

基于大数值孔径环形光锥照明的超分辨光学显微成像方法研究*

支绍韬 章海军[†] 张冬仙

(浙江大学现代光学仪器国家重点实验室, 杭州 310027)

(2011 年 4 月 7 日收到; 2011 年 4 月 28 日收到修改稿)

提出和发展了一种基于大数值孔径环形光锥照明的远场超分辨光学显微成像新方法, 采用将发光二极管 (LED) 面光源、窄带滤光和环形光锥照明相结合的特种照明方式, 实现超分辨显微成像. 建立了大数值孔径环形光锥照明成像的物理模型, 根据标量衍射理论, 在不同环形光锥照明时, 推导出光学显微系统像面衍射斑光强分布的理论计算公式; 通过 Matlab 求解和绘图, 得到衍射斑光强的分布图样, 从理论上证明这一成像方法可以有效提高光学显微镜的分辨率; 建立了相应的显微成像系统, 通过实验验证了该方法可有效改善显微镜的成像质量, 显著提高分辨率; 在中心波长 450 nm、环形光锥数值孔径 1.125—1.25 时, 实验获得的分辨率至少优于 150 nm, 与理论研究结果相符合, 从而证明了这一方法的可行性.

关键词: 光学显微, 超分辨, 环形光锥, 窄带滤光

PACS: 42.79.Ci, 42.40.Lx, 42.25.Fx, 87.64.M—

1 引言

远场光学显微镜可在自然环境下对样品实现实时无扫描的快速成像, 这是扫描电子显微镜 (SEM)、扫描隧道显微镜 (STM)、原子力显微镜 (AFM) 和扫描近场光学显微镜 (SNOM) 等^[1-4]无法实现的. 但是, 由于存在光学衍射极限, 常规远场光学显微镜的最高分辨率仅能达到可见光的半波长数量级, 约为 200 nm, 难以满足深亚微米至纳米量级乃至分子水平的显微观测成像^[5-7]. 因此, 如何进一步提高远场光学显微镜的分辨率历来是一个重要和迫切的问题.

近年来, Hell 等人^[8,9]发明了受激发射损耗显微镜 (STED), 其分辨率可优于 100 nm. 不过严格而言, 这是一类基于荧光及其消融技术的光学显微镜, 且需要逐点扫描, 才能实现图像的重建; Zhuang 等人^[10]利用单分子发光技术研发出随机光学重建显微镜 (STORM), 先获得单分子荧光图像, 再将成千上万个单分子图像叠加在一起, 最终获得超分辨率

的图像, 同样, 这一技术仍需荧光标记和逐点扫描.

上述研究工作是实现远场超分辨光学显微成像的成功例证. 不过, 除了需要逐点扫描之外, 这些技术还存在价格昂贵、操作复杂、无法实现实时成像等局限性. 为此, 本文提出和发展了一种基于大数值孔径环形光锥照明的远场超分辨光学显微成像新方法. 该方法采用将发光二极管 (LED) 面光源、窄带滤光和环形光锥照明相结合的特种照明方式, 改善显微镜的成像质量, 提高分辨率. 理论和实验研究表明, 利用这一方法建立的远场光学显微镜系统, 可获得至少优于 150 nm 的分辨率.

2 原理与方法

图 1(a) 所示为常规远场光学显微系统的全孔径照明成像示意图. 与常规显微系统不同的是, 本文提出和发展的新型远场超分辨光学显微成像方法, 以大数值孔径的环形空心光锥照明, 光线透过样品后只有 ε N.A.—N.A. 环带数值孔径 (而不是全

* 国家自然科学基金 (批准号: 51077117) 和浙江省自然科学基金 (批准号: Z1110196) 资助的课题.

[†] E-mail: zhanghj@zju.edu.cn

孔径) 范围内的部分进入物镜成像, 其中 ε 为环形光锥横截面的内径和外径之比, 其物理模型如图 1(b) 与 (c) 所示, 图中 β 为给定数值孔径物镜的

最大接收角, β_1 与 β_2 为不同环形空心光锥照明时物镜的实际接收角, 在本文中对应的 ε 值分别为 0.6 (N.A. = 0.75—1.25) 和 0.9 (N.A. = 1.125—1.25).

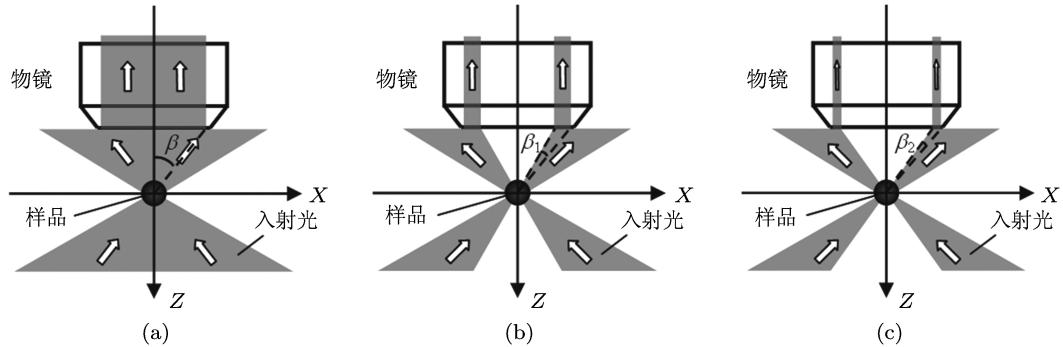


图 1 全孔径及环形空心光锥照明成像的物理模型 (a) 全孔径成像 $\varepsilon = 0$; (b) 宽环形光锥成像 $\varepsilon = 0.6$; (c) 窄环形光锥成像 $\varepsilon = 0.9$

设物镜孔径 (入瞳) 的半径为 a , 入射光透过样品后至物镜入瞳面, 将形成一个底面外半径为 a 、内半径为 εa 的环形倒立空心光锥. 采用高亮度的 LED 作为光源, 通过中心波长 450 nm、带宽 10 nm 的窄带滤光片滤光, 实现环形大孔径空心光锥照明. 此时, 点物 (发光点) 在显微成像系统像面上的衍射斑可以通过环孔的夫琅禾费衍射计算^[11–14]. 根据标量衍射理论^[15,16], 像面上的光场分布 $U_1(x_1, y_1)$, 可表示为

$$U_1(x_1, y_1) = \int \int_{-\infty}^{+\infty} U(x, y) \times \exp \left[-j \frac{2\pi(xx_1 + yy_1)}{\lambda r} \right] \times dx dy, \quad (1)$$

其中 r 表示入瞳面 (x, y) 到像面 (x_1, y_1) 的距离, λ 表示照明光中心波长, $U(x, y)$ 表示入瞳函数, 设 ρ 为入瞳面极坐标半径, 当 $\varepsilon a \leq \rho \leq a$ 时, $U(x, y) = C$ (常数); 当 $\rho < \varepsilon a$ 或 $\rho > a$ 时, $U(x, y) = 0$, 积分遍及整个入瞳面, 可得

$$U_1(\rho_1) = 2\pi C \int_{\varepsilon a}^a J_0 \left(\frac{2\pi N \rho_1 \rho}{\lambda a} \right) \rho d\rho, \quad (2)$$

式中 ρ_1 表示像面极坐标半径, N 表示物镜数值孔径, 即 N.A., $J_0(x)$ 表示零阶贝塞尔函数. 对暗物点而言, 其像面光场分布可由巴比涅原理表示为

$$U_d(\rho_1) = U_0 - U_1(\rho_1). \quad (3)$$

因此, 暗物点在显微成像系统像面上的衍射斑

光强分布为

$$I(\rho_1) = \left| U_0 \left(1 - \frac{U_1(\rho_1)}{U_0} \right) \right|^2, \quad (4)$$

其中 U_0 为常数, 表示没有物点时像面的光场分布. 由此可以得到显微成像系统像面上衍射斑的一维和二维分布, 根据衍射斑的大小, 可进一步确定系统的分辨率.

3 Matlab 计算与分析

在上述物理模型和理论推导的基础上, 当照明光波长 λ 为 450 nm, 物镜数值孔径 N.A. 为 1.25 时, 通过 Matlab 编程对全孔径及环形空心光锥照明显微成像系统的分辨率进行了计算和分析, 结果如图 2 所示.

可见, 以环形空心光锥照明成像 ($\varepsilon = 0.6$ 或 0.9) 时, 衍射光斑的直径比全孔径照明成像 ($\varepsilon = 0$) 时明显缩小, 从而可提高分辨率; 而且, 随着 ε 的增大, 衍射光斑会进一步缩小, 即分辨率进一步提高. 全孔径照明时, 根据瑞利判据得到的分辨率为 220 nm. 由于环形空心光锥照明成像所产生的衍射斑已不是传统意义上的艾里斑, 因此不能用瑞利判据来求取其分辨率, 而是以衍射斑光强分布的半峰全宽 (FWHM) 作为判别依据. 由此计算得到图 2(b) 和 (c) 所对应的分辨率分别为 158 nm, 136 nm. 因此, 与常规的全孔径显微成像相比, 采用窄环形空心光锥照明成像 ($\varepsilon = 0.9$), 光学显微镜的分辨率提高了约 1.62 倍 (220 nm/136 nm), 从而实现超分辨显微成像.

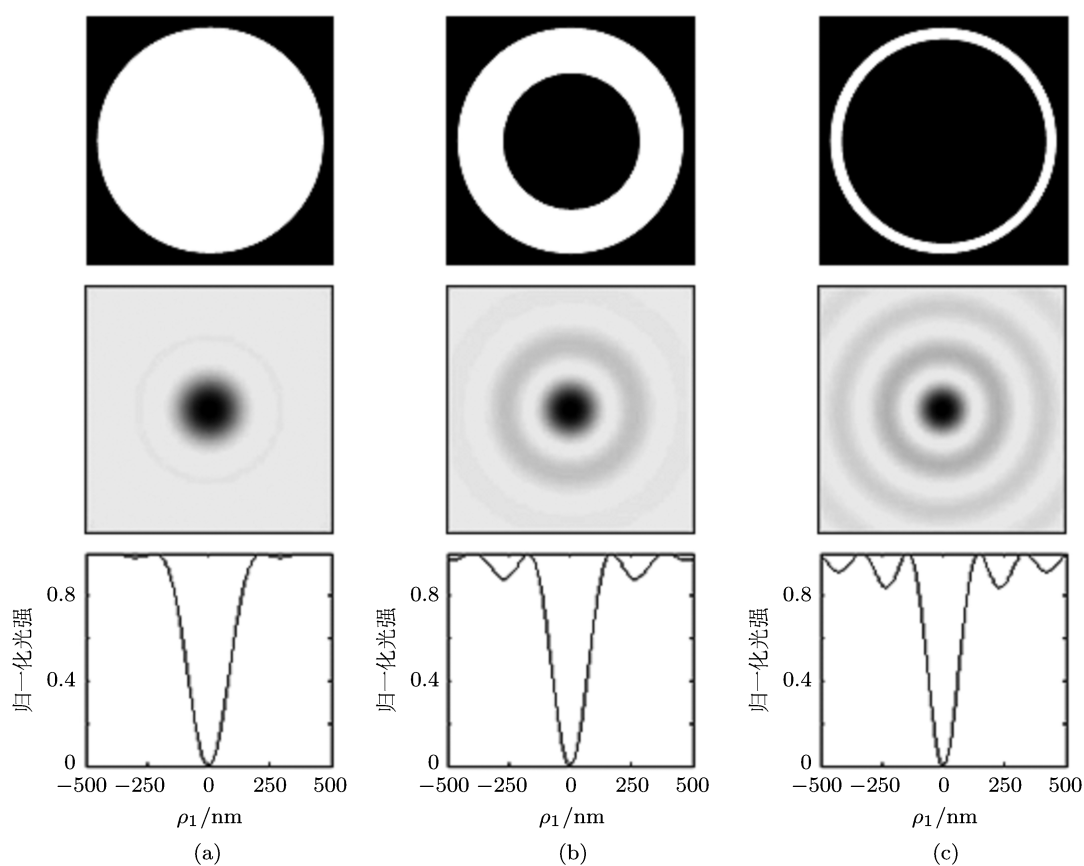


图2 暗物点在显微成像系统像面衍射斑的归一化光强分布图 (a) 全孔径成像 $\varepsilon = 0$; (b) 宽环形光锥成像 $\varepsilon = 0.6$; (c) 窄环形光锥成像 $\varepsilon = 0.9$

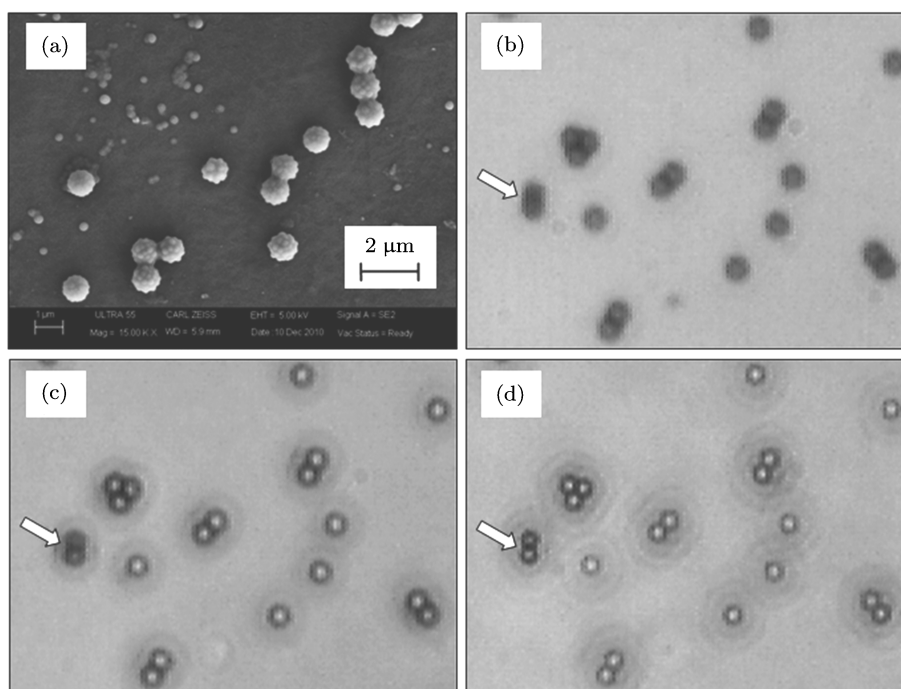


图3 直径 $0.8\text{--}1.0\text{ }\mu\text{m}$ 聚苯乙烯微球的显微图 (a) SEM 照片; (b) 全孔径成像 $\varepsilon = 0$; (c) 宽环形光锥成像 $\varepsilon = 0.6$; (d) 窄环形光锥成像 $\varepsilon = 0.9$

4 实验及结果

根据理论研究和 Matlab 计算分析结果,建立了相应的显微成像系统,并开展了常规显微成像及环形空心光锥照明显微成像实验. 实验中采用数值孔径 N.A. 为 1.25 的 100 $\times$ 油浸物镜,选择 3 W 高亮度的面发光 LED 作为光源,并以上述方式进行窄带滤光. 显微图像经 CCD 接收,通过图像采集卡输入到计算机进行实时显示.

首先对直径 0.8—1.0 μm 的聚苯乙烯微球进行显微观察,结果如图 3 所示. 图 3(a) 为 SEM 图像,图 3(b) 为常规全孔径光学显微图像,可以看出其中的一些微球(如图中箭头所指)因靠得太近而无法分辨;而采用环形空心光锥照明方式时,成像质量显著提高,微球的轮廓逐渐清晰,微球与微球之间可以良好分辨,如图 3(c) 和 (d) 所示;而且,随着 ε 的增大,微球轮廓变得更加清晰,分辨率进一步提高.

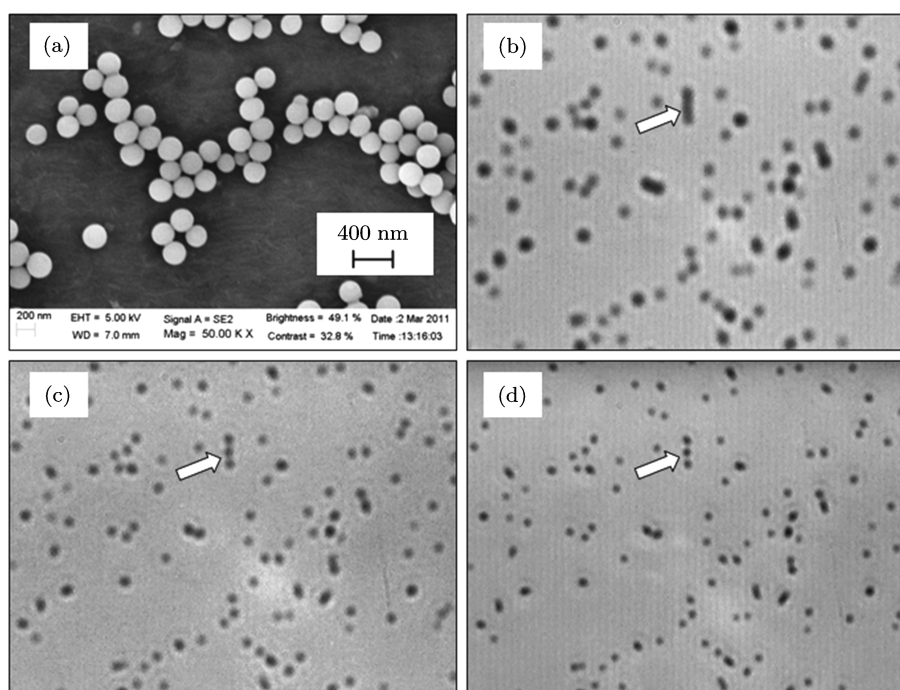


图 4 直径 150—200 μm 聚苯乙烯微球的显微图 (a) SEM 照片; (b) 全孔径成像 $\varepsilon = 0$; (c) 宽环形光锥成像 $\varepsilon = 0.6$; (d) 窄环形光锥成像 $\varepsilon = 0.9$

图 4 所示为直径 150—200 nm 的聚苯乙烯微球的显微成像结果. 图 4(a) 为 SEM 图像,图 4(b) 为常规全孔径光学显微图像,同样,其中的一些微球因直径太小及靠得太近而更加无法分辨,看起来连成一片(如图中箭头所指);当采用环形空心光锥照明方式时,可以发现原本连成一片的微球逐渐分开,即能够良好分辨,如图 4(c) 和 (d) 所示;随着 ε 的增大,微球轮廓变得更加清晰. 根据这一实验结果,可以确定采用大数值孔径环形空心光锥照明方式时,显微成像系统的分辨率至少优于 150 nm. 我们认为,从空间频率的角度而言,采用环形空心光锥照明,可以让更多的高频(空间频率)成分或细节通过光学显微系统,而将低频成分滤去,从而有效地抑制弥散,实现超分辨的显微成像.

5 结论

本文提出和发展了一种利用大数值孔径环形光锥照明实现远场光学显微镜超分辨成像的新方法. 通过物理模型分析、理论推导及 Matlab 计算,得到不同环形光锥照时光学显微系统像面衍射斑光强分布的理论计算公式,并绘制出衍射斑光强的分布图样,从理论上证明采用环形空心光锥照明的成像分辨率可比常规的全孔径显微成像提高 1.62 倍,即约为 $\lambda/3.3$. 据此建立了大数值孔径环形光锥照明的显微成像系统,并开展了相应的实验研究,进一步验证这一新型显微成像方法及系统可显著改善显微成像质量,提高分辨率. 在中心波长 450 nm、环形光锥数值孔径 1.125—1.25 时,实

验获得的分辨率至少优于 150 nm, 与理论研究结果相符合. 这一方法可为远场光学显微镜实现超分辨

成像提供一种新的技术途径.

-
- [1] Reimer L 2000 *Scanning Electron Microscopy* (Berlin: Springer-Verlag) p12
 - [2] Binnig G, Rohrer H 1982 *Helev Phys. Acta* **55** 726
 - [3] Fu X, Zhang D X, Zhang H J 2009 *Chin. Opt. Lett.* **7** 891
 - [4] Wang Z Y, Li Q, Zhao J, Guo J H 2000 *Acta Phys. Sin.* **49** 1959 (in Chinese) [王子洋, 李勤, 赵钧, 郭继华 2000 物理学报 **49** 1959]
 - [5] Stephens D J, Allan V J 2003 *Science* **300** 82
 - [6] Sales T R M, Morris G M 1997 *Opt. Lett.* **22** 582
 - [7] Yuval G, Bart J V, IAN T Y 2005 *Current Opinion in Biotechnology* **16** 3
 - [8] Hell S W, Wichmann J 1994 *Opt. Lett.* **19** 780
 - [9] Egner A, Jakobs S, Hell S W 2002 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** 3370
 - [10] Rust M J, Bates M, Zhuang X W 2006 *Nat Methods* **3** 793
 - [11] Born M, Wolf E (Translated by Yang J S) 1985 *Principles of optics* (Beijing: Science Press) pp505—520 (in Chinese) [玻恩, 沃尔夫著杨葭孙译 1985 光学原理 (北京: 科学出版社) 第 505—520 页]
 - [12] Zhao W Q, Chen S S, Feng Z D 2006 *Acta Phys.Sin.* **55** 3363(in Chinese) [赵维谦, 陈珊珊, 冯政德 2006 物理学报 **55** 3363]
 - [13] Zhao W Q, Feng Z D, Qiu L R 2007 *Chin. Phys.* **16** 1624
 - [14] Liu L, Deng X Q, Wang G Y, Xu Z Z 2001 *Acta Phys. Sin.* **50** 48 (in Chinese) [刘力, 邓小强, 王桂英, 徐至展 2001 物理学报 **50** 48]
 - [15] Lu S Z, You K M, Chen L Z, Wang Y W 2011 *Chin. Phys. B* **20** 034202
 - [16] Ramsay E, Serrels K A, Waddie A J, Taghizadeh M R 2008 *American J. Phys.* **76** 1002

Super-resolution optical microscopic imaging method based on annular illumination with high numerical aperture*

Zhi Shao-Tao Zhang Hai-Jun[†] Zhang Dong-Xian

(State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

(Received 7 April 2011; revised manuscript received 28 April 2011)

Abstract

On the basis of narrow-band filtered annular light-cone illumination with high numerical aperture, a new far-field super-resolution optical microscopic imaging method is proposed, and its physical model is established. Using the scalar diffraction theory, the formula of diffraction intensity in the image plane is derived for annular light-cone illumination and imaging under different numerical apertures. The diffraction patterns are further simulated through the Matlab program, which demonstrates that such a method may significantly increase the microscopic imaging resolution. Experiments have been carried out on a self-build microscopic system, showing that a resolution can be achieved to be better than 150 nm under 450 nm light wavelength and 1.125–1.25 annular numerical apertures. The experimental results are in good agreement with the theoretical predictions, thus proving the feasibility of this microscopic imaging method.

Keywords: optical microscopy, super-resolution, annular light-cone, narrow-band filter

PACS: 42.79.Ci, 42.40.Lx, 42.25.Fx, 87.64.M–

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 51077117), and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province, China (Grant No. Z1110196).

[†] E-mail: zhanghj@zju.edu.cn