

文章编号 : 0253-2239(2002)10-1219-05

荧光波长对共焦显微镜成像特性的影响^{*}

裴红津¹⁾ 唐志列¹⁾* * 杨初平¹⁾²⁾ 梁瑞生¹⁾ 汪 洁¹⁾ 徐险峰¹⁾

(1), 华南师范大学物理系, 广州 510631
(2), 华南农业大学理学院, 广州 510642

摘要: 导出了共焦显微镜中不同荧光波长情况下的荧光功率传输函数、三维脉冲响应函数(3D-PSF)和三维光学传递函数(3D-OTF)。结果表明,不同的荧光波长对共焦显微镜的空间截止频率、分辨率、光学传递函数存在明显的影响。当激发波长与荧光波长的比值下降到一定程度时,可以看到明显的失锥现象。

关键词: 荧光;共焦显微镜;成像特性

中图分类号: TH742.65 文献标识码: A

1 引 言

共焦扫描显微镜一经提出,就受到人们的关注。近十多年来,其理论研究和应用研究都取得了很大进展^[1~6]。共焦显微镜与普通光学显微镜相比具有极其明显的优点:能对物体的不同层面进行逐层扫描,从而获得大量的物体断层图像;可以利用计算机进行图像处理;具有较高的横向分辨率和纵向分辨率;对于透明和半透明物体,可以得到其内部的结构图像。在理论研究方面,绝大多数文献都只是讨论了荧光波长等于激发波长这一特殊情况^[7~14],很少讨论不同荧光波长对共焦显微镜成像特性的影响。由于荧光波长范围很宽,不同的荧光波长对成像特性存在明显的影响。因此选取合适的荧光波长进行成像,一方面可以提高成像质量,另一方面可以获得物体在不同荧光波长时的图像,为研究生物学细胞的生命过程提供影像学手段^[15,16]。本文讨论了不同荧光波长对共焦显微镜成像特性的影响。

2 共焦显微镜中的不同波长的荧光功率传输函数

共焦显微镜的原理图如图 1 所示,从这个系统出发导出不同荧光波长的功率传输函数。

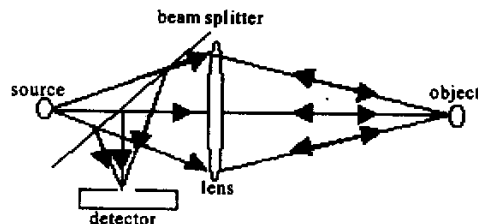


Fig.1 The diagram of confocal microscopy

对于点源、点探测器的共焦成像系统, v_s 、 v_d 分别为描述光源和探测器函数的光学坐标矢量, v_e 和 v_f 分别为以激发波长 λ_e 和荧光波长 λ_f 为单位的光学坐标矢量,由于单光子荧光正比于入射光振幅的二次方,因此物面上产生的单光子荧光强度分布为^[14]:

$$I_1(v_p - v_e) = \left| \iiint_{-\infty}^{\infty} S(v_s) h(v_e - v_s) dv_s \right|^2 \alpha(v_p - v_e), \quad (1)$$

式中 $h(v_e - v_s)$ 为激发光经过物镜 L 的三维脉冲响应函数, v_p 为扫描点的位置矢量。

从物面上的单光子荧光经物镜 L 和分束镜 BS 聚焦到探测器平面的成像过程属于非相干光成像过程,因此可以写出探测器平面上的单光子荧光强度分布为:

$$I_2(v_d, v_p) = \iiint_{-\infty}^{\infty} \left\{ \left| \iiint_{-\infty}^{\infty} S(v_s) h(v_e - v_s) dv_s \right|^2 \alpha(v_p - v_e) \right\} |h(v_d - v_f)|^2 dv_f. \quad (2)$$

考虑到探测器有一定的大小 $D(v_d)$,最后可写出图 1 所示的光学系统的单光子荧光功率传输函数为:

* 广东省自然科学基金(980046)资助课题。

* * 联系人 E-mail: tangzhl@scnu.edu.cn

收稿日期 2001-12-10;收到修改稿日期 2002-03-05

$$I_3(v_p) = \iiint_{-\infty}^{\infty} \left\{ \left| \iiint_{-\infty}^{\infty} S(v_s) h(v_e - v_s) dv_s \right|^2 \alpha(v_p - v_e) \right\} |h(v_d - v_f)|^2 dv_f D(v_d) dv_d. \quad (3)$$

考虑 $v_f = (\lambda_e/\lambda_f)v_e$, 交换 dv_e 和 dv_d 的积分次序后得:

$$I_4(v_p) = \iiint_{-\infty}^{\infty} \left\{ \left| \iiint_{-\infty}^{\infty} S(v_s) h_c(v_e - v_s) dv_s \right|^2 \iiint_{-\infty}^{\infty} |h(v_f - v_d)|^2 D(v_d) dv_d \right\} \alpha(v_p - v_e) dv_e = \{ |S(v_e) \otimes_3 h_c(v_e)|^2 [|h_f(v_f)|^2 \otimes_3 D(v_f)] \} \otimes_3 \alpha(v_p). \quad (4)$$

根据成像理论, 成像系统中像的光强分布是物的光强分布函数与系统的脉冲响应函数的卷积, 因此, 由(4)式得到图 1 所示的成像系统的三维脉冲响应函数为:

$$F(v) = \{ |S(v_e) \otimes_3 h_c(v_e)|^2 [|h_f(v_f)|^2 \otimes_3 D(v_f)] \}. \quad (5)$$

式中 \otimes_3 为三维卷积。

3 不同荧光波长对分辨率的影响

对于点源、点探测器的共焦显微镜成像系统, 有 $S(v_s) = \delta(v_s)$, $D(v_d) = \delta(v_d)$, 则由(5)式可得单光子荧光共焦显微镜的三维脉冲响应函数为:

$$F(v) = |h_c(v_e)|^2 |h_f(v_f)|^2, \quad (6)$$

式中 $h_c(v_e)$ 为激发光经过物镜 L 的三维振幅脉冲响应函数^[13],

$$h_c(v_e) = \iint_{-\infty}^{\infty} P(\xi, \eta) \exp\left[-\frac{j u_e}{2}(\xi^2 + \eta^2)\right] \times$$

$$\exp[-j(v_{ex}\xi + v_{ey}\eta)] d\xi d\eta, \quad (7)$$

式中 $h_f(v_f)$ 为荧光经过物镜 L 的三维振幅脉冲响应函数^[14],

$$h_f(v_f) = \iint_{-\infty}^{\infty} P(\xi, \eta) \exp\left[-\frac{j u_f}{2}(\xi^2 + \eta^2)\right] \times \exp\left[-j\left(\frac{\lambda_e}{\lambda_f}v_{ex}\xi + \frac{\lambda_e}{\lambda_f}v_{ey}\eta\right)\right] d\xi d\eta \quad (8)$$

$$\text{其中: } P(\xi, \eta) = \begin{cases} 1 & \xi^2 + \eta^2 \leq 1 \\ 0 & \text{others.} \end{cases} \quad (9)$$

$P(\xi, \eta)$ 为光学系统的光瞳函数, 而 $\xi = x/a$, $\eta = y/a$ 为归一化直角坐标, a 为光瞳半径。

为了研究不同荧光波长对共焦显微镜分辨率的影响, 下面分别从横向和纵向进行讨论。

3.1 荧光波长对横向分辨率的影响

在(7)式中, 令离焦参数 $u_e = 0$, 即可得到激发光经过物镜 L 在焦面上的二维脉冲响应函数:

$$h(v_{ex}, v_{ey}, 0) = \iint_{-\infty}^{\infty} P(\xi, \eta) \exp[-j(v_{ex}\xi + v_{ey}\eta)] d\xi d\eta = \frac{2J_1(\sqrt{v_{ex}^2 + v_{ey}^2})}{\sqrt{v_{ex}^2 + v_{ey}^2}}, \quad (10)$$

在(8)式中, 令离焦参数 $u_f = 0$, 即可得到荧光经过物镜 L 在焦面上的二维脉冲响应函数:

$$h(v_{fx}, v_{fy}, 0) = \iint_{-\infty}^{\infty} P(\xi, \eta) \exp\left[-j\left(\frac{\lambda_e}{\lambda_f}v_{ex}\xi + \frac{\lambda_e}{\lambda_f}v_{ey}\eta\right)\right] d\xi d\eta = \frac{2J_1\left[\left(\frac{\lambda_e}{\lambda_f}\right)\sqrt{v_{ex}^2 + v_{ey}^2}\right]}{\left(\frac{\lambda_e}{\lambda_f}\right)\sqrt{v_{ex}^2 + v_{ey}^2}}, \quad (11)$$

J_1 为一阶贝塞尔函数。把(10)式、(11)式代入(6)式, 得单光子荧光显微镜中焦斑的横向分布:

$$I(v_{ex}, v_{ey}, 0) = \left[\frac{2J_1(\sqrt{v_{ex}^2 + v_{ey}^2})}{\sqrt{v_{ex}^2 + v_{ey}^2}} \right]^2 \times \left[\frac{2J_1\left[\left(\frac{\lambda_e}{\lambda_f}\right)\sqrt{v_{ex}^2 + v_{ey}^2}\right]}{\left(\frac{\lambda_e}{\lambda_f}\right)\sqrt{v_{ex}^2 + v_{ey}^2}} \right]^2. \quad (12)$$

当荧光波长等于激发波长时, 单光子共焦显微镜焦斑的横向分布是^[14]

$$I(v_{ex}, v_{ey}, 0) = \left[\frac{2J_1(\sqrt{v_{ex}^2 + v_{ey}^2})}{\sqrt{v_{ex}^2 + v_{ey}^2}} \right]^4. \quad (13)$$

对(12)式进行计算, 得到不同荧光波长情况下, 单光

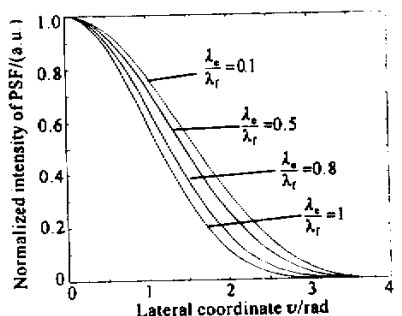


Fig.2 The lateral fluorescence point spread function (PSF)

子荧光的横向分布如图 2 所示。可以看出,在单光子共焦显微镜中,激发波长与荧光波长的比值越大,焦斑的横向分布越窄,对应的横向分辨率越高。

3.2 荧光波长对纵向分辨率的影响

$$h_z(0,0;iu_e) = \iint_{-\infty}^{\infty} P(\xi,\eta) \exp\left[-j\frac{u_e}{2}(\xi^2 + \eta^2)\right] d\xi d\eta = \frac{\text{si}\left(\frac{u_e}{4}\right)}{u_e/4}, \quad (14)$$

$$h_z(0,0;iu_f) = \iint_{-\infty}^{\infty} P(\xi,\eta) \exp\left[-j\frac{(\lambda_e/\lambda_f)u_e}{2}(\xi^2 + \eta^2)\right] d\xi d\eta = \frac{\text{si}\left[\frac{u_e\lambda_e/(4\lambda_f)}{u_e\lambda_e/(2\lambda_f)}\right]}{u_e\lambda_e/(2\lambda_f)}. \quad (15)$$

把 (14) 式、(15) 式分别代入 (6) 式得：

$$K(0,0;iu_e) = \left[\frac{\text{si}\left(\frac{u_e}{4}\right)}{u_e/4}\right]^2 \left\{\frac{\text{si}\left[\frac{u_e\lambda_e/(4\lambda_f)}{u_e\lambda_e/(2\lambda_f)}\right]}{u_e\lambda_e/(2\lambda_f)}\right\}^2 \quad (16)$$

当荧光波长等于激发波长时,单光子共焦显微镜焦斑的纵向分布为^[10]：

$$K(0,0;iu_e) = \left[\frac{\text{si}\left(\frac{u_e}{4}\right)}{u_e/4}\right]^4. \quad (17)$$

对 (16) 式进行数值分析,结果如图 3 所示,可以得到类似横向分辨率的结论:在单光子共焦显微镜中,

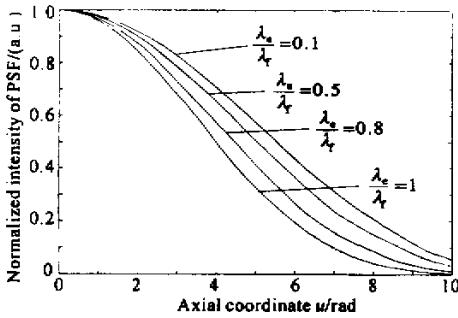


Fig. 3 The axial fluorescence point spread function (PSF)

在 (7) 式、(8) 式中,令 $v_{ex} = v_{ey} = v_{fx} = v_{fy} = 0$, 即横向坐标为零,则可分别得到激发光和荧光经过物镜 L 的三维脉冲响应函数在光轴上的分布：

激发波长与荧光波长的比值越大,焦斑的纵向分布越窄,纵向分辨率越高。

4 不同荧光波长对三维光学传递函数的影响

为讨论方便,我们引入归一化空间频率：

$$v_x = \frac{\lambda}{\sin\alpha} f_x,$$

$$v_y = \frac{\lambda}{\sin\alpha} f_y,$$

$$\mu = \frac{\lambda}{\sin^2\alpha} f_z,$$

式中 f_x 、 f_y 、 f_z 为空间频率。

以荧光波长 λ_f 为单位的空间频率和以激发波长 λ_e 为单位的空间频率存在下列关系：

$$v_f = \frac{\lambda_f}{\lambda_e} v_e.$$

引用下列关系^[10]：

$$\mathcal{F}\{|h(\mathbf{v})|^2\} = \begin{cases} \frac{1}{v} \left[1 - \left(\frac{|\mu|}{v} + \frac{v}{2}\right)^2\right]^{1/2}, & |\nu| \leq 2, |\mu| \leq v - \frac{v^2}{2} \leq \frac{1}{2} \\ 0, & \text{others} \end{cases} \quad (18)$$

对 (6) 式作三维傅里叶变换,即可得到不同荧光波长时的单光子共焦显微镜的三维光学传递函数：

$$H(v_x, v_y, i\mu) = \iiint_{-\infty}^{\infty} \frac{\lambda_e/\lambda_f}{\left[\left(x + v_x/2\right)^2 + \left(y + v_y/2\right)^2\right]^{1/2} \left[\left(x - v_x/2\right)^2 + \left(y - v_y/2\right)^2\right]^{1/2}} \times \left\{1 - \left[\frac{|z + \mu/2|}{\left[\left(x + v_x/2\right)^2 + \left(y + v_y/2\right)^2\right]^{1/2}} + \frac{\left[\left(x + v_x/2\right)^2 + \left(y + v_y/2\right)^2\right]^{1/2}}{2}\right]^2\right\}^{1/2} \times \left\{1 - \left[\frac{|z - \mu/2|}{\left[\left(x - v_x/2\right)^2 + \left(y - v_y/2\right)^2\right]^{1/2}} + \frac{\left[\left(x - v_x/2\right)^2 + \left(y - v_y/2\right)^2\right]^{1/2}}{2\lambda_e/\lambda_f}\right]^2\right\}^{1/2} dx dy dz, \quad (19)$$

式中, v 为横向归一化空间频率, μ 为纵向归一化空间频率。由 (19) 式可以推出不同荧光波长条件下,单光子共焦显微镜的纵向截止频率与横向截止频率

满足：

$$|\mu| \leq \frac{(1 + \lambda_e/\lambda_f)}{2}, \quad |\nu| \leq 2\left(1 + \frac{\lambda_e}{\lambda_f}\right). \quad (20)$$

当荧光波长等于激发波长时 $\lambda_f/\lambda_e = 1$,

$$|\mu| \leq 1, \quad |\nu| \leq 4,$$

与文献 10 结果一致。

对 (19) 式进行数值计算,可以得到在不同激发波长时,光学传递函数的三维曲线图。由图 4 可以得到以下结论:当荧光波长大于激发波长时,随着激发波长与荧光波长比值的增大,曲线越来越饱满,系统的成像效果越好。当激发波长与荧光波长的比值等于 0.1 时,可以看到明显的失锥现象。

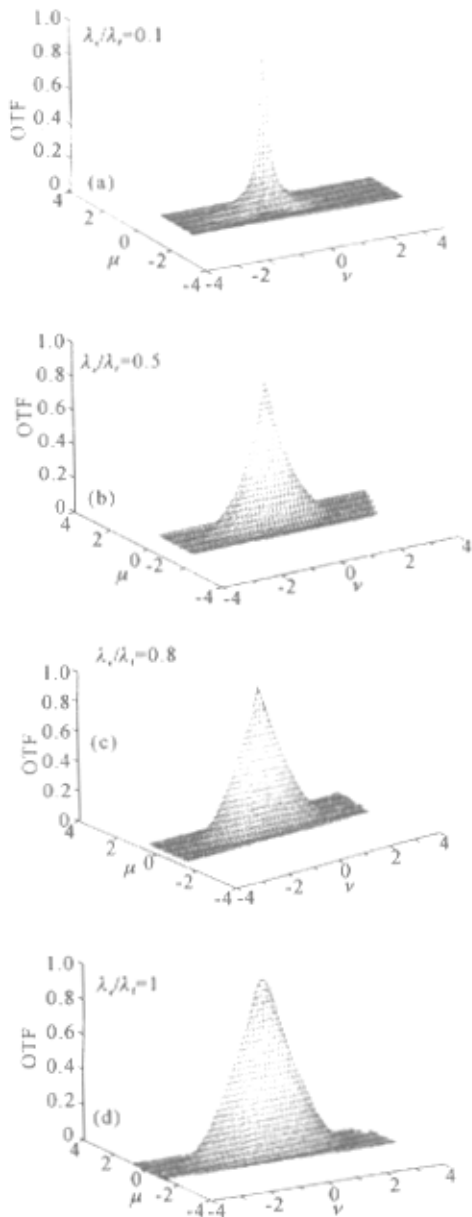


Fig. 4 Three-dimensional views of the normalized 3-D OTF

5 实验结果

实验上,我们设计出实用的共焦显微镜的光路

图^[17]在此基础上,成功研制了一台偏振共焦扫描显微镜。可以对不同的样品进行透射式或反射式成像,先后得到了集成电路^[1]、生物组织^[17]等样品的成像图片。图 5 是我们得到的不同层面的花粉图像。

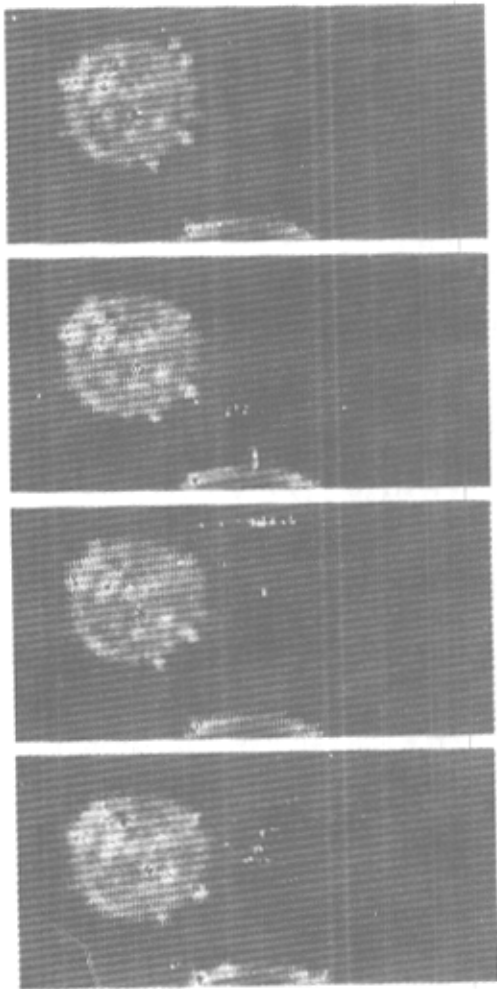


Fig. 5 Images of a pollen

结论 讨论了不同荧光波长对共焦显微镜的荧光功率传递函数、三维脉冲响应函数、焦斑的空间分布和三维光学传递函数的影响,得到了它们在不同激发波长与荧光波长比值时具体的表达式,并且通过数值计算,得到了它们的曲线图,结果表明,随着激发波长与荧光波长比值的增加,焦斑的横向分布和纵向分布变窄,横向分辨率和纵向分辨率提高,系统的成像效果变好。当激发波长与荧光波长的比值下降到一定程度时,可以看到明显的失锥现象,严重地影响了成像效果。

参 考 文 献

[1] Tang Zhilie, Lang Ruisheng, Zhu Xiaosong *et al.*. Study on imaging property of polarized confocal scanning

- microscopy. *Acta Optica Sinica*(光学学报), 1999, **19**(8):1118~1122 (in Chinese)
- [2] Hell S W, Booth M, Wilms S. Two-photon near- and far-field fluorescence microscopy with continuous-wave excitation. *Opt. Lett.*, 1998, **23**(15):1238~1240
- [3] Sanchez E J, Novotny L, Xie X S. Near-field fluorescence microscopy based on two-photon excitation with metal tips. *Phys. Rev. Lett.*, 1999, **82**(20):4014~4017
- [4] Xia A D, Wada S, Tashiro H. Optical data storage in C₆₀ doped polystyrene film by photo-oxidation. *Appl. Phys. Lett.*, 1998, **73**(10):1323~1325
- [5] Cumpstern B H, Ananthavel S P, Barlow S *et al.*. Two-photon polymerization initiators for three-dimensional optical data storage and microfabrication. *Nature*, 1999, **398**(6722):51~54
- [6] Sun H B, Matsuo S, Misawa H. Three-dimensional photonic crystal structures achieved with two-photon-absorption photopolymerization of resin. *Appl. Phys. Lett.*, 1999, **74**(6):786~788
- [7] Sheppard C J R, Cu M, Mao X Q. Three-dimensional coherent transfer function in a reflection-mode confocal scanning microscopy. *Opt. Commun.*, 1991, **81**(5):281~284
- [8] Gan X, Gu M, Sheppard C T R. Fluorescent image formation in the fibre-optical confocal scanning microscope. *J. Mod. Opt.*, 1992, **39**(4):825~834
- [9] Drazic V. Three-dimensional transfer function of coherent confocal microscopes with extended source and detector. *J. Mod. Opt.*, 1992, **39**(8):1777~1790
- [10] Tang Zhilie, Huang Zuohua, Lang Ruisheng *et al.*. The vertical resolution limit and it's criterion of confocal microscopes. *Chinese J. Quant. Electron.*(量子电子学报), 2000, **17**(3):199~204 (in Chinese)
- [11] Zhang Ping, Wu Zhen, Wang Cuiying *et al.*. Imaging optimization of fluorescence confocal scanning system. *Acta Optica Sinica*(光学学报), 1997, **17**(3):308~313 (in Chinese)
- [12] Huang Jin, Lang Ruisheng, Situ Da *et al.*. The optical transfer function of confocal scanning microscopy with Gauss source. *Acta Physica Sinica*(物理学报), 1998, **47**(8):1289~1294 (in Chinese)
- [13] Gu Ming. *Principles of Three-Dimensional Imaging In Confocal Microscopies*. Singapore: World Scientific, 1996
- [14] Tang Zhilie, Liang Ruisheng, Chang Hongsen. The Theory of two-photon confocal microscopy. *Acta Physica Sinica*(物理学报), 2000, **49**(6):1076~1080 (in Chinese)
- [15] Amos W, Bwhite J G, Fordham M. Use of confocal imaging in the study of biological structures. *Appl. Opt.*, 1987, **26**(16):3239~3243
- [16] Xing Da, Zhou Junchu, Yu Yanhua *et al.*. Green fluorescent protein imaging by laser confocal microscope. *Acta Optica Sinica*(光学学报), 1999, **19**(10):1439~1440 (in Chinese)
- [17] Pei Hongjin, Liang Ruisheng, Tang Zhilie *et al.*. The imaging studies of polarized confocal scanning microscopy. *J. South China Normal University (Natural Science Edition)* [华南师范大学学报(自然科学版)], 2001, **3**:89~92 (in Chinese)

Influence of Fluorescent Wavelength on Imaging Property of Confocal Microscopy

Pei Hongjin¹⁾ Tang Zhilie¹⁾ Yang Chuping¹⁾²⁾ Liang Ruisheng¹⁾
Wang Jie¹⁾ Xu Xianfeng¹⁾

(1), Department of Physics, South China Normal University, Guangzhou 510631)
(2), College of Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

(Received 10 December 2001 ; revised 5 March 2002)

Abstract : Fluorescence power transfer function, three-dimensional point spread function (3D-PSF) and three-dimensional optical transfer function (3D-OTF) for the various fluorescent wavelength are calculated. The results show that the fluorescent wavelength has influence on imaging property of confocal microscopy such as spatial cut-off frequency, resolution and 3D-OTF. There is a missing-cone in the 3-D space of OTF when the ratio of excitation wavelength to fluorescent wavelength decreases.

Key words : fluorescent wavelength ; confocal microscopy ; imaging property