

# 二次谐波共焦成像的分辨率\*

杨初平<sup>1</sup> 旷卫民<sup>1</sup> 刘 军<sup>1</sup> 唐志列<sup>2</sup>

(1 华南农业大学理学院, 广州 510642)

(2 华南师范大学物理系, 广州 510631)

**摘 要** 通过与双光子荧光共焦成像过程比较, 研究了非线性二次谐波的强度脉冲响应函数并对它进行频域分析, 获得了横向、纵向截止频率和通频带. 研究表明: 二次谐波共焦成像具有更高的分辨率.

**关键词** 共焦显微镜; 二次谐波; 频域; 分辨率

**中图分类号** O438 **文献标识码** A

## 0 引言

近年来, 在许多生物组织中发现具有光学活性的非线性二次谐波激发 (Second-harmonic Generation) 现象, 因此对物体受激发产生的二次谐波 (second-harmonic wave) 进行探测受到人们的关注<sup>[1~8]</sup>. 二次谐波与双光子荧光比较, 虽然两者都是来自待测物体内部的非线性过程, 但是前者与物体内部的二阶非线性极化率有关<sup>[9]</sup>, 属于相干光, 后者却与物体内部的非线性光子吸收系数有关<sup>[10, 11]</sup>, 属于非相干光. 由于共焦成像技术具有三维分辨等优点<sup>[13~15]</sup>, 对于二次谐波的共焦成像过程, 可以对它进行时域的或者频域的理论分析. 时域共焦理论分析表明<sup>[8]</sup>: 尽管二次谐波和双光子荧光都产生于非线性过程, 但前者的强度脉冲函数的空间分布范围更小, 因此具有更高的分辨率. 由于采用频域理论可以了解强度脉冲响应函数的频谱分布, 获得截止频率和通频带, 因此通过与双光子荧光共焦过程比较, 在频域里揭示二次谐波共焦成像的分辨率优于双光子荧光共焦成像的分辨率, 最后又利用不确定原理证明这个结论.

## 1 二次谐波的强度脉冲响应函数

非线性谐波的共焦成像过程如下: 光源发出的相干光波经过透镜  $L_1$  会聚到物面上, 物面上的待测物体通过非线性过程产生非线性谐波; 物体发出的相干性非线性谐波通过透镜  $L_2$  会聚到带滤光片的探测器上.

首先推导图 1 的由点源  $\delta(\mathbf{v}_s)$ 、点探测器  $\delta(\mathbf{v}_d)$  组成的二次谐波共焦成像系统的三维脉冲响

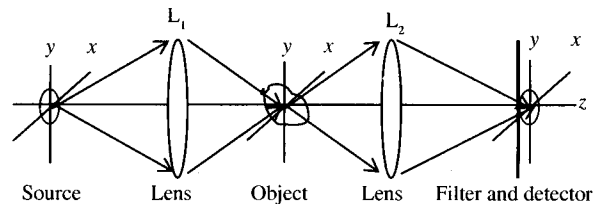


图 1 二次谐波共焦成像原理图

Fig. 1 Confocal microscope for second-harmonic

应函数. 根据非线性光学理论<sup>[9]</sup>, 二次谐波的振幅与激发光振幅的平方成正比, 激发波长为  $\lambda_0$  的相干光经  $L_1$  会聚到物面后, 待测物体受激发产生的二次谐波的振幅分布为

$$U_1(\mathbf{v}_p, \mathbf{v}') = \left| \int_{-\infty}^{\infty} \delta(\mathbf{v}_s) h(\mathbf{v} - \mathbf{v}_s) d\mathbf{v}_s \right|^2 \cdot O(\mathbf{v}_p - \mathbf{v}') \quad (1)$$

从物体发出的二次谐波经物镜  $L_2$  会聚到带滤光片的探测器的过程属于相干光成像过程, 因此探测器平面上的二次谐波的振幅分布为

$$U_2(\mathbf{v}_p, \mathbf{v}_d) = \int_{-\infty}^{\infty} \left\{ \left| \int_{-\infty}^{\infty} \delta(\mathbf{v}_s) h(\mathbf{v} - \mathbf{v}_s) d\mathbf{v}_s \right|^2 \cdot O(\mathbf{v}_p - \mathbf{v}') \right\} h(\mathbf{v}_d - \mathbf{v}') d\mathbf{v}' = \int_{-\infty}^{\infty} \left\{ \left| \int_{-\infty}^{\infty} \delta(\mathbf{v}_s) h(\mathbf{v} - \mathbf{v}_s) d\mathbf{v}_s \right|^2 h(\mathbf{v}_d - \mathbf{v}') \right\} \cdot O(\mathbf{v}_p - \mathbf{v}') d\mathbf{v}' = \left\{ \left| \int_{-\infty}^{\infty} \delta(\mathbf{v}_s) h(\mathbf{v} - \mathbf{v}_s) d\mathbf{v}_s \right|^2 \cdot h(\mathbf{v}_d) \right\} \otimes_3 O(\mathbf{v}_p - \mathbf{v}_d) \quad (2)$$

式中,  $h(\mathbf{v}), h(\mathbf{v}_d)$  是透镜的三维脉冲响应函数,  $\mathbf{v}_s, \mathbf{v}$  分别是光源、物面相对于激发光波长的光学坐标;  $O(\mathbf{v}_p - \mathbf{v}')$  表示与待测物体的二阶非线性极化率有关的函数,  $\mathbf{v}_p$  是扫描点的位置矢量,  $\mathbf{v}_p, \mathbf{v}'$  是物面相对于二次谐波波长的光学坐标.  $\left| \int_{-\infty}^{\infty} \delta(\mathbf{v}_s) h(\mathbf{v} - \mathbf{v}_s) d\mathbf{v}_s \right|^2$  表示激发光振幅的平方.  $\mathbf{v}_d$  是探测器平面相对于二次谐波波长的光学坐标.

根据相干成像理论<sup>[12]</sup>, 系统中像的复振幅分布是物的复振幅分布函数与系统的振幅(相干)脉冲响应函数的卷积, 从式(2)可以获得系统的振幅脉冲响应函数为

$$F_{SHW}(\mathbf{v}) = \left| \int_{-\infty}^{\infty} \delta(\mathbf{v}_s) h(\mathbf{v} - \mathbf{v}_s) d\mathbf{v}_s \right|^2 \cdot h(\mathbf{v}_d) = |h(\mathbf{v})|^2 \cdot h(\mathbf{v}_d) = |h(\mathbf{v})|^2 \cdot h(\mathbf{v}_{(2)}) \quad (3)$$

强度脉冲函数定义为振幅脉冲响应函数模的平

\* 广东省自然科学基金(05300843)和华南农业大学校长基金资助

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

收稿日期: 2005-07-15

方<sup>[12]</sup>,因此二次谐波共焦成像的强度脉冲响应函数为

$$I_{SHW}(\mathbf{v}) = F_{SHW}(\mathbf{v}) \cdot F_{SHW}^*(\mathbf{v}) = |h(\mathbf{v})|^4 \cdot$$

$$[h(\mathbf{v}_{(2)}) \cdot h^*(\mathbf{v}_{(2)})] = |h(\mathbf{v})|^4 \cdot |h(\mathbf{v}_{(2)})|^2 \quad (4)$$

对于双光子荧光(荧光波长等于激发波长)共焦显微镜,强度脉冲响应函数为<sup>[10]</sup>

$$I_{two-photon}(\mathbf{v}) = |h(\mathbf{v})|^4 \cdot |h(\mathbf{v})|^2 \quad (5)$$

直角坐标与光学坐标的关系为

$$\mathbf{v}_x = \frac{2\pi}{\lambda_0} x \sin \alpha, \mathbf{v}_y = \frac{2\pi}{\lambda_0} y \sin \alpha, \mathbf{v}_z = \frac{2\pi}{\lambda_0} z \sin^2 \alpha \quad (6)$$

$$\mathbf{v}_{(2)x} = \frac{2\pi}{\lambda_{(2)}} x \sin \alpha, \mathbf{v}_{(2)y} = \frac{2\pi}{\lambda_{(2)}} y \sin \alpha, \mathbf{v}_{(2)z} = \frac{2\pi}{\lambda_{(2)}} z \sin^2 \alpha \quad (7)$$

由于二次谐波波长  $\lambda_{(2)}$  等于激发光波长  $\lambda_0$  的一半, (6)、(7) 式中两个光学坐标矢量的关系为

$$\mathbf{v}_{(2)}(\mathbf{v}_{(2)x}, \mathbf{v}_{(2)y}, \mathbf{v}_{(2)z}) = 2\mathbf{v}(\mathbf{v}_x, \mathbf{v}_y, \mathbf{v}_z).$$

比较式(4)、(5)可知,尽管两者的强度脉冲响应

函数的形式是相似的,但由于二次谐波的波长是激发波长的一半,因而其强度脉冲响应函数具有更小的空间分布。

## 2 二次谐波强度脉冲响应函数的频域分析

为了进一步揭示非线性二次谐波的分辨率提高的原因,对它的强度脉冲响应函数进行频域分析是很有意义的。引入归一化的空间频率:  $\nu_x = \frac{\lambda_0}{\sin \alpha} f_x$ ,

$$\nu_y = \frac{\lambda_0}{\sin \alpha} f_y; \mu_z = \frac{\lambda_0}{\sin^2 \alpha} f_z, f_x, f_y, f_z \text{ 为空间频率。}$$

以二次谐波波长进行归一化的空间频率  $\nu_{(2)}$  与以激发光波长进行归一化的空间频率  $\nu$  的关系为  $2\nu_{(2)}$  ( $\nu_{(2)x}, \nu_{(2)y}, \mu_{(2)z}$ ) =  $\nu(\nu_x, \nu_y, \mu_z)$ 。对式(4)进行三维傅里叶变换,可得到二次谐波强度脉冲响应函数的频谱分布函数为

$$H_{SHW}(\nu_x, \nu_y; \mu_z) = \mathcal{F}_3\{|h(\mathbf{v})|^4 \cdot |h(\mathbf{v}_{(2)})|^2\} = \mathcal{F}_3\{|h(\mathbf{v})|^2\} \otimes_3 \mathcal{F}_3\{|h(\mathbf{v})|^2\} \otimes_3 \mathcal{F}_3\{|h(\mathbf{v}_{(2)})|^2\} =$$

$$\int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{2}{\{[(m - \frac{\nu_x}{2})]^2 + [(n - \frac{\nu_y}{2})]^2\}^{1/2}} \cdot \frac{1}{[(x + \frac{\nu_x}{2})^2 + (y + \frac{\nu_y}{2})^2]^{1/2}} \cdot \frac{1}{[(x - \frac{\nu_x}{2})^2 + (y - \frac{\nu_y}{2})^2]^{1/2}} \cdot$$

$$\left\{ 1 - \frac{\left| z + \frac{\mu_z}{2} \right|}{\frac{(m + \frac{\nu_x}{2})}{[(x + \frac{\nu_x}{2})^2 + (y + \frac{\nu_y}{2})^2]^{1/2}} + \frac{(n + \frac{\nu_y}{2})}{2} \right\}^{1/2} \cdot$$

$$\left\{ 1 - \frac{\left| z - \frac{\mu_z}{2} \right|}{\frac{(m + \frac{\nu_x}{2})}{[(x - \frac{\nu_x}{2})^2 + (y - \frac{\nu_y}{2})^2]^{1/2}} + \frac{(n + \frac{\nu_y}{2})}{2} \right\}^{1/2} \cdot$$

$$\left\{ 1 - \frac{\left| l - \frac{\mu_z}{2} \right|}{\{[(m - \frac{\nu_x}{2})]^2 + [(n - \frac{\nu_y}{2})]^2\}^{1/2}} + \frac{4}{4} \right\}^{1/2} \cdot dx dy dz dm dn dl \quad (8)$$

空间频率的取值必须保证式(8)具有非零值,因此可以求得二次谐波共焦显微镜的强度脉冲响应函数的纵向频率、横向频率分别必须满足

$$|\mu_z| \leq 2, |\nu| = \sqrt{\nu_x^2 + \nu_y^2} \leq 8, (SHW) \quad (9)$$

式(9)中取等号时表示纵向、横向的截止频率;相应的纵向、横向通频带宽为  $\Delta\mu_z = 2, \Delta\nu = 8$ 。

对于式(5)即双光子荧光共焦显微镜,它的强度脉冲响应函数的纵向频率与横向频率分别满足<sup>[9]</sup>

$$|\mu_z| \leq 3/2, |\nu| = \sqrt{\nu_x^2 + \nu_y^2} \leq 6, (twophoton) \quad (10)$$

式(10)取等号时表示纵向、横向的截止频率;相应的纵向、横向通频带宽为  $\Delta\mu_z = 3/2, \Delta\nu = 6$ 。

显然,双光子荧光的两个截止频率和两个通频带分别都小于二次谐波的。即使在荧光波长等于激发波长一半的极限情况下,双光子荧光共焦显微镜强度脉冲响应函数的纵向频率与横向频率分别为<sup>[13]</sup>

$$|\mu_z| \leq 2, |\nu| = \sqrt{\nu_x^2 + \nu_y^2} \leq 8, (twophoton) \quad (11)$$

这时的两个截止频率和两个通频带才分别与二次谐

波的相等.

综合上面的二次谐波和双光子荧光的强度脉冲响应函数的频域分析结果可知:无论是纵向、横向截止频率,还是纵向、横向通频带,二次谐波的都大于双光子荧光的,因而二次谐波的焦斑横向、纵向尺寸也更小,横向、纵向分辨率也更高.

### 3 通频带宽与焦斑空间大小的关系

通频带宽与焦斑空间大小的关系也可以从量子力学的不确定原理说明.

如图 2,根据量子力学的不确定原理,一个光子

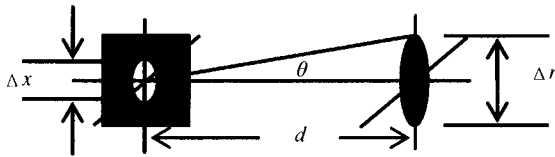


图 2 不确定关系

Fig. 2 Uncertainty relation

经过一个衍射成像系统后,其动量不确定度  $\Delta P_x$  与透镜光瞳直径  $\Delta x$ (即位置不确定度)受不确定关系决定

$$\Delta P_x \cdot \Delta x \approx h \quad (12)$$

从图 2 可以获得横向通频带宽  $\Delta f_r$  与焦斑横向大小(即爱里斑直径)  $\Delta r$  的关系. 横向通频带宽  $\Delta f_r$  与最大空间频率  $f_{\max}$  的关系为

$$\Delta f_r \approx f_{\max} = \Delta x / (2\lambda d) \quad (13)$$

而

$$\sin \theta = \Delta P_x / P_x \approx \Delta r / (2d) \quad (14)$$

式(12)、(13)、(14)联立可得

$$\Delta f_r \cdot \Delta r \approx 1 \quad (15)$$

式(15)表明,一个光子经过成像系统后,在像面上的横向位置不确定量  $\Delta r$ (即爱里斑直径)与空间频率不确定量  $\Delta f_r$ (即通频带)是一对共轭量. 类似地,纵向通频带  $\Delta f_z$  与纵向不确定量  $\Delta z$ (焦斑纵向尺寸)也满足不确定关系

$$\Delta f_z \cdot \Delta z \approx 1 \quad (16)$$

因此,通频带越宽,位置不确定量(焦斑空间尺寸)越小,横向、纵向分辨率也就越高.

### 4 结论

本文通过与双光子荧光共焦成像过程比较,推导了非线性二次谐波三维强度脉冲响应函数并对它进行傅立叶变换,获得了它的纵向、横向截止频率和纵向、横向通频带,在频域里揭示非线性二次谐波共焦成像具有更高分辨率,最后又进一步通过不确定原理给予证明.

### 参考文献

- Moreaux L, Sandre O, Blanchard-Desce M, et al. Membrane imaging by simultaneous second-harmonic generation and two-photon microscopy. *Optics Letters*, 2000, **25**(5):320~322
- Guo Yici, Ho P P, Savage H, et al. Second-harmonic tomography of tissue. *Optics Letters*, 1997, **22**(17):1323~1325
- Alvin T Yeh, Nader Nassif, Aikaterini Zoumi, et al. Selective corneal imaging using combined second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Optics Letters*, 2002, **27**(23):2082~2084
- Malcom Brown R, Jr, C Millard Andrew, et al. Macromolecular structure of cellulose studied by second-harmonic generation imaging microscopy. *Optics Letters*, 2003, **28**(22):2207~2209
- Jiang Yi, Ivan Tomov, Wang Yimin, et al. Second-harmonic optical coherence tomography. *Optics Letters*, 2004, **29**(10):1090~1092
- Fu Ling, Gan Xiaosong, Gu Min. Use of a single-mode fiber coupler for second-harmonic-generation microscopy. *Optics Letters*, 2005, **30**(4):385~387
- Minoru Kobayashi, Katsumasa Fujita, Tomoyuki Kaneko, et al. Second-harmonic-generation microscope with a microlens array scanner. *Optics Letters*, 2002, **27**(15):1324~1326
- 唐志列,邢达,刘颂豪.非线性二次谐波和三次谐波共焦显微镜的成像理论.中国科学,G辑,2003, **33**(6):212~218  
Tang Z L, Xing D, Liu S H. *Sciences in China, Series G*, 2003, **33**(6):212~218
- Shen Y R. *The Principles on Nonlinear Optics*, New York: John Wiley & Sons Inc. 1984. 71~84
- 唐志列,杨初平,裴红津,等.双光子共焦电子显微镜的三维成像理论及其分辨率改善.中国科学,A辑,2002, **32**(6):538~547  
Tang Z L, Yang C P, Pei H J, et al. *Sciences in China, Series A*, 2002, **32**(6):538~547
- 唐志列,梁瑞生,常鸿森.双光子和多光子共焦显微镜的成像理论.物理学报,2000, **49**(6):1076~1080  
Tang Z L, Liang R S, Chang H S. *Acta Physica Sinica*, 2000, **49**(6):1076~1080
- Goodman J W. *Introduction to Fourier Optics*, New York: John Wiley & Sons Inc. 1968. 88~155
- 杨初平,唐志列,裴红津.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, Tang Z L, Pei H J. *Acta Photonica Sinica*, 2004, **33**(2):159~163
- 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, Wan Z, Tan Y S, *et al.* *Acta Photonica Sinica*,  
2000, **29**(6): 549~553

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

15 王湘晖, 林列, 杨勇, 等. 基于矢量衍射理论的相位型光

## Resolution of Confocal Scanning Microscope for Second-harmonic Wave

Yang Chuping<sup>1</sup>, Kuang Weimin<sup>1</sup>, Liu Jun<sup>1</sup>, Tang Zhilie<sup>2</sup>

<sup>1</sup> College of Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642

<sup>2</sup> Department of Physics, South China Normal University, Guangzhou 510631

Received date: 2005-07-15

**Abstract** The three-dimensional intensity pulse function of a confocal scanning microscope for second-harmonic wave is derived and compared with that of a two-photon fluorescent confocal scanning microscope. By use of Fourier transformation, the three-dimensional intensity pulse function is theoretically investigated in frequency domain where the transverse and axial cut-off spatial frequencies, together with the transmission bands are given. The results show the optical resolution for second-harmonic wave is better than that for two-photon fluorescence. Such conclusion is also proved from the uncertainty principle.

**Keywords** Confocal microscope; Second-harmonic wave; Frequency domain; Optical 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 respectively. Now he is working as a lecturer in South China Agricultural University.