

文章编号:1002-2082(2017)01-0031-06

基于数字微镜的快速轴向扫描系统

詹维纳,卢景琦,刘杨贊,贾信庭,陶 琨

(武汉理工大学 理学院,湖北 武汉 430070)

摘要:为解决双光子荧光显微成像系统轴向扫描问题,提出一种基于数字微镜(DMD)的快速轴向扫描系统。该系统采用DMD选择光路,不同光路放置不同焦距的透镜组对光束发散角产生不同的改变,经物镜聚焦后得到不同深度的轴上扫描点。对该系统的轴向扫描距离、扫描点位置及衍射效率进行了理论计算仿真,结果表明:扫描系统采用4个模块以及5个模块时其轴向扫描距离均可达到1 mm,4模块系统中透镜的焦距为297.3 mm,5模块系统中透镜焦距为361.47 mm。轴向扫描点除边缘点外线性分布,轴向扫描频率达到几十 kHz,满足脑神经成像的要求。

关键词:光学设计;轴向扫描;ZEMAX;双光子荧光显微成像;DMD

中图分类号:TN202

文献标志码:A

doi:10.5768/JAO201738.0101006

Fast axial scanning system based on digital micromirror device

Zhan Weina, Lu Jingqi, Liu Yangzan, Jia Xinting, Tao Jun

(School of Science, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China)

Abstract: Aiming at solving axial scanning problem of dual photon fluorescence microscopy imaging system, fast axial scanning system based on digital micromirror device (DMD) is proposed in this paper. DMD is used for selecting optical path in this system, and lens groups with different focal lengths are placed in these optical paths to generate different changes of beam divergence angle. Then axial scanning spots with different depth are obtained after beam focused by objective lens. Axial scanning distance, scanning spot and diffraction efficiency are calculated and simulated. Results show that when scanning system adopts four modules or five modules, axial scanning distance can reach 1mm, focal length of lens in four modules and five modules is 297.3 mm and 361.47 mm respectively. Axial scanning spot varies in good linearity except marginal spot. Axial scanning frequency approaches to dozens of kilohertz. This scanning system can meet requirements of cranial nerve imaging.

Key words: optical design; axial scanning; ZEMAX; two photon fluorescence imaging system; DMD

引言

双光子荧光显微成像系统是对标记的样品进行双光子激发后产生的荧光进行成像,以实现对

样品的三维扫描。双光子荧光显微镜是目前对活体生物细胞等进行观测的有效工具^[1-3],具有探测深度大、分辨率高、对生物组织光损伤小等优点。

收稿日期:2016-07-21; 修回日期:2016-08-29

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金(2016IB004)

作者简介:詹维纳(1992—),男,河南信阳人,硕士研究生,主要从事双光子荧光显微系统中快速轴向扫描方法的研究。

E-mail:1367054103@qq.com

通信作者:卢景琦(1972—),男,教授,主要从事激光技术及生物光子学方面的研究。E-mail: Lujingqi@whut.edu.cn

生物神经信号传导时,神经纤维两侧的钙离子浓度会发生变化,用荧光蛋白等物质标记钙离子,经激光激发产生荧光,探测荧光的变化即可观察钙离子浓度的变化,相应地观察神经信号的传导过程。神经信号分布在三维空间中,其传导速度很快,一般在 ms 量级,在探测激光激发荧光信号的时候,荧光显微成像系统的扫描速度要尽可能地快。

在双光子荧光显微成像系统的三维扫描结构中,横向二维扫描因研究时间相对较长,目前已经比较成熟。而轴向扫描虽然已有多种方案提出,但都存在一定的缺陷。传统的采用移动物镜的方法,受限于驱动器以及物镜的机械惯性,其扫描速度很难达到 kHz 量级^[4]。根据运动液体变焦透镜的变焦功能^[5],基于这种透镜的扫描方法受限于液体表面曲率精度不足,对温度变化敏感,以及液体的迟滞效应,扫描速度有限。利用空间光调制器的相位调制能力,模拟不同焦距透镜的相位来改变焦距以实现焦点在光轴上的移动^[6],但空间光调制器的刷新率一般只有几十到几百 Hz。采用可变形镜的扫描方法,利用可变形镜的镜面变形能力改变镜面曲率,进而改变光束的发散角,光束聚焦后有不同的焦点^[7-8]。这种方法受限于可变形镜所使用的压电陶瓷等驱动器,在大冲程的情况下速度很慢,致使镜面曲率在改变较大时速度较慢,达不到快速扫描,无法满足脑神经功能成像等领域的扫描速度要求。电光晶体的扫描方法^[9-10]受限于电光晶体的通光孔径,而采用多个声光偏转器的扫描方法为保证衍射效率,轴向扫描范围较小,同时多个声光偏转器引入较多的色散,激光脉冲展宽明显,无法满足一般的扫描要求^[11-13]。本文提出一种以克服以上缺点的快速轴向扫描方法,并进行了详细计算和仿真。

1 基于 DMD 的快速轴向扫描系统

数字微镜器件(digital micromirror device, DMD)是一种高速光开关器件,主要由多个高速数字式光反射开关组成。这些光反射开关通过一定的排列方式集成光开关阵列,工作原理如图 1 所示。DMD 的核心工作单元是微反射镜,这种微反

射镜体积很小,大部分为正方形。利用集成电路技术在硅衬底上制出随机存储器(random access memory, RAM),微镜的转动由它下面的存储器单元的状态来控制,当存储器单元处于“1”状态即“on”状态时,微反射镜绕着其下面的铰链偏转+12°,当存储器单元处于“0”状态即“off”状态时,微反射镜偏转-12°。微反射镜片的尺寸仅有数十 μm,因此在工作时其响应速度极快,其响应时间可达到十几 μs。

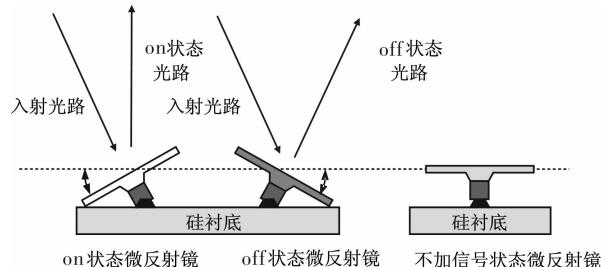


图 1 微反射镜工作原理图

Fig. 1 Working principle of micro mirror

基于 DMD 的轴向扫描系统原理图如图 2 所示。以 DMD 来选择光路,DMD 作为光开关有 2 种状态,相对应的有 2 条光路可以选择,这 2 条光路中一条放置一定焦距的透镜组,一条不放置任何透镜或者放置与前面一条光路中的透镜组焦距不同的透镜组。因此光束在 DMD 的不同选通状态下通过不同的光路后,光束的发散角将会不同,通过聚焦物镜后得到不同的聚焦点,即对应不同的轴向扫描深度。

对于单独的模块来说,DMD 的工作方式决定单独模块只能有 2 个轴上扫描点,这远远达不到成像扫描的需求,因此采用多模块级联的方式来增加扫描深度。模块级联的方式为在一个模块的后面根据需求依次加上多个模块,光束通过每一个模块都有 2 种不同的发散角,相对应的 2 个不同的聚焦点。通过 n 个模块之后整套系统就有 2^n 个焦距,相对应的就有 2^n 个轴上聚焦点。

1.1 轴向扫描距离

对整个系统而言,其由多个单独模块集成而成,根据光学传输矩阵理论,理想球面透镜近轴光线变换矩阵为

$$F = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{f} & 1 \end{bmatrix} \quad (1)$$

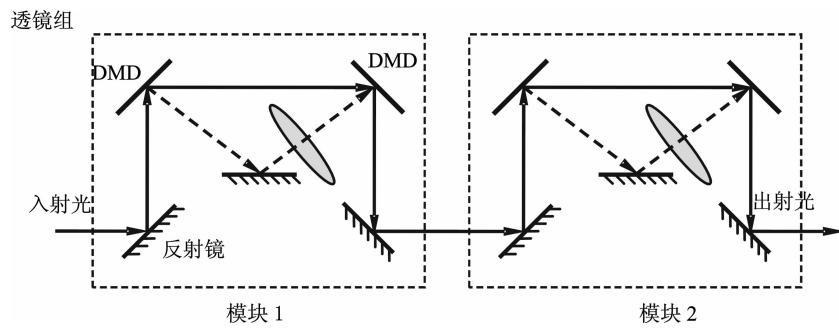


图 2 基于 DMD 的快速轴向扫描方法原理图

Fig. 2 Fast axial scanning method based on DMD

式中 f 为透镜的焦距。

空气中光线传播一段距离 l 的变换矩阵为

$$L = \begin{bmatrix} 1 & l \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (2)$$

光线经过 n 个模块之后, 在最后一个透镜的表面上有:

$$\begin{bmatrix} r_{2n-1} \\ \theta_{2n-1} \end{bmatrix} = F_1 L_1 F_2 L_2 \cdots F_{n-1} L_{n-1} F_n \begin{bmatrix} r_1 \\ \theta_1 \end{bmatrix} = T_1 T_2 \cdots T_{n-1} F_n \begin{bmatrix} r_1 \\ \theta_1 \end{bmatrix} \quad (3)$$

对于薄透镜, 从透镜出射的光线在光轴上的焦点到出射面的距离表示为

$$L = \frac{r}{\tan \theta} \quad (4)$$

根据(1)式~(4)式即可计算每一个轴向扫描点在光轴上的位置。

一般在实际应用中, 为了匹配物镜, 将扫描器件通过扫描镜和筒镜成像于物镜的前焦面上, 其简化光路图如 3 所示。图中, f_o 为透镜组焦距, f_s 为透镜组像的焦距, f_t 为扫描镜焦距, f_w 为物镜的焦距。以透镜组的模型替代轴向系统中 n 个模块对光束发散角的改变效果。

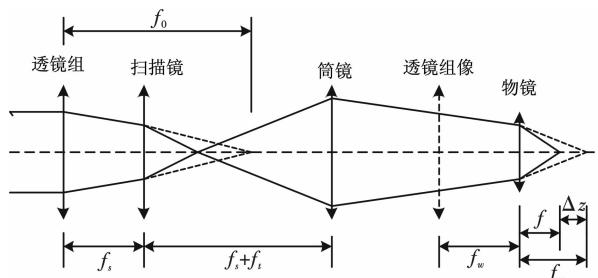


图 3 轴向扫描系统等效光路图

Fig. 3 Equivalent optical path of axial scanning system

透镜组经扫描镜和筒镜组成的光束准直装置

成像于物镜的前焦面上, 其像为图 3 中的透镜组像, 根据几何光学原理:

$$f_x = m^2 f_o \quad (5)$$

式中 m 为扫描镜和筒镜的放大倍数。

成像透镜可以等效为一个实际的透镜, 根据透镜成像公式得到系统的焦距:

$$f = \frac{f_w (f_w - f_x)}{d - f'_o - f_w} \quad (6)$$

则轴向扫描距离为

$$\Delta z = f_w - f = \frac{f_w^2}{f'_o} \quad (7)$$

将(5)式代入(7)式中, 系统轴向扫描范围表示为

$$\Delta z = \frac{f_w^2}{m^2 f_o} \quad (8)$$

因此, 对整个轴向扫描系统, 根据系统中模块的个数以及模块的工作状态, 利用(8)式即可求得其轴向扫描范围。

1.2 衍射效率

由于 DMD 是由多个微镜组装在一起, 微镜的尺寸很小, 因此光束照射到 DMD 上时衍射现象明显, 可以将微镜看作是一个二维衍射光栅。假设 DMD 在 2 个方向的个数分别为 N 和 P , DMD 的边长为 a , 相邻微镜中心距离为 d , 根据二维光栅理论^[14], 以单位振幅的光波入射到 DMD 的平面上时, 频谱面上的复振幅可以表示为

$$\begin{aligned} T(u, v) = & T_u(u, v) \text{comb}(\Lambda_x u) \text{comb}(\Lambda_y v) = \\ & T_u(u, v) \frac{1}{\Lambda_x} \sum_{N=-\infty}^{\infty} \delta(u - \frac{N}{\Lambda_x}) \frac{1}{\Lambda_y} \cdot \\ & \sum_{P=-\infty}^{\infty} \delta(v - \frac{P}{\Lambda_y}) \end{aligned} \quad (9)$$

式中: Λ_x, Λ_y 分别表示 x 方向和 y 方向的光栅周期; T_u 为透过率函数的傅里叶变换。则衍射级次

(n_1, n_2) 的衍射效率可以表示为

$$\eta_{n_1, n_2} = |T(u, v)|^2 = \left| \frac{1}{\Lambda_x \Lambda_y} T_u \left(\frac{n_1}{\Lambda_x}, \frac{n_2}{\Lambda_y} \right) \right|^2 \quad (10)$$

对于 DMD, $\Lambda_x = d, \Lambda_y = d$, 则有:

$$t_0(x, y) = \text{rect}\left(\frac{x}{F_x \Lambda_x}, \frac{y}{F_y \Lambda_y}\right) (e^{-i\varphi} - 1) + \text{rect}\left(\frac{x}{\Lambda_x}, \frac{y}{\Lambda_y}\right) \quad (11)$$

式中 F_x, F_y 为 2 个方向的占空比, $F_x = F_y = \frac{a}{d}$ 。

则衍射效率:

$$\begin{aligned} \eta_{n_1, n_2} &= \left| \frac{1}{\Lambda_x \Lambda_y} T_u \left(\frac{n_1}{\Lambda_x}, \frac{n_2}{\Lambda_y} \right) \right|^2 = 4 \left(\frac{\sin(\pi n_1 F_x)}{\pi n_1} \cdot \right. \\ &\quad \left. \frac{\sin(\pi n_2 F_y)}{\pi n_2} \right)^2 (\sin \frac{\varphi}{2})^2 + 4 \left(\frac{\sin(\pi n_1)}{\pi n_1} \cdot \right. \\ &\quad \left. \frac{\sin(\pi n_1)}{\pi n_1} \right) \left(\frac{\sin(\pi n_1 F_x)}{\pi n_1} \frac{\sin(\pi n_2 F_y)}{\pi n_2} \right) \cdot \\ &\quad (\sin \frac{\varphi}{2})^2 + \left[\frac{\sin(\pi n_1)}{\pi n_1} \frac{\sin(\pi n_2)}{\pi n_2} \right]^2 \end{aligned} \quad (12)$$

2 仿真分析

2.1 系统光路仿真分析

在 ZEMAX 中, 对系统单个模块的光路进行仿真, DMD 处于 on 和 off 状态下的光路如 5 图所示。

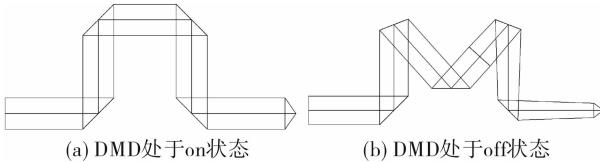


图 4 系统光路仿真图

Fig. 4 Optical path simulation with one modular

在 ZEMAX 中对整个系统进行仿真, 每一个模块对光束发散角的作用等效于一个透镜, 模块内部光程为 10 mm, 物镜采用奥林巴斯公司的 UMPLFLN20XW 显微物镜, 其工作距为 3.5 mm, 放大倍率为 20 \times , 其匹配筒镜的焦距为 180 mm, 根据(8)式轴向扫描距离与筒镜和扫描镜的放大倍数的平方成反比, DMD 有较大的通光孔径, 因此并不需要对光束放大, 所以 $m=1$ 。一般双光子荧光显微镜的样品穿透距离在 1 mm, 假定轴向扫描距离为 1 mm, 采用 4 个模块, 距离物镜最近的轴上扫描点为 4 个模块里面的 DMD 都处

于 off 状态, 经过计算每一个模块等效透镜的焦距为 297.3 mm, 光路图 5 如所示。以轴上扫描点距离物镜最后一个面的距离表示轴上扫描点的位置, 以轴上扫描点距离物镜最后一个面的距离的大小对轴上扫描点进行排序, 图 6 所示为轴上各扫描点在轴上的位置分布图, 可以看到, 除了边缘点之外, 轴上扫描点基本上呈线性分布。

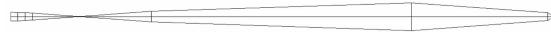


图 5 模块数为 4 时系统仿真图

Fig. 5 Optical path simulation of scanning system with 4 modules

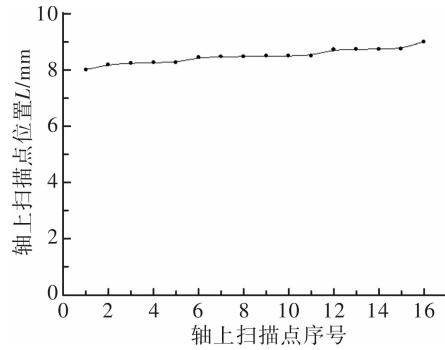


图 6 四模块轴上扫描点位置变化图

Fig. 6 Position of scanning point on axis with 4 modules

模块数增加为 5 个, 若要达到 1 mm 的轴向扫描距离, 经过计算模块等效透镜的焦距为 361.47 mm, 系统光路图如图 7 所示, 系统的轴向扫描点有 $2^5 = 32$ 个。



图 7 模块数为 5 时系统仿真图

Fig. 7 Optical path simulation of scanning system with 5 modules

图 8 所示为 32 个轴向扫描点在光轴上的位置, 可以看出, 除了边缘扫描点之外, 其余轴向扫描点具有良好的线性关系。

对比图 6 和图 8 可以得知, 在轴向扫描距离一定的情况下, 模块数越多, 轴向扫描点的间距就越小, 可以获得接近连续的轴向扫描。

2.2 衍射效率分析

选用超高速 V 系列 DMD(型号为 V-7001), 在实际应用中需要考虑衍射效率以及微反射镜的吸收等问题, 因此根据相关资料及计算, 单个

DMD 的光能利用率为 70%。采用多个模块级联时的光能利用率与模块数的关系如图 9 所示,随着系统中 DMD 数量的增加,系统的光能利用效率降低。

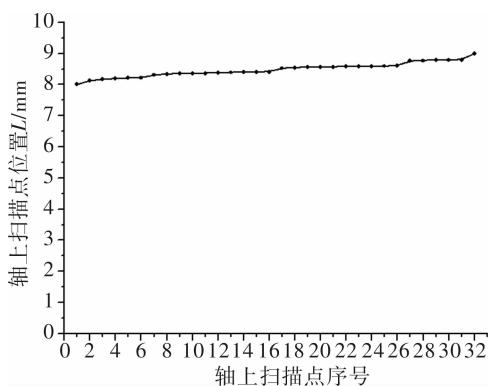


图 8 各扫描点位置变化图

Fig. 8 Position of scanning point on axis with 5 modules

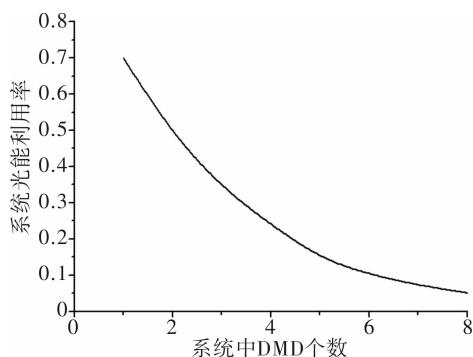


图 9 系统光能利用率与系统中 DMD 的个数关系

Fig. 9 Relationship between system energy utilization and DMD numbers

3 结论

基于数字微镜器件,本文提出了一种快速轴向扫描系统。该系统使用 DMD 作为光开关切换光路,不同光路对光束发散角的改变不同,经聚焦后具有不同深度的轴向扫描点。对该系统的轴向扫描距离、扫描点位置及衍射效率进行了理论计算仿真,结果表明:系统中有 4 个模块以及 5 个模块时轴向扫描距离均可达到 1 mm,并且轴向扫描点除边缘点外具有良好的线性,轴向扫描频率达到几十 kHz,满足脑神经成像方面的要求。系统的光能利用效率随着系统中模块数的增加而减少,因此在实际运用中需要根据扫描距离及样品能够承受的光强度等方面综合考虑轴向扫描系统中的模块个数。本文提出的轴向扫描系统克服了

已有的扫描方法的一些缺点,扫描频率高,轴向扫描距离长。采用模块化的设计,方便用户升级改造并且可以和不同的显微镜系统匹配集成,从而广泛应用于超高分辨率光学探测、生物荧光显微、细胞三维成像、超精密加工等前沿科学和工程领域中。

参考文献:

- [1] Masters B R, So P T, Gratton E. Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin[J]. Biophysical Journal, 1997, 72 (2): 2405-2412.
- [2] Bewersdorf J, Pick R, Hell S W. Multifocal multiphoton microscopy[J]. Optics Letters, 1998, 23 (9): 655-7.
- [3] Denk W, Delaney K R, Gelperin A, et al. Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy [J]. Journal of Neuroscience Methods, 1994, 54(2): 151-62.
- [4] Botcherby E J, Juskaitis R, Booth M J, et al. An optical technique for remote focusing in microscopy [J]. Optics Communications, 2008, 281 (4): 880-887.
- [5] Zhang Yunbo, Hou Wenmei, Zheng Jihong. Design and simulation of confocal detection system utilizing tunable-focus liquid lens[J]. Journal of Applied Optics, 2012, 33(1): 14-18.
张运波,侯文玫,郑继红.采用变焦液体透镜的共焦检测系统的设计与仿真[J].应用光学,2012, 33 (1): 14-18.
- [6] Li Dianmeng. Research of confocal scanning method based on phase-only liquid crystal spatial light modulator [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2013.
李佃蒙.基于纯相位液晶空间光调制器的共焦扫描方法研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2013.
- [7] Dong Weihui, Xie Yongjun, Li Enling. Design of co-axial catadioptric zoom system using deformable mirrors[J]. Journal of Applied Optics, 2010, 21 (6): 893-897.
董伟辉,谢永军,李恩玲.利用镜面形变实现共轴折反射式变焦光学系统设计[J].应用光学,2010, 31 (6): 893-897.
- [8] Hu Shaolei. Based on active optical imaging technology for space zoom[D]. Xi'an: Xi'an Institute of Op-

- tics and Precision Mechanics of CAS,2012.
- 胡少磊. 基于主动光学的空间变焦成像技术研究[D]. 西安: 中国科学院西安光学精密机械研究所, 2012.
- [9] Grewe B F, Voigt F F, Hoff M V, et al. Fast two-layer two-photon imaging of neuronal cell populations using an electrically tunable lens[J]. Biomed Opt. Express, 2011, 2(7): 2035-2046.
- [10] Du Rui. The study of axial random-access laser scanning scheme in two photo microscopy[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2011.
- 杜睿. 双光子轴向随机扫描方法研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2011.
- [11] Kirkby P A, Srinivas N K M, Silver R A. A compact acousto-optic lens for 2D and 3D femtosecond based 2-photon microscopy [J]. Optics Express, 2010, 18(13):13721-45.
- [12] Lyu Xiaohua. Research on the random access two-photon fluorescence microscope[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology,2006.
- 吕晓华. 随机扫描双光子荧光显微成像系统研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2006.
- [13] Jiang Runhua. On the wide-band acousto-optic deflector for two-photon microscopy[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology,2012.
- 姜润华. 用于双光子显微成像的宽带声光偏转器研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.
- [14] Li Jinpeng,Chen Lei,Fang Bo,et al. Diffraction efficiencies of phase gratings based on dynamic Interferometer[J]. Infrared and Laser Engineering,2015,44(9):2696-2701.
- 李金鹏,陈磊,方波,等. 动态干涉仪的位相光栅衍射效率研究[J]. 红外与激光工程, 2015, 44(9): 2696-2701.