

文章编号 1004-924X(2014)01-0031-08

入射激光对激光扫描共聚焦显微镜分辨率的影响

肖 昀^{1,2,3*}, 张运海³, 王 真^{3,4}, 黎发志³

(1. 中国科学院 长春光学精密机械与物理研究所, 吉林 长春 130033; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国科学院 苏州生物医学工程技术研究所, 江苏 苏州 215163;
4. 北京交通大学 理学院, 北京 100044)

摘要:利用点扩散函数(PSF)研究了入射激光的偏振态和光束的束腰直径对激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)分辨率的影响。根据 Wolf 和 Richards 的矢量衍射积分,建立了 LSCM N-1 层界面下的照明 PSF 模型,对零层和两层界面下的 PSF 进行了计算分析。结果显示:在零层界面下,圆偏振光入射的 PSF 在 xy 平面内关于焦点旋转对称,半峰全宽为 $0.43 \mu\text{m}$, x 向线偏振光入射时 PSF 在 x,y 方向的半峰全宽分别为 $0.48, 0.39 \mu\text{m}$;在圆偏振光入射的 PSF 中,高斯光束充溢系数为 $0, 1, 2, 5$ 对应的半峰全宽分别为 $0.43, 0.47, 0.62, 1.49 \mu\text{m}$ 。在两层界面下,当探测深度为 $50 \mu\text{m}$ 时,圆偏振光 PSF 的半峰全宽为 $0.26 \mu\text{m}$, x 向线偏振光入射时 PSF 在 x,y 方向的半峰全宽分别为 $0.28, 0.24 \mu\text{m}$;在圆偏振光入射的 PSF 中,充溢系数为 $0, 1, 2, 5$ 对应的半峰全宽分别为 $0.26, 0.28, 0.32, 0.68 \mu\text{m}$ 。以上计算结果表明,和线偏振光相比,圆偏振光在一个方向的分辨率优于线偏振光,在相垂直的另一个方向的分辨率弱于线偏振光,圆偏振光 PSF 在 xy 平面内关于焦点旋转对称,得到了较好的成像质量;物镜入瞳直径与激光束腰直径比值越小,LSCM 的分辨率越好。

关键词:激光共聚焦显微镜;矢量衍射积分;点扩散函数;分辨率;偏振态

中图分类号:TH742.9 **文献标识码:**A **doi:**10.3788/OPE.20142201.0031

Effect of incident laser on resolution of LSCM

XIAO Yun^{1,2,3*}, ZHANG Yun-hai³, WANG Zhen^{3,4}, LI Fa-zhi³

(1. *Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130033, China*; 2. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*;
3. *Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China*; 4. *School of Science, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China*)
* *Corresponding author, E-mail: xiaoyunanzhen@163.com*

Abstract: The effect of the polarization and intensity profile of an incident laser on the resolution of a Laser Scanning Confocal Microscope (LSCM) was investigated. According to the vectorial diffraction integral of Wolf and Richards, a model of the illumination Point Spread Function (PSF) of LSCM with N-1 interfaces was established to calculate and analyze the PSFs on the zero interface and two interfaces. The analysis shows that for the zero interface, the local Full Width at Half Maximum (FWHM) of the PSF with circular polarization is $0.43 \mu\text{m}$, which is rotationally symmetric in the xy

收稿日期:2012-11-22;修订日期:2013-01-17.

基金项目:中科院苏州生物医学工程技术研究所“一三五”规划重大突破项目(No. Y052031205);苏州市应用基础研究计划资助项目(No. SYG201128)

plane, and the FWHMs along x axis and y axis of the PSF with linear polarization are 0.48, 0.39 μm , respectively in the x axis. As the filling parameters of a Gaussian light are 0, 1, 2, 5, the FWHMs of the PSF with circular polarization are 0.43, 0.47, 0.62 μm and 1.49 μm , respectively. For two interfaces, when the probe depth is 50 μm , the FWHM of the PSF with circular polarization is 0.26 μm , and the FWHMs along x axis and y axis of the PSF with linear polarization are 0.28, 0.24 μm , respectively in x axis; for the filling parameters of 0, 1, 2, 5, and the probe depth of 50 μm , the FWHMs of the PSF with circular polarization are 0.26, 0.28, 0.32 and 0.68 μm , respectively. Calculations mentioned above show that the resolution of the circularly polarized light is better than that of the linearly polarized light in one direction, but it is worse than that of the linearly polarized light in the perpendicular direction. The PSF with the circularly polarized light is rotationally symmetric in the xy plane, therefore, a better image can be obtained. The smaller the filling parameter is, the better the resolution of LSCM is.

Key words: Laser Scanning Confocal Microscopy(LSCM); vectorial diffraction integral; Point Spread Function(PSF); resolution; polarization state

1 引言

激光扫描共聚焦显微镜(Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM)是研究微细结构的有效技术手段和必备的大型科研仪器,在生物和工业检测领域有着广泛的应用^[1-3]。系统采用精密针孔滤波技术,使得只有处于焦平面位置上的组织信息才能够被探测,从而最大限度地抑制了非聚焦平面的杂散光,具有很高的成像分辨率和信噪比。此外,系统沿 z 轴方向可以对组织各个层面进行无损光学扫描成像,进而实现对较厚样本的三维成像。

LSCM 采用激光作为照明光源,在被观测的组织样本处形成一个很小的照明光点,形成照明点扩散函数(Point Spread Function, PSF)。组织中的荧光物质受激发后产生荧光经成像系统后在共焦针孔处聚焦,经针孔空间滤波后被探测器件如光电倍增管(Photo Multiplier Tube, PMT)收集。然后控制系统对数据进行图像重建,得到二维或三维共聚焦图像。反映系统成像分辨率的综合 PSF 由照明 PSF 和成像探测 PSF 的乘积决定。其中,照明 PSF 的分布情况将影响系统的最终成像分辨率,其分布受到多种因素的影响,如照明激光的偏振态^[4-5]、高斯光束的束腰直径、物镜的数值孔径和像差等。其中,激光的偏振态和光束的束腰直径可以在构建共聚焦成像系统时进行

调整,以达到系统最佳的分辨率和信噪比。

1959 年, Wolf 和 Richards^[6] 根据平面波角谱理论和矢量理论给出了光学系统的矢量衍射积分表达式。1995 年, P. Török 等^[7-9] 推导出了一层界面下光学系统矢量衍射积分表达式,并分析了 PSF 随着数值孔径(Numerical Aperture, NA)、探测深度 d 变化的离焦现象。1997 年, P. Török 和 P. Varga^[10] 给出了 $N-1$ 层界面通用的矢量衍射积分表达式,但没有给出入射光偏振态和光能分布的影响。本文利用矢量衍射积分表达式,给出了照明光路中含偏振态和光束的束腰直径的 $N-1$ 层界面的积分表达式。其中,光束的束腰直径对应了光能在光瞳中的分布情况;计算分析 LSCM 零层和两层界面,得到了不同条件下的照明 PSF。通过比较各种照明 PSF,得到了照明光路中分辨率与入射光偏振态、光束束腰直径的关系。

2 照明 PSF 表达式

图 1 是一个关于 z 轴旋转对称的光学系统,无限远点光源发出偏振光经过物镜后聚焦于物镜焦点。此时的像方只有一种介质,焦点即为高斯焦点。以高斯焦点为原点,光轴为 z 轴建立 $O-xyz$ 坐标系, P 点为观察点。物镜入瞳直径和物镜到点 P 的距离远大于入射光波长。图 2 为光进入 N 种介质聚焦,和图 1 一样建立 $O-xyz$ 坐标

系。介质 $n_1 \sim n_N$ 的界面位置分别为 $-h_1 \dots -h_{N-1}$ 。本文把最后一层界面到原点的距离叫做探测深度 d 。

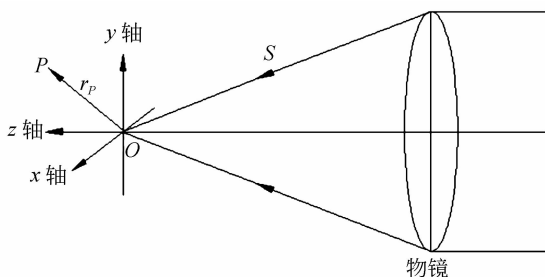


图 1 光经过物镜进入一种介质会聚

Fig. 1 Light focused by lens through single medium

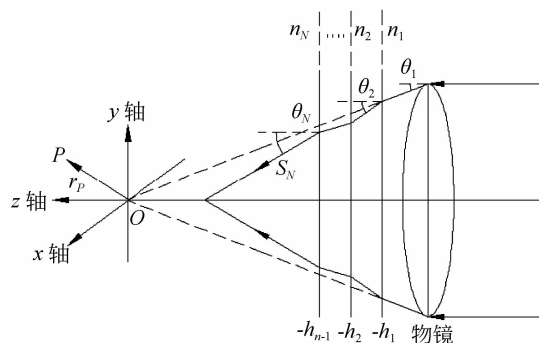


图 2 光经过物镜进入 N 种介质会聚

Fig. 2 Light focused by lens through N mediums

r_p 为点 P 的位置向量,在 $O-xyz$ 坐标系中点 P 的位置坐标为 (x_p, y_p, z_p) ;也可以转换为球坐标 (r, θ, φ) ,其中 $r > 0, 0 \leq \theta < \pi, 0 \leq \varphi < 2\pi$, θ 表示顶角, φ 表示方位角,则点 P 在球坐标系中的坐标为 (r_p, φ_p, z_p) 。介质 N 中的光线单位向量和位置向量可表示为:

$$\begin{aligned} s_N &= \sin \theta_N \cos \varphi_i + \sin \theta_N \sin \varphi_j + \cos \theta_N k, \\ r_p &= r_p (\sin \theta_p \cos \varphi_p i + \sin \theta_p \sin \varphi_p j + \cos \theta_p k), \end{aligned} \quad (1)$$

其中: i, j, k 为坐标系 (x, y, z) 的基向量。用 e 表示电场向量, ϵ 表示电场强度向量,用加粗的大写字母表示 3×3 张量矩阵。那么穿过 $N-1$ 层界面的会聚光焦点附近点 P 处的电场为:

$$\begin{aligned} e_{ill}(r_p, \varphi_p, z_p) &= -\frac{ik_1}{2\pi} \int_0^{\alpha} \int_0^{2\pi} \epsilon_N \exp(ik_0 \psi_i) \times \\ &\exp[ik_1 r_p \sin \theta_1 \cos(\varphi - \varphi_p) \sin \theta_p] \times \\ &\exp(ik_N z_p \cos \theta_N) \sin \theta_1 d\varphi d\theta_1. \end{aligned} \quad (2)$$

其中: $k_i = \frac{2\pi n_i}{\lambda_{ill}}$ 为介质 i 中的波数, k_0 为真空中的波数, n_i 为介质 i 的折射率, λ_{ill} 为入射光波长, α 是物镜的半孔径角,由 NA 和折射率 n_1 决定, θ_i 是介质 i 中的顶角, φ 是方位角。 ψ_i 为初始像差函数,其表达式为: $\psi_i = h_{N-1} n_N \cos \theta_N - h_1 n_1 \cos \theta_1$ 。

为了计算介质 N 中的 ϵ_N ,假定入射激光的偏振态为 $C = B\epsilon_0$,其中:

$$B = \begin{bmatrix} a & b & 0 \\ b & a & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}, \quad \epsilon_0 = (1, 0, 0).$$

矩阵 B 为改变入射光偏振态的特定矩阵。当 $a=1, b=0$ 时,入射光为线偏振光(沿 x 轴方向振动);当 $a=0, b=i$ 时,入射光为线偏振光(沿 y 轴方向振动);当 $a=\sqrt{2}/2, b=i\sqrt{2}/2$ 时,入射光为圆偏振光。

入射激光经物镜聚焦进入介质 1 中,此时电场强度向量^[4]为:

$$\epsilon_1 = A_{ill} P_{(1)} L_{(1)} R B \epsilon_0 = A_{ill} R C, \quad (3)$$

其中: A_{ill} 为照明光路的切趾函数,其表达式为:

$$A_{ill} = \exp\left(-\beta_G^2 \frac{\sin^2 \theta_1}{\sin^2 \alpha}\right) \cos^{1/2} \theta_1.$$

它包含了光束的束腰直径,并把物镜入瞳直径与激光束腰直径的比值(充溢系数 β_G)作为参数。切趾函数是物镜的一种特性,由物镜的设计参数决定。式(3)中的张量矩阵为琼斯矩阵^[4, 11],可以表示为:

$$\begin{aligned} L_{(1)} &= \begin{bmatrix} \cos \theta_1 & 0 & \sin \theta_1 \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin \theta_1 & 0 & \cos \theta_1 \end{bmatrix}, \\ P_{(i)} &= \begin{bmatrix} \cos \theta_i & 0 & -\sin \theta_i \\ 0 & 1 & 0 \\ \sin \theta_i & 0 & \cos \theta_i \end{bmatrix}, \\ R &= \begin{bmatrix} \cos \varphi & \sin \varphi & 0 \\ -\sin \varphi & \cos \varphi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}. \end{aligned} \quad (4)$$

$P_{(i)}$ 中的 i 代表介质 i ,矩阵 $L_{(1)}$ 和 $P_{(1)}$ 互为逆矩阵。在第 N 层介质中,电场强度向量为:

$$\epsilon_N = R^{-1} P_{(N)}^{-1} I_{N-1} \epsilon_1 = A_{ill} R^{-1} P_{(N)}^{-1} I_{(N-1)} R C. \quad (5)$$

其中: $I_{(N-1)}$ 表示界面对电场的影,其表达式为:

$$I_{(N-1)} = \begin{bmatrix} T_p^{(N-1)} & 0 & 0 \\ 0 & T_s^{(N-1)} & 0 \\ 0 & 0 & T_p^{(N-1)} \end{bmatrix}. \quad (6)$$

式中: $T_{s,p}^{(N-1)}$ 为经过 $N-1$ 层界面时垂直偏振光和平行偏振光的透射系数^[10], 其表达式为:

$$T_m^{(N-1)} = \frac{t_m^{(N-1)} \prod_{j=1}^{(j)} t_m^{(j)} \exp(i\beta_{j+1})}{D_m^{(N-1)}}. \quad (7)$$

其中: $\beta_l = k_l (h_{l-1} - h_l) \cos \theta_l$, $m = p, s$, $t_p^{(l)}$, $t_s^{(l)}$, $r_p^{(l)}$, $r_s^{(l)}$ 分别是菲涅尔透射系数和菲涅尔反射系数, 其表达式为:

$$\begin{aligned} t_p^{(l)} &= \frac{2n_l \cos \theta_l}{n_{l+1} \cos \theta_l + n_l \cos \theta_{l+1}}, \\ t_s^{(l)} &= \frac{2n_l \cos \theta_l}{n_l \cos \theta_l + n_{l+1} \cos \theta_{l+1}}, \\ r_p^{(l)} &= \frac{n_{l+1} \cos \theta_l - n_l \cos \theta_{l+1}}{n_{l+1} \cos \theta_l + n_l \cos \theta_{l+1}}, \\ r_s^{(l)} &= \frac{n_l \cos \theta_l - n_{l+1} \cos \theta_{l+1}}{n_l \cos \theta_l + n_{l+1} \cos \theta_{l+1}}. \end{aligned} \quad (8)$$

把式(4)、(6)代入式(5)可以得到:

$$\begin{aligned} \epsilon_{N,x} &= A_{\text{ill}} [(T_p^{(N-1)} \cos \theta_N - T_s^{(N-1)}) \times \\ & \quad (A \cos^2 \varphi + B \sin \varphi \cos \varphi) + T_s^{(N-1)} A], \\ \epsilon_{N,y} &= A_{\text{ill}} [(T_p^{(N-1)} \cos \theta_N - T_s^{(N-1)}) \times \\ & \quad (A \sin \varphi \cos \varphi - B \cos^2 \varphi) + T_s^{(N-1)} B \cos \theta_N], \\ \epsilon_{N,z} &= -A_{\text{ill}} T_p^{(N-1)} \sin \theta_N (A \cos \varphi + B \sin \varphi). \end{aligned} \quad (9)$$

对 φ 做如下变化:

$$\begin{aligned} & \int_0^{2\pi} \frac{\sin(n\varphi)}{\cos(n\varphi)} \exp[i\rho \cos(\varphi - \gamma)] d\varphi = \\ & 2\pi i^n J_n(\rho) \frac{\sin(n\gamma)}{\cos(n\gamma)}. \end{aligned} \quad (10)$$

其中: $J_n(\rho)$ 是第一类贝塞尔函数, n 为阶数。利用式(9)和式(10)来计算式(2), 最终得到:

$$\begin{aligned} e_{\text{ill},x}(r_p, \varphi_p, z_p) &= -\frac{ik_1}{2} [\alpha I_2^{(N)} \cos(2\varphi_p) + \\ & \quad bI_2^{(N)} \sin(2\varphi_p) + \alpha I_0^{(N)}], \\ e_{\text{ill},y}(r_p, \varphi_p, z_p) &= -\frac{ik_1}{2} [\alpha I_2^{(N)} \sin(2\varphi_p) - \\ & \quad bI_2^{(N)} \cos(2\varphi_p) + bI_0^{(N)}], \\ e_{\text{ill},z}(r_p, \varphi_p, z_p) &= -ik_1 [\alpha I_1^{(N)} \cos \varphi_p + \\ & \quad bI_1^{(N)} \sin \varphi_p]. \end{aligned} \quad (11)$$

其中: $I_0^{(N)}$, $I_1^{(N)}$, $I_2^{(N)}$ 分别为:

$$\begin{aligned} I_0^{(N)} &= \int_0^\alpha A_{\text{ill}} J_0(k_1 \sin \theta_1 r_p \sin \theta_p) \exp(ik_0 \psi_i) \times \\ & \quad (T_s^{(N-1)} + T_p^{(N-1)} \cos \theta_N) \times \\ & \quad \exp(ik_N z_p \cos \theta_N) \sin \theta_1 d\theta_1 \\ I_1^{(N)} &= \int_0^\alpha A_{\text{ill}} J_1(k_2 \sin \theta_1 r_p \sin \theta_p) \exp(ik_0 \psi_i) \times \\ & \quad T_p^{(N-1)} \sin \theta_N \times \exp(ik_N z_p \cos \theta_N) \sin \theta_1 d\theta_1 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} I_2^{(N)} &= \int_0^\alpha A_{\text{ill}} J_2(k_1 \sin \theta_1 r_p \sin \theta_p) \exp(ik_0 \psi_i) \times \\ & \quad (T_s^{(N-1)} - T_p^{(N-1)} \cos \theta_N) \\ & \quad \times \exp(ik_N z_p \cos \theta_N) \sin \theta_1 d\theta_1. \end{aligned} \quad (12)$$

点 P 处的光强可以表示为:

$$I_{\text{ill}} = |e_{\text{ill},x}|^2 + |e_{\text{ill},y}|^2 + |e_{\text{ill},z}|^2. \quad (13)$$

当 $N=1$ 时, $k_1 = k_N$, 于是有 $\theta_N = \theta_1$, $h_j = 0$, 此时, 式(11)和 Richards 和 Wolf^[6] 的公式一致。利用式(11)、(12)、(13), 分别取 $N=1, 3$, 就可以得到零层和两层界面下的电场衍射公式和光强公式。

3 应用

本文利用上述模型在 Matlab 软件中分别对零层界面和两层界面下激光聚焦显微镜的照明 PSD 进行了计算和分析, 以研究入射光对显微镜分辨率的影响。

3.1 零层界面

激光共聚焦显微镜在材料领域中的应用十分广泛^[12-13]。它可以用于观察样品表面亚微米程度的三维形态, 还可以测量多种微小的尺寸。在材料领域应用时, 激光共聚焦显微镜的像方多数只有一种介质, 即零层界面。

在零层界面中采用的参数为: NA 值为 0.8, 入射光为 x 方向线偏振光, 波长为 $0.6328 \mu\text{m}$, $n_1 = 1.0$, 光波在物镜入瞳处波像差为零。图 3 是 $\beta_G = 0$ 时在零层界面中两种不同偏振态入射光在 xy 平面的 PSF (以下如无特殊注明 β_G 均为 0), 图 3(a) 中入射光为圆偏振光, 图 3(b) 中入射光为 x 向线偏振光。在 PSF 图右上角处, 白色圆环表示圆偏振光入射, 白色线段表示线偏振光入射。从图中可以看出, 圆偏振光 PSF 关于焦点旋转对称, 线片振光 PSF 关于焦点旋转不对称。图 3(a) 中 PSF 的半峰全宽为 $0.43 \mu\text{m}$, 图 3(b) 中 PSF 在 x, y 方向的半峰全宽分别为 $0.48, 0.39 \mu\text{m}$ 。这是因为圆偏振光的振动方向是旋转对称, 而线偏振光的振动方向沿 x 轴方向, 不具有旋转对称性。图 3(b) 中光斑 x 轴尺寸大于 y 轴尺寸, 这种现象也符合 Richards 和 Wolf 的讨论^[6], 即 y 轴方向的分辨率优于 x 轴方向的分辨率。计算结果表明, 圆偏振光和线偏振光相比, 线偏振光在 y 方向的分辨率优于圆偏振光, 而在 x 方向弱于圆

偏振光的分辨率。圆偏振光 PSF 在 xy 平面内关于焦点旋转对称,将会得到较好的成像质量。

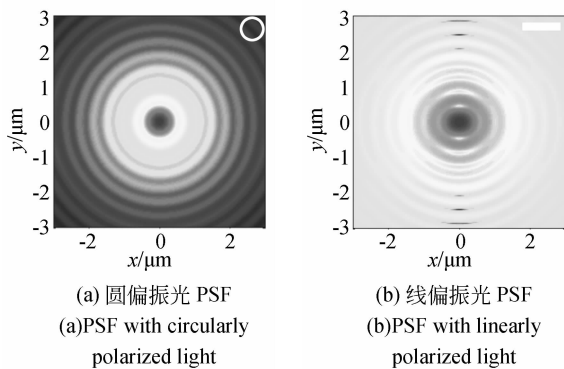


图 3 $\beta_G=0$ 时 xy 平面的 PSF

Fig. 3 PSFs in xy plane with $\beta_G=0$

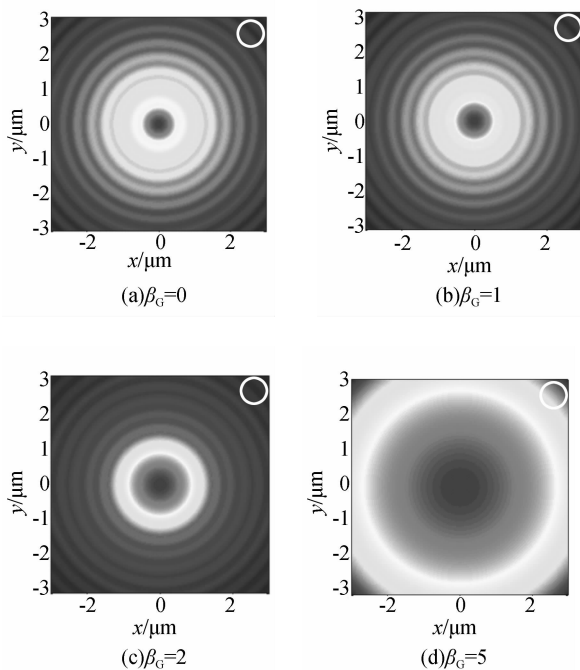


图 4 B_G 不同时 xy 平面的圆偏振光 PSF

Fig. 4 PSFs of circularly polarized light with different β_G in xy plane

图 4 是零层界面上 4 种不同光束束腰直径的圆偏振光在 xy 平面的 PSF。从图中可以看出,随着 β_G 的不断增大,PSF 的光斑半径不断增加。图 4(a)~(d) 中 PSF x 方向的半峰全宽分别为 $0.43, 0.47, 0.62, 1.49 \mu\text{m}$ 。由此可知,当入射光束束腰直径比物镜入瞳直径大时,其差值越大,得到的光斑越小,分辨率越好。

图 5 是 $\beta_G=0$ 时零层界面中两种不同偏振态

入射光在 xz 平面的 PSF。从图中可以看出,两种 PSF 关于焦面对称,焦点在 $z=0$ 处。图 5(a) 和 (b) 中光斑 z 方向的宽度要大于 x 方向的宽度,但是图 (a) 中光斑 x 方向的半峰全宽小于 (b) 中光斑的半峰全宽,其值和图 3 相同。

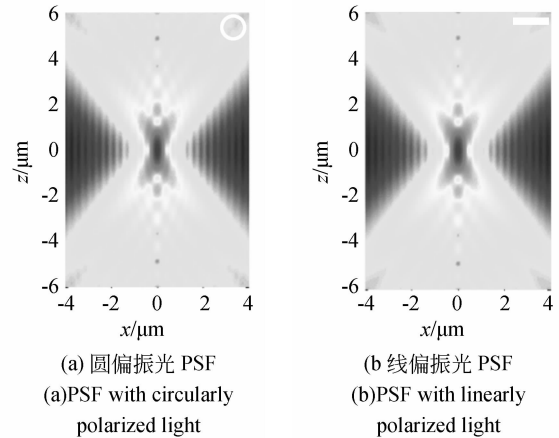


图 5 $\beta_G=0$ 时 xz 平面的 PSF

Fig. 5 PSFs in xz plane with $\beta_G=0$

3.2 两层界面

激光共聚焦显微镜可以用于荧光成像,在分子细胞生物学领域的应用很广泛^[14-16]。它可以利用荧光探针对细胞、分子等进行实时观察,还可以对组织结构进行三维重建等。在荧光成像中,像方有空气(或油)、盖玻片和组织样品 3 种介质,即有两层界面。

在两层界面中系统参数为:NA 值为 1.4,油的折射率 $n_1=1.518$,盖玻片的折射率 $n_2=1.515$,样品的折射率 $n_3=1.44$,盖玻片厚度为 $170 \mu\text{m}$,入射光波长为 $0.488 \mu\text{m}$,光波在物镜入瞳处波像差为零。组织样本有一定厚度,图 6 是探测厚度 d 为 $50 \mu\text{m}$ 时两种偏振光在 xy 平面的 PSF, $\beta_G=0$ 。从图中可以看出,圆偏振光入射形成的 xy 平面 PSF 关于焦点旋转对称;线偏振光入射形成的 xy 平面 PSF 关于焦点旋转不对称,并且 x 方向宽度大于 y 方向宽度。在图 6(a) 中 PSF 的半峰全宽为 $0.26 \mu\text{m}$,图 6(b) 中 PSF 在 x, y 方向的半峰全宽分别为 $0.28, 0.24 \mu\text{m}$ 。计算结果表明,圆偏振光和线偏振光相比较,圆偏振光在 x 方向的分辨率优于线偏振光,但在 y 方向弱于线偏振光的分辨率。圆偏振光 PSF 在 xy 平

面内关于焦点旋转对称,将得到较好的成像质量。

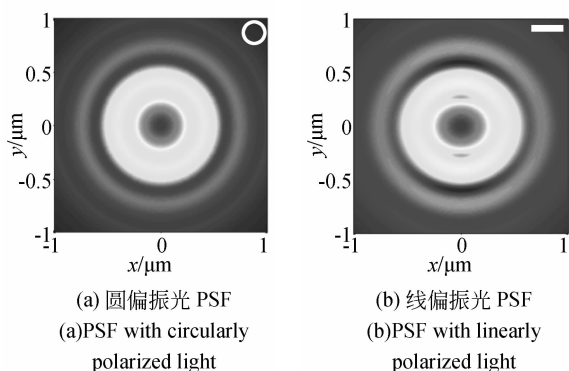


图 6 $\beta_G=0, d=50 \mu\text{m}$ 时, xy 平面的偏振光 PSF

Fig. 6 PSFs in xy plane with $\beta_G=0, d=50 \mu\text{m}$

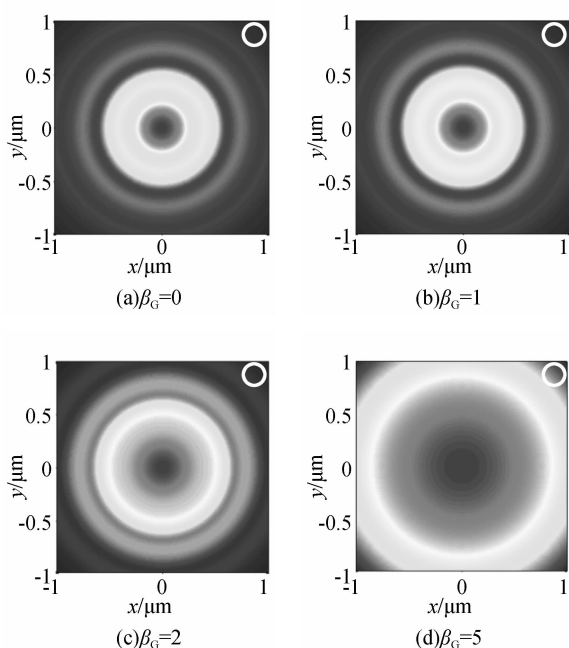


图 7 $d=50 \mu\text{m}$, β_G 不同时 xy 平面的圆偏振光 PSF

Fig. 7 PSFs of circularly polarized light with different β_G in xy plane when $d=50 \mu\text{m}$

图 7 是探测厚度 d 为 $50 \mu\text{m}$ 时, 4 种不同光束束腰直径的圆偏振光入射形成的 xy 平面 PSF。图 7(a)、(b)、(c)、(d) 的半峰全宽分别为 $0.26, 0.28, 0.32, 0.68 \mu\text{m}$ 。随着 β_G 的增加, PSF 的半峰全宽不断增大。 β_G 越小, 即光束束腰直径比物镜入瞳直径越大时, PSF 的分辨率越好。在实际应用中, 如果光束束腰直径大于物镜入瞳直径会造成能量损耗。根据蔡司共聚焦显微镜手册, 当 $\beta_G=0.8$ 时能得到较好的分辨率和光能利用率。

图 8 是 4 种不同探测深度在 xz 平面的圆偏振

光 PSF。此时, $\beta_G=0$, 图(a)、(b)、(c)、(d) 的探测深度分别为 $0, 20, 50, 100 \mu\text{m}$, 实际焦点位置(图 8 中 PSF 最大值所在位置)分别为 $z=-0.64 \mu\text{m}, z=-2.04 \mu\text{m}, z=-4.02 \mu\text{m}, z=-7.00 \mu\text{m}$, 这些值代表了实际焦点偏离高斯焦点的距离。在这些实际焦点处 x 方向的半峰全宽分别为 $0.2, 0.24, 0.26, 0.30 \mu\text{m}$ 。由图可知, 随着探测深度的增加, 实际焦点越来越偏离高斯焦点, PSF 的分布越来越大且不对称性加剧, 横向次极大值轴向位置向 z 轴负方向偏移加剧, 焦点纵向次极大值与焦点最大值的比值增加。这是由于界面的存在引入了像差, 并且像差随着探测深度的增加而增加。这一结果表明, 在用共聚焦显微镜做样本荧光观察时, 显微镜应尽量聚焦于盖玻片附近, 这将得到较高的成像质量, 否则成像质量会急剧下降。

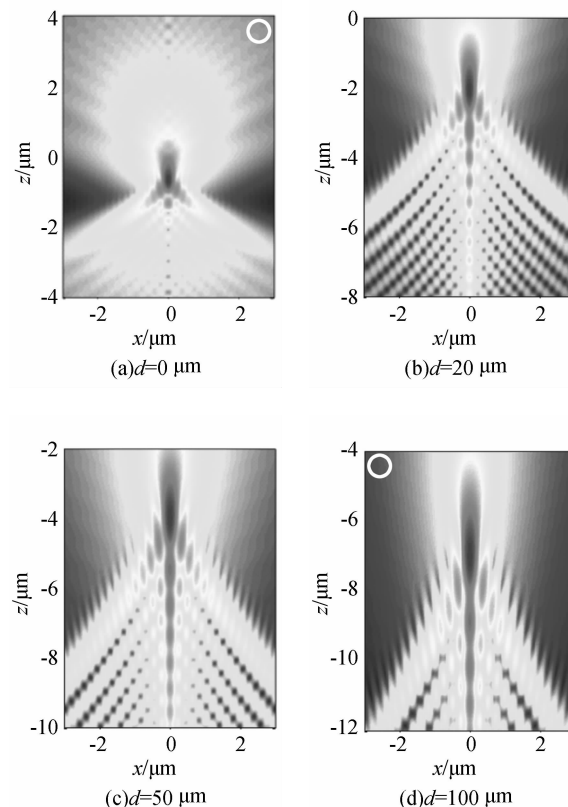


图 8 $\beta_G=0$, 探测深度不同时 xz 平面的圆偏振光 PSF

Fig. 8 PSFs of circularly polarized light with different probe depths in xz plane with $\beta_G=0$

4 结 论

本文根据 Wolf 和 Richards 的矢量衍射积分建立了激光共聚焦显微镜 N 层界面下的照明点

扩散函数模型,并对零层和两层界面下的 PSF 进行了计算分析。结果表明,圆偏振光和线偏振光相比较,圆偏振光在一个方向的分辨率优于线偏振光,但在与之垂直的另一个方向的分辨率弱于线偏振光。圆偏振光 PSF 在 xy 平面内关于焦点旋转对称,故得到了较好的成像质量。当物镜入瞳直径与激光束腰直径比值 β_0 越小时,激光共聚焦显微镜的分辨率越好。所以,为了获得较好的分辨率,保证成像质量,激光共聚焦显微镜应选用

圆偏振光入射;同时为了兼顾光能利用率和成像分辨率,还应适当选择物镜入瞳直径与激光束腰直径的比值。此外,为了获得好的荧光观察效果,观察的样本组织区域应该尽量靠近盖玻片。

本文的计算结果除了对共聚焦显微镜分辨率的改善有一定指导意义以外,还对诸如荧光相关光谱^[17-18]、受激发射损耗显微技术^[19-20]等高分辨光学成像的分辨率优化有借鉴意义。下一步研究将围绕照明 PSF 的测量展开。

参考文献:

- [1] DAVIDOVI P, EGGER M D. Scanning laser microscope for biological investigations[J]. *Applied Optics*, 1971, 10(7): 1615-1619.
- [2] WAKUDA H, NEJIME N, TADA Y, *et al.*. A novel method using confocal laser scanning microscopy for sensitive measurement of P-glycoprotein-mediated transport activity in Caco-2 cells[J]. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2011, 63(8): 1015-1021.
- [3] HOVAKIMYAN M, GUTHOFF R, REICHARD M, *et al.*. In vivo confocal laser-scanning microscopy to characterize wound repair in rabbit corneas after collagen cross-linking[J]. *Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2011, 39(9): 899-909.
- [4] NASSE M J, WOEHL J C. Realistic modeling of the illumination point spread function in confocal scanning optical microscopy [J]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 2010, 27(2): 295-302.
- [5] KHONINA S N, GOLUB I. How low can STED go? Comparison of different write-erase beam combinations for stimulated emission depletion microscopy [J]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 2012, 29(10): 2242-2246.
- [6] RICHARDS B, WOLF E. Electromagnetic diffraction in optical systems II. Structure of the image field in an aplanatic system [J]. *Proc. R. Soc. London, Ser. A*, 1959, 253(1274): 358-379.
- [7] TOROK P, VARGA P, LACZIK Z, *et al.*. Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices: an integral representation[J]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1995, 12(2): 325-332.
- [8] TOROK P, VARGA P, BOOKER G R. Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices: structure of the electromagnetic field. I [J]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1995, 12(10): 2136-2144.
- [9] TOROK P, VARGA P, BOOKER G R. Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices: structure of the electromagnetic field. II [J]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1996, 13(11): 2232-2238.
- [10] TOROK P, VARGA P. Electromagnetic diffraction of light focused through a stratified medium [J]. *Applied Optics*, 1997, 36(11): 2305-2312.
- [11] TOROK P, HIGDON P D, WILSON T. On the general properties of polarized light conventional and confocal microscopes [J]. *Opt. Commun.*, 1998, 148(4-6): 300-315.
- [12] LIN S H, CHEN Z M, LIU S J, *et al.*. Three-dimensional observation of defects in nitrogen-doped 6H-SiC crystals using a laser scanning confocal microscope [J]. *J. Mater. Sci.*, 2012, 47(7): 3429-3434.
- [13] BOULESTEIX R, MAITRE A, BAUMARD J F, *et al.*. Quantitative characterization of pores in transparent ceramics by coupling electron microscopy and confocal laser scanning microscopy [J]. *Mater. Lett.*, 2010, 64(16): 1854-1857.
- [14] CHETVERIKOV P E. Confocal laser scanning microscopy technique for the study of internal genitalia and external morphology of eriophyoid mites (Acari: Eriophyoidea) [J]. *Zootaxa*, 2012, 3453: 56-68.
- [15] MCFADDEN C, BARTZ J, AKSELROD M, *et al.*. Towards cell nucleus microdosimetry: construction of a confocal laser-scanning fluorescence microscope to readout fluorescence nuclear track

- detectors (FNTDs) [J]. *Medical Physics*, 2012, 39(6): 3725-3725.
- [16] AGUIAR T R, ANDRE C B, ARRAIS C A G, *et al.*. Micromorphology of resin-dentin interfaces using self-adhesive and conventional resin cements; a confocal laser and scanning electron microscope analysis [J]. *Int. J. Adhes. Adhes.*, 2012, 38: 69-74.
- [17] KRICHEVSKY O, BONNET G. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications [J]. *Rep. Prog. Phys.*, 2002, 65(2): 251-297.
- [18] HESS S T, HUANG S H, HEIKAL A A, *et al.*. Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review [J]. *Biochemistry*, 2002, 41(3): 697-705.
- [19] BIANCHINI P, HARKE B, GALIANI S, *et al.*. Multiphoton and STED imaging nanoscopy [J]. *Biophys. J.*, 2012, 102(3): 724a.
- [20] LAU L, LEE Y L, SAHL S J, *et al.*. STED microscopy with optimized labeling density reveals 9-fold arrangement of a centriole protein [J]. *Biophys. J.*, 2012, 102(12): 2926-2935.

作者简介:



肖 昀(1988—),男,山东聊城人,博士研究生,2010年于山东大学获得学士学位,主要研究方向为激光共聚焦显微镜成像技术。E-mail: xiaoyunanzhen@163.com

(版权所有 未经许可 不得转载)