

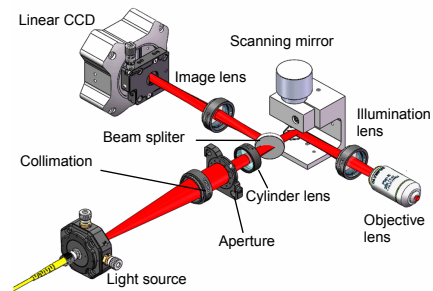


# 高分辨率大视场线扫描共焦显微镜的设计与研制

孔文<sup>1,2</sup>, 郎婷婷<sup>2</sup>, 高峰<sup>1</sup>, 樊金宇<sup>1</sup>, 史国华<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏 苏州 215163;

<sup>2</sup>中国计量大学光学与电子科技学院, 杭州 310018



**摘要:** 商用共聚焦显微镜使用二维光点扫描对样品成像, 成像帧频被限制在 30 Hz 以内, 扫描速度大多在 10 帧/秒(f/s)左右。为了提高共聚焦系统成像速度, 满足生物细胞在体成像的需求, 本文使用线光束对样品进行一维扫描照明, 成像速度大大提高, 同时根据共聚焦成像原理, 在线阵 CCD 前使用狭缝滤除非聚焦平面杂散光以提高成像质量。实验表明, 系统光学放大倍率为 55 倍, 横向分辨率高于 2.2  $\mu\text{m}$ , 当线阵 CCD 以 28 kHz 行频扫描成像时, 帧频可达 50 f/s, 通过对动植物细胞成像证明, 本系统可用于生物细胞的在体成像。

**关键词:** 成像系统; 线扫描; 共聚焦; 高帧频成像

中图分类号: TN16

文献标志码: A

## Design of high-resolution wide field of view confocal line scanning laser microscopy

Wen Kong<sup>1,2</sup>, Tingting Lang<sup>2</sup>, Feng Gao<sup>1</sup>, Jinyu Fan<sup>1</sup> and Guohua Shi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China;

<sup>2</sup>College of Optical and Electronic Technology, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China

**Abstract:** Commercial confocal microscopy usually utilizes two-dimensional galvanometer to scan specimen, the frame rate is limited within 30 f/s, and commercial confocal microscopy is 10 f/s or lower. In order to improve the imaging speed of confocal system, and meet the needs of real-time observation of in vivo imaging, in the high-speed confocal line scanning laser microscopy, the sample is illuminated by one-dimensional scanning laser beam. The imaging speed is greatly improved. At the same time, a slit is placed before the linear array CCD to filter out the non-focused plane stray light and improve the image quality. Experiments show that the optical magnification is 55, horizontal resolution is higher than 2.2  $\mu\text{m}$ , and the frame rate is up to 50 frame per second when the linear CCD scans with 28 kHz horizontal frequency and 512 pixels $\times$ 2048 pixels image resolution, image experiment of plant and animal cells prove that this imaging system could be used in ex vivo or in vivo cell image.

**Keywords:** imaging system; line scanning; confocal; high-frame-frequency imaging

DOI: 10.3969/j.issn.1003-501X.2017.06.007

Citation: *Opto-Elec Eng*, 2017, 44(6): 616–620

### 1 引言

共聚焦成像技术, 就是将光源经过物镜聚焦后照

射样品, 使用针孔滤除非聚焦层面的杂散光, 只有聚焦层面的光可以通过针孔到达探测器成像, 这样大大减少了非焦点杂散光对于成像质量的影响, 极大地提高了图像分辨率, 在生命科学<sup>[1]</sup>、半导体检测<sup>[2]</sup>和材料科学<sup>[3]</sup>等领域已被广泛应用。点共聚焦显微镜中光源

收稿日期: 2017-04-18; 收到修改稿日期: 2017-05-20

\*E-mail: ioe\_eye@126.com

发出的光通过针孔照明样品,因此需要通过扫描才可以对样品成像,共聚焦成像系统扫描模块有三种:载物台、照明光束或物镜<sup>[4]</sup>。照明光束扫描速度快,而且容易实现,是共聚焦显微镜中最常见的扫描方式。常见的扫描方法有振镜扫描<sup>[5]</sup>、共振式扫描<sup>[6]</sup>、多面转镜扫描<sup>[7]</sup>、声光扫描<sup>[8,9]</sup>、微机电系统(MEMS)扫描<sup>[10]</sup>等,最常见的是检流计扫描振镜,其他扫描方式虽然速度更快,但是会影响视野、畸变、色散等其他系统关键参数。由于成本低廉、稳定可靠的优点,扫描振镜是激光共聚焦扫描显微镜中最常用的扫描器件,受到振镜扫描速度的限制,二维点扫描商用共聚焦显微镜大多是单帧或低帧频(小于 10 f/s)成像<sup>[11,12]</sup>,近年来有报道称研制出帧频为 30 Hz 的点扫描激光共聚焦显微镜<sup>[13-15]</sup>。

为了进一步提高成像速度,Master<sup>[16]</sup>等提出使用线光束进行一维扫描代替二维点扫描,只需一维扫描即可对样品成像,大大提高了扫描和成像速度。国内对于线扫描成像鲜有报道,何益<sup>[17]</sup>等人提出采用线共聚焦扫描检眼镜检测眼底视网膜的非受控抖动。其使用帧频为 53 kHz 的 CCD 相机以 512 pixels × 1024 pixels 的分辨率对视网膜进行低分辨率成像,成像速度可达 110 f/s,可用于探测视网膜的非受控生理震颤。文中报道的成像分辨率仅 10 μm,成像视场仅 10°左右,而且生物应用受限。

本文研制了一种大视场、高分辨率的线扫描共聚焦成像系统。通过 Zemax 的优化设计,采用消色差双胶合柱面镜,形成一维线扫描光束,结合优化设计的扫描照明光路,以聚焦的线光束一维扫描样品,通过狭缝滤除非聚焦层面杂散光实现共聚焦成像。系统结构简单紧凑,适用于在体光学成像的分辨率和视场角,横向分辨率高于 2.19 μm,成像帧频更可达 50 f/s,满足细胞级的快速、动态观察的需要,可以用于在体观察体表肿瘤等病变细胞,为疾病诊断提供新的检查方法。

## 2 线共聚焦成像的构成与评价

### 2.1 系统结构

图 1 为高速线扫描共聚焦显微镜的结构示意图,激光光源(功率可调单色光源,最大输出功率 82 mW,  $\lambda=641$  nm,  $\Delta\lambda=3$  nm)发出的光线经过准直镜( $f=150$  mm)准直变为平行光,平行光穿过光阑,被柱面镜( $f=60$  mm)聚焦为线光束,部分线光束穿过分光镜,经由扫描振镜(Cambridge 6230H 系列)反射,线光束变为扫描光,

被照明透镜( $f=50$  mm)会聚,进入物镜(Olympus UPLSAPO 20X),最终聚焦于物镜焦平面,照明样品。样品返回的成像光束经过物镜收集后,穿过照明透镜,被扫描振镜反射到分光镜,在分光镜处大部分成像光线被反射,经由成像透镜( $f=100$  mm)聚焦,穿过共聚焦狭缝(大恒光电 GCM-560101M)到达线阵 CCD(e2v AViVA SM2LV2014 线阵相机,2048 行像素,像素大小 14 μm)。线阵 CCD 相机将接收到的光信号转化为电信号,图像采集卡将 CCD 传来的电信号转化为图像,显示在屏幕上,系统电控和图像显示均通过电脑实现。系统成像分辨率为 512 pixels × 2048 pixels,其中 512 为样品一次完整扫描所经过的扫描点数,数值由系统控制程序决定,2048 对应 CCD 的行像素个数。

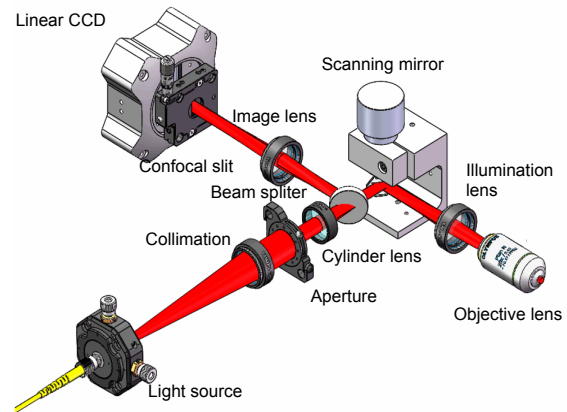


图 1 高速线扫描共聚焦显微镜的结构示意图。

Fig. 1 Schematics of high speed confocal line scanning laser microscopy.

为最大化利用样品返回的成像光束的强度,保证成像质量,分光镜的反射-透射比为 90/10,光源最大输出功率为 82 mW,经过分光镜、光阑以及各透镜后,到达样品的功率为 3.5 mW,实际检测中可以根据成像的需要调节光源功率,以满足 GB7427.1-2012 规定的激光产品功率要求。因此本成像系统既可以对离体样品成像,也可用于在体样品的检测。

在此系统中,共聚焦狭缝放置于 CCD 前,物镜非聚焦层面的样品返回光被检测器前的共聚焦狭缝阻挡,只有物镜聚焦层面的样品返回的光线可以到达 CCD 成像,这样就避免了非聚焦层面的杂散光对样品成像带来的影响,有效地提高了系统的信噪比和分辨率。同时在柱面镜前设有光阑,可以根据需要调节进入系统中照明光束的大小,间接调节成像区域的大小,有针对地对样品感兴趣的部分成像。

## 2.2 系统评价

使用 Zemax 对上述线共焦系统结构进行仿真,分析线光束色散情况,以及不同扫描角度的单波长线光束形状和位置,通过光线点列图的方式对线扫描共聚焦系统进行评价。

图 2(a)为不同波长的光在成像面的光线点列图,从图中可以看到,不同波长的光经过线扫描共聚焦系统后,聚焦在成像平面同一位置,光束为线状,这是由于系统中使用了消色差双胶合柱面镜,在设计时针对蓝色(486.1 nm),绿色(546.1 nm)和红色(656.3 nm)三个波长,对分散的不同波长值和透镜形状进行了优化,实现了最小色差。因此,此柱面镜可在整个可见光区域使用。同时,对系统球差也进行了一定程度的优化,与单个柱面镜相比,消色差双胶合柱面镜的球差要小得多,因此本系统还可以用于多波长光源照明条件下的样品成像,也就是说,即使光源波长改变,线光束的形状和位置也不会发生很大的变化。

图 2(b)为不同扫描角度的光线点列图,由图可见,不同扫描角度下,聚焦平面的光仍能保持线状不改变。说明经过线扫描系统后,光束的像差得到很好的控制,不会产生明显的球差、畸变等单色像差,这对于保证线扫描共聚焦系统成像质量起到了很大的作用。

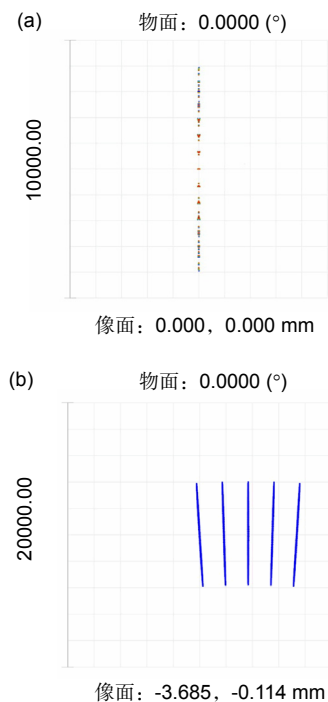


图 2 (a) 不同波长的光线点列图. (b) 不同扫描角度的光线点列图.

Fig. 2 (a) Spot diagram of light in different wavelength. (b) Spot diagram of light in different scanning angle.

经过对仿真结果的分析,不同波长的光线点列图证明了系统对于多个波长的光束在系统中的传输进行了一定程度的优化,不同波长的光源均可用于本系统对样品成像,丰富了本系统的适用范围。对于单波长成像,经过系统传输后,光束基本保持线状不变,说明系统不存在明显的单色像差,侧面证明系统具有很好的成像质量。

## 3 实验结果

### 3.1 放大倍率

系统的光学放大倍率取决于成像透镜焦距与物镜焦距之间的比值:

$$M = \frac{f_{\text{img}}}{f_{\text{obj}}} = \frac{100}{1.8} \approx 55, \quad (1)$$

其中:  $f_{\text{img}}$  为成像透镜焦距,  $f_{\text{obj}}$  为物镜焦距。从样品反射回的成像光束经成像透镜聚焦后,匹配到线阵 CCD 的探测面尺寸,从而得到最佳的成像质量。

### 3.2 分辨率检测

首先对系统的横向分辨率进行检测,使用分辨率板作为样品放置在三维调整架上,调节三维调整架纵向高度,使其位于焦平面位置,此时系统得到的图像最清晰,系统能分辨出的最小间距即系统的最高分辨率。分辨率板使用 Thorlabs R2L2S1P1,该分辨率板的测试靶最大线对数为 228 lp/mm,即最大可用分辨率为 2.19  $\mu\text{m}$ 。图 3(a)为分辨率板最小测试靶图像,调节三维调整架沿某一方向纵向移动,使得分辨率测试靶先靠近后远离聚焦平面。当分辨率测试靶位于聚焦平面时,最小刻度线仍清晰可辨,因此系统横向分辨率应高于 2.19  $\mu\text{m}$ 。

对于轴向分辨率,通常使用样品在不同深度返回光强度的半高全宽表示<sup>[18]</sup>。本系统中使用毛玻璃作为样品,将其放置在三维调整架上,沿着深度方向移动样品,每隔一段距离记录下图像的返回光强度。当样品位于焦平面时返回光强度最大,设此处深度为 0。然后建立光强度与轴向深度的关系,即认为归一化强度值的半高全宽为此系统的轴向分辨率,如图 3(b),本文中扫描共聚焦系统的轴向分辨率约为 9  $\mu\text{m}$ 。

### 3.3 视场大小

系统中振镜的扫描驱动电压直接决定了振镜扫描角度,进一步决定了系统的视场大小。以分辨率板的靶条作为标尺,可大致计算出系统的视场大小,靶条的分辨率为 228 lp/mm,则靶条的总宽度约为 21.9  $\mu\text{m}$ ,

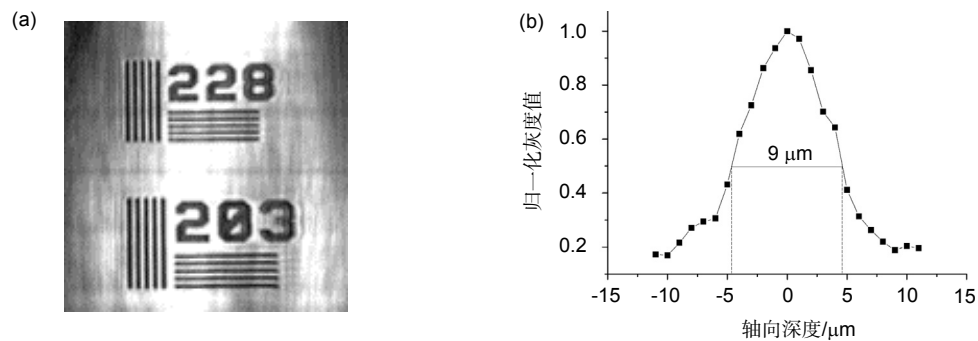


图3 横向(a)和轴向(b)分辨率检测。

Fig.3 Test results of (a) lateral resolution and (b) axial resolution.

对应图 3(a)中 14 个像素,因此每个像素对应的实际大小为  $1.56 \mu\text{m}$ ,由此可以算出系统的视场大小约为  $713 \mu\text{m} \times 713 \mu\text{m}$ 。

### 3.4 实物成像

常见的动植物细胞直径约为  $5 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$ ,理论上本成像系统的分辨率足以对一般的生物细胞成像,于是我们针对四种常见的动植物细胞进行了实验验证。图 4(a)为洋葱表皮细胞,图中细胞近似长方形,宽度约为  $100 \mu\text{m}$ ,长度  $150 \mu\text{m} \sim 300 \mu\text{m}$ ,细胞中心高亮部分应为植物细胞的液泡;图 4(b)为某种植物叶肉细胞,形状为不规则多边形,直径约  $20 \mu\text{m}$ 。两者均为成熟的植物细胞,同种细胞形态相似,排列紧密,细胞之间有明显边界分隔开来。图 4(c)为人口腔上皮细胞图像,在漱净的口腔任意一侧的颊部,用消毒牙签的钝端轻轻刮几下,把牙签上附有口腔壁碎屑的一端放在载玻片上的氯化钠溶液中涂几下,盖上盖玻片,将载玻片放在三维调整架上,调节至适当位置使得系统能够清晰成像,对口腔上皮细胞进行观察,观察到的细胞呈扁平状,形状不规则,直径约  $20 \mu\text{m}$ ,符合口腔上皮细胞的特征。图 4(d)为人血细胞图像,取少量血液滴在载玻片上,再盖上盖玻片放置到三维调整

架上对其观察,发现血细胞形状规则,大致为圆形,直径在  $9 \mu\text{m}$  左右。

通过对两种植物细胞的观察,说明本系统可用于离体细胞样本的观察;通过对人口腔上皮细胞和人血细胞的观察,说明本系统可用于人体活细胞的观察。

## 4 数据分析

高速线扫描激光共聚焦显微镜使用线光源照明样品,一维线扫描取代了常见的二维点扫描,简化了系统光路,极大地提高了扫描和成像速度。通过对洋葱表皮细胞、植物叶肉细胞、人口腔上皮细胞和血细胞的观察说明本成像系统可用于细胞层级或者亚细胞级细胞器的观察,高达  $50 \text{ f/s}$  的帧频表明系统可用这些细胞的实时观察。在特异性荧光标记的帮助下,未来我们可以通过对不同细胞的特异性标记,使不同细胞产生不同波长的荧光,对细胞进行活体观察,记录其生理特点和发现在体细胞与离体细胞不同生理特性的可能性。

穿透深度和轴向分辨率是在体成像系统的两个主要参数,穿透深度较大时,无需对表层细胞做处理,即可对深层细胞进行检测,这种非侵入式检测对于在体成像有着重大意义;而轴向分辨率较高时,可以根

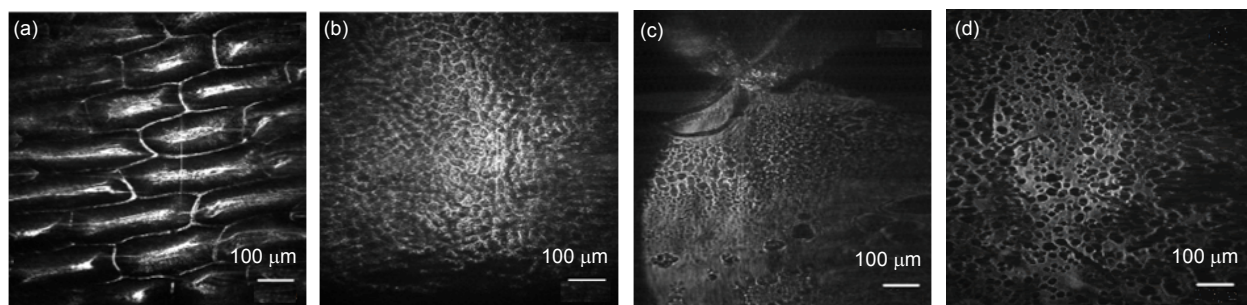


图4 (a) 洋葱表皮细胞.(b) 植物叶肉细胞.(c) 人口腔上皮细胞.(d) 人血细胞成像实验。

Fig. 4 Images of (a) onion epidermal cells, (b) plant mesophyll cells, (c) human oral epithelial cells and (d) human blood cells.

据轴向移动的距离知道图像所在的深度,对于确定病变细胞的深度具有长足意义。图3表明高速线扫描激光共聚焦显微镜具有较高的轴向分辨率,但是关于穿透深度的检测由于实验条件的限制未能实现。

线扫描使用线光源代替点光源扫描,虽然提高了成像速度,但也在一定程度上牺牲了成像分辨率;同时系统光路仍可进行优化,比如成像过程中由于透镜表面的反光,图像里存在一条明亮的竖线,可以通过镀增透膜等方法解决。

临床中通常取一定大小的病变组织,通过病理组织学方法制成病理切片,使用光学显微镜观察切片,其成像分辨率一般在1 μm左右,而高速线扫描激光共聚焦显微镜分辨率约2.19 μm,可以在一定程度上代替病理切片用于临床观察。

## 5 结论

本文提出了一种高速线扫描激光共聚焦显微镜,使用线光束代替点光源,一维线扫描照明样品成像代替了点扫描成像,极大地提高了成像速度,同时使用共焦成像原理,仅有焦平面返回的光可以到达CCD成像,有效屏蔽了非聚焦层面杂散光对成像产生的噪声干扰。理论计算和实验表明,系统光学放大倍率为55倍,横向分辨率高于2.19 μm,且具有较高的轴向分辨率。系统还能对样品实时成像,帧频为50 f/s,足以用于对于细胞层级的样品进行实时观察,当系统使用更高行频的CCD相机时,成像速度可以得到进一步提升。系统结构简单,成本低廉,成像速度快,分辨率高,未来可以根据得到的图像对样品进行三维重构,得到三维立体图像,因此在生物细胞的在体观测方面拥有较好的前景。

## 基金项目

国家自然科学基金(61675226, 61378090);江苏省杰出青年基金(BK20060010);中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDB-SSW-JSC03);科技部重大科学仪器设备开发专项(2016YFF0102000)。

## 参考文献

- Husebye H, Doyle S L. Using confocal microscopy to investigate intracellular trafficking of toll-like receptors[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2016, **1390**: 65–77.
- Castillo-Badillo J A, Cabrera-Wrooman A, García-Sáinz J A. Visualizing G Protein-coupled receptors in action through confocal microscopy techniques[J]. *Archives of Medical Research*, 2014, **45**(4): 283–293.
- Shang Li, Yang Linxiao, Seiter J, et al. Nanoparticles interacting with proteins and cells: a systematic study of protein surface charge effects[J]. *Advanced Materials Interfaces*, 2014, **1**(2): 1300079.
- Liang Rongguang. Biomedical optical imaging technologies: design and applications[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2012: 221–226.
- Zhao Weiqian, Ren Lili, Sheng Zhong, et al. Beam deflection scanning for laser confocal microscopy[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2016, **24**(6): 1257–1263.  
赵维谦, 任利利, 盛忠, 等. 激光共焦显微光束的偏转扫描[J]. *光学精密工程*, 2016, **24**(6): 1257–1263.
- Xiong Daxi, Liu Yun, Liang Yong, et al. Correction of distortion in microscopic imaging with resonant scanning[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2015, **23**(10): 2971–2979.  
熊大曦, 刘云, 梁永, 等. 共振扫描显微成像中的图像畸变校正[J]. *光学精密工程*, 2015, **23**(10): 2971–2979.
- Li Zhaohui. Design and optimization in constructing an in-vivo confocal laser scanning microscopy[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2011, **40**(5): 667–672.
- Pircher M, Hitzberger C K. Acousto optic modulation based en face AO SLO OCT[M] // Drexler W, Fujimoto J G. Optical Coherence Tomography: Technology and Applications. Switzerland: Springer International Publishing, 2015: 1921–1939.
- Zeng Shaoqun, Bi Kun, Xue Songchao, et al. Acousto-optic modulator system for femtosecond laser pulses[J]. *Review of Scientific Instruments*, 2007, **78**(1): 015103.
- Yin C, Glaser A K, Leigh S Y, et al. Miniature in vivo MEMS-based line-scanned dual-axis confocal microscope for point-of-care pathology[J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, **7**(2): 251–263.
- Brown C M, Dalal R B, Hebert B, et al. Raster image correlation spectroscopy (RICS) for measuring fast protein dynamics and concentrations with a commercial laser scanning confocal microscope[J]. *Journal of Microscopy*, 2008, **229**(1): 78–91.
- Moens P D J, Gratton E, Salvemini I L. Fluorescence correlation spectroscopy, raster image correlation spectroscopy, and number and brightness on a commercial confocal laser scanning microscope with analog detectors (Nikon C1)[J]. *Microscopy Research & Technique*, 2011, **74**(4): 377–388.
- Choi S H, Kim W H, Lee Y J, et al. Visualization of epidermis and dermal cells in ex vivo human skin using the confocal and two-photon microscopy[J]. *Journal of the Optical Society of Korea*, 2011, **15**(1): 61–67.
- Chen Ye, Wang Danni, Khan A, et al. Video-rate in vivo fluorescence imaging with a line-scanned dual-axis confocal microscope[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, **20**(10): 106011.
- Choi S M, Kim W H, Côté D, et al. Blood cell assisted in vivo particle image velocimetry using the confocal laser scanning microscope[J]. *Optics Express*, 2011, **19**(5): 4357–4368.
- Böhne M, Masters B R. Confocal microscopy of the cornea[J]. *Progress in Retinal and Eye Research*, 1999, **18**(5): 553–628.
- He Yi, Shi Guohua, Lu Jing, et al. High-speed line scanning confocal laser ophthalmoscope[J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, **32**(1): 0117001.  
何益, 史国华, 卢婧, 等. 高速线扫描共焦检眼镜[J]. *光学学报*, 2012, **32**(1): 0117001.
- Dwyer P J, DiMarzio C A, Rajadhyaksha M. Confocal theta line-scanning microscope for imaging human tissues[J]. *Applied Optics*, 2007, **46**(10): 1843–1851.