

一种实现共焦显微镜空间微分成像的新方法

张 曼¹ 唐志列^{1,2} 谭治良¹ 吴泳波¹ 廖燕菲¹ 郭利娜¹

(¹ 华南师范大学物理与电信工程学院, 广东 广州 510631
² 华南师范大学广东省高等学校量子信息技术重点实验室, 广东 广州 510631)

摘要 提出了一种实现共焦显微镜空间微分成像的新方法。为了获得空间微分图像,首先利用时间分辨技术结合互补调制技术,获得两束相位相反的调制光,然后利用这两束相位相反的调制光结合共焦扫描技术,实现共焦显微镜的空间微分成像。实验表明:这种空间微分技术可以准确实现共焦显微镜的空间微分成像,从而获得成像物体的边缘轮廓和实现边缘增强。

关键词 显微术;共焦显微镜;空间微分;边缘增强

中图分类号 O766⁺.1 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS201232.0318001

New Method of Spatial Differential Imaging with Confocal Microscope

Zhang Man¹ Tang Zhilie^{1,2} Tan Zhiliang¹ Wu Yongbo¹ Liao Yanfei¹ Guo Lina¹

¹ School of Physics and Telecom Engineering, South China Normal University,
Guangzhou, Guangdong 510631, China
² Laboratory of Quantum Information Technology, South China Normal University,
Guangzhou, Guangdong 510631, China

Abstract A new method for obtaining the spatial differential confocal microscopic image is presented. In order to realize spatial differential confocal microscopy, an optical complementary chopper is designed based on time-resolved technology to achieve the differential of signals. Combining with confocal scanning technology, using the different signals of confocal microscope the spatial differential confocal microscopic image is obtained. Through experiments, the rationality of the system is approved. The spatial differential confocal microscopic images of integrated circuit maskplate are measured on this system. The results show that the spatial differential confocal microscopy can gain edge profile of imaging objects and enhance image edge compared to the confocal microscopy.

Key words microscopy; confocal microscope; spatial differential technique; edge enhancement

OCIS codes 180.1790; 180.3170; 240.6645

1 引 言

共焦显微技术(DCM)具有很高的空间分辨率和特有的层析成像能力,因此在生物医学研究、三维高密度存储以及三维微细加工等领域具有广泛的应用^[1~3]。微分显微术具有突出边缘,易于观察成像物体精细结构等优点。如果把共焦扫描成像和微分数值分析方法结合起来,实现微分 DCM,使其既具有共焦扫描成像分辨率高和微分成像边缘增强的优

点,又克服了各自的缺点,可以应用于表面轮廓、三维微细结构测量等领域。目前,获得微分共焦显微图像的方法有:非干涉差分 DCM^[4,5]、差动式自聚焦共焦显微探测技术^[6]和反射式微分干涉相衬(DIC) DCM^[7,8]等。非干涉差分 DCM 和差动式自聚焦共焦显微探测技术是利用共焦显微镜的纵向脉冲响应函数在离焦的条件下来实现超分辨率层析成像,由于没有满足共焦条件,其横向分辨率并没有得到改

收稿日期: 2011-09-13; **收到修改稿日期**: 2011-10-14

基金项目: 国家自然科学基金(60877068)和国家高校博士工程研究基金(20104407110008)资助课题。

作者简介: 张 曼(1986—),女,硕士研究生,主要从事光声成像方面的研究。E-mail: zm46233@163.com

导师简介: 唐志列(1963—),男,教授,博士生导师,主要从事光声成像和激光共聚焦显微镜等方面的研究。

E-mail: tangzhl@scnu.edu.cn(通信联系人)

善。不同于光学相干检测的方法,本文在利用时间分辨技术实现光谱导数的原理基础上^[9,10],提出利用时间分辨技术结合激光扫描共焦显微成像技术来实现共焦显微镜空间微分成像。该成像技术是利用互补调制器直接对被测表面焦平面上不同空间的信号进行微分,是一种能获得图像边缘增强的新的可行方法。

2 共焦显微镜空间微分的原理与设计

从数学基本微分公式出发,空间微分信号即为空间光强分布 $I(x)$ 对空间坐标 x 的变化率,可表示为

$$\frac{dI}{dx} = \lim_{\Delta x \rightarrow 0} \frac{\Delta I}{\Delta x} = \lim_{\Delta x \rightarrow 0} \frac{I(x + \Delta x) - I(x)}{\Delta x}, \quad (1)$$

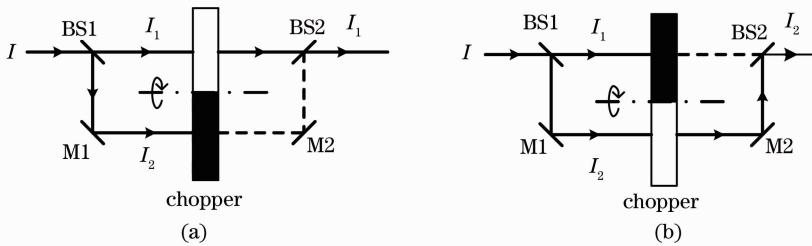


图 1 互补调制器的原理,虚线表示光线被斩波器挡掉。(a) t 时刻;(b) $(t + \Delta t)$ 时刻

Fig. 1 Principle of optical complementary chopper, dashed lines denote the light is blocked by the chopper. (a) At time t ; (b) at time $(t + \Delta t)$

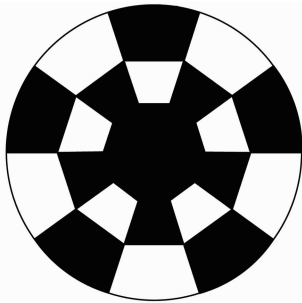


图 2 斩波器的结构图

Fig. 2 Structure of chopper

入射光 I 经分光镜 BS1 分成强度相等的两束光 I_1 和 I_2 , 设在 t 时刻, I_1 光束通过互补斩波器, 而 I_2 光束被互补斩波器挡掉; 经过 Δt 时间后, I_1 光束被互补斩波器挡掉, 而 I_2 光束通过互补斩波器。则通过互补调制器后这两束光可表示为

$$\begin{aligned} I_1(t) &= I_{01} \cos \omega t, \\ I_2(t + \Delta t) &= I_{02} \cos(\omega t + \pi), \end{aligned} \quad (2)$$

式中 ω 为互补斩波器的调制频率。由于互补斩波器的透光孔与遮光孔成对称分布, 所以 $I_1(t)$ 和 $I_2(t + \Delta t)$ 两束光的相位差为 π , 即有 $\omega \Delta t = \pi$ 。设 $I_1(t)$ 和 $I_2(t + \Delta t)$ 产生的光电信号分别表示为 $S_1(t)$ 和 $S_2(t + \Delta t)$,

式中 $I(x + \Delta x)$ 和 $I(x)$ 分别代表成像物体在 $x + \Delta x$ 和 x 处的光强。因此, 要实现空间微分, 必须同时满足下列两个条件: 1) 实现光强 $I(x + \Delta x)$ 和 $I(x)$ 的差分; 2) 空间两点的距离 Δx 要足够小, 即 $\Delta x \rightarrow 0$ 。

为了实现相邻两点光强信号的差分, 利用时间分辨技术结合互补调制技术, 获得两束相位相反的调制光。互补调制器由互补斩波器和分束-合束器组成, 其原理如图 1 所示。其中分束-合束器包括分光镜 BS1、BS2 和全反镜 M1、M2, 而互补斩波器的结构图如图 2 所示, 黑色代表遮光孔, 白色代表透光孔, 透光孔与遮光孔成对称分布(彩色图见电子版)。

波形图如图 3(a) 和 (b) 所示, 则当这两束光被聚光镜聚焦到光电探测器时, 光电探测器接收到的信号为

$$S = S_1(t) + S_2(t + \Delta t) = C(I_{01} - I_{02}) \cos \omega t, \quad (3)$$

式中 C 是与实验条件有关的常数。显然, 光电探测器最后输出信号的大小决定于两光束的强度之差。当成像物体不动或光束不扫描时, 由于 $I_1(t)$ 和 $I_2(t + \Delta t)$ 是从同一点反射的光强, $I_{01} = I_{02}$, 因此光电探测器的输出为零, 其波形图如图 3(c) 所示。

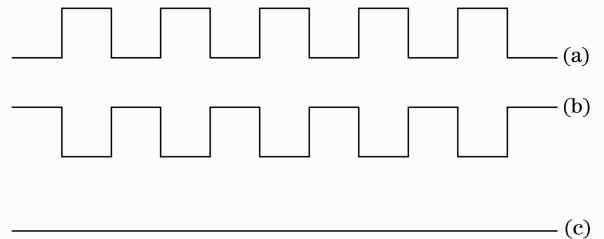


图 3 波形图。(a) 光电信号 $S_1(t)$; (b) 光电信号 $S_2(t + \Delta t)$; (c) 总光电信号 S

Fig. 3 Waveform diagram. (a) Photo-electronic signal $S_1(t)$; (b) photo-electronic signal $S_2(t + \Delta t)$; (c) total of photo-electronic signal S

当物体或焦点以速度 v 扫描时,光电探测器接收到的光强为

$$S = CI_{01}(x)\cos\omega t + CI_{02}(x + v\Delta t)\cos(\omega t + \pi) = CI_{01}(x)\cos\omega t - CI_{02}(x + v\Delta t)\cos\omega t = CI_1(x) - CI_2(x + v\Delta t) = S(x) - S(x + v\Delta t). \quad (4)$$

由(4)式可见, I_1 和 I_2 两束光产生的光电信号在光电探测器内实现了差分。

由于光束扫描机构是连续运动的,因此光电探测器接收到的是空间微分信号,可表示为

$$\frac{dS}{dx} = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{S(x + v\Delta t) - S(x)}{v\Delta t} = \lim_{\Delta x \rightarrow 0} \frac{S(x + \Delta x) - S(x)}{\Delta x}. \quad (5)$$

可见,利用时间分辨结合共焦扫描可以实现空间微分。最后将光电探测器输出的空间微分信号输入到锁相放大器,锁相放大器提取、放大后将空间微分信号经数据采集系统输入到计算机记录并处理,最后重建出样品二维空间分布的微分图像。

3 实验装置

为了同时满足实现空间微分的两个条件,设计如图4所示的实验装置。光源是美国 Melles Griot 公司生产的波长为 514 nm 的 35LAL515-230 风冷氩离子激光器。振镜是美国 Cambridge Technology Inc. (CTD)生产的高速光学扫描振镜,在输出控制信号时

采用浮点型数据,足以保证转动时的精度,不对成像分辨率造成影响。光电倍增管探测系统为卓立汉光公司生产,电源型号为 HCV1005,光电倍增管的型号是 PMTH-S1。锁相放大器是 Stanard Research System Inc. (SRS 公司)的 SR830 型数字信号处理 (DSP)锁相放大器,数据采集卡是美国国家仪器公司 (National Instrument)的 PCI-6115 型同步数据采集卡,互补光调制器为自制。

本系统采用无机械噪声的光束扫描技术和高分辨率的显微物镜,对成像物体进行二维扫描。利用激光扫描技术,氩离子激光器输出的光经互补调制器再聚焦,在成像物体上形成一个焦点,其反射光经聚焦后需通过针孔才能到达光电倍增管(PMT),成像物体中高于或低于焦平面的反射光以及杂散光都被针孔遮挡掉。利用互补调制器,光电倍增管探测到的是成像物体上相邻两点的微分信号。将该信号输送到数据采集系统中,通过计算机算法可以重建出成像物体二维空间分布的共焦空间微分显微图像。

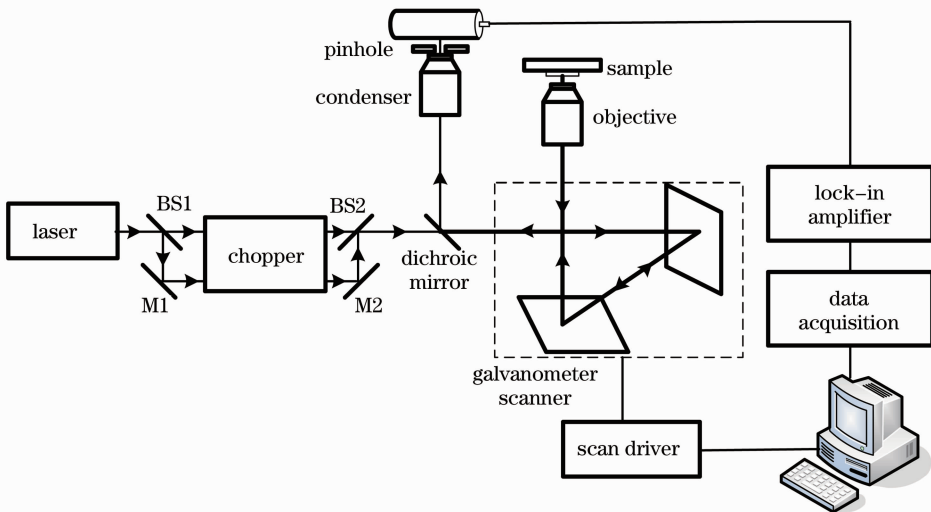


图4 共焦显微镜空间微分成像装置

Fig. 4 Experimental setup of spatial differential imaging with confocal microscopy

4 实验结果与分析讨论

显微镜的物镜为 $20\times$ 的平场物镜,光源为氩离子激光器,以集成电路掩模板作为成像物体。实验时选择激光器的输出功率为 15 mW,互补调制器的频

率为 2500 Hz,光电倍增管的负高压为 -100 V,锁相放大器的灵敏度为 500 mV,积分时间为 30 ms。根据以上这些参数,扫描一幅像素为 256 pixel \times 256 pixel 的共焦空间微分显微图像,所需的时间约为 27 min。

实验过程中,对同一目标分别进行共焦显微成像和空间微分成像,实验结果如图 5(a)~(d)所示。

由图 5(b)和(d)可以看到,空间微分技术确实可以准确实现共焦显微镜的微分成像,突出成像物体的边缘轮廓。此外,垂直扫描方向的边界更清晰,而平行于扫描方向的边界差很多。这是由于成像物体(集成电路掩模板)的边缘非常平直,当扫描的两点不在边缘位置上时,这两点对应的光强相等,光电倍增管的输出为零;当扫描的两点处于边缘位置时,应分为两种情况:1)当成像物体的边缘与光束扫描

方向垂直时,相邻两点分别处在边界的内和外,相应的光强相差很大,光电倍增管输出的差分信号也比较大,因此图像中垂直扫描方向的轮廓清晰;2)当成像物体的边缘分布与光束扫描方向平行时,由于相邻两点对应的光强相近,光电倍增管输出的差分信号接近为零,导致平行于扫描方向的轮廓不清晰。但对于大多数的实际样品,由于其边界是很不规则的,因此对实际样品的微分成像影响不大。因此,利用互补光调制器,结合共焦扫描技术,可以成功实现共焦显微镜空间微分成像。

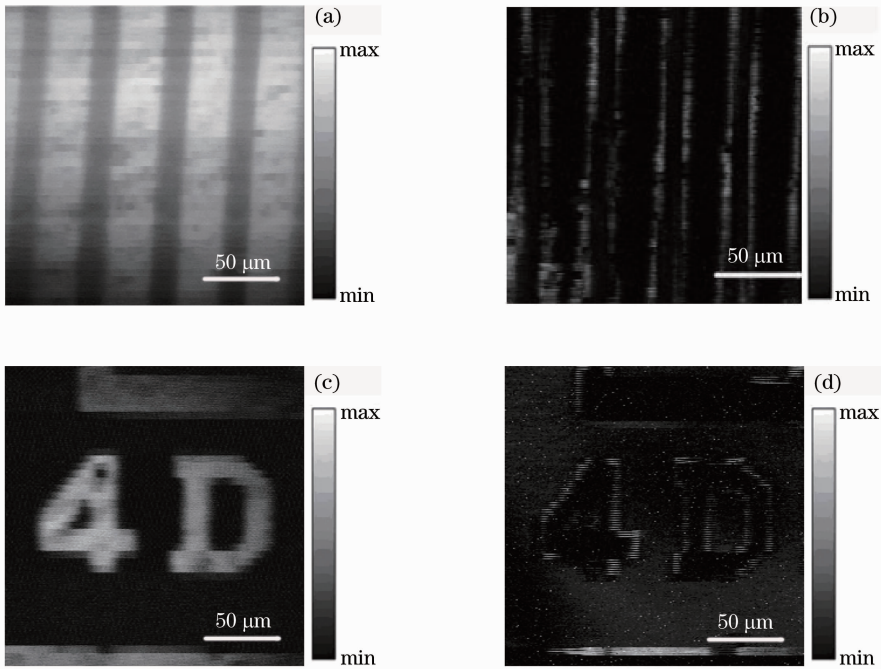


图 5 集成电路掩模板的共焦显微图像(a),(c)及对应的共焦空间微分显微图像(b),(d)

Fig. 5 Confocal microscopic images of integrated circuit maskplate. (a),(c) Images from confocal microscopy; (b),(d) images from spatial differential confocal microscopy

5 结 论

采用时间分辨技术结合互补调制技术获得两束相位相反的调制光,然后利用这两束相位相反的调制光,结合共焦扫描技术,实现共焦显微镜空间微分成像。实验结果表明:这种空间微分技术可以实现共焦显微镜的横向微分成像,从而突出成像物体边缘轮廓,实现边缘增强。

参考文献

- 1 T. Wilson. Confocal Microscopy [M]. New York: Academic Press, 1990
- 2 Pascale Guitera, Giovanani Pellacani, Kerry A. Crotty *et al.*. The impact of in vivo reflectance confocal microscopy on the diagnostic accuracy of lentigo maligna and equivocal pigmented and nonpigmented macules of the face [J]. *J. Investigative*

Dermatology, 2010, **130**(8): 2080~2091

- 3 Zhang Jianhuan, Tan Jiubin. Engineering slope measurement with confocal microscopy[J]. *Acta Optica Sinica*, 2003, **23**(4): 446~450
- 张建寰, 谭久彬. 应用共焦显微镜原理测量倾斜工程表面[J]. *光学学报*, 2003, **23**(4): 446~450
- 4 C. H. Lee, J. P. Wang. Noninterferometric differential confocal microscopy with 2-nm depth resolution [J]. *Opt. Commun.*, 1997, **35**(2): 233~237
- 5 Lisong Yang, Li Liu, Guiying Wang *et al.*. Noninterferometric measurement of lead zirconate titanate inverse piezoelectric extension [J]. *Opt. Engng.*, 2001, **40**(6): 909~913
- 6 Jiubin Tan, Jie Zhang. Differential confocal optical system using gradient-index lenses [J]. *Opt. Engng.*, 2003, **42**(10): 2868~2871
- 7 C. J. R. Sheppaed, C. J. Cogswell. Image formation in video-enhanced and confocal DIC microscopy[C]. *SPIE*, 1994, **1846**: 64~71
- 8 C. J. Cogswell, C. J. R. Sheppaed. Confocal differential interference contrast (DIC) microscopy: including a theoretical

- analysis of conventional and confocal DIC imaging [J]. *J. Microscopy*, 1992, **165**(1): 81~101
- 9 Zhong Kejun, Tang Zhilie, Chen Gengsheng *et al.*. A new derivative photoacoustic spectroscopic technique [J]. *Acta Optica Sinica*, 2005, **25**(9): 1288~1292
- 钟可君, 唐志列, 陈更生 等. 一种实现光声光谱的导数光谱的新方法[J]. *光学学报*, 2005, **25**(9): 1288~1292
- 10 Lina Guo, Zhilie Tang, Yongheng He *et al.*. Characterization of a derivative photoacoustic spectrometer [J]. *Rev. Sci. Instrum.*, 2007, **78**(2): 023104

栏目编辑: 李文喆