

光电工程

Opto-Electronic Engineering

中文核心期刊 中国科技核心期刊
Scopus CSCD

偏振激光照明对多层薄膜结构成像对比度影响

张子建, 王天义, 徐欣, 王吉祥, 张欣, 张若冰, 史国华, 叶虹

引用本文:

张子建, 王天义, 徐欣, 等. 偏振激光照明对多层薄膜结构成像对比度影响[J]. *光电工程*, 2023, **50**(7): 230089.

Zhang Z J, Wang T Y, Xu X, et al. Effect of polarized laser illumination on imaging contrast of multilayer thin film structure[J]. *Opto-Electron Eng*, 2023, **50**(7): 230089.

<https://doi.org/10.12086/oe.2023.230089>

收稿日期: 2023-04-19; 修改日期: 2023-06-06; 录用日期: 2023-06-09

相关论文

Deep learning enhanced NIR-II volumetric imaging of whole mice vasculature

Sitong Wu, Zhichao Yang, Chenguang Ma, Xun Zhang, Chao Mi, Jiajia Zhou, Zhiyong Guo, Dayong Jin

Opto-Electronic Advances 2023, **6**(4): 220105 doi: [10.29026/oea.2023.220105](https://doi.org/10.29026/oea.2023.220105)

3D imaging lipidometry in single cell by in-flow holographic tomography

Daniele Pirone, Daniele Sirico, Lisa Miccio, Vittorio Bianco, Martina Mugnano, Danila del Giudice, Gianandrea Pasquinelli, Sabrina Valente, Silvia Lemma, Luisa Iommarini, Ivana Kurelac, Pasquale Memmolo, Pietro Ferraro

Opto-Electronic Advances 2023, **6**(1): 220048 doi: [10.29026/oea.2023.220048](https://doi.org/10.29026/oea.2023.220048)

光片荧光显微镜研究进展

张子建, 徐欣, 王吉祥, 叶虹, 张欣, 史国华

光电工程 2023, **50**(5): 220045 doi: [10.12086/oe.2023.220045](https://doi.org/10.12086/oe.2023.220045)

光学相干层析技术在眼科手术导航方面的研究进展

李云耀, 樊金宇, 蒋天亮, 唐宁, 史国华

光电工程 2023, **50**(1): 220027 doi: [10.12086/oe.2023.220027](https://doi.org/10.12086/oe.2023.220027)

更多相关论文见光电期刊集群网站 



光电工程
Opto-Electronic Engineering

<http://cn.ojournal.org/oe>



OE_Journal



Website

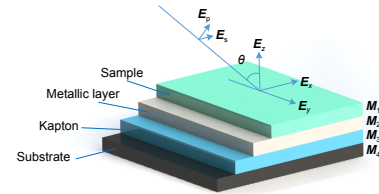
DOI: 10.12086/oe.2023.230089

偏振激光照明对多层薄膜结构成像对比度影响

张子建^{1,2}, 王天义^{1,2}, 徐欣^{1,2}, 王吉祥^{1,2},
张欣², 张若冰², 史国华^{2*}, 叶虹^{2*}

¹中国科学技术大学生物医学工程学院, 安徽合肥 230026;

²中国科学院苏州生物医学工程技术研究所江苏省医用光学重点实验室,
江苏苏州 215163



摘要: 光学多层干涉断层扫描技术 (Optical multilayer interference tomography, OMLIT) 应用于光电关联显微镜中以实现清晰的光学大视场成像, 为高分辨率电镜图像提供目标区域标定。为了进一步提升成像对比度和定位精度, 将偏振照明和 OMLIT 成像技术相结合, 提出一种多层薄膜偏振照明的理论模型, 使用矩阵传输方法对不同入射角的偏振光在不同材质、厚度的多层薄膜介质间的传播及干涉成像进行了仿真。结果表明, 当照明光的电场振荡方向平行于入射面时, 能够获得比非偏振光更高的图像对比度。当照明光以 62° 入射角照射金属银镀层样品表面, 成像对比度提升高达 138 倍。这项工作为偏振照明 OMLIT 提供了理论基础, 为光电融合显微成像技术的发展提供了全新的技术方案。

关键词: 偏振成像; 矩阵算法; 多层薄膜; 光学多层干涉断层扫描技术

中图分类号: O436

文献标志码: A

张子建, 王天义, 徐欣, 等. 偏振激光照明对多层薄膜结构成像对比度影响 [J]. 光电工程, 2023, 50(7): 230089

Zhang Z J, Wang T Y, Xu X, et al. Effect of polarized laser illumination on imaging contrast of multilayer thin film structure[J].

Opto-Electron Eng, 2023, 50(7): 230089

Effect of polarized laser illumination on imaging contrast of multilayer thin film structure

Zhang Zijian^{1,2}, Wang Tianyi^{1,2}, Xu Xin^{1,2}, Wang Jixiang^{1,2}, Zhang Xin²,
Zhang Ruobing², Shi Guohua^{2*}, Ye Hong^{2*}

¹Department of Biomedical Engineering, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China;

²Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China

Abstract: Optical multilayer interference tomography (OMLIT) is used in correlated light and electron microscopy to image a large field through an optical microscope, providing the navigation of the region of interest for later nanometer-resolution electron microscope imaging. In order to further improve the imaging contrast and positioning accuracy of thin film samples, a theoretical model combining polarization illumination and OMLIT is proposed. This model is written in the matrix formalism and the propagation of polarized light through different layers with various

收稿日期: 2023-04-19; 修回日期: 2023-06-06; 录用日期: 2023-06-09

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项 (XDB32030205); 苏州市创新创业领军人才 (ZXL2022476)

*通信作者: 史国华, ghshi_lab@sibet.ac.cn; 叶虹, hongye@sibet.ac.cn。

版权所有©2023 中国科学院光电技术研究所

incident angles is simulated. The simulation results show that using the polarized light with an electric field oscillating parallel to the incidence plane (p-polarization) exhibits a much higher imaging contrast than the unpolarized light. Especially when the p-polarized light illuminates on an OMLIT sample, of which the first coating layer is Ag, with an incidence angle of 62° , the imaging contrast can be vastly enhanced by 138 times. The presented model provides a theoretical basis for polarization illumination OMLIT, pathing a new technical way for the development of the correlated light and electron microscopy technique.

Keywords: polarimetric imaging; matrix algorithm; multilayer thin film; optical multilayer interference tomography

1 引言

脑科学是当前生物学的重点研究领域, 它帮助我们了解意识建立的生物学基础。人类脑部大约包含千亿个神经元, 每个神经元产生约 1 万个突触连接, 绘制脑部神经网络图谱能够更好地了解脑部信息传递, 揭示大脑工作原理^[1-2]。光电关联显微镜 (Correlated light and electron microscopy, CLEM) 因其能兼顾毫米尺度成像和纳米级别分辨的能力, 在脑科学的研究中受到广泛应用^[3-4]。CLEM 首先通过光学显微镜实现毫米尺度的成像, 然后在选定区域使用电子显微镜观测纳米级结构。为了高精度的电镜成像定位, 提升光学成像的分辨率和对比度至关重要。

目前光学成像主要分为荧光标记和无标记两类方法。荧光标记^[5-7]对特定生物组织进行标记, 成像对比度高。然而, 荧光标记是稀疏标记, 无法观测细胞中所有神经元形态, 并且荧光样本制作流程与电子显微镜样本制作流程不完全兼容, 荧光标记中的靶向免疫荧光基因和基因编码的探针会损伤细胞中的微小结构^[8-9]。无标记光学成像如功能光声显微镜^[10-11]、光学相干断层扫描^[12]、光学相干层析成像^[13-14]等, 虽然可以观察到视野中的所有神经元形态, 但是轴向分辨率低、成像对比度低, 不容易与电子显微镜相关联。

为了进一步发展光电关联成像技术, Schalek 等人研制了自动卷带超微切片机 (automated tape ultramicrotome, ATUM)^[15], 可以将生物样本切成 29 nm 的超薄切片, 提升轴向分辨率; 使用卷带自动收集掉入水船中的超薄生物样本切片, 能够对收集到的样本切片进行光学和电镜观察。2021 年张若冰等人在 ATUM 基础上首次提出了光学多层干涉断层扫描 (optical multilayer interference tomography, OMLIT) 技术^[16], 利用多层薄膜之间的反射光相互干涉以增强光学图像对比度, 提供高对比度光学图像。由于该技术不使用荧光标记, 避免了细胞超微结构的损伤。但

是目前 OMLIT 使用白色 LED 作为光源, 照明方式为垂直落射式照明, 没有对光源和照明条件进行进一步优化。

由菲涅尔公式可知, 光束在穿过两个介质的界面时, 不同偏振态的光反射率不同。椭偏仪^[17]、布儒斯特角显微镜^[18-19]等就是根据这种现象, 完成对薄膜折射率、薄膜厚度等信息的探测。然而由于生物组织大多是浑浊介质, 光束在进入生物样本后会发生散射, 因此这种偏振性质较少用于生物组织成像。通过 ATUM 制备的生物样本切面平整, 厚度一般为几十纳米, 生物散射影响微弱, 可将其视为一层薄膜, 使得对其进行偏振成像成为可能。

基于此, 本文结合 OMLIT 和偏振光照明的优势, 提出了一种使用线偏振光倾斜照明多层薄膜结构以提升光学图像对比度的理论方法。该方法利用具有特定电场振荡方向的线偏光在不同介质表面的反射光的相干叠加, 提供比 OMLIT 更高的光学图像对比度。本文从理论仿真角度构建了采用偏振照明的多层薄膜干涉成像模型, 模拟偏振光与非偏振光对成像对比度的影响, 并对现象进行了解释。同时对不同金属镀层、照明角度和卷带的影响都进行了理论仿真和分析, 为最佳实验参数的选择提供理论指导。

2 理论与方法

定义入射平面为 y - z 平面, 其中 z 为深度方向, 如图 1 所示。任何平面波都可以由 TE 波 (横电波, 电矢量垂直于入射面, 也称为 s 偏振态 E_s) 和 TM 波 (横磁波, 磁矢量垂直于入射面, 也称为 p 偏振态 E_p) 组成^[20], 计算中假定所有介质层都是无源且非磁性的, 得到分层介质的特征矩阵 $M^{[21]}$ 表达式如下:

$$M(z) = \begin{bmatrix} \cos(k_0 n z \cos \theta) & -\frac{i}{q} \sin(k_0 n z \cos \theta) \\ -iq \sin(k_0 n z \cos \theta) & \cos(k_0 n z \cos \theta) \end{bmatrix}, \quad (1)$$

式中: $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda_0}$ 为波数, λ_0 为入射光波长, θ 表示入射

光线与 z 轴的夹角, $n = \sqrt{\varepsilon\mu}$ 为折射率, 取决于材料介质的介电常数 ε 和磁导率 μ , 其实部表示介质对光场的散射, 虚部表示介质对光场的吸收, q 为与偏振相关的物理量。TM 波和 TE 波在麦克斯韦方程中数学形式相同, 因此 TM 波的公式可以由 TE 波直接置换得出, 当为 TE 波时, $q = \sqrt{\frac{\varepsilon}{\mu}} \cos\theta$, 为 TM 波时, $q = \sqrt{\frac{\mu}{\varepsilon}} \cos\theta$ 。特征矩阵能够确定单色平面波在分层介质中的传播, 并且将特定平面的电矢量同 $z=0$ 时平面的电矢量相关联。

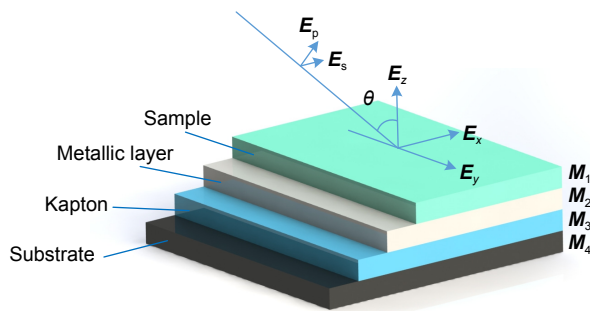


图 1 多层薄膜结构示意图

Fig. 1 Schematic of a multilayer thin film structure

当含有多个分层介质时, 多层薄膜的特征矩阵可以由单个介质的特征矩阵相乘得出, 即将多层介质等效为一个单层的介质, 即

$$\mathbf{M} = \mathbf{M}_1 \mathbf{M}_2 \mathbf{M}_3 \cdots \mathbf{M}_l = \begin{bmatrix} m_{11} & m_{12} \\ m_{21} & m_{22} \end{bmatrix}. \quad (2)$$

每一层的特征矩阵采用 \mathbf{M}_j 表示, 其中 j 表示层数, l 表示最后一层, m 为 4×4 矩阵中的对应元素。

由于电场和磁场在通过分层介质的边界时切向分量连续, 可以得到:

$$A + B = (m_{11} + m_{12}q_l)T, \quad (3)$$

$$q_1(A - B) = (m_{21} + m_{22}q_l)T, \quad (4)$$

其中: A 为入射波的电矢量振幅, B 为反射波的电矢量振幅, T 为折射波的电矢量振幅。 q_l 为多层介质中最后一层介质的 q 值, q_1 为第一层介质的 q 值。推导可得等效介质膜的反射系数 r 和反射率 R :

$$r = \frac{B}{A} = \frac{(m_{11} + m_{12}q_l)q_1 - (m_{21} + m_{22}q_l)}{(m_{11} + m_{12}q_l)q_1 + (m_{21} + m_{22}q_l)}, \quad (5)$$

$$R = |r|^2. \quad (6)$$

由于生物组织中不同部位处的折射率存在差异, 导致传输矩阵 \mathbf{M} 存在差异, 进而影响反射率 R , 不同折射率部位处的反射率不同, 成像对比度定义为细胞中两处不同部位反射率 R_1 和 R_2 差值比^[16]:

$$C_{\text{com}} = \frac{R_2 - R_1}{R_1}. \quad (7)$$

接着介绍多层薄膜结构模型, 如图 1 所示, 共分为四层。第一层为超薄生物样本切片; 第二层为金属纳米镀层, 在电子显微镜观察时能够传导样品表面的电子, 在激光照明时, 能够将光部分反射回样品, 增强图像对比度; 第三层为卷带层, 常使用 kapton 卷带, 用来自动收集超薄样本切片^[22], 其厚度为固定值 $50 \mu\text{m}$; 第四层为基底, 常采用导电胶带以释放电子显微镜观察时产生的电子, 厚度为固定值 $50 \mu\text{m}$ 。

生物组织折射率有很多种^[23], 为简化模型计算复杂度, 将模型简化为细胞两种不同部位的折射率, 分别为细胞内折射率 n_{pos1} 和重金属标记区域的折射率 n_{pos2} 。 n_{pos1} 由环氧树脂折射率^[24-25] 和小鼠脑细胞质折射率^[26] 共同决定, 为一个范围值, 本文取中间值 1.426 ^[16]。进行超薄切片时, 通常用重金属 Os 进行染色^[27-28], 这些重金属离子会吸附在蛋白质表面, 提高成像对比度。 n_{pos2} 由树脂^[24-25]、细胞质^[26]、细胞膜^[29]、重金属离子^[27-28] 的折射率共同决定, 同样为范围值, 本文取中间值 $2.183 + 0.9645i$ ^[16]。生物组织样品的折射率在可见光范围内基本不随波长变化^[30], 仿真时忽略这部分影响。金属层与卷带层的折射率随入射光波长改变而改变, 仿真时, 照明光波长设为 488 nm , 金属采用折射率如表 1 所列, 卷带折射率为 $1.8605 + 0.00084i$ ^[31]。

依据公式, 对比度差异源于细胞中不同部位介质折射率 n_{pos1} 与 n_{pos2} 不同而导致的反射率 R 不同。当样本为多层薄膜时, 多层薄膜都会产生反射光, 这些反射光相互干涉, 从而增强对比度。同时, 成像对比度与入射光波长 λ_0 、各镀层折射率 n 与厚度 z 、入射角度 θ 有关, 当前 OMLIT 使用白色 LED 光源垂直落射式照明, 没有对偏振分量 q 和入射角度 θ 进行优化。因此本文提出一种偏振照明的光学多层干涉模型, 并对上述关键数值进行模拟和仿真, 以提供更好的光学图像对比度。

3 数据仿真与分析

首先以 Fe 材料金属镀层为例进行仿真, 计算多层薄膜样本在 p 偏振光、非偏振光和 s 偏振光照明下的成像对比度, 仿真结果如图 2 所示。由于非偏振自然光中 p 偏振和 s 偏振的光功率相同^[21], 本文以相同光功率的 p 偏振光和 s 偏振光叠加模拟非偏振光

表 1 不同镀层金属下的最佳成像对比度
Table 1 Optimal imaging contrast under different coating metals

Metal	Refractive index at 488 nm ^[31]	Optimum incidence angle/°	Coating thickness/nm	Slice thickness/nm	Contrast using p-polarized light	Contrast using unpolarized light
Al	0.77+5.91i	64	130	68	153.5	3.5
Ag	0.05+3.02i	62	150	54	684.2	4.9
Au	1.13+1.84i	65	86	46	40.5	1.1
Co	1.86+3.51i	65	50	64	44.5	1.6
Cr	2.67+3.28i	65	36	68	28.7	1.2
Cu	1.23+2.54i	65	72	56	48.4	1.5
Fe	2.72+2.86i	65	36	68	22.81	1.0
Pt	0.53+4.28i	64	58	62	175.1	3.4
Ti	0.39+3.50i	63	78	58	226.4	3.7

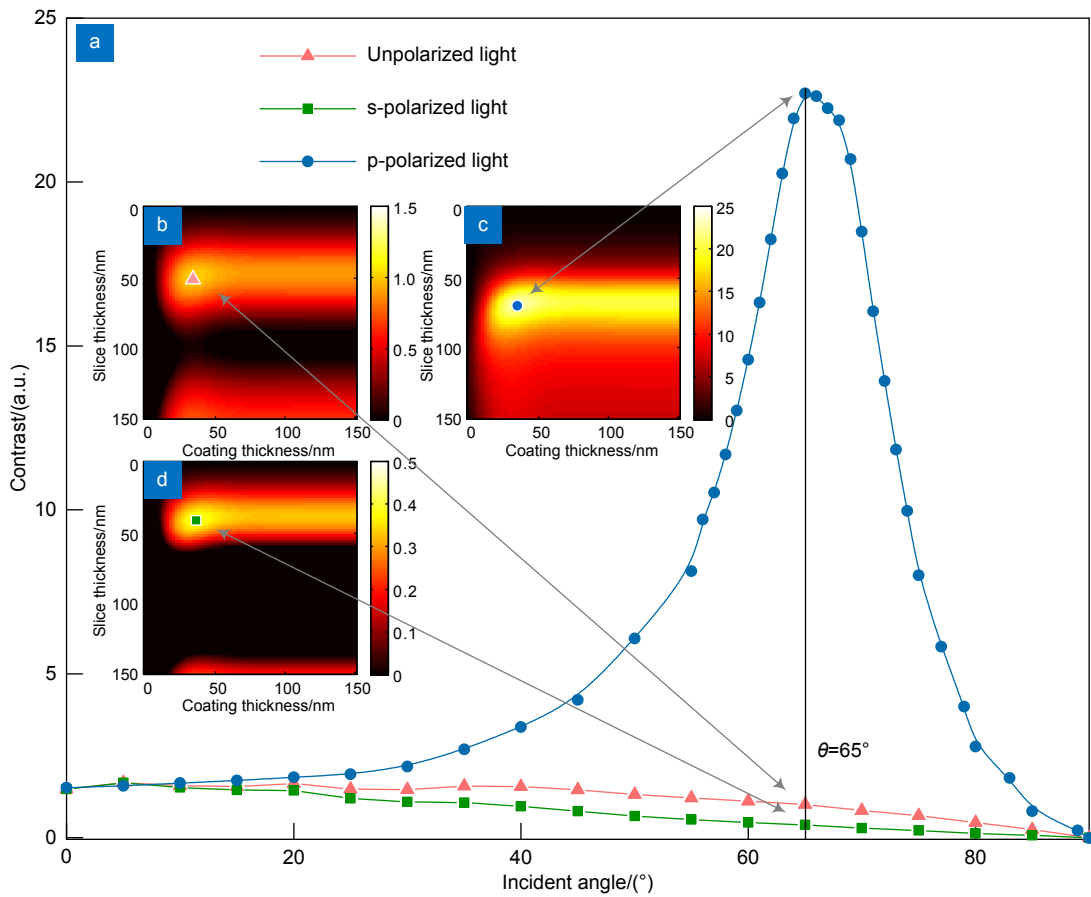


图 2 (a) Fe 金属镀层时不同偏振态及角度的影响; 65°入射角时 (b) 非偏振光照明, (c) p 偏振照明和 (d) s 偏振照明时的仿真图像

Fig. 2 (a) The effect of different polarization states; Simulation images for (b) unpolarized light, (c) p-polarized light and (d) s-polarized light at 65° incidence angle

照明。

图 2 中, 插图 (b)、(c) 和 (d) 分别是非偏振光、p 偏振光和 s 偏振光在入射光角度为 65° 时成像对比度随金属镀层厚度与样品切片厚度变化的仿真图像,

其最大值对应图 2(a) 中标注的位置, 此时生物样本厚度分别为 50 nm、68 nm 和 40 nm, 金属镀层厚度分别为 34 nm、36 nm 和 36 nm, 成像对比度分别为 1.01、22.81 和 0.39。接着对入射角度从 0° 到 90° 进行

仿真, 将各角度下最大值绘入图 2(a) 中, 得到非偏振光 (三角形线条)、p 偏振光 (圆形线条) 和 s 偏振光 (矩形线条) 照明时的最佳成像对比度曲线。横坐标为入射光角度, 纵坐标为金属镀层和生物切片厚度最优时的成像对比度, 为无量纲单位。当用 s 偏振光或非偏振光进行照明时, 最佳成像对比度会从 1.48 开始逐渐下降, 直至变成 0。当用 p 偏振光进行照明时, 最佳成像对比度会逐渐上升, 在 65° 时达到峰值, 为 22.81, 之后随照明角度增加逐渐降低至 0。当垂直入射时, p 偏振光与 s 偏振光的电场矢量振动方向都与样品平面平行, 因而成像对比度相同。随着照明入射角度逐渐增大, 电场矢量振动方向与样品平面产生夹角, 成像对比度产生差异。仿真结果表明, 使用 p 偏振光进行照明时, 能够大大增强图像对比度, 远大于单独使用 s 偏振照明或非偏振照明时的图像对比度。

这种现象可以通过 p 偏振光和 s 偏振光在不同角度照明下反射率与折射率不同来定性分析。仅考虑空气射向生物样品层时的光传播现象, 忽略各层薄膜厚度和反射光干涉的影响, 对结果进行解释。当使用 p 偏振光和 s 偏振光分别在相同角度照明时, 空气与生物样品层的交界处会拥有不同反射率, 记为 R_p 和 R_s 。同时, 生物切片被简化为细胞两个不同部位的折射率, 这两个部位反射率的解析解可使用菲涅尔方程表示^[32], 如图 3(a) 所示。p 偏振光照明两个部位时的反射率分别为 R_{ppos1} 与 R_{ppos2} , 用实心圆形和空心圆形线条表示; s 偏振光照明时的反射率分别为 R_{spos1} 与 R_{spos2} , 用实心矩形和空心矩形线条表示。当偏振光从低折射率介质进入高折射率介质时, p 偏振光的反射率会随着入射角度的增加先减少至最低值而后增加至 1, 反射率最低时对应的角度称为布儒斯特角 θ_B 。此角度下 p 偏振

光几乎全部折射进入下层样品, 而 s 偏振光一部分折射进入下层介质, 一部分反射。

由式 (7) 可知, $R_{ppos2}/R_{ppos1} - 1$ 取值越大, 则成像对比度越大。如图 3(b) 所示, 图中实心圆形为 p 偏振光照明时成像对比度, 实心矩形为 s 偏振光照明时成像对比度。使用 p 偏振光在空气与生物组织不同部位处的布儒斯特角附近角度照明时, 反射率的数值更低, R_{ppos2}/R_{ppos1} 的值更大。而 s 偏振光照明时的反射率 R_s 则随着入射角度的增加从起始数值逐渐增加至 1^[32], 没有出现与 p 偏振光相似的趋势, 因而根据式 (7) 计算出的成像对比度始终在下降。这是 p 偏振光比 s 偏振光照明成像对比度更高的原因。在接近 90° 入射时, 细胞两个不同部位的 R_p 和 R_s 趋于 1, 因而成像对比度接近 0。这里我们从菲涅尔方程角度对空气入射到生物表面时的情况进行了解释, 说明了 p 偏振光比 s 偏振光照明时对比度更强的原因, 并且一般在布儒斯特角附近。然而在实际的仿真过程中, 这样的反射现象在每层交界处都会产生, 此外还需要考虑各膜层厚度以及多层薄膜之间反射光相互干涉产生的影响, 因此定性分析的最佳成像对比度和最佳入射角度会与多层薄膜仿真存在差异。在偏振照明多层薄膜干涉成像计算中, 能够充分考虑到这些因素, 计算结果更准确。

为了探究不同金属镀层材料下的最佳入射角度、金属镀层厚度以及生物切片厚度与成像对比度的关系, 我们对不同材料的金属镀层做了仿真模拟, 发现其在 p 偏振照明的情况下均能获得更好的成像对比度, 仿真结果如图 4 所示, 其中横坐标为金属镀层厚度, 纵坐标为生物样本切片厚度。图中虚线交汇处为最大成像对比度, 其数值与图中轮廓线的峰值相同。横向轮廓线表明在横向虚线指示生物样本厚度下成像对比

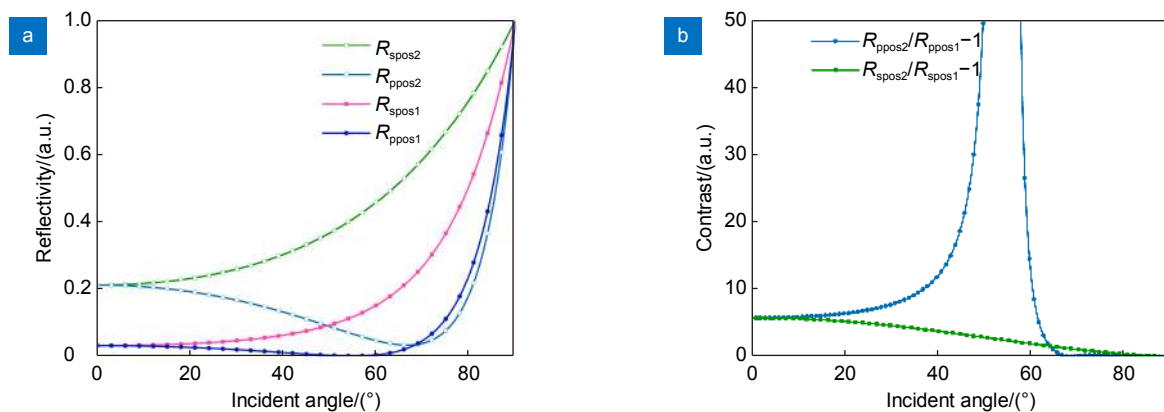


图 3 (a) R_p 和 R_s 的菲涅尔方程; (b) R_p 和 R_s 对比度与入射角关系

Fig. 3 (a) Fresnel function of R_p and R_s ; (b) Contrast of R_p and R_s as a function of incidence angle

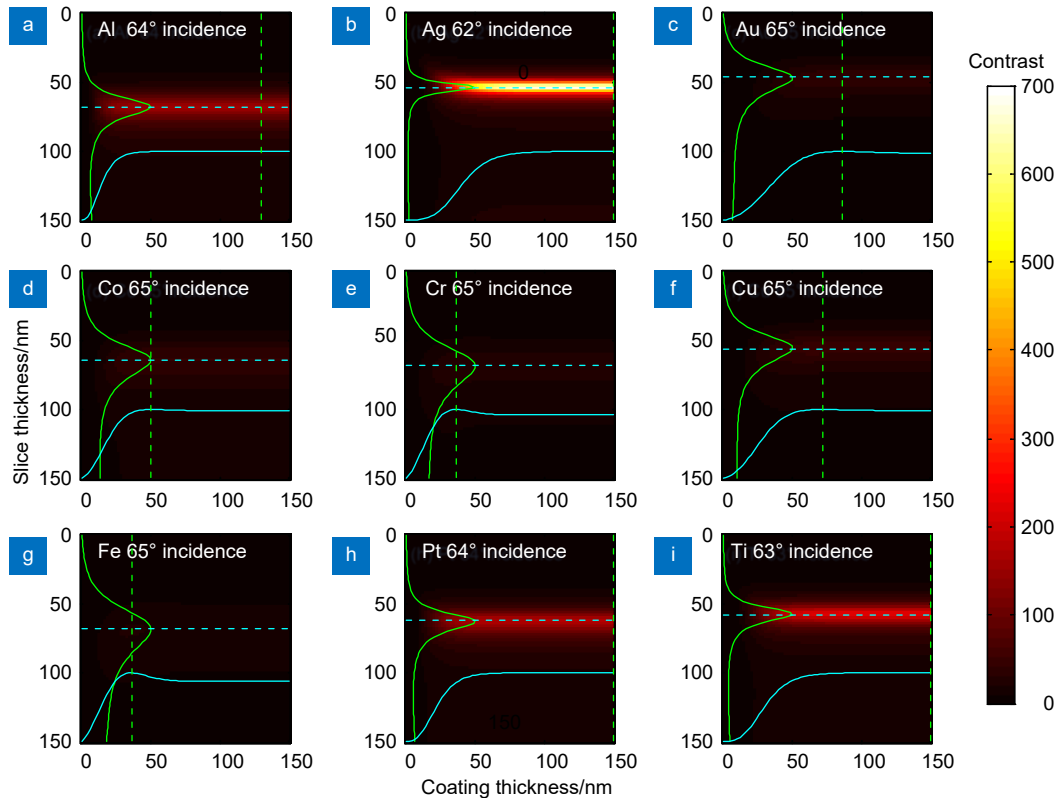


图 4 p 偏振照明时不同金属镀层影响。金属镀层为 (a) Al, (b) Ag, (c) Au, (d) Co,

(e) Cr, (f) Cu, (g) Fe, (h) Pt 和 (i) Ti 时最佳偏振入射角入射下的成像对比度

Fig. 4 Effect of different metal coatings with p-polarized lighting. Image contrast of metal coatings with (a) Al, (b) Ag, (c) Au, (d) Co, (e) Cr, (f) Cu, (g) Fe, (h) Pt and (i) Ti at the best polarization incidence angle

度随金属镀层厚度的变化趋势；纵向轮廓线表明在纵向虚线指示金属镀层厚度下成像对比度随生物样本切片厚度的变化趋势。

图 4 表明，在生物样品切片厚度不变的情况下，随着金属镀层厚度的增加，不同材质金属镀层对应的成像对比度变化虽有细微差别，但变化趋势相同，即成像对比度先上升，之后几乎保持恒定。这种现象和金属折射率的虚部有关，当金属镀层厚度超过一定数值后，光束在金属镀层中被完全损耗吸收，故成像对比度不再随着金属镀层厚度增加而发生变化。表 1 列举了不同材质金属镀层的最佳成像对比度及其对应的镀层厚度和生物切片厚度，即图 4 中两条虚线交叉点的横、纵坐标。最佳成像对比度同时依赖于生物样本切片厚度，针对不同材质的金属镀层，生物样本最佳切片厚度介于 45 nm 到 71 nm 之间。表 1 最后一栏为非偏振光照明时的最佳成像对比度，用以与 p 偏振光照明时的成像对比度做数值比较。需要注意其切片厚度和镀层厚度与 p 偏振光照明时的参数不完全相同。

随着照明入射角度从 0° 开始逐渐增大，所有金属

的最佳成像对比度变化趋势与图 2 趋势相同，即对比度随照明入射角度增大而增大，入射角度达到 65° 附近时达到峰值，之后随照明角度增大而减小，越接近 90°，成像对比度越低，最佳成像对比度始终在两种生物介质的布儒斯特角之间。根据表 1 可以发现，改变金属镀层的材质后，最佳成像对比度也会相应发生变化，所有金属镀层的最佳入射角度均在 65° 左右。不同的金属镀层之间，使用 p 偏振光照明均能取得比非偏振光更大的图像对比度，普遍能提升 20 倍以上，Ag 镀层高达 138 倍。这种对比度的差异源于金属镀层的复折射率 $n = n_0 + ki$ ，对模型中折射率进行模拟后发现，实部 n_0 越小，虚部 k 越大，最佳成像对比度越大。例如表 1 中，金属 Al、Ag、Pt 和 Ti，其折射率实部 n_0 均小于 1，其最佳成像对比度值均大于 150。这也为金属镀层的选择提供了理论指导意义。

上文探讨了金属镀层对成像对比度影响，我们对卷带与基底对成像对比度影响也做了模拟仿真，以 Fe 为例，结果如图 5 所示，图中实心矩形线条为带有卷带与基底的四层结构模型，空心矩形为只有生物

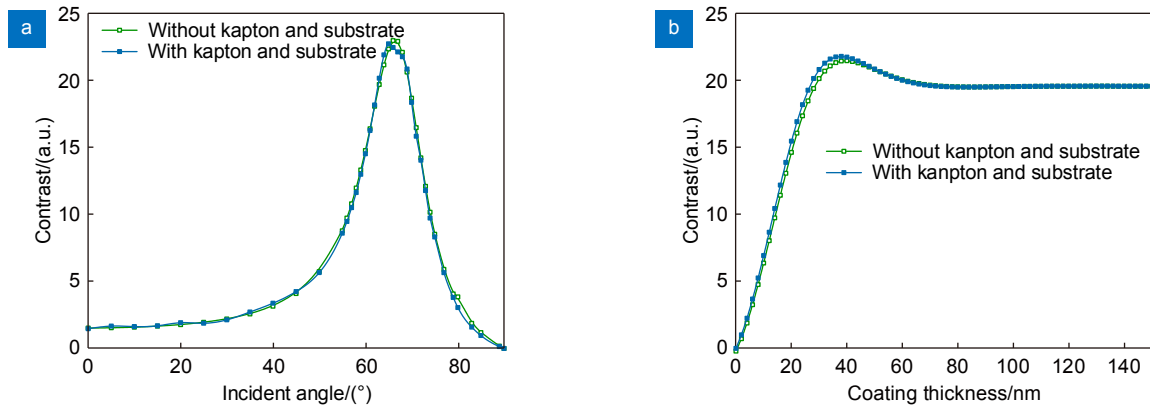


图 5 p 偏振照明时卷带与基底作用仿真。(a) 不同入射角时 Fe 最佳成像对比度; (b) 不同 Fe 镀层厚度时成像对比度

Fig. 5 Simulation of tape and substrate interaction in p-polarized lighting. (a) The optimal image contrast of Fe at different incidence angles; (b) Imaging contrast at different Fe coating thicknesses

样品与银镀层两层薄膜结构的模型。图 5(a) 为不同入射角度下的最佳成像对比度, 图中两条仿真曲线几乎重叠, 说明卷带与基底在偏振 OMLIT 模型中对成像对比度增强影响较小。图 5(b) 为 Fe 镀层不同厚度时 65° 入射角下的成像对比度, 此时生物样品厚度为 68 nm。可以发现, 当金属镀层厚度小于 50 nm 时, 光束依旧能穿过金属镀层, 这时卷带能够提供一部分反射光, 因而成像对比度略大于没有卷带和基底时的情况。而当镀层厚度大于 50 nm 后, 光束无法穿过金属镀层, 因而有无卷带与基底成像对比度都表现一致。

4 结 论

为进一步提升 CLEM 中光学成像对比度, 本文利用分层介质的特征矩阵建立了偏振照明多层薄膜干涉理论模型, 并进行了数值仿真。仿真结果表明, 使用 p 偏振激光照明多层薄膜样本时能够获得比非偏振光更大的图像对比度; 采用多种金属材料进行仿真模拟, 发现 p 偏振光的最佳入射角度都在 65° 附近, 这两种现象可以用菲涅尔方程和布儒斯特角定性解释。同时, 不同材质金属镀层的厚度在超过一定数值后成像对比度几乎保持不变, 这是由于绝大部分光在金属镀层中被损耗吸收。金属镀层折射率的实部越小, 虚部越大, 处于最佳入射角度和最佳生物样本厚度时, 成像对比度越大。卷带能够自动收集超薄切片, 基底用于传导电子, 这两层结构使得该技术更容易在光电关联成像中应用, 但对成像对比度影响较小。

本文在 OMLIT 与偏振照明的基础上, 提出了一种使用 p 偏振光倾斜照明生物样品-金属镀层-卷带-基底多层薄膜结构以提升成像对比度的方法, 能够将多

层薄膜干涉成像技术与偏振照明的优势结合起来。与 OMLIT 理论模型相比, 采用偏振激光倾斜照明的方式能获得更大的图像对比度, 但是采用激光进行宽场照明会不可避免地产生散斑, 影响成像质量, 因而需要借助其他技术消除散斑的影响, 例如通过多角度照明^[33] 或者图像重建算法^[34] 进行散斑消除。本方法为多层薄膜样本提供了一种新型的高对比度成像方式, 有助于增加光学照明成像下的生物信息含量, 从而更好地进行光学图像与电镜图像的配准。

参考文献

- [1] Dance A. Connectomes make the map[J]. *Nature*, 2015, **526**(7571): 147-149.
- [2] Brittin C A, Cook S J, Hall D H, et al. A multi-scale brain map derived from whole-brain volumetric reconstructions[J]. *Nature*, 2021, **591**(7848): 105-110.
- [3] De Boer P, Hoogenboom J P, Giepmans B N G. Correlated light and electron microscopy: ultrastructure lights up[J]. *Nat Methods*, 2015, **12**(6): 503-513.
- [4] Fu Z F, Peng D M, Zhang M S, et al. mEosEM withstands osmium staining and Epon embedding for super-resolution CLEM[J]. *Nat Methods*, 2020, **17**(1): 55-58.
- [5] Li A A, Gong H, Zhang B, et al. Micro-optical sectioning tomography to obtain a high-resolution atlas of the mouse brain[J]. *Science*, 2010, **330**(6009): 1404-1408.
- [6] Gong H, Zeng S Q, Yan C, et al. Continuously tracing brain-wide long-distance axonal projections in mice at a one-micron voxel resolution[J]. *NeuroImage*, 2013, **74**: 87-98.
- [7] Xu S, Zhu Q B, Huang M. Development of a handheld fluorescence imaging system for detecting food residues[J]. *Laser Technol*, 2022. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1125.tn.20221212.1219.001.html>.
徐帅, 朱启兵, 黄敏. 手持式食品残留物荧光成像检测系统开发[J]. *激光技术*, 2022. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1125.tn.20221212.1219.001.html>.
- [8] Giepmans B N G, Deerinck T J, Smarr B L, et al. Correlated light and electron microscopic imaging of multiple endogenous proteins using Quantum dots[J]. *Nat Methods*, 2005, **2**(10):

- 743–749.
- [9] Kukulski W, Schorb M, Welsch S, et al. Correlated fluorescence and 3D electron microscopy with high sensitivity and spatial precision[J]. *J Cell Biol*, 2011, **192**(1): 111–119.
- [10] Yao J J, Wang L D, Yang J M, et al. High-speed label-free functional photoacoustic microscopy of mouse brain in action[J]. *Nat Methods*, 2015, **12**(5): 407–410.
- [11] Li X F, Kang L, Zhang Y, et al. High-speed label-free ultraviolet photoacoustic microscopy for histology-like imaging of unprocessed biological tissues[J]. *Opt Lett*, 2020, **45**(19): 5401–5404.
- [12] Kut C, Chaichana K L, Xi J F, et al. Detection of human brain cancer infiltration ex vivo and in vivo using quantitative optical coherence tomography[J]. *Sci Trans Med*, 2015, **7**(292): 292ra100.
- [13] Li Y Y, Fan J Y, Jiang T L, et al. Review of the development of optical coherence tomography imaging navigation technology in ophthalmic surgery[J]. *Opto-Electron Eng*, 2023, **50**(1): 220027.
李云耀, 樊金宇, 蒋天亮, 等. 光学相干层析技术在眼科手术导航方面的研究进展[J]. *光电工程*, 2023, **50**(1): 220027.
- [14] Jiang P Q, Wang P H. Research on dispersion compensation technology for SD-OCT system[J]. *Opto-Electron Eng*, 2021, **48**(10): 210184.
姜盼秋, 汪平河. 谱域光学相干层析系统的色散补偿技术研究[J]. *光电工程*, 2021, **48**(10): 210184.
- [15] Schalek R, Kasthuri N, Hayworth K, et al. Development of high-throughput, high-resolution 3D reconstruction of large-volume biological tissue using automated tape collection ultramicrotomy and scanning electron microscopy[J]. *Microsc Microanal*, 2011, **17**(S2): 966–967.
- [16] Fan H, Luo D S, Zhu J L, et al. Optical multilayer interference tomography compatible with tape-based serial SEM for mesoscale neuroanatomy[J]. *ACS Photonics*, 2021, **9**(1): 25–33.
- [17] Sato S, Ando S. Interferometric imaging ellipsometry: fundamental study[J]. *Proc SPIE*, 2009, **7405**: 74050F.
- [18] Stine K J. Brewster angle microscopy[M]//Steed J W, Gale P A. *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2012.
- [19] Ivanova S, Tonchev V, Yokoi N, et al. Surface properties of squalene/meibum films and NMR confirmation of squalene in tears[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, **16**(9): 21813–21831.
- [20] Pascoe K J. Reflectivity and transmissivity through layered, lossy media: a user-friendly approach[R]. 2001.
- [21] Born M, Wolf E. *Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light*[M]. 6th ed. New York: Pergamon Press, 1980.
- [22] Hayworth K J, Morgan J L, Schalek R, et al. Imaging ATUM ultrathin section libraries with WaferMapper: a multi-scale approach to EM reconstruction of neural circuits[J]. *Front Neural Circuits*, 2014, **8**: 68.
- [23] Khan R, Gul B, Khan S, et al. Refractive index of biological tissues: Review, measurement techniques, and applications [J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2021, **33**: 102192.
- [24] Nogi M, Handa K, Nakagaito A N, et al. Optically transparent bionanofiber composites with low sensitivity to refractive index of the polymer matrix[J]. *Appl Phys Lett*, 2005, **87**(24): 243110.
- [25] Lü C L, Cui Z C, Wang Y X, et al. Studies on syntheses and properties of episulfide - type optical resins with high refractive index[J]. *J Appl Polym Sci*, 2003, **89**(9): 2426–2430.
- [26] Binding J, Arous J B, Léger J F, et al. Brain refractive index measured *in vivo* with high-NA defocus-corrected full-field OCT and consequences for two-photon microscopy[J]. *Opt Express*, 2011, **19**(6): 4833–4847.
- [27] Sousa A A, Hohmann-Marriott M, Aronova M A, et al. Determination of quantitative distributions of heavy-metal stain in biological specimens by annular dark-field STEM[J]. *J Struct Biol*, 2008, **162**(1): 14–28.
- [28] Hua Y F, Laserstein P, Helmstaedter M. Large-volume *en-bloc* staining for electron microscopy-based connectomics[J]. *Nat Commun*, 2015, **6**(1): 7923.
- [29] Beuthan J, Minet O, Helfmann J, et al. The spatial variation of the refractive index in biological cells[J]. *Phys Med Biol*, 1996, **41**(3): 369–382.
- [30] Deng Z C, Wang J, Ye Q, et al. Determination of continuous complex refractive index dispersion of biotissue based on internal reflection[J]. *J Biomed Opt*, 2016, **21**(1): 015003.
- [31] RefractiveIndex. INFO[EB/OL]. <https://refractiveindex.info/>.
- [32] Manion M. *Encyclopedia of Optical Engineering*[M]. Chicago: American Library Association, 2004.
- [33] Kuang C F, Ma Y, Zhou R J, et al. Digital micromirror device-based laser-illumination Fourier ptychographic microscopy[J]. *Opt Express*, 2015, **23**(21): 26999–27010.
- [34] Goodman J W. *Speckle Phenomena in Optics: Theory and Applications*[M]. Englewood: Roberts & Company, 2007.

作者简介



张子建(1997-), 男, 硕士。研究方向: 偏振照明成像。

E-mail: zhangzj.stu@sibet.ac.cn



【通信作者】史国华(1981-), 男, 博士, 研究员。研究方向: 光学成像。

E-mail: ghshi_lab@sibet.ac.cn



【通信作者】叶虹(1987-), 女, 博士, 助理研究员。研究方向: 光学成像。

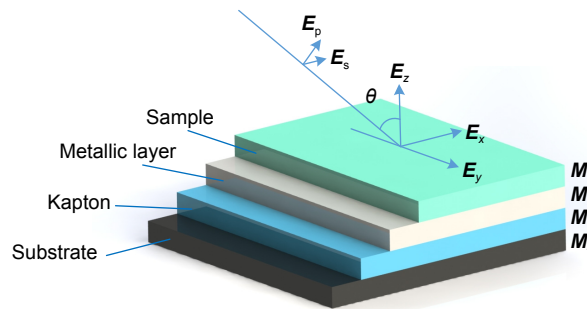
E-mail: hongye@sibet.ac.cn



扫描二维码, 获取PDF全文

Effect of polarized laser illumination on imaging contrast of multilayer thin film structure

Zhang Zijian^{1,2}, Wang Tianyi^{1,2}, Xu Xin^{1,2}, Wang Jixiang^{1,2}, Zhang Xin²,
Zhang Ruobing², Shi Guohua^{2*}, Ye Hong^{2*}



Schematic of multilayer thin film structure

Overview: Optical multilayer interference tomography (OMLIT) is an optical image technique that has an ultrathin sample film affixed on a multilayer structure to enhance the image contrast through light interference. This method is used in correlated light and electron microscopy to first image a large field through an optical microscope providing the navigation of the region of interest for later nanometer-resolution electron microscope imaging. Polarization imaging is widely used in biology to improve system resolution. In order to further improve the imaging contrast and positioning accuracy, a theoretical model of multilayer film polarization imaging is proposed by combining polarization illumination and OMLIT.

At first, taking the metal coating of Fe material as an example, the matrix formalism theoretical model is used to calculate the imaging contrast of multilayer film samples under the illumination of polarized light in two orthogonal directions and unpolarized light. The simulation results show that using the polarized light with an electric field oscillating parallel to the incidence plane (p-polarization) exhibits a much higher imaging contrast than the unpolarized light. This phenomenon can be qualitatively explained by the Fresnel function, which describes the difference in reflectivity and refractivity of two orthogonally polarized lights illumination under different angles. The matrix formalism theoretical model can accurately calculate the effects of the thickness of each film layer and the interference of reflected light between multilayer films. Subsequently, the model is used to simulate nine different metal coatings. The results show that, with the slices of biological samples being unchanged, the imaging contrast increases initially and then remains stable. This phenomenon is related to the imaginary part of the metal refractive index. After the thickness of the metal exceeds 50 nm, the light beam is completely absorbed within the metal coating, hence increasing the thickness no longer causes a change in imaging contrast. Among the nine types of coatings, the Ag coating provided the best imaging contrast. With an incidence angle of 62°, the imaging contrast is vastly enhanced by 138 times. Finally, the effects of tape and substrate are simulated, and the results showed that the imaging contrast in the multilayer films remained unchanged regardless of whether tape and substrate are present or not when the metal coating material is Fe. This indicates that the enhancement effect of tape and substrate on the imaging contrast in the polarized OMLIT model is relatively small.

The presented model provides a theoretical basis for polarization illumination OMLIT, pathing a new technical way for the development of the correlated light and electron microscopy technique.

Zhang Z J, Wang T Y, Xu X, et al. Effect of polarized laser illumination on imaging contrast of multilayer thin film structure[J]. *Opto-Electron Eng*, 2023, 50(7): 230089; DOI: 10.12086/oe.2023.230089

Foundation item: Project supported by Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences Fund (XDB32030205), and Leading Talents of Innovation and Entrepreneurship Program in Suzhou (ZXL2022476)

¹Department of Biomedical Engineering, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China; ²Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China

* E-mail: ghshi_lab@sibet.ac.cn; hongye@sibet.ac.cn