

带对准光路的激光细胞穿孔显微物镜设计

黄幼萍, 林 峰

(福建师范大学光电与信息工程学院, 医学光电科学与技术教育部重点实验室, 福建 福州 350007)

摘要: 针对近红外光谱可对活体组织进行无损伤穿孔, 并解决在穿孔中需要重新对焦的问题, 通过 Zemax 软件对 7 片式前置光阑显微物镜结构在 $0.48\sim 1.48\ \mu\text{m}$ 波长范围内进行了宽光谱消色差的优化设计。设计实现了像距为无限远的多光谱共焦成像, 其放大倍率为 40, 数值孔径 0.5, 最大焦面漂移量仅为 $27\ \mu\text{m}$, 可见光波段在空间频率为 $350\ \text{lp/mm}$ 时, 0.7 视场的 $\text{MTF}>0.5$, 具有较高的分辨力。并且在波长 $1480\ \text{nm}$ 处, MTF 值接近衍射极限, 具有较高的能量, 满足细胞穿孔的要求。文中还给出了实验结果, 并预测其应用前景。

关键词: 消色差显微物镜; 激光细胞穿孔; 多光谱共焦成像; Zemax 软件; 无限远像距

中图分类号: TH773

文献标识码: A

文章编号: 1001-8891(2015)04-0305-06

Design of Microscopic Objective for Laser Cell Perforation with an Aligned Optical Path

HUANG You-ping, LIN Feng

(Key Laboratory of Optoelectronic Science and Technology for Medicine Ministry of Education,
College of Photoelectric and Information Engineering, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

Abstract: Since living tissue can be perforated without injury by near infrared spectrum, and in order to solve the problem of refocusing, the 7 pieces of front aperture microscope structure is designed and optimized in the $0.48\sim 1.48\ \mu\text{m}$ waveband by using Zemax software. It realizes apochromatism and multi-spectral confocal imaging with the image distance of infinity, and the maximum focal shift is only $27\ \mu\text{m}$. At the same time, the optical magnification reaches 40 and number aperture is 0.5. The Optimal Structure Designing shows that the system has high resolution, the MTF of visible wavelengths beyond 0.5 at a spatial frequency of $350\ \text{lp/mm}$ in 0.7 field. In addition, the MTF of $1480\ \text{nm}$ wavelength is close to the diffraction limit and the energy is high, which caters for the requirements of cell perforation. In the meantime, the experimental results are drawn out and we have made predictions about its prospects.

Keywords: achromatic microscope objective, laser cell perforation, multispectral confocal imaging, Zemax software, infinity image distance

0 引言

激光穿孔^[1]即用激光微束照射受体细胞, 导致细胞膜的可逆性穿孔, 将一些外源物质导入到活细胞当中。由于激光具有无污染、非接触、保证细胞完整性等优点, 且可以对单个细胞进行操作, 适用于各种细胞的研究, 使得激光穿孔技术在基因转导等方面具有一定的研究价值。早在 20 世纪 60 年代末, Saks^[2]等人就已经使用红宝石激光器进行细胞穿孔实验, 此后许多穿孔实验表明, 使用近红外光谱^[3]可穿透到更深

层组织, 且速度更快, 转染效率更高。目前, 国内外主要有可见光-紫外以及可见-近红外两种宽光谱显微物镜, 后者在激光穿孔中比较常见^[4-6], 但这些镜头在穿孔时需要重新对焦, 因此本设计基于奥林巴斯 IX71 显微镜的强大拓展能力和实验的具体要求, 添加了一个对准光路, 同时需要设计一款可以实现多光谱共焦显微物镜, 以代替奥林巴斯标准物镜系列, 解决其在细胞穿孔中需要重新对焦的问题。

无限远像距^[7]显微物镜的特点是显微物镜和辅助物镜之间为平行光束, 间距比较自由、装配调整自由,

收稿日期: 2014-10-20; 修订日期: 2015-02-04.

作者简介: 黄幼萍 (1991-), 女, 汉族, 福建泉州人, 硕士研究生, 主要从事光学设计方面的研究。E-mail: 986930890@qq.com.

通讯作者: 林峰 (1968-), 男, 汉族, 福建龙岩人, 高级工程师, 主要从事光学设计方面的研究。E-mail: lfeng127@163.com.

基金项目: 福建省科技厅重点项目, 编号: 2013H0022; 福州市科技计划项目, 编号: 2014-G-68.

在其间加入棱镜等附加元件而不引起像差和放大倍率的变化。利用这一优点, 本文将显微物镜设计为无限远共轭距, 通过与 CCD 或者计算机相结合形成各种显微成像技术, 拓宽其应用领域。

设计时利用 625~660 nm 波段进行对准, 1440~1500 nm 用于细胞穿孔, 可见光谱波段则作为观察时使用, 此外使用单一波长光可以减小色差, 提高光学系统的分辨力, 故对准和穿孔分别选取 650 nm 和 1480 nm 波长作为入射光。由于可见光和近红外光在同一种光学材料中的成像焦面不一样, 为了让近红外光束聚焦在可见光谱范围内, 设计中采用多光谱共焦技术。同时系统采用的光学玻璃较为普遍。

1 光学系统的设计优化及公差分析

1.1 设计指标

无限远像距的显微物镜的焦距可由公式 $f=f_{TL}'/\beta$ 计算得出, f_{TL}' 为辅助物镜的焦距; β 为显微物镜的放大倍率。不同厂家的辅助物镜, 其焦距也不一样。以奥林巴斯显微物镜为参考, 辅助透镜的焦距 $f_{TL}'=180$ mm, 则 $f=f_{TL}'/\beta=180/40=4.5$ mm, 当放大倍率为 $40\times$ 时, $NA\geq 0.5$, 故光学系统的设计指标选取如下。

1.2 初始结构的确定

显微物镜的结构主要是在折射式和反射式两种类型中选取。由于反射式中反射面的加工要求比较高, 物镜装调、防止杂光和保持稳定性等也都比较困难, 故设计中选择折射式的结构。该显微镜属于小焦距物镜, 设计中应注重校正轴上色差、球差^[8], 而垂轴色差可以通过补偿目镜进行补偿。球差是轴上点的单色像差, 主要由透镜的球形表面引起的, 使用双胶合透

镜可以同时校正球差和色差。综上本光学系统选用三组双胶合, 根据消色差理论^[9], 整个系统应满足:

$$\delta l'_{ch,k} = -\frac{1}{n'_k u'^2_k} \sum h^2 \frac{\phi}{v} = 0 \tag{1}$$

式中: n'_k 为第 k 个折射面的折射率; u'_k 为出射光线与光轴的夹角; h 为光线的入射高度。

对双胶合系统应满足:

$$\frac{\phi_1}{v_1} + \frac{\phi_2}{v_2} = 0 \tag{2}$$

$$\phi_1 + \phi_2 = \phi \tag{3}$$

式中: ϕ_1 、 v_1 和 ϕ_2 、 v_2 是各块透镜的光焦度和阿贝常数; ϕ 为总光光焦度。

由公式(1)~(3)可知, 采用冕牌玻璃和火石玻璃的组合方式可消除色差。故三组双胶合均采用冕牌和火石玻璃的组合形式, 把孔径光阑固定在第一个面。对该光学系统进行反光路设计, 当像距为无穷远时, 系统应以平行光入射, 即物距设为无穷远。利用 Zemax 多重结构^[10]对多光谱进行建模, 由于物镜的放大倍率由物镜的焦距和辅助透镜的焦距共同决定, 其中辅助透镜的焦距是固定的, 所以在评价函数中要严格控制物镜的焦距, 同时还要控制好玻璃的中心厚度、边缘厚度、材料的折射率和阿贝常数等边界条件。优化后的效果并不是很理想, 此时在系统中加入一块单透镜 5 (见图 1), 使其能更好地校正像差。当把透镜 5 和 6、7 设计成三胶合时, 倍率色差得到很大的改善, 系统的像差明显变小, 最大的均方根半径只有 1.5 μm (见图 2)。该系统主要采用的玻璃材料折射率和阿贝常数分别为(1.8, 40)、(1.7, 54)、(1.7, 26)、(1.5, 61)等。

表 1 设计指标 Table 1 Design specifications

Magnification	Focal length	Numerical aperture	Field	Working distance	Image distance	Design spectrum
$-40\times$	4.5 mm	0.5	22 mm	≥ 2.5 mm	Infinity	Visible light、650 nm、1480 nm

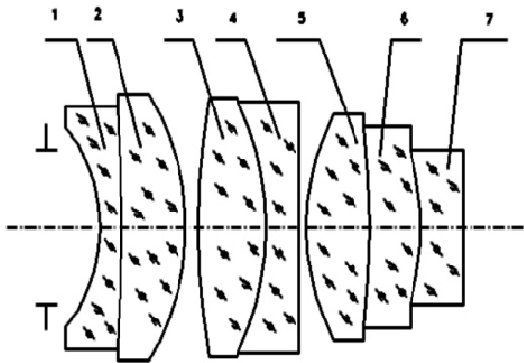


图 1 光学系统结构 Fig.1 Layout of optical system

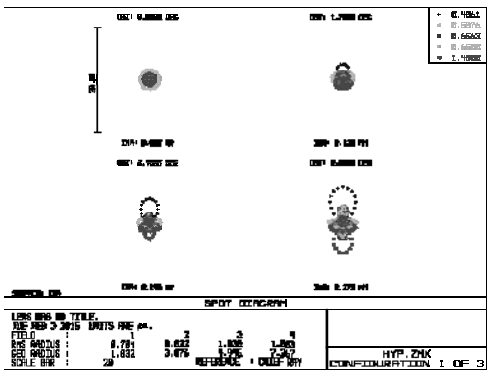


图 2 点列图 Fig.2 Spot Diagram

为了减小培养皿厚度、液体环境等因素带来的像差影响，本设计在透镜7后增加了2块平板用来模拟培养皿和细胞的组织液，这2块平板的厚度和材料选择上均按实验要求来设定，从而使物镜模拟的结果与实验的情况相似，实验结果更为精确。

1.3 优化结果分析

图3分别是可见光波段、650 nm波段、1480 nm波段以及全波段的调制传递函数。可以看出，1480 nm波长在空间频率为350 lp/mm时，MTF接近衍射极限，

大部分能量都集中在瑞利斑内，具有较高的能量，能够实现细胞穿孔。其余波段在该空间频率处，0.7 视场的 MTF 都在 0.5 以上，分辨率较高。

图4和图5是全波段的多色光焦点漂移图和色球差曲线图，0.486 nm、0.650 nm、0.656 nm、1.480 nm4条谱线在0.707带基本交于一点，焦移量也仅为27 μm，光学系统实现了消色差。

图6给出了全系统的场曲和畸变，所对应的最大畸变为一0.31%，满足观测条件。

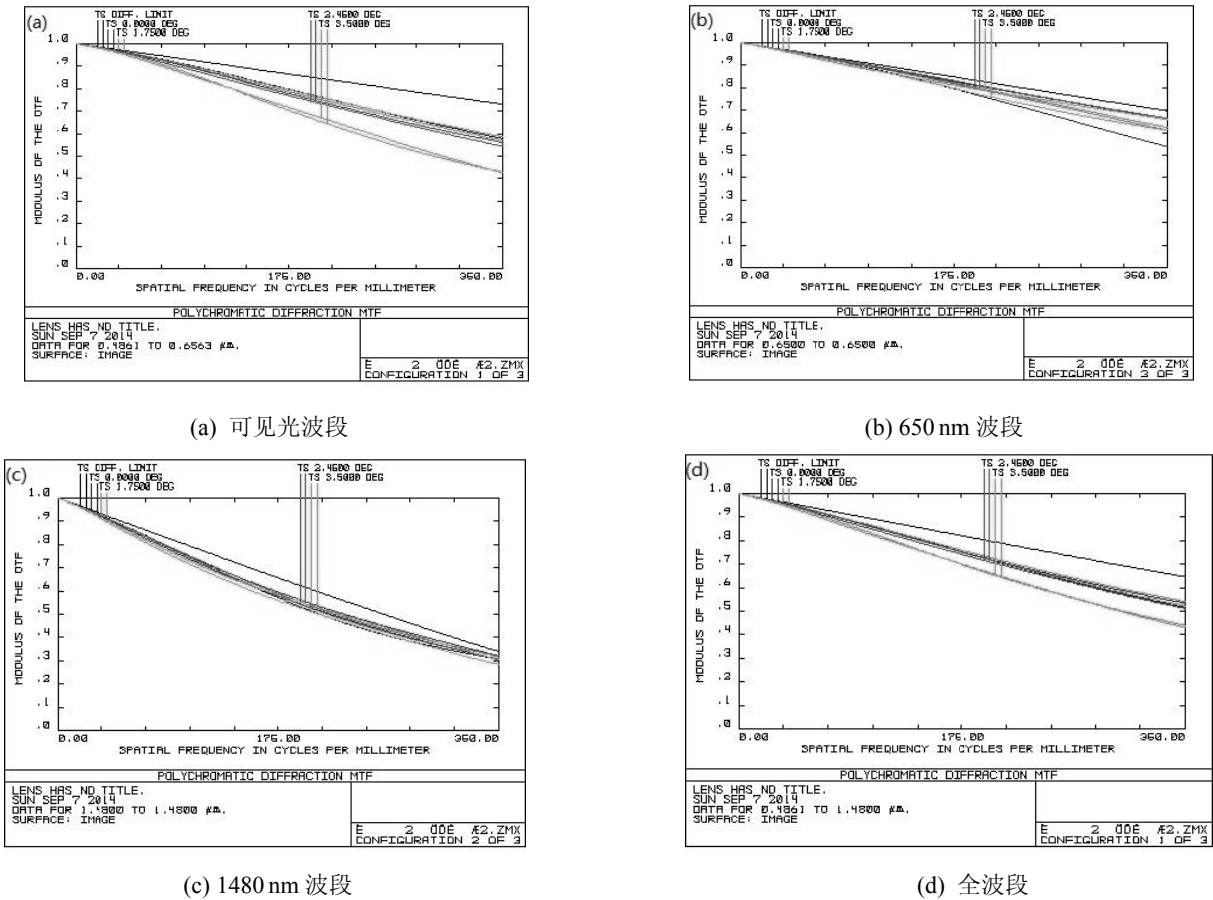


图3 MTF 曲线

Fig.3 MTF curves

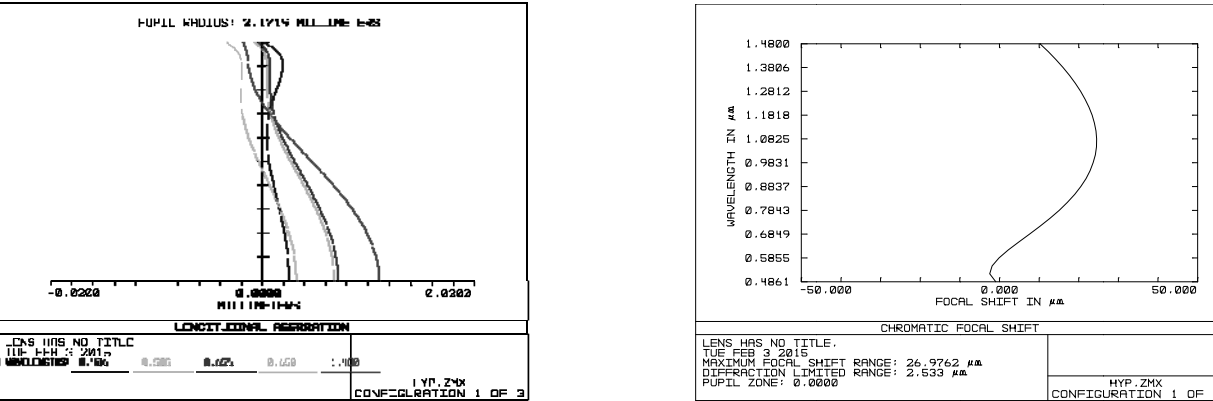


图4 色球差曲线图

Fig.4 Longitudinal Aberration

图5 焦点漂移图

Fig.5 Focal Shift

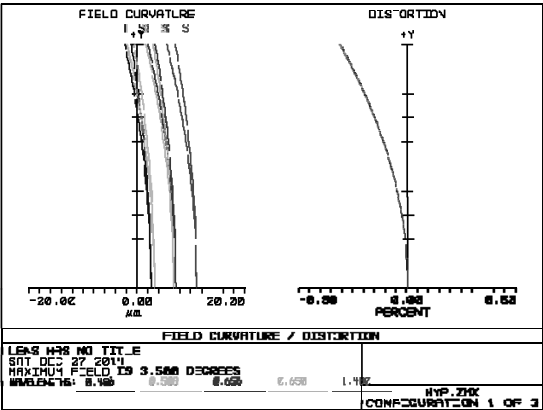


图 6 畸变图 Fig.6 Distortion

1.4 公差分析

理论设计完成后，根据加工厂家的加工水准和装配检测工艺，需要合理进行公差分配，以提高产品的实际光学性能和良率,表 2 是该光学系统的公差要求。

以在 350 lp/mm 传递函数的平均值作为评价标准，用 zemax 软件进行公差分析后，标准名义值为 0.50265718，其中影响较为严重的公差操作数如图 7 所示。图中显示，靠近孔径光阑的第 2、第 4 光学面在 X、Y 轴上的偏心和厚度偏差较为敏感，可采取较

表 2 光学系统的公差要求 Table 2 Tolerance demands of optical systems

光圈	局部光圈	厚度公差/mm	X 偏心公差/mm	Y 偏心公差/mm	X 轴倾角	Y 轴倾角	折射率	阿贝常数误差/%
5	0.5	±0.05	±0.02	±0.02	5′	5′	0.001	1

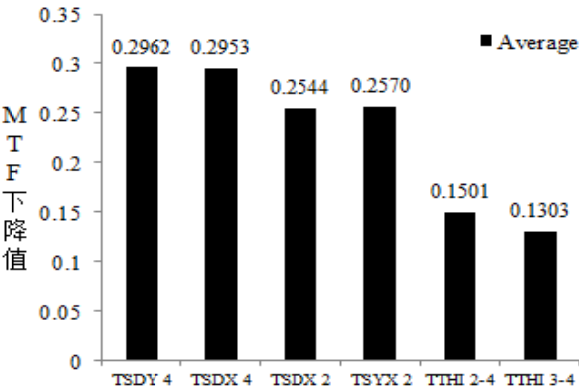


图 7 最敏感的公差操作数 Fig.7 The most sensitive tolerance operands

3 实验结果

图 10 是 650nm 激光产生的衍射光圈，该光圈用于目标的对准。当激光光束和物镜在同一方向校准时，则光圈是平均对等的，光的颜色也是均匀的，如图 10 所示，其光圈质量在可接受范围内。

图 11 则是用 1480nm 激光在 小鼠胚胎上进行的穿孔情况。从图 11 可知，物镜穿孔质量整体还是比较理想，因而本设计符合实验要求。

为严格的公差要求，即第 2 和第 4 面的 X、Y 偏心公差设置为±0.015 mm，第 2~4 面以及第 3~4 面的厚度公差设置为±0.03 mm，再次采取 20 个蒙特卡罗样本，分析后的 MTF 曲线和蒙特卡罗分析结果分别如图 8 和表 3 所示，其结果表明，90%以上的 MTF 在 0.2635，满足光学系统的要求。

2 激光细胞穿孔实验装置

激光细胞穿孔的装置如图 9 所示。把物镜安装在奥林巴斯 IX71 显微镜上，该显微镜具有 6 个输入/输出口，可以单独使用其中某个光口，也可以同时使用。在穿孔实验中，上光口用来照明，后上光口和右侧光口作为光路输入口，650nm 和 1480nm 激光分别从这 2 个光口发射出来经过瞄准仪成为平行光，这 2 束平行光再被反射镜反射到物镜（NA=0.5，β=−40°）上，通过物镜聚焦在样品上，在短时间内能迅速完成细胞穿孔且不破坏活细胞的完整性。从左侧光口或者底光口中选一个光口来安装 CCD，就可以获得原始图像。

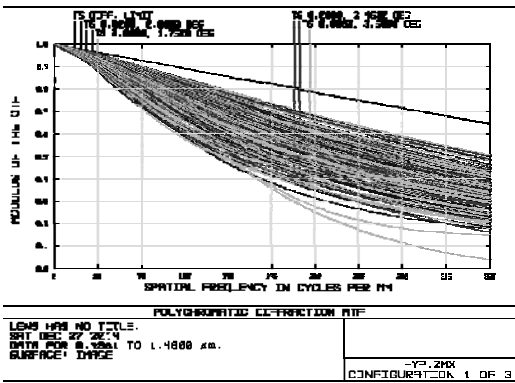


图 8 20 个样本的 MTF 曲线 Fig 8 MTF curves of 20 samples

表 3 蒙特卡罗分析结果

Table 3 Monte Carlo analysis results
MTF (350 lp/mm)
90%>0.26354274
80%> 0.28492367
50%>0.34495827
20%>0.41901765
10%>0.42466588

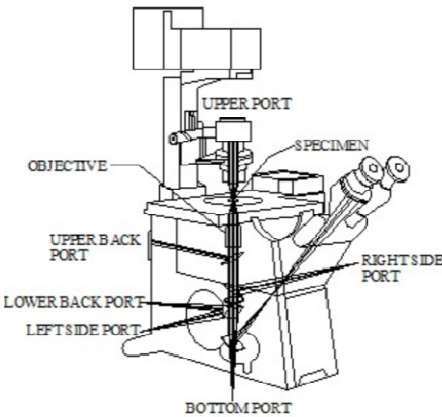
4 应用前景

随着绿色荧光蛋白和其它分子荧光探针的发明，荧光显微镜和激光共聚焦显微镜在生物医学上得到了更广泛地应用。由于标本的自发荧光量比较小，为了提高荧光图像的亮度，应选择数值孔径较大的消色差物镜，尤其是在高放大倍率时，更应该采用高数值孔径的物镜，以检测微弱的荧光信号。激光扫描共聚焦显微镜要求物镜具有消色差和高分辨率的特点。从上述设计结果可得出，系统实现了消色差，并具有较高的分辨力，满足了荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜的要求。同时，系统使用的都是些常见的冕牌和火石玻璃，解决了成本昂贵的问题，因而此物镜在荧光探测^[11]和激光共聚焦显微技术^[12]中将具有可观的应用前景，同样适合在多种显微技术^[13]相结合的情况下使用。应用在荧光显微镜中，可以将荧光激发光源、激发滤光片、荧光照系统安装在后上光口，把图6光路图中的红外滤光片更换成滤光片，在底光口安装 CCD 探测器连接到计算机观察荧光成像。激光共聚焦显微镜是在荧光显微镜上加装激光扫描和

共轭装置，共聚焦扫描元件可以安装在左侧光口或者后下光口中，通常使用红外或可见光激发荧光探针，与计算机配合使用，可以得到细胞或组织内部微细结构，形成一种强有力的研究工具。多光谱共焦是本设计的另一特点，这一特色使得它可以普遍应用在多光谱显微成像系统^[14-15]中，从可见光到近红外区域内对活体进行成像，获取光谱图像。除此之外，本结构的像距为无限远，这使得它在生物医学领域中将会有更广泛的应用。

5 结束语

通过 Zemax 软件对 7 片式的光学系统结构进行优化，设计了像距为无限远，带对准装置的细胞穿孔显微镜。物镜的放大倍率为 $40\times$ 、数值孔径为 0.5，设计结果表明系统在可见光到近红外宽波段内进行了消色差，存在的像差较小，在 350 lp/mm 时具有较高的分辨力和优良的成像质量。所使用的材料为常见光学玻璃，预测该物镜在生物医学领域中有广泛的应用。



(a) 奥林巴斯 IX71/IX81 显微镜

图 9 实验装置图

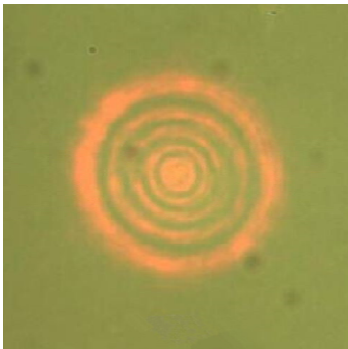
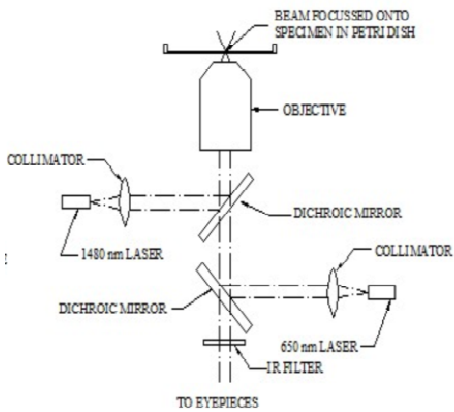


图 10 衍射光圈 Fig.10 The diffraction ring



(b) 光路原理图

Fig.9 Experimental equipment

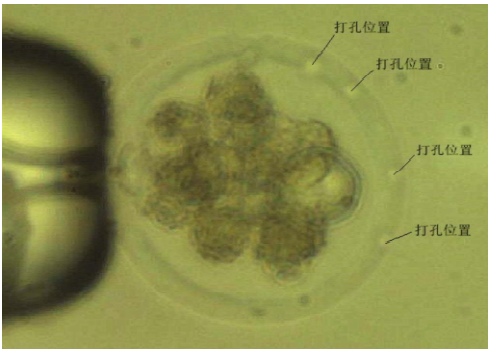


图 11 穿孔质量 Fig.11 Perforation performance

参考文献:

- [1] Stevenson D J, Gunn-Moore F J, Campbell P, et al. Single cell optical transfection[J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2010: rsif20090463.
- [2] Saks N M, Roth C A. Ruby laser as a microsurgical instrument[J]. *Science*, 1963, **141**(3575): 46-47.
- [3] 王懋, 李春炎, 孙云飞, 等. 近红外小动物活体荧光成像系统的研制[J]. *光学学报*, 2013, **33**(6): 617003.
- [4] Baumgart J, Bintig W, Ngezahayo A, et al. Quantified femtosecond laser based opto-perforation of living GFSTR-17 and MTH53 a cells[J]. *Optics express*, 2008, **16**(5): 3021-3031.
- [5] Judith Baumgart, Willem Bintig, AnacletNgezahaYo, et al. Quantified Femtosecond Laser Based Opto-perforation of Living Cells[J]. *JLMN-Journal of Laser Micro/Nanoengineering*, 2009, **4**(2): 111-117.
- [6] 梁晓轩, 王晶, 张镇西. 纳米尺度激光紧聚焦光穿孔技术[J]. *西安交通大学学报*, 2012, **46**(10): 107-115.
- [7] 迟泽英, 陈文建. *应用光学与光学设计基础*[M]. 南京: 东南大学出版社, 2008: 330-333.
- [8] 陈姣, 焦明印, 常伟军, 等. 紫外-可见光谱显微成像光学系统的设计[J]. *应用光学报*, 2011, **32**(2): 195-199.
- [9] 李晓彤, 岑兆丰. *几何光学·像差·光学设计*[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2003: 124-132.
- [10] 马洁, 曾宇. 基于 1.06/1.54 μm 激光的离轴折反式平行光管物镜设计[J]. *红外技术*, 2010, **32**(2): 81-83.
- [11] 罗湘建. 生物医学荧光成像系统的应用[J]. *Medical Equipment*, 2010, **23**(6): 24-25.
- [12] 高兴宇, 萧泽新, 伍世荣. 基于 OSLO 的无限远像距消色差显微物镜的设计[J]. *光学与光电技术*, 2006, **4**(4): 4-7.
- [13] Rao B, Soto F, Kerschensteiner D, et al. Integrated photoacoustic, confocal, and two-photon microscope[J]. *Journal of biomedical optics*, 2014, **19**(3): 036002-036002.
- [14] Hiraoka Y, Shimi T, Haraguchi T. Multispectral imaging fluorescence microscopy for living cells[J]. *Cell structure and function*, 2002, **27**(5): 367-374.
- [15] 曾卫娟, 李宗焕, 文印宪, 等. 多光谱成像技术在生物医学中的应用进展[J]. *现代生物医学进展*, 2012, **12**(5): 968-971.