

可调焦透镜实现三维显微成像

David Leuenberger, Optotune AG; Fabian F. Voigt, 苏黎世大学

可调焦透镜能够加速并增强现代显微成像方法中的三维成像能力，包括共聚焦显微镜、双光子显微镜以及光片显微镜等。

对于显微镜初学者来说，当他们发现样品中仅略微失焦的部分在图像中却显得模糊得多时，可能会感到困惑。人眼所见的景深似乎远大于相机所记录的景深。这种令人迷惑的现象产生的原因在于眼睛的调节功能：在通过显微镜观察时，使用者会不断——且通常是无意识地——改变焦平面，而无需旋动调焦旋钮，仅通过调节眼睛晶状体的焦距即可实现。自显微镜发明以来，可调焦透镜帮助研究人员更直观地感知微观物体的三维形状和纹理。

在配备电子图像采集的现代显微镜中实现类似装置是非常必要的。如今，科学家们对在更短时间尺度上以高空间分辨率观察生物体的结构和功能的需求日益增长。现代生物显微学也正逐步从成像位于载玻片与盖玻片之间的微小样品，转向三维细胞培养、整个胚胎甚至活体动物成像，以便在更自然的环境中研究发育与生理功能。

传统上，获取三维成像数据需要通过机械平移物镜或样品（使用载物台或压电物镜 Z 扫描器）实现。由于这些装置中运动部件的机械惯性，要在数百微米的 Z 范围内实现高于 10–20 Hz 的体积扫描速度非常具有挑战性。

一种称为“远程聚焦”的替代方案则通过改变光线进入或离开显微物镜时的汇聚程度，从而分别诱导激发光或发射光的轴向焦点偏移。可用于这一目的的可调光学元件种类多样，例如空间光调制器、可变形镜以及可调焦透镜等。由于其低成本、结构与控制简单以及宽广的焦距调节范围，可调焦透镜特别适合于对体积采样速度要求高、分辨率中等的显微成像应用。

可调焦透镜技术

Optotune 的形变透镜基于弹性聚合物材料。透镜的核心元件由一层薄膜组成，该薄膜构成了液体腔室与空气之间的界面（见图 1）。为了调节焦距，音圈执行器对环绕透光孔径的液体储槽施加压力，使液体被迫进入透镜中心，从而改变薄膜的曲率。电动可调焦透镜（ETL）的控制非常简便，只需使用现成的电流控制器或透镜驱动器，为透镜提供 0 至 290 mA 的电流即可。

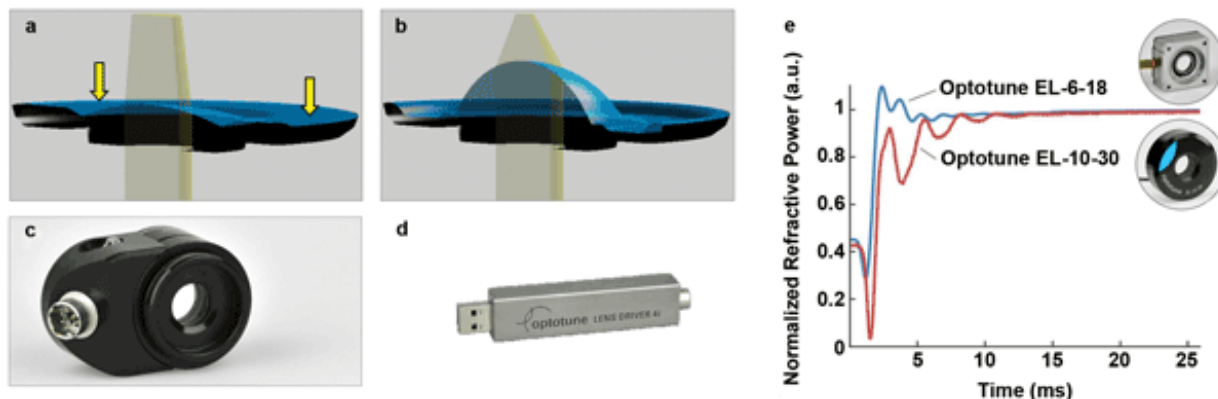


图 1. (a, b): 电动可调透镜 (ETL) 的工作原理，通过电流控制的电磁或机械执行器压下充液透镜容器，使液体流向透镜中心，从而改变透镜形状。(c) 对于 ETL，我们提供软件控制的透镜驱动器 (d)，用于提供电流。(e) ETL 的典型响应时间约为 5 ms，实际稳定时间随透镜孔径而异。

我们提供多种电控可调透镜（ETL），孔径范围从 6 mm 到 16 mm 不等。典型焦距范围为：高色散液体版本 52–120 mm，低色散液体版本 80–200 mm。在工作过程中，控制电流可能会使透镜升温，从而导致焦距随温度漂移。由于液体透镜的热膨胀对焦距的影响约为玻璃透镜的两倍数量级，因此需要在透镜中集成温度传感器。结合靠近液体的温度传感器以及透镜中存储的校准曲线，USB 驱动固件可计算出正确的电流值，从而将透镜设定并维持在指定的焦距。

ETL 的一大优势是其响应时间极短，仅为数毫秒。图 1e 展示了对矩形阶跃脉冲响应时归一化折射功率随时间变化的典型示例。可调焦透镜在 240–2500 nm 范围内具有高透过率，且耐受高功率（1064 nm 连续波操作下可达 10 kW/cm²），同时具有保持偏振的特性。

在显微镜中集成可调焦透镜

现代显微镜使用无穷远校正物镜，这意味着样品发出的光从物镜出来时是平行光束。为了成像，需要额外的物镜筒透镜（图 2）。相反，当将准直激光束送入物镜时，激光光束会在样品内部聚焦。通过可调焦透镜改变光束的准直状态，可以移动焦平面。例如，当将发散光束送入物镜时，焦点会远离物镜前透镜的位置。

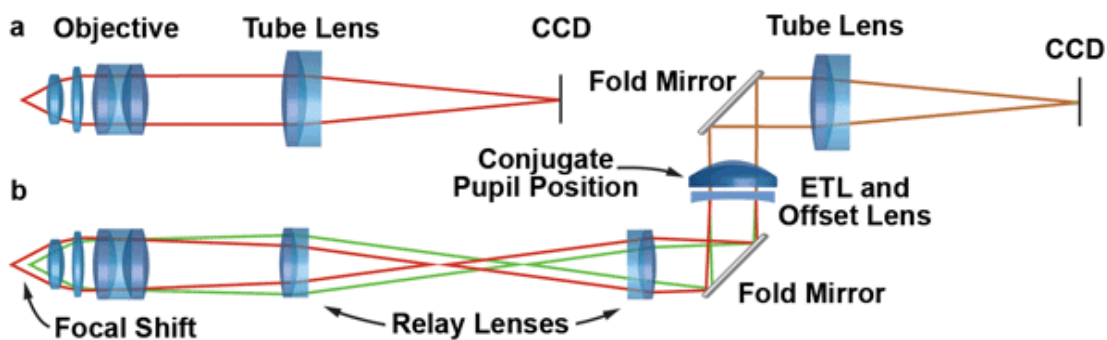


图 2.(a) 在采用无穷远校正光学的显微镜中，图像由物镜和筒透镜形成。(b) 在物镜与筒透镜之间插入由两枚消色差透镜组成的中继系统，可形成共轭光阑。在此位置可放置 ETL 与偏置透镜，实现轴向聚焦，同时不改变数值孔径或放大倍数。将 ETL 和偏置透镜水平放置可避免透镜膜因重力引起的变形。图片来源：Fabian F. Voigt。

对于大多数三维显微成像应用，需要能够同时增加和减小物镜的工作距离。一些 ETL 仅能在正焦距范围内调节，此时必须将其与固定的负偏置透镜（OL）配合使用，以将光束从会聚光转换为发散光。

通过显微镜目镜观察时，人眼会移动头部，使眼睛位于显微镜的出瞳位置，这些出瞳通常可见为悬浮在目镜上方的小亮盘。在出瞳位置，眼睛能够获得最佳的显微图像概览，并充当“集成人眼聚焦装置”实现最佳聚焦效果。理想情况下，ETL/OL 组合也应放置在此类光阑位置，但使用标准目镜的出瞳通常不利：典型的筒透镜与目镜组合具有高中间放大倍率，从而极大限制了可用的聚焦范围。这是因为调焦范围与显微镜放大倍数的平方成反比。

更优的方案是通过定制中继系统形成与物镜光阑位置共轭的光阑（图 2）。需要注意将 ETL/OL 组件放置在光路的垂直段（图 2b），否则图像可能出现不希望的像差（尤其是像散），这是由于透镜膜受重力作用产生的变形所致。在新一代高度模块化的科研显微镜中，集成此类中继系统通常较为简单。

然而，一些商业仪器不适合用户进行大幅度改装。在这种情况下，ETL/OL 组合可以放置在平行光路径的其他位置。缺点是，将可调元件放置在远离共轭光阑的位置会导致聚焦时放大倍数和数值孔径（NA）发生变化。在光学设计术语中，系统不再是远心的。因此，焦平面移动会伴随变焦效应和分辨率变化。对于几十分之一微米的小调节范围，这些效应通常很小且可接受。对于较大的焦点位移，可通过图像处理补偿放大倍数变化。

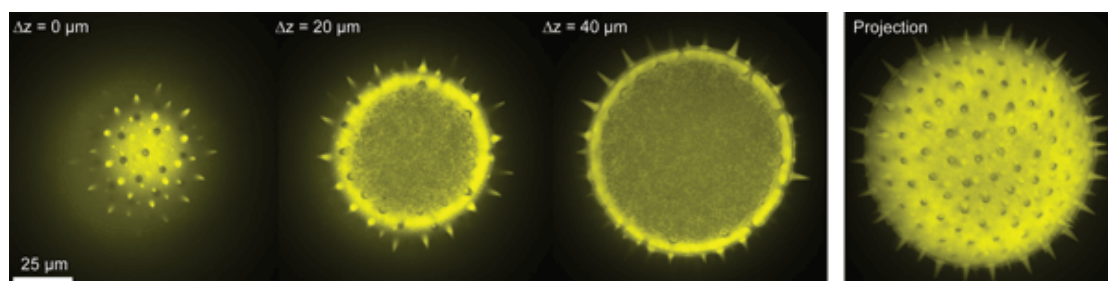


图 3. 使用 40× 物镜和集成 ETL 的旋转盘共聚焦显微镜拍摄的花粉粒（直径 100 μm）Z 堆栈。图中显示了不同轴向焦点位置的单帧图像以及最大强度投影图。最大 Z 范围为 60 μm。图片来源：Fabian F. Voigt 和 Helge Ewers。

在远程聚焦系统的设计中，成本与复杂性之间存在显著权衡。与可变形镜或空间光调制器不同，大多数可调焦透镜只有单一自由度，即焦距。在远程聚焦路径中仅配备单个 ETL 的显微镜无法在整个 Z 调节范围内实现与真正自适应光学显微镜相同的复杂像差校正。然而，使用 ETL 聚焦的成本仅为完整自适应光学系统的一小部分。

应用示例：共聚焦显微镜

共聚焦显微镜是最重要的显微技术之一，在细胞生物学、单分子物理学及其他众多学科中有广泛应用。我们在商用旋转盘共聚焦显微模块（Yokogawa CSU-X1）与倒置显微镜台（Olympus IX71）结合的系统中测试了 ETL。

由于无法在该显微镜中集成中继系统，ETL/OL 组件被安装在一个可旋转进入光路的定制滤光片盒中。使用 40× 物镜和 1.3 NA（Olympus UPLFLN 40XO）时，实现了最大 Z 范围为 60 μm。

应用示例：活体双光子显微镜

双光子激发技术在散射介质中具有出色的成像能力，非常适合用于脑组织深层的荧光成像。结合神经活动的功能指示剂和活体成像协议，双光子显微镜已成为记录活体小鼠脑内数十至数百个神经元群体活动的标准方法，成像深度可达数百微米。

仅采样单一焦平面只能有限观察局部网络中的分布式活动模式。因此，我们在现有的双光子显微镜基础上进行了改装，该显微镜配备可通过声光偏转器进行极快速 X-/Y 扫描的系统，并加入了 ETL 与 OL。声光偏转器可将飞秒激光束以千赫兹速率随机访问照射到大量神经元上。

引入 ETL 后，可快速切换至多个焦平面。我们实现了对分布于两个焦平面（间距 30–100 μm）中最多 40 个神经元的成像速率为 30–40 Hz（见图 4）。除了多平面成像外，ETL 还可用于清醒和行为动物的运动校正。

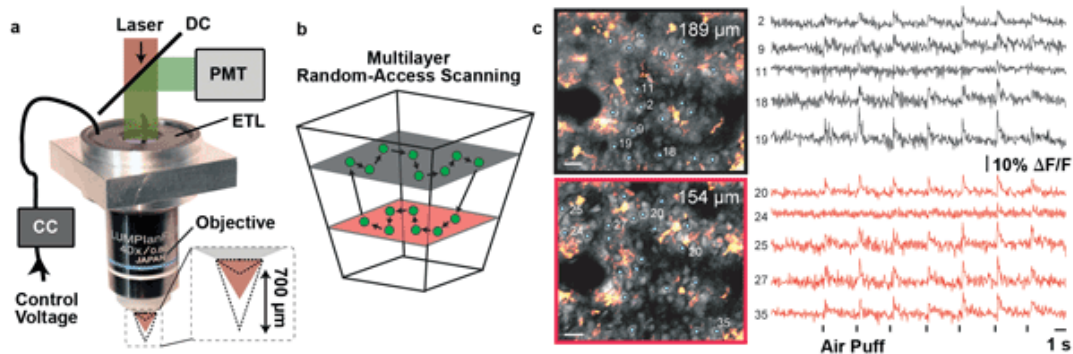


图 4.(a) 物镜支架，用于在定制双光子显微镜中集成 ETL，该显微镜配备声光偏转器，可对小鼠脑内神经元活动进行活体成像。ETL 由电流控制器 (CC) 驱动，并与偏置透镜 (未显示) 一起安装在物镜附近。(b) 由于 ETL 未放置在共轭光阑位置，扫描体积呈锥形。声光偏转显微镜可在随机访问扫描模式下快速测量使用钙指示剂标记的神经元活动。ETL 增强了多平面成像能力，成像速率可达 40 Hz。(c) 图中显示不同深度的两个焦平面（神经元灰色显示，星形胶质细胞橙色显示）。用于快速钙成像的细胞 (1 至 40) 已标记。神经元信号表现出与重复空气刺激动物胡须同步的反应。比例尺：20 μm 。图片来源：Benjamin Grewe、Fabian F. Voigt 和 Fritjof Helmchen。

应用示例：快速三维光片显微镜

在过去十年中，光片显微镜和选择性平面照明显微镜 (SPIM) 已被公认为活体生物样品成像的理想工具（例如用于记录斑马鱼和果蝇的胚胎发育过程）。在 SPIM 中，样品从侧面被光片照射，从而将荧光激发限制在显微镜物镜焦平面上的单一平面内。SPIM 提供出色的光学切片能力、低光毒性以及高图像采集速度，并被《Nature Methods》评为 2014 年度方法。

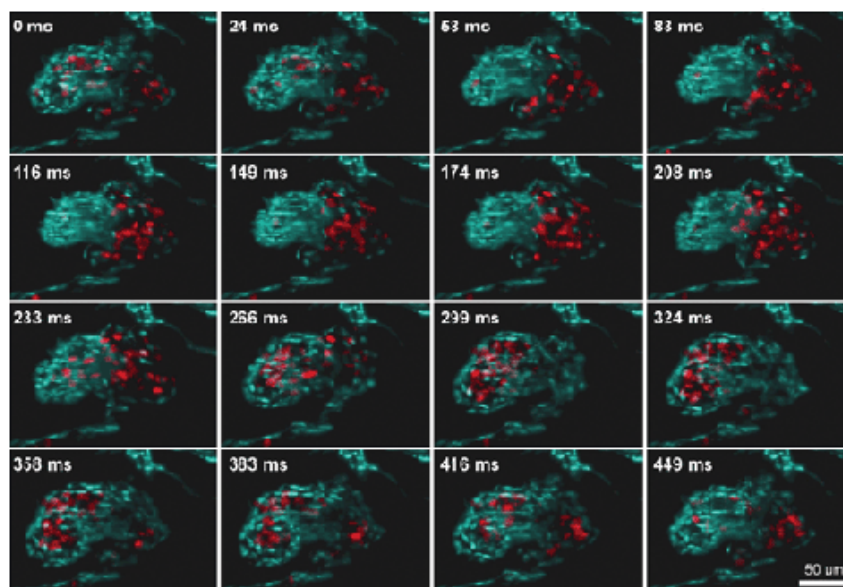


图 5.使用配备 ETL 的光片显微镜 (ETL-SPIM) 进行快速 Z 扫描，以 60 Hz 体积速率拍摄的跳动斑马鱼心脏三维重建图。心脏以蓝色标记，红细胞显示为红色。图片来源：Florian Fahrbach、Michaela Mickoleit 和 Jan Huiskens。

最近，一套 SPIM 系统配备了 ETL 用于快速体积扫描。借助以数百至数千帧每秒运行的相机，可在跳动的斑马鱼心脏中以前所未有的速率获取 10 至 20 个平面，实现每秒 30–60 次体积扫描。如此高的体积扫描速率使得追踪心脏中流动的单个红细胞成为可能。

展望未来

未来，将推出具有更大有效孔径和更宽调焦范围的 ETL，同时配备创新的驱动电子系统，可将重复性提高一个数量级。预计在未来十年内，集成可调透镜的显微物镜可能会成为日常使用的标准装备。

作者简介

Fabian F. Voigt 为瑞士苏黎世大学脑研究所博士生；Dr. David Leuenberger 为瑞士 Dietikon 的 Optotune AG 销售经理；

致谢

作者感谢 Manuel Aschwanden、Jerry Chen、Adriana Dabacan、Helge Ewers、Florian Fahrbach、Benjamin Grewe、Fritjof Helmchen、Jan Huisken、Michaela Mickoleit、Oliver Pfäffli 和 Mark Ventura 对 ETL 快速三维显微成像研究的贡献。

参考文献

1. B. Grewe 等 (2011)。使用电可调透镜对神经元群体进行快速双层双光子成像。《Biomed Opt Express》，第 2035–2043 页。
2. J. Chen 等 (2013)。利用可调透镜在双光子成像中对舔舐诱导的脑运动进行在线校正。《J Physiol》，第 4689–4698 页。
3. E.H.K. Stelzer (2015)。用于定量生物学的光片荧光显微镜。《Nat Methods》，第 12 卷，第 1 期，第 23–26 页。
4. F. Fahrbach 等 (2013)。配备可调透镜的快速三维光片显微镜。《Opt Express》，第 21010–21026 页。
5. M. Mickoleit 等 (2014)。跳动斑马鱼心脏的高分辨率重建。《Nat Methods》，第 11 卷，第 9 期，第 919–922 页。

更多信息与技术支持

新特光电是 Optotune 在中国的授权合作伙伴，一站式提供其全系列可调光学元件（液态可调焦镜头、精密&快速光束控制反射振镜、光束位移器、激光散斑衰减器及控制器）的选型匹配、应用方案设计及系统集成与工程落地全生命周期的技术支持。通过可调光学技术，实现焦距动态调节、光束精准偏转与高质量成像优化，广泛应用于激光加工、机器视觉检测、3D 成像及高端科研系统等场景。

液态可调焦镜头：<https://www.sintecclaser.com/optical/liquid-lens.html>

精密&快速光束控制反射振镜：<https://www.sintecclaser.com/optical/beam-steering.html>

光束位移器：<https://www.sintecclaser.com/optical/beam-shifting-devices.html>

激光散斑衰减器：<https://www.sintecclaser.com/optical/laser-speckle-reducers.html>

我们还可提供不同通光孔径、调焦范围、光束偏转角度及涂层波长（UV–IR）的定制化可调光学解决方案，满足从科研到工业量产的多样化需求。获取最新方案及报价，请联系：

手机|微信：罗经理：18162698939，夏经理：13697356016