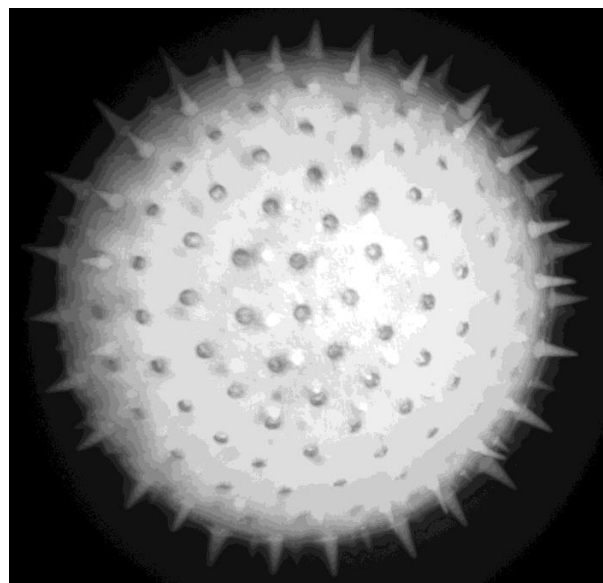
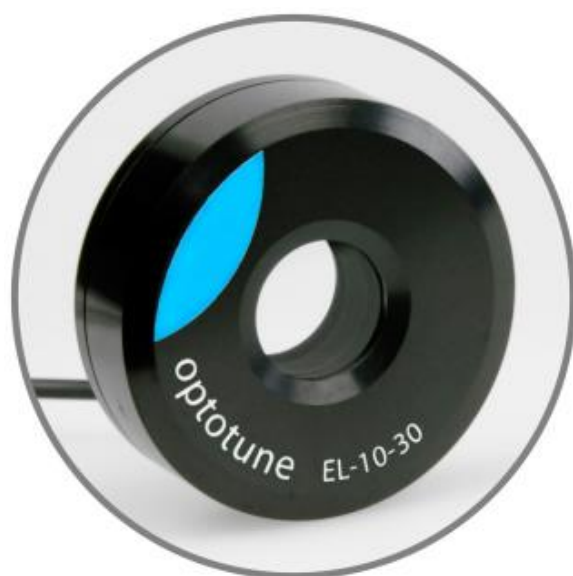


## 应用说明：

适用于宽场、共聚焦、双光子及薄光片显微镜的可调焦透镜



### 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

## 摘要

EL-10-30 具有大光圈、响应和驱动速度快以及优异的光学性能，在显微镜领域的各种应用中具有广阔的前景。在本应用说明中，我们将探讨在三种不同的显微镜技术中应用电调焦透镜（ETL）实现快速轴向调焦的方法，这三种技术分别是：（1）经典宽场荧光显微镜，（2）荧光共聚焦显微镜，以及（3）双光子显微镜。关于这些技术的详细介绍，请参阅 <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/index.html>。

## 一般考虑因素与典型应用

ETL可用于显微镜领域的多种应用，包括专用可调谐照明系统以及电控变焦光学系统等。在本应用说明中，我们将专门讨论利用ETL沿光轴进行对焦的应用。根据ETL的具体实现方式及光学性能要求，可实现30至700微米的轴向对焦范围。尽管如此，本文中关于在显微镜中使用ETL的大部分技术细节同样适用于其他应用场景。在标准显微镜中，轴向对焦通常通过移动Z轴载物台上的样本或移动显微镜物镜来实现。实现精密对焦的常见替代方案是使用压电驱动的物镜转台。然而，这些对焦技术依赖于相对于样本的机械轴向运动。若采用光学对焦方案，则可实现无机械运动且更快速的对焦。将ETL集成到显微镜的光路中，是实现光学对焦的一种便捷方案。现代显微镜物镜具有无限远校正光学系统，这意味着源自物镜焦平面内某一点的光线不会聚焦到像平面内的某一点，而是以平行光束（聚焦于无限远）的形式从物镜射出（图1）。需要额外添加一支管透镜，才能在探测器上形成实像。

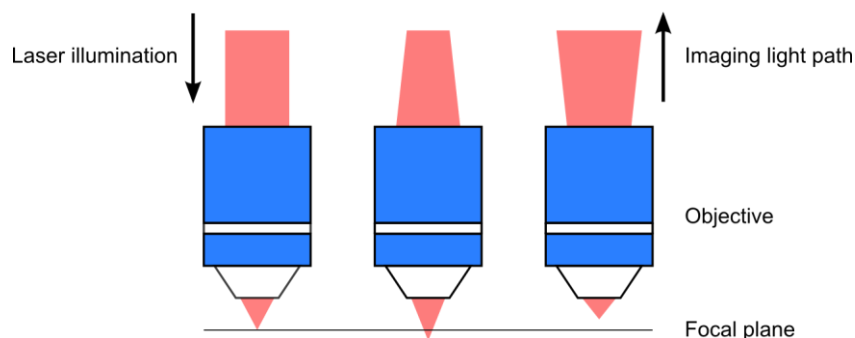


图1：在成像过程中，经过无限远校正的物镜将一束平行光聚焦到其焦平面上形成一个光斑，反之亦然。位于标称焦平面下方或上方的点光源，将分别产生会聚光束或发散光束。

如果物体或光源向物镜前透镜靠近，物镜会产生发散光束；反之，如果物体位于标称工作距离之外，则会产生聚光束。这些条件也可以反过来看：如果能利用可调光学元件在物镜处产生发散或聚光束，则可以沿光轴对显微镜进行对焦。这既适用于通过物镜的照明光路，也适用于成像光路，例如在激光扫描显微镜中。

由于 EL-10-30 只能产生可调的聚光束，因此必须与负焦距的偏移透镜配对，才能实现从负焦距到正焦距的调谐范围（图2）。

我们将焦距为 -100 mm 的平凹单片透镜与EL-10-30（低色散型，焦距范围为 50-200 mm）组合在一起。ETL 与偏移透镜 (OL) 的组合可安装在定制的透镜支架或标准的 30 mm 透镜管中。

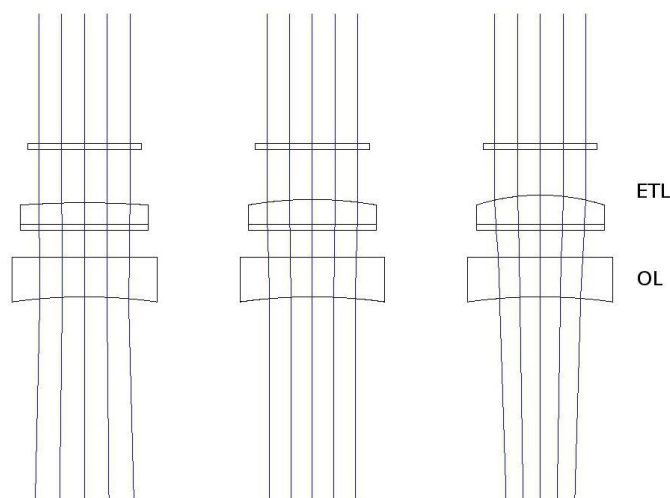


图2: EL-10-30 (ETL) 与焦距为负值 ( $f = -100$  mm, Thorlabs LC 4232) 的偏移透镜 (OL) 的 ZEMAX模型。请注意可调表面曲率的变化及其导致的光束发散角变化。

实现光学对焦的最简单方法是将ETL/OL组件尽可能靠近物镜安装（图3）。例如，可以将ETL和OL安装在一个带有两个RMS螺纹的镜筒中，并将其插入物镜转盘与物镜之间——这与安装压电对焦装置的方式相同。

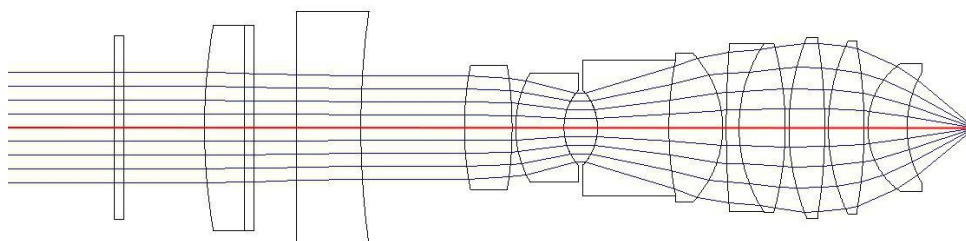


图3: ETL/OL组件与显微镜物镜组合系统（美国专利4231637）。整个系统的轴向长度约为50 mm。在该系统中，将 EL-10-30 的焦距从150 mm调节至80 mm，可在标称工作距离附近实现约  $-50\ \mu\text{m}$  至  $+50\ \mu\text{m}$  的轴向焦点扫描。所使用物镜的焦距为4.4 mm。

将ETL和OL定位在物镜后止挡附近操作简单且易于实现，但这对于光学聚焦而言并非最佳位置，也不适用于所有成像应用。大多数显微镜物镜都是同心物镜，这意味着每个光束中的中心光线（例如图3中的轴上光线，红色），也称为主光线，在离开物镜前透镜后会沿光轴传播。当ETL置于物镜附近进行对焦时，会导致非同心条件（图4）。其结果是，若轴向焦距位置发生变化，视场（FOV）大小或放大倍率也会随之改变。如果所需的焦距偏移较小（ $< 50\ \mu\text{m}$ ），这种偏差尚可接受。另一种方案是，通过4f中继系统（例如由两个消色差透镜组成的4f系统）将ETL/OL组件定位在显微镜物镜的共轭瞳平面处，因为大多数物镜的光阑无法直接访问（图5）。

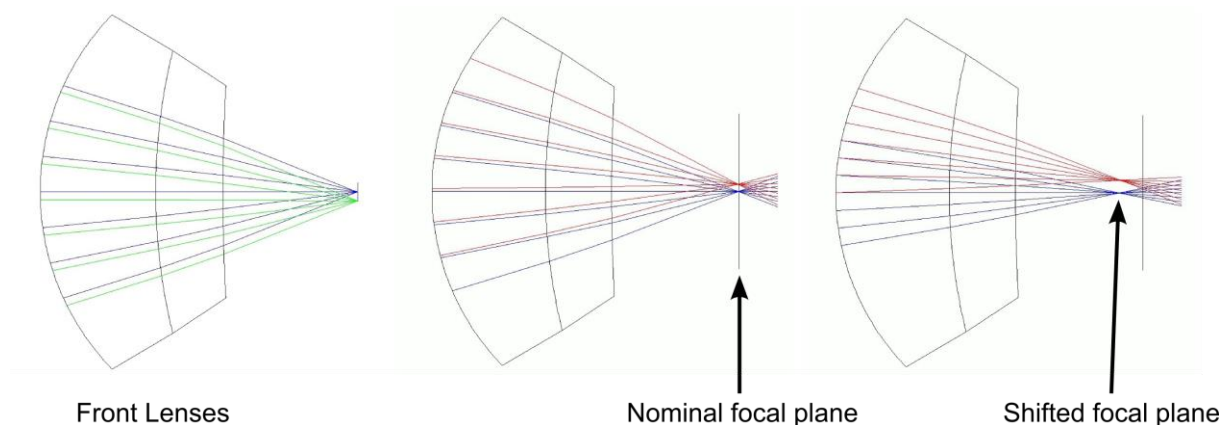


图4：显微镜物镜前组透镜，其两束光线在样品上聚焦于不同的侧向位置。左图显示了在同心条件下的情况——中央的绿色（主）光线与光轴平行传播（蓝色主光线）。中间和右侧面板展示了使用同一物镜，并将ETL/OL插入其后止挡附近时的聚焦情况。倾斜（红色）光束的主光线不平行于光轴传播，因此，如果将焦平面移近物镜，红色和蓝色焦点的距离就会增大（导致放大倍率或视场大小发生变化）。

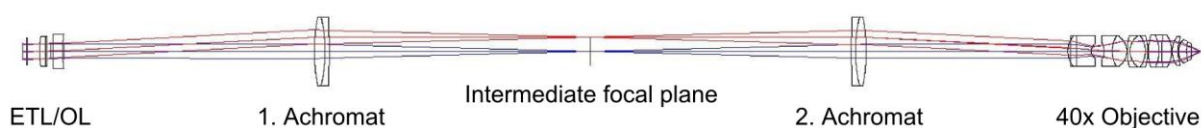


图5：用于保持同心成像条件的4f中继系统的布局示例。ETL/OL组件（左侧）通过由中间段两个 $f=100\text{ mm}$ 消色差透镜组成的4f系统，被放置在物镜（日本专利8-292374；右侧）的共轭瞳平面处。瞳孔（红光与蓝光光束的交点）被重新成像至物镜中。该系统的总长度约为380毫米。为形成图像，系统左侧需配备一支管透镜。在基于ETL的对焦过程中，中间焦平面会发生位移。

然而，大多数商用显微镜不允许在光路中插入中继系统。在这种情况下，将中继系统放置在相机或激光端口处可能是一个可行的方案。

#### EL-10-30的控制

EL-10-30可通过激光二极管专用精密恒流驱动器（例如Edmund Optics NT56-804、Thorlabs LD1255R）以及0-250 mA可编程模拟输出，轻松实现计算机控制。对于简单的对焦应用，只需建立一个将控制电流与对焦位置关联起来的校准查找表即可（请参见图15）。

以下是对这两种实现方式的总结：

| 类型   | ETL/OL 靠近后止点                                                            | ETL/OL 位于共轭瞳孔处                                          |
|------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| 优点   | 易于实现，特别是在商用显微镜中                                                         | 在整个对焦范围内，视野大小和放大倍率均保持不变                                 |
| 缺点   | 在对焦范围内视场大小/放大倍率的变化。<br><br>在对焦范围内数值孔径及分辨率的变化                            | 根据工作条件，由于前镜片的暗角现象，数值孔径可能会发生变化。需要中继系统，因此实现起来较为复杂，且需要占用空间 |
| 典型应用 | 共聚焦显微镜（分辨率约为 $50\mu\text{m}$ ）<br><br>双光子显微镜（分辨率最高可达 $700\mu\text{m}$ ） | 非常适合定制显微镜。<br><br>适用于视觉观察。                              |

#### 应用示例：宽场显微镜

在目视观察时，对焦过程中视场（FOV）或放大倍率的改变会令人困惑（因为其视觉效果类似于变焦效应）。对于微小的对焦增量（几微米），这种现象尚可接受；否则，该效应将变得令人分心。在这种情况下，必须将ETL/OL组件放置在共轭瞳位置。在大多数显微镜中，必须将一个包含额外中继光学元件和ETL/OL组件的定制模块插入光路中。在典型的正置显微镜中，限位位置位于物镜内部且无法直接接触，因此需要采用中继系统。然而，在倒置显微镜中，共轭瞳通常由显微镜机身内部的光学系统形成；在某些类型的倒置显微镜中，该瞳孔位于光学路径的垂直段且可直接接触，因此非常适合插入基于ETL的对焦系统。图6所示的1980年代蔡司Axiovert 35显微镜便是此类设备之一。

#### 系统配置

将ETL/OL组件插入30毫米的镜头管中，并将其安装在光学导轨上，使其靠近瞳孔（图8）。为了确定瞳孔位置，可以使用一个简单的技巧：将用于相位显微镜的相位掩模重新成像到共轭瞳孔平面上。聚光镜或物镜中相位掩模形成清晰像的位置，即是ETL的理想安装位置（图8插图）。这种基于ETL的对焦方式还具有额外优势，即ETL可与多种物镜配合使用。根据物镜的不同，ETL和OL的最佳位置可能会发生偏移，因为某些类型的物镜在瞳孔成像特性上存在差异。

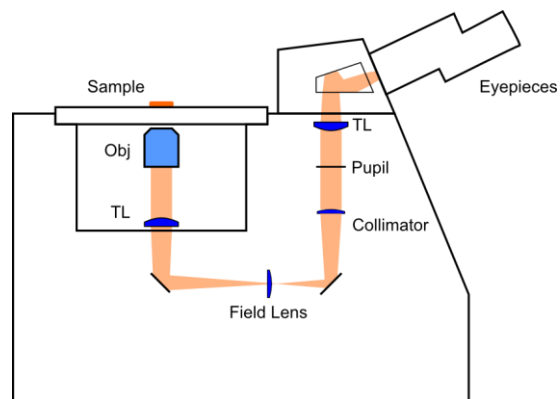


图6: Axiovert 35显微镜的光路。ETL/OL组件可直接放置于瞳孔位置，无需额外插入中继系统。TL: 管镜。

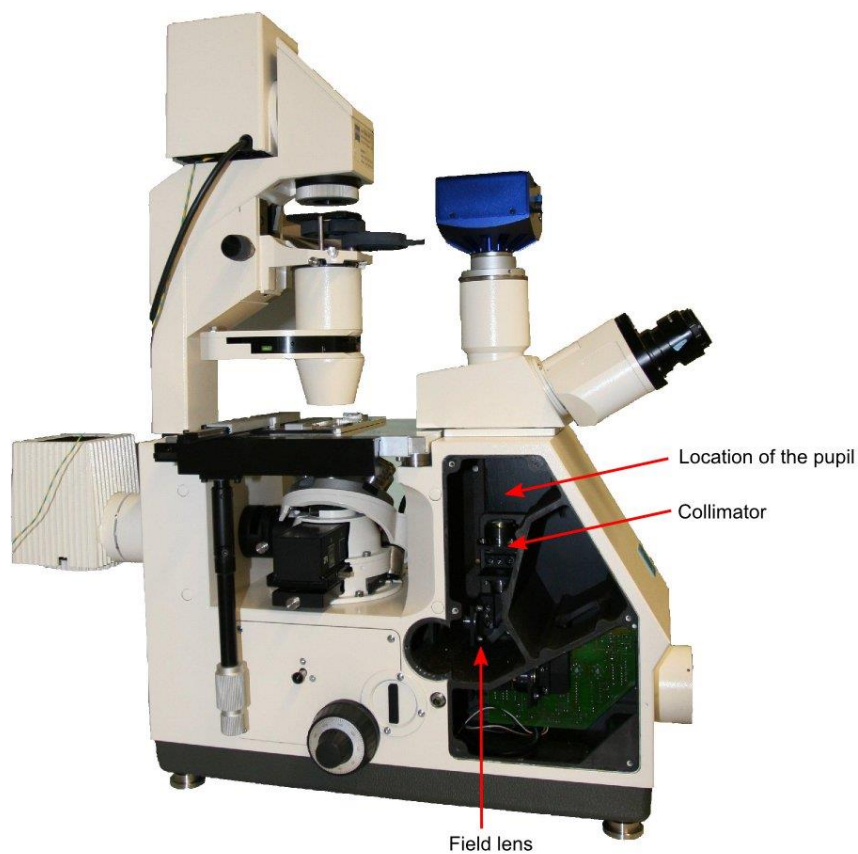


图7: Axiovert 35显微镜，侧盖已拆下以便观察瞳孔。图6中所示的部分光学元件在此图中已标出。

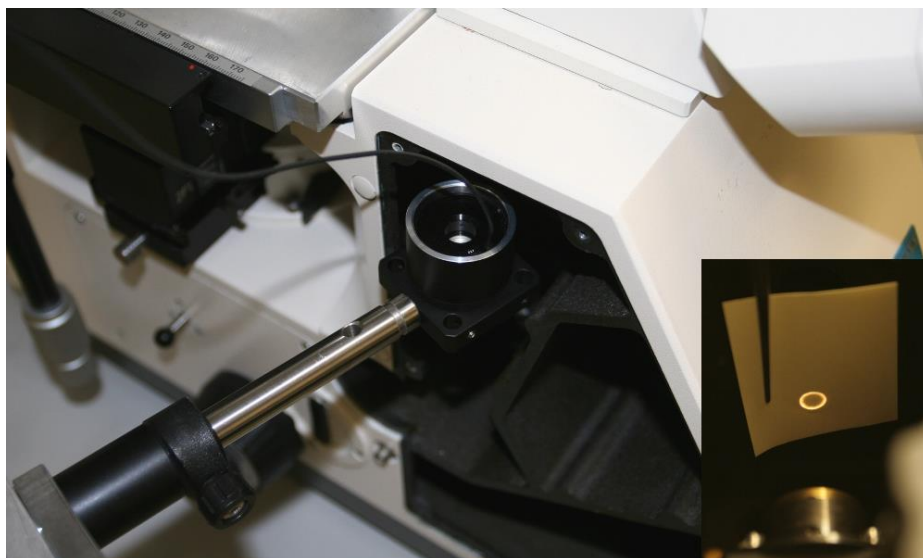


图8：将ETL/OL组件安装在共轭瞳位置。ETL和OL安装在与光学导轨相连的立柱上。插图：可通过观察相位环的清晰图像来确定共轭瞳位置。

## 结果

配合使用40倍、数值孔径0.6的物镜（Zeiss LD Achromplan 40x / 0.6 Korr Ph2），可实现高达 $120\mu\text{m}$ 的失焦范围（校正环设置为固定位置）。图9展示了利用ETL对焦技术对一组花粉粒进行Z堆栈成像的示例图像（落射荧光模式）。

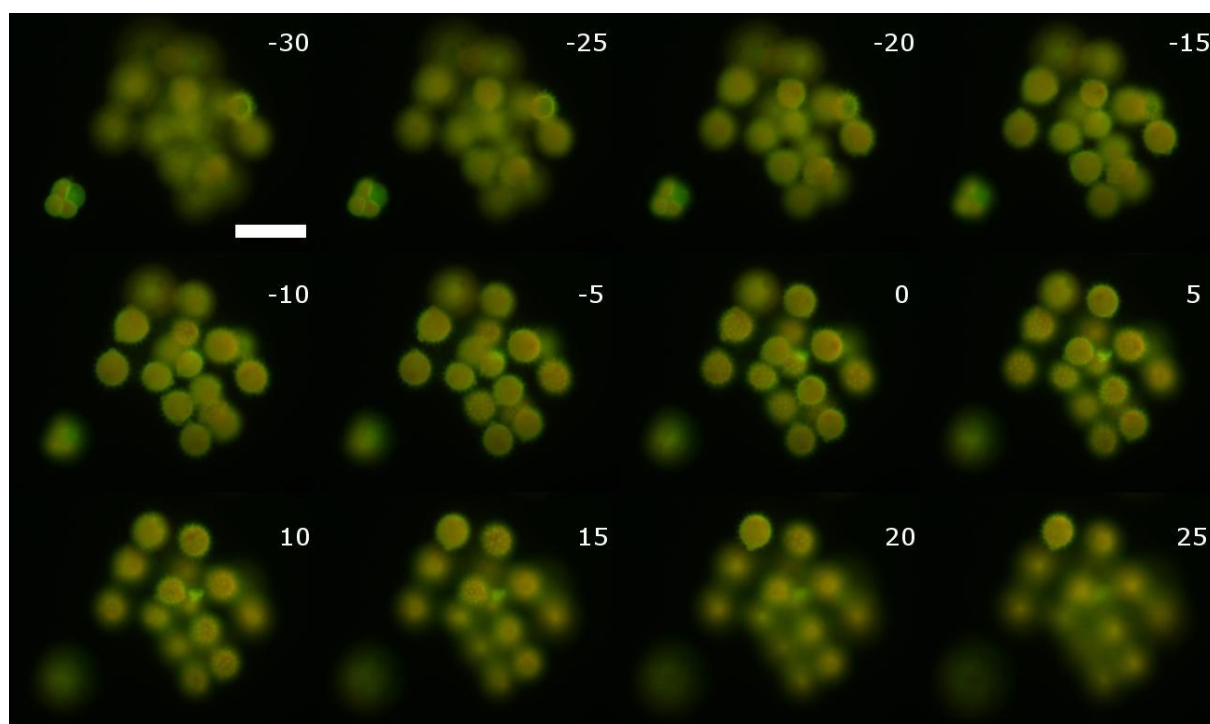


图9：基于ETL的聚焦系统对一组花粉颗粒的轴向扫描成像结果。成像范围相对于标称像面在 $-30\mu\text{m}$ 至 $+25\mu\text{m}$ 之间变化。由于EL-10-30被放置在共轭瞳面位置，因此系统在轴向调焦过程中不产生放大率变化。比例尺： $100\mu\text{m}$ 。

## 应用示例：共聚焦显微成像

共聚焦显微镜是最重要的显微成像技术之一，在细胞生物学、单分子物理及众多科研领域具有广泛应用。关于该成像方法及不同类型共聚焦系统的详细介绍，可参考：

<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/index.html>.

## 系统配置

标准共聚焦显微系统通常为高度集成化设计，在大部分光路中无法直接插入或更换光学元件。根据具体显微镜结构，可采用不同方式引入 ETL/OL 组件。一种方案是在不影响共聚焦成像所需滤光片的前提下，将 ETL/OL 组件集成至定制滤光片转盘模块（filter cube），并安装于显微镜的滤光转轮中。另一种方案是将ETL集成在中继成像系统中（见图10）。

本研究中所使用的系统1（图11）为旋转盘共聚焦显微镜（spinning disk confocal），共聚焦模块（Yokogawa Electric Corporation CSU-X1）及CCD相机连接至 Olympus Corporation IX-71 显微镜的侧端口。该结构允许在滤光转轮中插入经过改装的原厂滤光片组件，其中集成 ETL 与 OL，而无需对显微镜进行大范围改造。在实际运行过程中，只需将滤光转轮旋转至空位，即可将ETL从光路中移除，实现快速切换。

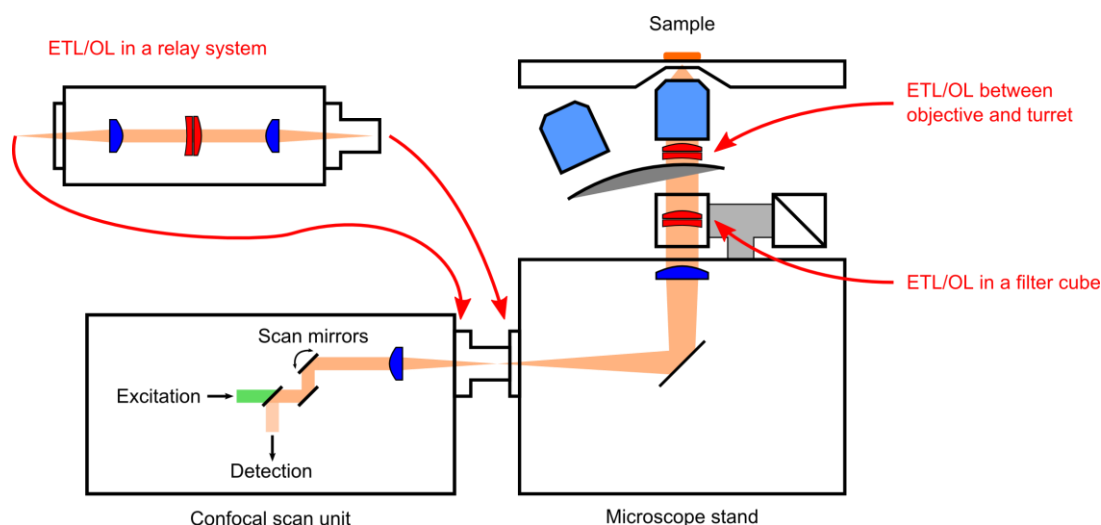


图10：在典型倒置式激光扫描显微镜中基于ETL实现调焦的三种方案。

- (1) ETL/OL组件可置于物镜与物镜转盘之间，其作用类似于压电驱动式调焦单元。
- (2) 在允许的情况下，ETL与OL可集成于定制滤光片模块中并安装于滤光转盘内。上述两种方案的共同缺点是：在调焦过程中可能引起显著的放大倍率变化。
- (3) 为避免该问题，可在共焦扫描单元与显微镜主体之间引入中继成像系统。为获得最佳系统性能，ETL应尽可能安装在光路的垂直段；否则，由重力引起的非对称膜面形变可能导致成像质量下降。

<sup>1</sup> 我们感谢苏黎世联邦理工学院（ETH Zurich）Helge Ewers实验室（<http://www.neuro.nano-optics.ethz.ch/>）提供使用EL-10-30 并与旋转盘共聚焦显微系统联合测试的机会。

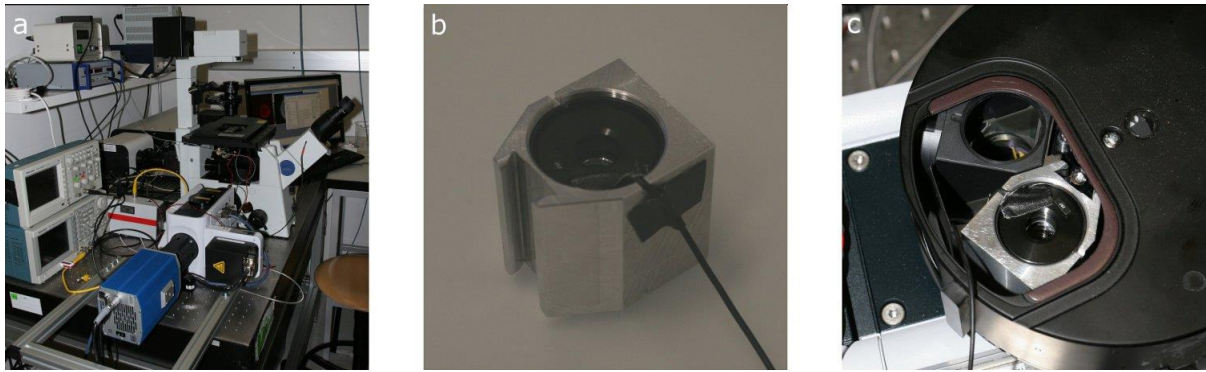


图11：ETL与OL在共聚焦显微镜中的集成实现。

- (a) 旋转盘共聚焦单元安装于显微镜机架的左侧端口，蓝色CCD相机用于图像采集。驱动ETL的电流转换器由函数发生器进行控制。
- (b) ETL/OL组件集成于定制滤光片模块中。
- (c). 该滤光片模块被插入滤光转盘内，并将滤光转盘重新安装至显微镜机架中，位于物镜转盘下方。

## 结果

在与 40×、数值孔径 NA = 1.3 的物镜（Olympus Corporation UPLFLN 40XO）组合使用时，实现了约 60  $\mu\text{m}$  的轴向扫描范围。图12展示了花粉颗粒（直径约100  $\mu\text{m}$ ）z-stack中的单层切片图像。

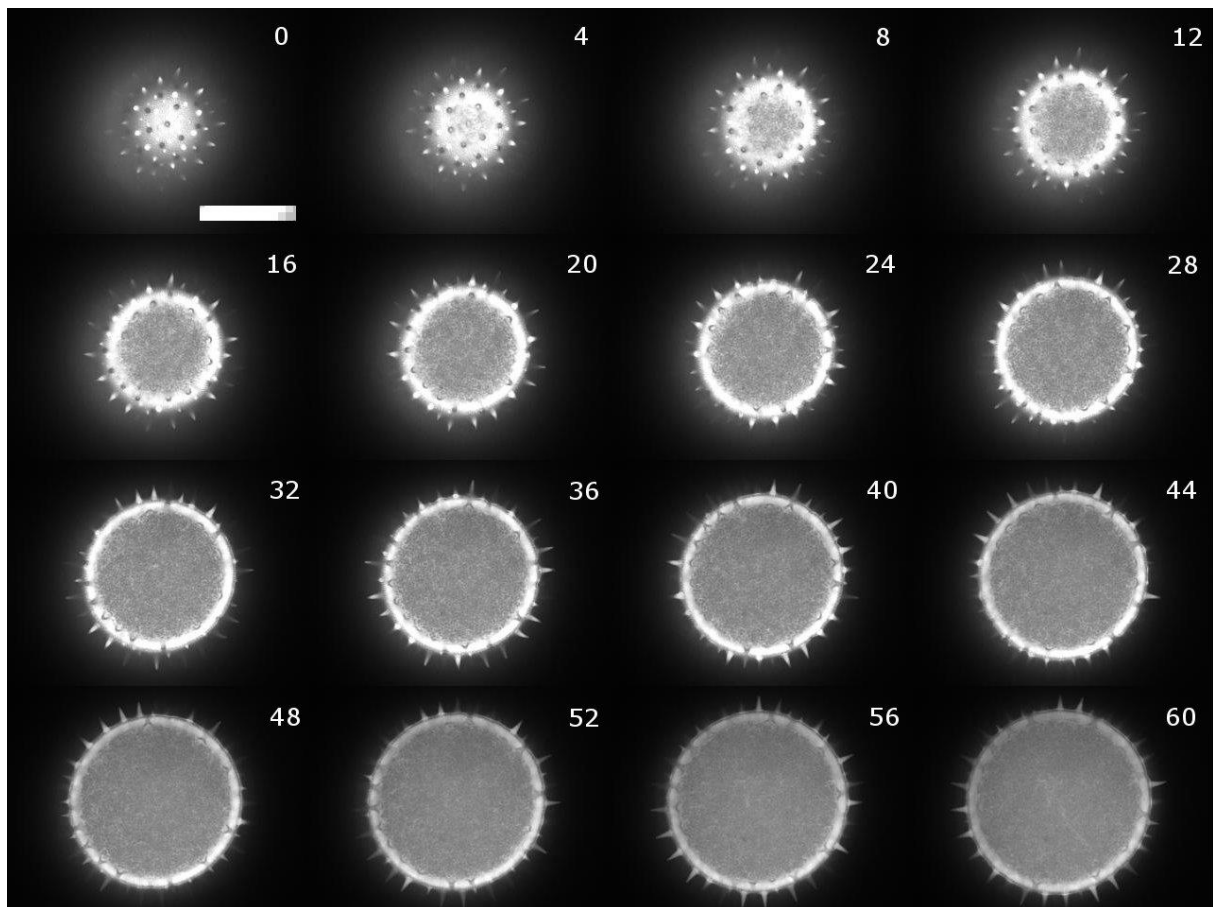


图12：花粉颗粒（直径约100  $\mu\text{m}$ ）的Z-stack成像，轴向扫描范围为60  $\mu\text{m}$ 。各图像对应的Z位置相对于第一张图像已标注。比例尺：50  $\mu\text{m}$ 。

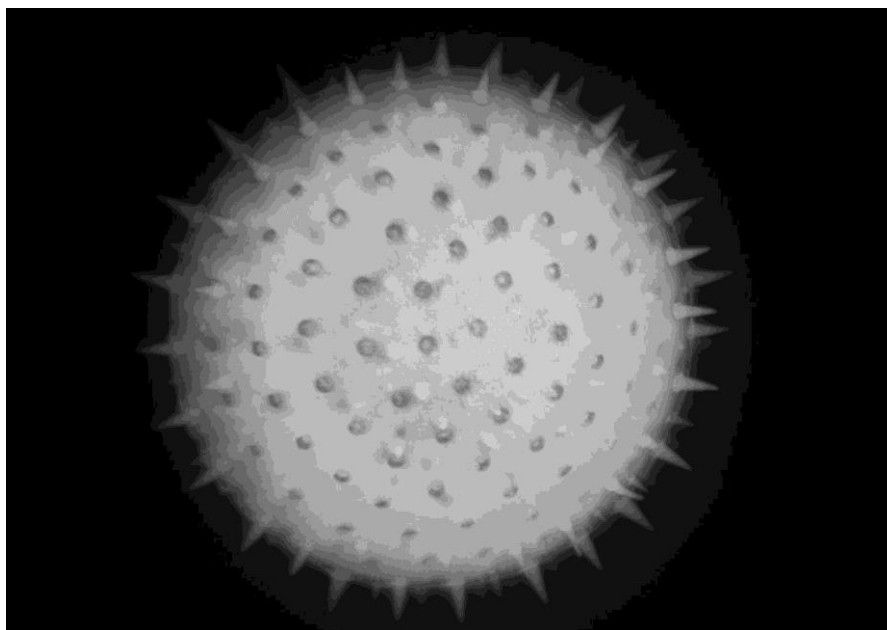


图13：图9所示数据的最大强度投影结果。

#### 应用示例：双光子显微成像

由于其在强散射介质中具有优异的成像能力，双光子激发技术非常适用于组织深层的荧光成像（关于双光子方法的详细介绍可参考：<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/multiphoton/multiphotonintro.html>）。结合神经元活动功能性指标以及在体成像实验方案，双光子显微镜已成为记录活体小鼠脑内深部神经活动的标准方法，可用于观测从数十到数百个神经元的群体活动。由于神经元在三维空间中分布，仅采集单一焦平面只能反映局部网络活动的有限信息。因此，对快速、简洁的三维显微成像技术具有明确需求，而使用ETL提供了一种结构简单且实现直接的解决方案。事实上，ETL与双光子显微成像具有高度互补性与良好适配性，主要体现在以下方面：

- 在大多数双光子显微系统中，轴向扫描可以仅通过在激发光路中引入光学调焦方案来实现。这是由于双光子显微所采用的非线性激发机制，使得荧光激发仅发生在焦点处。因此，通过调节激发光束实现焦点的轴向与横向移动，即可完成三维双光子激光扫描显微成像。
- 激发激光通常工作在近红外（NIR）波段，在本系统中为850 nm。较长波长使系统对波前像差具有更高容忍度，而这些像差在可见光波段会显著降低成像质量。
- 激发光源较窄的光谱带宽（10 nm FWHM）降低了由非消色差设计的 ETL/OL 组合可能引入的色差影响。
- 对于大多数用于功能性细胞活动测量的生物学应用，ETL/OL组件靠近物镜安装所引入的视场（FOV）变化通常不会干扰实验结果。在功能成像中，需要对同一组细胞进行重复扫描；当放大倍率变化导致细胞间距发生变化时，相应的扫描点仍可重新定义并进行匹配采集。

## 系统配置

与定制双光子显微镜联合使用的系统结构如图14所示。

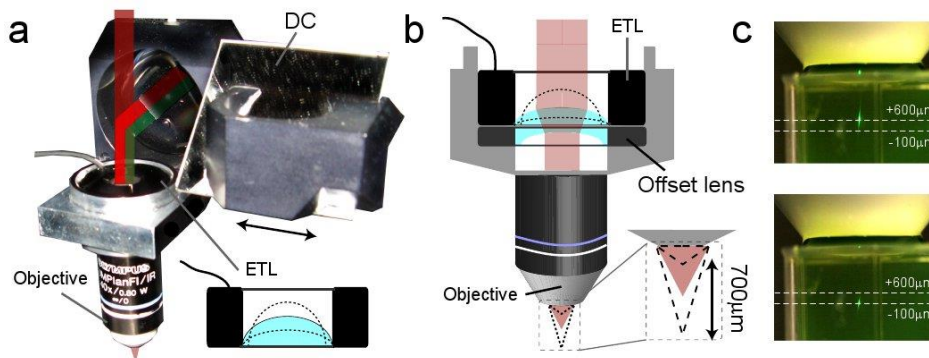


图14：ETL/OL组件在双光子显微镜中的集成实现。

(a) ETL与OL安装于定制物镜支架中，该支架连接至显微镜检测系统。通过可移动二向色镜（DC），发射荧光信号可被引导至背景中的检测系统。支架底部配有RMS螺纹接口，可用于连接 Olympus Corporation LUMPlanFI/IR 40× NA 0.8 水浸物镜。

(b) 定制支架内部ETL与OL组件的剖面示意图。

(c) 在荧光素溶液中对双光子激发焦点的直接可视化结果。与40×物镜组合使用时，焦点（绿色拉长光斑）在约700 μm范围内可进行轴向移动。

## 结果

通过将ETL焦距在50 mm至200 mm范围内调节，实现了最高约700 μm的轴向调焦范围。由此引起物镜工作距离（标称值为3.3 mm）的变化范围为2.8 mm至3.41 mm。对于大多数成像应用而言，实际所需的轴向扫描范围通常更小。

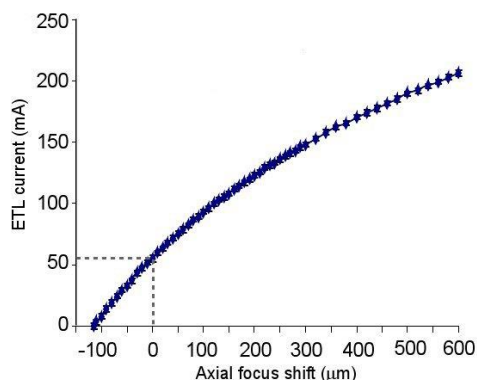


图15：轴向焦点位移与施加于ETL控制电流之间的关系（40×物镜，-100 mm补偿透镜条件下）。该标定数据集被用于建立查找表（lookup table），以实现目标焦点位置的精确调节与定位。

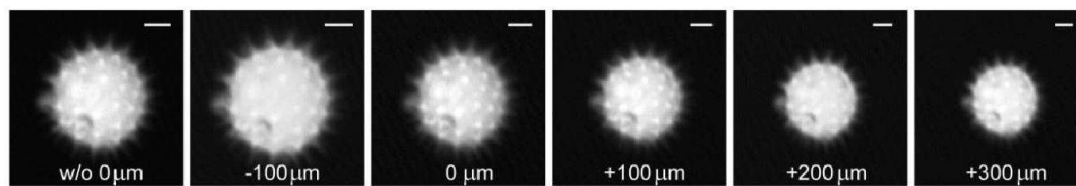


图16：花粉颗粒成像结果对比。（左图）未使用ETL调焦时的成像；（右图）在不同轴向焦点位移条件下，通过ETL实现再对焦后的成像，位移量由显微镜电动Z轴平台测量得到。需注意放大倍率及视场（FOV）尺寸的变化。比例尺：5  $\mu\text{m}$ 。

对于基于该系统获取的神经元活动快速功能测量结果，可参考以下文献：

Benjamin F. Grewe 等：《基于电控可调透镜的快速双层双光子神经元群体成像》，Biomedical Optics Express, Vol. 2, Issue 7, pp. 2035-2046 (2011), doi:10.1364/BOE.2.002035 (<http://www.opticsinfobase.org/boe/abstract.cfm?uri=boe-2-7-2035>)

#### 应用示例：检测显微镜

在采用标准镜头组件的检测显微系统中，可调焦透镜通常安装于无限远校正物镜与筒镜之间。以下示例展示了一个基于标准商用组件的系统配置，该系统将 EL-10-30-Ci 与 Qioptiq Photonics GmbH & Co. KG 的 Optem 微型检测镜头进行组合应用。所有光学组件均采用 C-mount 接口设计，因此可实现无缝机械与光学对接。该配置实现的轴向扫描范围（Z-range）及分辨率性能如下表所示。



图17：采用标准商用组件构建的高倍率检测系统示例。图中显示一块PCB在7.9 $\times$ 放大倍率下的成像结果（导线宽度为10  $\mu\text{m}$ ）。

#### 在显微成像中使用ETL的检查清单

- TL/OL组件应插入光路的哪个位置？该位置是否具备可达性与机械安装空间？
- 是否可以将ETL/OL组件在光学系统中垂直于地面安装，以避免因重力作用导致ETL膜面产生非对称形变？
- 光束直径是否足够匹配 EL-10-30 的10 mm通光孔径？（此要求同样适用于共轭瞳面的尺寸。）如果不需要电动调焦功能，可考虑使用 ML-20-35 手动可调透镜，其自由通光孔径为20 mm。
- 所需的调焦范围是多少？在大多数情况下，ETL的光学调焦需与机械调焦装置配合使用，以满足整体行程需求。ETL通常适用于中高数值孔径物镜下的几十微米至数百微米调焦范围；对于低倍率、低NA物镜，调焦范围可扩展至约1 mm。
- 对光学性能有哪些约束要求？例如在双光子显微中，近红外准单色激发光对色差及其他像差的要求较低，因此可实现数百微米的调焦范围，适用于在体脑成像。而共焦显微系统通常对像差校正要求更高，但样本尺度较小（几十微米量级），因此ETL仍可在特定应用中有效使用。通常通过完整光学系统仿真可优化ETL调焦方案以满足性能需求。
- 目标调焦速度是多少？已有实验表明 EL-10-30 可实现快速调焦，例如在40× NA 0.8物镜条件下，100 μm 焦点位移可在15 ms内完成，对应焦距从108 mm变化至82 mm。

#### 参考文献与致谢

衷心感谢以下人员在 EL-10-30 相关应用测试中的支持与贡献，并参与了本应用说明的实验验证与技术完善：Benjamin F. Grewe、Fabian F. Voigt、Marcel van 't Hoff、Fritjof Helmchen（苏黎世大学脑研究所），以及 Helge Ewers（苏黎世联邦理工学院物理化学实验室与生物化学研究所）。本文档由 Fabian F. Voigt 撰写。本应用说明中的研究工作得到了苏黎世大学、瑞士国家科学基金会（SNSF）、欧盟第七框架计划（EU-FP7）以及瑞士 SystemsX.ch 计划（项目 2008/2011-Neurochoice）的资助与支持。

#### 使用 Optotune 透镜的相关文献

- B. F. Grewe, F. F. Voigt, M. van 't Hoff, and F. Helmchen, “利用电控可调透镜实现神经元群体快速双层双光子成像” *Biomedical Optics Express* **2**, 7, 2035-2046 (2011).  
(<http://www.opticsinfobase.org/boe/abstract.cfm?uri=boe-2-7-2035>)
- B. Kemper, R. Schubert, S. Dartmann, A. Vollmer, S. Ketelhut, G. von Bally, “自干涉数字全息显微中的改进定量相位衬度及利用内吞微球探测细胞质动态折射率变化” *SPIE 三维及多维显微成像: 图像获取与处理 XX*, Proceedings Vol. 8589 (2013). <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?articleid=1656293>
- F. O. Fahrbach, F. F. Voigt, B. Schmid, F. Helmchen, and J. Huisken, “基于可调透镜的快速三维光片显微成像” *Optics Express* **21**, 18, 21010-21026 (2013). (<http://www.opticsinfobase.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-21-18-21010>)
- J. L. Chen, O. A. Pfäffli, F. F. Voigt, D. J. Margolis, and F. Helmchen, “利用可调透镜在线校正双光子成像中的舔舐引起脑运动” *Journal of Physiology* 00.00, 1-10 (2013). (<http://jp.physoc.org/content/early/2013/08/29/jphysiol.2013.259804.abstract?sid=52004717-fd2e-4c39-8c6a-24cc2df0645a>)
- J. M. Jabbour, B. H. Malik, C. Olsovsky, R. Cuenca, S. Cheng, J. A. Jo, Y.-S. L. Cheng, J. M. Wright, and K. C. Maitland, “利用电控可调透镜实现共焦显微中的轴向光学扫描”, *Biomedical Optics Express* **5**, 2, 645-652 (2014). <http://dx.doi.org/10.1364/BOE.5.000645>