

13. Кондратенко А. Н.//Поверхностные и объемные волны в ограниченной плазме. М., 1985.
14. Moisan M., Hubert J., Margot J. et al.//NATO Adv. Sci. Inst. Series. 1993. 302. P. 1.
15. Benova E., Zhelyazkov I.//Phys. Scripta. 1991. 43. P. 68.
16. Boisse-Laporte C.//NATO Adv. Sci. Inst. Series. 1993. 302. P. 25.

Поступила в редакцию
30.06.95

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 3, ФИЗИКА. АСТРОНОМИЯ. 1996. № 2

ОПТИКА И СПЕКТРОСКОПИЯ

УДК 532.42

РАСЧЕТ ПАРАМЕТРОВ КОНФОКАЛЬНОГО КР-МИКРОСКОПА

С. Ю. Аржанцев, Д. А. Рузметов, А. Ю. Чикишев

(кафедра общей физики и волновых процессов)

Описывается метод расчета параметров оптической схемы конфокального КР-микроскопа. Предложен способ подбора оптимальных параметров для конкретной экспериментальной установки. Проведено сравнение результатов теоретического расчета с имеющимися экспериментальными данными.

Введение

Развитие лазерных источников излучения вызвало огромный интерес к исследованию биологических систем методом спектроскопии комбинационного рассеяния (КР). Для получения информации о процессах, происходящих в живой клетке, используются различные типы микроскопов. Соединение микроскопической техники со спектроскопией КР позволяет определять конформацию молекулы в клетке, изучать взаимодействие молекул с различными клеточными органеллами. Существенными недостатками спектроскопии КР являются малое сечение рассеяния и наличие фона, связанного в основном с флуоресценцией. Использование резонансного возбуждения молекул позволяет увеличить КР-сигнал. При исследовании живых клеток фон от раствора, необходимого для поддержания жизнеспособности клетки, может значительно превышать КР-сигнал. Применение конфокального микроскопа позволяет ограничить объем образца, образующего сигнал.

В конфокальных микроскопах используются точечные осветитель и детектор. Точечность детектора обеспечивается диафрагмой в плоскости изображения. В таких микроскопах осветитель и конденсатор играют равные роли в формировании изображения объекта, что и позволяет улучшать линейное разрешение вдоль оси Z .

В настоящее время существует два подхода к теоретическому описанию формирования трехмерного изображения в конфокальных микроскопах. В основе первого лежит параксиальное приближение скалярной теории дифракции [1], во втором — векторная теория дифракции [2]. В обоих случаях полученные интегралы не имеют решений в аналитическом виде, что значительно затрудняет использование результатов других авторов. К тому же конкретный вид интеграла зависит от оптической схемы микроскопа.

Для увеличения отношения сигнал/фон необходимо подобрать параметры оптической схемы КР-микроскопа так, чтобы диафрагма не уменьшала полезный сигнал, но в то же время обеспечивала достаточно точное разрешение вдоль оси Z .

В данной статье рассчитываются параметры оптической схемы конфокального КР-микроскопа в параксиальном приближении скалярной дифракционной теории, оценивается объем, образующий сигнал, и на основе сделанных расчетов оптимизируется оптическая схема.

Теория

Рассмотрим установку для измерения КР-спектров микрообъектов, изображенную на рис. 1. Лазерный луч поступает на линзу L_1 и фокусируется объективом L_2 на объекте, рассеянный свет от которого собирается тем же объективом, проходит через диафрагму D и регистрируется детектором. Представленную на рис. 1 оптическую схему

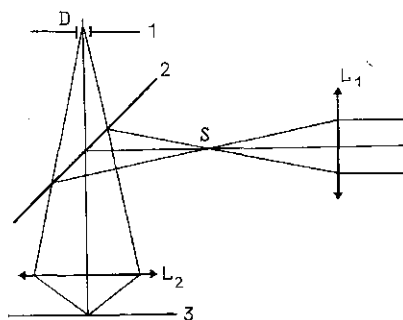


Рис. 1. Оптическая схема конфокального микроскопа: D — конфокальная диафрагма, L_1 — коллиматор, L_2 — эквивалентная линза (объектив микроскопа), S — перетяжка лазерного пучка, 1 — плоскость изображения, 2 — селективное зеркало, 3 — предметная плоскость,

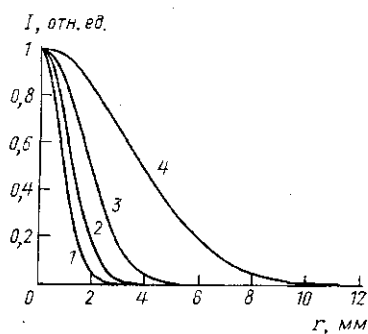


Рис. 2. Распределение интенсивности лазерного пучка в плоскости входного зрачка объектива для различных фокусных расстояний коллимирующей линзы: $f_1=5$ (1), 10 (2), 15 (3) и 20 см (4)

можно отнести согласно [1, 3] к конфокальным микроскопам (КМ). В этой схеме точечным источником можно считать перетяжку лазерного пучка S , расположенную в фокусе линзы L_1 , а точечность детектора обеспечивает диафрагма D . Объектив L_2 играет роль одновременно осветительной и приемной линзы, что автоматически обеспечивает конфокальность микроскопа. Для промышленных объективов известно их линейное увеличение M и числовая апертура N . Через эти величины можно выразить и другие параметры объектива [4]: $f_{об} = \Delta_0/M$ — фокусное расстояние, где Δ_0 — оптическая длина тубуса микроскопа; $a = f_{об}N(1 + 1/M)$ — радиус входного зрачка; $f'_{об} = n f_{об}$ — заднее фокусное расстояние объектива, где n — показатель преломления среды. В расчетах можно рассматривать в качестве объектива тонкую линзу с фокусными расстояниями $f_{об}$, $f'_{об}$ и радиусом a .

Для описания распространения лазерного луча через такую оптическую систему можно воспользоваться формализмом $ABCD$ -матриц [5]. Гауссов пучок можно описать комплексным параметром $q(z)$:

$$1/q = 1/R(z) - 2i/k\omega^2(z),$$

где $R(z)$ — радиус кривизны волнового фронта вблизи оптической оси; $\omega(z)$ — радиус гауссова пучка; $k=2\pi/\lambda$ — волновое число.

Параметры гауссова пучка после прохождения оптической системы преобразуются по формуле $q_2=Aq_1+B/Cq_1+D$, где $q_{1,2}$ — комплексный параметр соответственно до и после прохождения оптической системы; A, B, C, D — коэффициенты, описывающие оптическую систему [5]. Если известны начальные параметры лазерного луча, то можно вычислить параметры пучка в любой точке пространства, например, найти распределение интенсивности в плоскости объекта (в цилиндрической системе координат):

$$I(z, r) = \frac{\omega_0^2}{\omega^2} \exp\left(-\frac{r^2}{\omega^2}\right),$$

где $\omega_0=\omega(z=0)$ — радиус перетяжки гауссова пучка в предметной плоскости.

Так как комбинационное рассеяние и флуоресценция являются некогерентными процессами, то построение изображения в плоскости диафрагмы D нужно описывать с помощью интеграла Кирхгофа—Френеля. Этот интеграл определяет амплитуду поля в любой плоскости в зависимости от амплитуды в исходной плоскости:

$$U_2(x_2, y_2) = \iint_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{i\lambda R} U_1(x_1, y_1) e^{-ikR} dx_1 dy_1,$$

где R — расстояние между точками с координатами (x_1, y_1) и (x_2, y_2) . Последовательно вычисляя распределение интенсивности после прохождения эквивалентной линзы, в плоскости изображения для точки с координатами (r, φ) в предметной плоскости получим следующее выражение:

$$I_3(v, \varphi, v_3, \varphi_3) = U_3 U_3^* = \frac{1}{\lambda^4 b_1^2 d_2^2} |h(u, v')|^2, \quad (1)$$

где введены безразмерные продольные и поперечные координаты [6]: $v=(kan/b_1)r$, $v_3=(ka/d_2)r_3$, $u=ka^2(1/f_{об}-n/b_1-1/d_2)z$;

$$h(u, v) = \int_0^1 2 \exp\left(\frac{i}{2} u \rho^2\right) J_0(v\rho) \rho d\rho -$$

импульсная функция отклика линзы [1], J_0 — функция Бесселя, $v'=(v^2+v_3^2+2vv_3\cos(\varphi-\varphi_3))^{1/2}$, b_1 — расстояние от плоскости объектива до объекта, d_2 — расстояние от плоскости объектива до плоскости изображения.

Если записать $b_1=z+d_1$, где d_1 — расстояние до предметной плоскости объектива, то, принимая во внимание, что $z \ll d_1$, продольную координату можно представить в виде $u \approx (ka^2n/d_1^2)z$. Интегрируя формулу (1) по предметной плоскости и по плоскости изображения при наличии диафрагмы D , получим интегральную интенсивность, поступающую на детектор, в зависимости от расстояния u между рассеивающей и предметной плоскостями (считаем, что все излучение, прошедшее через диафрагму, регистрируется детектором):

$$I'(u, v_d) = \left[\lambda^4 b_1^2 d_2^2 \left(1 + \left(\frac{2u}{v_0^2} \right)^2 \right) \right]^{-1} \int_0^\infty v dv \int_0^{v_d} v_3 dv_3 \exp \left(-\frac{v^2}{v_e^2} \right) \times \\ \times \int_0^{2\pi} |h(u, \sqrt{v^2 + v_3^2 + 2vv_3 \cos(\varphi - \varphi_3)})|^2 d\varphi d\varphi_3, \quad (2)$$

где $v_d = (ka/d_2) R_d$ — безразмерный радиус диафрагмы, $v_0 = (kan/b_1) \omega_0$,

$$v_e^2 = \left(\frac{kan\omega}{b_1} \right) = v_0^2 \left[1 + \left(\frac{2u}{v_0^2} \right)^2 \right].$$

В аналитическом виде интегралы не берутся, следовательно, для расчета схемы необходимо использовать численное интегрирование. Интегрирование производилось по методу Симпсона, с удвоением шага разбиения до тех пор, пока не была достигнута заданная точность. Погрешность интегральных сумм оценивалась по формуле Рунге [7].

Результаты

Для оптимизации оптической схемы КР-микроскопа, в частности подбора фокусного расстояния линзы L_1 и определения необходимого размера диафрагмы, воспользуемся результатами расчета по приведенным выше формулам.

Расчет проводился в два этапа: распространение лазерного луча через эквивалентную оптическую систему до объекта рассчитывалось по законам гауссовой оптики и с помощью дифракционной теории описывалось распространение рассеянного излучения от объекта до детектора. Все расчеты проводились для источника возбуждения с длиной волны 514,5 нм и расходямостью 0,26 мрад (линия Аг-лазера), иммерсионного объектива с линейным увеличением 90, числовой апертурой 1,3 и показателем преломления кедрового масла 1,5. В результате вычислений для различных фокусных расстояний линзы L_1 были получены распределения интенсивности излучения в плоскости входного зрачка объектива, изображенные на рис. 2. Поскольку радиус входного зрачка для данного объектива $a=2,37$ мм, то, как видно из рисунка, наилучшее заполнение лазерным пучком объектива обеспечивает линза с фокусным расстоянием 10 см. Для такой линзы был рассчитан минимальный радиус гауссова пучка в фокальной плоскости объектива микроскопа $\omega_0=0,21$ мкм, или в безразмерных оптических единицах $v_0=3,38$.

Поскольку КР-сигнал смещен по частоте относительно возбуждающего излучения, то при вычислении интеграла (2) длина волны бралась 542 нм (отстройка 1000 см⁻¹).

В результате интегрирования по формуле (2) при перетяжке лазерного пучка в предметной плоскости $v_0=3,38$ было получено семейство кривых, изображенных на рис. 3 и отвечающих различным диафрагмам v_d (радиус диафрагмы $R_d = v_d M / (kN)$). На рис. 3 изображена интегральная интенсивность, регистрируемая детектором, при перемещении вдоль оптической оси плоского объекта, рассеивающего лазерное излучение. Полуширина (половина ширины на половине высоты) этой кривой будет характеризовать разрешающую способность микроскопа вдоль оптической оси. Зависимость полуширины от величины диафрагмы изображена на вставке к рис. 3 (кривая А).

Полученные результаты интересно сравнить с аналогичным расчетом аксиальной разрешающей способности, который был проведен в работе [8] (см. вставку к рис. 3, кривую *C*). Отличие состояло в том, что в [8] объект освещался точечным источником света, следовательно, в фокусе объектива интенсивность была распределена по закону $(2J_1(v)/v)^2$ [1], с шириной $v=2$. Если сфокусировать лазерный луч так, чтобы радиус перетяжки в фокусе объектива был равен $v_0=2$, то следует ожидать, что для малых диафрагм ($v_d \ll 2$) гауссов источник будет эквивалентен точечному и кривые зависимости параметра $u_{1/2}$ от радиуса диафрагмы v_d будут отличаться слабо. Это и подтверждается нашим расчетом (см. вставку к рис. 3, кривую *B*). При увеличении v_d наблюдается возрастание расхождения кривых вследствие различия распределения интенсивности в фокальной плоскости объектива.

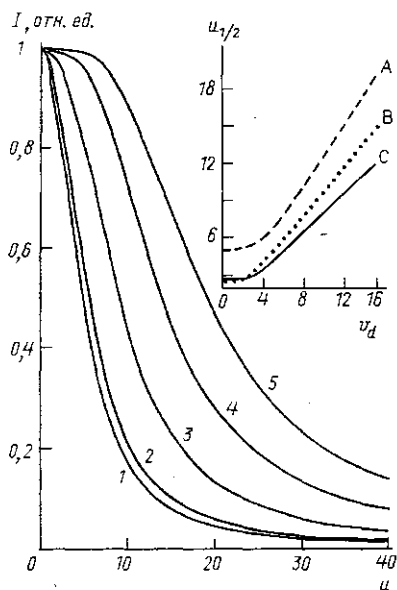


Рис. 3. Зависимость интегральной интенсивности, регистрируемой детектором, от расстояния u между рассеивающей и фокальной плоскостями в безразмерных единицах для различных диафрагм: $v_d=1$ (1), 3 (2), 7 (3), 11 (4) и 15 (5). На вставке показана зависимость полуширины для семейства этих кривых от радиуса диафрагмы: *A* — гауссов источник, $v_0=3,38$; *B* — гауссов источник $v_0=2$; *C* — точечный источник

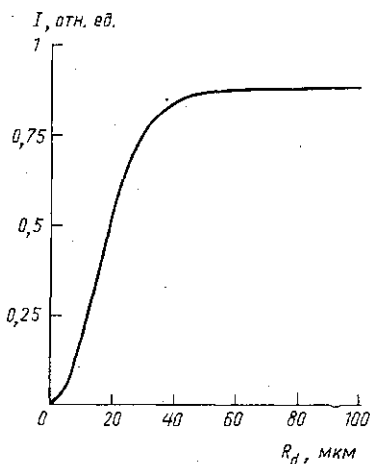


Рис. 4. Зависимость интенсивности, регистрируемой детектором, от радиуса диафрагмы для рассеивающего объекта, расположенного в предметной плоскости объектива

Для проверки алгоритма численного интегрирования воспользуемся результатами работы [9]. В данной работе было экспериментально определено разрешение по оси Z для конфокального КР-микроскопа, упрощенная схема которого изображена на рис. 1. Лазерный луч ($\lambda=660$ нм, расходимость $\theta=1,5$ мрад) проходит через линзу с фокусным расстоянием $f_1=0,1$ м и фокусируется иммерсионным объективом ($M=63$, $n=1,33$ (вода), $N=1,2$). Плоский предмет (тонкая пленка полистирина толщиной 100 нм) движется через фокус вдоль оптической

оси, рассеянный свет от него проходит через диафрагму $R_d=50$ мкм и регистрируется детектором.

Для приведенных выше параметров системы был вычислен радиус перетяжки $v_0=2,6$ и по формуле (2) было найдено семейство кривых $I^f(u, v_d)$. Для диафрагмы $R_d=50$ мкм ширина кривой I^f составляет $\delta z=2z_{1/2} \approx 2$ мкм, что согласуется с результатом [9] — $\delta z=2,3 \pm \pm 0,2$ мкм.

Как уже говорилось выше, в КР-микроскопии приходится иметь дело с чрезвычайно низким уровнем сигнала, поэтому при оптимизации схемы КР-микроскопа в первую очередь необходимо обеспечить высокую чувствительность. Следовательно, важным критерием выбора радиуса диафрагмы является ее высокая пропускная способность, при которой максимальная часть излучения, исходящего из слоя $u=0$, должна попадать на детектор. На рис. 4 показана зависимость интенсивности, регистрируемой детектором, от размера диафрагмы, при этом рассеивающий объект расположен в плоскости $u=0$. Для $R_d \geq 50$ мкм кривая интенсивности становится пологой, и значительного выигрыша в сигнале такие диафрагмы не дают. Таким образом, можно считать оптимальным радиус диафрагмы $R_d=50$ мкм, и по графику А на вставке к рис. 3 можно определить соответствующую разрешающую способность микроскопа $\delta z=2z_{1/2} \approx 1,6$ мкм. Считая, что поперечное разрешение определяется величиной v_0 , можно оценить объем, образующий сигнал: $2r_0 \times 2r_0 \times dz_{1/2} \approx 0,2$ мкм³, где $r_0=0,17$ мкм — радиус перетяжки.

Таким образом, в работе предложен метод расчета параметров оптической схемы конфокального КР-микроскопа. Для описанной выше системы из соображений наилучшего разрешения и максимальной чувствительности теоретически определены оптимальные параметры оптической схемы: радиус конфокальной диафрагмы 50 мкм, фокусное расстояние коллимирующей линзы 0,1 м. Определено линейное разрешение вдоль оси Z микроскопа — 1,6 мкм и найден объем, образующий КР-сигнал, — 0,2 мкм³. Проведено сравнение линейного разрешения вдоль оси Z для гауссова и точечного источников. Результаты расчета, проведенного по предложенной схеме, совпадают с экспериментальными результатами, полученными в работе [9].

ЛИТЕРАТУРА

1. Wilson T., Sheppard C. Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy. L., 1984.
2. Visser T. D. Wiersma S. H.//J. Opt. Soc. Am. 1994. A11, N 2. P. 399.
3. Дюков В. Г., Кудеяров Ю. А. Растровая оптическая микроскопия. М., 1992.
4. Курт М. Основы теории микроскопа. М., 1955.
5. Мэйтленд А., Данн М. Введение в физику лазеров. М., 1978.
6. Борн М., Вольф Э. Основы оптики. М., 1970.
7. Калиткин Н. Н. Численные методы. М., 1978.
8. Wilson T., Carlini A. R.//Opt. Lett. 1987. 12, N 4. P. 227.
9. Puppels G. J., Colier W., Olminkhof J. H. F. et al.//J. Raman Spectr. 1991. 22. P. 217.

Поступила в редакцию
19.05.95