

聚焦型折射率显微成像系统空间分辨率的影响因素及改进方法

杨艺哲¹, 刘中法¹, 方宇¹, 吴晓静^{2*}, 杨勇^{1**}, 朱思伟²

¹南开大学现代光学研究所, 天津 300071;

²天津市人民医院, 天津 300121

摘要 为了提高成像系统的空间分辨率, 分析聚焦型折射率显微成像系统中聚焦光斑尺寸与包络形状对空间分辨率的影响机制, 提出一种通过数值去卷积算法改善成像空间分辨率的方法。首先分析聚焦广义柱矢量光束的空间场分布, 接着对比该光束与理想细光束在折射率显微成像过程中对空间分辨率的影响差异。通过测量折射率与形状已知的 PS(Polystyrene) 小球, 获得该实验条件下系统的点扩展函数。采用去卷积算法对其他样品图像进行重构, 获得更加接近真实情况的实验结果。结果表明, 该方法对提高该系统的成像质量与空间分辨率有着显著的效果。

关键词 物理光学; 石墨烯; 折射率成像; 光束分析; 空间分辨率

中图分类号 O436

文献标志码 A

doi: 10.3788/AOS202141.1726001

Influencing Factors and Improved Methods of Spatial Resolution of Focused Refractive Index Microscopy Imaging System

Yang Yizhe¹, Liu Zhongfa¹, Fang Yu¹, Wu Xiaojing^{2*}, Yang Yong^{1**}, Zhu Siwei²

¹Institute of Modern Optics, Nankai University, Tianjin 300071, China;

²Tianjin Union Medical Centre, Tianjin 300121, China

Abstract In order to improve the spatial resolution of the imaging system, the influence mechanisms of the focal spot size and envelope shape in the focused refractive index microscopy imaging system on the spatial resolution are analyzed, and a method for improving the imaging spatial resolution through a numerical deconvolution algorithm is proposed. First, the spatial field distribution of the focused generalized cylindrical vector beam is analyzed, and then the difference between the influence of this beam and the ideal slim beam on the spatial resolution during the refractive index microscopic imaging process is compared. By measuring PS (Polystyrene) spheres with known refractive index and shape, the point spread function of the system under the experimental conditions is obtained. The deconvolution algorithm is used to reconstruct other sample images to obtain experimental results closer to the real situation. The results show that this method has a significant effect on improving the imaging quality and spatial resolution of the system.

Key words physical optics; graphene; refractive index imaging; beam analysis; spatial resolution

OCIS codes 260.5430; 160.4236; 040.1880; 100.2960

1 引言

作为一种新型的二维材料, 石墨烯具有很多独

特的光电特性。基于石墨烯的偏振选择吸收特性^[1-2]可以实现高灵敏度的折射率测量, 基于该原理研制的生物传感器在癌细胞筛选、气体成分和气体

收稿日期: 2021-01-25; 修回日期: 2021-03-09; 录用日期: 2021-03-23

基金项目: 国家自然科学基金(12074203, 11774256)

通信作者: *xiaojingwu@nankai.edu.cn; **yangyong@nankai.edu.cn

参数检测等领域得到广泛的应用^[3-4]。2013 年,科学家提出了基于还原氧化石墨烯的高度集成的光声成像系统,实现对癌症小鼠病变部位的快速且高质量的光声成像^[5]。但是所有已报道的石墨烯细胞传感与成像技术并不具有高的空间分辨率,因此本课题组基于石墨烯的偏振选择吸收原理提出了一种细胞显微折射率成像技术,相比于现有的表面等离子体显微成像技术^[6-7]具有无标记、高空间分辨率、高折射率灵敏度及大探测深度等特点,在细胞生理活动的动态监测和细胞药物应答等领域具有重要的潜在应用价值。研究发现,提高成像的空间分辨率会改善细胞的成像质量。本课题组首先采用线偏振光聚焦的方法实现了空间分辨率为 $2.34 \mu\text{m}$ 和折射率灵敏度为 9.3×10^{-4} RIU (RIU 为单位折射率) 的折射率显微成像^[8]; 然后采用广义柱矢量光束经过高数值孔径物镜聚焦的方式,实现了空间分辨率为 $1.07 \mu\text{m}$ 和折射率灵敏度为 4.40×10^{-5} RIU 的折射率显微成像^[9]; 最后进一步结合使用共聚焦成像技术,实现了空间分辨率为 727 nm 和折射率灵敏度为 2.86×10^{-5} RIU 的折射率显微成像^[10]。

然而,仅仅采用光束调制技术很难进一步改善成像的空间分辨率,而通过对聚焦光场分布的分析,再结合去卷积等数学的手段,可以进一步提高成像系统的空间分辨率。目前,已有科学家在不同的应用领域针对不同类型的光束开展了许多相关研究,例如有科学家针对涡旋光束在大气中传输所产生的湍流效应而导致其存在轨道角动量发生串扰和传输质量下降的问题,研究了大气湍流及光束参数对聚焦贝塞尔光束的螺旋谱展宽和接收功率的影响^[11]。科学家结合了艾里光束片状光照明样本成像与去卷

积算法,实现了光片显微镜对样本的高轴向分辨率大视场成像^[12]。

本文首先分析紧聚焦条件下矢量光束聚焦场的形成与光场分布,基于菲涅耳公式计算多层膜结构在不同偏振态下的光强差分探测结果,分别构建细光束和柱矢量聚焦光场扫描载玻片上方介质小球的折射率分布模型,并对这一物理过程与机理进行研究,定量分析不同光束对系统空间分辨率的影响。然后提出一种消除光束包络形状的方法,采用已知折射率分布的介质小球测量出系统的点扩展函数,通过编写反卷积的重构算法重构出更为接近理想条件下的实验结果,有效消除宽光束包络形状带来的影响,改善成像系统的空间分辨率。

2 基本原理

2.1 折射率的测量原理

在全内反射的条件下,光从光密介质射入光疏介质中会在交界面处形成倏逝波。所用的光学系统折射率的测量原理是基于石墨烯的偏振选择吸收特性,为此设计一种三明治结构,将石墨烯夹在介质 1 (折射率 n_1) 和介质 2 (折射率 n_2) 的中间,结构如图 1(a) 所示。石墨烯具有复杂的光学常数,复折射率 n 为 $2.6 + 1.3i$ 。单层石墨烯的厚度为 0.34 nm 。根据菲涅耳公式及多层膜耦合理论,对石墨烯在全内反射条件下的反射率进行模拟,则 TE (Transverse Electric) 偏振波和 TM (Transverse Magnetic) 偏振波的反射率曲线如图 1(b) 所示。从图 1(b) 可以看到,当入射角大于临界角 (61.2°) 时,石墨烯对 TE 偏振光的吸收强于 TM 偏振光,展现出了石墨烯的偏振选择吸收特性。

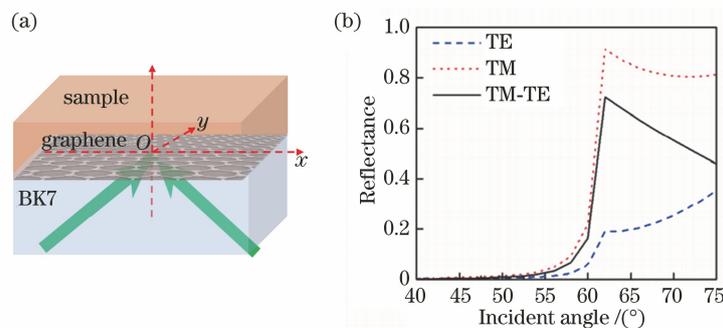


图 1 全内反射条件下石墨烯的偏振选择吸收特性。(a) 含有石墨烯的三明治结构示意图;
(b) TE 偏振光和 TM 偏振光的反射率曲线

Fig. 1 Polarization selective absorption properties of graphene under total internal reflection conditions. (a) Schematic of sandwich structure containing graphene; (b) reflectivity curves of TE polarized light and TM polarized light

2.2 广义柱矢量光束与理想细光束的理论模拟

基于 2.1 节的石墨烯偏振选择吸收特性,搭建基于石墨烯的折射率显微成像系统,该系统采用的是偏振角度为 45° 的广义柱矢量光束。根据聚焦矢量衍射的基础理论,Zhan 等^[13-16]将折射率显微成像系统延伸推广至广义柱矢量偏振光聚焦光场的计算与模拟。一束广义柱矢量光束的电场可以表示为

$$\mathbf{E}(r, \varphi) = P[\cos \varphi_0 \mathbf{e}_r + \sin \varphi_0 \mathbf{e}_\varphi], \quad (1)$$

式中: φ_0 为光束中每一点偏振方向与其径向方向的夹角; \mathbf{e}_r 和 \mathbf{e}_φ 分别为沿径向 r 和角向方向 φ 的单位矢量; P 为系统的瞳函数。广义柱矢量光束的聚焦场表达式为

$$\mathbf{E}(r, \varphi, z) = E_z \mathbf{e}_z + E_r \mathbf{e}_r + E_\varphi \mathbf{e}_\varphi, \quad (2)$$

式中: \mathbf{e}_z 为沿传播方向 z 上的单位矢量; E_z 、 E_r 和 E_φ 分别为沿传播方向、径向和角向的电场分量强度,分别表示为

$$\begin{cases} E_z(r, \varphi, z) = iA \cos \varphi_0 \int_0^{\theta_{\max}} \cos^{\frac{1}{2}}(\theta) P(\theta) \sin^2 \theta J_0(kr \sin \theta) \exp(ikz \cos \theta) d\theta \\ E_r(r, \varphi, z) = A \cos \varphi_0 \int_0^{\theta_{\max}} \cos^{\frac{1}{2}}(\theta) P(\theta) \sin \theta \cos \theta J_1(kr \sin \theta) \exp(ikz \cos \theta) d\theta, \\ E_\varphi(r, \varphi, z) = A \sin \varphi_0 \int_0^{\theta_{\max}} \cos^{\frac{1}{2}}(\theta) P(\theta) J_1(kr \sin \theta) \exp(ikz \cos \theta) d\theta \end{cases} \quad (3)$$

式中: A 为一个振幅系数,计算过程中常常省略或取为 1; $J_0(x)$ 为第一类贝塞尔函数,其中 o 为其阶数; θ_{\max} 为由显微物镜数值孔径决定的最大孔径角; k 为入射光的波矢。对于圆孔或矩孔等孔径,透光部分的 $P(\theta)$ 值为 1。当 φ_0 为 0 时,对应径向偏振光的聚焦;当 φ_0 为 90° 时,对应角向光的聚焦;当 φ_0 为其他角度时,则对应广义柱矢量光束的聚焦。

在仿真模拟中,模拟波长为 532 nm 的 45° 广义柱矢量光束经过一个具有高数值孔径($NA = 1.49$)的显微物镜后的聚焦光场分布。图 2(a) 为广义柱矢量光束聚焦的示意图,图 2(b)~2(d) 分别为其聚焦后纵向电场分量强度 E_z 、径向电场分量强度 E_r 以及角向电场分量强度 E_φ 的分布。从图 2 可以看到,对于 45° 广义柱矢量偏振光束的聚焦,聚焦光斑同时具有 E_z 、 E_r 和 E_φ 三个电场分量,说明在其光斑上同时具有 p 偏振和 s 偏振,其聚焦电场即为相应的径向偏振光和角向偏振光的聚焦场的线性叠加。由于 45° 广义柱矢量偏振光束的聚焦光斑同时具有 p 偏振和 s 偏振,这样就可以实现共光路的聚焦并与石墨烯发生作用。

以上介绍了广义柱矢量光束的形成以及作用,下面将定量分析该光束在紧聚焦情况下的光束宽度,在径向光束与角向光束的直径处[图 2(c) 和图 2(d) 虚线]取值可以模拟得到直径处的光强分布,如图 2(e) 和图 2(f) 所示。经过计算可知,两个光束的半峰全宽分别为 613.0 nm 与 573.2 nm 。为了对比光束宽度与包络形状对测量结果的影响,同时模拟理想细光束对测量结果的影响。

首先构建图 3 的细光束扫描多层介质的模型,其中最下方为 BK7 玻璃层,设定折射率为 1.517 ,BK7 上方为 10 层石墨烯,厚度为 3.4 nm ,折射率为 $2.6 + 1.3i$,石墨烯上方分别为三层不同厚度和不同折射率的样品。设定入射角度大于全内反射角,在该角度下扫过该分层结构。使用菲涅耳多层膜公式可以得到理想条件下光束对上方物质的测量结果。

根据麦克斯韦电磁波理论、菲涅耳方程组以及多层膜耦合理论^[17]并结合图 3, TM 偏振波的反射系数可表示为

$$r_{01234} = \frac{r_{01} + r_{1234} \exp(2i\delta_1)}{1 + r_{01} \times r_{1234} \exp(2i\delta_1)}, \quad (4)$$

式中: r_{01234} 为总的反射系数; r_{01} 为 BK7 玻璃与石墨烯层界面的反射系数; r_{1234} 为石墨烯层上方的反射系数总和; δ_1 为第一层介质的光程。

同理,可以得到

$$r_{1234} = \frac{r_{12} + r_{234} \exp(2i\delta_2)}{1 + r_{12} r_{234} \exp(2i\delta_2)}, \quad (5)$$

$$r_{234} = \frac{r_{23} + r_{34} \exp(2i\delta_3)}{1 + r_{23} r_{34} \exp(2i\delta_3)}, \quad (6)$$

式中: r_{12} 为石墨烯与介质 1 界面的反射系数; r_{234} 为介质 1 以上界面的反射系数; r_{23} 为介质 2 与介质 3 界面的反射系数; r_{34} 为介质 3 与介质 4 之间的反射系数; δ_2 和 δ_3 分别为第二层和第三层介质的光程。另外 r_{01} 、 r_{12} 、 r_{23} 和 r_{34} 可以由

$$r_{i,i+1} = \frac{\epsilon_i k_{i+1} - \epsilon_{i+1} k_i}{\epsilon_i k_{i+1} + \epsilon_{i+1} k_i}, \quad (i = 0, 1, 2, 3) \quad (7)$$

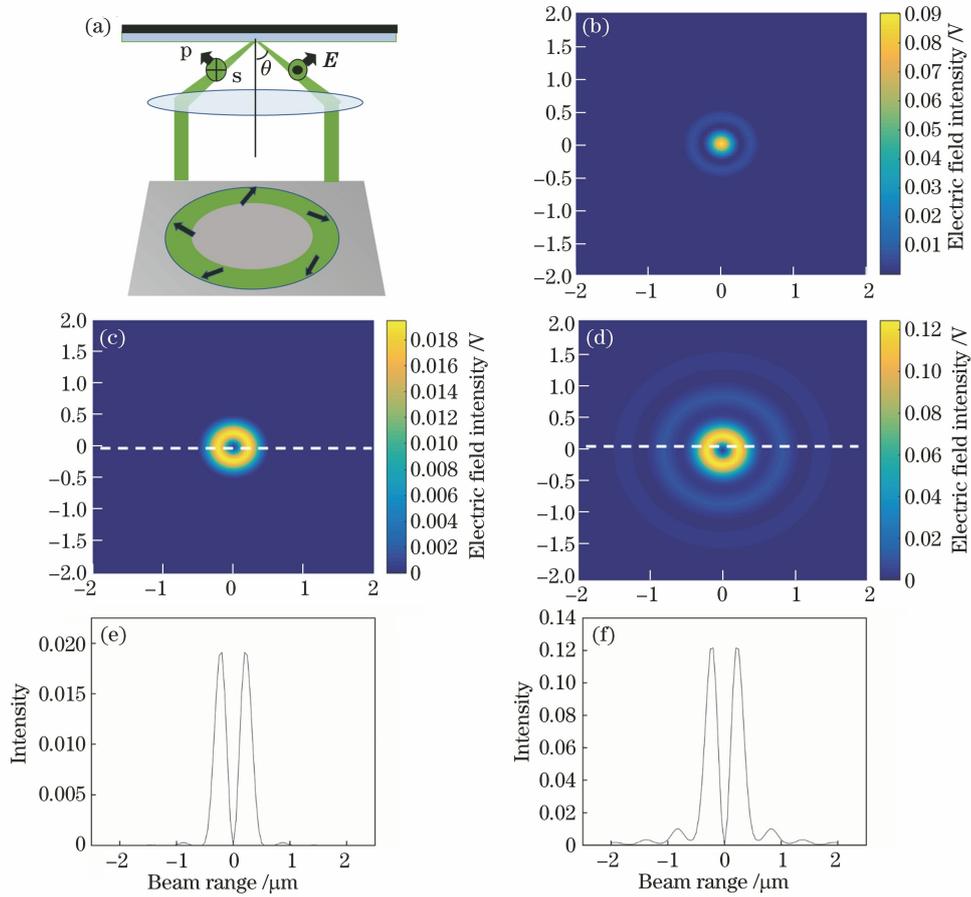


图 2 45°广义柱矢量入射光聚焦。(a)偏振示意图;(b)纵向电场分量强度;(c)径向电场分量强度;(d)角向电场分量强度;(e)径向电场光束直径处的宽度;(f)角向电场光束直径处的宽度

Fig. 2 45° generalized column vector incident light focusing. (a) Polarization schematic diagram; (b) intensity of longitudinal electric field component; (c) intensity of radial electric field component; (d) intensity of angular electric field component; (e) width at diameter of radial electric field beam; (f) width at diameter of angular electric field beam

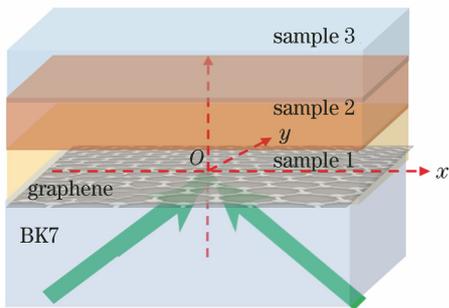


图 3 细光束扫描多层介质的模型

Fig. 3 Model of slim beam scanning multilayer medium

得到。另外还有其他几个重要的关系式,即

$$\begin{cases} \epsilon_i = n_i^2 \\ k_i = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{(\epsilon_i - \epsilon_0 \sin^2 \theta_1)^2}, \\ \delta_i = k_i h_i \end{cases} \quad (8)$$

式中: ϵ_i 为不同层的相对介电常数; n_i 为不同层的折射率; k_i 为不同层的波矢; δ_i 为不同层中的光程;

λ 为入射光的波长; h_i 为第二层和第三层介质的光程。总的反射率可以根据总的反射系数得到,即

$$R = |r_{01234}|^2. \quad (9)$$

同理,根据菲涅耳方程组以及多层膜耦合理论可以求解出 TE 偏振波的反射系数,这样就可以求出 TM 光与 TE 光之间的差分结果。

综上,本课题组可以理论模拟出 45°广义柱矢量光束的电场分布,并定量分析出紧聚焦情况下该光束的光斑大小,而且能够推导出理想细光束的理论计算公式,这为后续使用这两种光束对上方物质进行扫描奠定了理论基础。

2.3 理论模拟实验

根据 45°广义柱矢量光束与理想细光束的理论进行理论模拟工作,为了更为直观地观察不同光束与上方物质发生作用的机理,选用的样品为均匀的 5 μm 直径的 PS(Polystyrene)介质小球。选用这一样品是因其本身的圆型形状具有对称性并且具有不

同的分层,这更利于观察实验现象。接着分别使用不同的光束来扫描该小球的直径,对直径处的探测结果进行模拟仿真。

第一步模拟理想细光束扫描介质小球的过程,如图 4 所示。

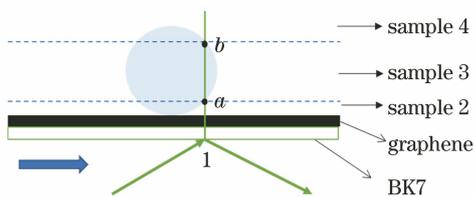


图 4 理想细光束扫描 PS 介质小球的模型
Fig. 4 Model of ideal slim beam scanning PS medium ball

在模拟过程中,由图 4 的大箭头方向从左至右以 $0.05 \mu\text{m}$ 的步长扫过放有小球的载玻片,当经过位置 1 时,该理想细光束探测到载玻片的上方物质由下至上分别为石墨烯、石墨烯到 a 点为空气、 a 点到 b 点为介质小球以及 b 点以上为空气。通过前面推导出的菲涅耳方程组以及多层膜耦合理论,使用探测器便可以得到该位置 TM 光与 TE 光的差分结果,经过与折射率样品的标定可以将其转化为折射率数值。当扫过整个小球时,就可以得到理想细光束与上方小球发生作用的结果。

接着模拟 45° 广义柱矢量光束扫描 PS 介质小球的过程,如图 5 所示。

在模拟过程中,由图 5 的大箭头方向从左至右以 $0.05 \mu\text{m}$ 的步长扫过放有小球的载玻片,当经过位置 1 时,光束经过具有大数值孔径的物镜后聚焦,光斑聚焦在石墨烯的表面,由理论表征可知在紧聚

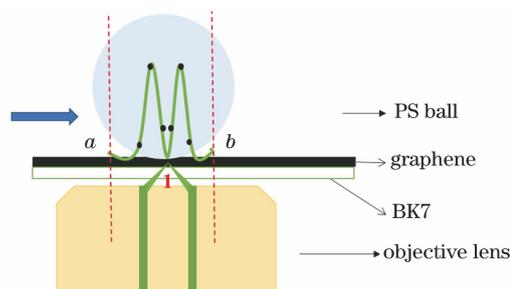


图 5 45° 广义柱矢量光束扫描 PS 介质小球的模型
Fig. 5 Model of 45° generalized cylindrical vector beam scanning PS medium ball

焦的情况下,光束在 $4 \mu\text{m}$ 的区间内均有光强,所以柱矢量光束与小球发生作用的区域为 a 与 b 两条虚线之间的区域。在光束上标记出的点代表取样点,在每一个取样点处均可认为是该位置使用理想细光束扫过上方样品产生的电压信号,但是由于柱矢量光束具有包络形状,因此在该取样点处的输出电压信号应为柱矢量光束在该位置的光强乘以使用理想细光束扫过上方样品产生的电压信号。可以这样理解,该光学系统接受到的电压信号即为柱矢量光束在区域 a 与 b 之间与上方物质发生作用后信号的叠加。由此,当光束扫过整个小球时,就可以得到 45° 广义柱矢量光束与上方小球发生作用的结果。

探究不同光束扫描介质小球的机理后,当两束光束均以 $0.05 \mu\text{m}$ 的步长扫过整个小球时,根据菲涅耳方程组以及多层膜耦合理论公式可以计算得到理想细光束扫描小球后的折射率,结果如图 6(a)所示。对于 45° 广义柱矢量光束,实验中使用到的是该光束的径向与角向分量。图 6(b)为使用 45° 广义柱矢量聚焦光束扫描小球后得到的折射率。

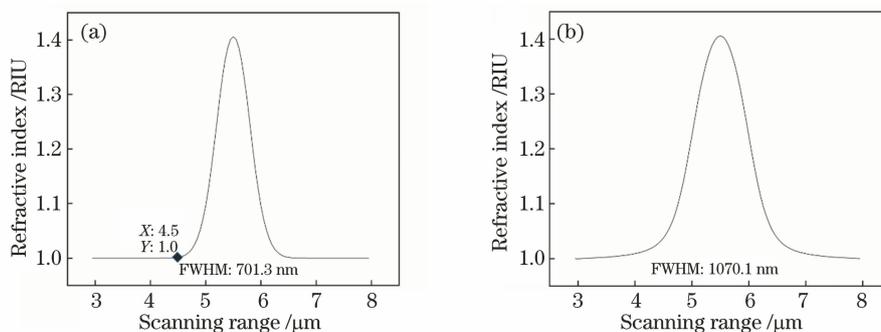


图 6 不同光束扫描小球直径处测得的折射率曲线。(a) 细光束扫描小球直径处测得的折射率曲线;
(b) 45° 广义柱矢量光束扫描小球直径处测得的折射率曲线

Fig. 6 Refractive index curves measured at diameter of ball scanned by different beams. (a) Refractive index curve measured at diameter of ball scanned by slim beam; (b) refractive index curve measured at diameter of ball scanned by 45° generalized cylindrical vector beam

从图 6 可以看到,理想细光束扫描得到的折射率曲线的半峰全宽为 701.3 nm,而 45°广义柱矢量光束扫描得到的折射率曲线的半峰全宽为 1070.1 nm,相比于细光束的扫描结果,半峰全宽明显变大。同时,该小球的直径为 5 μm ,而系统的探测深度为 1.29 μm ^[10],因此,在理想的模型中,当细光束开始扫过小球时,光束探测不到小球,折射率数值也近乎不变,在非涅耳多层膜公式的计算过程中,根据探测器的灵敏度设定相邻取样点 TM 光与 TE 光的差分结果大于 10^{-5} 即为系统探测的极限深度,图 6 标记点即为开始可以测得小球信号的位置。由于小球是对称的,根据小球信号的位置可以知道理想条件下的小球宽度应该为 3 μm 。对于 45°广义柱矢量光束扫描得到的结果,当光束扫到小球时,相邻取样点 TM 光与 TE 光的差分结果便大于 10^{-5} ,原因在于光束本身的包络形状带来的卷积影响,使得测量结果较理想结果发生了畸变,因此探测到的小球宽度为 5 μm 。根据柱矢量光束扫描样品的原理,认为是光束包络形状与上方样品发生卷积而造成测量结果的分辨率下降。为了消除光束包络形状带来的影响,编写反卷积算法来解决这一问题。

一般来说,反卷积的目的是找到一个形式的卷积方程的解,即

$$f' \oplus g' = h', \quad (10)$$

式中: h' 为一些记录的信号,也就是模糊图像; f' 为希望恢复的一些信号,即为理想图像,但是在记录之前已经与其他一些信号 g' 发生卷积, g' 可以表示光学系统的传递函数; \oplus 为卷积符号。如果知道 g' 或者通过计算求出 g' , 那么便可以执行确定性反卷积。

本文的模拟工作正是基于此公式的理论进行的,在模拟过程中沿着水平方向扫过镀有石墨烯的载玻片,其上放有小球 1 和小球 2,首先分别用细光束与 45°广义柱矢量光束扫过小球 1,分别得到小球 1 在理想条件下的 f'_1 以及经过卷积后的 h'_1 ,编写的去卷积算法中的反卷积函数可以由已知的 f'_1 和 h'_1 直接求解出该光学系统在此条件下的光学传递函数 g' 。在具体的实验过程中,需要移动平移台来寻找另一个小球,在此过程中系统会出现一定量的误差,因此在模拟工作中,将小球 2 的折射率设为大于小球 1 的折射率(0.005)来类比这一部分的误差。接着分别使用细光束与 45°广义柱矢量光束扫过小球 2,可以得到扫过小球 2 的折射率如图 7(a)所示,由小球 1 求解出该光学系统的光学传递函数 g' 后,采用反卷积算法恢复出小球 2 消除宽光束影响后的折射率,如图 7(b)所示。

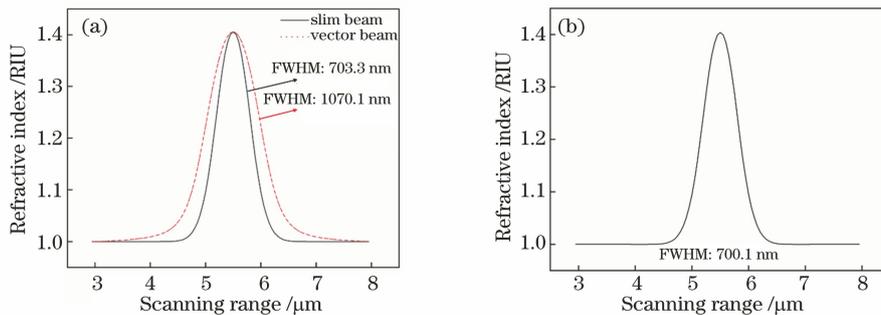


图 7 解卷积与理论模拟结果。(a)理想细光束和广义柱矢量光束扫过小球 2 后的模拟结果;(b)消除宽光束影响后的结果
Fig. 7 Deconvolution and theoretical simulation results. (a) Simulation results of ideal slim beam and generalized column vector beam sweeping over small ball 2; (b) result of ball 2 after eliminating influence of wide beam

从图 7(a)可以看到,使用理想细光束扫过小球 2 后的半峰全宽为 703.3 nm,使用 45°广义柱矢量光束扫过小球 2 后的半峰全宽为 1070.1 nm。从图 7(b)可以看到,小球 2 消除宽光束影响后的半峰全宽为 700.1 nm。通过三条曲线半峰全宽的对照,不难看出算法恢复出来的结果较柱矢量光束测得的结果有了明显的改进,并且与理想细光束扫过的结果较为接近,由此表明算法可以有效提高该光学系统的空间分辨率。

3 实验结果与分析

3.1 实验光学系统的原理以及搭建

实验中搭建的石墨烯基折射率显微成像系统如图 8 所示,其中 SLM 为空间光调制器,L 1~L 5 为透镜,M 1~M 4 为平面镜,P 为线偏振片,HP 为半波片,VP 1 和 VP 2 为涡旋波片,BS 1 和 BS 2 为光分束器,MO 为物镜,PBS 为偏振光分束器,BD 为平衡探测器,CCD 为电荷耦合相机。

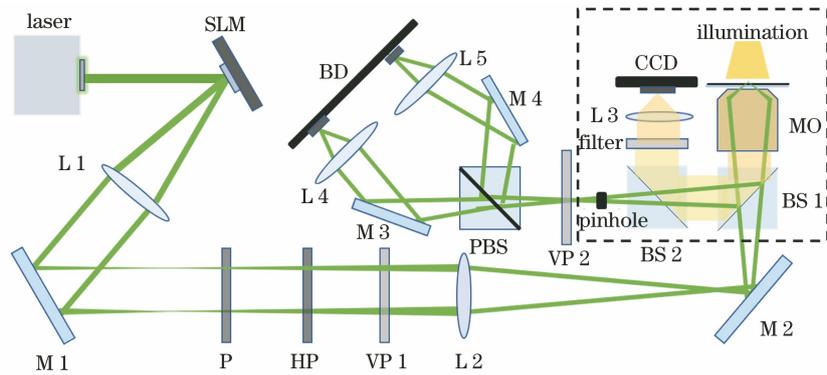


图 8 聚焦型石墨烯传感成像的光路

Fig. 8 Optical path of focused graphene sensor imaging

一束波长为 532 nm 和功率 18 mW 的激光入射到空间光调制器液晶面板的中心,空间光调制器加载了轴棱镜、螺旋位相板及条形光栅的相位信息,形成完美 OV(Perfect Optical Vortex,POV)^[18] 光束,该光束反射后经过一个凸透镜(L1),在透镜的后焦点处形成光斑质量最佳和光环宽度最细的 POV 光束。光束继续传播,在透镜焦面后形成一个像点,该像点与空间光调制器处互为共轭。第二个凸透镜(L2)的前焦面放置在像点的位置,光束经过后形成一束准直的平行光。光束经过一个涡旋波片(VP1)后形成实验所需的径向分量和角向分量等分的光,即 45° 广义柱矢量偏振光,这样一束柱矢量偏振 POV 光经过一个具有高数值孔径($NA = 1.49$)的显微物镜后聚焦于石墨烯-盖玻片的传感芯片,盖玻片的厚度为 0.17 mm,石墨烯为 10 层的由化学气相沉积方法制作的材料,厚度约为 3.4 nm。在光束聚焦光斑的两个垂直方向分别形成 s 偏振和 p 偏振,由于石墨烯对 s 偏振和 p 偏振具有不同的吸收率,所以反射光斑在两个互相垂直的方向上具有不同的光强分布。反射光束经过分光棱镜(BS1)的反射光区与入射光区后分开,后被另一个分光棱镜(BS2)分为两束。其中一束透射光经过第二个涡旋波片(VP2),其光轴排列方向与第一个涡旋波片(VP1)完全一致,此时柱矢量光束被还原成一束线偏振光,其偏振方向由柱矢量光束中径向分量和角向分量的比例决定。线偏振光继续传播经过一个偏振分光棱镜(PBS)后将其水平分量及垂直分量分开,其中水平分量强度代表从显微物镜反射出来的柱矢量光束中径向分量的强度之和,而垂直分量则代表角向分量的强度之和。被偏振分光棱镜分离的两束光分别进入平衡探测器的两个光电探头,最终记录下石墨烯对 s 偏振和 p 偏振的吸收差异。另外

一束则是经过一个具有 550 nm 截止波长的长通滤光片和一个透镜,最后进入 CCD 相机中。当样品上方的宽带卤素照明光源打开时,样品的散射光通过显微物镜耦合,最终进入 CCD 相机中,通过 CCD 相机可以观察样品的分布明场图像。

基于上述广义柱矢量偏振光束的折射率传感与扫描成像系统,能够真正地达到共光路聚焦与差分探测的目的。使用该系统可以对诸如细胞和 PS 小球等样品进行扫描测量。细胞的折射率分布图像是使用一个精密二维电动平移台来控制聚焦光斑扫描样品而得的。平移台的最小移动步长为 22 nm,其移动精度满足细胞尺寸的扫描成像要求。通过标准折射率溶液的标定可以将采集到的电压数据转换为折射率数值,编写程序将获得的数据点矩阵以图像的形式显示出来,每一幅折射率图像的扫描尺寸为 $30 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$,扫描的每一步步长为 $0.6 \mu\text{m}$,扫描的像素数为 50×50 。通过对 LabView 仪器控制软件程序及 MATLAB 图像绘制算法的优化,生成一幅尺寸为 $100 \text{ pixel} \times 100 \text{ pixel}$ 的图像仅需约 4.2 min。

3.2 实验样品及结果分析

在实验中采用的测量样品是由天津均益佳科技公司生产的直径为 $5 \mu\text{m}$ 的 PS 小球,图 9 分别为该样品的明场显微镜图与库尔特表征图。

在实验准备中,将购得的 PS 小球溶液与水进行体积比为 1:10 的稀释,得到稀释的 PS 小球溶液后使用移液器吸取一部分溶液并滴在镀有石墨烯的特制载波片上,待溶液干燥后放在光学平移台上,使用搭建好的光学系统以步长为 $0.6 \mu\text{m}$ 扫过该小球的直径处,同时平衡探测器会采集到载玻片上折射率的变化。

实验中首先在视场中寻找一个小球,在尺寸为 $30 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$ 的区域以内以 $0.6 \mu\text{m}$ 的步长进行扫

描,经过数据处理可以从扫描结果中得到该小球直径处对应的一维数列矩阵,图 10 为测量到的 PS 小

球明场图与折射率图,其中图 10(a)为小球的明场图,图 10(b)为第一个小球的折射率图。

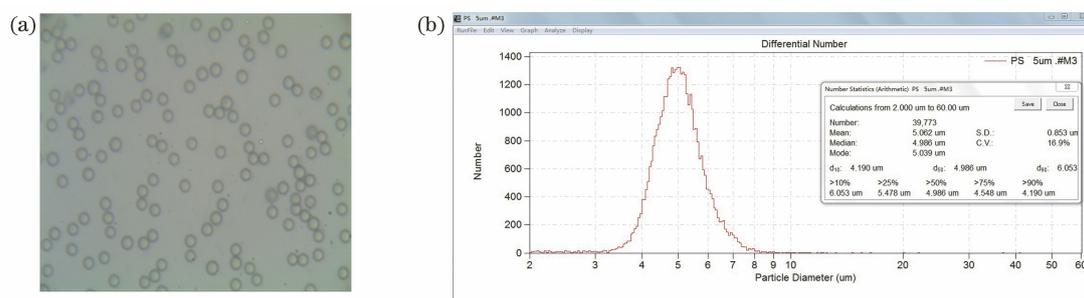


图 9 PS 小球的表征图。(a)显微镜表征图;(b)库尔特表征图

Fig. 9 Characterization diagram of PS beads. (a) Microscope characterization diagram; (b) Coulter characterization diagram

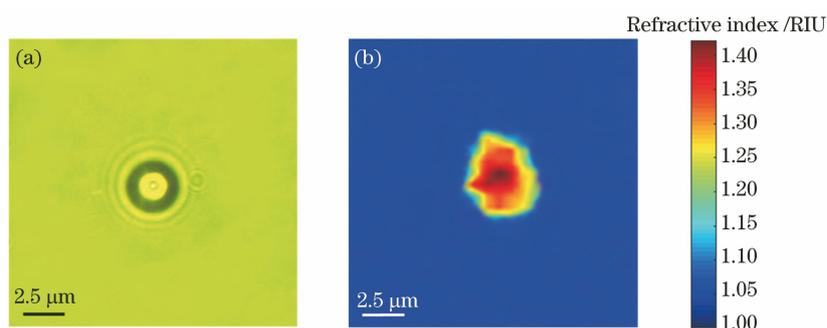


图 10 光学系统扫描第一个 PS 小球的结果。(a)光学系统下的明场图;(b)扫描第一个 PS 小球得到的折射率分布图

Fig. 10 Result of optical system scanning 1st PS ball. (a) Bright field diagram under optical system; (b) refractive index distribution obtained by scanning 1st PS ball

通过理论模拟可以得到小球直径处在理想条件下的结果,接着由编写的算法可以求解出在该实验条件下系统的点扩展函数。移动平移台来找到视场中的待测小球,同样使用光学系统来扫过待测小球的直径处,可以得到待测小球的折射率和该小球直径处所对应的一维数列矩阵,再由此前求得的点扩展函数并通过解卷积算法可以得到该小球解卷积之后的结果,实验结果如图 11 所示。

图 11(a)为实验系统测得的小球的折射率结果,图 11(b)为在一维水平方向经过算法恢复后的折射率图像。从图 11(a)和图 11(b)可以看到,在水平方向,小球的宽度明显缩小,而在垂直方向,小球宽度没有改变,由此可以说明采用该方法可以有效改善成像质量。图 11(c)为在二维方向恢复后的结果,图 11(d)为光学系统测得的小球与算法恢复后的小球直径[图 11(a)与图 11(c)的虚线]处的折射率曲线,两条曲线的半峰全宽分别为 3625.5 nm 和 685.5 nm。从图 11(c)和图 11(d)可以看到,由于求取半峰全宽的过程中采用插值的方法以及测量样品可能存在大小差异,恢复后的半峰全宽较理想情况较小,经过算法恢复后的小球尺寸与形状都更为接

近理想条件下的结果,说明光学系统有效地消除了由宽光束包络形状带来的影响,提高了该系统成像的空间分辨率。

4 结 论

通过分析紧聚焦条件下矢量光束聚焦场的形成与光场分布,基于菲涅耳公式计算多层膜结构在不同偏振态下的光强差分探测结果,分别使用细光束和柱矢量聚焦光束扫描载玻片上方介质小球来探测样品的折射率分布,并对这一物理过程和机理进行研究,这对于改进方法的提出具有重要意义。针对宽光束对于系统空间分辨率存在的问题,提出一种消除光束包络形状影响的方法。经过模拟与实验结果的验证,所提方法对于光束与上方物质发生作用的机理研究具有正确性,针对问题编写的算法恢复后的小球效果比实际光学系统更为清晰,对提高该系统的成像质量与空间分辨率有着显著的效果,并且为后续的生物折射率图像质量的提高提供一种新的方法。由于光学手段进行折射率测量具有免标记和无损于细胞等优点,对该方法的进一步改进在细胞显微成像相关的领域将会有更大的应用前景。

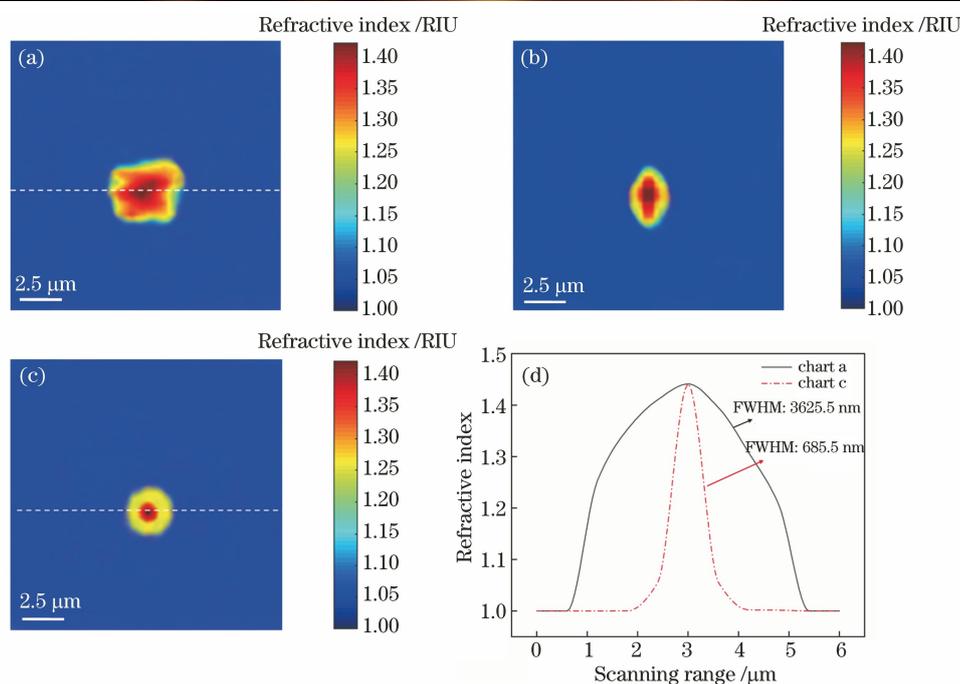


图 11 小球实验的解卷积结果。(a)光学系统扫描第二个 PS 小球得到的折射率分布图;(b) PS 小球一维横向方向解卷积恢复后的折射率分布图;(c) PS 小球二维横向与纵向方向解卷积恢复后的折射率分布图;(d)实验测得与解卷积恢复后 PS 小球直径处的折射率曲线

Fig. 11 Deconvolution results of ball experiment. (a) Refractive index distribution obtained by scanning 2nd PS ball by optical system; (b) refractive index distribution of PS ball after one-dimensional transverse deconvolution; (c) refractive index distribution of PS ball after two-dimensional transverse and longitudinal deconvolution; (d) refractive index curves measured at diameter of PS ball recovered by deconvolution

参 考 文 献

- [1] Bao Q L, Zhang H, Wang B, et al. Broadband graphene polarizer [J]. Nature Photonics, 2011, 5 (7): 411-415.
- [2] Ye Q, Wang J, Liu Z B, et al. Polarization-dependent optical absorption of graphene under total internal reflection [J]. Applied Physics Letters, 2013, 102(2): 021912.
- [3] Xing F, Liu Z B, Deng Z C, et al. Sensitive real-time monitoring of refractive indexes using a novel graphene-based optical sensor [J]. Scientific Reports, 2012, 2: 908.
- [4] Xing F, Yang Y, Shen J F, et al. Ultra-high sensitivity, multi-parameter monitoring of dynamical gas parameters using a reduced graphene oxide microcavity [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016, 235: 474-480.
- [5] Sheng Z H, Song L, Zheng J X, et al. Protein-assisted fabrication of nano-reduced graphene oxide for combined *in vivo* photoacoustic imaging and photothermal therapy [J]. Biomaterials, 2013, 34 (21): 5236-5243.
- [6] Peterson A W, Halter M, Tona A, et al. High resolution surface plasmon resonance imaging for single cells [J]. BMC Cell Biology, 2014, 15: 35.
- [7] Howe C L, Webb K F, Abayezed S A, et al. Surface plasmon resonance imaging of excitable cells [J]. Journal of Physics D: Applied Physics, 2019, 52 (10): 104001.
- [8] Sun L X, Zhang Y Q, Wang Y J, et al. Refractive index mapping of single cells with a graphene-based optical sensor [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017, 242: 41-46.
- [9] Sun L X, Zhang Y Q, Wang Y J, et al. Real-time subcellular imaging based on graphene biosensors [J]. Nanoscale, 2018, 10(4): 1759-1765.
- [10] Sun L X, Wang Y J, Zhang H Q, et al. Graphene-based confocal refractive index microscopy for label-free differentiation of living epithelial and mesenchymal cells [J]. ACS Sensors, 2020, 5(2): 510-518.
- [11] Wei H Y, Yan J L, Jia P, et al. Spiral phase spectrum of focused Bessel beams in atmospheric turbulence channel [J]. Acta Optica Sinica, 2020, 40 (24): 2401001.

韦宏艳, 闫玠霖, 贾鹏, 等. 聚焦贝塞尔光束在大气湍流中的螺旋相位谱 [J]. 光学学报, 2020, 40(24):

- 2401001.
- [12] Xu H, Zhang Y H, Zhang X, et al. Airy beam light sheet microscopy with deconvolution[J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(3): 0318013.
徐豪, 张运海, 张欣, 等. 结合去卷积的艾里光束片状光显微成像研究[J]. *光学学报*, 2017, 37(3): 0318013.
- [13] Zhan Q W. Cylindrical vector beams: from mathematical concepts to applications[J]. *Advances in Optics and Photonics*, 2009, 1(1): 1-57.
- [14] Youngworth K, Brown T. Focusing of high numerical aperture cylindrical-vector beams [J]. *Optics Express*, 2000, 7(2): 77-87.
- [15] Chen W B, Zhan Q W. Three-dimensional focus shaping with cylindrical vector beams [J]. *Optics Communications*, 2006, 265(2): 411-417.
- [16] Zhan Q W. Trapping metallic Rayleigh particles with radial polarization [J]. *Optics Express*, 2004, 12(15): 3377-3382.
- [17] Huck A, Witthaut D, Kumar S, et al. Large optical nonlinearity of surface plasmon modes on thin gold films[J]. *Plasmonics*, 2013, 8(4): 1597-1605.
- [18] García-García J, Rickenstorff-Parrao C, Ramos-García R, et al. Simple technique for generating the perfect optical vortex[J]. *Optics Letters*, 2014, 39(18): 5305-5308.