

27. Многоканальный конфокальный микроскоп на основе дифракционного мультипликатора

В. П. Бессмельцев, М. В. Максимов, В. В. Вилейко, Н. В. Голошевский, В. С. Терентьев

Институт автоматки и электротметрии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, России

Представлена реализация сканирующего лазерного конфокального микроскопа, в котором сканирование образца осуществляется матрицей (33×33) освещающих пучков, что существенно увеличивает скорость построения изображений объекта и позволяет получать их в режиме видео в реальном времени. Разделение излучения лазерного источника на матрицу освещающих пучков обеспечивается дифракционным оптическим элементом. Сканирование образца лазерными пучками обеспечивается двумя плоскопараллельными пластинками, угловые повороты которых осуществляются двумя гальванометрическими сканерами, с ортогонально расположенными осями вращения роторов.

Ключевые слова: Многоканальный конфокальный микроскоп, Дифракционный оптический элемент, Мультипликатор, Сдвиговые плоскопараллельные пластины.

Цитирование: Бессмельцев, В. П. Многоканальный конфокальный микроскоп на основе дифракционного мультипликатора / В. П. Бессмельцев, М. В. Максимов, В. В. Вилейко, Н. В. Голошевский, В. С. Терентьев // HOLOEXPO 2018 : XV международная конференция по голографии и прикладным оптическим технологиям : Тезисы докладов. — М. : МГТУ им. Н. Э. Баумана, 2018. — С. 123–127.

Введение

Многоканальные лазерные конфокальные сканирующие микроскопы (МЛКСМ) применяются для исследований в биологии [1], для послойного построения трехмерного изображения флуоресцирующих объектов или профиля поверхности различных материалов и объектов [2]. Главное преимущество многоканальных систем заключается в существенно большей скорости сканирования исследуемой поверхности от 100 до 1000 раз (до 10^3 кадров/с), чем с помощью одноканальных классических систем.

Наибольшее распространение получила конструкция на основе диска Нипкова с микролинзами. Преимуществом схемы Нипкова является использование вращающихся на одной оси матрицы микролинз и соответствующих им конфокальных диафрагм, что позволяет автоматически синхронизовать координатно-временную развертку матрицы сфокусированных пятен в области объекта и сигнала в плоскости видеоматрицы без использования дополнительных согласующих устройств. Недостаток такой компоновки состоит как в сложности и, соответственно, стоимости изготовления такого диска с микролинзами (типичное количество микролинз 20 000 [3,4], так и значительной потере ($\geq 50\%$) света при прохождении через отверстия с матрицей микролинз. Среди недостатков многоканальной микроскопии можно отметить интермодуляционное влияние одного канала на другой, зависящее от расстояния между лучами, что ограничивает количество лучей, одновременно освещающих объект [5].

В ИАиЭ СО РАН разработан высокоскоростной многоканальный конфокальный микроскоп, собранный из относительно недорогих компонентов и с автосинхронизацией развертки лучей по объекту и приемной фотоматрице при неподвижной матрице конфокальных диафрагм [6]. Это достигается за счет оригинальной оптической схемы, содержащей модуль сканирования на основе двух сдвиговых плоскопараллельных пластин. Также к достоинству данной схемы можно

отнести максимально возможную лучевую эффективность, за счет использования разработанного в институте специального дифракционного оптического элемента (ДОЕ) — фокусирующего мультипликатора.

1. Оптическая схема

Принципиальный вид оптической схемы представлен на рис. 1.

Свет линейно поляризованного лазерного источника (длина волны 532 нм) I падает на ДОЭ 2, мультиплицирующий пучок в массив 33×33 сходящихся пучков и фокусирующий их в область матрицы конфокальных диафрагм 4, отражается от полупрозрачного зеркала 3, разделяющего ход лучей в осветительном и приемном канале. Далее лучи проходят две рефрактивные плоскопараллельные пластины 5^x и 5^y , которые используются для их параллельного смещения по x - и y -координатам соответственно после прохождения пластин, тубусную линзу 6, $\lambda/4$ -двулучепреломляющую пластину 7, объектив 8 и фокусируется в объектной плоскости исследуемого объекта 9.

Отраженный (рассеянный) свет распространяется в обратном направлении, как показано пунктирными линиями в предположении, что объект зеркально

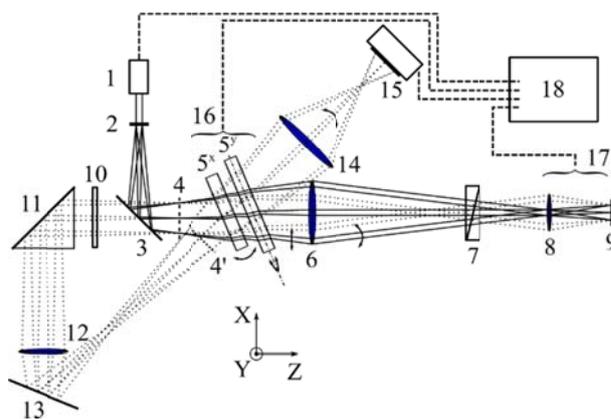


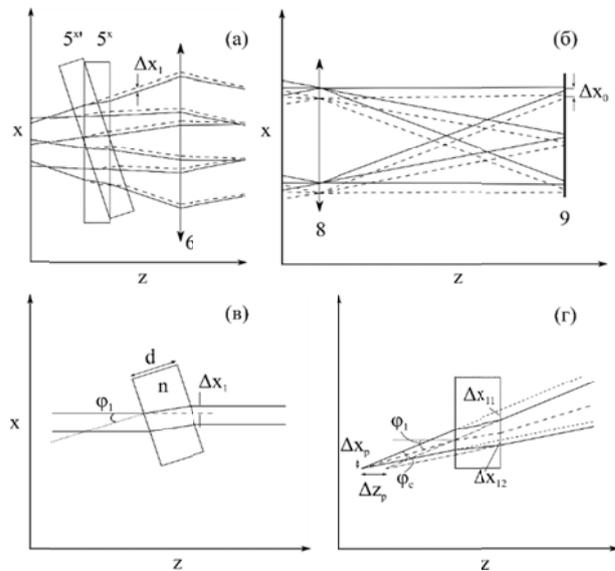
Рис. 1. Принципиальная оптическая схема МЛКСМ

отражает свет. Перед попаданием на матрицу диафрагм пучки повторно проходят через рефрактивные дефлекторы $5^x, 5^y$, что позволяет провести пучки в приемном тракте через тот же массив диафрагм. При прохождении матрицы диафрагм только световые пучки, идущие от объектов, находящихся в фокусе микрообъектива, будут пропускаться с минимальными потерями. Далее пучки проходят разделительное зеркало 3 и попадают на поляризатор 10, который настроен на подавление поляризации лазерного источника, при этом сигнальный свет от объекта, благодаря элементу 7, имеет ортогональную поляризацию и проходит дальше через призму с крышкой 11, проекционный объектив 12, зеркало 13 и формирует действительное изображение 4' из плоскости матрицы диафрагм 4, снова — через две плоскопараллельные пластины, проекционный объектив 14 и изображение фокусируется на матрицу фотодетекторов (видео матрицу) 15. Объектив 12 должен переносить изображение без увеличения из плоскости 4 в 4'. Положение 4' не должно быть внутри пластины 5, чтобы избежать рассеяния на возможных неоднородностях сфокусированных лучей. Призма с крышкой 11 необходима для согласования направлений перемещения сканирующих лучей по поверхности образца и сигнальных лучей по поверхности регистрирующей видео матрицы.

Пластины $5^x, 5^y$ закреплены каждая на своем электромеханическом угловом дефлекторе (гальваносканере) с ортогонально ориентированными роторами. Управление углами поворота пластинок в сканерном модуле 16, модуль 17 для перемещения объектива 8 по аксиальной оси и объекта 9 по латеральным осям, а также управление интенсивностью лазера автоматизированы с помощью модуля 18. Получение изображения производится в режиме углового сканирования пучком по оси X при построчном перемещении пучка по оси Y. При повороте пластинок происходит перемещение сфокусированных сканирующих пучков в плоскости 9, при этом сканирование осуществляется в относительно малых углах в пределах углового расстояния между соседними пучками. Отраженный сигнальный свет, проходя через пластины после плоскости 4', также синхронно отклоняется и происходит сканирование сигнала по поверхности видео матрицы.

Тройной проход световых пучков через систему рефрактивных дефлекторов позволяет обеспечить синхронизацию развертки освещения на образце с разверткой принятых пучков в плоскости быстродействующей видео матрицы, считывающей изображение объекта. Каждый кадр фотоприемной матрицы представляет собой результат накопления светового сигнала за время одного цикла параллельного сканирования массивом пучков поверхности образца, аналогично схеме с диском Нипкова.

2. Принцип работы сканирующей системы на основе плоскопараллельных пластин



а — смещение лучей, б — в области фокусировки; в — смещение параксиального луча, г — преломление конуса 5^x — прямо, $5^{x'}$ — под углом, 6 — тубусная линза, 8 — микроскопный объектив, 9 — объектная плоскость

Рис. 2. Сканирование с помощью пропускающей пластинки (три пучка): плоскопараллельные пластинки

На рис. 2а схематично представлен ход лучей через пластинку и тубусную линзу б при двух положениях пластинки. Наклон пластинки относительно первоначального положения приводит к латеральному смещению конусов и к соответствующему смещению пучков в области объекта (рис. 2б). Пусть величина латерального смещения после поворота пластинки Δx_1 , то в соответствии с законами параксиальной оптики сфокусированное пятно в области объекта смещается на Δx_0 (рис. 2в).

$$\Delta x_0 = -\Delta x_1/M, \tag{1}$$

где M — это латеральное увеличение оптической системы тубусная линза — объектив. Пусть параллельный пучок падает на поверхность пластинки под углом ϕ_1 (рис. 2в), тогда величина сноса пучка по оси X составит (при расчете по закону Снеллиуса)

$$\Delta x_1 = d \sin \phi_1 \left(1 - \frac{\cos \phi_1}{\sqrt{n^2 - \sin^2 \phi_1}} \right) \approx_{\phi_1 \rightarrow 0} \approx \phi_1 d \frac{n-1}{n} \left(1 - \frac{n^2 - 3n - 3}{6n^2} \phi_1^2 + O(\phi_1^4) \right). \tag{2}$$

Согласно формуле (2) смещение пучков при малых углах поворота с высокой степенью линейно от угла, и определяется коэффициентом преломления и толщиной пластинки.

Лучи матрицы падают на пластинку под разными углами. Поэтому необходимо более подробно рассмотреть влияние пластинки на наклонно падающий конус света (рис. 2г). Пусть угол падения биссектрисы конуса (рис. 2г, штриховая линия) на поверхность пластинки равен ϕ_1 , а угол конуса — ϕ_c , т. е. углы падения огиба-

ющих пучков равны $\varphi_1 - \varphi_c/2$ и $\varphi_1 + \varphi_c/2$. Чтобы определить смещение фокуса в области объекта в результате влияния пластинки, можно записать следующие формулы для поперечного (Δx_p) и продольного (Δz_p)

$$\Delta z_p = \frac{\Delta x_{11} - \Delta x_{12}}{t_1 - t_2} \approx d \frac{n-1}{n} \left[1 - \frac{n^2 - n - 1}{2n^2} \left(3\varphi_1^2 + \frac{\varphi_c^2}{4} \right) + O(\varphi_{1,c}^4) \right]. \quad (3)$$

$$\Delta x_p = \frac{t_2 \Delta x_{11} - t_1 \Delta x_{12}}{t_1 - t_2} \approx -\varphi_1 d \frac{n^3 - 2n^2 + 1}{n^3} \left[\left(\varphi_1^2 - \frac{\varphi_c^2}{4} \right) + O(\varphi_{1,c}^4) \right]. \quad (4)$$

$$t_1 = \operatorname{tg}(\varphi_1 + \varphi_c/2), \quad t_2 = \operatorname{tg}(\varphi_1 - \varphi_c/2)$$

$$\Delta x_{11} = d \sin(\varphi_1 + \varphi_c/2) \left(1 - \frac{\cos(\varphi_1 + \varphi_c/2)}{\sqrt{n^2 - \sin^2(\varphi_1 + \varphi_c/2)}} \right).$$

$$\Delta x_{12} = d \sin(\varphi_1 - \varphi_c/2) \left(1 - \frac{\cos(\varphi_1 - \varphi_c/2)}{\sqrt{n^2 - \sin^2(\varphi_1 - \varphi_c/2)}} \right).$$

Формулы (3) и (4) описывают оптическое смещение координат вершины светового конуса после прохождения пластинки. Также приведено приближенное разложение для малых углов φ_1 и φ_c ($< 0,3$ рад). Если угловые расходимости φ_c лучей одинаковы, то для продольного смещения Δz_p каждого луча присутствует отличие, определяемое собственным углом наклона φ_1 . Если $\varphi_1 = 0$, то как и в паракиальном приближении (см. штрих-пунктирные линии на рис. 2г), вертикальное смещение Δx_p всегда равно нулю. Из формул (3) и (4) можно оценить характерную величину аберраций в фокусе объектива между центральным и самым крайним лучом в матрице лучей. При толщине подложки $d = 5$ мм, $n = 1,46$, углах $\varphi_{1,c} = 0,1$ рад, $M = 100$ сдвиг фокуса между центральным и крайним лучами составит величину

$$\frac{\Delta z_p(\varphi_1 = 0,1) - \Delta z_p(\varphi_1 = 0)}{M^2} < 0,5 \text{ нм},$$

что можно рассматривать, как пренебрежимо малую величину. То же самое и для латерального смещения — $\Delta x_p/M < 2$ нм.

Согласно формулам (2) и (3) отклонение пластинкой паракиального пучка зависит от коэффициента преломления среды пластинки. Зачастую в конфокальных лазерных сканирующих системах используют несколько лазеров в видимом диапазоне, например, 488 нм, 532 нм и 640 нм для возбуждения нескольких флюорофоров. Для использования нескольких источников с разными длинами волн необходимо оценить вносимые хроматические аберрации. Из формулы (4) можно получить следующую оценку для первого порядка латерального смещения.

$$\delta x_\lambda \approx \varphi_1 d \frac{1}{n^2} \frac{1}{M} \frac{\partial n}{\partial \lambda} \delta \lambda \approx \varphi_1 d \frac{1}{M n^2} \delta n,$$

где δn — разница показателей преломления для крайних спектральных точек. Для кварца величина $|\delta n| = 6 \cdot 10^{-3}$, таким образом, влияние хроматической аберрации будет мало $\delta x_\lambda < 20$ нм. Это говорит о том,

смещения вершины конуса для каждого луча, если представить образующие конус лучи через прямые линии и найти их пересечение, полагая при этом, что вершина исходного конуса лежит в координатах (0, 0).

что в данной схеме можно использовать несколько лазеров в качестве источников излучения одновременно с одной и той же пластинкой.

3. Мультипликатор пучков с функцией фокусатора

Особенностью предложенной схемы является использование дифракционного элемента совмещающего функции мультипликатора, формирующего матрицу из 33×33 пучков и фокусирующего элемента [7]. Фокусирующий дифракционный оптический элемент-мультипликатор (ФДОЭМ), изготавливался методом прямой лазерной записи на фоторезисте с помощью круговой лазерной записывающей системы.

ФДОЭМ представляет собой фазовую структуру, нанесенную на кварцевую подложку в круге диаметром $D = 8$ мм. Он трансформирует падающий П-образный или гауссовский луч в 33×33 лучей, фокусирующихся на расстоянии $F = 210$ мм (рис. 3).

Для исследования качества лучей и распределения их интенсивностей в матрице, измерялись профили распределения интенсивностей в зонах А, Б, В и Г

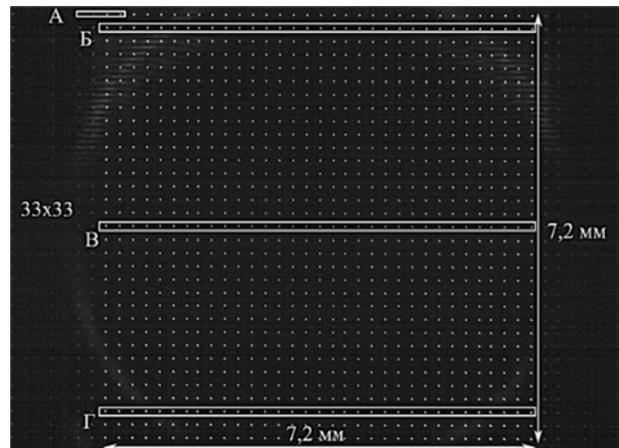


Рис. 3. Матрица пучков 33×33 в плоскости фокусировки. В зонах А, Б, В и Г проводилось измерение профилей интенсивностей

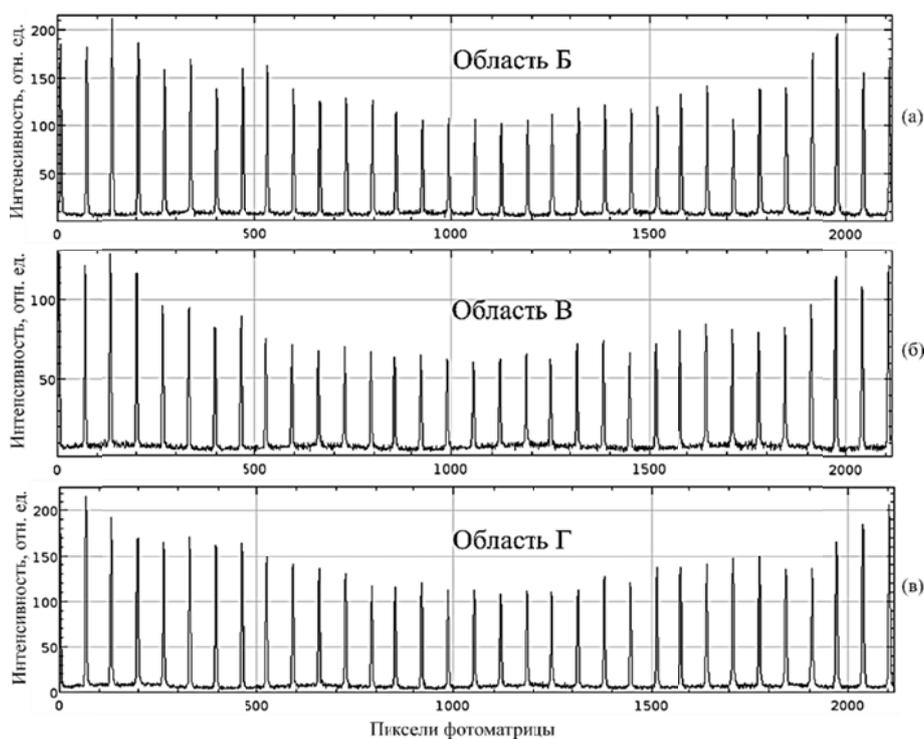


Рис. 4. Распределение профилей интенсивностей лучей из области: Б (а), В (б) и Г (в)

(рис. 4). В силу центральной симметричности распределения интенсивностей лучей относительно центра матрицы лучей, достаточно рассмотреть только горизонтальные участки Б, В и Г. Профили интенсивности измерялись по фотоснимку в области максимального значения интенсивности в ряду лучевых пятен. Измерения из области А показывают, что диаметр d каждого луча по уровню интенсивности e^{-2} близок к дифракционному пределу,

По интенсивности паразитных порядков можно оценить дифракционную эффективность данного ФДОЭМ, как $> 90\%$ в полезном сигнале. Качество каждого сфокусированного пучка близко к гауссовскому основной моды.

Размер сфокусированной матрицы пучков составляет $7,2 \times 7,2$ мм, т. е. расстояние между соседними пучками — $0,225$ мм. Распределение интенсивности пучков внутри матрицы неравномерное: в центре оно составляет около $1/2,5$ от максимального значения, которое находится в периферийных областях (рис. 4).

Неравномерность распределения пучков исправлялась программно, после калибровки МЛКСМ по равномерно рассеивающей поверхности.

4. Реализация и результаты

В экспериментальной установке применена высокоскоростная камера EoSens MC 1362, имеющая формат изображения: 1280×1024 пикселов² и быстродействие 500 кадров/с при полном разрешении.

В системе сканирования использованы гальванометрические сканеры СТИ 6240. Сканеры обеспечивают скорость сканирования до 800 строк в секунду, таким образом, при количестве сканируемых строк между соседними осветительными пучками равным 10,

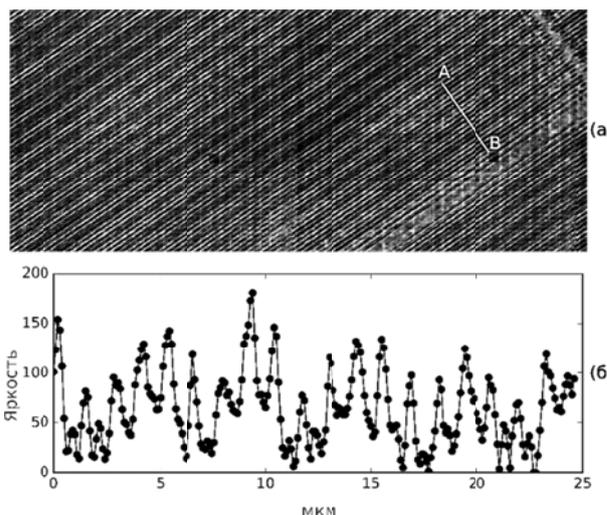


Рис. 5. Изображение линий голограммы с шагом $1,2$ мкм (а) и распределение интенсивности вдоль отрезка АВ (б)

быстродействие системы составило около 80 кадров в секунду.

Фокусировка объектива выполняется моторизованным механическим приводом с диапазоном перемещения 25 мм и разрешением $2,5$ мкм, и пьезоприводом MCL NanoF 200WS, имеющий диапазон перемещения ± 100 мкм, разрешение $0,4$ нм, Латеральные перемещения образца выполняются с помощью прецизионного двухкоординатного стола с диапазоном перемещения по X и по Y 200 мм и точностью $\pm 0,5$ мкм. Характеристики стола позволяют реализовать режим сшивки смещенных по XY кадров изображения для получения изображения большой размерности.

В схеме использовался объектив Nikon CFI60 100X NA. Размер области сканирования объектива — 80×80 мкм (шаг дискретизации по кадру в плоскости \approx менее 100 нм).

На рис. 4 приведён пример полученного с помощью МЛКСМ изображения. Исследуемым объектом являлась часть голографической структуры, представляющей собой дифракционную решетку, выполненную на полимерной пленке толщиной 25 мкм с односторонним металлическим напылением. Период линий дифракционной решетки составлял 1,2 мкм и 0,75 мкм. Сканирование поверхности объекта осуществлялось с не металлизированной стороны объекта, т. е. через полимерную пленку толщиной 25 мкм, что существенно затрудняет получение изображений структуры объекта вследствие внесения пленкой существенных aberrаций при использовании объективов с высокой числовой апертурой, а также из-за паразитных интерферен-

ционных явлений. Изображение полученных отсканированных областей шивались друг с другом путем совмещения их границ. На рис. 5а показаны две совмещенные области сканирования (80×160 мкм). На рис. 5б показано распределение яркости пикселей вдоль отрезка АВ, среднеквадратичное отклонение которых составляет 37. На рис. 4а показано изображение линий с периодом 0,75 мкм, среднеквадратичное отклонение яркости точек вдоль отрезка АВ у которого составляет 25, т. е. в 1,5 меньше.

Благодарность

Исследование выполнено за счет средств субсидии на финансовое обеспечение выполнения государственного задания по Программе II.10.2. Фундаментальные проблемы взаимодействия лазерного излучения с однородными и структурированными средами, перспективные технологии и устройства фотоники (координатор акад. А. М. Шалагин).

Список источников

- [1] **Pawley, J. B.** Handbook of biological confocal microscopy. Third edition. / J. B. Pawley. — Boston: Springer US, 2006. — 632 p.
- [2] **Свищев, Г. М.** Конфокальная микроскопия и ультрамикроскопия живой клетки / Г. М. Свищев. — Москва, Физматлит, 2011. — 120 с.
- [3] Высокоскоростной лазерный конфокальный 3D микроскоп NS-3000 / URL: <http://axalit.ru/catalog/opticheskie-mikroskopy-konfokalnye/> (Дата обращения 21.05.2018).
- [4] **Ishihara, M.** High-speed surface measurement using a non-scanning multiple-beam confocal microscope / M. Ishihara, H. Sasaki // Opt. Eng. — 1999. — Vol. 38. — № 6. — P. 1035–1040.
- [5] **Бессмельцев, В. П.** Форма профиля флуоресценции от толстого слоя флуорофора в многоканальном конфокальном микроскопе / В. П. Бессмельцев, В. С. Терентьев // Оптический журнал. — 2015. — Том 82. — № 6. — С. 58–65.
- [6] **Патент № 2 649 045 РФ.** Многоканальный конфокальный микроскоп / В. П. Бессмельцев, В. С. Терентьев, М. В. Максимов. — Оpubл. 29.03.2018.
- [7] **Бессмельцев, В. П.** Дифракционный фокусирующий мультипликатор для параллельного многоканального секвенатора / В. П. Бессмельцев, П. С. Завьялов, В. П. Корольков, Р. К. Насыров, В. С. Терентьев // Автoметрия. — 2017. — Том 53. — № 5. — С. 48–56. — DOI: 10.15372/AUT20170505.

Multichannel confocal microscope based on the diffraction multiplier

V. P. Bessmeltsev, M. V. Maksimov, V. V. Vileyko, N. V. Goloshevsky, V. S. Terentyev

Institute of Automation and Electrometry, Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia

The implementation of a scanning laser confocal microscope is presented, in which the sample is scanned by a matrix (33×33) of illuminated beams, which greatly increases the speed of building the images of the object and allows them to be obtained in real time video mode. The separation of the laser source radiation into a matrix of illuminating beams is provided by a diffractive optical element. Scanning the sample by laser beams is provided by two plane-parallel plates, the angular rotations of which are carried out by two galvanometric scanners, with orthogonally located axes of rotation of the rotors.

Keywords: Multichannel confocal microscope, Diffractive optical element, Multiplier, Shear plane-parallel plates.