

荧光谱线分布对共焦荧光显微镜分辨率的影响*

杨初平 谭默言 宋清 习岗

(华南农业大学理学院, 广州 510642)

摘 要 研究了荧光谱线分布对共焦荧光显微镜中分辨率的影响, 导出了荧光谱线分布的荧光功率传输函数、三维脉冲响应函数. 数值计算了荧光谱线均匀分布的情况, 结果表明: 与采用单一中心荧光波长的分辨率比较, 共焦荧光显微镜的横向分辨率、纵向分辨率随着荧光谱线范围和色散的增大而下降; 谱线响应范围小的探测器有利于分辨率.

关键词 共焦荧光显微镜; 荧光谱线分布; 分辨率

中图分类号 TH742.65 **文献标识码** A

0 引言

共焦扫描显微镜一经提出, 就受到人们的关注. 近 10 多年来, 其理论研究和应用研究都取得了很大进展^[1~9]. 共焦显微镜与普通光学显微镜相比具有极其明显的优点: 能对物体的不同层面进行逐层扫描, 从而获得大量的物体断层图像, 可以利用计算机进行图像处理; 具有较高的横向分辨率和纵向分辨率; 对于透明和半透明物体, 可以得到其内部的结构图像. 在理论研究方面, 绝大多数文献都只是讨论了荧光波长等于激发波长^[3~8]或者单个荧光波长^[1,8]这种情况, 没有讨论荧光谱线分布和色散系数对共焦荧光显微镜分辨率的影响. 事实上, 荧光谱线分布有一定的范围, 会导致色散, 研究荧光谱线分布对共焦荧光显微镜分辨率的影响是必要的. 本文导出了荧光谱线分布的荧光功率传输函数、三维脉冲响应函数, 数值计算了荧光谱线均匀分布和色散系数对共焦荧光显微镜分辨率的影响. 研究结果显示: 与采用单一荧光中心波长的分辨率比较, 共焦荧光显微镜的横向、纵向分辨率随着荧光谱线范围的增大和色散系数增大而下降, 采用响应谱线范围小的探测器, 可以改善横向分辨率、纵向分辨率.

1 荧光谱线分布的三维脉冲响应函数

荧光共焦显微镜成像系统如图 1. 对于面源 $S(\mathbf{v}_s)$ 、面探测器 $D(\mathbf{v}_d)$, 根据文献[9]的结论, 可以写出图 1 所示的激发波长为 λ_e 、荧光波长为 λ_0 的共焦荧光显微镜系统荧光功率传输函数为

$$I(\mathbf{v}_p) = \{ |S(\mathbf{v}_e) \otimes_3 h(\mathbf{v}_e)|^2 \cdot [|h(\mathbf{v})|^2 \otimes_3 D(\mathbf{v})] \} \otimes_3 O(\mathbf{v}_p) \quad (1)$$

式中, $h(\mathbf{v})$ 是物镜 L 的三维脉冲响应函数; $O(\mathbf{v}_p)$ 为

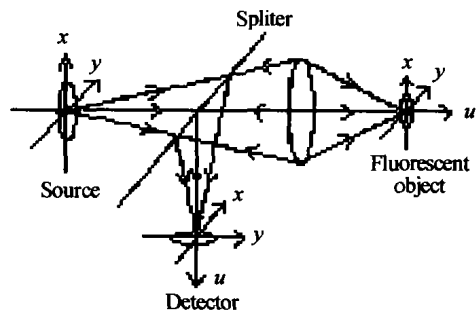


图 1 共焦显微镜的原理图

Fig. 1 Confocal microscopy

荧光物体的物分布函数, \mathbf{v}_p 是扫描点的位置矢量.

$\mathbf{v} = (v_x, v_y, u)$ 是光学坐标矢量. 坐标变换为

$$v_x = \frac{2\pi}{\lambda_0} x \sin \alpha, v_y = \frac{2\pi}{\lambda_0} y \sin \alpha, u = \frac{2\pi}{\lambda_0} z_f \sin^2 \alpha \quad (2)$$

式中 $\sin \alpha$ 为物镜数值孔径.

一般来说, 以激发光波长为 λ_e 单位的光学坐标矢量 \mathbf{v}_e 和以荧光波长 λ_0 为单位的的光学坐标矢量 \mathbf{v} 的关系为 $\mathbf{v}_e = \frac{\lambda_0}{\lambda_e} \mathbf{v}_e$.

根据成像理论, 成像系统中像的光强分布是物的光强分布函数与系统的脉冲响应函数的卷积, 因此, 由式(1)得到图 1 的成像系统的三维脉冲响应函数为

$$F(\mathbf{v}) = \{ |S(\mathbf{v}_e) \otimes_3 h(\mathbf{v}_e)|^2 \times [|h(\mathbf{v})|^2 \otimes_3 D(\mathbf{v})] \} \quad (3)$$

考虑到荧光具有一定的谱线范围 $[\lambda_1, \lambda_2]$, 荧光谱线分布函数一般有高斯分布和洛伦兹分布, 为了了解谱线分布对分辨率的影响, 先考虑谱线均匀分布即 $g(\lambda, \lambda_0) = 1, \lambda \in [\lambda_1, \lambda_2]$; 探测器的谱线响应也是均匀的, 即 $D(\lambda, \lambda_0) = 1, \lambda \in [\lambda_1, \lambda_2]$, 中心波长与荧光一致. 只适用于单一荧光波长的式(3)需要改写为

$$F(\mathbf{v}) = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} g(\lambda, \lambda_0) D(\lambda, \lambda_0) \{ |S(\mathbf{v}_e) \otimes_3 h(\mathbf{v}_e)|^2 \times [|h(\mathbf{v}(\lambda))|^2 \otimes_3 D(\mathbf{v}(\lambda))] \} d\lambda \quad (4)$$

与单一波长的情况比较, 增加了一个因子 $g(\lambda, \lambda_0) \cdot D(\lambda, \lambda_0)$, 两者的乘积取决于波长范围小的; 若探测

* 广东省自然科学基金(010207)和华南农业大学校长基金资助项目

Tel: 020-85280324 Email: yangchp@sina.com

收稿日期: 2004-03-29

器谱线响应范围大于荧光谱线范围, 荧光谱线范围以外探测器是没有响应的, 故这里处理为荧光谱线范围小于探测器谱线范围, 通过荧光谱线范围研究探测器谱线响应范围对分辨率的影响, 式(4)表示对一定荧光谱线范围积分. 对于点源和点探测器, 一定荧光谱线分布的三维脉冲响应函数为

$$F(\mathbf{v}) = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} g(\lambda, \lambda_0) D(\lambda, \lambda_0) |h(\mathbf{v}_e)|^2 \times |h(\mathbf{v}(\lambda))|^2 d\lambda \quad (5)$$

2 荧光分布对分辨率的影响

为了讨论一定荧光谱线分布对分辨率的影响, 推导出这种情况下的三维脉冲响应函数的具体形式是必要的. 如果荧光的波长分布为 $[\lambda_1, \lambda_2]$, 中心波长为 λ_0 , 焦距为 f_0 . 则波长为 λ 的三维脉冲函数为^[10]

$$u_i(x_i, y_i, z) = \frac{1}{\lambda^2 d_0 z} \exp(jk d_0) \exp(jkz) \cdot \exp(jk \frac{x_i^2 + y_i^2}{2z}) \iint_{-\infty}^{\infty} P(x, y) \exp[j \frac{\pi}{\lambda} (\frac{1}{z} + \frac{1}{d_0} - \frac{1}{f(\lambda)})(x^2 + y^2)] \exp(-j2\pi \frac{x_i x + y_i y}{\lambda z}) dx dy \quad (6)$$

式中 $P(x, y)$ 为光学系统的光瞳函数, 不同波长的物镜焦距为 $f(\lambda)$, 点光源与物镜的距离为 d_0 .

由于不同荧光波长的焦距不同, 为了比较, 在荧光中心波长的像面附近接受荧光, d_i 表示中心波长的像距, z 为观察平面到物镜的距离, $z = d_i + z_f$, z_f 为观察平面到像面的距离. 以中心波长 λ_0 进行归一化, 略去式(6)的常数相位项, 得荧光波长为 λ 的三维脉冲函数为

$$h_3(x_i, y_i, z_f) = \frac{1}{\lambda^2 d_0 (d_i + z_f)} \iint_{-\infty}^{\infty} P(x, y) \cdot \exp[-j(\frac{\lambda_0}{\lambda} \frac{\pi}{\lambda_0} \frac{z_f}{(z_f + d_i) d_i} - \frac{\pi}{\lambda} f(\lambda, \lambda_0))(x^2 + y^2)] \cdot \exp(-j2\pi \frac{\lambda_0}{\lambda} \frac{x_i x + y_i y}{\lambda_0 (z_f + d_i)}) dx dy \quad (7)$$

式中 $f(\lambda, \lambda_0) = \frac{1}{f_0} - \frac{1}{f(\lambda)}$. 因为离焦量远小于像距, 即 $d_i \gg z_f$, 因此, 式(7)变为

$$h_3(x_i, y_i, z_f) = \frac{1}{\lambda^2 d_0 d_i} \iint_{-\infty}^{\infty} P(x, y) \cdot \exp[-j(\frac{\lambda_0}{\lambda} \frac{\pi}{\lambda_0} \frac{z_f}{d_i} - \frac{\pi}{\lambda} f(\lambda, \lambda_0))(x^2 + y^2)] \cdot \exp(-j2\pi \frac{\lambda_0}{\lambda} \frac{x_i x + y_i y}{\lambda_0 d_i}) dx dy \quad (8)$$

利用式(2)的坐标变换和 $(\xi, \eta) = (x/a, y/a)$, a 为透镜光瞳孔径. 代入式(8), 得

$$h_3(v_x, v_y, u) = \frac{a^2}{\lambda^2 d_0 d_i} \iint_{-\infty}^{\infty} P(\xi, \eta) \cdot$$

$$\exp[-j(\frac{\lambda_0}{\lambda} \frac{u}{2} - \frac{\pi a^2}{\lambda} f(\lambda, \lambda_0))(\xi^2 + \eta^2)] \cdot \exp[-j \frac{\lambda_0}{\lambda} (v_x \xi + v_y \eta)] d\xi d\eta \quad (9)$$

采用柱坐标, $(\xi, \eta) = (r \cos \theta, r \sin \theta)$; $(v_x, v_y) = (\rho \cos \phi_1, \rho \sin \phi_1)$; 得

$$h_3(\lambda, \rho; u) = \frac{a^2}{\lambda^2 d_0 d_i} \times \int_0^1 \exp[-j(\frac{\lambda_0}{\lambda} \frac{u}{2} - \frac{\pi a^2}{\lambda} f(\lambda, \lambda_0))r^2] J_0(\frac{\lambda}{\lambda_0} r \rho) r dr \quad (10)$$

这就是某一荧光波长 λ 在中心波长 λ_0 焦点附近的像面上的三维脉冲响应函数. 从式(10)可以看出, 由于在中心波长焦平面附近接收荧光, 与中心波长比较, 其他荧光波长的三维脉冲响应函数出现一个因子.

焦距与波长的关系式、折射率与波长的关系的Cauchy方程分别为^[11]

$$\frac{1}{f(\lambda)} = k[n(\lambda) - 1] \quad (11)$$

$$n(\lambda) = a + \frac{b}{\lambda^2} + \frac{c}{\lambda^4} + \dots \quad (12)$$

式(11)中 k 与透镜球面的曲率半径有关, 式(12)中 a, b, c 是透镜材料的系数略去高阶项, 把式(12)代入式(11)得

$$f(\lambda, \lambda_0) = \frac{1}{f_0} - \frac{1}{f(\lambda)} = k[n(\lambda_0) - 1] - k[n(\lambda) - 1] = k(\frac{b}{\lambda_0^2} - \frac{b}{\lambda^2}) = kb \frac{\lambda^2 - \lambda_0^2}{\lambda^2 \lambda_0^2} \quad (13)$$

式(10)可以表示为

$$h_3(\lambda, \rho; u) = \frac{a^2}{\lambda^2 d_0 d_i} \times \int_0^1 \exp[-j(\frac{\lambda_0}{\lambda} \frac{u}{2} - \frac{\pi a^2}{\lambda} kb \frac{\lambda^2 - \lambda_0^2}{\lambda^2 \lambda_0^2})r^2] J_0(\frac{\lambda}{\lambda_0} r \rho) r dr \quad (14)$$

式(14)的横向分布、纵向分布分别为

$$h_3(\lambda, \rho; 0) = \frac{a^2}{\lambda^2 d_0 d_i} \times \int_0^1 \exp[j(\frac{\pi}{\lambda} \cdot a^2 kb \frac{\lambda^2 - \lambda_0^2}{\lambda^2 \lambda_0^2})r^2] J_0(\frac{\lambda}{\lambda_0} r \rho) r dr \quad (15)$$

$$h_3(\lambda, 0; u) = \frac{a^2}{\lambda^2 d_0 d_i} \times \int_0^1 \exp[-j(\frac{\lambda_0}{\lambda} \frac{u}{2} - \frac{\pi}{\lambda} a^2 kb \frac{\lambda^2 - \lambda_0^2}{\lambda^2 \lambda_0^2})r^2] r dr \quad (16)$$

考虑荧光谱线的均匀分布和探测器的均匀响应, 则一定谱线范围时系统的三维脉冲响应函数的横向分布、纵向分布分别为

$$F(\rho; 0) = |h(\frac{\lambda_0}{\lambda_e} \rho; 0)|^2 \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} g(\lambda, \lambda_0) D(\lambda, \lambda_0) \cdot |h_3(\lambda, \rho; 0)|^2 d\lambda \quad (17)$$

$$F(0; u) = |h(0; \frac{\lambda_0}{\lambda_e} u)|^2 \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} g(\lambda, \lambda_0) D(\lambda, \lambda_0) \cdot$$

$$|h_3(\lambda, 0; u)|^2 d\lambda \quad (18)$$

其中

$$h\left(\frac{\lambda_0}{\lambda_c} \rho; 0\right) = \frac{a^2}{\lambda_c^2 d_0 d_i} \times \int_0^1 J_0\left(\frac{\lambda_0}{\lambda_c} r \rho\right) r dr \quad (19)$$

$$h\left(0; \frac{\lambda_0}{\lambda_c} u\right) = \frac{a^2}{\lambda_c^2 d_0 d_i} \times \int_0^1 \exp\left[-j\left(\frac{\lambda_0}{\lambda_c} \frac{u}{2}\right) r^2\right] r dr \quad (20)$$

2.1 对横向分辨率的影响

为了研究荧光谱线分布对分辨率的影响,采用荧光谱线的均匀分布,不同谱线范围和色散系数,对式(17)的数值计算结果如图 2. 计算过程中的系数满足

$$k \sim 10^2 \text{ m}^{-1}, b \sim 10^{-16} \text{ m}^2, \lambda_0 = 7 \times 10^{-7} \text{ m}, a \sim 10^{-2} \text{ m}, K = a^2 k b / \lambda_0^2 = 10^{-4}$$

式中 k 与透镜球面的曲率半径有关, b 是表示透镜材料色散特性的色散系数, λ_0 为荧光中心波长, a 为透镜孔径; 当 k, λ_0, a 一定时, K 只与色散系数 b 有关.

图 2 中: 实线 (690~710 nm, $K=1e-4$) 和点实线 (650~750 nm, $K=1e-4$) 比较 (相同的色散系数不同的谱线范围); 实线 (690~710 nm, $K=1e-4$) 和点划线 (690~710 nm, $K=2e-4$) 比较 (不同的色散系数); 点线 (700 nm) 表示单一荧光波长.

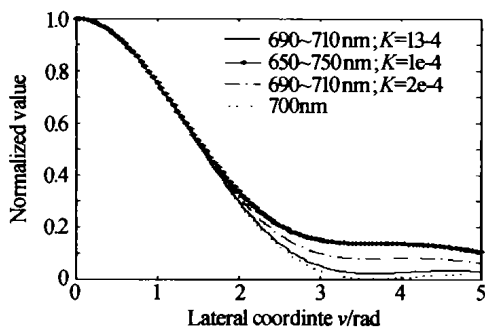


图 2 不同谱线范围、色散系数的横向分布
Fig. 2 Lateral distribution of fluorescent intensity

由图 2 可以得到如下结论: 与采用单一中心荧光波长比较, 一定的荧光谱线范围使焦斑的横向尺寸增大; 随着谱线范围增大或者色散系数增大, 焦斑的横向尺寸增大, 旁瓣强度提高, 分辨率下降. 因此, 色散系数增大与荧光谱线范围增大的效果相似, 都是使横向分辨率下降.

2.2 对纵向分辨率的影响

采用荧光谱线的均匀分布, 不同谱线范围和色散系数, 对式(18)的数值计算结果如图 3. 点划线 (690~710 nm, $K=1e-4$) 和点实线 (650~750 nm, $K=1e-4$) 比较 (相同的色散系数不同的谱线范围); 点划线 (690~710 nm, $K=1e-4$) 和实线 (690~710 nm, $K=2e-4$) 比较 (不同的色散系数); 点线 (700 nm) 表示单一荧光波长.

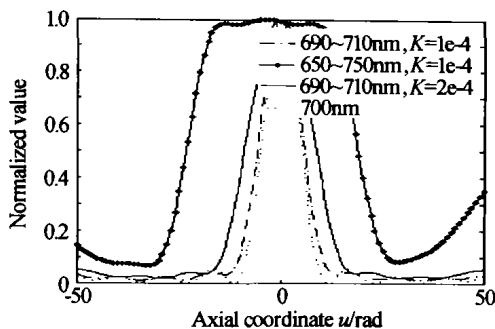


图 3 不同谱线范围、色散系数的纵向分布
Fig. 3 Axial distribution of fluorescent intensity

由图 3 可以得到如下结论: 与采用单一中心荧光波长比较, 一定荧光的谱线范围使焦斑纵向尺寸增大; 随着谱线范围增大或者色散系数增大, 焦斑的纵向尺寸增大, 呈现不对称性, 旁瓣强度提高, 分辨率下降. 这可以从物理上得到解释: 从文献[9]可知, 荧光波长较长, 焦斑的纵向尺寸较大; 荧光波长较短, 焦斑的纵向尺寸较小. 由于透镜色散的影响, 不同荧光波长的焦斑的纵向中心相对于中心波长的焦斑的纵向中心在光轴上具有一定的偏离, 长波朝后偏离, 短波朝前偏离, 因而光强的叠加结果使焦斑纵向尺寸增大.

3 结论

本文研究了荧光谱线范围对荧光共焦显微镜分辨率的影响, 导出了荧光谱线分布的荧光功率传输函数、三维脉冲响应函数, 采用荧光谱线的均匀分布, 数值计算了荧光谱线分布范围、色散系数和探测器响应谱线范围对共焦荧光显微镜分辨率的影响. 结果表明: 1) 与单一中心波长的分辨率比较, 一定的荧光谱线分布使荧光共焦显微镜的焦斑横向尺寸变大; 随着荧光谱线范围的增大, 焦斑横向尺寸增大, 横向分辨率下降; 2) 与单一中心波长的分辨率比较, 一定的荧光谱线分布使荧光共焦显微镜的焦斑纵向尺寸变大; 随着荧光谱线范围的增大, 焦斑纵向尺寸更大, 纵向分辨率下降; 3) 色散系数增大与荧光谱线范围的增大对分辨率的影响是一样的, 使分辨率下降; 4) 对于探测器的选择, 谱线响应范围小的可以改善横向、纵向分辨率.

参考文献

- 孔兵, 王昭, 谭玉山, 等. 共焦显微镜三维轮廓快速测量方法及其误差分析. 光子学报, 2000, 29(6): 549~553
Kong B, Wang Z, Tan Y S, et al. Acta Photonica Sinica, 2000, 29(6): 549~553
- 王湘晖, 林列, 杨勇, 等. 基于矢量衍射理论的相位型光瞳滤波器设计. 光子学报, 2003, 32(11): 1378~1381
Wang X H, Lin L, Yang Y, et al. Acta Photonica Sinica, 2003, 32(11): 1378~1381

- 3 杨初平,裴红津,唐志列. 不同荧光波长的双光子共焦成像分析. 光子学报, 2004, **33**(2):159~163
Yang C P, Pei H J, Tang Z L. *Acta Photonica Sinica*, 2004, **33**(2):159~163
- 4 Sheppard C J R, Cu M, Mao X Q. Three-dimensional coherent transfer function in a reflection-mode confocal scanning microscopy. *Opt Commu*, 1991, **81**(5): 281~284
- 5 Gan X, Gu M, Sheppard C T R. Fluorescent image formation in the fibre-optical confocal scanning microscope. *J Mod Optics*, 1992, **39**(4): 825~834
- 6 张平,吴震,王翠英,等. 荧光共焦扫描系统成像特性的优化. 光学学报, 1997, **17**(3):308~313
Zhang P, Wu Z, Wang C Y, et al. *Acta Optica Sinica*, 1997, **17**(3):308~313
- 7 唐志列,杨初平,裴红津,等. 双光子共焦显微镜的三维成像理论及其分辨率的改善. 中国科学 A, 2002, **32**(6):538~547
Tang Z L, Yang C P, Pei H J, et al. *Science in China (Series A)*, 2002, **32**(6):538~547
- 8 Drazic V. Three-dimensional transfer function analysis of a confocal fluorescence microscope with a finite-sized source and detector. *J Mod Optics*, 1993, **40**(5): 879~887
- 9 裴红津,唐志列,杨初平,等. 荧光波长对共焦显微镜成像特性的影响. 光学学报, 2002, **22**(10):1219~1223
Pei H J, Tang Z L, Yang C P, et al. *Acta Optica Sinica*, 2002, **22**(10):1219~1223
- 10 Goodman J W. Introduction to Fourier Optics. New York: Mc Graw-Hill, 1968
- 11 姚启钧原著. 光学教程, 高等教育出版社, 1981. 167, 381
Yao Qijun. The Course of Optics, Beijing: Higher Education Press, 1981. 167, 381

Dependence of The Resolution of a Fluorescent Confocal Microscopy on Fluorescent Spectrum

Yang Chuping, Tan Moyan, Song Qing, Xi Gang

College of Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642

Received date: 2004-03-29

Abstract The dependence of the resolution of a fluorescent confocal microscopy on fluorescent spectrum is studied, and the power transfer function and three-dimensional pulse spread function are derived. Assuming well-distributed fluorescent spectrum, calculated results show that the lateral resolution and the Axial resolution are worse while fluorescent spectrum widen and dispersion coefficient increased, compared with that by only using the central fluorescent wavelength. The detector responding to narrower fluorescent spectrum is good for the resolution.

Keywords Fluorescent confocal microscopy; Fluorescent spectrum; Resolution



Yang Chuping was born in 1970. He graduated from the Physics major in 1993, won the M. S. degree in 1996 from South China Normal University. Now he is working as an lecturer in South China Agricultural University.