

基于数字微镜器件并行共焦成像的光点阵列优化

朱茜^{1,2,3}, 杨西斌^{2,3}, 李思崑², 李辉², 王驰¹, 刘首鹏², 简俊明², 熊大曦^{3*}

¹上海大学机电工程与自动化学院, 上海 200072;

²中国科学院苏州生物医学工程技术研究所江苏省医用光学重点实验室, 江苏 苏州 215163;

³中国科学院苏州生物医学工程技术研究所光健康研究中心, 江苏 苏州 215163

摘要 数字微镜器件(DMD)的灵活性有助于实现并行共焦成像。设计并搭建了基于 DMD 的并行共焦成像系统, 分析了 DMD 光点阵列对轴向分辨率、横向分辨率和图像对比度的影响, 得出了最优光点阵列参数。结果表明: 光点越小, 则横向和轴向分辨率越高; 当光点间距大于光点大小时, 增大光点间距对成像的横向分辨率无明显改善; 对于 1×1 微镜, 光点间距为光点大小的 4 倍时对应的图像对比度最高, 即 1×1 光点大小、4 倍光点间距为最优光点阵列。对数值孔径为 0.25 的物镜而言, 最优光点阵列对应的横向分辨率优于 512 lp/mm, 轴向分辨率可达 $7.82 \mu\text{m}$, 均达到衍射极限。基于最优光点阵列的三维体光栅成像比宽场成像具有更高的分辨率和明显的层切效果, 与激光扫描共焦成像相比无较大差距。基于 DMD 的并行共焦成像系统在保证高速成像的前提下, 实现了高分辨率和高图像对比度的光学层切成像, 在实时成像和三维成像中有一定的优势和应用前景。

关键词 显微; 应用光学; 并行共焦成像; 数字微镜器件; 轴向分辨率; 横向分辨率; 图像对比度

中图分类号 O439

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201838.0118001

Spot Array Optimization of Parallel Confocal Imaging Based on Digital Micromirror Device

Zhu Qian^{1,2,3}, Yang Xibin^{2,3}, Li Simin², Li Hui², Wang Chi¹, Liu Shoupeng²,
Jian Junming², Xiong Daxi³

¹School of Mechatronic Engineering and Automation, Shanghai University, Shanghai 200072, China;

²Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology,
Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China;

³Center of Optics Health, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology,
Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China

Abstract The flexibility of a digital micromirror device (DMD) helps to realize parallel confocal imaging. A parallel confocal imaging system based on DMD is designed and built. The influences of DMD spot array on axial resolution, lateral resolution and image contrast are analyzed to obtain the best spot array parameters. Results show that, the smaller the spot size is, the higher the lateral and axial resolution are. When the spot distance is larger than the spot size, the imaging horizontal resolution is not improved obviously with the increasing distance between spots. The imaging contrast is the highest when the spot interval equals to four times of spot size for 1×1 micromirror. That is to say, the optimal spot array is that spot size equals to 1×1 and spot interval equals to four times of spot size. For an objective lens with a numerical aperture of 0.25, the lateral resolution of optimal spot array is superior to 512 lp/mm, and its axial resolution can reach $7.82 \mu\text{m}$, which reaches diffraction limit. When the optimal spot array is used to image three-dimensional body grating, it has higher resolution and obvious optical sectioning effect than that of wide field imaging, and has no much difference compared with that of laser scanning confocal imaging. The parallel confocal imaging system based on DMD achieves optical sectioning imaging with high resolution and

收稿日期: 2017-07-28; 收到修改稿日期: 2017-08-31

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(61405238, 61475185, 51376191)、江苏省自然科学基金青年项目(BK20141206)、苏州市医疗器械与新医药专项(ZXY201433)

作者简介: 朱茜(1993—), 女, 硕士研究生, 主要从事共焦显微镜和超分辨显微镜方面的研究。E-mail: 15067137901@163.com

导师简介: 王驰(1982—), 男, 博士, 副研究员, 主要从事光纤传感等方面的研究。E-mail: wangchi@shu.edu.cn

* 通信联系人。E-mail: xiongdaxi@sibet.ac.cn

high imaging contrast on the premise of high speed imaging. It has certain advantages and application prospects in real-time imaging and three-dimensional imaging.

Key words microscopy; applied optics; parallel confocal imaging; digital micromirror device; axial resolution; lateral resolution; imaging contrast

OCIS codes 180.1790; 110.0180

1 引 言

近十几年来,随着技术的发展,共焦成像被广泛应用于生物医药和材料科学等领域^[1-2]。传统的共焦成像普遍采用单点扫描的方式,扫描速度慢,操控扫描头和样品运动的机械控制复杂^[3-4]。并行共焦成像技术可以对被测物面上的多个点同时进行成像,大大提高了测量速度,引起了国内外研究人员的重视。并行共焦成像技术的核心思想是用光分束器件将光源光束分割成光点阵列,通过光学系统建立起光点阵列、物面和相机像面的共轭关系,将每个光点作为一个共焦点进行成像。目前普遍采用Nipkow转盘^[5]和微透镜阵列^[6-7]等实现并行共焦成像,这些方法提高了共焦成像的速度;但是此类微光学器件制作困难,无法保证其光学性能的一致性和均匀性,在测量中引入了较大的误差,且一旦制成,诸如孔径、孔间距(微透镜阵列上对应的参数分别是微透镜直径和微透镜间距)等光学参数将无法更改,故难以适应不同的测量要求^[8]。

为了改善上述缺陷,将数字微镜器件(DMD)当作光分束器件引入到并行共焦成像中。DMD是美国德州仪器公司于1987年发明的一种数字光学器件,其集成了近百万片正方形的微反射镜,镜面为高反射率的铝合金材料。通过DMD芯片控制静电吸引,每个微镜都可以在 $15\ \mu\text{s}$ 内旋转 $+12^\circ$ 和 -12° (也可以旋转 $+10^\circ$ 和 -10°),分别对应“on”和“off”态,可以用作虚拟针孔来代替传统共聚焦的小孔进行多点并行扫描。相较Nipkow转盘、微针孔阵列和微透镜阵列等并行共焦成像,DMD具有无机械振动影响和光点阵列参数可变等优势,且DMD具有程序可控制性,在保证高速成像和高分辨率成像的前提下可适应不同的测量要求。近年来,基于DMD的并行共焦成像技术成为研究热点。

1999年,Hanley等^[9]提出了基于DMD的可编程阵列显微镜,通过光谱转换进行三维光谱成像;2001年,Walker^[10]提出了基于DMD的多点照明非扫描共聚焦荧光显微镜,得到了层切和高分辨率的图像;同年,Bitte等^[11]提出了基于DMD的三维轮廓成像,并对微小结构进行了成像;Fainman等^[12]

也成功研制出基于DMD的并行共焦显微镜,实现了对微血管系统的快速并行点扫描和三维重构。自2008年起,国内学者先后进行了基于DMD的并行共焦系统的研究。余卿等^[8,13-16]提出了基于DMD的并行共焦显微测量和图像处理方法,分析了轴向分辨率与点光源大小的关系,得出轴向分辨率只与光点大小有关、与光点间距(T)无关且光点越大则轴向分辨率越小的结论;Zhang等^[16-19]通过分析深度响应曲线,对硬币和硅材料的台阶结构进行了成像;Wang等^[20]分析了不同大小和周期的针孔阵列对轴向分辨率的影响,发现光点越小则轴向分辨率越大。上述研究中,DMD仅对照明光进行调制,将光源光束分割为并行光源,相当于传统共聚焦中的照明针孔,光路上未实现传统共聚焦中探测针孔的功能,需要用相机或图像处理算法来代替传统共聚焦中的探测针孔,并未对成像光进行调制。

针对上述问题,国内外研究人员考虑对照明光和成像光都进行DMD调制,使DMD既相当于照明针孔,又相当于探测针孔,且DMD、样品和相机三者满足共轭关系。2010年,Feng等^[21]研制出基于DMD的并行激光共焦系统,对分辨率板和肌腱样品进行了成像;同年,Wu等^[22]提出了一种单像素光学层切的可编程阵列显微镜,设计并仿真了照明光路;2012年,Martial等^[23]提出了基于DMD的多波长共聚焦显微镜,对花粉和蜗牛神经元进行了荧光成像。目前,关于光点阵列参数对成像质量的影响分析及对光点阵列参数的优化还未见报道。

本文采用DMD同时充当照明针孔和探测针孔的方案,重新设计了DMD共聚焦系统光路;分析了照明、成像和采样光路中重要元件的参数,并搭建了基于DMD的并行共焦成像系统;理论分析了DMD光点阵列参数对成像质量的影响,实验验证了DMD光点阵列参数与横向分辨率、轴向分辨率、图像对比度、成像速率之间的关系;确定了最优成像效果所对应的光点阵列参数,以此光点阵列对三维体光栅进行成像,并将成像效果分别与宽场成像、共聚焦成像进行了对比分析。

2 实验光路介绍

基于DMD的并行共焦成像系统光路如图1所示,

该系统主要由激光光源、准直扩束镜组、二分之一波片 ($\lambda/2$)、偏振分束器 (PBS)、DMD、筒镜、四分之一波片 ($\lambda/4$)、物镜、相机和电动位移台等组成。激光波长为 532 nm;物镜由日本 Olympus 公司生产,放大倍率为 10,数值孔径为 0.25;采用的 DMD 共包含 1024×768 个

微镜,每个微镜的尺寸为 $13.68 \mu\text{m} \times 13.68 \mu\text{m}$,微镜间隔约为 $1 \mu\text{m}$,切换速率可达 $15 \mu\text{s}$ 。相机 (ORCA-Flash 4.0 V2 C11440-22CU, Hamamatsu, 日本) 的像素尺寸为 $6.5 \mu\text{m} \times 6.5 \mu\text{m}$, Z 轴电动位移台 (KMTS 50E/M, Thorlab) 的轴向精度为 50 nm,轴向移动量为 50 mm。

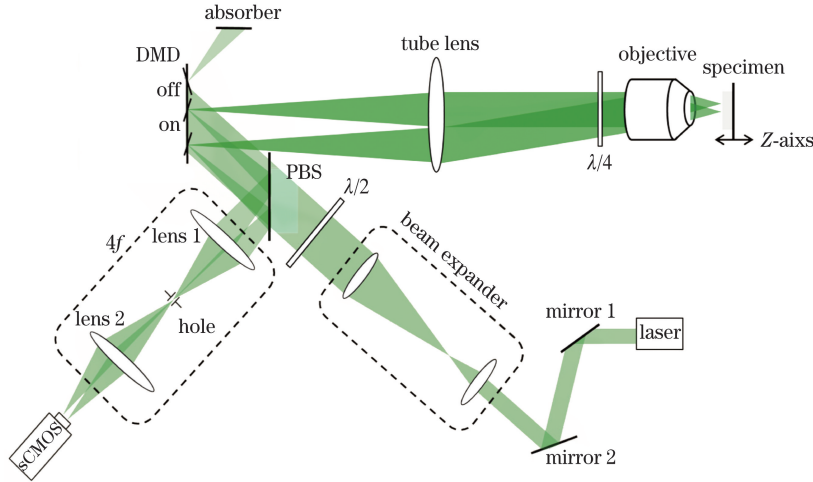


图 1 基于 DMD 的并行共焦成像系统光路

Fig. 1 Optical path of parallel confocal imaging system based on DMD

激光光源发出波长为 532 nm 的准直光,经准直扩束光路、二分之一波片和 PBS 后,以 66° (与 DMD 平面所成夹角) 入射 DMD, DMD 光点等效于照明针孔阵列,处于 on 态的微镜将光反射至筒镜,反射光依次经过四分之一波片和物镜后照亮样品。样品反射的成像光经物镜收集后原路返回 DMD 表面,此时 DMD 光点等效于探测针孔阵列, DMD 与样品面满足共轭关系;经 DMD 光点阵列反射的成像光被 sCMOS 接收, DMD 与 sCMOS 满足共轭关系,即 DMD、样品面与 sCMOS 三者之间两两共轭。

需要指出的是,激光经过二分之一波片被调制为 p 偏振光,四分之一波片与 p 偏振方向成 45° ,照明光经过四分之一波片后被调制为圆偏光,成像光经过四分之一波片后被调制为 s 偏振光。根据 PBS 透过 p 偏振光、反射 s 偏振光的原理实现照明光和成像光的分束。

在照明光路中,激光的端面直径约为 1.5 mm,而 DMD 的尺寸约为 $14.008 \text{ mm} \times 10.506 \text{ mm}$,为了将 DMD 表面完全照亮,激光的直径至少需扩大至原来的 10 倍。采用焦距分别为 30 mm 和 300 mm 的透镜,将激光扩束成直径为 15 mm 的准直光,以 66° 均匀地照亮 DMD 表面。

在成像光路中, DMD 上处于 off 态微镜反射的光被吸收板吸收,处于 on 态微镜反射的光通过筒镜和物镜后照亮样品表面。为了达到系统的衍射极

限, DMD 上一个微镜经过筒镜和物镜缩放到样品表面的尺寸应小于一个艾里斑的大小,即

$$\begin{cases} s_{\text{pixelDMD}} = \frac{f_{\text{obj}}}{f_{\text{Tubelens}}} \leq \delta \\ \delta = \frac{\lambda}{2NA} \end{cases}, \quad (1)$$

式中 $s_{\text{pixelDMD}} = 13.68$ 表示 DMD 一个微镜的尺寸; f_{obj} 、 f_{Tubelens} 分别表示物镜、筒镜的焦距; δ 为阿贝衍射极限,表示艾里斑的大小, $\delta = 1.06 \mu\text{m}$; NA 表示物镜的数值孔径; λ 表示激光的波长, $\lambda = 532 \text{ nm}$ 。对于该系统采用的放大倍率为 10 的物镜, $f_{\text{obj}} = 18 \text{ mm}$, $NA = 0.25$ 。筒镜的焦距应满足

$$f_{\text{Tubelens}} \geq 231.43 \text{ mm}. \quad (2)$$

综上,选取 $f_{\text{Tubelens}} = 300 \text{ mm}$,从而使 DMD 的一个微镜共轭到样品面上的像小于艾里斑。

在采样光路中, DMD 与 sCMOS 像素间的匹配直接影响成像质量,故其匹配需要满足一定的比例关系。若 DMD 单个像素的像过小,可能导致其成像在 sCMOS 像素之间的空隙中,使测量失效;若 DMD 单个像素的像过大,则 sCMOS 无法实现对 DMD 的完整成像。

根据奈奎斯特采样定理,采样光路应满足:在 sCMOS 成像面上, DMD 单个像素 s_{pixelDMD} 至少大于等于 sCMOS 的两个像素 $s_{\text{pixelsCMOS}}$,即

$$s_{\text{pixelDMD}} \geq 2s_{\text{pixelsCMOS}} \frac{f_2}{f_1}, \quad (3)$$

式中 DMD 的单个像素为 $13.68 \mu\text{m}$, sCMOS 的像素为 $6.5 \mu\text{m}$, 故 f_1 和 f_2 应满足 $f_2/f_1 \leq 1.05$ 。采用 $4f$ 系统, 取 $f_1 = f_2 = 180 \text{ mm}$, 使得 DMD 的像素成像到 sCMOS 上的缩放比为 1:1。

相干光经过 DMD 调制后形成的光波场是一个包含了 DMD 自身衍射图案、DMD 所照明样品实像、虚像的复杂二维周期性光波场^[8]。当 DMD 用于并行共焦成像时, 只需用到 DMD 的零级衍射图案中包含的 DMD 所照明样品的实像。在 $4f$ 系统中透镜 1 和透镜 2 的焦面处增加一个小孔, 只让零

级衍射图案中的样品实像被 sCMOS 接收, 从而滤除 DMD 自身衍射图案、样品虚像和除零级衍射以外的样品实像, 以获得样品清晰的实像。

3 光点阵列设计

DMD 光点阵列参数如图 2 所示, 其中白色和黑色的方块分别表示 on 态和 off 态的微镜。图 2(a) 为光点大小调制示意图, 从上到下分别为 1×1 、 2×2 、 3×3 光点大小; 图 2(b) 为以 2×2 光点大小为例的光点间距调制示意图, 从上到下依次为 2, 4, 6 倍光点间距。

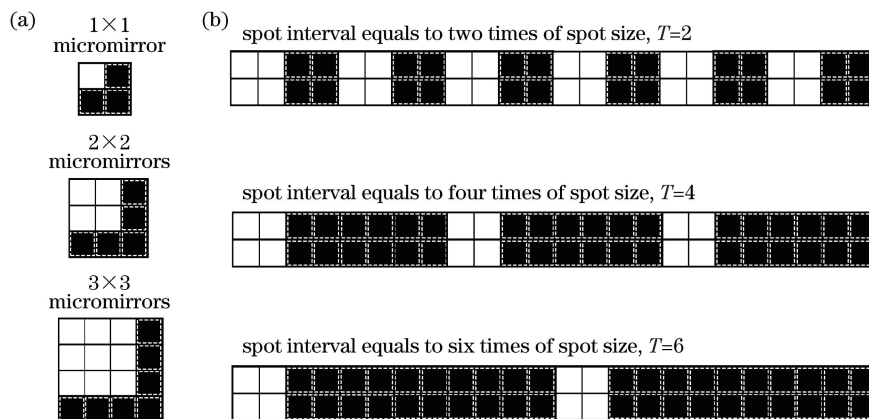


图 2 DMD 光点阵列参数。(a) 光点大小调制; (b) 光点间距调制(以 2×2 光点大小为例)

Fig. 2 Parameters of DMD spot array. (a) Modulation of spot size; (b) modulation of spot interval (taking 2×2 micromirrors for example)

1×1 光点大小、2 倍光点间距光点阵列的 DMD 扫描方式如图 3 所示。其中, 光点间距越大, 微镜间成像的相互干扰越小。传统的 DMD 并行共焦成像采用图 3(a) 所示的排列方式, on 态微镜的间距不同, 所引起的微镜间干扰差别较大, 对成像的影响也有较大差别。此处采用图 3(b) 的排列方式, 相较

图 3(a) 的传统排列方式, 处于 on 态的微镜与其周围 on 态微镜间距的差别变小, 引起的微镜间干扰趋于相同, 对成像的影响也趋于均匀分布, 故其优于传统的排列方式。采用的 DMD 微镜阵列扫描方式如图 3(c) 所示, 以 1×1 光点大小、2 倍光点间距的光点阵列为例, 将 DMD 上处于 on 态的微镜依次向右

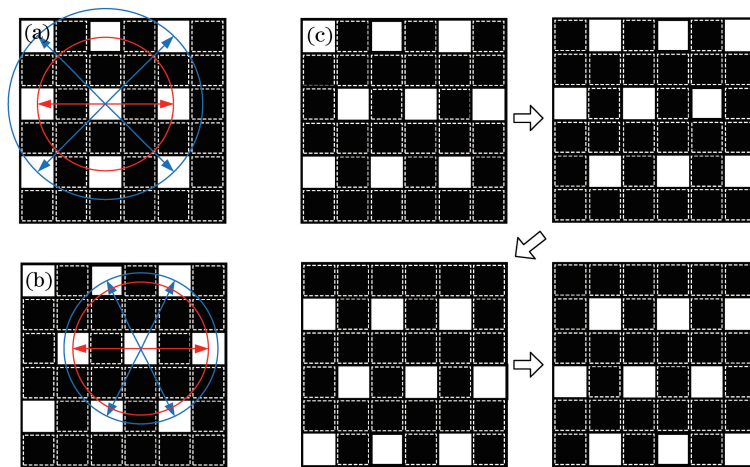


图 3 1×1 光点大小、2 倍光点间距光点阵列的 DMD 扫描方式。(a) 传统的排列方式; (b) 采用的排列方式; (c) 采用的扫描方式

Fig. 3 DMD scanning mode of spot array with 1×1 spot size and two times of spot interval. (a) Traditional arrangement mode; (b) used arrangement mode; (c) used scanning mode

移动 1 个像素单元,移动 2 次,对样品某一行进行扫描,按此方式对样品逐行扫描 2 次,便能完成对样品一个平面的扫描,并用图像相加算法将一个扫描周期中的所有图像相加,重构出完整的图像。

4 光点阵列对成像效果的影响

图像质量由不同的参数进行评价,其中轴向分辨率、横向分辨率和图像对比度是主要的评价参数。并行共焦成像中光点阵列参数的变化会影响系统的成像质量。分别利用分辨率板和深度响应曲线来定量分析轴向分辨率、横向分辨率和图像对比度,讨论光点阵列参数变化对成像效果的影响。当相机积分时间相同时,成像速度只与光点间距有关,光点间距越大,则成像速度越慢。

4.1 轴向分辨率

影响系统轴向分辨率的主要因素是轴向光强分布,称为深度响应函数,评价深度响应优劣的指标为半峰全宽^[20](FWHM),FWHM 越小,则轴向分辨率越高。FWHM 定义为沿轴向采样时,接收端光

强在最大值一半时所对应的轴向坐标间距,其计算公式为

$$W_{FWHM} = \frac{0.45\lambda}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}}, \quad (4)$$

式中 W_{FWHM} 为半峰全宽, n 为物镜的折射率。可见, NA 越大、 λ 越小,则 W_{FWHM} 越小,其轴向分辨率越高。理论上, $W_{FWHM} \approx 7.54 \mu\text{m}$ 。

以反射镜为样品,分别采用 1×1 、 2×2 和 3×3 共 3 组光点大小对样品进行成像,并使用电动位移台在垂直样品面方向上移动样品,得到的深度响应曲线如图 4 所示。其中横坐标为样品在垂直样品面方向上的位移,即轴向位移量;纵坐标为强度,最高点表示样品位于正焦状态,此时所对应的光强为最大值。深度响应曲线在最大值一半时所对应的横坐标间距为 FWHM。由图 4 可知, 1×1 光点大小的 FWHM 为 $7.82 \mu\text{m}$,与理论值 $7.54 \mu\text{m}$ 基本一致; 2×2 、 3×3 光点大小的 FWHM 分别为 $8.75 \mu\text{m}$ 和 $16.93 \mu\text{m}$,即光点越小,FWHM 越小,轴向分辨率越高。

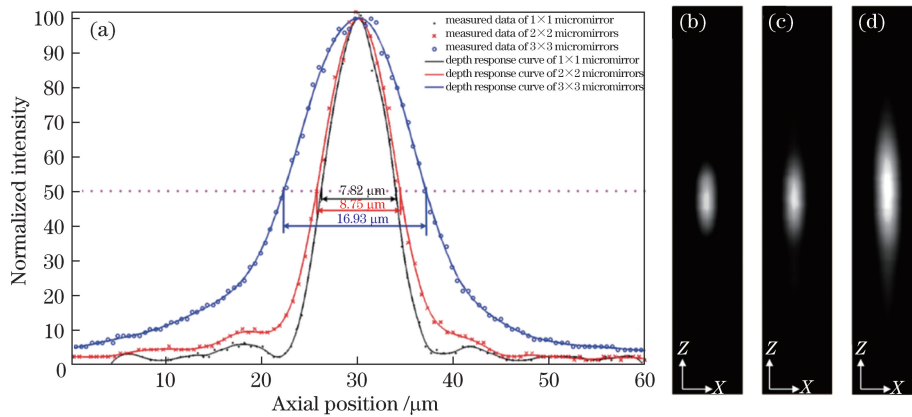


图 4 不同光点大小的轴向分辨率比较。(a)不同光点大小的深度响应曲线;
(b) 1×1 、(c) 2×2 和 (d) 3×3 光点大小的轴向成像深度

Fig. 4 Comparison of axial resolution with different spot sizes. (a) Depth response curves of different spot sizes; axial imaging depth of (b) 1×1 , (c) 2×2 and (d) 3×3 spot sizes

不同光点大小、不同光点间距的深度响应曲线如图 5 所示。图 5(a)为 1×1 光点大小、不同光点间距的深度响应曲线,4 条深度响应曲线基本重叠,FWHM 无较大差距;图 5(b)、(c)所示的 2×2 、 3×3 光点大小的深度响应曲线基本重叠,FWHM 无较大差距。综上所述,当光点间距大于光点大小时,增大光点间距对轴向分辨率无明显改善。

4.2 横向分辨率

以高分辨率板(USAF1951 # 58-198, Edmund Optics, 美国)作为样品,对系统的横向分辨率进行标定。用不同光点大小和光点间距的光点阵列分别

对分辨率板进行成像,并用图像相加算法将一个扫描周期中的所有图像相加,以重构出完整图像。12 组不同光点阵列对分辨率板的成像如图 6 所示。

分别对图 6 的 12 组不同光点阵列对分辨率板的成像图进行横向分辨率标定。以 $T=4$ 的 3 组不同光点阵列为例,分析过程如图 7 所示,图 7(a)为 1×1 光点大小、 $T=4$ 的光点阵列对分辨率板的成像图;图 7(b)为 1×1 光点大小、 $T=4$ 的光点阵列对分辨率板“9-1”线对的竖直剖切线;图 7(c)为图 7(b)中竖直剖切线的灰度变化。根据瑞利判据,由图 7(c)中的灰度变化能够区分“9-1”线对,故认为

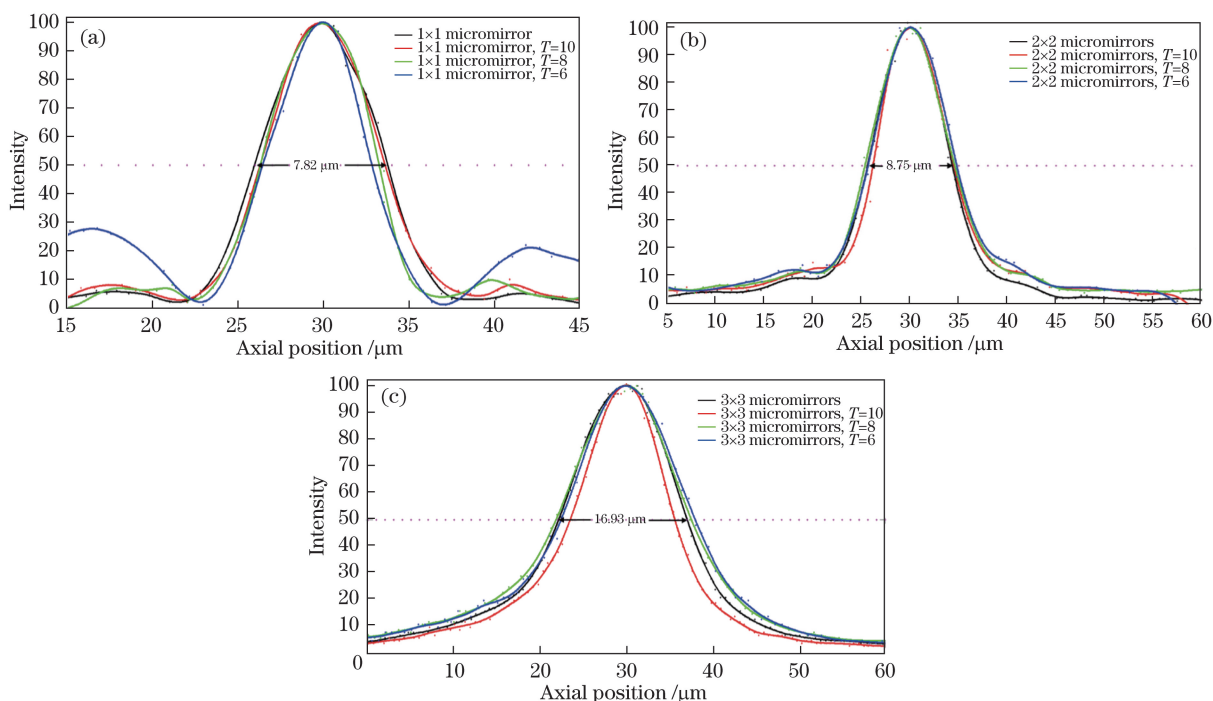


图 5 不同光点间距的轴向分辨率比较。(a) 1×1 光点大小；(b) 2×2 光点大小；(c) 3×3 光点大小

Fig. 5 Comparison of axial resolution with different spot intervals. (a) 1×1 spot size; (b) 2×2 spot size; (c) 3×3 spot size

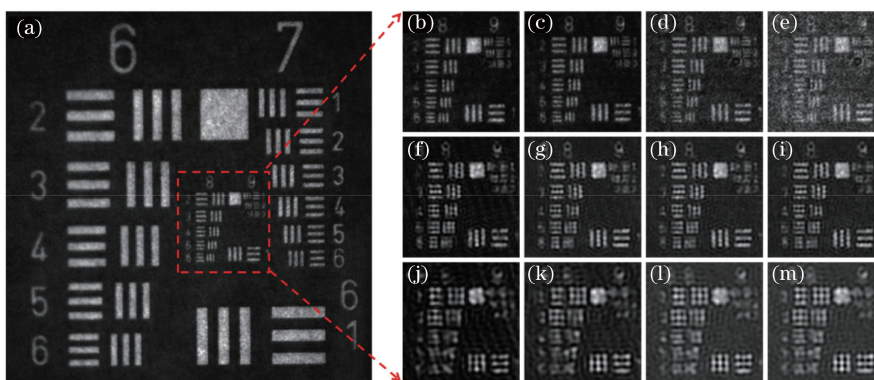


图 6 不同光点阵列对分辨率板的成像。(a) 1×1 光点大小, 2 倍光点间距; (b)~(e) 1×1 光点大小, 2, 4, 6, 8 倍光点间距; (f)~(i) 2×2 光点大小, 2, 4, 6, 8 倍光点间距; (j)~(m) 3×3 光点大小, 2, 4, 6, 8 倍光点间距

Fig. 6 Imaging of resolution plate with different spot arrays. (a) 1×1 spot size and two times of spot interval; (b)-(e) 1×1 spot size and two, four, six, eight times of spot interval; (f)-(i) 2×2 spot size and two, four, six, eight times of spot interval; (j)-(m) 3×3 spot size and two, four, six, eight times of spot interval

1×1 光点大小、 $T=4$ 的光点阵列能看清“9-1”线对, 即横向分辨率高于 512 lp/mm; 同理, 由图 7(e)、(g) 所示的灰度变化差异可得, 2×2 光点大小、 $T=4$ 的光点阵列的横向分辨率高于 406 lp/mm, 3×3 光点大小、 $T=4$ 的光点阵列的横向分辨率高于 323 lp/mm。

由图 7 可见: 1×1 光点大小所对应的横向分辨率优于 977 nm, 由阿贝衍射极限得出系统的理论横向分辨率为 $1.06 \mu\text{m}$, 故 1×1 光点大小可达到衍射极限; 2×2、3×3 光点大小所对应的横向分

辨率低于 1×1 光点大小所对应的横向分辨率, 且光点越小, 图像的横向分辨率越高; 当光点间距大于光点大小时, 增大光点间距对成像的横向分辨率无明显改善。

4.3 图像对比度

图像对比度指的是一幅图像灰度反差的大小, 可以通过最大强度 I_{\max} 和最小强度 I_{\min} 对其进行计算, 可表示为

$$I_{\text{contrast}} = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}} \times 100\% \quad (5)$$

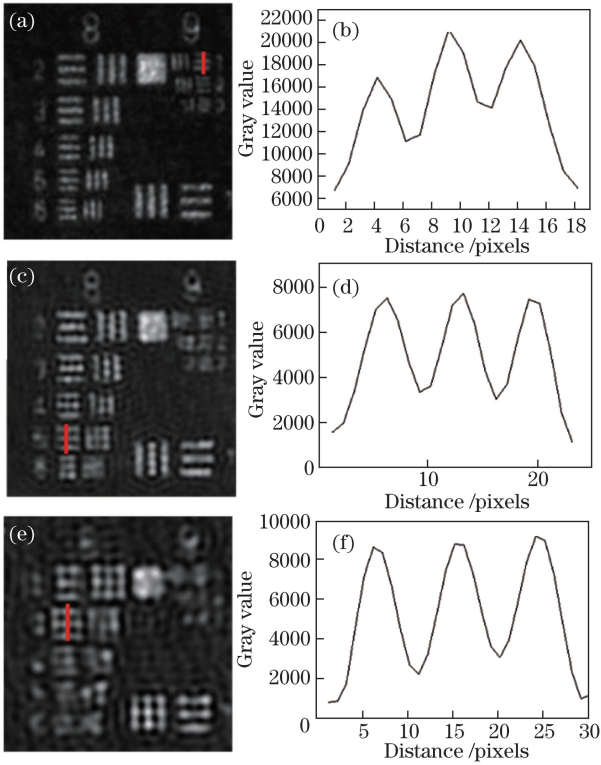


图 7 (a) 1×1 光点大小、 $T=4$ 的光点阵列对分辨率板“9-2”线对的竖直剖切线；(b)图 7(a)中竖直剖切线的灰度变化；(c) 2×2 光点大小、 $T=4$ 的光点阵列对分辨率板“8-5”线对的竖直剖切线；(d)图 7(c)中竖直剖切线的灰度变化；(e) 3×3 光点大小、 $T=4$ 的光点阵列对分辨率板“8-2”线对的竖直剖切线；(f)图 7(e)中竖直剖切线的灰度变化

Fig. 7 (a) Vertical section line of “9-2” line pairs on resolution plate with spot size of 1×1 and $T=4$;
(b) change of gray level of vertical section line in Fig. 7(a);
(c) vertical section line of “8-5” line pairs on resolution plate with spot size of 2×2 and $T=4$;
(d) change of gray level of vertical section line in Fig. 7(c);
(e) vertical section line of “8-2” line pairs on resolution plate with spot size of 3×3 and $T=4$;
(f) change of gray level of vertical section line in Fig. 7(e)

光点间距代表光点阵列的疏密程度，决定着相邻光点间的相互干扰程度。光点间距越小，则扫描速度越快，光点接收相邻光点的光信号比例越大。所接收的相邻光点光信号大部分为离焦信息，这使得该光点处的背景噪声变大，导致图像对比度下降；反之，光点间距越大，则扫描速度越慢，光点接收相邻光点的光信号比例越小，该光点处的背景噪声越小，图像对比度越高。

对图 6 中 1×1 光点大小的 4 组不同光点阵列的分辨率板成像图进行图像对比度分析，结果如图 8 所示，由图可见，当光点间距为 4 倍光点大小时，所对应的图像对比度最高。

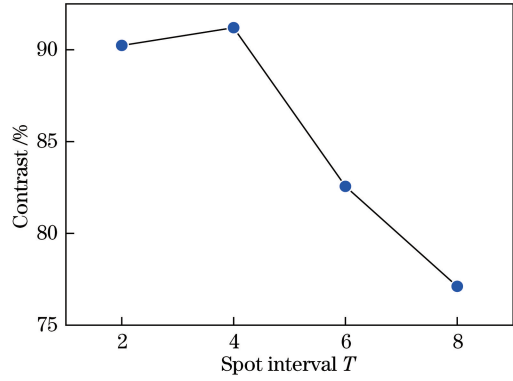


图 8 1×1 光点大小、不同光点间距的图像对比度
Fig. 8 Contrast of image with 1×1 spot size and different spot intervals

4.4 成像速度

在相机积分时间相同的条件下，基于 DMD 并行共焦成像系统的成像速度只与光点间距有关，即

$$t = \delta' T^2, \quad (6)$$

$$v = \frac{1}{t} = \frac{1}{\delta' T^2}, \quad (7)$$

式中 t 为成像时间， δ' 为单帧图像的曝光时间， v 为成像速度， T 为光点间距。对于光点间距为 T 的光点阵列， t 为 δ' 的 T^2 倍，故成像速度 v 与 T^2 成反比。如图 9 所示，当 $\delta' = 1/400$ s 时， $t = T^2/400$ s， $v = 400/T^2$ ，光点间距越大，则成像速度越慢。

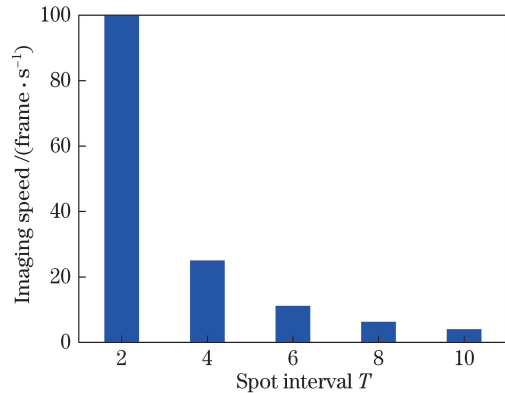


图 9 不同光点间距的成像速度比较
Fig. 9 Comparison of imaging speeds with different spot intervals

4.5 最优光点阵列

由上述分析可知，横向和轴向分辨率随光点的减小而增大。当光点间距大于光点大小时，增大光点间距对横向和轴向分辨率均无明显改善；成像速度与光点大小无关，仅随光点间距的增大而减小；对于 1×1 光点大小，当光点间距为 4 倍光点大小时图像对比度最高，故 1×1 光点大小、4 倍光点间距为最优光点阵列，能够实现高分辨率、高成像速度和高

图像对比度的并行共聚焦成像。

上述光点阵列优化方案并不依赖于特定型号的 DMD 或物镜。不同型号 DMD 的主要差别在于微镜尺寸及数量,而微镜的形状及排列方式均相同。采用提出的正六边形排列方式均能使处于 on 态的微镜间的距离趋于相同,从而改善成像质量。物镜的数值孔径大小决定了样品表面照明光点的大小及系统分辨率。当改变物镜数值孔径时,需保证照明光点大小、DMD 微镜尺寸及 sCMOS 像元大小满足一定的匹配关系,必要时可调整光学系统缩放比,从而不影响整体方案的有效性。

4.6 最优光点阵列与宽场和共聚焦成像比较

三维体光栅的成像如图 10 所示。图 10(a)为宽场对三维体光栅的成像,图 10(c)为基于 DMD 的并行共聚焦成像系统在最优光点阵列(即 1×1 光点大小、4 倍光点间距)下对三维体光栅的扫描成像(放大倍率为 10, $NA=0.25$),图 10(e)为 Leica 共聚焦显微镜对三维体光栅的单点扫描成像(共聚焦小孔为 $200 \mu\text{m}$),图 10(b)、(d)、(f)分别为图 10(a)、(c)、(e)中黄色画线部分的强度分布。

三维体光栅中,位置 A、C、E 和 G 为凸状结构,位置 B、D 和 F 为凹状结构,图 10(a)、(c)、(e)分别对位置 A、C、E 和 G 所在平面进行正聚焦成像,即位置 B、D 和 F 所在平面为离焦成像。由图 10(b)可知,图 10(a)中位置 B 的强度远远高于位置 A、C、E 和 G,位置 D 和 F 的强度约为位置 A、C、E 和 G 的一半,说明在宽场成像中三维体光栅不同层的样品信息相互重叠,导致层切效果差,背景噪声强,成像质量差。由图 10(d)可知,图 10(c)中位置 B、D 和 F 的强度趋近于 0,位置 A 的强度最高,位置 C、E 和 G 在最优光点阵列的并行扫描成像中层切效果明显,适用于三维成像。同样,由图 10(f)可知,在图 10(e)中位置 B、D 和 F 的强度约为 10~20,比图 10(c)中位置 B、D 和 F 的强度略高,说明 Leica 共聚焦显微镜成像有明显的层切效果,但略差于图 10(c)的层切效果。

综上所述,基于 DMD 并行共聚焦成像系统,采用最优光点阵列扫描三维体光栅时,在保证高速成像的前提下,实现了高横向和轴向分辨率、高对比度的成像,层切效果较好,适用于三维样品的成像。相比商用 Leica 共聚焦系统,基于 DMD 的并行共聚焦成像系统的成像效果无较大差距,但在成像速度上却有明显的优势。受相机曝光时间的限制(以 flash4.0 相机为例),对 $512 \text{ pixel} \times 512 \text{ pixel}$ 的图像帧频可

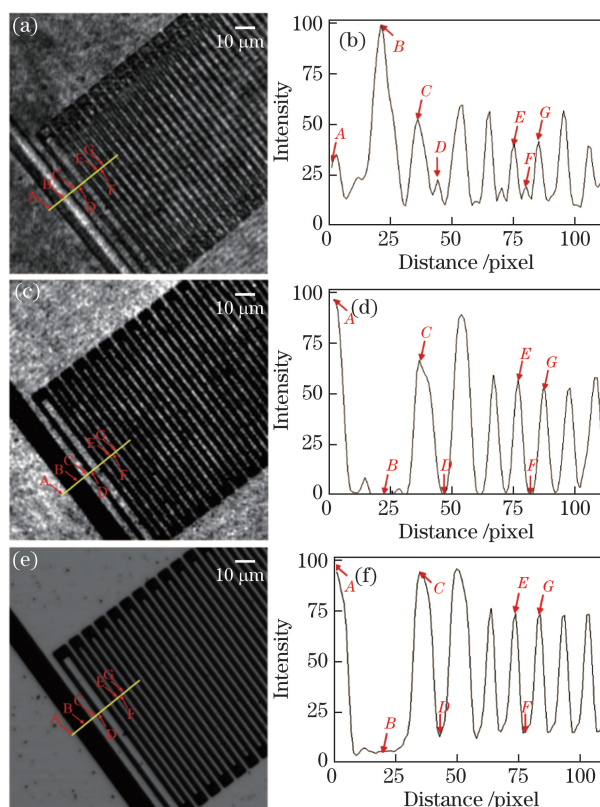


图 10 三维体光栅的成像。(a)宽场成像及其(b)强度分布;
(c)最优光点阵列的并行扫描成像及其(d)强度分布;
(e) Leica 共聚焦显微镜成像及其(f)强度分布

Fig. 10 Imaging of three-dimensional body grating.

(a) Wide field imaging and (b) its intensity distribution;
(c) parallel scanning imaging of optimal spot array and
(d) its intensity distribution; (e) Leica confocal microscopy
imaging and (f) its intensity distribution

达 $100 \text{ frame} \cdot \text{s}^{-1}$,即 1 s 最快可得到 25 张 $512 \text{ pixel} \times 512 \text{ pixel}$ 的图像,如图 10(c)所示;Leica 共聚焦系统采用单点扫描成像,1 s 最快只能得到 1 张 $512 \text{ pixel} \times 512 \text{ pixel}$ 的图像,如图 10(e)所示。

5 结 论

设计并搭建了基于 DMD 的并行共聚焦成像系统,介绍了 DMD 的并行扫描方式,分析了 DMD 光点阵列参数对轴向分辨率、横向分辨率、图像对比度和成像速度的影响,并得到了最优光点阵列。以最优光点阵列对三维体光栅进行了并行扫描成像,并与宽场和共聚焦系统的成像效果进行了对比分析。实验结果表明,光点越小,则横向和轴向分辨率越高;成像速度只随光点间距的增大而减小;当光点间距大于光点大小时,增大光点间距对成像的横向和轴向分辨率均无明显改善; 1×1 光点大小时,当光点间距为 4 倍光点大小时图像对比度最高,且具有

较大的成像速度,即 1×1 光点大小、4 倍光点间距为最优光点阵列。基于 DMD 的并行共焦成像系统在保证高分辨率和层切成像效果的前提下,实现了高速的扫描成像,在实时成像和三维成像的实际应用中具有一定的优势和指导意义。

参 考 文 献

- [1] Pawley J B. Handbook of biological confocal microscopy[M]. New York: Plenum Press, 1990.
- [2] Wilson T. Confocal microscopy[M]. New York: Academic Press, 1990.
- [3] Yang J M, Qiu L R, Zhao W Q, *et al.* Laser differential reflection-confocal focal-length measurement[J]. Optics Express, 2013, 20(23): 26027-26036.
- [4] Corle T R, Kino G S. Confocal scanning optical microscopy and related imaging systems[M]. San Diego: Academic Press, 1996.
- [5] Wilson T, Sheppard C. Theory and practice of scanning optical microscopy[M]. London: Academic Press, 1984.
- [6] Tiziani H J, Uhde H M. Three-dimensional analysis by a microlens-array arrangement[J]. Applied Optics, 1994, 33(4): 567-572.
- [7] Fujita K, Nakamura O, Kaneko T, *et al.* Confocal multipoint multiphoton excitation microscope with microlens and pinhole arrays[J]. Optics Communications, 2000, 174(1/2/3/4): 7-12.
- [8] Yu Q, Yu X F, Liu W W, *et al.* Re-studies on parallel confocal measurement system with digital micromirror device[J]. Acta Optica Sinica, 2011, 31(5): 0523005.
余卿,余晓芬,刘文文,等. 数字微镜器件用于并行共焦测量的再研究[J]. 光学学报, 2011, 31(5): 0523005.
- [9] Hanley Q S, Verveer P J, Arndt-Jovin D J, *et al.* Three-dimensional spectral imaging by Hadamard transform spectroscopy in a programmable array microscope[J]. Journal of Microscopy, 2000, 197: 5-14.
- [10] Walker J G. Non-scanning confocal fluorescence microscopy using speckle illumination[J]. Optics Communications, 2001, 189(4/5/6): 221-226.
- [11] Bitte F, Dussler G, Pfeifer T. 3D micro-inspection goes DMD[J]. Optics and Lasers in Engineering, 2001, 36(2): 155-167.
- [12] Fainman Y, Botvinick E, Price J. 3D quantitative imaging of the microvasculature with the Texas instruments digital micromirror device[C]. SPIE, 2001, 4457: 137-144.
- [13] Yu Q, Yu X F, Cui C C, *et al.* Research on image processing in parallel confocal measurement with DMD[J]. Acta Metrologica Sinica, 2015, 36(2): 113-117.
余卿,余晓芬,崔长彩,等. 基于 DMD 的并行共焦图像处理研究方法研究[J]. 计量学报, 2015, 36(2): 113-117.
- [14] Yu Q, Ye R F, Fan W, *et al.* Parameters of structured lights of DMD used in confocal measurement[J]. Optics and Precision Engineering, 2015, 23(5): 1273-1278.
余卿,叶瑞芳,范伟,等. 基于数字微镜器件实现共焦测量的结构光参数[J]. 光学精密工程, 2015, 23(5): 1273-1278.
- [15] Yu X F, Yu Q, Liu W W, *et al.* Parallel confocal microscopy detection with digital micromirror device[J]. Opto-Electronic Engineering, 2010, 37(9): 56-62.
余晓芬,余卿,刘文文,等. 数字微镜器件用于并行共焦显微探测的研究[J]. 光电工程, 2010, 37(9): 56-62.
- [16] Zhang Yunbo, Strube S, Molnar G, *et al.* Parallel large-range scanning confocal microscope based on a digital micromirror device[J]. Optik, 2013, 124(13): 1585-1588.
- [17] Zhang Y B, Hou W M, Ju A S, *et al.* Design and experiment of digital micromirror device based confocal microscope[J]. Chinese Journal of Scientific Instrument, 2011, 32(9): 2108-2113.
张运波,侯文玫,句爱松,等. 基于数字微镜器件的共焦显微镜的设计与实验[J]. 仪器仪表学报, 2011, 32(9): 2108-2113.
- [18] Zhang Y B, Hou W M, Zhang J H, *et al.* The development of parallel confocal microscope employing digital micromirror device[J]. Opto-Electronic Engineering, 2011, 38(6): 65-70.
张运波,侯文玫,郑继红,等. 采用数字微镜的共焦显微镜的研制[J]. 光电工程, 2011, 38(6): 65-70.
- [19] Guan Z C, Zhang Y B, Hou W M. The optical design of confocal microscope based on DMD[J]. Optical Instruments, 2011, 33(3): 57-61.
官志超,张运波,侯文玫. 基于数字微镜的共焦显微系统的光路设计[J]. 光学仪器, 2011, 33(3): 57-61.
- [20] Wang Q Q, Zheng J H, Wang K N, *et al.* Parallel detection experiment of fluorescence confocal microscopy using DMD[J]. Scanning, 2016, 38(3): 234-239.
- [21] Feng Z F, Wang L Q, Duan H L. Confocal fluorescence microendoscopy using a digital micromirror device[C]. SPIE, 2010, 7845(1): 367-370.
- [22] Wu Y, Ye P, Arce G R, *et al.* A single-pixel optical-sectioning programmable array microscope (SP-PAM)[C]. SPIE, 2010, 7596: 75960D.
- [23] Martial F P, Hartell N A. Programmable illumination and high-speed, multi-wavelength, confocal microscopy using a digital micromirror[J]. Plos One, 2012, 7(8): e43942.