

# 基于偏振滤波图像增强和动态散斑照明的宽场荧光层析显微镜\*

文侨 王凯歌 邵永红 屈军乐<sup>†</sup> 牛憨笨

(深圳大学光电工程学院, 光电子器件与系统(教育部、广东省)重点实验室, 深圳 518060)

(2012年5月21日收到; 2012年9月6日收到修改稿)

提出了一种基于偏振滤波图像增强和动态散斑照明的新型宽场荧光层析显微镜. 该显微镜采用了一种新型的偏振滤波图像增强技术, 基于激发光与荧光偏振态的差异, 利用偏振器件滤除激发光; 并利用动态散斑照明实现宽场层析. 该荧光层析显微镜具有结构简单、低成本、响应速度快、容易操作等特点. 实验研究结果表明, 本文提出的滤波方案能够显著提高图像质量, 利用动态散斑照明实现宽场层析具有较高的纵向分辨能力. 研究丰富了在荧光显微镜中, 从强激发光中提取弱荧光信号的技术手段, 为今后发展具有快速响应, 波长可调谐的多光谱荧光层析等高端的显微镜具有重要参考意义.

**关键词:** 激光散斑, 偏振滤波, 荧光显微镜, 层析**PACS:** 42.62.Be, 42.30.Ms, 42.25.Ja**DOI:** 10.7498/aps.62.034203

## 1 引言

具有层析分辨能力光学显微镜的出现是显微镜技术的一次革命, 该技术的发展使得组织和细胞的光学连续切片和三维结构重建等能够得以实现, 对研究生命现象的本质具有重要的科学意义. 激光扫描共焦显微镜 (laser scanning confocal microscope, LSCM) 能够有效提高图像的分辨率和成像质量, 而且具有深层分辨能力和三维层析能力<sup>[1-4]</sup>, 但该显微镜系统复杂、造价昂贵、成像速度慢. 最近, 人们提出了一种利用动态散斑照明的荧光显微镜, 该显微镜不仅具有深层层析分辨能力, 而且采用宽场成像方法, 不需要复杂的振镜扫描系统和共轭针孔光阑, 因此, 结构简单、成像速度快、使用便捷<sup>[5-10]</sup>.

荧光显微镜是利用特定波长光照射被检物, 使之发出荧光, 在显微镜下观察物体的形状及其所在位置的一种显微光学检测技术. 荧光显微镜的一项

关键技术是把淹没在较强激发光中的荧光信号提取出来, 激发光的滤波效果在一定程度上决定了成像的质量. 目前使用的荧光显微镜大多数根据荧光与激发光波长的差异, 采用频率滤波方法来滤除激发光, 提取荧光信号. 这种方法不仅对滤光片要求很高, 而且对荧光和激发光的波长有很强的依赖性, 导致荧光显微镜的使用受到激发光与荧光的波长限制. 例如当激发光或荧光波长改变时, 需要切换相适应的滤光片; 当激发光为白光或宽带光源时, 如果激发光与荧光在波长上有重叠, 采用传统的频率滤波法则无能为力<sup>[11]</sup>.

本文提出了一种新型的基于偏振滤波图像增强和动态散斑照明的宽场荧光层析显微镜. 该显微镜采用新型的偏振滤波图像增强技术, 基于激发光与荧光偏振态的差异, 利用偏振器件滤除激发光, 提取荧光信号; 并利用动态散斑照明实现宽场层析, 具有结构简单、低成本、响应速度快等特点. 本文的研究对于今后发展一种不受激发光与荧光波长的限制的宽场荧光层析显微镜具有重要的参

\* 国家自然科学基金(批准号: 61108026, 61078067)、高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 20114408120001)、广东高校优秀青年创新人才培养计划(批准号: LYM11107)和深圳大学科研基金(批准号: 201033)资助的课题.

<sup>†</sup> 通讯作者. E-mail: jlqu@szu.edu.cn

考意义.

## 2 实验装置及原理

图 1 是一种新型基于偏振滤波图像增强和动态散斑照明的宽场荧光层析显微镜结构示意图. 该显微镜主要由激光器、散射体、散斑成像光学系统、荧光显微镜、偏振元件及控制系统等部分组成. 半导体抽运固体激光器 (长春新产业光电技术有限公司, MBL50, 中心波长为 473 nm) 发出的激光耦合到散射体, 获取特定大小的散斑光源, 该光源经过偏振片  $P_2$  (大恒新纪元科技股份有限公司, GCL-050003) 后得到具有线偏振特性的散斑光, 再经散斑成像光学系统将散斑成像到显微镜 (Leica 公司, LDMLB2) 的物镜 (其中物镜放大倍率为 40 倍, 数值孔径为 0.65) 后焦面上, 使后焦面上的散斑的大小刚好覆盖显微物镜的后通光孔径, 以实现样品的宽场激发. 散斑激发样品产生的荧光经由物镜收集, 分别经过双色分光镜为 (Chroma

Technology 公司, 505 dcxr)、透镜  $f_s$  和检偏器  $P_1$  (大恒新纪元科技股份有限公司, GCL-050003), 最终成像于 CCD 相机 (英敏基信息技术有限公司, QHY-IMG2S-M-COOL), 再由计算机读取和存储作为源图像. 显微镜的横向分辨率为  $d = 1.22\lambda f/D$ , 其中  $\lambda$  为波长,  $f$  为透镜的焦距,  $D$  为通光孔径. 检偏器  $P_1$  的偏振态与激发光偏振态正交, 从而过滤激发光. 通过计算机同步步进电机和 CCD 相机, 步进电机驱动散射体运动, 产生一系列彼此独立的散斑. 当步进电机每前进一步, 散斑变化一次, CCD 相机同步记录一幅荧光图像, 计算机对应地存储一系列源图像. 这一系列源图像中任一幅源图像都是彼此独立的, 而且其记录的荧光强度都包括物镜焦平面内荧光信号强度和焦平面以外的荧光背景强度. 由于散斑图案的变化, 导致物镜焦平面内荧光信号强度变化剧烈, 而焦面外的荧光信号变化缓慢, 这种信号变化特征恰恰被包含于源图像中, 因此根据这种信号变化特征, 利用特殊的算法<sup>[4]</sup>, 能够获得物镜焦平面内的荧光信号, 实现宽场层析成像.

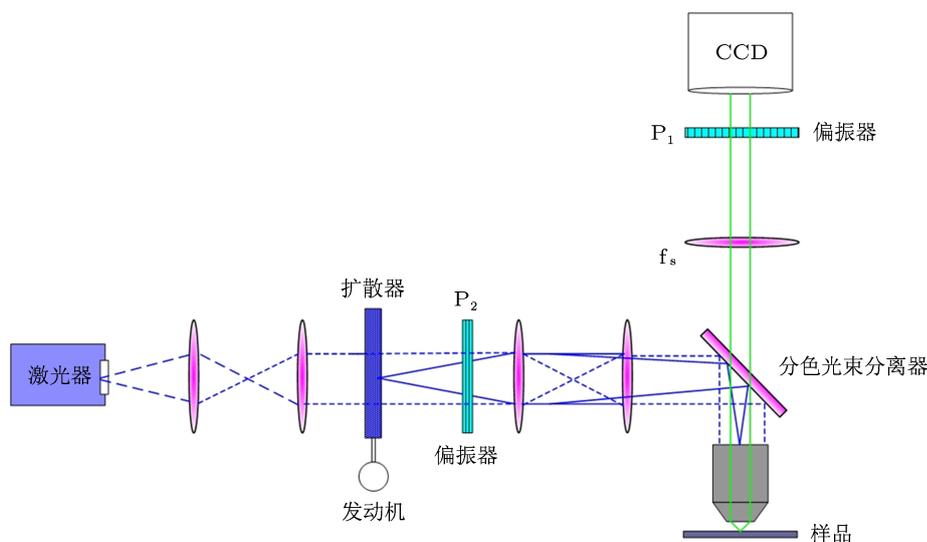


图 1 基于偏振滤波和动态散斑照明的宽场荧光层析显微镜结构图

宽场荧光显微镜实现层析的基本原理如下: 在普通荧光显微镜中, 引入激光散斑照明, 在显微镜物镜的后面形成一系列随机变化的散斑照明分布图案, 如图 2(a) 所示. 图 2(b) 是为图 2(a) 中散斑照明分布图案的放大图, 其中点划线表示后焦平面, 小椭圆表示散斑.

散斑照明样品时, 在样品上激发产生对应的一系列荧光信号, 这些荧光信号经物镜、分光镜、透

镜、检偏器后成像于 CCD 相机上. 这些荧光信号主要有两个来源: 一是产生于显微镜物镜焦平面内的荧光信号, 另一个是产生于显微镜物镜焦平面外的背景荧光信号. 假如散斑所照明到的样品处都能激发出荧光, 且荧光强度正比于激发光强度. 在宽场荧光显微镜中, 当物后焦平面处 (图 2 中点划线) 与 CCD 平面满足物像共轭面时, 若不考虑光学元件口径尺寸的限制, 共轭面的物像关系的点扩散函

数 (PSF<sub>F</sub>) 为 δ 函数, 物后焦平面处的物体清晰地成像于 CCD 平面 (如图 3(a)); 非物后焦平面与 CCD 平面不是物像共轭面, 它们的物像关系的点扩散函数 (PSF<sub>NF</sub>) 不是 δ 函数, 因此, 非物后焦平面的物体弥散而模糊地成像于 CCD 平面 (如图 3(b)). 因此, 随着照明散斑的变化, CCD 相机探测到的来自于显微镜物镜焦平面内的荧光信号强度发生剧烈变化 (如图 3(a)), 图 3(a) 下方的小散斑为物后焦平面上的一个散斑在 CCD 平面的成像, 而在物镜焦平面外的荧光信号强度变化缓慢 (如图 3(b)), 图 3(b) 下方的散斑为物后焦平面上的一个散斑在 CCD 平面的成像. 这种信号变化特征是实现层析的基础, 根据这种信号变化特征, 利用下面算法能够提取的该层面的荧光信号, 实现样品的层析成像 [5,7]

$$I_{RMS} = \left\{ \left[ \sum_{i=1}^N (I_i - I_{i-1})^2 \right] / 2N \right\}^{1/2}, \quad (1)$$

式中,  $N$  为图像序列中的图像数,  $I_i$  为第  $i$  幅图像的强度,  $I_{RMS}$  为采集得到  $N$  幅图像的均方根图像, 也就是层析图像,  $N$  一般取值为 40~60.

若以高斯-洛仑兹近似表示探测和照明的点扩展函数, 则散斑图案变化时, 在 CCD 探测器探测面上的每一个象素的强度变化的均方根值 RMS (root-mean-square) 可以表示为 [5-7]

$$RMS = \frac{\langle I_S \rangle CA}{\sqrt{3 + 2\zeta_c^2}}, \quad (2)$$

式中,  $A = \frac{\pi\omega_0^2}{2}$ ,  $\omega_0 = \frac{0.61\lambda}{NA}$ ,  $NA$  为物镜数值孔径,  $\zeta_c = \frac{\lambda Z_c}{\pi\omega_0^2}$ ,  $Z_c$  为轴向离焦距离,  $C$  为荧光团的浓度. RMS 反映了该系统的具有层析分辨能力, 类似于共焦显微镜的层析能力 (正比于  $1/z_c^2$ ). 增大显微镜的数值孔径, 将有利于改善层析显微镜的纵向分辨能力.

基于正交偏振的滤光方案的工作原理说明如下: 将图 1 中的光路展开 (只考虑光的偏振特性), 得到如图 4 所示的光路原理简化示意图, 其中, 参

考面 1 上的带箭头的虚线和参考面 2 带箭头的实线表示光的偏振方向, 而偏振片  $P_1$ ,  $P_2$  上的带箭头的实线表示偏振片  $P_1$ ,  $P_2$  的偏振方向, 样品  $S$  上的带箭头的蓝色虚线、红色实线分别表示激发光和荧光的偏振方向. 具体地, 参考面 1 位置为激发光 (带箭头的蓝色虚线表示激发光, 箭头表示偏振方向) 入射偏振片  $P_2$  前的任意一位置, 激发光的偏振态为自然偏振, 经过偏振片  $P_2$  (偏振方向如图 4 中所示) 后, 入射到样品  $S$  上的激发光为线偏振光. 样品  $S$  被激发光激发后, 辐射出荧光信号 (带箭头红色实线表示荧光, 箭头表示偏振方向), 荧光为自然光或接近自然光. 由于偏振片  $P_1$  与偏振片  $P_2$  正交, 激发光经过偏振片  $P_1$  时由于其偏振方向与偏振片偏振方向垂直而被过滤掉. 样品  $S$  被激发辐射出的荧光为自然光, 其中偏振态平行于偏振片  $P_1$  的那部分荧光, 能顺利地通过偏振片  $P_1$ , 入射到 CCD 相机上.

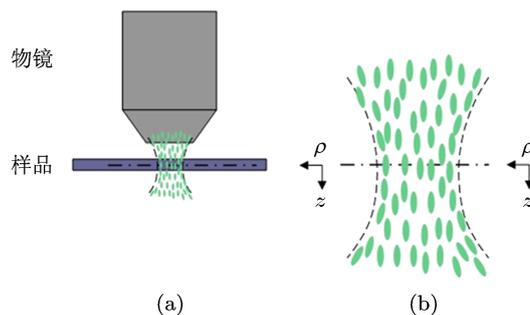


图 2 物镜后的散斑照明分布图案



图 3 散斑在 CCD 上成的像 (a) 焦平面处散斑在 CCD 上成的像; (b) 焦平面外散斑在 CCD 上成的像

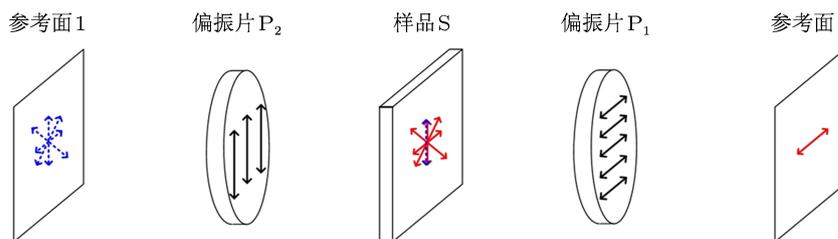


图 4 正交偏振滤光原理示意图

### 3 实验结果

实验中我们给出铃兰根茎样品切片的荧光层析图像,如图5所示.图5(a)为未采用偏振片 $P_1$ 来滤除激发光的图像,即采用偏振滤波图像增强前的层析图像,图5(b)为采用偏振片 $P_1$ 滤除激发光,实现图像增强后的层析图像,图5(c)为对比实验,采用高消光比的滤光片代替偏振片 $P_1$ 滤除激发光的层析图像.图中的阿拉伯数字表示的是不同深度的层析图像,图5(1)与图5(2)差 $5\ \mu\text{m}$ 深度,图5(2)与图5(3)差 $4\ \mu\text{m}$ 深度.对比图5(1),5(2),5(3)可知,该显微镜具有较高的层析分辨能力.(a)图中,由于激发光较强,荧光信号基本淹没在激发光中,(b)图清晰地显示出荧光图像.对比(a)图和(b)图可知,本文提出的偏振滤波图像增强方案能够很好地滤

除激发光,提取荧光信号,显著地提高图像质量.我们在实验中也采用高对比的滤光片代替偏振片 $P_1$ 滤除激发光后的图像,为(c)图.比较(b),(c)两图可知,我们提出的偏振滤波法获得的图像质量并不差于传统滤波法.需要指出的是,实验中所采用的起偏器和检偏器为国产吸收型偏振片(大恒新纪元科技股份有限公司,型号GCL-050003),其消光比为 $500:1$ ;进行对比实验的传统频率滤波法采用的是美国进口滤光片(Chroma Technology Corp.,型号HQ510lp),其光密度(optical density, OD)大于6,即消光比大于 $10^6$ .由此可知,采用偏振滤波图像增强技术,显著降低了荧光显微镜中滤除激发光对光学器件性能参数的要求.当然,如果采用高消光比的检偏器件,偏振滤波荧光显微镜所获得的图像质量也将会有进一步地提高.

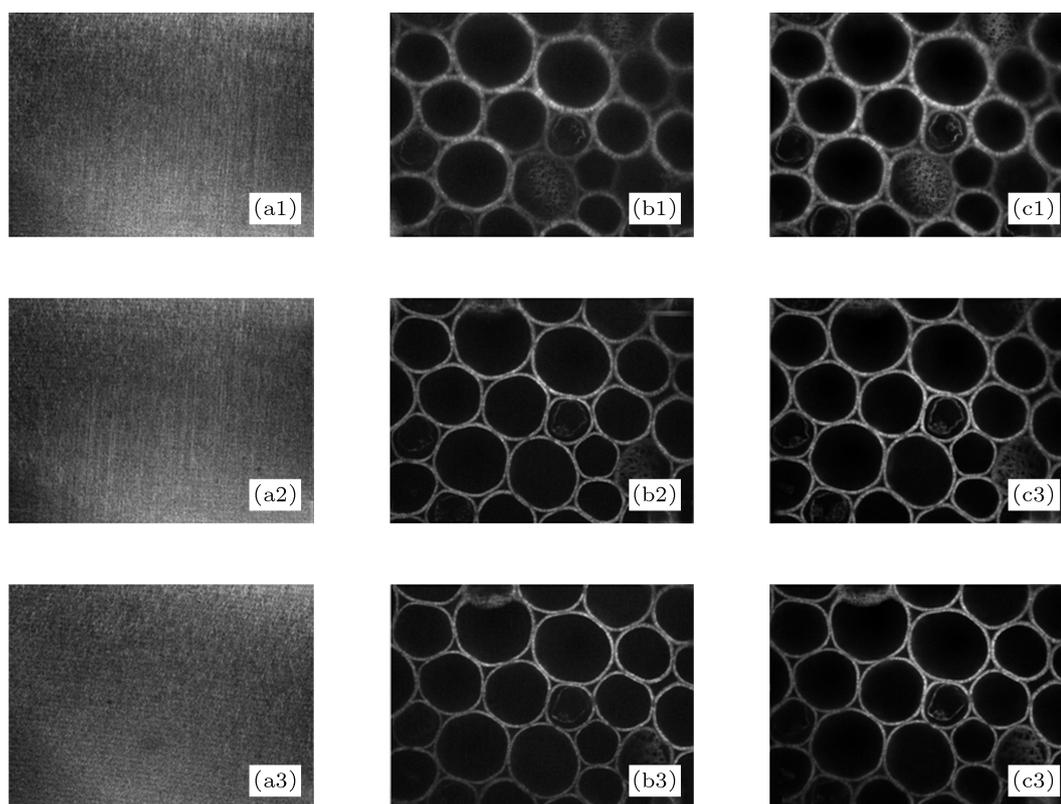


图5 铃兰根茎样品切片的荧光层析图像 (a)采用偏振滤波图像增强前的层析图像;(b)采用偏振滤波实现图像增强后的层析图像;(c)采用高消光比的滤光片的对比层析图像

### 4 结论

本文提出了一种基于偏振滤波图像增强和动

态散斑照明的新型宽场荧光层析显微镜.该显微镜采用新型的偏振滤波图像增强技术,基于激发光与荧光偏振态的差异,利用偏振器件滤除激发光.实

验研究表明, 偏振滤波图像增强技术能够显著地提高图像质量, 也显著降低了光学器件性能参数的要求. 该方案丰富了荧光显微镜从较强的激发光中提取微弱荧光信号的技术手段, 且不受激发光与荧光波长的限制, 对于今后解决波长可调谐的多光谱荧光显微镜、白光照明多光谱荧光显微镜等技术上的瓶颈具有直接的参考意义. 利用动态散斑照明能

够实现宽场层析, 这种散斑照明宽场荧光显微技术能够以高的纵向分辨率对生物组织进行层析成像, 而且结构简单, 成像速度快, 使用方便, 该显微镜对于满足当今生物、生命科学领域发展的需求, 研制具有我国自主知识产权的高端荧光显微镜有重要意义.

- 
- [1] Wilson T, Shepard C J 1984 *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy* (New York: Academic Press)
- [2] Denk W, Strickler J H, Webb W W 1990 *Science* **248** 73
- [3] Somekh M G, See C W, Goh J 2000 *Opt. Commun.* **2** 75
- [4] Braeckmans K, Peeters L, Sanders N N, De Smedt 2003 *Bio. Phys. J.* **85** 2240
- [5] Ventalon C, Mertz J 2005 *Opt. Lett.* **30** 3350
- [6] Ventalon C, Mertz J 2006 *Opt. Express* **14** 7198
- [7] Lin H M, Shao Y H, Qu J L, Yin J, Chen S P, Niu H B 2008 *Acta Phys. Sin.* **57** 7641 (in Chinese) [林浩铭, 邵永红, 屈军乐, 尹君, 陈思平, 牛憨笨 2008 物理学报 **57** 7641]
- [8] Shao Y H, Li H, Wen Q, Wang Y, Qu J L, Niu H B 2010 *Chin. Opt. Lett.* **10** 944
- [9] Lim D, Ford T N, Chu K K, Mertz J 2011 *J. Biomed. Opt.* **16** 016014
- [10] Mazzaferrri J, Kunik D, Belisle J M, Singh K, Lefrancois S, Costantino S 2011 *Opt. Express* **19** 14508
- [11] Wen Q, Qu J L, Shao Y H, Wang K G, Niu H B *China Patent* 201010616211. X [2010-12-30]

# A novel wide field fluorescence sectioning microscope based on polarization filtering image enhancement and dynamic speckle illumination\*

Wen Qiao Wang Kai-Ge Shao Yong-Hong Qu Jun-Le<sup>†</sup> Niu Han-Ben

(Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, College of Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

(Received 21 May 2012; revised manuscript received 6 September 2012)

## Abstract

We propose a novel wide-field fluorescence sectioning microscope based on polarization filtering image enhancement and dynamic speckle illumination in this article. A new type of polarization filtering image enhancement technology, based on the differences in polarization characteristic between excitation light and fluorescence, is used to filter out the excitation light and enhance image quality. The dynamic speckle illumination is employed to achieve the wide field fluorescence sectioning which has many advantages, such as simple configuration, low cost, rapid response and easy operation. The experimental results indicate that our filtering method can be utilized to improve the image quality significantly, and the dynamic using speckle illumination can be employed to achieve optical sectioning with a wide field and a high vertical resolution capability. Our study is not only to enrich the technological method to extract the weak fluorescence signal from the strong excitation light, but also to provide a significant reference for developing a light wavelength tunable multi-spectral fluorescence microscope with rapid response.

**Keywords:** laser speckle, polarization filtering, fluorescence microscope, optical sectioning

**PACS:** 42.62.Be, 42.30.Ms, 42.25.Ja

**DOI:** 10.7498/aps.62.034203

---

\* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 61108026, 61078067), Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (Grant No. 20114408120001), Foundation for Distinguished Young Talents in Higher Education of Guangdong, China (Grant No. LYM11107) and Science Foundation of Shenzhen University, China (Grant No. 201033).

<sup>†</sup> Corresponding author. E-mail: jlqu@szu.edu.cn