

文章编号 1004-924X(2002)06-0582-06

共聚焦激光扫描荧光显微镜扫描系统研制

周拥军¹, 陈德强¹, 黄文浩¹, 夏安东^{1,2}

(1. 中国科学技术大学 精密机械及精密仪器系, 安徽 合肥 230026;

2. 中国科学院化学所 分子反应动力学实验室, 北京 100800)

摘要:为适应三维光学微细加工及三维光学信息存储研究的需要,研制了共聚焦激光扫描荧光显微镜的工作台式扫描系统,扫描范围 $138\mu\text{m} \times 138\mu\text{m}$ 。工作台采用压电陶瓷驱动器(PZT actuator)驱动的方式来获得高分辨率的位移,采用带柔性铰链的杠杆放大装置来获得较大的位移范围。描述了工作台的工作原理,并对其静态和动态性能进行了测试,实验表明这一扫描系统能很好的应用于共聚焦激光扫描荧光显微镜系统。

关键词:共焦显微镜;压电陶瓷驱动器;柔性铰链

中图分类号:TH742.64 **文献标识码:**A

1 引言

共聚焦激光扫描显微镜(confocal laser scanning microscopy, 简称 CLSM)及其在此基础上发展起来的双光子激光扫描显微镜(two-photon laser scanning microscopy, 简称 TPLSM)以其优异三维成像能力在生物学、半导体工艺及三维微细加工等诸多领域得到日益广泛的应用^[1-2]。共聚焦激光扫描荧光显微镜(CLSM)光学部分的基本原理如图1所示。点光源发出的光通过分光镜和物镜聚焦到样品上,并在样品中激发出荧光。荧光由物镜收集并通过分光镜会聚到共焦小孔上,并由探测器检测。由于共焦小孔、点光源和物镜焦面处于共轭位置,因此非焦面的荧光和杂散光将被共焦小孔阻挡。通过逐点扫描工作台上的样品,便可得到样品的荧光图象。

扫描方式的选择和设计是共聚焦显微镜研制的重要环节。自共聚焦扫描显微镜出现以来,其扫描方式主要有三种:工作台扫描(stage scanning)^[3],光束扫描(beam scanning)^[4]和转盘扫描(spinning disk)^[5]。工作台扫描是指激发光的会聚焦点静止而承载样品的工作台进行二维平面运动实现逐点扫描。光束扫描与其相反,通过在光

路中加入扫描振镜使光束发生偏转,从而实现焦点在样品上的扫描^[6]。转盘扫描是利用快速旋转的Nipkow Disk来实现光束对样品的光栅式扫描。

目前,利用双光子及其共聚焦显微镜来进行三维光学高密信息存储及三维光学微细加工的研究工作已成为微型电子器件和光子器件的重要方法^[7-8]。三维光学微细加工要求聚焦脉冲的宽度要小,光斑的空间轮廓形状光滑。光束扫描方式由于在扫描过程中使光束发生偏转而产生球差,从而容易导致光斑的空间轮廓形状凹凸不平。Nipkow Disk扫描方式在利用飞秒激光作为光源时,将不可避免地造成飞秒激光脉宽的变形和加宽,同样也无法提供高质量的光斑。所以我们开发了一套专门用于此研究方向的工作台扫描的共聚焦显微镜扫描系统,它的扫描过程不改变光束的参数从而使光斑质量达到最优。

本文主要报道了利用压电陶瓷驱动器较高的位移分辨率和基于柔性铰链的微动工作台组建的共聚焦荧光显微镜的扫描系统的原理与设计,对工作台的有关性能如扫描范围、非线性及其动态性能进行了测试,并通过实验获得了良好的效果。

收稿日期:2002-04-09;修订日期:2002-09-24

基金项目:“百人计划”及其创新基金项目资助

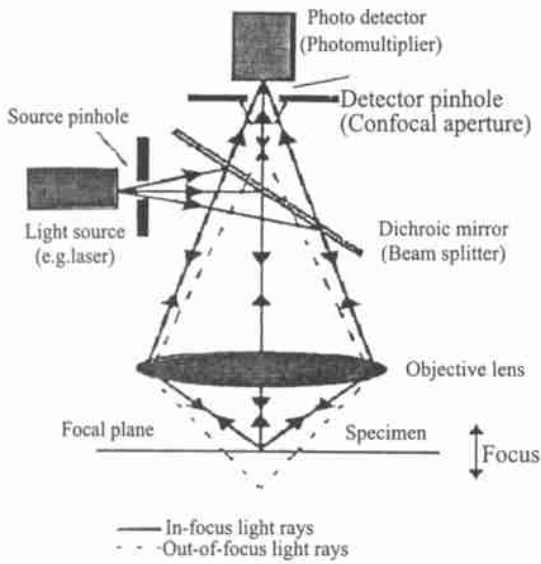


图 1 共聚焦激光扫描荧光显微镜原理图

Fig. 1 Principles of the confocal laser scanning fluorescence microscopy.

2 共聚焦激光扫描荧光显微镜的扫描系统

研制的共聚焦显微镜的扫描系统由两部分组成,一是计算机控制电子系统(CLSM 控制器)(图 2);二是微位移工作台(图 3)。

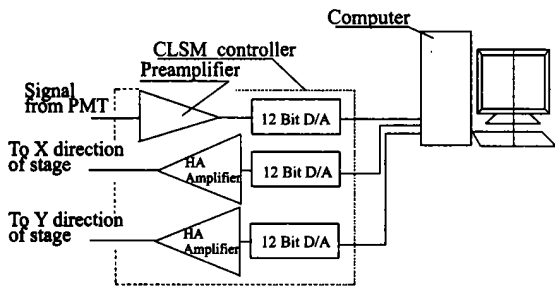


图 2 共聚焦激光扫描荧光显微镜电子及控制系统

Fig. 2 Electronical and controlling system of the confocal laser scanning fluorescence microscope.

扫描系统的基本工作原理是:计算机通过 D/A 转换器和高压放大电路产生两路独立的峰值在 0~120V 的扫描电压,波形为三角波或锯齿波(图 2)。这两路扫描电压分别驱动两个压电陶瓷驱动器,使它们分别在两个方向(x 和 y)上产生相应的伸缩运动。一个微位移工作台(图 3)将嵌入在它内部的压电陶瓷驱动器的伸缩运动放大,并带

动微位移工作台及其上面的样品实现二维扫描。

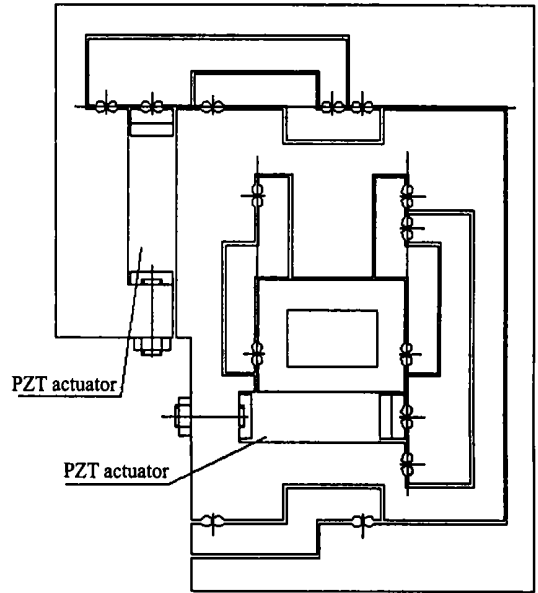


图 3 扫描工作台结构

Fig. 3 Drawing of the scanning stage.

压电陶瓷驱动器的变形量与两端的电压大致成正比,采用的压电陶瓷驱动器在 120V 电压下可输出约 10.8μm 的位移。这样压电陶瓷驱动器提供了一种将电压信号转换为微位移的简便方式,而且它具有非常好的可控性。

微位移工作台的结构如图 3 所示。它在两个方向上将压电陶瓷驱动器的位移放大,实际的放大倍数为 12.8,并实现在二维平面上的扫描。压电陶瓷驱动器具有非常高的位移精度,但它的位移量相对于共焦显微镜的需要来说仍然较小。因此,采用了基于柔性铰链的杠杆放大机构来获得更大范围的位移。柔性铰链是一种圆弧切口结构,利用其有限的角位移可实现精密的运动^[9]。考虑到与压电陶瓷驱动器的线膨胀系数比较接近,工作台材料选用整块的铝合金 LD31,并用线切割方法加工而成。为保证扫描运动的直线性,工作台由平行四杆机构加上一个杠杆放大机构组成(图 4)。平行四杆机构的对称性保证在杠杆做微转动时,工作台中承载样品的部分始终做平动。工作台在两个方向上的结构完全相同。图 4 为在一个方向上的机构简图。

放大机构对压电陶瓷驱动器的变形量 d_p 作二级杠杆放大,理想情况下总输出位移为:

$$d = m_1 m_2 d_p, \tag{1}$$

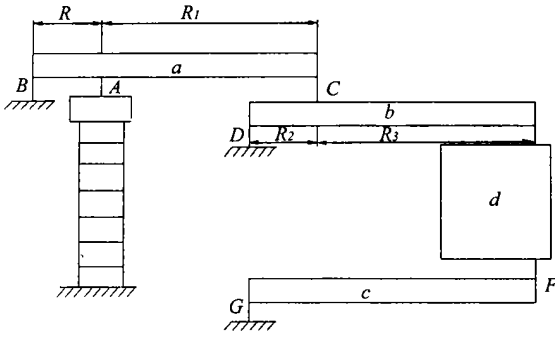


图 4 工作台在一个方向上的机构简图。A ~ F 为柔性铰链, a, b, c 为杠杆, d 为运动部分

Fig.4 Schematic of the stage design in one direction, where A ~ F are flexure hinges, a, b, c are levers, and d is the moving part.

其中: $m_1 = 1 + R_1 / R$, $m_2 = 1 + R_3 / R_2$

在设计中, $R = 15\text{mm}$, $R_1 = 60\text{mm}$, $R_2 = 10\text{mm}$, $R_3 = 40\text{mm}$, 由(1)式可得理想情况下总输出位移应为 $270\mu\text{m}$ 。

由于柔性铰链和压电陶瓷驱动器的刚度均为有限的, 因此总输出位移必然有一定的损失。Fredric E S 给出了由柔性铰链引起的位移损失的理论计算^[10]:

$$d / g d_p = \{ 1 + (0.222 t^2 - 0.1818 t^{5/2} / 1/2) \times [g k_1 + k_2 (g - m_2)] \}^{-1}, \quad (2)$$

其中: 为柔性铰链的圆弧半径, t 为柔性铰链的厚度。

$$g = m_1 m_2,$$

$$k_1 = 4 m_1 / R_2^2 m_2 + 3 / R^2 m_1 m_2,$$

$$k_2 = 4 R_1 / R R_2^2 m_2$$

在设计中, 柔性铰链的圆弧半径 = 1.75mm , 柔性铰链的厚度 $t = 0.35\text{mm}$, 代入式(2)得 $d / g d_p = 0.97$ 。可见柔性铰链造成的位移损失很小, 约 3%。

工作台的位移分辨率对三维微细加工和成像有很大的影响, CLSM 控制器电压纹波小于 10mV , 所以理论上工作台位移分辨率小于 $0.025\mu\text{m}$, 远小于光学分辨率, 完全满足成像和三维微细加工的要求。

3 工作台性能测试

3.1 工作台静态性能测试

图 5(A) 为实测得到的工作台上压电陶瓷驱

动器的电压位移曲线, 测试仪器 VRZ480 电感测微仪, 分辨率 $0.1\mu\text{m}$ 。图 5(B) 为用激光干涉仪 HP5528A 对工作台进行的测试, 分辨率 $0.1\mu\text{m}$ 。测试结果表明工作台最大位移量 $138\mu\text{m}$ 。与理想值的差距除了柔性铰链引入的位移损失外, 其余主要由压电陶瓷驱动器的刚度及驱动器与工作台的粘接处的刚度引入。但从(A)、(B)两图中可以看出它们的位移曲线基本相同, 工作台的位移输出与压电陶瓷驱动器的位移输出成固定的比例关系(12.8:1), 表明工作台的位移能由压电陶瓷驱动器上的电压准确的控制。

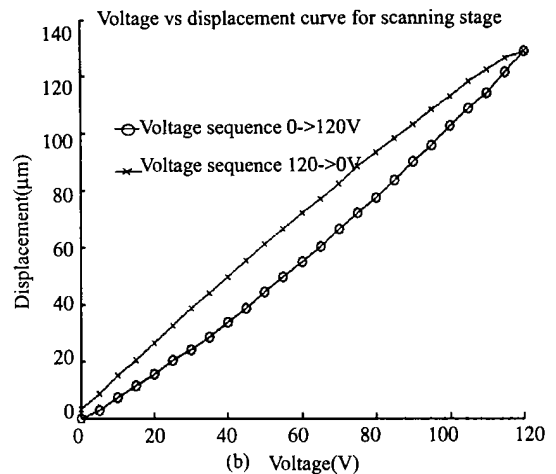
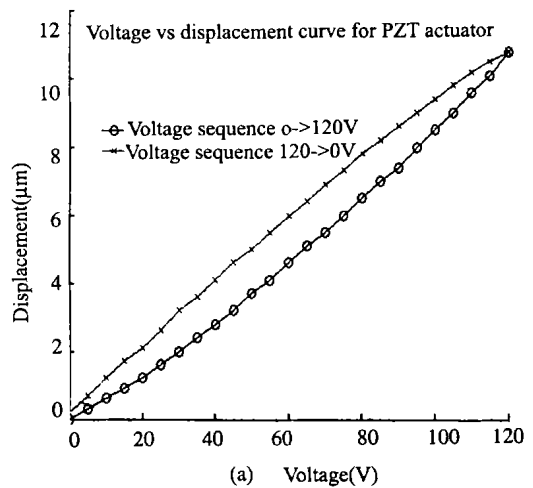


图 5 压电陶瓷驱动器(a)及扫描工作台(b)的电压一位移曲线

Fig.5 Voltate versus displacement curve for PZT actuator(A) and scanning stage(B).

从测试结果可以看出压电陶瓷存在一定的迟滞。解决这种非线性的方法是根据实测位移电压曲线用软件补偿来修正扫描电压的波形, 使位移

输出成线性:即对实测的数据进行三次曲线拟合,得到其三次方程:

$$y_1 = -7.9 \times 10^{-6} x_1^3 + 0.004 x_1^2 + 0.71 x_1 - 0.4, \quad (3)$$

$$y_2 = -1.2 \times 10^{-5} x_2^3 + 0.00064 x_2^2 + 1.2 x_2 + 3. \quad (4)$$

其中: y 为位移, x 为电压。由方程可求得某一位移对应的电压。方程(3),(4)与实测数据的最大误差分别为 $0.6\mu\text{m}$ 和 $0.7\mu\text{m}$ 。如果想获得更精确的位移输出,也可采用硬件中加入闭环反馈来实现线形输出^[11]。

对工作台的电压-位移曲线进行了多次测试,比较各次测试结果中各测量点上位移的差异可反映出工作台的重定位精度。测试数据表明误差平均值 $0.37\mu\text{m}$,均方根误差 $0.24\mu\text{m}$,最大值与最小值之差 $0.7\mu\text{m}$ 。

3.2 工作台动态性能测试

由于工作台在工作时处于动态扫描状态,其动态性能会对扫描过程的稳定性及位移精度产生影响^[12]。图 6 为用电容测微仪 BHCWY-1 及示波器 TDS210 测得的工作台在两个方向(以图 3 为例,水平方向为 x ,垂直方向为 y)的冲击响应。对其分析表明 x 、 y 两个方向的共振频率分别为 91Hz 和 32Hz 。工作台扫描时在 x 方向上进行扫描, y 方向实现帧扫描,以便获得更好的动态性能。一般取工作频率(行扫描)在 10Hz 以下。

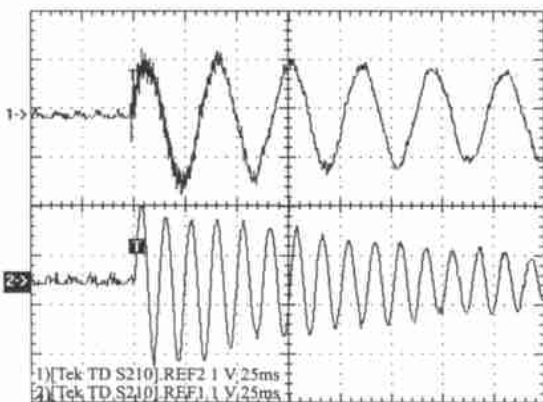


图 6 扫描工作台在两个方向上的冲击响应

Fig. 6 Impulsive response of the scanning stage in two directions.

4 实验结果

为了验证工作台的扫描功能,用该扫描工作台在自行研制的共聚焦荧光显微镜中对样品进行扫描成像。样品中的荧光物质为 Shipley 公司 S1830 光刻胶,激发光源为 VERD1-5 半导体泵浦激光器(Coherent, USA),波长 532nm ,显微镜入口处激光功率约 5mW ,荧光波长大于 590nm ,得到的图像如图 7 所示。

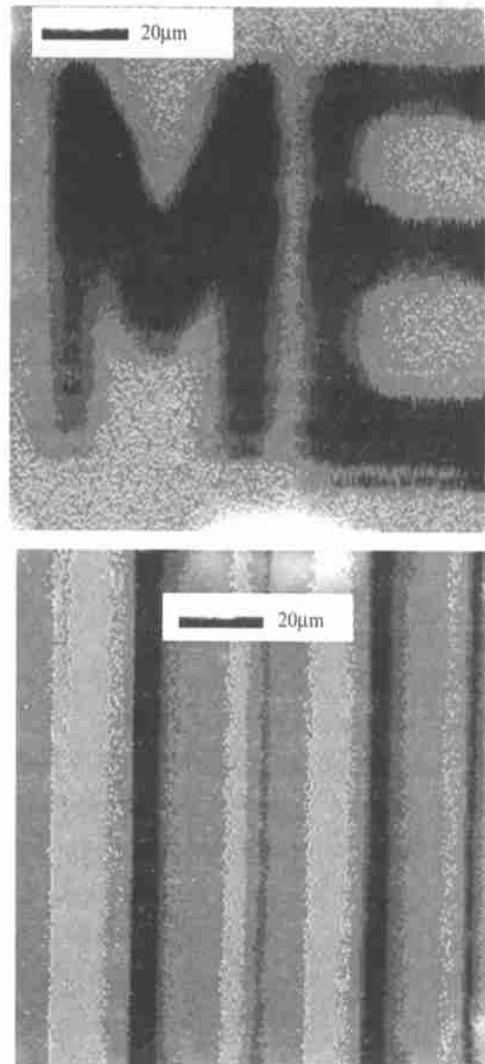


图 7 S1830 光刻胶荧光图像。A 为两个英文字母“ME”。B 为光刻胶组成的样条。深色部分表示荧光

Fig. 7 Fluorescent images of S1830 photoresist, where A is the two English character “ME”, and B is the arrangement of lines of the photoresist. The deep color represents fluorescence.

图 7(A) 为 S1830 光刻胶通过光刻而成的两个英文字母“ME”。图 7(B) 为用该光刻胶制成的线条, 图中的线条最小宽度约为 $4\mu\text{m}$, 深色部分代表荧光。

5 结论

报道了利用压电陶瓷驱动器较高的位移分辨率和基于柔性铰链的微动工作台组建的共焦荧光

显微镜的扫描系统, 各种性能测试均满足共焦荧光显微镜的要求, 并在实验中得到了较理想的图像。该工作台在扫描过程中不会引入像差, 并简化了共焦显微镜的光路设计。并且, 增加或减小扫描电压的幅值可以方便的调节视场的范围。轴向的扫描可以用步进电机或手动方便地加入。这种工作台可以实现准确的定位, 以便实现对某些感兴趣的点或线进行时间扫描, 非常适合微细加工的需求。

参考文献:

- [1] 陈德强, 夏安东, 王克逸, 等. 双光子激光扫描荧光显微镜及其应用[J]. 物理, 2000, 29(4): 232-236.
- [2] Xia A D, Wada S, Tashiro H. Optical data storage of C60 doped polystyrene film by photooxidation[J]. *Appl. Phys. Lett*, 1998, 73: 1323-1325.
- [3] Wilson T, Sheppard C J R. *Theory and practice of scanning optical microscopy* [M]. London, Academic press. 1984.
- [4] Steltzer E H K, Wijnandts van Resandt R W. Nondestructive sectioning of fixed and living specimen using a confocal scanning laser microscope: microtomography[J]. *SPIE*, 1987, 809: 137-140.
- [5] Juškaitis R, Wilson T, Neil M A A, et al. Efficient real-time confocal microscopy with white light sources[J]. *Nature*, 1996, 383: 804-806.
- [6] 张景和, 袁雅珍, 阮锦. 激光扫描显微镜中的扫描系统[J]. 光学 精密工程, 1995, 3(2): 62-65.
- [7] Hong B S, Shigeki M, Hiroaki M. Three-dimensional photonic crystal structures achieved with two-photon absorption photopolymerization of resin[J]. *Appl. Phys. Lett*, 1999, 74(6): 786-788.
- [8] Zhang H, Walker E P, Feng W Y, et al. Multi-layer optical data storage based on two-photon recordable fluorescent disk media[J]. *Eighteenth IEEE symposium on mass storage systems*, 2001: 225-236.
- [9] Paros J M, Weisbord L. How to design flexure hinges[J]. *Machine Design*, 1965, 37: 151-156.
- [10] Fredric E S E, Clayton T. Piezodriven 50um range stage with subnanometer resolution[J]. *Rev. Sci. Instrum.* 1978, 49(12): 1735-1740.
- [11] Nishimura K. A spring-guided micropositioner with linearized subnanometer resolution[J]. *Rev. Sci. Instrum*, 1991, 62(8): 2004-2007.
- [12] 吴一辉, 扬洪波. 纳米 X-Y 工作台固有频率特性的研究[J]. 光学 精密工程, 1995, 3(6): 50-54.

Development of the scanning system for confocal laser scanning fluorescence microscope

ZHOU Yong-jun¹, CHEN De-qiang¹, HUANG Wen-hao¹, XIA An-dong^{1,2}

(1. Department of Precision Machinery and Instrumentation,
University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

2. Molecular Reaction Dynamics Lab, Institute of Chemistry,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: For adaptation of 3D optical microfabrication and 3D optical data storage, we have developed a stage-scanning system for a confocal laser scanning fluorescence microscope (CLSM) with $138\mu\text{m} \times 138\mu\text{m}$ field of view. The stage employs flexure hinges driven by piezoelectric (PZT) actuators to achieve high positioning accuracy and large scanning area. This paper describes the principle of the stage, and the testing of

the static and dynamic properties. The whole system has been testified to work well for confocal laser scanning microscopy .

Key words : confocal microscope ; PZT (piezoelectric) actuator ; flexure hinge

作者简介:周拥军(1971-),男,河北邯郸人,1993年毕业于重庆大学机械工程一系,现为中国科技大学精密机械及精密仪器系博士生,主要研究方向光机电一体化、三维光学信息存储及三维光学微细加工。Email: yjz@mail.ustc.edu.cn。

征订启示

愿《液晶与显示》成为您的良师益友 欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登产品信息

《液晶与显示》是由中国科学院长春光学精密机械与物理研究所和中国光学光电子行业协会液晶专业分会主办,科学出版社出版的我国液晶学科和显示领域中惟一的专业性学术期刊。

《液晶与显示》以创新性、综合性、实用性为办刊特色,内容丰富,涵盖面广,信息量大,可读性强,既是启迪科技人员开拓创新思路的参考期刊,又是从事液晶和显示技术研究的广大科技人员、大专院校师生及相关领域的科技工作者进行学术交流的论坛,也是图书、情报等部门必不可少的信息来源。

《液晶与显示》为双月刊,A4开本,80页,国内定价10.00元,全年60.00元,国内外公开发行。国内邮发代号:12-203,国内读者可在当地邮局订阅;也可通过“全国非邮发报刊联合发行部”订阅(地址:天津市陈塘庄电子部第46研究所半导体杂志社,邮编:300220),本刊的代号为:5074。国外读者可通过中国国际图书贸易总公司订阅(地址:北京399信箱,邮编:100044),国外发行代号:4868Q。同时,《液晶与显示》编辑部将竭诚为广大读者服务,随时办理订阅。

地 址:吉林省长春市人民大街140号 中国科学院长春光学精密机械与物理所

《液晶与显示》编辑部

邮 编:130022

电 话:(0431)5684692-2534

传 真:(0431)5682346

E-mail:yjxs@ciomp.ac.cn

网 址:www.ciom.ac.cn