

doi:10.3788/gzxb20154408.0811002

荧光共焦并行探测显微成像系统设计及实验

王青青, 郑继红, 桂坤, 王康妮, 李道萍, 王雅楠, 高正

(上海理工大学 光电信息与计算机工程学院, 教育部光学仪器与系统工程研究中心,
上海市现代光学系统重点实验室, 上海 200093)

摘 要:将数字微镜器件加入到荧光显微成像系统中, 代替传统共焦显微系统中的照明针孔, 利用其调制特性, 通过在数字微镜器件上加载不同图片, 实现对光束的分割. 对马铃薯细胞分别进行四通道、六通道、九通道的荧光细胞探测, 同时采用平面反射镜作为样品, 测试得到系统的深度响应曲线, 分析了系统的分辨率. 实验结果表明, 数字微镜器件的加入实现了从点对点共焦成像变为多点并行共焦显微成像, 提高了显微成像的探测速度, 同时具有较高的分辨率.

关键词:显微系统; 共焦; 数字微镜器件; 荧光细胞; 并行探测; 成像; 深度响应

中图分类号: TH742

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2015)08-0811002-5

Design and Experiment of Parallel Detection of Fluorescence Confocal Microscopy Imaging System

WANG Qing-qing, ZHENG Ji-hong, GUI Kun, WANG Kang-ni,

LI Dao-ping, WANG Ya-nan, GAO Zheng

(*Engineering Research Center of Optical Instrument and System, Ministry of Education, Shanghai Key Lab of Modern Optical System, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China*)

Abstract: Digital micromirror device is added into the fluorescence confocal microscopy system, instead of lighting pinhole of a traditional confocal microscopy system. The modulation properties of digital micromirror device divide a light source into multiple beams through loading different pictures on digital micromirror device. Four-channel, six-channel and nine-channel fluorescence images of photo cells were detected and the system resolution was analyzed by measuring the depth response curve. The experimental results show that the microscopy system transfers from point-to-point imaging into the parallel confocal microscopy imaging based on digital micromirror device. The system provides a fast scanning speed and a high resolution.

Key words: Microscopy; Confocal; Digital micromirror device; Fluorescence cell; Parallel detection; Imaging; Depth response

OCIS Codes: 110.0180; 180.1790; 180.2520; 230.3990; 230.4040

0 引言

自 20 世纪 50 年代 Minsky^[1] 提出共焦显微概念以来, 共焦显微系统在生物医学、材料科学等领域被广泛应用. 激光扫描共焦显微镜 (Laser Scanning Confocal Microscope, LSCM)^[2] 在分析活细胞结构、分子、离子

的实时动态变化过程、细胞多层成像和三维结构重建^[3] 等方面应用较多. 传统共焦显微镜采用单点式、位移台扫描方式, 位移台的驱动装置主要采用压电陶瓷或步进电机^[5], 扫描速率低. 多点并行扫描的共焦成像技术^[6], 如 Nipkow 转盘法提高了扫描速度, 但其光能利用效率低, 结构不能多变; 微透镜阵列实现并行共焦

基金项目:上海市重点学科项目第三期项目 (No. S30502)、上海市研究生创新基金项目 (No. JWCXSL1402)、上海市人才发展基金 (No. 2012026) 和上海市教委重点科研创新项目 (No. 14ZZ138) 资助

第一作者:王青青 (1992-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为荧光共焦显微成像技术. Email: wqq7662793@126.com

导师 (通讯作者):郑继红 (1975-), 女, 教授, 博士, 主要研究方向为聚合物分散液晶材料及电光器件、信息光学等. Email: jihongzheng@sina.com

收稿日期:2014-12-15; **录用日期:**2015-04-30

<http://www.photon.ac.cn>

检测时,由于微透镜阵列一旦加工成型,就不能更改,导致构建成的并行共焦成像系统的适应性较差^[7].

数字微镜器件^[8-9] (Digital Micromirror Device, DMD)可作为分光束器件来制作柔性数字光源,替代传统共焦系统中的探测针孔,利用面阵列探测器 CCD 替代传统共焦系统中的接收针孔. DMD 芯片由约一百万个数字微镜构成,将一束光分成多束,再通过聚焦透镜形成光源阵列,每一个微镜可以通过程序控制其开关状态^[10],从而可以根据需求改变光源阵列的大小、周期,代替传统的照明针孔进行多点并行扫描,实现从点对点共焦到多点并行共焦显微,提高了共焦成像的探测速度,且具有高分辨率. 基于数字微镜器件的共焦显微镜^[11-12]在保持共焦显微镜高分辨率的同时,提高了探测速度,为微纳工件的三维轮廓测量带来了便利^[13].

DMD 中的反射镜寿命长,性能极其稳定,便于计算机控制,是一种理想的空域光调制器,被应用于投影技术^[14-15]. 随着科技的发展,光学成像与探测精密密度要求越来越高,目前,DMD 被广泛应用于光学成像探测以及光电设备领域,比如:利用 DMD 进行波前调控,研制出光谱可调谐光源^[16],通过编程控制,实现不同光谱分布的光辐射输出;利用 DMD 实现全息三维显示^[17],在三维成像方面有很大的前景;同时,在半导体光刻工艺中,加入数字微镜器件,实现了基于 DMD 的无掩模光刻机^[18].

本文提出了一种基于 DMD 的荧光共焦并行探测显微成像系统并进行了实验,将该系统应用到荧光显微探测中,可以提高对细胞的探测速率,为生物医学等相关领域中的细胞探测工作提供便利.

1 基本原理

在荧光共焦显微镜的基础上,将 DMD 加入到荧光共焦显微系统中,利用 DMD 的调制特性,代替传统共焦显微系统中的照明针孔,实现对光束的分割. 多路激发光经过透镜后被无限远显微物镜聚焦到样品上,所激发的荧光最终成像在 CCD 像面,其中,光源阵列面、物面和 CCD 像面是彼此共轭的,实现了荧光共焦并行探测显微成像,提高了共焦显微系统的探测速度.

实验采用单色性和方向性较好的激光做光源,由于激光的相干性,经过 DMD 调制后有衍射现象,选用 DMD 的零级衍射光作为激发光,荧光共焦并行探测显微成像得到系统的深度响应曲线,探测到马铃薯细胞样品中激发的荧光信号图像.

2 数字微镜器件

1987 年美国德州仪器公司开发了一种微机电系统数字微镜器件,它的微芯片是一个快速的、基于反射的数字光开关. 一个 DMD 芯片上有几十万到几百万

个微镜,每一个微镜的大小固定、彼此的间距也是固定的. 本文采用的 DMD 芯片集成了 1024×768 个微镜,单个微镜的边长为 $10.8 \mu\text{m}$,微镜间隔很小,能充分利用光能. 每个微镜都可以绕着各自的旋转轴做 $\pm 12^\circ$ 的偏转,即每个微镜都有 3 个状态: $+12^\circ, 0^\circ, -12^\circ$, 图 1 为 DMD 结构示意图.

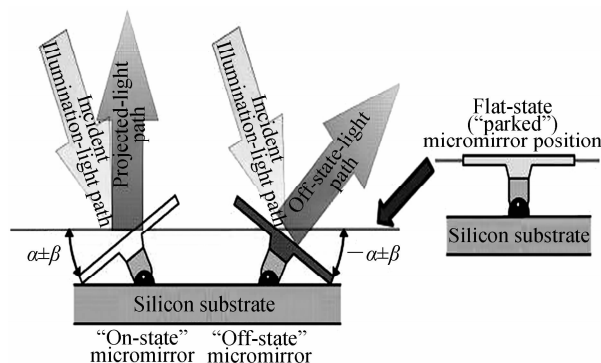


图 1 数字微镜器件 DMD 的结构

Fig. 1 Structure diagram of Digital Micromirror Device

DMD 是电寻址空域光调制结构,通过在反射镜上加偏置电压,微镜可以旋转到 $+12^\circ$ 和 -12° ,定义 $+12^\circ$ 时微镜处于“ON”状态, -12° 时微镜处于“OFF”状态, DMD 未通电时,所有微镜均保持在 0° ,当微镜处于“ON”状态时,以一定入射角(与垂直镜面方向成 24°)入射,则反射光将垂直出射,如图 1. 由于其结构特性,可以在反射定律下进行空域光调制,还可以在衍射条件下进行空域光调制.

定义处于“ON”状态的微镜作为探测针孔,由于 DMD 相邻微镜间隔很小,如果探测针孔之间间距太小,会造成重叠成像,最小间距由瑞利衍射^[19]决定,即 $\delta = 0.61\lambda/\text{NA}$ (1)

系统中,采用 405 nm 紫光,当显微物镜的数值孔径为 0.1 时,为 $2.47 \mu\text{m}$,而 DMD 的相邻微镜间距为 $1 \mu\text{m}$ 左右,则探测针孔间距应至少有一个微镜处于“OFF”状态. 图 2 为 DMD 阵列示意图, DMD 的探测针孔大小为 3×3 个像素单元,周期 $T=4$,可以通过修改程序对 DMD 的探测针孔大小和周期进行修改.

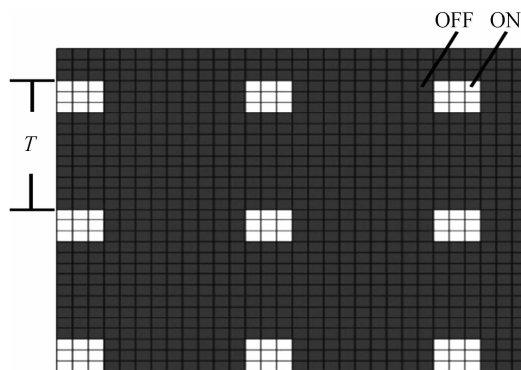


图 2 DMD 阵列示意图

Fig. 2 Schematic diagram of DMD array

此外,DMD对相干光存在衍射效应,其原因是由于微镜阵列中,微镜的尺寸很小,且微镜之间存在间隙,可以将微镜阵列看成是一个二维光栅,使得入射单色相干光束经DMD调制后产生衍射现象.利用DMD对相干光的衍射特性,可以增大荧光细胞的成像视场.

3 DMD 荧光共焦并行探测显微成像系统设计

基于DMD的荧光并行探测共焦显微成像系统光路图见图3.激发激光经扩束后,以 24° 入射角照射在数字微镜器件上,通过计算机来控制一定位置、数目的微镜处于“ON”状态来形成特定的针孔阵列,分成多束激发光,经过透镜后从UV波段二向色镜组出射,经过无限远显微物镜会聚于样品上,激发产生多路荧光信号.此荧光信号再次被物镜收集,经二向色镜组的滤光,被成像透镜会聚于CCD上,进行多路荧光并行探测显微成像.其中,DMD、物面和CCD像面是彼此共轭的.

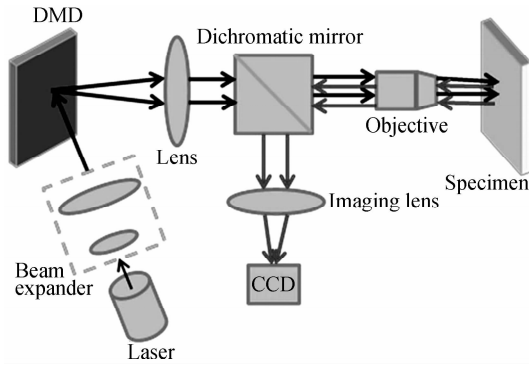


图3 基于DMD的多通道荧光共焦显微成像系统光路
Fig.3 Optical system of multi-channel fluorescence confocal microscopy based DMD

图3中,如果单个DMD像素在CCD上成像的大小小于CCD的单个像素,则会出现一个CCD像素同时呈现多个DMD像素的灰度值的情况,带来测量误差,为此DMD像素在CCD上成像的大小应大于CCD的像素.通过焦距为 f 的透镜与焦距为 f_1 的成像透镜的匹配,实现CCD和DMD像素的匹配,则

$$\delta_{\text{CCD}} \leq \delta_{\text{DMD}} \frac{f_1}{f} \quad (2)$$

式中,CCD像素 δ_{CCD} 为 $2.2 \mu\text{m}$,DMD像素 δ_{DMD} 为 $10.8 \mu\text{m}$,则焦距之间满足关系为 $f \leq 4.9f_1$.

由于基于DMD显微系统可以实现并行显微探测,并且DMD上可以通过加载不同图片来探测细胞不同位置的荧光信息,因此拟实现对细胞样品的整个视场的扫描.图4是 3×3 个像素单元,周期 $T=4$ 的DMD扫描模式示意图.按照图中箭头所示,将DMD上处于“ON”状态的微镜依次向右移动3个像素单元,一次可以对样品进行9个点的探测,移动4次,对荧光

细胞进行某一行扫描,按此方式,对样品细胞逐行扫描16次,便能够完成对样品的一个平面的扫描.与传统逐点共焦显微系统相比,扫描速度提高了9倍,测量参数可以通过修改计算机控制DMD的程序来改变,从而满足不同扫描速率的测量需求.

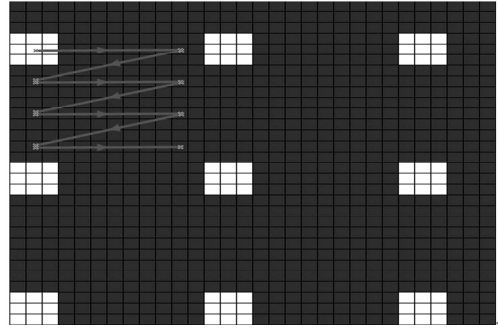


图4 DMD扫描模式示意图(3×3 个像素单元,周期 $T=4$)
Fig.4 Scanning mode diagram of DMD with 3×3 pixel unit and $T=4$

影响荧光共焦成像系统轴向分辨率的主要因素是轴向光强分布,即深度响应函数.评价其优劣的指标为半极大处全宽度(Full Width at Half Maximum, FWHM),定义为 Z 轴采样时接收端光强在最大值一半处所对应的轴向坐标间距 Δz ^[20],其表达式为

$$\Delta z = \frac{0.45\lambda}{n - \sqrt{n^2 - \text{NA}^2}} \quad (3)$$

式中, λ 为激发光波长, n 为显微物镜折射率,NA为显微物镜数值孔径.可见,NA越大, λ 越小,则 Δz 越小,其轴向分辨率越高.通过理论计算,激发波长为 405 nm ,选取 $\text{NA}=0.65$ 的显微物镜,则 $\Delta z=2 \mu\text{m}$, $\text{NA}=1.25$,则 $\Delta z=0.27 \mu\text{m}$.

4 实验结果分析

4.1 实验系统

实验系统见图3,激发光源采用紫外(Ultraviolet, UV)波段的 405 nm 半导体准直激光器(Dream Laser公司),功率为 50 mW .DMD(上海益协电子科技有限公司)的微镜数量为 1024×768 个,每个微镜为正方形,边长为 $10.8 \mu\text{m}$.摄像机(日本JVC公司)像素尺寸为 $2.2 \mu\text{m} \times 2.2 \mu\text{m}$,采用的是 $1/2.5$ "彩色1000万CMOS图像传感器.物镜为放大倍率 $40 \times$, $\text{NA}=0.65$ 的无限远物镜.选用透镜焦距 f 为 50 mm ,成像透镜 f_1 分别为 12 mm 和 36 mm ,满足式(2)的要求.

4.2 深度响应曲线测试

如图2为DMD阵列示意图,选取DMD的探测针孔大小为 3×3 个像素单元,周期 $T=4$,将平面反射镜放置在纳米位移台上,作为探测样品,设置位移台步长为 $1 \mu\text{m}$,选取激发光波长为 405 nm ,显微物镜数值孔径为 0.65 ,进行深度响应曲线测试.图5为测量的深度响应曲线.从归一化光强的数值来看,当光强最大值一

半为 0.5 时,FWHM 值约为 $6.5 \mu\text{m}$. 由于 DMD 对激光的衍射效应,导致各个通道之间存在干扰,实验结果与理论计算有所差异,系统纵向分辨率有待提高.

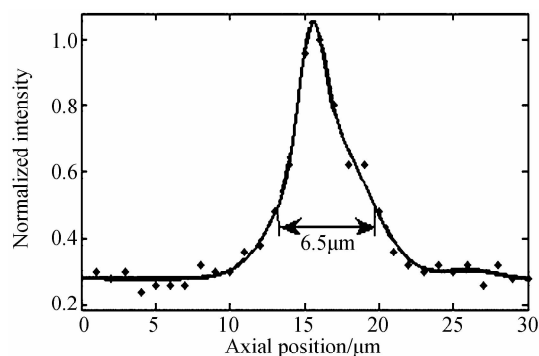


图 5 深度响应曲线

Fig. 5 The depth response curve of the system

4.3 DMD 微镜全部处于“ON”状态下的宽场成像

考虑到 DMD 对相干光的衍射效应,提高激发光的光能利用率,实验中,在 DMD 上加载全白图片,即 DMD 的微镜全部处于“ON”状态,将具有不同发散角的衍射光耦合进显微物镜,聚焦在样品的不同位置,实现对样品的宽场成像.图 6(a)是在 DMD 衍射效应下,多束激光激发荧光成像得到的马铃薯图像,图 6(b)是未经过 DMD 的一束激发光所激发得到的荧光细胞图像.在相干光为激发光源下,以 DMD 的衍射效应为基础,图 6(a)的成像视场明显大于图 6(b),在原有系统上增大了成像视场.

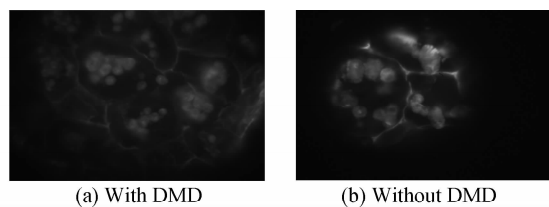


图 6 马铃薯细胞显微图

Fig. 6 Potato cell pictures taken by microscopy

4.4 并行探测细胞成像

相干性很好的激光经过 DMD 调制后所形成的光波场是一个包含了 DMD 自身的衍射图案、DMD 所显示图像的实像、虚像的复杂二维周期性光波场,在用于并行共焦探测时,只需用到 DMD 的零级衍射图案中所包含的 DMD 所显示图像的实像.实验系统中,经过二向色镜的荧光信号再经过成像物镜聚焦后,进入 CCD 摄像头,通过调节摄像头与成像透镜之间的相对距离,得到比较清晰的成像图片.由于 DMD 上加载的图片白色区域数目增多,即显微镜探测系统的通道数增加,会引起分束后的激发光能量减弱,不足以激发出一定强度的荧光,被 CCD 探测,所以在 DMD 上分别加载图 7(a)~(c)的图片,分别实现对一束激光进行四通道、六通道、九通道的分束,初步实现荧光并行探测显

微成像.实验中,样品采用马铃薯神经细胞样品,得到如图 7(d)~(i)的荧光细胞图像.图 7(d)~(f)是在成像透镜焦距 f_1 为 12 mm 时得到的并行探测细胞成像图,图 7(g)~(i)是在成像透镜焦距 f_1 为 36 mm 时得到的并行探测细胞成像图,图 7(d)~(i)的荧光细胞图像反映出四通道、六通道、九通道下的细胞荧光图像与 DMD 的调制图片一致,利用 DMD 将一束激发光进行分束,实现并行探测显微系统的快速成像.

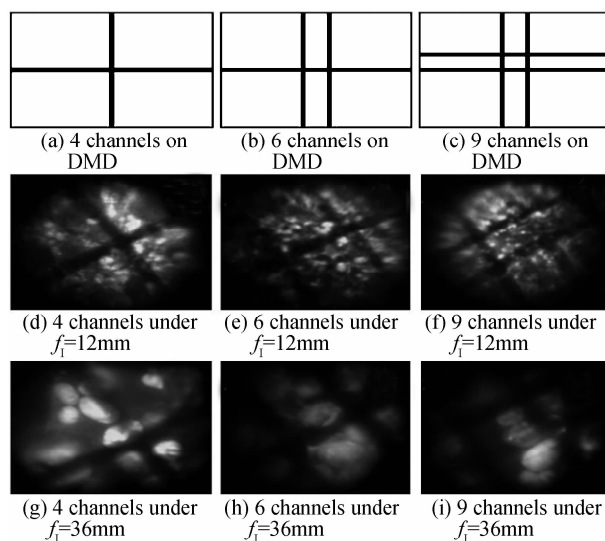


图 7 采用不同成像透镜拍摄的马铃薯细胞显微图

Fig. 7 Potato cell pictures adopting imaging lens with different focal length

由于激光的相干性在显微检测中带来了相干噪声和散斑,在进行荧光并行探测显微成像时,由于通道之间噪声串扰和系统固有光学像差的存在,造成图 7 中 CCD 所采集的荧光细胞图像边缘模糊、黑色区域被荧光干扰而发生畸变.实验对设计系统进行了验证,实现了多通道的并行探测,但由于显微探测系统的通道数增加,导致激发的荧光信号微弱,不能被 CCD 探测,故不能实现对样品的扫描.因此在后续的研究工作中,拟使用大功率激光光源作为激发光,增加探测的通道数,实现扫描,同时改善相干噪声和散斑,提高荧光细胞图片的质量,提高系统的分辨率.

5 结论

基于数字微镜器件,提出了荧光并行探测共焦显微成像系统设计方案并进行初步实验.设计中将 DMD 加入到荧光共焦显微系统中,利用 DMD 的调制特性,代替传统共焦显微系统中的照明针孔,实现对光束的分割,从点对点共焦成像变为并行显微探测成像.实验中拍摄了四通道、六通道、九通道的马铃薯细胞图片,实现了荧光并行显微探测,测试了深度响应曲线.在现有工作基础上,拟通过扩大 DMD 通道数量,提高扫描速率,实现对荧光细胞的全视场扫描,提高系统工作效率.

参考文献

- [1] MINSKY M. Microscopy apparatus; US, 30133467 [P], 1961-12-19.
- [2] DAVIDOVITS P, EGGER M D. Scanning laser microscope [J]. *Nature*, 1969, **223**(5208): 831.
- [3] PAN Bing, XIE Hui-min, DAI Fu-long, *et al.* Experiment study of moire fringes in laser scanning confocal microscopy [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2007, **36**(4): 622-626.
潘兵, 谢惠民, 戴福隆, 等. 激光扫描共聚焦显微镜中云纹法的实验研究[J]. *光子学报*, 2007, **36**(4): 622-626.
- [4] LI Zhao-hui. Design and optimization in constructing an in-vivo confocal laser scanning microscopy[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2011, **40**(5): 667-672.
李朝辉. 激光扫描实时共聚焦显微成像系统设计[J]. *光子学报*, 2011, **40**(5): 667-672.
- [5] TIZIANI H J, UHDE H M. Three-dimensional analysis by a microlens-array confocal arrangement [J]. *Applied Optics*, 1994, **33**(4): 567-572.
- [6] RONG Zi-hao, LI Shuai, KUANG Cui-fang, *et al.* Real-time super-resolution imaging by high-speed fluorescence emission difference microscopy[J]. *Journal of Modern Optics*, 2014, **61**(16): 1364-1371.
- [7] LI Jun-chang, SONG Qing-he, GUI Jin-bin. Theory research on Fresnel diffraction hologram display with DMD[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2009, **38**(6): 1459-1463.
李俊昌, 宋庆和, 桂进斌. 数字微镜用于菲涅尔衍射全息显示的理论研究[J]. *光子学报*, 2009, **38**(6): 1459-1463.
- [8] TU Long, YU Jin, FAN Zhong-wei, *et al.* Parallel confocal microscopic detection technique and its research progress[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2012, **49**(8): 080006.
涂龙, 余锦, 樊仲维, 等. 并行共焦显微检测技术及其研究进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2012, **49**(8): 080006.
- [9] DAN Dan, YAO Bao-li, LEI Ming, *et al.* Structured illumination microscopy for super-resolution and optical sectioning [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2014, **59**(12): 1291-1307.
- [10] HOU Wen-mei, ZHANG Yun-bo. Fast parallel 3D profilometer with DMD technology[C]. SPIE, 2011, **8321**: 1-7.
- [11] YU Qing, YU Xiao-fen, CHENG Ling-li, *et al.* Research on the influence of Talbot effect on the moiré in laser parallel confocal microscopy system [J]. *Chinese J Scientific Instrument*, 2009, **30**(6): 1271-1274.
余卿, 余晓芬, 陈伶俐, 等. 泰伯效应对激光并行共焦显微系统成像影响的研究[J]. *仪器仪表学报*, 2009, **30**(6): 1271-1274.
- [12] HUANG C C, LIN C C, YEH K M. Confocal microscopy scanned by digital micromirror device with stray light filters [C]. SPIE, 2008, 6884: 68840T.
- [13] JIANG Shi-hong, WALKER J. Differential high-speed digital micromirror device based fluorescent speckle confocal microscopy[J]. *Applied Optics*, 2010, **49**(3): 497-594.
- [14] LIN Li-na, SONG Shan-shan, WANG Wen-sheng. Projection optical system design of coaxial dual-band infrared based on digital micro-mirror device [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2013, **42**(12): 1519-1523.
林丽娜, 宋姗姗, 王文生. 基于数字微镜器件的共轴红外双波段投影光学系统设计[J]. *光子学报*, 2013, **42**(12): 1519-1523.
- [15] CHEN Fang-han, ZHAO Guang-yu, JIANG Shi-long, *et al.* Optical system design of DMD digital fringe projection based on the application of 3-D defect inspections [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2015, **44**(2): 222002.
陈方涵, 赵光宇, 蒋仕龙, 等. 基于三维缺陷检测的DMD数字条纹投影光学系统设计[J]. *光子学报*, 2015, **44**(2): 222002.
- [16] AI Qi, CHEN Xiao, TIAN Miao, *et al.* Multi-channel C-band-tunable fiber lasers based on digital-micromirror-device processor[J]. *Acta Optica Sinica*, 2014, **34**(4): 135-140.
艾琪, 陈笑, 田淼, 等. 基于数字微镜器件的多通道C波段可调谐光纤激光器[J]. *光学学报*, 2014, **34**(4): 135-140.
- [17] WANG Peng, ZHANG Ya-ping, ZHANG Jian-qiang, *et al.* 3-D computer generated hologram display based on digital micro-mirror device [J]. *Laser Technology*, 2013, **37**(4): 483-486.
王鹏, 张亚萍, 张建强, 等. 基于数字微镜器件的计算全息3维显示[J]. *激光技术*, 2013, **37**(4): 483-486.
- [18] XU Zheng-ping. Application of digital micromirror device in photoelectric equipment [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2014, **51**(5): 87-96.
徐正平. 数字微镜器件在光电设备中的应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2014, **51**(5): 87-96.
- [19] ZHANG Yun-bo, HOU Wen-mei, ZHENG Ji-hong, *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. *光电工程*, 2011, **38**(6): 65-70.
- [20] SHEPPARD C J R, MARTHEWS H J. The extended-focus, auto-focus and surface-profiling techniques of confocal microscope[J]. *Journal of Modern Optics*, 1988, **35**: 145-154.