

文章编号: 1005-5630(2013)01-0044-04

浅谈共聚焦显微技术*

陈木旺

(麦克奥迪实业集团有限公司, 福建 厦门 361006)

摘要: 共聚焦显微镜以其高对比度、高分辨率及可重建三维图像的独特优势, 在生物医学研究、微细加工、半导体和高分子材料的生产检测等领域获得广泛应用。常用的共聚焦技术方法有: 传统的激光扫描共聚焦显微镜(LSCM), 其特点是获得的图像对比度和分辨率高, 但需要逐点扫描, 帧成像时间长, 系统复杂, 体积大, 价格昂贵; 碟片共聚焦显微镜(SDCM)是采用多光束扫描的方法来获得共聚焦图像, 速度可以大大提高, 但牺牲了共聚焦图像的分辨率, 系统更为复杂, 且不能调整轴向分辨率; 结构光显微镜(SIM)具有方法简单, 可模块化设计, 成本低, 成像质量接近于激光扫描共聚焦显微镜, 成像速度快, 性价比较高。

关键词: 显微; 共聚焦显微技术; 激光扫描共聚焦; 碟片共聚焦; 结构光

中图分类号: TH 742 **文献标识码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.1005-5630.2013.01.009

A brief discussion on confocal microscopy techniques

CHEN Murwang

(Motic China Group Co., Ltd., Xiamen 361006, China)

Abstract: Confocal microscopy boasts such advantages as high contrast, high resolution and easy to 3D reconstruction. Therefore, the device has been widely applied in the manufacture and detection of biology and medical research, micro-machining, semiconductor and macromolecule. There are several kinds of confocal microscopy, including laser scanning confocal microscopy (LSCM), spinning-disk confocal microscopy (SDCM) and structured illumination microscopy (SIM). LSCM has such advantages as high contrast and resolution, but it is complicated, bulky, expensive and slow in imaging. SDCM can get the confocal image fast based on the lower resolution and more complicated technique. Though SIM is the simplest and cheapest confocal microscopy, it can offer high quality image with fast speed.

Key words: microscopy; confocal microscopy; laser scanning; spinning-disk; structured illumination

引言

普通的显微镜在获得聚焦处信息的同时也获得离焦处的信息, 该离焦信息会影响观察到的图像, 其效果犹如在聚焦处铺上了一层“薄纱”, 大大降低了图像的对比度。所谓的共聚焦显微镜, 可以尽量多地抑制聚焦处之外的杂散光, 以保证获得的图像仅仅来自样品聚焦处的信息, 即像面和观察面是完全“共轭”的, 去除了“薄纱”的影响, 对比度更高, 且可分层获得样品的信息, 也就是光学共聚焦图像, 获得样品

* 收稿日期: 2012-05-30

作者简介: 陈木旺(1979-), 男, 福建漳州人, 高级工程师, 博士, 主要从事光电仪器方面的研究。

多幅连续的共聚焦图像,即在不破坏样品的情况下可用这些二维共聚焦图像重建出样品的三维图像,非常适合于活体观察,并已成为生物医学、材料科学和半导体等领域的重要研究工具。目前除了传统的激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopy, LSCM)之外,还有碟片共聚焦显微镜(spinning-disk confocal microscopy, SDCM)和结构光显微镜(structured illumination microscopy, SIM)。

1 激光扫描共聚焦技术原理及其特点^[1]

激光扫描共聚焦显微镜,是在普通显微镜的基础上增加了“共聚焦技术”和“激光扫描技术”。共聚焦技术,就是在共聚焦显微镜的光路中设置了两个共聚焦针孔,即照明针孔和探测器针孔,并与样品上的聚焦点共轭。具体原理如图1所示,激光光源发出的激光束,通过照明针孔后成为点光源,经物镜成像在样品上为一个聚焦点,从聚焦点发出(或反射)的光反方向经物镜成像在探测器针孔处,也就是说,放置在探测器针孔后面的探测器只能接收来自聚焦点的光,减少了非聚焦处杂散光的干扰,从而提高获得图像的对比度。这就是一个点物体的共聚焦成像原理,需要配合对样品的逐点扫描才能实现样品的二维共聚焦成像。一般采用激光扫描技术实现对样品的二维扫描成像,即在光路中安装两个检流镜,其转动角度可控制,分别用于控制光束对样品进行X和Y方向的逐点扫描成像,以获得样品某个深度的共聚焦图像,改变载物台的轴向(Z方向)位置,并获得一系列样品不同深度的共聚焦图像,即可在不破坏样品的情况下对样品进行三维重建,实现样品的三维观察。

LSCM的横向分辨率接近于普通显微镜的2倍,轴向分辨率可达到几百纳米。虽然如此,但由于存在共聚焦针孔,抑制了绝大部分的杂散光,使得探测器接收到信号很微弱,需要高灵敏度的光电倍增管PMT作为探测器,但其量子效率低,获得的图像信噪比低;另外,由于采用逐点扫描成像,成像时间长,结构也比较复杂,还需要高成本的激光作为光源。

2 碟片共聚焦技术原理及其特点^[2]

LSCM是基于单光束扫描成像,效率低,成像速度过慢,不利于活体的观察。碟片共聚焦显微镜是基于多光束扫描的方法,速度大大地提高,可以实时成像。其具体原理如图2所示,在样品聚焦平面的共轭面上放置一个可以旋转的碟片,碟片上开有很多针孔阵列,光源发出的光经过这些针孔后形成许多点光源,经过物镜成像在样品的聚焦平面上,从样品聚焦点发出(或反射)的光反方向经过物镜成像后又聚焦到原来的针孔上(即碟片上的针孔同时充当照明针孔和探测器针孔),通过45°分光镜后成像在面阵探测器上,这样可以同时多个点成像,再配合碟片的高速旋转,可以实现快速的二维成像。用碟片上的微透镜阵列提高照明效率,以进一步提高成像速度^[2]。

相对于LSCM,由于多点成像,探测器的积分时间可以比较长,且采用面阵图像传感器如CCD,其量子效率比较高,获得的图像信噪比也会比较高,不需要激光作为光源;多点成像也带来些不足,一是杂散光会通过邻近的针孔进入面阵探测

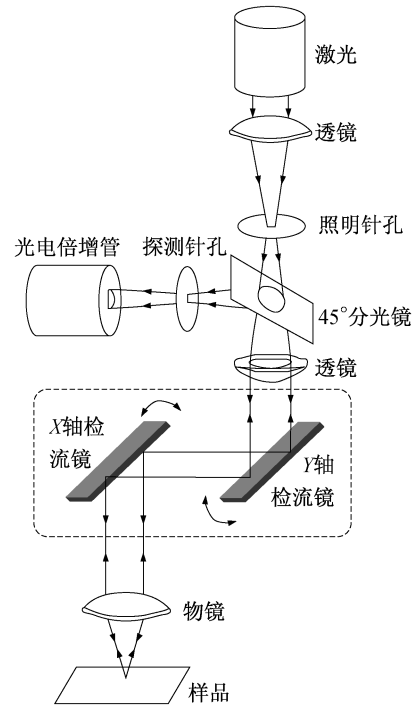


图1 LSCM的原理

Fig. 1 Principle of LSCM

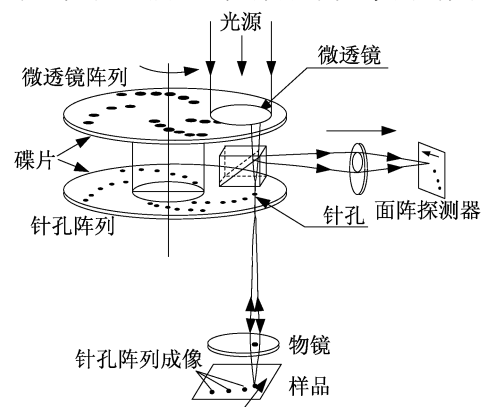


图2 SDCM的原理

Fig. 2 Principle of SDCM

器,降低图像的对比度,影响分辨率;二是碟片的针孔大小是固定的,不像 LSCM 的探测器针孔是可以调节的,也就不能改变分辨率;三是系统更复杂、昂贵。

3 结构光显微技术原理及其特点

结构光显微镜 SIM 是将结构光测量方法应用到共聚焦测量中的一种显微镜。它是在落射显微镜基础上增加照明调制功能,即在照明光路中插入一个空间光调制器(如光栅),见图 3 所示,照明受到光栅调制后经物镜投影在样品上,在样品的聚焦平面上将受到调制照明的照射,而在远离聚焦平面处则不被调制,受调制的聚焦平面信息和不受调制的非聚焦平面信息将同时进入成像探测器,改变照明的调制相位并成像,获得一组不同调制相位的图像,如图 4(a)所示,采用相移算法可以算出聚焦层的图像即共聚焦图像^[3-4],如图 4(b)所示。

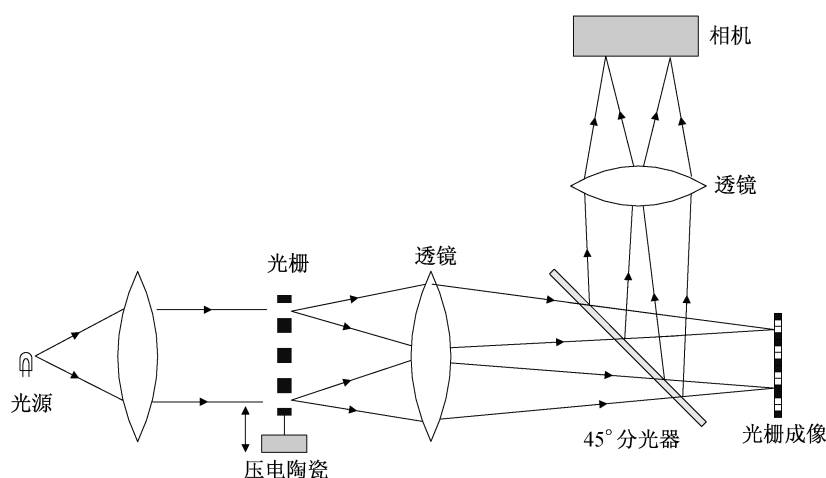
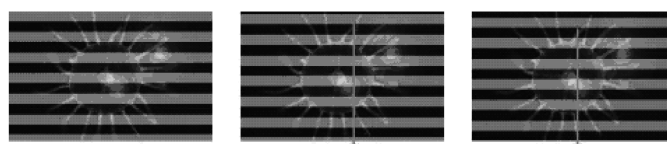
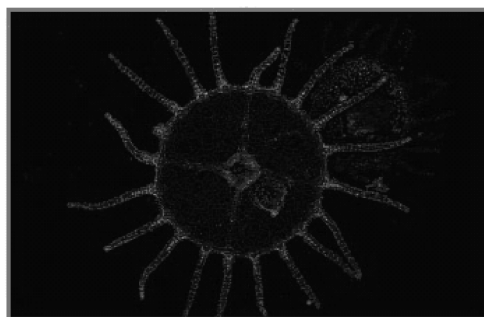


图 3 SIM 的光路图

Fig. 3 Optical layout of SIM



(a) 调制图像
(a) Modulated images



(b) 共聚焦图像
(b) Confocal image

图 4 SIM 的原理

Fig. 4 Principle of SIM

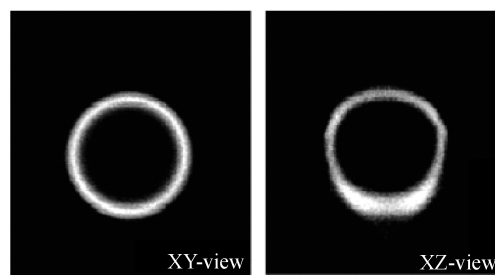
该方法只需获得3帧调制图像即可重建出一幅共聚焦图像,且采用的是面阵相机,速度可以大大地提高。实现也简单:硬件上只需增加照明调制及相移功能,可以采用空间光调制器如数字微镜阵列(DMD)来实现^[5],再配合软件上简单的相移算法,即可在普通的落射显微镜上获得共聚焦图像。Maryland大学的Adam Puche博士对该技术与LSCM的性能进行了比较测试,见图4所示,表明SIM获得的图像质量接近于LSCM^[4];且该技术也不需要采用激光作为光源,成本低,也被称为“穷人的共聚焦显微镜”。

4 结论

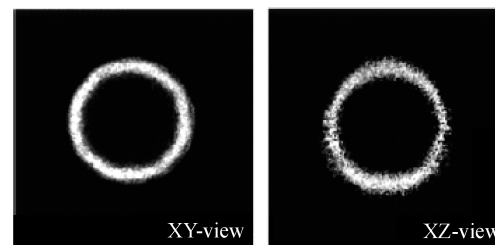
从上述的三种共聚焦显微镜的原理及其技术特点来看,LSCM虽然具有分辨率最高,且轴向分辨率可调整的优点,但是其成像速度慢、信噪比也不高、系统复杂且昂贵,在一定程度上限制了其应用,特别是不能用于活体观察;SDCM的成像速度快,可以实时成像,但其分辨率有所降低,轴向分辨率不可调,系统复杂,价格昂贵;而SIM具有实现简单,成本低廉,且成像质量接近于LSCM,速度较LSCM快,性价比较高。

参考文献:

- [1] PAWLEY J B. Handbook of biological confocal microscopy[M]. Madison: University of Wisconsin, 2006: 207—219, 221—237.
- [2] WANG E, BABBEY C M, DUNN K W. Performance comparison between the high-speed Yokogawa spinning disc confocal system and single-point scanning confocal systems[J]. *J Microscopy*, 2005, 218(2): 148—159.
- [3] QIOPTIQ. OptiGrid structured-illumination microscopy[EB/OL]. [2012-06-18]. http://www.aic-imagecentral.com/products/pdfs/OptiGrid_Brochure.pdf.
- [4] PUCHE A. Independent resolution test of OptiGrid structured light imaging system[EB/OL]. [2012-06-18]. <http://www.qioptiq.com/download/OptiGrid%20Resolution%20Comp.pdf>.
- [5] 官志超, 张运波, 侯文玫. 基于数字微镜的共焦显微系统的光路设计[J]. *光学仪器*, 2011, 33(3): 53—61.



(a) 在SIM上获得的6 μm荧光珠切层图像
(a) Optical section image of a 6 μm microsphere by SIM



(b) 在LSCM上获得的6 μm荧光珠切层图像
(b) Optical section image of a 6 μm microsphere by LSCM

图4 SIM和LSCM获得切层图像比较
Fig. 4 Comparison of optical section image between SIM and LSCM