

文章编号 : 0253-2239(2002)10-1229-07

共焦扫描荧光显微镜的信噪比与信息量^{*}

高万荣 杨晓春 黄琳 胡茂海 袁祥岩 陶纯堪 卞松玲

(南京理工大学电光学院, 南京 210094)

摘要: 在研制用于对厚的生物样品进行光学断层成像的共焦扫描荧光显微镜时, 由于成像信号十分微弱及存在很强的多次散射作用, 因此杂散光的抑制非常重要, 而信噪比、信号背景比就成为决定能否获得高对比度、高分率图像的关键。运用光学信息量的概念, 在已有的光学成像系统信息量计算、共焦扫描荧光显微镜信噪比及传递函数计算的基础上, 详细分析了共焦扫描荧光显微镜信息量与信噪比等之间的定量关系。该关系表明, 为了充分利用共焦扫描荧光显微镜的成像性能, 必须选择适当的探测小孔。所得的结果对于共焦扫描荧光显微成像系统的研制有重要的实用价值。

关键词: 共焦荧光显微镜; 信噪比; 信息量

中图分类号: TH742.64 文献标识码: A

1 引 言

共焦扫描荧光显微成像技术是近 50 年来在显微成像领域所提出的一种最重要的成像技术, 它是一种将聚焦照明与空间滤波探测结合起来, 因而探测衍射限制焦面体积之中的信号 S , 而抑制掉该焦面体积元外产生的背景 B 。这种独特的高选择性探测技术, 减少了影像模糊, 增加了有效分辨率, 因而可以对厚的散射样品成十分清晰的图像。除了减少影响像模糊和改进分辨率之外, 对焦面外背景光的抑制, 还增加了图像的对比度和信息量^[1~6], 因为这种技术有效地提高了图像的信噪比(S/N)。由于具有这样一些独特的成像特性, 特别是其在生物医学临床诊断等方面的巨大应用前景, 因此人们采用不同的方法从不同的侧面对这种成像技术进行了研究, 包括传递函数的计算^[7~14]、电磁场方法^[15]、蒙特卡罗模拟分析^[16]、共焦显微术与外差显微术的比较研究^[17]、共焦显微术轴向分辨率的精确计算^[18]、信噪比分析^[19, 20]、对比度分析^[21]等。Cox 等^[22]则用光学系统传递的信息量的概念分析了共焦扫描显微镜的成像特性^[22]。所有这些分析从不同的方面揭示了共焦显微术独特的成像特性。然而, 还没有人采用光学系统信息量与信噪比相结合的方法分析共焦显微术, 特别是共焦荧光显微术由于其高的信噪比,

因而对于同一样品, 可以比普通显微成像系统传输更多的信息量。这对于生物组织的显微成像具有重要的实用价值。因为生物组织的荧光信号十分微弱, 为了获得高对比度高分辨率的图像, 背景光及杂散光的抑制就成为一个关键问题。

本文主要讨论光学成像系统信息量的基本理论, 分析共焦荧光显微术的信噪比, 计算其信息量, 并将计算结果与普通显微成像系统的信息量进行比较。最后给出用我们研制的一台共焦荧光显微镜采集的一些生物样品的共焦荧光显微断层图像。

2 基本理论

Abbe 第一个阐述了在相干照明条件下, 由于衍射现象所决定的光学系统分辨率的极限。该经典分辨率极限的现代的而且更准确的表述形式为: 光学系统传输一个有限的空间频率带宽, 该带宽由系统的角孔径和照明光的波长所决定。Lukosz^[1]则证明, 对于一个给定的光学系统, 并不是其所传输的空间频率带宽是不变的, 仅仅是光学系统所传输的光学信息的自由度 N 是不变的。光学信息的自由度 N 等于视场大小与光学系统的带宽之积, 乘以由于存在两个独立的偏振态而引入的因子 2, 再乘以系统的时间自由度 N_t , 即

$$N = 2N_{xy}N_t, \quad (1)$$

空间自由度为

$$N_{xy} = (1 + L_x \Delta k_x / 2\pi) (1 + L_y \Delta k_y / 2\pi), \quad (2)$$

式中 L_x 、 L_y 分别为图像在 x 与 y 方向上的宽度,

* 南京理工大学青年基金资助课题。

E-mail: th-daring@sohu.com

收稿日期 2001-02-28; 收到修改稿日期 2001-07-16

$\Delta k_x, \Delta k_y$ 表示空间频率, 对于 $L_x \Delta k_x \gg 2\pi$ 及 $L_y \Delta k_y \gg 2\pi, N_{x,y}$ 则变为图像大小 S 与两维空间带宽之积:

$$N_{x,y} = L_x L_y \Delta k_x \Delta k_y / 4\pi^2 = SW, \quad (3)$$

时间自由度数为

$$N_t = \mathcal{X}(1 + T\Delta\nu), \quad (4)$$

式中 T 为观察时间, $\Delta\nu$ 为系统的时间域带宽。对于 $T\Delta\nu \gg 1, N_t$ 则变为与时间带宽积成正比:

$$N_t = 2T\Delta\nu. \quad (5)$$

(4) 式中的因子 2 是因 N 的定义而引入的, 即 N 是完全描述一个波场的必要实参量的数目。对于一个经典波场, 每个场振子的振幅和相位都必须加以规定。按照这个传输信息自由度不变定理, 可以减小光学系统的视场, 而将带宽扩展到衍射受限的频率值之外, 也可以通过减小系统所传输的时间频率带宽, 而使所传输的空间频率带宽扩展到衍射受限的频率值之外。然而, 可能达到的空间带宽受隐失波 (evanescent wave) 的出现的限制^[2]。如果物体被垂直入射照明, 则物体的空间频率中, 只有满足 $k_x^2 + k_y^2 = k^2$ 的那些频率, 才给出自由传播的平面波, 而对 $k_x^2 + k_y^2 > k^2$ 的所有其他的空间频率相应的为隐失波, 其振幅在物体之后随距离呈指数衰减, 因此当距离远大于波长时, 其值便探测不到, 因为一个光学系统只能传输传播波。角孔径 $2\alpha_x = 180^\circ$ 的普通光学系统传输所有的传播波。在 k_x 方向上, 其空间带宽为

$$\Delta k_x / 2\pi = 2/\lambda, \quad (6)$$

其二维带宽为

$$W = (2\pi)^{-2} \iint_{(k_x^2 + k_y^2 \leq k^2)} dk_x dk_y = \pi/\lambda^2. \quad (7)$$

当倾斜照明时, 空间带宽并不改变, 但这时, 不同的空间频率

$$[k_x - k_x^s] + [k_y - k_y^s] \leq k^2, \quad (8)$$

与传播平面波相对应。显然, 传播平面照明波的波矢量分量 k_x^s, k_y^s 应满足条件

$$[k_x^s]^2 + [k_y^s]^2 \leq k^2, \quad (9)$$

式中等号相应于在掠入射照明的情形。

由此可见, 提高光学系统的通带宽度, 即为获得高分辨率的光学系统, 可以采用将在不同入射角照明下, 普通光学系统所通过的不同空间频率带宽相结合的方法来实现。对于角孔径为 $2\alpha_x$ 的普通光学系统, 则在适当的照明下 [包括掠入射情况 $k_x^s =$

$\pm k, k_y^s = 0$] 则得到的高分辨率系统在 k_x 方向上的带宽变为

$$\Delta k_x / 2\pi = \mathcal{X}(1 + \sin\alpha_x) \lambda, \quad (10)$$

对于 $\alpha_x = 90^\circ$ 则

$$\Delta k_x / 2\pi = 4/\lambda. \quad (11)$$

高分辨系统在一个方向上的最大通带宽度是普通系统通带宽度的 2 倍, 高分辨率系统的两维空间带宽是普通系统的 4 倍。由上面的分析可以看出, 仅仅单从光学系统的信息量不变定理出发, 可以推出光学系统的通带宽度可以任意高。然而, 由于隐失波的存在, 使得高分辨率系统的最大一维空间带宽是角孔径为 180° 的普通系统带宽的 2 倍。尽管有这个限制, 光学系统的信息量不变定理表明, 通过改变影响光学系统信息量的其他参量, 可以使其通带宽度展宽, 因而使系统的分辨率提高。因此该定理是现代高分辨率显微成像系统的重要理论基础之一。

上面的分析是在没有噪声的条件下进行的, 实际上系统中的噪声会影响其所传递的信息量。Bendinelli 等^[3] 证明, 对于一个焦距为 f 、通光孔径为 $D \times D$ 、视场大小为 $L_x \times L_y$ 的系统, 在非相干照明和有噪声的情况下, 其传递的有效空间自由度数为

$$N_{\text{eff}} = \left(\frac{4C_x}{\pi} \right) \left(\frac{4C_y}{\pi} \right) \left[1 - \left(\frac{S}{N} \right)^{1/2} \right]^2, \quad (12)$$

式中 S/N 为信噪比,

$$C_x = \frac{\pi L_x D_x}{4\lambda f}, \quad C_y = \frac{\pi L_y D_y}{4\lambda f}. \quad (13)$$

上面是信噪比对平面自由度的影响关系式。根据光学系统所能传递的总信息量的公式^[4]:

$$N = (2L_x B_x + 1) \mathcal{X} (2L_y B_y + 1) \mathcal{X} (2L_z B_z + 1) \times (2TB_T + 1) \log_2(1 + S/N), \quad (14)$$

式中 $L_x L_y$ 为视场大小, $B_x = D_x / (2\lambda f), B_y = D_y / (2\lambda f)$ 分别是系统在 x, y 方向上所能传递的最高空间频率, L_z 为景深, B_z 为 z 方向上的空间带宽, T 是观察时间, B_T 为系统时间带宽。式中常数 1 为考虑到当带宽 B_T 等起于 0 时, 信号成为一个不变的直流信号, 因此, 需要一个单一的测量值来唯一地加以规定。

综合 (12) 式及 (14) 式, 便可得出在有噪声的情况下, 光学系统所能传递的有效信息量可以表示为

$$N_E = N_{\text{eff}} N_z N_T \log_2(1 + S/N), \quad (15)$$

式中 N_{eff} 如 (12) 式所示, $N_z = (2L_z B_z + 1), N_T = 2TB_T + 1$ 。

3 共焦扫描荧光显微镜的信噪比和信息量

共焦扫描荧光显微镜最重要的特点之一就是它可以对厚的生物样品等实现光学断层成像。这也是它得到深入研究和不断寻找新的应用的最主要的原因。我们在多年进行共焦扫描荧光显微术的实验研究和产品开发中发现^[29~33]，由于荧光信号很微弱，常常因为背景信号或者杂散光，使得很难探测到有用信息。如图 1 所示为一生物的扫描图像，由于背景光及杂散光的影响，因而样品的细节信息受到了干扰。我们知道，从信息论的观点来看，光学成像系统就是一个传递信息的系统。因此有必要建立光学成像系统的传递的信息量的多少与信噪比等参量之间的定量关系。从(15)式可以看出，信噪比从两个方面影响光学系统传递有效信息量。一方面通过(12)式影响成像系统的有效自由数，另一方面通过(15)式影响光学系统的传递的有效信息量。因此，建立共焦扫描荧光显微镜传递的信息量与信噪比之间的定量关系，是提高共焦荧光显微系统光学断层成

像能力的影响因素、获得高分辨率图像的根本方法。

3.1 信噪比分析

显微镜的成像性质由其点扩展函数所决定。点扩展函数则是物镜的数值孔径 NA、成像光束的波长(λ)以及样品折射率 n_R 的函数。当用无量纲的归一化光学坐标表示时，则点扩展函数可以表示为一个与这些实验参量无关的函数^[20]。当选择满足正弦成像条件的光学单位时，则在样品中，距离光轴的距离 v 及距离焦平面的距离 u 由下式给出：

$$v = k(\text{NA})r, \quad (16)$$

$$u = ka^2 z/f^2, \quad (17)$$

式中 $k = 2\pi/\lambda$ 是真空中波数， $\text{NA} = n \sin \alpha$ ， α 是物镜聚焦光束的半孔径角， r 为距离光轴的距离， a 为物镜通光孔径的半径， z 为距离焦平面的距离。在像平面上，离轴距离 v_1 可通过在(16)式中用 NA/M 代替 NA 而得到，式中 M 为成像放大系数。由定义，像面始终位于 $u = 0$ 的位置，因为它与位于焦平面的样品平面($u = 0$)光学共轭。对于无像差的透镜，则强度点扩展函数可以表示为

$$h^2(u, v) = \left| \frac{2\pi a^2}{\lambda^2 d_o d_i} \int_0^1 r' J_0(vr') \exp\left\{ \frac{1}{2} j u \left[-\frac{(d_o + f)f'}{d_o d_i} \right] dr'^2 \right\} dr' \right|^2, \quad (18a)$$

式中 d_o 、 d_i 分别为物距和像距， J_0 为零阶贝塞尔函数。我们假定样品为弱吸收的(光学薄样品)，且没有任何光致漂白，无任何荧光饱和以及无任何斯托克斯偏移现象^[15]。当 $d_o \gg f$ (透镜焦距)时，则上式简化为

$$h^2(u, v) = \left| \frac{2\pi a^2}{\lambda^2 d_o d_i} \int_0^1 r' J_0(vr') \exp\left(-\frac{1}{2} j u r'^2\right) dr' \right|^2. \quad (18b)$$

一般的荧光显微镜的原理图如图 1 所示。由点光源发出的激发光束被一个半透半反射镜反射后，然后由物镜聚焦到荧光样品上。由被扫描的物体上激发出来的荧光由同一物镜收集后，通过半透半反射镜到达探测小孔，由光电倍增管接收。对物体或者光束进行扫描，便可以得到一组有序的信号，这组有序的信号显示在屏幕上，便可以得到被扫描物体的图像。激发功率 P_0 被物镜 L_0 成像在样品中，由此而产生的随空间位置而变化的激发强度与 $(P_0/A) i_c(u, v)$ 成正比。式中 A 为被成像的位于焦面的样品面积， $i_c(u, v)$ 则是激发光强度归一化分布函数。在位置 (u, v) 处的一个微小

样品体积元 $dudv^2 = dudv d\theta$ 中，所产生的荧光光子的数目与下式成正比：

$$n = Q\sigma d u d v^2 F(u, v) (p_0/A) i_c(u, v) \tau, \quad (19)$$

式中 Q 是吸收截面积为 σ 的荧光色团的量子效率， $F(u, v)$ 为局部荧光色团浓度， τ 为采集一幅平面图像所要求的时间。

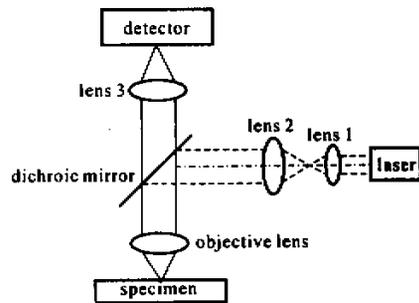


Fig. 1 Schematic of confocal scanning fluorescence microscopy

假定每个发射的能量为 $h\nu$ 的荧光光子以某一个与位置有关的系数 q 被物镜收集并传输到像面。位于位置为 u 的整个样品平面上所收集的荧光在像面上以平面荧光分布与点扩展函数卷积的形式重新

分布。然后,对整个样品厚度 t 求和便得到总的像强度。最后,所探测的光子数等于像强度沿整个探测器

孔径 D 的积分与探测系数 ϵ 之积。由此,所探测的信号光子数 n_s 或背景光子数 n_b 由下式给出^[20]:

$$\left. \begin{aligned} n_s &= \frac{\epsilon q Q \sigma P_0 \tau}{A h \nu} \int_0^{v_0} d v_1^2 \int_{-u_0}^{v_0} d u [F_s(u, v) i_e(u, v) \otimes h^2(u, v)], \\ n_b &= \frac{\epsilon q Q \sigma P_0 \tau}{A h \nu} \int_0^{v_0} d v_1^2 \int_{-u_0}^{v_0} d u [F_b(u, v) i_e(u, v) \otimes h^2(u, v)], \end{aligned} \right\} \quad (20)$$

式中 $v_0 = \frac{k(\text{NA})}{2} v_D$, $u_0 = \frac{1}{2} k a^2 t / f^2$, $d v^2$ 为像平面上的微分面积元, $F(u, v)$ 的形式取决于样品是离散的或连续的,以及所计算的量是信号还是背景, \otimes 为卷积运算。

信号 S 被定义为所探测到的由分辨体积 V_R 中所发出的荧光光子。显然,分辨体积的大小随分辨率标准定义的不同而变化。由于点扩展函数的 $1/e^2$ 等强度曲面所包围的分辨体积既可以获得高的信号,又能获得高的空间分辨率。因此,在我们的计算中,将分辨体积 V_R 定义为 $1/e^2$ 轮廓所包围的体积^[20]。当采用光学坐标表示时,该分辨体积的短半径为 2.6,长半径为 8.7,其所包围的体积等于 264。在连续样品中,包围在 V_R 中的荧光色团被定义为信号,因此,信号荧光色团的分布变为

$$F_s(u, v) = \begin{cases} C_0 [v^2 + (0.3u)^2]^{1/2} < 2.6 \\ 0 & \text{others,} \end{cases} \quad (21)$$

式中 C_0 为均匀分布的荧光色团的浓度,对于 t 大于分辨体积轴向长度(17.4), $n_s(u_0)$ 与样品厚度无关。因此,便得出信号光子的计算公式为

$$n_s(v_D, t) = C \int_D d v^2 \int_{V_R} h^4(u, v) v d v d \theta d u, \quad (22)$$

式中 $C = \epsilon q Q \sigma P_0 \tau C_0 / A h \nu$ 。

对于连续样品,位于分辨体积 V_R 外的荧光色团发出的荧光便是背景荧光,因此,背景荧光色团分布由下式给出:

$$F_b(u, v) = C_0 - F_s(u, v), \quad (23)$$

背景光子数由下式给出:

$$n_b(v_D, t) = \left[C \int_D d v^2 \int_{-t/2}^{t/2} d u i_e(u, v) \otimes h^2(u, v) \right] - n_s(v_D, t). \quad (24)$$

如前所述,一幅荧光图像的信息量由其信噪比

决定,且通常被限制于散粒噪声。散粒噪声等于 $\sqrt{n_t}$, 式中 n_t 为所探测的总的光子数。在没有背景时,所有探测到的光子都是信号,因此信噪比 $\beta = \sqrt{n_t}$ 。在有背景时,散粒噪声仍然等于 $\sqrt{n_t}$, 但并不是所有探测到的光子都是信号,令 $n_t = \sqrt{S+B}$, 并用 S 和 S/B 表达 β , 则有^[20]

$$\beta(v_D, t) = S(v_D)^{1/2} \left[\frac{(S/B)(v_D, t)}{1 + (S/B)(v_D, t)} \right]. \quad (25)$$

由(25)式可以看出,信噪比是样品厚度和探测器半径 v_D 的函数。对于共焦成像当采用光学坐标时,探测器半径通常小于 4,但即使是 $v_D = 20$ 时,可以抑制掉 700 厚的样品中所产生的背景光而信号则没有任何减小。在共焦显微镜中,所探测的背景光的 97% 是由 $t < 100$ 中的样品中产生的,因此对 $t > 100$, $n_b(v_D, t)$ 几乎与样品的厚度无关^[20]。因此,我们分析共焦显微术与普通显微术的信息量时取样品厚度 $t = 100$, 共焦显微术的探测器小孔半径 $v_D < 0.5$, 普通显微术的 $v_D = \infty$ 。在这个条件下,共焦显微镜的 $n_s(v_D)$ 近似等于孔径面积 πv_D^2 与峰值强度之积^[15]:

$$n_{sco}(v_D) = 4\pi^2 C U_D^2 \times 3.7 = 14.8\pi^2 C v_D^2, \quad (26)$$

普通显微镜的信号则为

$$n_{sco}(\infty) = 120\pi^2 C, \quad (27)$$

共焦显微镜中的背景信号为

$$n_{bco}(v_D, t) = 4\pi^2 C v_D^2 \times 1.4 = 5.6\pi^2 C v_D^2. \quad (28)$$

普通显微镜中的背景:

$$n_{bco}(\infty, t) = 16\pi^2 C [0.97t - 7.6], \quad (29)$$

因此,对共焦显微镜有

$$\frac{n_{sco}(v_D, t)}{n_{bco}} = \frac{14.8\pi^2 C v_D^2}{5.6\pi^2 C v_D^2} = 2.6, \quad (30)$$

普通显微术中的信号背景比为

$$\frac{n_{sco}(\infty)}{n_{bco}(\infty, t)} = \frac{7.5}{[0.97t - 7.6]} \quad (31)$$

由上式可以看出,在这个条件下,共焦显微镜的信号背景比与探测器孔径及样品厚度无关,这个独特的性质使其可以用来更真实地提示生物样品的内部结构。

相反,普通显微镜中的信号背景比则与样品厚度有关,并且随着样品厚度的增加而迅速减小。由此可见,普通显微术中所得到的图像与所测样品厚度的大小有关,随着样品厚度的变化而变化,因而所反映样品内部真实形貌有一定误差。

由上式可以得出共焦显微镜中的信噪比为

$$\beta(v_D, t) = 8.72 \sqrt{C} v_D, \quad (32)$$

普通显微镜中的信噪比为

$$\beta(\infty, t) = \frac{4\pi \times 7.5 \sqrt{7.5C}}{[0.97(t) - 7.6] + 0.75} = \frac{258 \sqrt{C}}{0.97(t) - 0.1} \quad (33)$$

$$R = 8 \frac{[1 - (8.72 v_D)^{1/2}] \log_2(1 + 8.72 v_D)}{\{1 - [258/(0.97t - 0.1)]^{1/2}\} \log_2[1 + 258/(0.97t - 0.1)]} \quad (36)$$

式中为简化起见,我们没有考虑常数 C 。

图 2 所示为当 $t = 100$ 时, R 与 v_D 的关系曲线。由图可以看出当 v_D 很小时,由于共焦面上有用的信号也被遮挡而不能到达探测面,因而共焦系统并不能比普通系统传递更多的信息量。只有当 v_D 足够大时,共焦系统才能比普通系统传递更多的信息量。所以在研制实际的共焦扫描荧光显微成像系统时,要选择恰当的探测小孔。

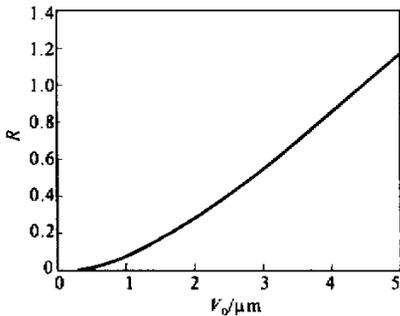


Fig. 2 Relationship between R and v_D for $t = 100$

图 3 给出了利用我们所设计的共焦扫描荧光显微成像系统所采集的藻类植物的光学断层图像,尽管该样品的荧光信号极其微弱,但由于选择了适当的孔径以探测信号,从而在获得高分辨率图像的同时,最大限度地探测有用信号,以提高信噪比,同时在整个光学系统的设计中均严格采取了抑制杂散光

3.2 信息量分析及试验结果

由前面分析可知,光学系统的信息量可表达为

$$N = N_{\text{eff}} N_z N_T \log_2(1 + \beta), \quad (34)$$

式中

$$N_{\text{eff}} = (2L_x B_x + 1)(2L_y B_y + 1)(1 - \beta^{1/2})^2.$$

当常数 1 可以忽略不计时,上式变为

$$N = (2B_T T)(2L_z B_z)(2L_x B_x)(2L_y B_y) \times (1 - \beta^{1/2})^2 \log_2(1 + \beta). \quad (35)$$

在成像条件相同(即 B_T 、 T 、 L_x 、 L_y 、 ΔL_z 均相同)的情况下,根据前面的分析,由于共焦扫描荧光显微系统在 x 、 y 、 z 方向上的通带宽度均为普通显微术的两倍,因此共焦系统所传递的信息量在没有考虑信噪比的情况下,至少要比普通系统高出 8 倍。由(32)式和(33)式,可以得出在考虑通带宽度和信噪比的情况下,共焦系统与普通系统的信息量之比为

的措施,因而可以获得不同断层的清晰图像。

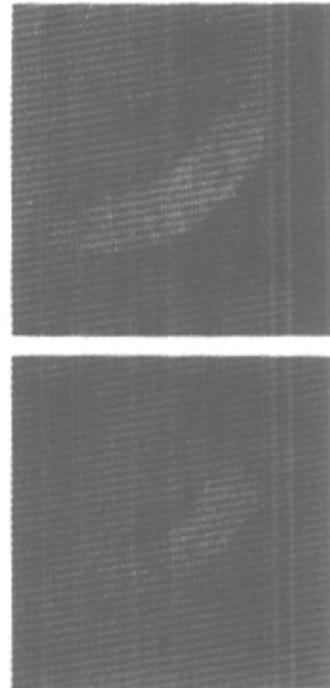


Fig. 3 Images obtained from phycophyta with a confocal fluorescence microscope designed by authors

结论 光学系统所传递的信息量是评价光学系统成像性能的一个综合定量指标。本文在已有多种研究成果的基础上,分析了共焦扫描荧光显微镜所传递

的信息量与通带宽度、视场大小及信噪比之间的依赖关系,并计算了共焦荧光显微镜的传递的信息量与普通显微镜所传递的信息量之比。理论分析和实验结果均表明,只有有效地抑制杂散光的影响,选择适当的空间滤波器尺寸,才能最有效地利用共焦显微术的成像性能。

参 考 文 献

- [1] Lukosz W. Optical systems with resolving powers exceeding the classical limit. *J. Opt. Soc. Am.*, 1966, **56**(11):1463~1472
- [2] Lukosz W. Optical systems with resolving powers exceeding the classical limit II. *J. Opt. Soc. Am.*, 1967, **57**(7):932~942
- [3] Bendinelli M, Consortini A, Ronchi L. Degrees of freedom, and eigerfuntions, of the noisy image. *J. Opt. Soc. Am.*, 1974, **64**(11):1498~1502
- [4] Toraldo Di Francia G. Degrees of freedom of an image. *J. Opt. Soc. Am.*, 1969, **59**(7):799~804
- [5] Cox I J, Sheppard C J R. Information capacity and resolutions in an optical system. *J. Opt. Soc. Am. (A)*, 1986, **3**(8):1152~1158
- [6] Van der Voort H T M, Brakenhoff G J. Determination of the 3-dimensional optical properties of a confocal scanning laser microscope. *Optik*, 1988, **78**(1):48~53
- [7] Sheppard C J R, Choudhury A. Image formation in the scanning microscope. *Optica Acta*, 1977, **24**(10):1051~1073
- [8] Sheppard C J R, Wilson T. Image formation in scanning microscopes wits partiately coherent source and detector. *Optica Acta*, 1978, **25**(4):315~325
- [9] Strelbl N. Depth transfer by an imaging systems. *Optica Acta*, 1984, **31**(11):1233~1241
- [10] Wilson T, Carlini A R. Depth discrimination criteria in confocal optical systems. *Optik*, 1987, **76**(4):164~166
- [11] Van der Voort H T M, Brakenhoff G J. Determination of the 3-dimensional optical properties of a confocal scanning laser microscope. *Optik*, 1988, **78**(2):48~53
- [12] Streibl N. Three-dimensional imaging by a microscope. *J. Opt. Soc. Am. (A)*, 1985, **2**(2):121~127
- [13] Drazic V. Dependence of two-and three-dimensional optical tranfer functions on pinhole radius in a coherent confocal microscope. *J. Opt. Soc. Am. (A)*, 1992, **9**(5):725~731
- [14] Sheppard C J R, Gu Min, Mao X Q. Three-dimensional coherent transfer function in a reflection-mode cofocal scanning microscope. *Opt. Commun.*, 1991, **81**(5):281~284
- [15] Visser T D, Wiersma S H. Electromagnetic description of image formation in confocal fluorescence microscopy. *J. Opt. Soc. Am. (A)*, 1994, **11**(2):599~608
- [16] Schmiiff J M, Ben-Letaief K. Efficient Monte Carlo simulation of confocal microscopy in biological tissue. *J. Opt. Soc. Am. (A)*, 1996, **13**(5):952~961
- [17] Kempe M, Rudolph W, Welsch E. Comparative study of conical and heterodyne microscopy for imaging through scattering media. *J. Opt. Soc. Am. (A)*, 1996, **13**(1):46~52
- [18] Torok P, Wilson T. Rigorous theory for axial resolution in confocal microscopes. *Opt. Commun.*, 1997, **137**(1):127~135
- [19] Sandison D R, Piston D W, Williams R M *et al.*. Quantitative comparison of background rejection, signal-to-noise ratio, and resolution in conical and full-field laser scanning microscopes. *Appl. Opt.*, 1995, **34**(19):3576~3588
- [20] Sandison D R, Webb W W. Background rejection and signal-to-noise optimization in confocal and alternative fluorescence microscopes. *Appl. Opt.*, 1994, **33**(4):603~615
- [21] Dunn A K, Smithpeter C, Welch A J *et al.*. Sources of contrast in conical reflection imaging. *Appl. Opt.*, 1996, **35**(19):3441~3446
- [22] Cox I J, Sheppard C J R, Wilson T. Supes-resolution by confocal fluorescent microscopy. *Optik*, 1982, **60**(4):391~396
- [23] Sheppard C J R. The spatial frequency cut-off in three-dimensional imaging. *Optik*, 1986, **72**(4):131~133
- [24] Sheppard C J R. The spational frequency cut-off in three-dimensional imaging II. *Optik*, 1986, **74**(3):128~129
- [25] Kimura S, Munakata C. Dependence of 3-D optical transfer functions on the pinhole radius in a fluorescent confocal optical microscope. *Appl. Opt.*, 1990, **29**(20):3007~3011
- [26] Amos W B, White J G, Fordham M. Use of confocal imaging in the study of biological structures. *Appl. Opt.*, 1987, **26**(16):3239~3243
- [27] Kimura S, Munakata C. Calculation of three-dimensional optical transfer function for a confocal scanning fluorescent microscope. *J. Opt. Soc. Am. (A)*, 1989, **6**:1015~1019
- [28] Nakamura O, Kawata S. Three-dimensional transfer function analysis of the tomographic capality of a confocal fluorescence microscope. *J. Opt. Soc. Am. (A)*, 1990, **17**(3):522~526
- [29] Tao Chunkan, Gao Wanrong, Bian Songling *et al.*. Laser confocal scanning microscope. *Invention Patent of China*. 98111188.2, 1998
- [30] Gao Wanrong, Nie Shouping, Liu Min *et al.*. The affecting factors of a confocal fluorescence scanning microscope. *Photoelectron and Laser (光电子·激光)*, 1998, **9**(6):501~503 (in Chinese)
- [31] Gao Wanrong, Tao Chunkan, Nie Shouping *et al.*. The high resolution of confocal fluorescence scanning microscope. *Optical Technique (光学技术)*, 1999, (137):4~7 (in Chinese)
- [32] Tao Chunkan, Gao Wanrong, Bian Songling *et al.*. Laser confocal scanning microscope. *Invention Patent of China*, Applying for in 2000, be authorized, 01108137.6
- [33] Tao Chunkan, Gao Wanrong, Bian Songling *et al.*. Laser confocal scanning microscope. New Practice Patent, Applying for in 2000, be authorized, 01217876.4.

Signal-to-Noise Ratio and Information Capacity of a Confocal Scanning Fluorescence Microscope

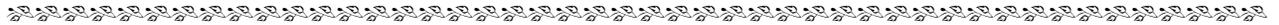
Gao Wanrong Yang Xiaochun Huang Lin Hu Maohai Yuan Xiangyan
Tao Chunkan Bian Songling

(*Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094*)

(Received 28 February 2001; revised 16 July 2001)

Abstract : Signal-to-noise ratio and signal-to-background ratio are crucial factors for a confocal scanning fluorescence microscope to form high contrast and resolution images of thick tissues because of the low signal level and multiple scattering processes. So the suppression of stray light is very important. Based on the concept of information capacity and the results of the calculation of the signal-to-noise ratio and the transfer function of a confocal scanning fluorescence microscope, the relationships among the information capacity, signal-to-noise ratio and 3-D optical transfer function are analyzed. The results obtained is very useful for development of a confocal scanning fluorescence microscope.

Key words : confocal scanning fluorescence microscope; signal-to-noise ratio; information capacity



全国第 11 次光纤通信暨第 12 届集成光学学术会议征文通知

本次会议由中国通信学会光通信委员会、中国电子学会通信学分会、中国光学学会纤维光学与集成光学专业委员会联合主办,南京邮电学院、南京富士通通信设备有限公司等单位承办。

本次会议将于 2003 年秋季在南京举行,欢迎全国各高等院校、科研部门的科技人员投稿,展示最新研究成果,欢迎规划、设计、建设、运行维护部门的工程技术人员投稿,交流实际工作中的宝贵经验和心得,欢迎有关企业、部门到会介绍新产品。

一 会议征文范围

1. 网络与系统技术;
2. 光纤与光缆;
3. 光有源器件与光电集成;
4. 光无源器件与集成光路;
5. 光纤传感。

二 会议征文只接受电子文档,征文具体范围、要求,请看南京邮电学院校园网: <http://www.njupt.edu.cn/> 征文通知。

三 征文截稿日期 2003 年 5 月 31 日。

四 通信地址:江苏南京新模范马路 66 号 邮编 210003

联系人:南京邮电学院光信息技术系 张小英 电话(传真)(025)3492308

南京邮电学院科技处 黄金仙 电话(025)3492248

全国第 11 次光纤通信暨第 12 届集成光学学术会议筹备组

2002 年 9 月 5 日