显微成像系统分辨率问题讨论(特邀)

党诗沛1,2,李润泽1,周美玲1,千佳1,但旦1,于湘华1,姚保利1,2*

(1. 中国科学院西安光学精密机械研究所 瞬态光学与光子技术国家

重点实验室,陕西西安710119;

2. 中国科学院大学,北京 100049)

摘 要:空间分辨率是光学显微成像系统的核心指标,根据光学衍射理论,成像系统的空间分辨率由 照明光波长与显微物镜的数值孔径共同决定。而在实际成像过程中,根据不同判据得出的显微成像系 统分辨率略有差异,需要根据光源的相干性和被观测目标的结构等特征选择合适的判据来准确计算成 像系统分辨率。通过理论分析和数值模拟,给出了不同情况下成像分辨率的计算方法,并对比了在相 干光源和非相干光源照明下,对双缝目标和双点目标成像时成像分辨率的差异。 关键词:光学显微成像: 相干光和非相干光照明; 分辨率判据

中图分类号: O436 文献标志码: A **DOI**: 10.3788/IRLA20220735

Discussion on spatial resolution of microscopic imaging system (invited)

Dang Shipei^{1,2}, Li Runze¹, Zhou Meiling¹, Qian Jia¹, Dan Dan¹, Yu Xianghua¹, Yao Baoli^{1,2*}

 State Key Laboratory of Transient Optics and Photonics, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Xi'an 710119, China;
 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Spatial resolution is a key specific parameter of the optical microscopic imaging system. According to the optical diffraction theory, the spatial resolution of imaging system is determined by the wavelength of illumination light and the numerical aperture of microscope objective. In the practical imaging process, the resolutions of microscopic imaging system obtained from different criteria are slightly different. It is necessary to select an appropriate criterion according to the coherence of light sources and the structural characteristics of obsversed targets to accurately calculate the resolutions of imaging system. In this paper, the calculation methods for spatial resolution under different conditions are provided via theoretical analysis and numerical simulation. Furthermore, we compare and discusse the difference of imaging resolutions under the illuminations of coherent and incoherent light sources for double points and double slits targets, respectively.

Key words: optical microscopic imaging; coherent and incoherence light illumination; resolution criterion

收稿日期:2022-10-12; 修订日期:2022-10-30

作者简介:党诗沛,男,博士生,主要研究方向为结构光照明显微成像。

基金项目:国家自然科学基金 (62005309, 62105359); 中国博士后科学基金 (2020M673522); 陕西省自然科学基础研究 (2021JQ-325); 陕西省 重点研发计划 (2021GY-079, 2020SF-193); 西安市博士后创新基地资助项目 (2021-08)

导师(通讯作者)简介:姚保利,男,研究员,博士生导师,博士,主要从事新型光学成像理论与技术方面的研究。

0 引 言

光学显微镜是众多显微成像技术中应用范围最 广的工具之一,对物理学、材料学、生物医学等众多 领域的科学研究和工业生产都具有重要意义。在显 微成像系统中,"分辨率"一词用于表征显微系统对被 观测目标细节的区分能力,以具体数值来表示被观测 样品内两个能被区分的实体点或线之间的最小距 离。成像分辨率是光学显微成像系统的核心性能指 标,围绕成像分辨率的探索和研究一直是光学显微成 像领域的热点之一^[1-3]。

1835年,英国科学家艾里 (Airy)^[4] 发现,由于光 的衍射效应,点光源经过光学系统所成的像不是理想 的几何点像,而是有一定大小的圆斑(后被称为艾里 斑 (Airy disk))。1876年,德国科学家阿贝 (Abbe)^[5-6] 从光栅衍射的角度分析显微镜的分辨率能力,得出了 著名的分辨率极限公式,即 $\delta = \lambda/(2n \cdot \sin\theta)$,其中 δ 表 示显微成像系统可分辨的最小距离, λ 为光波长, n 代 表样品周围介质的折射率, θ 为显微物镜的半孔径角, (n·sinθ) 定义为显微物镜的数值孔径 (Numerical Aperture, NA)。NA 值越大, 代表物镜收集光线的能力越 强,分辨率越高。在可见光成像中,采用最短波长的 紫光 (*λ*≈400 nm)、最大数值孔径 NA≈1 的物镜 (干 镜)时,显微成像系统的极限分辨率约为 200 nm。这 个分辨率极限后来被称为光学显微的"阿贝衍射极 限"。1879年, 瑞利 (Rayleigh)^[7] 在艾里斑的理论基础 上进一步延伸,根据艾里斑强度分布,提出了光学成 像系统分辨率极限判据,即在两个点光源相互靠近过 程中,当一个艾里斑的中心正好重叠于另一个艾里斑 的第一级暗环时,认定为两者"刚好可以分辨",如果 两个艾里斑再继续相互接近,则两者无法被分辨,这 一判据被称为"瑞利判据"。瑞利判据对应分辨率计 算公式为: $\delta = 0.61\lambda/(n \cdot \sin\theta)$ 。1916年,美国物理学家 斯派罗 (Sparrow)^[8-9] 提出了另外一种分辨率极限判 据,即当强度相同的两个光点由重合向远分开时,当 二者叠加所形成的衍射斑中心主极大开始消失,在中 心区域形成平顶时,被认为刚好能分辨。根据 Sparrow 判据得出的分辨率计算公式为: $\delta = 0.47\lambda/$ $(n \cdot \sin \theta)$ 。因此,相同条件下, Sparrow 判据计算所得的 分辨率极限值小于瑞利判据。

成像系统分辨率实验标定时,根据所采用的待测 目标不同,结果也会有所差异。常用的分辨率测试目 标有线状和点状,由于线状与点状物体衍射形成的光 斑形状有所不同,线状物体衍射后的一级暗线位置与 点状物体衍射形成的艾里斑一级暗纹位置不一致, 因此,对于线状物体分辨率极限与点状物体也有所差 异^[10-12]。另外,在不同相干性光源照明情形下,物体 不同位置点所成图像分别为相干叠加(光场复振幅叠 加)或者非相干叠加(强度叠加)^[13-14],两者最终的分 辨能力也有所不同。

文中通过理论分析和数值模拟,分别论证分析了 在相干光照明和非相干光照明情况下,双孔衍射和双 缝衍射在不同判据下的分辨率极限,对比了在照明光 源相干性不同、被观测目标结构特征不同时,光学显 微成像系统分辨率的差异。

1 理论分析和数值模拟

根据光的标量衍射理论,光学显微成像系统的理 论分辨率极限计算公式可以统一表示为:

$$\delta = \gamma \cdot \frac{\lambda}{NA} \tag{1}$$

式中: λ 表示照明或发光波长; NA 表示系统的数值孔 径; 系数 y 的取值与照明光的相干性、待测目标是双 点或双缝, 以及所采用的分辨率判据等因素有关。通 过模拟不同情况下目标经过光学系统形成的衍射斑, 利用不同判据对像面衍射斑强度分布的不同要求得 出不同情况下的 y 取值。

1.1 点源衍射的分辨率极限

点源经过衍射受限光学系统所成的像不是理想的几何点像,而是有一定大小的艾里斑。艾里斑沿径向的强度分布为^[13]:

$$I(\rho) = I_0 \left[\frac{2J_1(ka\rho/z)}{ka\rho/z} \right]^2$$
(2)

式中: I_0 为艾里斑中心强度; $k = 2\pi/\lambda$ 为波矢; a 表示衍 射孔半径 (透镜成像时为透镜孔径的一半); z 为衍射 孔径到像面距离; ρ 为径向坐标; J_1 是第一类一阶贝 塞尔函数。为了简化公式得到统一的分辨率判据, 笔 者定义无量纲量 x 与实际距离 ρ 的关系: x = kap/z, 用 来表示两点或两缝的相对间距。公式 (2) 可简化为:

$$I(x) = I_0 \left[\frac{2J_1(x)}{x} \right]^2$$
(3)

(1) 非相干光照明下不同判据的两点分辨率

在非相干光照明或荧光显微成像条件下,两个点 源经过衍射受限光学系统之后,所成图像为两个点源 各自艾里斑强度的非相干叠加,从公式(3)可以得到 像面坐标中的总强度分布为:

$$I(x) = I_0 \left[\frac{2J_1 \left(x - \frac{dx}{2} \right)}{x - \frac{dx}{2}} \right]^2 + I_0 \left[\frac{2J_1 \left(x + \frac{dx}{2} \right)}{x + \frac{dx}{2}} \right]^2$$
(4)

式中: dx 表示两个艾里斑中心之间的距离。模拟中通 过改变 dx 的值使两个艾里斑逐渐靠近(远离)达到极 限判据情况, 然后测量不同条件情况下 dx 的值, 从而 求得公式(1)中对应的系数 γ 值。由 x = kap/z, 可得像 面上两点中心的实际距离δ'为:

$$\delta' = d\rho = dx \frac{z}{ka} = \frac{dx}{2\pi} \frac{\lambda}{n' \sin \theta'}$$
(5)

根据物像空间满足的正弦条件:

$$\delta n \sin \theta = \delta' n' \sin \theta' \tag{6}$$

式中: $n \approx n'$ 分别表示物空间和像空间的折射率, 可得 到物面上两点的分辨率距离 $\delta = dx$ 的关系为:

$$\delta = \frac{\mathrm{d}x}{2\pi} \frac{\lambda}{n\sin\theta} = \frac{\mathrm{d}x}{2\pi} \frac{\lambda}{\mathrm{NA}} \tag{7}$$

对比公式 (7) 和公式 (1) 可以计算得到不同成像 条件下系数 y 的取值为 y = dx/2π。

瑞利判据定义为第一个点光源经过衍射受限光 学系统之后形成的艾里斑中心与第二个点源产生的 艾里斑的第一零点重合。根据公式 (2)~(4),计算模拟 了两个艾里斑二维强度分布图及沿图中虚线的轮廓 线,如图 1 所示。图中的蓝线 (I_1)和红线 (I_2)分别代 表两点源在像面上各自形成的强度分布轮廓,绿线 (I_{sum})代表两点源叠加强度分布轮廓。通过不断减小 dx的值模拟两个点源不断靠近,当 dx = 3.833 时 (如 图 1(b) 所示),蓝色线的极大值与红色线的第一极小 值重合,满足瑞利判据条件,根据公式 (7)可计算得到 瑞利判据的系数 γ = 0.61。此时,两点所产生的艾里 斑强度叠加后的曲线,中心凹陷大小为峰值的 27%。



图 1 两非相干点源衍射叠加形成的光斑强度分布随点源间距变化情况。蓝线 (*I*₁) 和红线 (*I*₂) 分别表示两点源在像面上各自强度分布轮廓, 绿 线 (*I*_{sun}) 表示总的强度分布轮廓

Fig.1 Superposition intensity distributions formed by two diffracted incoherent point sources vs their separated distance. The blue (I_1) and red (I_2) lines represent the intensity distribution profiles of the two-point sources on the image plane, while the green one (I_{sum}) represents total intensity distribution profile

对于 Saprrow 判据, 其定义是当两个艾里斑叠加 总强度中心主极大消失, 在中心区域形成平顶时, 所 对应两点源之间的距离为分辨率极限,如图 1(c)所示,在此情况下 dx = 2.990。同理,根据公式(7)可计

(a)

Normalized intensity 0 0 0

\$/n

dx=3.833

算得到 Sparrow 判据的系数 $\gamma = 0.47$ 。

(2) 相干光照明下不同判据的两点分辨率

在相干光照明条件下,两个点源经过衍射受限光 学系统之后,产生的光场为两个艾里斑的复振幅叠 加,此时像面总强度分布为:

$$I(x) = I_0 \left| \frac{2J_1\left(x - \frac{dx}{2}\right)}{x - \frac{dx}{2}} + e^{j\varphi} \frac{2J_1\left(x + \frac{dx}{2}\right)}{x + \frac{dx}{2}} \right|^2$$
(8)

式中: φ为两个点源的相对相位差。当两点的距离

0°, 0-10 -8 -6 -4 -2 0 2 x dx 仍取瑞利判据间隔时 (dx = 3.833),两点光源叠加的 艾里斑强度随二者相位差及其相对间距的变化关系如 图 2(a) 所示,当 φ 分别为 0、π/2 和 π 三种情况时,对 应的强度分布曲线如图 2(b) 所示。

当 $\varphi = \pi/2$ 时, I(x)分布与非相干情况完全相同, 分辨率相同。当 $\varphi = 0$ 时,两个点光源相位相同,I(x)不出现中心凹陷,因而两点在瑞利判据间隔下不能被 分辨。若要能分辨,需进一步增大 dx 的值,以瑞利判据 下中心下凹 27%进行判断,如图 3(c)所示,此时 dx = 5.136,相应的 y = 0.82。同样地,在 Saprrow 判据下



图 2 相距为瑞利判据间隔的两个不同相位差的衍射相干点源叠加形成的光斑总强度分布。(a)两点光源叠加的艾里斑强度随二者相位差及相 对间距的变化关系; (b) φ 分别为 0、π/2 和 π 时对应的强度分布曲线

1.5

1.2

0.9 0.6

0.3

10

8

4 6

Fig.2 Superposition total intensity distribution profiles formed by two diffracted coherent point sources with different phase difference at the separated distance of Rayleigh criterion. (a) Total intensity distribution profiles of the superimposed two Airy disk against their phase difference and the distance; (b) Intensity distribution profiles at $\varphi = 0$, $\pi/2$ and π , respectively





Fig.3 Criterion of resolution limit for two point sources with the same phase (φ =0) under coherent illumination. (a)-(d) Superposition total intensity distributin profiles under different separated distances of the two point sources

(如图 3(b) 所示), dx = 4.607, 相应的 γ = 0.73。

当 φ=π 时,两个点源相位相反。当两个点源不断 靠近时,相干叠加后的总强度中心值始终为零,其像 面总强度分布如图 4 中绿色曲线所示,两个点源一直 可以分辨,成像分辨率比非相干照明下高。但是此种 情况下不能根据合成强度轮廓线峰值位置准确确定 两个点源的位置间距,例如当两个点源之间的距离 dx=5.136 时 (如图 4(a) 所示),第一个点源中心刚好处 于第二个点源艾里斑的第一级亮纹位置,此时为相长 干涉,合成强度轮廓线峰值位置与两个点源艾里斑中 心重合。但是当 dx<5.136 时,如图 4(b)~(d) 所示,两 个点源的实际位置间距小于探测图像强度两峰值之 间的距离,并且随着两个点源的不断靠近,其在像面 的合成强度峰值越来越低。为了更清楚地看明这个 趋势,图 4(e)将4条曲线画在同一坐标系中。可以看 到,合成强度两峰值随着 dx减小,其强度值越来越 小。图 4(f)是其相应的每条曲线各自归一化强度分 布,可以看到,合成强度两峰之间的间距变化很小。 这说明在这种情况下,两点在瑞利判据间隔以下还是 不能被有效分辨。



图 4 相干光源照明条件下两个相位相反 (φ = π) 点源的分辨率极限判断问题。(a)~(d) 两点源的间距 dx 不断减小时所形成艾里斑叠加强度分 布; (e) dx 取不同值的两点源叠加强度分布; (f) 图 (e) 中叠加总强度各自归一化强度分布

Fig.4 Criterion of resolution limit for two point sources with the opposite phase ($\varphi = \pi$) under coherent light illumination. (a)-(d) Superposition total intensity distribution profiles with the reducing separated distance dx of the two point sources; (e) Superposition intensity distributions profiles for different values of dx; (f) Respectively normalized intensity distributions profiles corresponding to (e)

1.2 双缝衍射的分辨率极限

与点源衍射形成艾里斑类似,单缝经过光学系统 之后由于衍射形成明暗相间的条纹。垂直于缝扩展 方向相应强度分布为: $I(\rho) = [\sin(ka\rho/z)/(ka\rho/z)]^2$,同 样令 $x = ka\rho/z$,则强度分布为: $I(x) = (\sin x/x)^2$,其像面 上所形成的衍射光斑强度分布与点光源艾里斑强度 分布对比结果如图 5 所示。可以看到,单缝衍射光斑的一级暗线和主峰半高宽比艾里斑更小一些,因此用 双缝测量系统的分辨率更高一些。

(1) 非相干光照明或荧光显微成像时, 像面上的 总强度分布为两个单缝衍射强度分布的叠加: $I(x) = \left(\frac{\sin x}{x}\right)^2 + \left[\frac{\sin(x+dx)}{x+dx}\right]^2$ 。此时瑞利判据间距 dx = 3.14, y为0.5; Saprrow判据间距dx = 2.62, y为0.42。

(2) 相干光照明时, 像面上总强度分布为两个单衍射 的复振幅叠加的模平方。当两个狭缝的相位差等于零 时, 总强度分布表达式为: $I(x) = \left[\frac{\sin x}{x} + \left(\frac{\sin(x+dx)}{x+dx}\right)\right]^2$ 。 此时瑞利判据间距 dx = 4.55, y 为 0.71; Saprrow 判据 间距 dx = 4.17, y 为 0.66。



图 5 单点衍射 (a) 与单缝衍射 (b) 光斑形状及其相应强度分布曲线 (c)

Fig.5 Diffraction intensity patterns of (a) a single point and (b) a single slit, and (c) their corresponding intensity distributiong profiles

2 结果和讨论

以上分别对非相干光和相干光照明情况下,光学 显微成像系统对双点目标和双缝目标成像时,分辨率 极限计算公式中的系数 y进行了计算,表1对上述结 果进行了对比。

从表1可以看出,在相同条件下,当分别选用瑞 利判据和 Sparrow 判据计算显微成像系统分辨率极限 时, Sparrow 判据比瑞利判据得到的分辨率极限更优 一些。在同一判据下,在非相干光照明情况下,系数 y 的取值更小,相应的成像系统分辨能力更强。相比 于双点目标,在用双缝目标标定系统成像分辨率时, 系数 y 的取值也更小,测量得到的系统分辨能力也更 优一些。

值得注意的是,在上述讨论相干光照明条件下, 对于相位相反的两个点源,系统总能识别出来两个光 斑,但是光斑成像位置与点源实际位置难以确定。当 两点源距离小于艾里斑第一级亮环的半径时,经过成 像系统后所拍摄图像始终显示总强度的第一个峰值 刚好处于第二个点源艾里斑的一级亮环位置。同时, 当相位相反的这两点相互靠近时,将造成点源衍射艾 里斑在该方向上的压缩,如图 4(e) 所示。该现象可以 用来产生小于衍射极限艾里斑的超振荡聚焦,笔者对 此进行了模拟。

为了方便,这里以一维方向压缩进行说明,该结 果可以扩展到二维压缩。如图 6(a)所示,单位振幅的 点光源 P_0 衍射聚焦为艾里斑结构。通过在 P_0 点左 右各加入一个振幅相同、相位相反、间距为 dx = 5.136 的 P_{-1} 和 P_{+1} 两个点源,可以实现对初始点源 P_0 的艾里斑在 x 方向的压缩,如图 6(b) 所示。通过增

表 1 不同情形下分辨率极限公式中系数 γ 的取值 Tab.1 Values of coefficients γ in resolution equation at

different cases Resolution criterion Coherent imaging Incoherent imaging Target 0.5 Abbe Double slit -0.82 0.61 Double point Rayleigh Double slit 0.71 0.5 0.73 0.47 Double point Sparrow Double slit 0.42 0.66

加±1级点源的强度,可进一步提高对中心点光源所 形成艾里斑的压缩程度。定义±1级点源与中心点源 强度比: β = I_{±1}/I₀,则衍射光斑随β变化过程如图 6(b)~ (d) 所示。以中心点强度为参考,相应的沿虚线归一 化强度分布如图 6(e) 所示。与原艾里斑相比,图 6(d) 压缩后中心点衍射光斑峰值半高宽减小 36%。类似地,在±1级点源与中心点源强度相同时,通过减小±1级点源与中心点源的距离,同样可以提高压缩程度,如图 7所示。图 7(c)所示为压缩后中心点衍射光斑半高宽减小 46%,但±1级点源距离中心点源不



- 图 6 超衍射极限聚焦。(a) 单点衍射聚焦艾里斑分布; (b) 3 个振幅相同、两边两点 (P₋₁ 和 P₊₁) 相位与中心点 (P₀) 相位相反、相邻两点间距 dx = 5.136 的 3 个相干点源衍射聚焦艾里斑的分布; (c)~(d) 逐渐增加+1 和-1 级两个点源与中心点源的强度比 β = I_{±1}/I₀, 衍射艾里斑的强度分布; (e) 图 (a)~(d) 中沿虚线以中心点为参考归一化强度分布曲线
- Fig.6 Focusing beyond the diffraction limit. (a) Airy disk distribution of single point diffraction focusing; (b) Diffraction focusing Airy pattern of three coherent point source when placing two points of P_{-1} and P_{+1} at dx=5.136 with the same intensity and π phase shift to the central point of P_0 ; (c)-(d) Diffraction Airy disk patterns when increasing the ratio of intensities of the P_{-1} and P_{+1} points to the central point P_0 , $\beta = I_{\pm 1}/I_0$; (e) The intensity distribution profiles along the dashed lines in (a)-(d)



- 图 7 超衍射极限聚焦。(a)~(d)逐渐减小±1级两个点源距中心的位置所形成衍射光斑分布;(e)图(a)~(d)中沿虚线以中心点为参考的归一化强 度分布曲线
- Fig.7 Focusing beyond the diffraction limit. (a)-(d) The diffraction patterns when the ± 1 points move approaching to the center point; (e) The intensity distribution profiles along the dashed lines in (a)-(d)

能太近,否则会导致中心点被淹没在±1级艾里斑中,如图 7(d) 所示。

3 结 论

综上所述,光学显微成像系统的分辨率是一个既 简单又复杂的问题。根据不同判据所得的分辨率略 有差异,在实际显微成像应用中,不同判据的适用范 围也略有不同,需要根据成像目标的结构特征和光源 的相干性等具体的成像条件选用合适的判据,才能够 得到更接近实际情况的系统分辨率。

参考文献:

- Yamanaka M, Smith N I, Fujita K. Introduction to superresolution microscopy [J]. *Microscopy*, 2014, 63(3): 177-192.
- [2] Ma Y, Wen K, Liu M, et al. Recent advances in structured illumination microscopy [J]. *Journal of Physics: Photonics*, 2021, 3(2): 024009.
- [3] Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy [J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 198(2): 82-87.
- [4] Airy G B. On the diffraction of an object-glass with circular aperture [J]. *Transactions of the Cambridge Philosophical Society*, 1835, 5(3): 283-291.
- [5] Abbe E. A contribution to the theory of the microscope and the nature of microscopic vision [J]. *Proceedings of Bristol*

Naturalists Society, 1876, 1(2): 200-261.

- [6] Abbe E. The relation of aperture and power in the microscope
 [J]. Journal of the Royal Microscopical Society, 1882, 2: 300-309.
- [7] Rayleigh L. Investigations in optics, with special reference to the spectroscope [J]. London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, 1879, 8(49): 261-274.
- [8] Sparrow C M. On spectroscopic resolving power [J]. Astrophysical Journal, 1916, 44(2): 76-86.
- [9] Sayanna K R, Sagar D K, Goud S L. Effects of defocusing on the Sparrow limits for apodized optical systems [J]. Optics Communications, 2003, 217(1): 59-67.
- [10] You S T, Kuang C F, Zhang B L. Resolution criteria in doubleslit microscopic imaging experiments [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 33764.
- [11] Yamamoto K. Two-point resolution in bright background under partially coherent light [J]. *Optical Review*, 2020, 27(6): 486.
- [12] Reddy A N K, Khonina S N. Apodization for improving the two-point resolution of coherent optical systems with defect of focus
 [J]. *Applied Physics B*, 2018, 124(12): 229.
- [13] Latychevskaia T. Lateral and axial resolution criteria in incoherent and coherent optics and holography near- and farfield regimes [J]. *Applied Optics*, 2019, 58(13): 3597-3603.
- [14] Gao P, Yuan C. Resolution enhancement of digital holographic microscopy via synthetic aperture: a review [J]. *Light: Advanced Manufacturing*, 2022, 3(1): 105-120.