

文章编号:1002-2082(2015)01-0029-06

激光共聚焦近红外荧光扫描系统光学设计

罗刚银,王弼陡,缪 鹏,王 磊,王钟周,钱 庆,钱 俊

(中国科学院 苏州生物医学工程技术研究所,中科院生物医学检验技术重点实验室,中国 江苏 215163)

摘 要:为了实现对近红外荧光的高分辨率扫描,设计了工作在近红外光谱区的激光共聚焦光学系统。采用结构简单的凹凸双透镜物镜实现了照明光路和发射光路的设计,并采用 Zemax 软件进行了光学设计和仿真。实验表明:照明光路的聚焦弥散斑小于 $1\ \mu\text{m}$,照明针孔处的聚焦光斑小于 $40\ \mu\text{m}$,满足照明针孔的尺寸要求;发射针孔处的聚焦光斑小于 $10\ \mu\text{m}$,满足探测针孔尺寸要求;同时照明光路和发射光路的 MTF 曲线的截止频率都分别满足其衍射极限分辨率的要求,照明光路在全视场空间分辨率 $420\ \text{lp/mm}$ 处 $\text{MTF} > 0.08$,发射光路在全视场空间频率 $400\ \text{lp/mm}$ 处 $\text{MTF} > 0.07$ 。

关键词:光学设计;近红外荧光扫描;激光共聚焦;Zemax

中图分类号:TN24;TH703

文献标志码:A

doi:10.5768/JAO201536.0101006

Optical design of near infrared fluorescence confocal laser scanning system

Luo Gangyin, Wang Bidou, Miao Peng, Wang Lei, Wang Zhongzhou,
Qian Qing, Qian Jun

(CAS Key Lab of Bio-Medical Diagnostics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, CAS, Suzhou 215163, China)

Abstract: In order to realize the high resolution scanning for near infrared fluorescence, a laser scanning confocal optical system was designed which worked in the near infrared region. The lighting lens, and emission lens were realized based on simple concave lens and convex lens. The software Zemax was used for the optical design and simulation. Simulation results shows that the focal spot's size of lighting lens is less than $1\ \mu\text{m}$, and the focal spot's size is less than $40\ \mu\text{m}$ at the lighting pinhole position, which meets the lighting pinhole's requirement. The focal spot's size is less than $10\ \mu\text{m}$ at the emission pinhole position, which meets the emission pinhole's requirement. In addition, the cutoff frequency of the lighting lens and emission lens meets the diffraction limit resolution requirement respectively. Therefore, it has high optical transmission efficiency.

Key words: optical design; near infrared fluorescence scanning; confocal laser scanning; Zemax

引言

荧光标记技术是指利用一些能发射荧光的物质(如荧光探针,荧光染料等)共价结合或物理吸附在所研究样本的某个基团(如蛋白分子等)

上,然后利用荧光扫描仪等仪器检测其荧光特性来提供被研究对象的内部结构信息(如抗原抗体分布、浓度等)。用于荧光标记的荧光物质有很多,而其中的近红外荧光染料(near infrared fluo-

收稿日期:2014-08-25; 修回日期:2014-09-18

基金项目:中科院苏州生物医学工程技术研究所“一三五”规划重大突破资助项目(Y052031205);苏州市应用基础研究计划资助项目(SYG201128)

作者简介:罗刚银(1984—),男,四川德阳人,助理研究员,主要从事生物光谱仪器方面的研究。E-mail:luogy1237@sina.com

rescence, NIR)具有独特的优点。近红外荧光染料的发射波长为 700 nm~1 200 nm,在该范围内生物分子自身荧光较弱,可避免背景干扰而获得较高的分析灵敏度。近红外荧光具有较强的穿透能力,能够实现样本的深层检测,近红外荧光对样本造成的光损伤较低,也有利于实现活体检测^[1]。

激光诱导荧光技术(laser induced fluorescence, LIF)是常见的荧光检测技术,而激光共聚焦扫描技术(confocal laser scanning, CLS)是共聚焦技术与 LIF 技术相结合的产物。LIF 技术和 CLS 技术都采用激光作为发射荧光的激发光源,但是 LIF 技术中照明激光和发射荧光不通过同一物镜,激光往往对样本进行斜射照明,是场光源,可用于普通的荧光显微镜;而 CLS 技术中照明激光和发射荧光通过同一物镜,激光往往对样本进行垂直照明,是点光源^[2],可用于激光共聚焦显微镜。相对于 LIF 技术,CLS 技术具有更高的分辨率^[3],并且可以实现深度荧光扫描。

本文根据 CLS 技术的工作原理,针对近红外荧光染料的光谱需求,设计了近红外荧光扫描光学系统,并采用 Zemax 软件对光学设计进行了优化。

1 激光共聚焦工作原理

CLS 技术是利用照明针孔对照明光源的空间滤波和整形作用,形成点光源对样品进行照射,而点光源具有发散小、能量集中等优点,有利于对样品中的荧光物质进行高效激发,这也避免了场光源照射时样品中每一点的荧光激发都会受到邻近点的衍射或散射光干扰的问题。同时,CLS 技术还利用样品中的点光源照射点与探测针孔的共轭关系来实现有用荧光的抗干扰、高精度探测,即只有在焦平面上的点光源照射点所发出的荧光能够通过探测针孔被光电探测元件所接收,而焦平面以外的干扰荧光和散射光不能通过探测针孔。可见,CLS 光学系统中的照明针孔和探测针孔共同聚焦于样品中的点光源照明点,从而实现样品中的激发荧光的高分辨率探测。

CLS 光学系统主要由照明光源、照明光滤光片、照明光聚焦透镜组、照明针孔、准直透镜组、二向色镜、物镜、发射光滤光片、发射光聚焦透镜组、探测针孔、光电探测元件等构成,如图 1 所示。

图 1 中,LASER 为用作照明光源的激光器,

F1 为照明光滤光片,F2 为发射光滤光片,L1 为照明光聚焦透镜组,L2 为准直透镜组,L3 为物镜,L4 为发射光聚焦透镜组,A1 为照明针孔,A2 为探测针孔,D1 为用于照明光和发射光分离的二向色镜,PMT 为用于光电探测的光电倍增管。按照功能划分,CLS 光学系统包括照明光路和发射光路两部分,其中照明光路包括的光学元件有 LASER、F1、A1、L1、L2、L3、D1,而发射光路包括的光学元件有 L3、L4、D1、F2、A2、PMT。

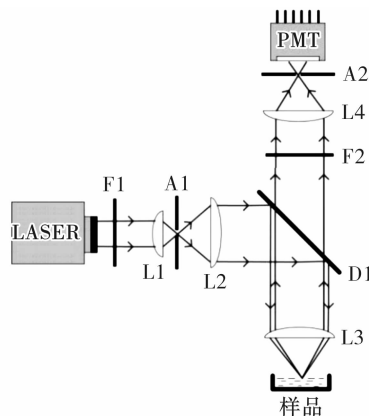


图 1 激光共聚焦工作原理图

Fig. 1 Principle diagram of confocal laser scanning

2 光学系统的设计指标

CLS 光学系统的照明光源是方向性、单色性很好的激光,采用平行入射的方式进入光学系统,因此在光学设计时只需校正轴上点,即 0 视场的球差。具体的设计任务要求如下:

- 1) 视场角 $\omega=0^\circ$,入瞳直径为 8 mm,只校正轴上点球差。
- 2) 工作于近红外波段,其中照明激光光源的波长为 780 nm,发射荧光的波长为 820 nm。
- 3) CLS 光学系统常用的照明针孔和探测针孔的尺寸范围为 $50\ \mu\text{m} \sim 300\ \mu\text{m}$,因此照明光聚焦透镜组 L1 和发射光聚焦透镜组 L2 的焦点弥散斑应该小于 $50\ \mu\text{m}$ 。
- 4) CLS 光学系统的共聚焦焦点的几何弥散斑直径小于 $1\ \mu\text{m}$ 。
- 5) 镜头结构尽量简单。

3 具体光学设计过程

3.1 物镜(L3)光学设计

考虑到单透镜很难校正球差,因此采用凹凸双透镜结构^[4]来设计 CLS 系统的物镜 L3,设置入瞳

直径为 8 mm,角度视场为 0 视场,波长为 780 nm, F 数=1/2。考虑选择一种类似于双胶合透镜的结构,先简单将所有的半径设置为 20 mm,所有的厚度设置为 6 mm,两块透镜分别选择高反射率的玻璃 SF59($n=1.95$)和 ZF14($n=1.92$),如表 1 所示。初始结构的像差曲线、点列图和 MTF 曲线分别如图 2、图 3 和图 4 所示,由以上图示可见,该初始结构的像差很大,由 MTF 曲线也可看出该初始结构的成像质量很差,因此需要校正像差。

表 1 物镜初始结构参数

Table 1 Initial structure of objective

序号	r/mm	d/mm	玻璃材料
1	20	6	SF59
2	-20	6	
3	-20	6	ZF14
4	5.097	6	

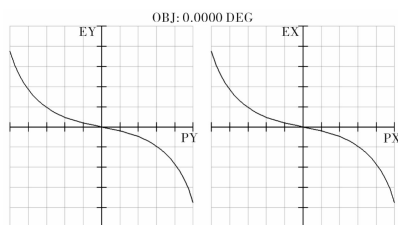


图 2 初始结构的像差曲线

Fig. 2 Ray fan of initial structure

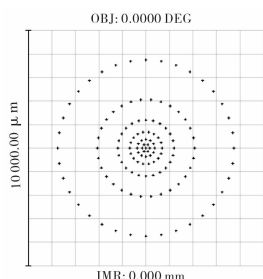


图 3 初始结构的点列图

Fig. 3 Spot diagram of initial structure

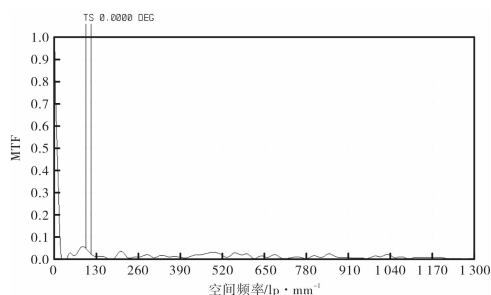


图 4 初始结构的 MTF 曲线

Fig. 4 MTF curves of initial structure

由于本物镜只校正轴上点球差,因此通过设置优化函数进行球差校正,从而得到所需的物镜结构。优化函数的具体设置如下:

1) 设置优化函数为“RMS(均方根)+Spot Radius(像点尺寸)+Centroid(质心点)”。

2) 设置玻璃厚度边界条件为“Min=1,Max=8”。

3) 设置空气间隔边界条件为“Min=1,Max=16”。

4) 增加 LONA 和 SPHA 优化操作数,设置“Target=0,Weight=1”。

5) 将第 1、2、3 面镜的 r 值设置为变量,通过选择最后一面镜的 r 值的 Slope Type 类型 F Number 值为 1/2 来限制物镜的 F 数。

6) 将 4 个面镜的 d 值都设置为变量。

首先采用“Optimization”进行自动优化,然后选择“Hammer Optimization”进一步锤形优化^[5]。优化后的凹凸双透镜物镜的结构参数如表 2 所示,其三维图、像差曲线、点列图分别如图 5、图 6 和图 7 所示。由图 5~图 7 可见,设计的凹凸双透镜物镜的像差很小,光学弥散斑的直径小于 1 μm 。

表 2 优化后的物镜结构参数

Table 2 Optimized structure of objective

序号	r/mm	d/mm	玻璃材料
0	∞ (光阑)		
1	15.187	8	SF59
2	-160.132	5.092	
3	-7.196	8	ZF14
4	-8.779	7.141	

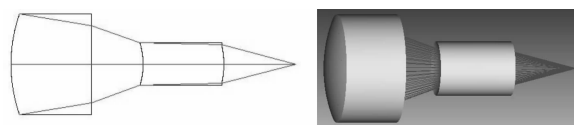


图 5 优化后物镜的三维图与渲染图

Fig. 5 3D layout and shaded model of optimized objective

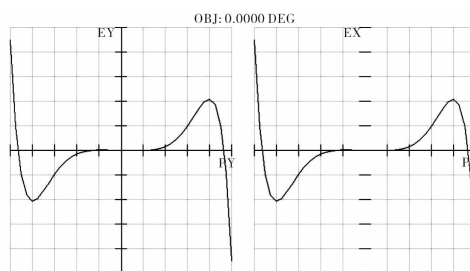


图 6 优化后物镜的像差曲线

Fig. 6 Ray fan of optimized objective

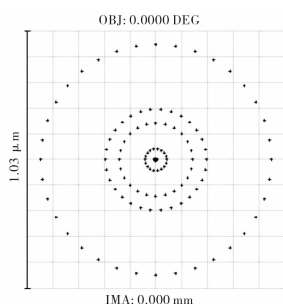


图7 优化后物镜的点列图

Fig. 7 Spot diagram of optimized objective

物镜的数值孔径表征物镜的聚光能力,是物镜的重要性质之一,增强物镜的聚光能力可提高物镜的分辨率。数值孔径 NA 的计算公式如下:

$$NA = n \cdot \sin\theta \quad (1)$$

式中: n 为物镜与观察对象之间介质的折射率;如空气的折射率为 1; θ 为物镜的孔径半角,计算得该物镜的数值孔径值为 0.24。

数值孔径 NA 是显微镜物镜最主要的光学特性,它决定了物镜的衍射分辨率 $\delta^{[6]}$ 的大小,其计算公式为

$$\delta = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad (2)$$

该物镜的工作波长为 780 nm,因此其衍射分辨率为 $1.98 \mu\text{m}$ 。优化后的物镜的 MTF 曲线如图 8 所示,可见其在全视场空间频率 $N=1/\delta=504 \text{ lp/mm}$ 处的 $MTF>0.1^{[7]}$,因此具有极高的分辨率。

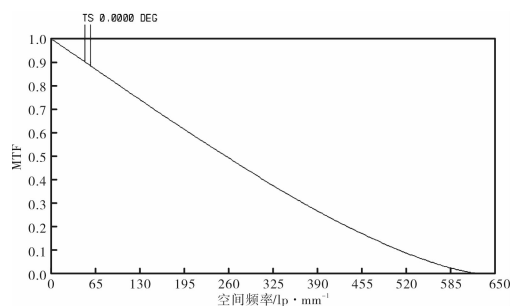


图8 优化后物镜的 MTF 曲线

Fig. 8 MTF curves of optimized objective

由于该物镜只是照明光路和发射光路的一部分,还需要分别和照明光路、发射光路一起校正球差,因此该物镜的参数结构在照明光路和发射光路的设计过程中还会继续做调整。

1.2 照明光路(F1、A1、L1、L2、L3)设计

为了简化光路,选择单凸透镜设计照明光聚焦透镜组 L1,玻璃材料依然选择 SF59。单凸透

镜结构参数如表 3 所示,其三维图与渲染图如图 9 所示,点列图如图 10 所示。该照明光聚焦透镜组 L1 的会聚光斑的点列图小于 $40 \mu\text{m}$,因此完全满足目前激光共聚焦常用照明针孔直径为 $50 \mu\text{m} \sim 300 \mu\text{m}$ 的实际应用需求。同时,由于所采用单凸透镜的第 2 面镜为平面,因此也进一步降低了该透镜的加工和安装要求。

表3 单凸透镜结构参数

Table 3 Structure of single convex lens

序号	r/mm	d/mm	玻璃材料
0	∞ (光阑)		
1	31.746	8.052	SF59
2	∞	30.080	

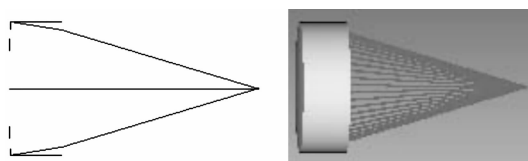


图9 单凸透镜的三维图与渲染图

Fig. 9 3D layout and shaded model of single convex lens

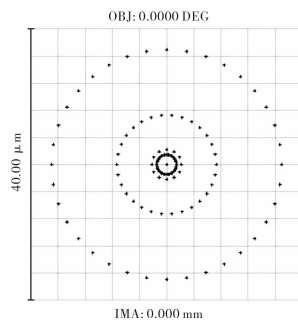


图10 单凸透镜的点列图

Fig. 10 Spot diagram of single convex lens

同样,采用单凸透镜设计准直透镜组 L2,其初始结构与表 3 相同,并添加二向色镜的反光面和物镜 L3,得到照明光路的初始结构。为进一步优化该照明光路,保持照明光聚焦透镜组 L1 的光学结构固定不变,设置准直透镜组 L2 的凸面(第 4 面)和物镜 L3 的 4 个面(第 6、7、8、9 面)的 r 值为变量,设置 L2 的玻璃厚度 d 值为变量,同时设置 L3 的玻璃厚度 d 值和空气间隔 d 值为变量。先采用“Optimization”进行自动优化,然后选择“Hammer Optimization”进一步锤形优化,通过改变 r 值、 d 值的方法来优化照明光路结构,优化后的照明光路结构参数如表 4 所示,其三维图和渲染图如图 11 所示。

表 4 优化后的照明光路结构参数

Table 4 Optimized structure of lighting lens			
序号	r/mm	d/mm	玻璃材料
0	∞ (光阑)		
1	31.746	8.052	SF59
2	∞	80.160	
3	∞	4.493	SF59
4	-34.530	10	
5	∞	10	MIRROR
6	-20.384	3.793	SF59
7	-574.575	9.532	
8	6.228	5.322	ZF14
9	8.235	9.831	

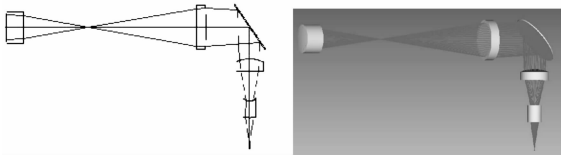


图 11 照明光路的三维图与渲染图

Fig. 11 3D layout and shaded model of lighting lens

优化后的照明光路的像差曲线、点列图、MTF 曲线分别如图 12、图 13 和图 14 所示。由图 12~图 14 可见该照明光路的弥散斑尺寸小于 $1\text{ }\mu\text{m}$ 。另外,物镜 L3 的参数结构在照明光路像差校正的过程中已经重新调整,其数值孔径为 0.2,工作波长为 780 nm ,由公式(2)计算可得照明光路的衍射

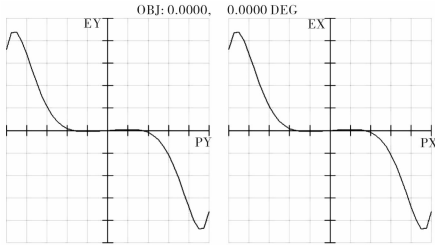


图 12 照明光路的像差曲线

Fig. 12 Ray fan of lighting lens

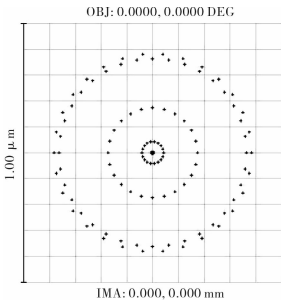


图 13 照明光路的点列图

Fig. 13 Spot diagram of lighting lens

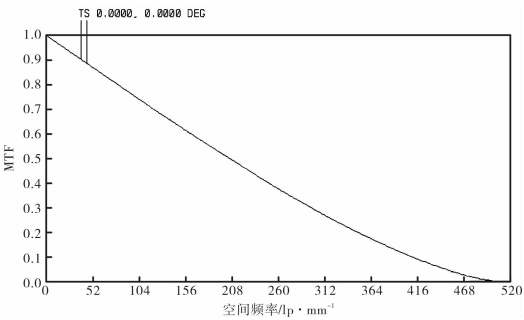


图 14 照明光路的 MTF 曲线

Fig. 14 MTF curve of lighting lens

分辨率为 $2.38\text{ }\mu\text{m}$,因此由图 13 可知,其在全视场空间频率 $N = 1/\delta = 420\text{ lp/mm}$ 处的 $\text{MTF} > 0.08^{[7]}$,因此该照明光路具有极高的点光源分辨率。

1.3 发射光路设计

为了简化光路,同样选择凹凸双透镜设计发射光聚焦透镜组 L4,其初始结构与物镜 L3 相同,并添加物镜 L3 和二向色镜的折射面,选择二向色镜 D1 和发射光滤光片 F2 的玻璃材质为 BK7,设置物方数值孔径为 0.2,得到其发射光路的初始结构。为进一步优化该发射光路,设置发射光聚焦透镜组 L4 的 4 个面(第 9、10、11、12 面)的 r 值为变量,设置 L4 的两块玻璃厚度 d 值和空气间隔 d 值为变量,同时设置 L4 的两块玻璃材料为变量(选择 Slove Type 类型为 Substitute)。首先采用“Optimization”进行自动优化,然后选择“Hammer Optimization”进一步锤形优化,通过改变 r 值、 d 值和玻璃材料的方法来优化发射光路结构,优化后的发射光路结构参数如表 5 所示,其三维图和渲染图如图 15 所示。

表 5 优化后的发射光路结构

Table 5 Optimized structure of emission lens			
序号	r/mm	d/mm	玻璃材料
物面	∞	9.831	
1	8.235	5.322	
2	6.228	9.532	ZF14
3	-574.575	3.793	SF59
4	-20.384	10	
5	∞	1	BK7(二向色镜)
6	∞	15	
7	∞	1	BK7(滤光片)
8	∞	10	
9	45.889	3.681	ZF14
10	-437.351	10	
11	24.715	9.315	F2
12	80.918	20.848	

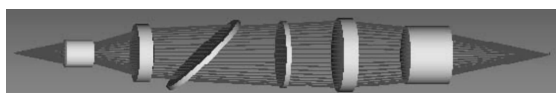


图 15 发射光路的三维图与渲染图

Fig. 15 3D layout and shaded model of emission lens

优化后的发射光路的点列图、MTF 曲线分别如图 16 和图 17 所示。可见该发射光路的弥散斑尺寸小于 $10\ \mu\text{m}$, 完全满足目前激光共聚焦常用探测针孔直径为 $50\ \mu\text{m} \sim 300\ \mu\text{m}$ 的实际应用需求。同时, 由于物镜 L3 的数值孔径为 0.2, 发射光路工作波长为 $820\ \text{nm}$, 由公式(2)计算可得发射光路的衍射分辨率为 $2.5\ \mu\text{m}$, 由图 16 可知, 其在全视场空间频率 $N=1/\delta=400\ \text{lp/mm}$ 处的 $\text{MTF} > 0.07^{[7]}$, 因此该发射光路具有极高的光学传输效率。

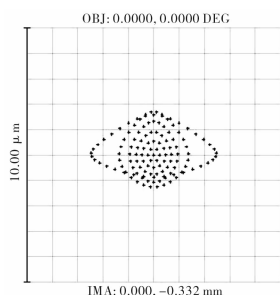


图 16 发射光路的点列图

Fig. 16 Spot diagram of emission lens

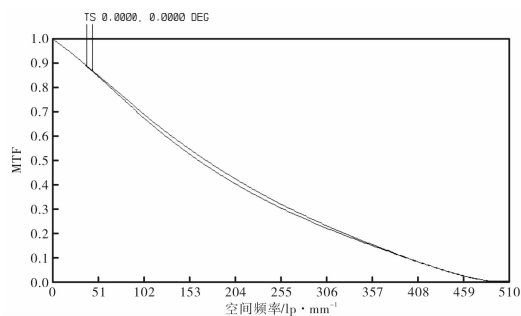


图 17 发射光路的 MTF 曲线

Fig. 17 MTF curves of emission lens

4 结论

本文采用激光共聚焦原理设计了近红外荧光扫描系统, 采用结构简单的凹凸双透镜物镜实现了照明光路和发射光路的设计。其中, 照明光路的聚焦弥散斑小于 $1\ \mu\text{m}$; 照明针孔处的聚焦光斑尺寸小于 $40\ \mu\text{m}$, 满足照明针孔的尺寸要求; 发射针孔处的聚焦光斑小于 $10\ \mu\text{m}$, 满足探测针孔尺寸要求; 同时照明光路和发射光路的 MTF 曲线的截

止频率都分别满足其衍射极限分辨率的要求, 具有较高的光学传输效率。因此, 该光学系统具有结构简单、工作于近红外光谱区、分辨率高的优点, 可满足生物芯片、基因芯片等对激光共聚焦近红外荧光扫描系统的需求。另外, 本光学系统中物镜的数值孔径较小, 因此还可以采用较为复杂的显微物镜来进一步提高系统的数值孔径, 从而进一步提高激光共聚焦光学系统的光学分辨率和荧光探测效率。

参考文献:

- [1] Duan Xia, Synthesis and application of NIR fluorescence dye for biological analysis[D]. Jinan: Shandong Normal University, 2009.
段霞. 用于生物分析的近红外荧光染料合成与应用[D]. 济南: 山东师范大学, 2009.
- [2] Huo Xia, Lyu Jianxun, Yang Rendong, et al. Comparison of laser scanning confocal microscope with light microscope[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2001, 10(2): 76-79.
霍霞, 吕建勋, 杨仁东, 等. 激光共聚焦显微镜与光学显微镜之比较[J]. 激光生物学报, 2001, 10(1): 76-79.
- [3] Hu Maohai, Yang Xiao-chun. High-speed laser scanning control system for confocal microscopy[J]. Journal of Applied Optics, 2011, 32(4): 797-800.
胡茂海, 杨晓春. 共聚焦显微镜激光高速扫描控制系统设计及实现[J]. 应用光学, 2011, 32(4): 797-800.
- [4] Fan Yingjuan, Zhang Yanjun. Design of He-Ne laser beam focusing lens based on Zemax[J]. Journal of Applied Optics, 2010, 31(6): 1032-1035.
范应娟, 张艳军. 基于 Zemax 的 He-Ne 激光光束聚焦物镜的设计[D]. 应用光学, 2010, 31(6): 1032-1035.
- [5] Lin Xiaoyang. Super manual of ZEMAX optical design[M]. Beijing: Posts & Telecom Press, 2014.
林晓阳. ZEMAX 光学设计超级学习手册[M]. 北京: 人民邮电出版社, 2014.
- [6] Liu Jun, Gao Ming. Optic design[M]. Xi'an: Xi'an University of Electronic Technology Press, 2006.
刘钧, 高明. 光学设计[M]. 西安: 西安电子科技大学出版社, 2006.
- [7] Xiao Zexin. System and application of optical mechanical and electrical integration[M]. Guangzhou: South China University of Technology Press, 2011.
萧泽新. 光机电一体化系统及应用[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2011.