

多光谱消色差成像流式细胞仪的光学系统设计

李 灿¹ 郭帮辉¹ 孙 竹^{2*}

¹中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 吉林 长春 130033

²长春长光思博光谱技术有限公司, 吉林 长春 130033

摘要 为了解决成像流式细胞仪多色、宽波段、长工作距离以及大数值孔径等难点, 设计了 1 款多光谱成像流式细胞仪光学系统。系统基于模块化设计思想, 灵活运用部分和整体的优化方法, 保证各模块的相对独立性; 显微镜引入衍射元件对宽波段色差进行校正, 保证在全波段下成像质量均达到理想的性能指标; 多光谱分解镜组采用二向色镜堆栈分光, 多重结构同时优化 6 个通道, 大大降低了系统对色差的校正难度。全局优化得到最终的光学系统, 放大倍率为 60 倍, 视场为 $60\ \mu\text{m} \times 128\ \mu\text{m}$, 波段为 420~800 nm, 6 个分光通道, 分辨率达到 $0.5\ \mu\text{m}$, 成像质量接近衍射极限。

关键词 光学设计; 成像流式细胞仪; 宽波段

中图分类号 TH773 **文献标识码** A

doi: 10.3788/AOS201636.0922002

Optical System Design of Multispectral Achromatic Imaging Flow Cytometer

Li Can¹ Guo Banghui¹ Sun Zhu²

¹Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun, Jilin 130033, China

²Changchun optical spectrum Sibot Technology Co. Ltd., Changchun, Jilin 130033, China

Abstract In order to solve the difficulties of the multi-color, wide wavelength band, long working distance and high numerical aperture in imaging flow cytometer, an optical system of multispectral achromatic imaging flow cytometer is designed. Based on the modular design concept, the relative independence of each module is guaranteed by the flexible use of the local and whole optimization method. The microscope objective introduces diffractive optical element to correct chromatic aberration in the wide spectrum. So the imaging quality can meet ideal performance in full-wave band. The multispectral group uses dichroscope stack to split light, and six channels are optimized by multiple structure. The difficulty of chromatic aberration correction is reduced greatly. The final optical system is got by global optimization. The magnification is 60, the field of view is $60\ \mu\text{m} \times 128\ \mu\text{m}$, the wavelength range is from 420 nm to 800 nm, the system has six channels, the resolution is $0.5\ \mu\text{m}$, and the imaging quality is close to diffraction limit.

Key words optical design; imaging flow cytometer; wide wave band

OCIS codes 220.3620; 120.4570; 220.2740; 220.2945

1 引 言

流式细胞术(FCM)是一种对液流中排成单列的细胞或其他生物微粒(如微球、细菌、小型模式生物等)逐个进行快速定量分析和分选的技术。经过近 50 年的发展和完善,如今的流式细胞仪已经十分成熟,并被广泛地运用于从基础研究到临床实践的各个方面,涵盖了细胞生物学、免疫学、血液学、肿瘤学、药理学、遗传学及临床检验等领域^[1-3]。但是传统流式细胞检测技术仍然存在局限性,例如获得的细胞信息很有限,缺乏

收稿日期: 2016-01-04; **收到修改稿日期:** 2016-03-03

基金项目: 国家重大科学仪器设备开发专项(2013YQ14051702)

作者简介: 李 灿(1985—),男,博士,助理研究员,主要从事光学系统设计方面的研究。E-mail: LC19851125@163.com

* **通信联系人。** E-mail: sunzhu0224@163.com

细胞形态学、细胞结构及亚细胞水平信号分布的相关信息。2011年,美国 Merck Millipore 旗下的 Amnis 公司首先研制成功第 1 台成像流式细胞仪,可以同时分析大量细胞的群体和实时观测细胞图像^[4-7]。然而,成像流式细胞仪具有多色、宽波段、长工作距离以及大数值孔径等特点和难点,特别是多色、宽波段显微成像光学系统的设计,制约着成像流式细胞仪的发展。

本文针对以上多色和宽波段的问题设计 1 款高质量成像流式细胞仪的光学系统。显微物镜采用多镜头的反望远结构设计保证长工作距离,同时引入衍射元件校正系统宽波段色差,保证在全波段下的成像质量。多光谱成像镜组采用全光谱分波段多重结构优化设计方法,以保证系统各个波段色差的良好校正。

2 系统的整体结构

成像流式细胞仪光学系统主要包括显微成像系统和测速-对焦系统 2 部分,如图 1 所示,其中显微成像光学系统由显微物镜、2 组相同的前后中继镜组和多光谱成像镜组组成,测速-对焦光学系统由正负调制光栅光路 2 部分组成。

显微成像系统采用时间延迟积分(TDI)线扫描技术完成高速运动细胞荧光成像,细胞产生的散射光和荧光信号被大数值孔径显微物镜收集,然后由二向色镜堆栈分光产生所需的多光谱图像,包括明场、暗场以及荧光的细胞成像。测速-对焦系统采用光栅共聚焦原理完成显微物镜对焦,同时,由光栅调制得到细胞的流速,保证细胞的速度精确控制和 TDI 相机的信号反馈驱动控制。

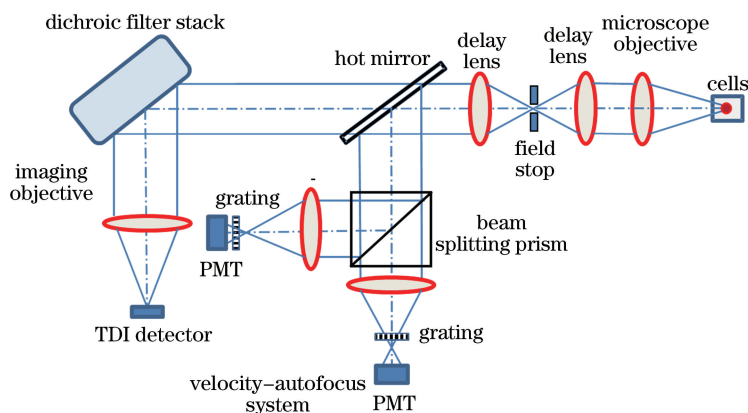


图 1 多光谱流式细胞仪系统原理

Fig. 1 System principle of multispectral flow cytometer

3 系统指标分析及理想结构设计

3.1 系统的关键技术指标

表 1 给出了成像流式细胞仪光学系统的主要技术指标,系统对 5 mm/s 高速细胞群成像,像元分辨率 $0.5 \mu\text{m}$,光谱通道分为 6 个,其中包括 1 个明场,1 个暗场和 4 个荧光通道。系统视场 $60 \mu\text{m} \times 128 \mu\text{m}$,水平方向的瞬时视场 $60 \mu\text{m}$ 完全可以覆盖单个细胞的成像,然而对 TDI 成像系统,垂直方向视场 $128 \mu\text{m}$ 主要考虑到 TDI 效应,即覆盖细胞高速运动被扫描拍摄所需的视场。波长 450 nm 的发光二极管(LED)为明场照明光源,波长 785 nm 激光作为暗场照明光源,波长 830 nm 激光作为测速-调焦光源,荧光激发光源的波长分别为 405,488,561,658 nm。通过对整体指标的分析,将技术指标分配到显微成像和测速-对焦 2 个子系统。

表 1 光学设计指标

Table 1 Optical design parameters

Parameters	Values
Field of view	$60 \mu\text{m} \times 128 \mu\text{m}$
Wavelength	420~800 nm
Pixel resolution	$0.5 \mu\text{m}$
NA	0.75

Parameters	Values
Spectral channel number	6
Laser wavelength	405,488,561,658,785,830 nm
LED wavelength	450 nm

3.2 显微成像系统

3.2.1 显微成像系统指标分析

根据总体指标的分解,将显微成像系统分为显微物镜、中继镜组和多光谱分解镜组 3 部分组成^[8-9]。目前,专用于生物荧光成像的日本滨松 TDI 相机分辨率为 2048 pixel \times 128 pixel,其 12 μm 的像素大小决定整体放大倍率至少为 24 倍,探测器光敏面的尺寸 24.576 mm \times 1.536 mm,水平方向每个通道光敏面宽度约 3.9 mm,由此方向上视场 60 μm 决定整体放大倍率最大不超过 65 倍,垂直方向为扫描成像,TDI 探测器不必考虑与光学系统视场的匹配,仅影响 TDI 的积分级次。按照 65 倍计算,细胞的流速 5 mm/s,探测器线速度 325 mm/s,即行频要求 27 kHz,该相机行频最大 50 kHz,完全满足要求。

依据以上计算^[10],确定选择日本滨松的 C10000-801 型号相机,综合考虑各个通道之间的间隔和高分辨率的要求,成像系统整体放大倍率确定为 60 倍,显微物镜焦距为 4.5 mm,多光谱成像物镜焦距为 270 mm,中继镜组焦距为 36 mm。各分光学系统的具体指标如表 2、3、4 所示。

表 2 显微物镜指标

Table 2 Microscope objective parameters

Parameters	Values
Field of view	150 μm
Wavelength	420~830 nm
Pixel resolution	0.5 μm
NA	0.75
Focal length of microscope objective	4.5 mm
Focal length of delay lens	36 mm

表 3 多光谱显微成像系统指标

Table 3 Multispectral microscope imaging system parameters

Parameters	Values
Field of view	60 $\mu\text{m}\times$ 128 μm
Wavelength	420~800 nm
Pixel resolution	0.5 μm
Spectral channel number	6
Focal length of TDI imaging objective	270 mm

表 4 光谱通道

Table 4 Spectral channel

Channel	1	2	3	4	5	6
Wavelength band /nm	420~480	480~560	560~600	600~640	640~745	745~800

3.2.2 二向色镜堆栈设计

二向色镜堆栈的设计采用多重结构优化,通过控制 6 个二向色镜的相对空间位置,保证 TDI 成像系统均匀扩展为 6 个通道,实现各个通道光谱成像分布于 TDI 相机的不同位置且无重叠。同时,保证二向色镜之间不发生结构干涉。图 2 给出了最终二向色镜堆栈光学系统的设计结果,其中二向色镜的相对位置如表 5 所示。

表 5 二向色镜堆栈设计结果

Table 5 Design result of dichroic filter stack

Channel	1	2	3	4	5	6
Wavelength band /nm	420~480	480~560	560~600	600~640	640~745	745~800
Off-axis /mm	0	4	8	16	20	24
Tilt /($^{\circ}$)	44.02	44.41	44.80	45.20	45.59	45.98

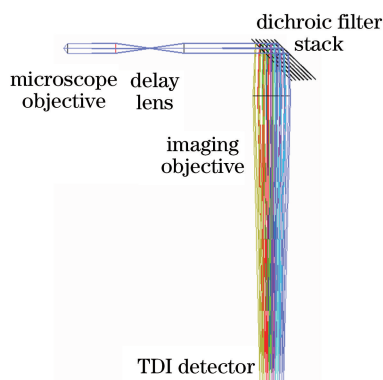


图 2 显微成像系统理想光学结构

Fig. 2 Ideal optical structure of microscope imaging system

3.3 测速-对焦系统

测速-对焦系统采用功率为 40 mw、波长为 830 nm 的激光照明待测细胞,产生的散射光被 2 个探测器接收,通过对比 2 路信号的调制度可以精确地得到细胞离焦的方向和数值,同时由光栅调制信号的频率提取细胞的速度信号,图 3 所示是该部分的系统原理图。

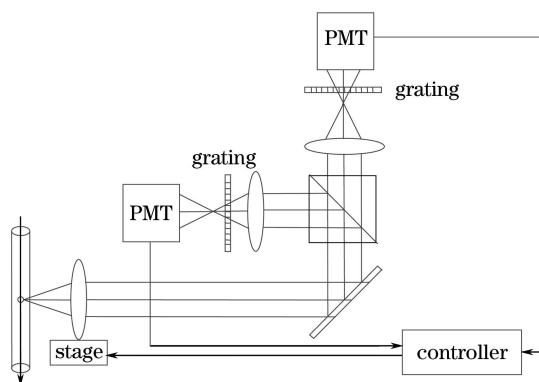


图 3 测速-对焦系统原理

Fig. 3 Principle of velocity-autofocus system

细胞的散射率为 $10^{-12} \sim 10^{-9}$, 对应的散射能量在拍瓦量级,光电探测器选择高灵敏度的光电倍增管 (PMT)。细胞的运动速度为 5 mm/s,假设液流中细胞尺寸和间隔均为 $1 \mu\text{m}$,则调制信号频率为 2.5 kHz,探测器频响至少要求 20 kHz,选择日本滨松的 H7421-50 探测器。PMT 物镜对无穷远成像,要求出瞳位于像面后方 20 mm,入瞳孔径为 10 mm,出瞳口径为 5 mm 以匹配探测器光敏面。

系统入瞳距离定为 130 mm,根据入瞳和出瞳的共轭关系^[10]计算得到焦距取 45 mm。调焦范围指标要求是 $\pm 5 \mu\text{m}$,根据共聚焦和光栅调制的原理,物空间的光栅周期对应为 $10 \mu\text{m}$,显微物镜视场 $128 \mu\text{m}$ 对应大约 13 个周期。整个系统垂轴放大倍率是 10 倍,调制光栅的周期为 $100 \mu\text{m}$,且轴向的调焦范围 $\pm 5 \mu\text{m}$ 对应正负光栅位置相对像面的距离分别为 $\pm 500 \mu\text{m}$,确定的测速-对焦系统指标如表 6 所示,理想结构如图 4 所示。

表 6 测速-对焦系统指标

Table 6 Velocity-autofocus system parameters

Parameters	Values
Field of view	$60 \mu\text{m} \times 128 \mu\text{m}$
Wavelength	830 nm
Focal length of PMT objective	50 mm
Exit pupil diameter	5 mm
Exit pupil position	20 mm
Grating period	$100 \mu\text{m}$

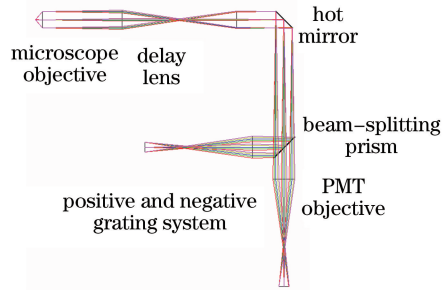


图 4 测速-对焦系统理想光学结构

Fig. 4 Ideal optical structure of velocity-autofocus system

4 光学系统结构的设计结果

4.1 成像光学系统设计

4.1.1 显微物镜

图 5 给出了显微物镜的设计,系统采用反远距物镜的设计,在显微物镜后组引入大的负光焦度以提高系统工作距离,前组采用齐明透镜组,大大降低了整个系统球差校正难度,工作距离是 5 mm。显微物镜的波长范围为 420~830 nm,采用多片低色散 FK 和 QK 系列的光学玻璃,配合第 5 个平面引入的衍射面校正色差^[11-13],设计结果所设计的光学元件有 84 个周期,最大的频率为 14.82 period/mm,即最小的环带间隔为 67.5 μm,相对于可见光波长满足标量衍射理论近似。

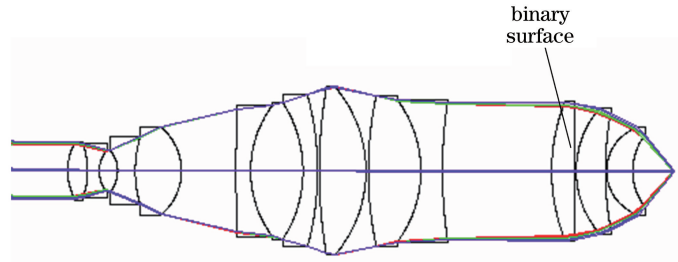


图 5 显微物镜结构

Fig. 5 Microscope objective structure

根据标量衍射理论,衍射效率表达式为^[8]:

$$\eta_m = \left\{ \sin \left[c \left[m - \frac{(n-1)d}{\lambda} \right] \right] \right\}^2, \quad (1)$$

式中 λ 为入射波长, m 表示设计的衍射级次, n 表示基底材料的折射率, d 代表环带深度。衍射级次 $m = 1$ 时,由(1)式可以得到环带深度应满足如下等式:

$$d = \frac{\lambda}{n-1}, \quad (2)$$

假设设计波长为中心波长 0.625 μm,基底 BK7 的折射率取 1.52,经计算,工作在 1 级的衍射面的环带深度为 1.2 μm。根据(1)式得到全波段的衍射效率,如图 6(a)所示,短波 0.420 μm 处仅为 40.5%,将会影响短波处能量的大小。通过优化设计,波长最终选择 0.558 μm,全波段的衍射效率均在 69.3%以上,如图 6(b)所示,明显提高了全波段衍射效率,平均衍射效率表达式为:

$$\bar{\eta}_m = \frac{1}{\lambda_{\max} - \lambda_{\min}} \int_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} \eta_m d\lambda, \quad (3)$$

由(3)式计算平均衍射效率约为 88.3%。

显微物镜设计结果接近衍射极限,可满足高质量成像要求,图 7(a)为光学传递函数(MTF)曲线,在 1000 lp/mm 频率处调制传递函数大于 0.4;图 7(b)为点列图,点斑均方根半径小于 0.5 μm;图 7(c)为能量

分布图,可以看到目标能量的 80%以上均在 $0.35 \mu\text{m}$ 半径内;图 7(d)为轴向色差图,系统轴向色差均小于 $1.2 \mu\text{m}$ 。系统设计结果接近衍射极限,可以分辨 $0.5 \mu\text{m}$ 的细节。

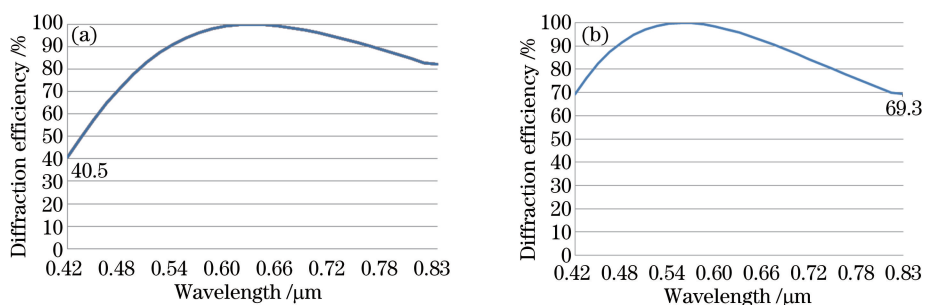


图 6 衍射效率。(a)设计波长为 $0.625 \mu\text{m}$; (b)设计波长为 $0.558 \mu\text{m}$

Fig. 6 Diffraction efficiency. (a) Designed wavelength is $0.625 \mu\text{m}$; (b) Designed wavelength is $0.558 \mu\text{m}$

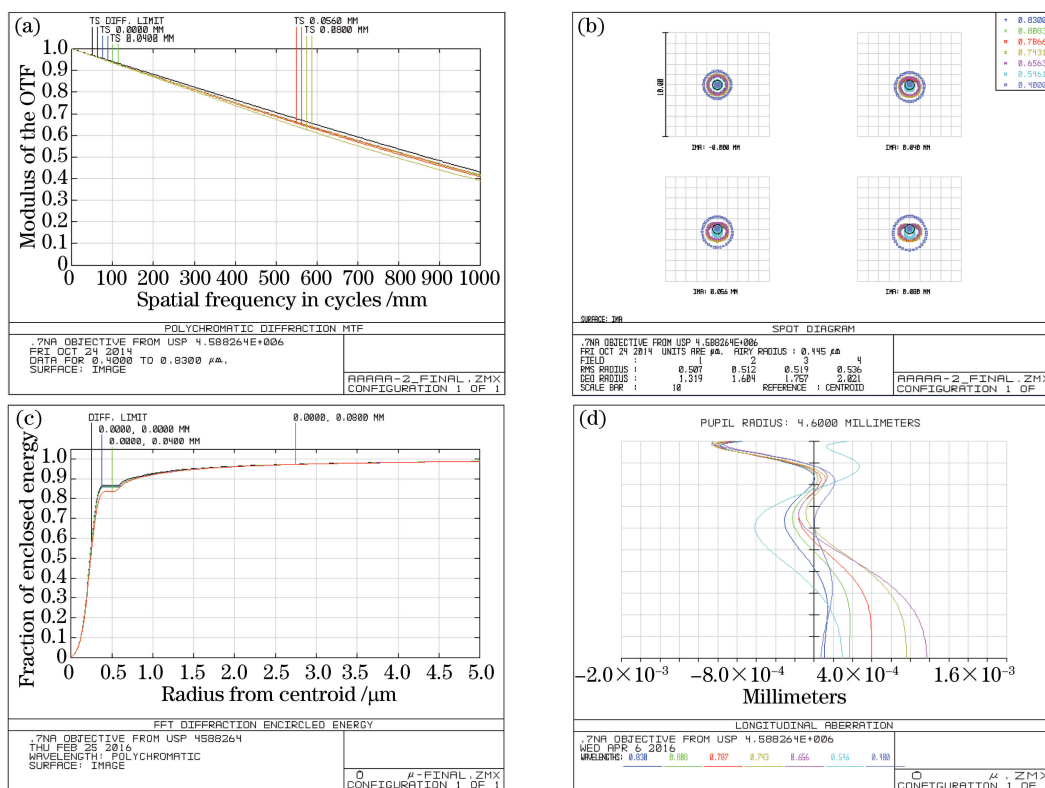


图 7 显微镜的像质评价。(a)全波段下 MTF 曲线; (b)点列图; (c)能量分布图; (d)轴向色差图

Fig. 7 Image quality assessment of microscope objective. (a) MTF curve at all wavelength; (b) spot diagram; (c) energy distribution; (d) longitudinal aberration

4.1.2 二次中继镜组

图 8 给出了前中继镜组的设计结果,由 2 个双胶合透镜组成。图 9 为 MTF 曲线,在 125 lp/mm 频率处系统的 MTF 大于 0.5。高清晰的中间像面处设置视场光阑,有利于系统抑制外界杂散光和各通道之间的干扰^[13-14]。

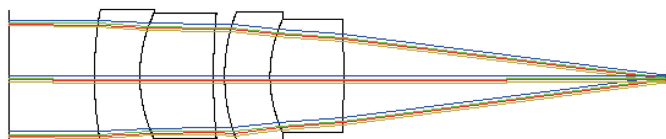


图 8 中继镜组结构

Fig. 8 Relay lens structure

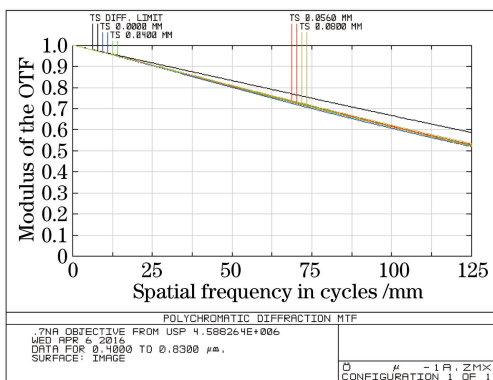


图 9 中继镜组的 MTF 曲线

Fig. 9 MTF curve of relay lens

4.1.3 多光谱分解

为提高系统优化效率,多光谱分解的设计中暂时忽略显微物镜和 2 次成像镜组。根据搭建的二向色镜堆栈,设计采用多重结构同时优化多光谱成像物镜,每个结构对应从短波到长波的 6 个波段,这种分波段的优化大大降低了系统对色差的校正难度,图 10 给出了多光谱成像物镜的初步设计结果,最终设计需要联合显微物镜和中继镜组联合优化。

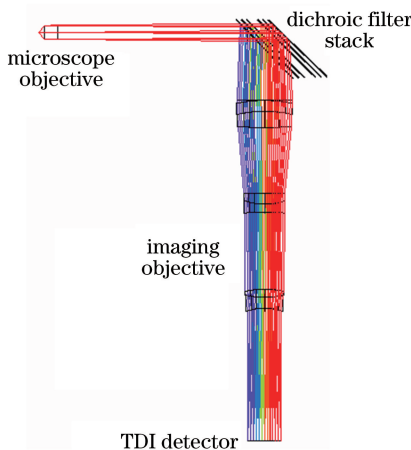


图 10 成像物镜初始结构

Fig. 10 Initial structure of the imaging objective

4.1.4 整体成像光学设计

将以上显微物镜、中继镜组、多光谱分解的 3 个系统对接,取消显微物镜和中继镜组的变量,仅优化多光谱成像物镜各个变量得到最终的显微成像光学系统,如图 11 所示。图 12 为 TDI 成像系统的 MTF 曲线,6 个分光通道的 MTF 在 20 lp/mm 处均能达到 0.4 以上,在光学系统中间频率 16.67 lp/mm 均能达到 0.45 以上^[15-16]。

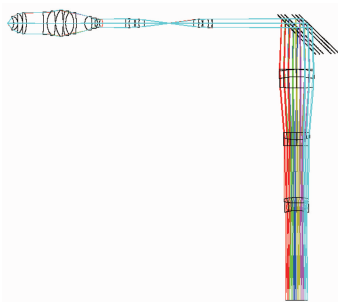


图 11 成像光学系统的最终结构

Fig. 11 Final structure of imaging optical system

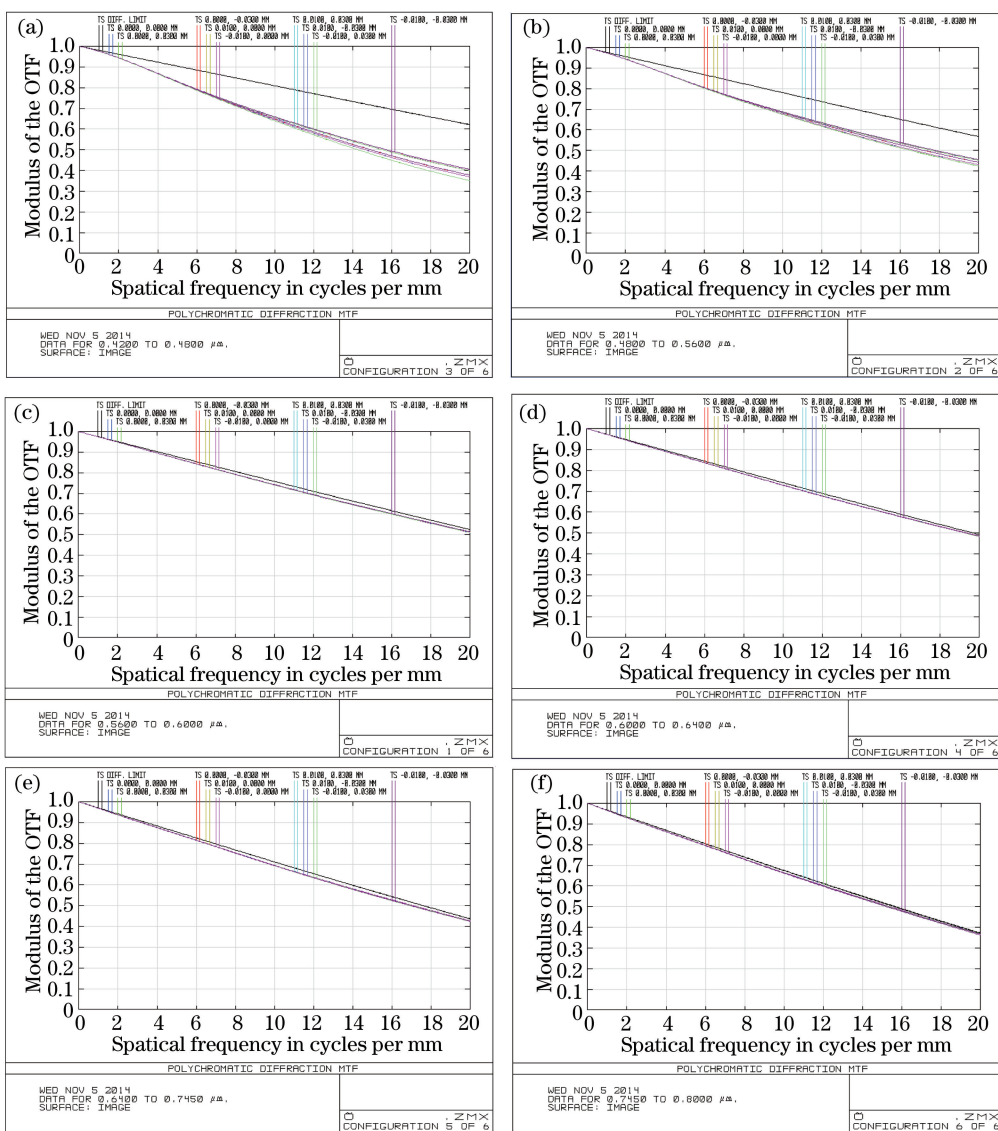


图 12 成像光学系统的 MTF 曲线。(a)通道 1; (b)通道 2; (c)通道 3; (d)通道 4; (e)通道 5; (f)通道 6
 Fig. 12 MTF curve of imaging optical system. (a) Channel 1; (b) channel 2; (c) channel 3; (d) channel 4; (e) channel 5; (f) channel 6

4.2 测速-自动对焦光学系统设计

图 13 给出调焦测速系统的设计结果,系统的出瞳直径为 4.5 mm,基本满足 PMT 探测器 5 mm 靶面的匹配。出瞳位于中间像面后方 20 mm,满足 PMT 探测器工作距离的要求。图 14(a)为系统 MTF 图,在空间频率 90 lp/mm 处调制度在 0.55 以上,接近于衍射极限。图 14(b)为探测面处相对照度分布图,出瞳面上

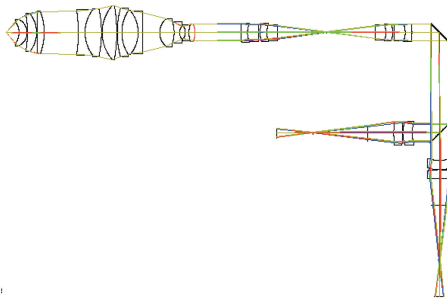


图 13 测速-对焦系统光路
 Fig. 13 Optical path of velocity-autofocusing system

的相对照度均匀性在 0.97 以上。调焦测速光学系统的高质量成像和出瞳的能量均匀性,可以保证其调焦和测速信号的提取精度。

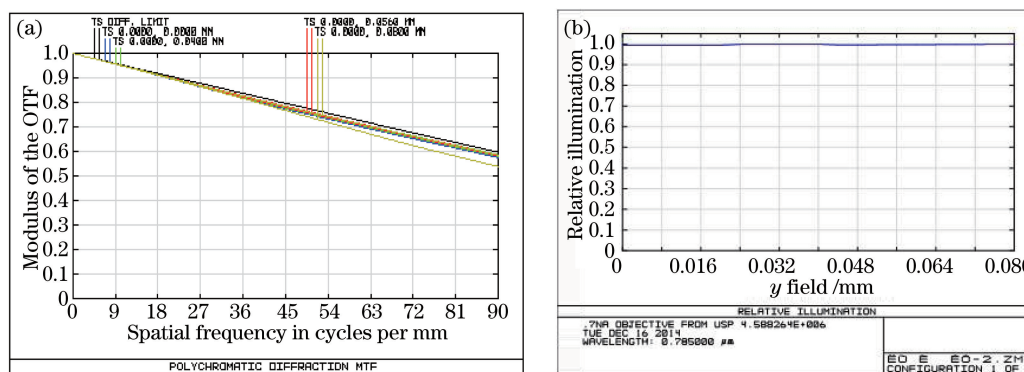


图 14 测速-对焦系统的像质评价。(a)MTF 曲线; (b)相对照度

Fig. 14 Image quality assessment of velocity-autofocusing system. (a) MTF curves; (b) relative illumination

5 结 论

基于模块化设计思想,灵活运用部分和整体优化方法,在保证各模块独立性的基础上,完成了 1 款 60 倍、视场为 $60 \mu\text{m} \times 128 \mu\text{m}$ 、6 通道的高质量成像流式细胞仪光学系统设计。根据显微成像和测速-对焦系统各自的特点,通过对总体技术指标的层层分解,建立各个系统的理想结构以及初始光学系统,最后全局优化得到最终的光学系统结构。显微成像光学系统划分为显微物镜、中继镜组和多光谱分解镜组 3 部分,显微物镜采用多镜头的反望远结构设计,同时引入衍射元件对系统宽波段色差校正,保证在全波段下成像质量均达到衍射极限。中继镜组采用对称性的结构为系统提供视场光阑位置,保证各个通道在像面上的分光以及杂散光的抑制。多光谱分解镜组采用二向色镜堆栈的分光方式,多重结构同时优化 6 个光谱通道,这种分波段的优化大大降低了系统对色差的校正难度,保证了全波段的成像质量达到理想的性能指标。

参 考 文 献

- Shapiro H M. Practical flow cytometry[M]. New York: Wiley-Liss, 2003: 1-50.
- Grogan W M, Collins J M. Guide to flow cytometry methods[M]. Florida: CRC Press, 1990: 1-20.
- Bayanheshig, Li Taotao, Pan Mingzhong, *et al.* Tunable spatial heterodyne spectroscopy with grating-mirror structure [J]. Optics and Precision Engineering, 2015, 23(12): 3295-3302.
巴音贺希格, 李涛涛, 潘明忠, 等. 光栅-平面镜型可调式空间外差光谱仪 [J]. 光学精密工程, 2015, 23(12): 3295-3302.
- Ortyn W E, Basiji D A, Morrissey P J, *et al.* Blood and cell analysis using an imaging flow cytometer: US8660332[P]. 2014-02-25.
- Ortyn W E, Basiji D A. Imaging and analyzing parameters of small moving objects such as cells: US6975400[P]. 2005-12-13.
- Ozaki Y, Uda S, Saito T H. A quantitative image cytometry technique for time series or population analyses of signaling networks[J]. PLoS One, 2010, 5(4): 9955-9965
- George T C, Basiji D A, Hall B E, *et al.* Distinguishing modes of cell death using the image stream multispectral imaging flow cytometer[J]. Cytometry A, 2004, 59(2): 237-245.
- Yang Liangliang, Cui Qingfeng, Liu Tao, *et al.* Measurement of diffractive efficiency for diffractive optical elements[J]. Acta Optica Sinica, 2012, 32(4): 0412007.
杨亮亮, 崔庆丰, 刘涛, 等. 衍射光学元件衍射效率的测量 [J]. 光学学报, 2012, 32(4): 0412007.
- Cai Yanmin, Wang Xiangzhao, Huang Huijie. Optical design of lithography projective lens with variable total track[J]. Chinese J Lasers, 2014, 41(4): 0416003.
蔡燕民, 王向朝, 黄惠杰. 共轭距可变的光刻投影物镜光学设计 [J]. 中国激光, 2014, 41(4): 0416003.
- Bian Yinxiu, Wang Heng, Guo Tianyi, *et al.* Design of ultra-short throw ratio projection lens [J]. Acta Optica Sinica,

2015, 35(12): 1222002.

卞殷旭, 王 恒, 郭添翼, 等. 超短投影距的投影物镜设计[J]. 光学学报, 2015, 35(12): 1222002.

- 11 Thomas S, Nicholas G. Hybrid diffractive-refractive lenses and achromats[J]. Appl Opt, 1988, 27(14): 2960-2971.
- 12 Wood A P. Design of infrared hybrid refractive-diffractive lenses[J]. Appl Opt, 1992, 31(13): 2253-2258.
- 13 Carmina L, Peter P C. Modeling diffraction efficiency effects when designing hybrid diffractive lens systems[J]. Appl Opt, 1992, 31(13): 2248-2252.
- 14 Chang Jun, Shen Benlan, Wang Xi, *et al.* Off-axis reflective active zoom system with broad spectrum and dynamic local high-resolution[J]. Optics and Precision Engineering, 2016, 24(1): 7-13.
常 军, 沈本兰, 王 希, 等. 宽谱段、动态局部高分辨离轴主动反射变焦系统[J]. 光学 精密工程, 2016, 24(1): 7-13.
- 15 Xue Qingsheng. Opticalsystem design of large relative-aperture and wide field of view spaceborne imaging spectrometer [J]. Chinese J Lasers, 2014, 41(3): 0316003.
薛庆生. 星载大相对孔径宽视场成像光谱仪光学系统设计[J]. 中国激光, 2014, 41(3): 0316003.
- 16 Xie Yao, Wang Liping, Guo Benyin, *et al.* Measurement of transversal magnification for reduced projection system[J]. Optics and Precision Engineering, 2016, 24(1): 1-6.
谢 耀, 王丽萍, 郭本银, 等. 微缩投影系统的垂轴放大率测量[J]. 光学 精密工程, 2016, 24(1): 1-6.