

# 復旦大學

## 本科毕业论文



论文题目： 多光子显微镜的搭建与应用

院 系： 物理学系

专 业： 物理学

姓 名： 刘知平 学 号：13307110296

指导教师： 季敏标 职 称：教授

单 位： 复旦大学物理系

日 期： 2017 年 5 月 22 日

# 多光子显微镜的搭建与应用

Fabrication and Application of a Multiphoton Microscope

刘知平 Zhiping Liu\*

\* 复旦大学物理系 Physics Department, Fudan University

完成于 2017 年 5 月 22 日

**姓名：** 刘知平

**学号：** 13307110296

**院系：** 物理学系

**指导老师：** 季敏标

# 目录

<b>摘要</b>	<b>2</b>
<b>1 引言</b>	<b>3</b>
<b>2 多光子显微镜的原理</b>	<b>5</b>
2.1 多光子显微成像原理 . . . . .	5
2.1.1 谐波生成 . . . . .	5
2.1.2 振动谱学 . . . . .	5
2.2 并发系统编程 . . . . .	6
2.2.1 时钟与触发 . . . . .	6
2.2.2 生产者-消费者设计模式 . . . . .	8
<b>3 多光子显微镜的设计与搭建</b>	<b>8</b>
3.1 实验仪器 . . . . .	8
3.1.1 Ekspla PT257 皮秒可调激光器 . . . . .	8
3.1.2 Olympus IX73 倒置显微镜 . . . . .	8
3.1.3 Cambridge Technology 6215H 振镜伺服系统 . . . . .	8
3.1.4 光传感器 . . . . .	9
3.1.5 NI PCI-6111 多功能输入/输出设备 . . . . .	9
3.1.6 NI LabVIEW 2013 . . . . .	10
3.2 显微镜的设计与搭建 . . . . .	10
3.3 显微镜的性能测试 . . . . .	15
<b>4 多光子显微镜的应用</b>	<b>16</b>
<b>5 实验展望</b>	<b>19</b>
<b>6 致谢</b>	<b>19</b>
<b>7 参考文献</b>	<b>19</b>
<b>附录</b>	<b>23</b>
.1 ScanImage-LabVIEW 程序参数列表 . . . . .	23
.2 ScanImage-LabVIEW 程序算法 . . . . .	24

## 摘要

基于 Ekspla PT257 皮秒可调激光器、Olympus IX73 倒置显微镜、Cambridge Technology 6215H 二维扫描振镜、NI PCI-6111 型数据采集卡以及 NI LabVIEW 2013 版软件等设备，设计并搭建了激光扫描多光子显微镜。该显微镜可用于材料与生物样品与非线性材料样品的高次谐波成像、相干反 Stokes Raman 散射成像等。使用该系统对一些样品进行了成像，验证了该显微镜工作的可靠性。

**关键字** 非线性光学；生物医学成像；Raman 散射；并发编程；LabVIEW

## Abstract

A laser scanning multiphoton microscope is designed and built up, based on Ekspla PT257 picosecond tunable laser, Olympus IX73 inverted microscope, Cambridge Technology 6215H 2-D galvanometer scanning mirror system, NI PCI-6111 multifunction I/O device, and NI LabVIEW 2013 software, etc.. This microscope is capable of imaging nonlinear processes, such as harmonic generation, coherent anti-Stokes Raman scattering, of biological samples and nonlinear material samples. The functionality of the system was tested with imaging a few samples.

**Keywords** Nonlinear optics, biomedical imaging, Raman scattering, concurrency programming, LabVIEW

# 1 引言

美国理论物理学家 M. Goeppert Mayer 在 1931 年她的博士论文中预言了原子的双光子吸收现象。[1] 直到 1961 年激光技术出现后，才首次在铕掺杂的晶体的双光子吸收中通过实验观察到了双光子激发荧光现象，随后多光子光谱学迅猛发展。[2] 1989 年，美国 Cornell 大学的 W. Denk、J. H. Strickler 和 W. W. Webb 制造了首个双光子激光扫描荧光显微镜，打开了多光子激光显微的大门，[3] 有关多光子显微成像的出版物数量也呈指数增长，该现象被称为“多光子显微成像的 Moore 定律”，[4] 如图 1 所示。在三十余年的发展后，多光子显微技术在非线性材料的表征、生物学研究和医学诊断方面都有重要应用。[5]

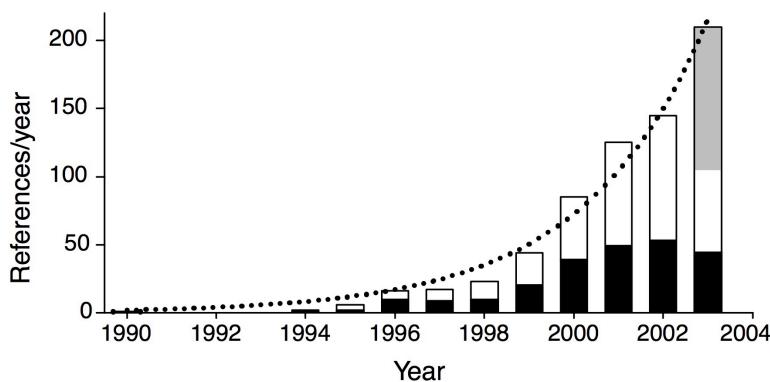


图 1：使用、发展或评论多光子显微技术的文献数量（数据来自 PubMed 和 ISI）。柱状图的总高度表示各年设计多光子显微的出版总数量，其中黑色部分表示专注于实验装置改进的文献，剩余的白色部分表示多光子扫描显微用于具体生物学研究的文献，灰色部分为基于 2003 年半年出版量的总出版量估计，虚线是数据的指数拟合。[4]

多光子显微技术可以通过样品的可测量的非线性光学响应，如二次谐波生成 (second harmonic generation, SHG)、三次谐波生成 (third harmonic generation, THG) 和多光子吸收荧光等，得到样本的高分辨率三维图像，如图 2 所示，其有如下特性：首先，由于在弱光场下，物质对于光的响应强度通常与入射光强呈线性，而非线性光学效应大多需要较强的光场下才能观测到。基于此特点，多光子显微镜多采用峰值功率大的超快脉冲激光作为光源，且仅有在焦点（束腰）附近的样本的非线性光学效应才能观测到。这使得样本的三维局域分辨得以实现，光损伤和光漂白局限于焦点附近，有利于活细胞乃至活体的长时间成像。其次，多光子显微镜采用波长较长的红外激光，偏离激发光波长，可实现暗场成像；其对于生物组织的透射深度更深，这有利于组织的深层三维成像。[6, 7]

在生物与医学成像中，由于样本通常富含脂类成分，常使用相干 Raman 散射显微技术进行显微成像。它包括 CARS（如图 2(g) 所示）与 SRS（如图 2(h) 所示）。脂肪酸分子中的大量的 C–H 键有相对孤立的 Raman 峰，可以作为化学环境复杂的组织中脂质的特有签名。此外，脂质体的高度集中的结构为相干 Raman 散射显微提供了很强的信号。[6, 8] 与此同时，

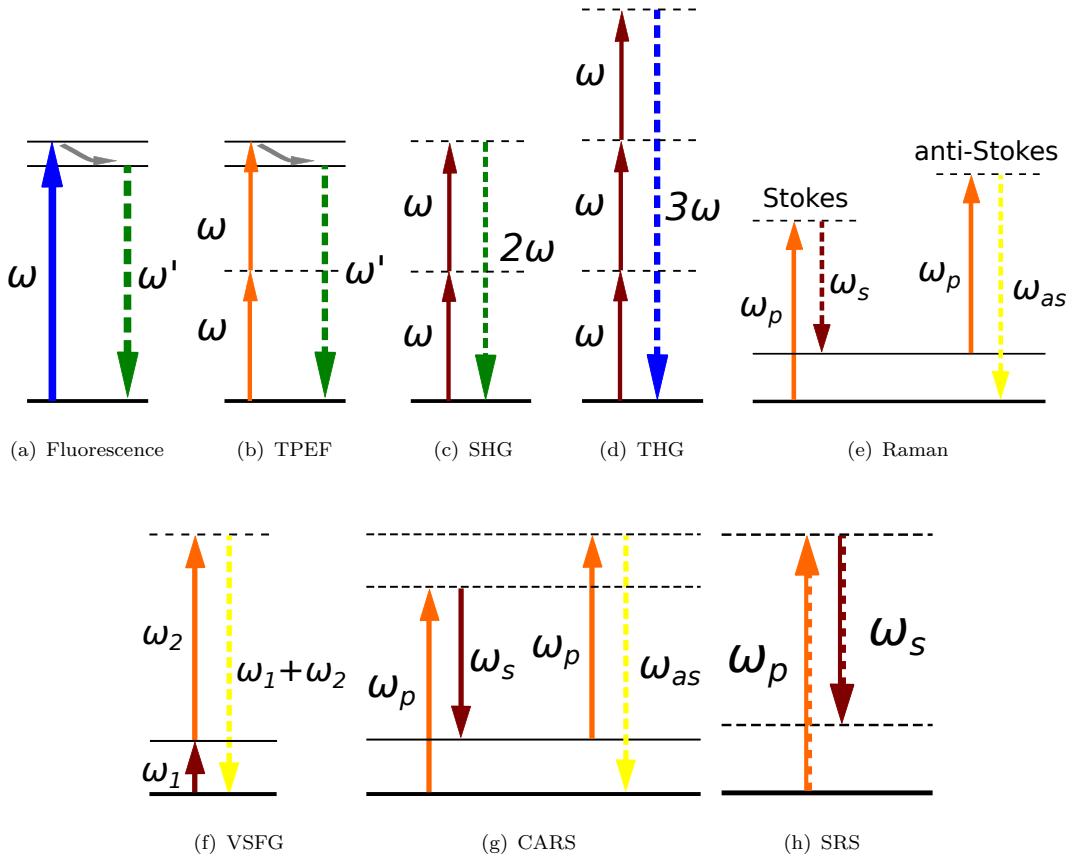


图 2: 各种荧光以及多光子过程的能级图。(a) 荧光过程, (b) 双光子激发荧光过程 (two-photon excitation fluorescence), (c) 二次谐波生成过程 (second harmonic generation), (d) 三次谐波生成过程 (third harmonic generation), (e) 自发 Raman 散射过程, (f) 振动和频生成过程 (vibration sum frequency generation), (g) 相干反 Stokes Raman 散射过程 (coherent anti-Stokes Raman scattering), (h) 受激 Raman 散射过程 (stimulated Raman scattering)。其中黑色粗水平线为基态, 细水平线为激发态的电子或振动能级, 水平虚线为虚能级。实线箭头为入射光线, 虚线箭头为探测光。

多光子显微技术也可以满足生物医学成像的长时间探测时的安全性要求, [9] 实时、无标记的成像的要求, [10, 11] 以及定量分析细胞生化特性的要求。[6]

多光子显微成像主要有两个目标: 数据提取与数据管理。显微图像给了科学家们对于样本的直观理解, 但仍然需要从图形中提取一些客观的参数帮助他们得出客观、定量的结论, 因此我们需要数据提取技术。而如今越来越多的显微镜可以自动采集定时的或三维的海量图像数据, 以至于人工无法处理如此大量的图像数据, 因此我们需要依靠自动的数据处理流水线, 即数据管理技术。[6]

已经有众多用户友好的软件为了实现上述目标而努力, 例如开源平台 ImageJ 和 CellProfiler, 以及 MATLAB 的商用图像处理库 Image Processing Toolbox。[12]

## 2 多光子显微镜的原理

### 2.1 多光子显微成像原理

一般地，显微成像的图像分辨率来源于样本与周围介质的结构的光学性质差异。对非线性光学显微成像来说，探测光信号的强弱比度取决于材料样本中的化学键与结构等特性引起的非线性电极化率张量  $\chi$  的不均匀性。<sup>[6]</sup> 接下来介绍非线性光学显微成像中涉及波长转换的两个主要的过程：谐波生成电磁辐射与化学键共振激发的辐射。

#### 2.1.1 谐波生成

由于非线性极化率的作用，两个频率分别为  $\omega_1$  与  $\omega_2$  的单色光入射到非线性介质中，在满足相位匹配的情况下，可能产生和频信号  $\omega_+$  或差频信号  $\omega_-$ ，这是一种三波混频现象，如式 1、2。

$$\omega_+ = \omega_1 + \omega_2 \quad (1)$$

$$\omega_- = |\omega_1 - \omega_2| \quad (2)$$

在  $\omega_1 = \omega_2 = \omega$  时，和频信号为  $\omega_+ = 2\omega$ ，这就是二次谐波生成现象（second harmonic generation，SHG，如图 2(c)）。类似地，有三次谐波生成（third harmonic generation，THG，如图 2(d)）。<sup>[13]</sup>

由于二次谐波生成是二阶非线性响应，故不会出现在具有中心反演对称性结构的介质中，只有在对称性破缺的界面或非对称的分子组织结构处才会出现；<sup>[14]</sup> 三次谐波则不要求介质的对称性，但要求材料有三阶电极化率与有限相位匹配，或在激发区域内是非均匀的，这常见于生物样品中的两种材料交界折射率突变处，如细胞表面。<sup>[6]</sup>

在测试本多光子显微镜时，用到铌酸锂（LiNbO<sub>3</sub>）。它是一种无色、不溶于水的固体，其晶体为中心反演对称性破缺的三方晶系（如图 3(a) 所示），因此可以作为二次谐波生成的材料样本。它广泛应用于光波导、通信技术、压电传感器、光学调制器以及许多线性或非线性光学工程中。<sup>[15]</sup> 同理，在具有中心反演对称性破缺结构的偶数层二维二硫化钼（MoS<sub>2</sub>）薄膜（如图 3(b) 所示），也可以观察到二次谐波生成现象。<sup>[16]</sup>

#### 2.1.2 振动谱学

红外光谱与 Raman 光谱是测量分子化学键振动模式的两种主要技术。红外光谱通过红外振动吸收直接探测振动态，而 Raman 光谱通过探测分子自发 Raman 散射中，由泵浦光激发振动能级产生的 Stokes 与反 Stokes 光子完成。自发 Raman 光谱常用于探测生物样品，但由于其散射截面小，故成像时间较长。在实际使用中常利用相干相互作用来克服这个缺点。<sup>[19]</sup>

相干反 Stokes Raman 散射（coherent anti-Stokes Raman scattering，CARS，如图 2(g)）是一个四波混频过程，会产生经由振动跃迁共振增强的可探测的反 Stokes 光子，散射截面

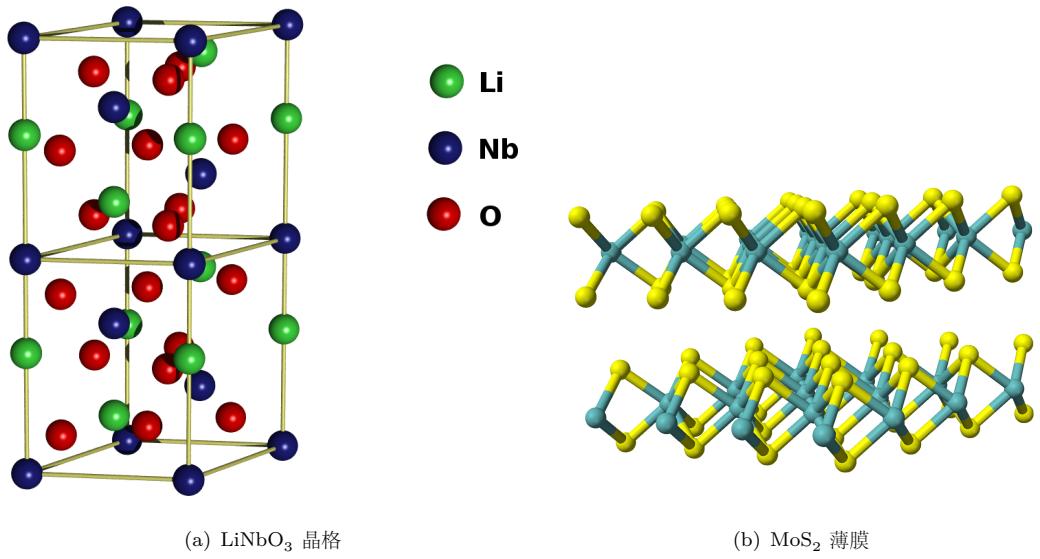


图 3: 两种非线性材料的围观结构。(a) LiNbO<sub>3</sub> 晶体是中心反演对称性破缺的三方晶系; (b) MoS<sub>2</sub> 晶体是六方晶系, 其薄膜仅在层数为偶数时中心反演对称性对称性破缺。[17, 18]

比自发 Raman 散射大几个数量级，适用于快速显微成像。

受激 Raman 散射 (stimulated Raman scattering, SRS, 如图 2(h)) 是一个双光子过程: 相位、能量匹配的泵浦光与 Stokes 光将分子激发到振动能级的效率大大增高。每当发生该过程时, 一个泵浦光光子会转化为一个 Stokes 光光子, 实际测量时会测量泵浦光的损失, 即受激 Raman 损失 (stimulated Raman loss, SRL); 或 Stokes 光的增益, 即受激 Raman 增益 (stimulated Raman gain, SRG)。[6,13]

## 2.2 并发系统编程

若一个系统可以执行两个或以上独立但在时间上重叠的任务或计算，各计算之间有潜在的交互作用，则称之为并发（concurrency）或并发系统。由于并发系统的执行过程不确定，故其设计难度较高。最大的挑战在于确保不同运算运行步骤间的交互或是通信，能以正确的顺序进行，同时，也要确保在不同运行步骤间共享的资源，能够正确被访问。<sup>[20]</sup> 使用时钟、触发的技术与合适的设计模式，可以较好地解决并发系统中上述问题。

### 2.2.1 时钟与触发

在本显微系统中，信号的输入与输出是并发且需要高度同步的。为了完成并发与同步的要求，需要按照时序逻辑系统（temporal logic system）来设计本显微镜系统。时序逻辑系统是指系统任何时刻的稳态输出向量  $y(t_0)$  不仅取决于当前的输入向量  $x(t_0)$ ，还与前一时刻输入形成的状态有关，即

$$\mathbf{y}(t_0) = f[\mathbf{x}(t)] \quad (t < t_0) \quad (3)$$

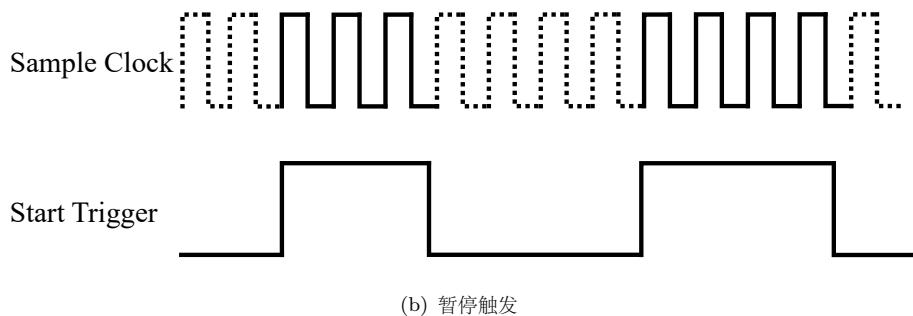
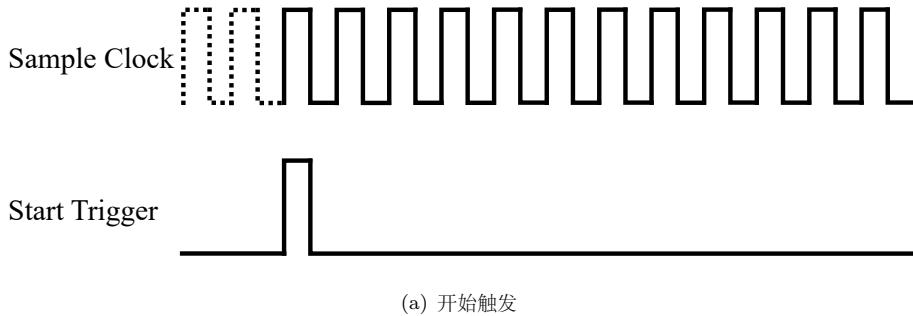


图 4: 两种触发信号与采样时钟信号的关系, 其中虚线表示被屏蔽的采样时钟信号。(a) 开始触发: 触发信号上升沿边沿触发, 上升沿后采样时钟开始工作; (b) 暂停触发: 触发信号高电平时采样时钟工作, 低电平时采样时钟被暂停。

这不同于组合逻辑系统相反, 组合逻辑的输出只会跟目前的输入成一种函数关系, 即

$$\mathbf{y}(t_0) = f[\mathbf{x}(t_0)] \quad (4)$$

本质上来说, 多光子显微成像系统是一个时序逻辑系统: 其输入  $\mathbf{x}(t)$  为光传感器的响应强度与用户界面操作, 输出  $\mathbf{y}(t)$  包括振镜的 X、Y 角度控制电压、显示器上的图形输出与其他信号的输出。[21]

在时序逻辑系统中, 时钟脉冲信号是同步系统中的计时器: 每当一个时钟脉冲信号(时钟嘀嗒)到达时, 系统的相关部分根据输入信号信号计算得出输出状态, 并改变输出。在本显微系统中模拟输出与模拟输入有着独立的采样时钟, 这意味着 X 和 Y 两个通道模拟输出信号当且仅当模拟输出采样时钟嘀嗒时改变一次, 模拟输入的端口当且仅当模拟输入采样时钟嘀嗒时采样一次。为了保证输入输出的同步性, 需要引入触发信号。

触发信号用于控制一个时序逻辑系统的开始与结束(或暂停)。按照触发信号控制的动作, 可以分为开始触发、暂停触发和参考触发; 按照触发信号的作用方式, 可以分为边沿触发(有、无迟滞)和窗触发。其工作原理为根据触发信号, 选择性地屏蔽一部分采样时钟信号, 从而控制系统各部分的开始、结束与运行速率, 如图 4 所示。[21, 22]

### 2.2.2 生产者-消费者设计模式

在并发系统编程中，生产者-消费者设计模式（producer-consumer design pattern）是一种基于主-从模式（master-slave pattern）的设计模式。它适用于增强不同速率的并发循环（或任务、线程）之间的数据共享能力，使得各循环时间上脱耦。[23] 生产者-消费者模式主要有三部分组成：生产者循环、消费者循环、以及数据队列。生产者会将产生的数据元素入队列（enqueue）至数据队列中，再由消费者循环将数据元素出队列（dequeue），读取并处理对应数据。

该模式常用于生产数据的速度快于处理数据的速度的情景，或需要缓存数据集中处理的情景，如模拟数据的采样后处理和图形用户界面的用户事件处理。在这些情况下，将生产者产生的数据入队列的速率远大于处理数据的速率，或需要集中多组数据一起处理。[24]

## 3 多光子显微镜的设计与搭建

### 3.1 实验仪器

#### 3.1.1 Ekspla PT257 皮秒可调激光器

本系统实用 Ekspla PT257 皮秒可调激光器作为显微镜的激光源。该激光器整合了皮秒光学振荡器与皮秒二极管泵浦固态激光器，可以同时输出泵浦光（固定波长 1064nm）与探测光（波长可调 800 ~ 2000nm）两路激光。其可调光路的脉冲宽度不超过 10ps，接近傅里叶极限；其脉冲重复率高达 87MHz，适用于基于光子计数的非线性光谱探测与显微成像。[25] 基于如上性能特性，该激光器适合作为本显微镜系统的光源，能够完成基于二次谐波生成、相干反 Stokes Raman 散射等非线性光学过程过程的显微成像。

#### 3.1.2 Olympus IX73 倒置显微镜

本系统中使用 Olympus IX73 倒置显微镜作为成像平台。该显微镜具有很强的可拓展性，可以根据应用灵活配置单层光路和双层光路，加上其它显微镜部件，能够实现多种成像技术。[26]

#### 3.1.3 Cambridge Technology 6215H 振镜伺服系统

使用 Cambridge Technology 6215H 型二维振镜伺服系统作为本显微镜的激光扫描系统。该振镜扫描系统中，每一个马达都由动磁式驱动器（moving magnetic actuator）与高精度位置探测器组成闭环的反馈系统，使得该振镜扫描系统得以兼顾扫描速率、精度以及长时间运行下的鲁棒性。[27] 该振镜扫描系统由 X、Y 两个振镜与驱动器组成。在正常工作模式下，伺服系统控制两个振镜偏转的角度  $\theta_x$ 、 $\theta_y$  分别与两路输入电压  $V_x$ 、 $V_y$  成正比，其扫描范围为  $\pm 40^\circ$ ，典型小角度阶跃响应为  $200\mu s$ ，可以满足本显微镜的成像需求。

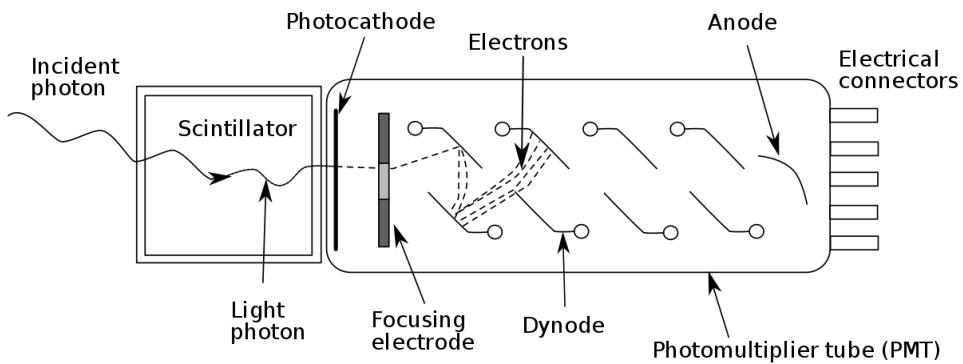


图 5: 带有闪烁体的光电倍增管的结构示意图 [30]

### 3.1.4 光传感器

本系统使用光电二极管 (photodiode) 或光电倍增管 (photomultiplier tube) 作为显微镜的光传感器，在传感器的线性区间内，可以认为其输出信号的电压与入射光强成正比。

**光电二极管** 光电二极管是一种能够将光转换成电流或者电压信号的光探测器。传统的太阳能电池就是通过大面积的光电二极管来产生电能。其基础结构通常是一个 PN 结或者 PIN 结。当一个具有充足能量的光子冲击到二极管上，它将激发一个电子，从而产生自由电子（同时有一个带正电的空穴）。这样的机制也被称作是内光电效应。如果光子的吸收发生在结的耗尽层，则该区域的内电场将会消除其间的屏障，使得空穴能够向着阳极的方向运动，电子向着阴极的方向运动，于是光电流就产生了。[28]

**光电倍增管** 光电倍增管是一种对紫外光、可见光和近红外光极其敏感的特殊真空管，它包含光电阴极，若干二次发射极（打拿极）和一个阳极，如图 5。入射光电倍增管的光子撞击光电阴极，产生光电效应；产生的光电子被聚焦、加速到二次发射极，发生二次电子发射，产生更多二次电子，进一步加速达到下一个二次发射极。经过多个二次发射极后，光电子数目得以倍增，最后达到阳极，成为可以探测到的电信号。[29]

### 3.1.5 NI PCI-6111 多功能输入/输出设备

为了同步控制振镜的扫描与光传感器的采样，我们使用了美国国家仪器 (National Instruments, NI) 公司的 NI PCI-6111 多功能输入/输出设备 (multifunction I/O device, 简称数据采集卡)。该数据采集卡有 2 个模拟输入端口 (12 位, 5MS/s/ch)，2 个模拟输出端口，8 个数字 I/O 端口，可以实现同时采样，提供两个 24 位的计数器和数字触发功能。[31] 此数据采集卡可适用于本系统中的数字 I/O 端口、模拟 I/O 端口的同步任务。本系统中，酱数据采集卡配合 NI BNC-2110 型 BNC 屏蔽接线盒使用，通过 BNC 端口进行数据 I/O 操作。[32]

此外，该数据采集卡还提供实时系统集成（Real-Time System Integration，RTSI），这是 NI 大部分设备上的一种数据总线。多个设备可以使用 RTSI 总线相连来交换定时信号和控制信号，常用于任务同步。[33]

### 3.1.6 NI LabVIEW 2013

LabVIEW (Laboratory Virtual instrument Engineering Workbench) 是 NI 公司设计的一种专为工程师和科研人员设计的集成式开发环境，其本质是一种图形化编程语言 (G)，采用的是数据流模型或框图，可以方便直观地完成编程工作，如图 6 所示。使用 LabVIEW 编写的程序被称为虚拟仪器 (virtual instrument, VI)，主要功能为数字、模拟信号的生成和采集与信号处理、运算。此外，由于 LabVIEW 是一种内在的并发语言，所以很容易胜任本系统中的多线程并行执行的要求。[34] 本系统的搭建中使用了 NI LabVIEW 与 NI 公司提供的 NI-DAQmx 数据采集与测量驱动软件包，配合 NI PCI-6111 数据采集卡完成扫描的控制以及数据的采集、处理，获得最终的显微成像。[35]

LabVIEW 的图形化编程语言的结构易于实现多线程，分布式计算，消息传递，资源共享（包括内存共享）等任务，以及 2.2.2 中提到的生产者-消费者设计模式，因此容易完成本系统所需要软件的并发编程。类似于面向过程 (procedure oriented, PO) 与面向对象 (object oriented, OO)，有时候我们也称 LabVIEW 是一种面向并发的编程语言 (concurrency oriented programming language, COPL)。[36]

本系统需要 LabVIEW 2013 安装以下包：

- NI DAQmx：该包是 NI DAQ 多功能 I/O 设备的驱动软件。它完美契合 LabVIEW 界面提供上百种子 vi，供数据采集与仪器控制使用。[37]
- NI Vision Acquisition Software (NI VAS)：这是 NI 公司的视觉图像获取软件，可用来获取、显示、记录、监控多路摄像头的图像，并且与提供一套 LabVIEW 的 API 子 vi；调用其中的 IMAQ 包，可以将数据矩阵储存为 TIFF (tagged image file format) 文件。[38]

## 3.2 显微镜的设计与搭建

基于以上实验仪器与成像需求，我们设计了一套基于共聚焦激光逐点扫描成像的显微成像系统。如图 7 所示，由激光器发出的一或多束调制过的激光，通过由数据采集卡控制二维振镜的角度，该角度对应经过物镜后的光线在待测样品成像平面上的坐标  $(x, y)$ 。在透射或反射光线经过聚光镜后，由光电二极管或光电倍增管作为光传感器，通过数据采集卡采集对应电信号  $V$ 。通过计算机内的 LabVIEW 程序，用振镜的位置  $(x, y)$  与信号强度  $V$  还原出二维灰度图像  $V = V(x, y)$ ，并在显示器上实时显示。该多光子显微镜有两种显微成像模式：实用光电耳机光探测的透射模式与使用光电倍增管探测的反射模式。

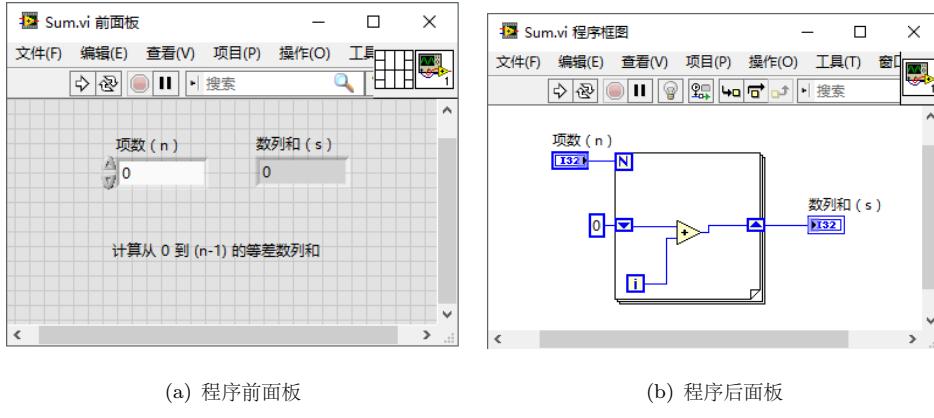


图 6: 一个 LabVIEW 中 for 循环的简易示例程序

为了得到高质量、均匀的二维图像，且保证成像效率，需要合理设计激光扫描的路径，即设计图像扫描坐标  $(x, y)$  的参数方程：

$$\begin{cases} x = x(n) \\ y = y(n) \end{cases} \quad (5)$$

我们使用如图 8 所示的扫描信号，使得焦点逐行地扫描样品平面上的一块正方形区域。该扫描信号的具体形式  $(x(n), y(n))$  由附录 .1 中表 1 内的参数决定，其具体参数方程以及输出信号算法实现的伪代码可参见附录 .2。

不难发现，本系统的程序要求两个模拟输出端口与模拟输入端口采样时刻的高度同步；同时还希望程序对于连续成像过程中的一些图形用户界面事件做出及时的响应，如调节增益、保存图片等。为了实现以上功能，我们发挥了 LabVIEW 易设计并发程序的优势，使用了生产者-消费者设计模式，其程序结构如图 9 所示。

该程序结构可分为三个部分：

1). 初始化部分 该部分主要负责完成以下任务：

- 将用户设定的扫描参数转化为匹配程序内部的 LabVIEW 自定义控件 **status.ctl** 接口的数据；
- 初始化两个生产者-消费者结构中的数据队列：图像数据队列与图形用户界面事件队列；
- 与数据采集卡通信并重设数据采集卡的数字输出端口，保证数字计数器的默认输出端口为 **PFI12**。

2). 循环运行部分 该部分由五个独立、并发的子任务组成，如图 9(b)：

- 数字输出 (digital output, DO)：即计数器输出，输出一个每帧采样的暂停触发，用来控制模拟输入与模拟输出循环实现同步。同步信号路由 (route) 至 RTSI 总线的

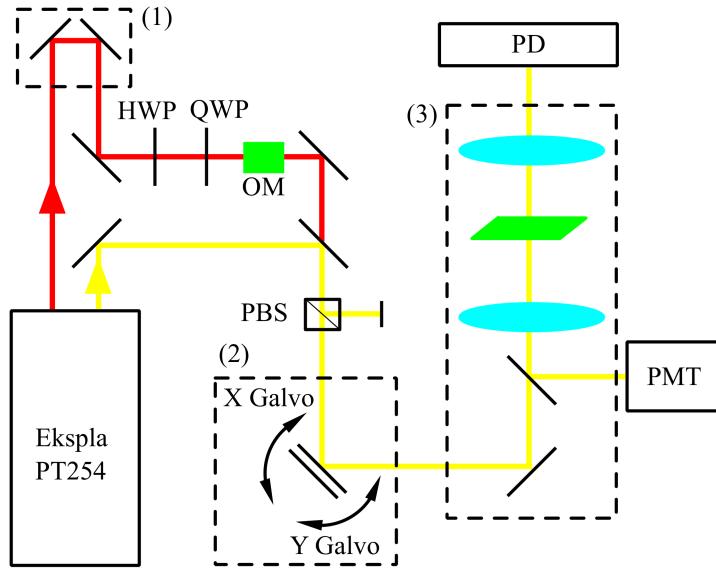
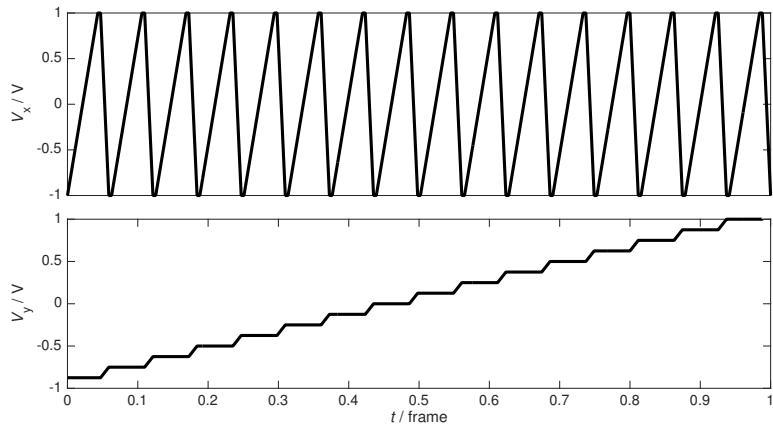


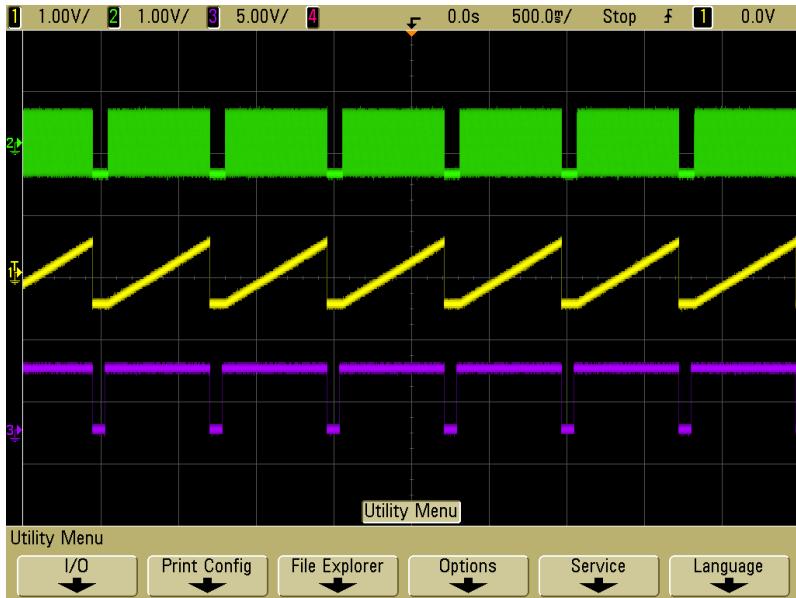
图 7: 激光逐点扫描显微镜的光路图。其中 PD 为光电二极管, PMT 为光电倍增管, HWP 为半波片, QWP 为  $1/4$  波片, PBS 为偏振光分束器。黄色光线为 690 1000nm 可调光, 红色光线为 1064nm 激光。虚线框 (1) 中为光学延迟线, 用于调节两路激光的时间同步; 虚线框 (2) 中为二维振镜, 两个振镜的旋转分别控制出射光沿着 X 、Y 两个方向扫描; 虚线框 (3) 中为 Olympus IX73 显微镜的结构。

**RTSIO** 端口, 作为模拟输入和模拟输出循环的内部触发信号, 同时也通过 **PFI12** 端口输出, 可以作为其他设备的每帧触发信号 (frame trigger), 使用 NI-DAQmx 实现。

- 模拟输出 (analog output, AO): 在 AO 采样时钟嘀嗒时, 输出时间  $n$  对应的 X 、 Y 振镜的角度, 即出射光线扫描位置  $(x(n), y(n))$  的电压信号。AO 受到 RTSI 端口的暂停触发控制, 使用 NI-DAQmx 实现。
- 模拟输入 (analog input, AI): 在 AI 采样时钟嘀嗒时, 采集对应的光探测器电压信



(a) 输出信号示意图

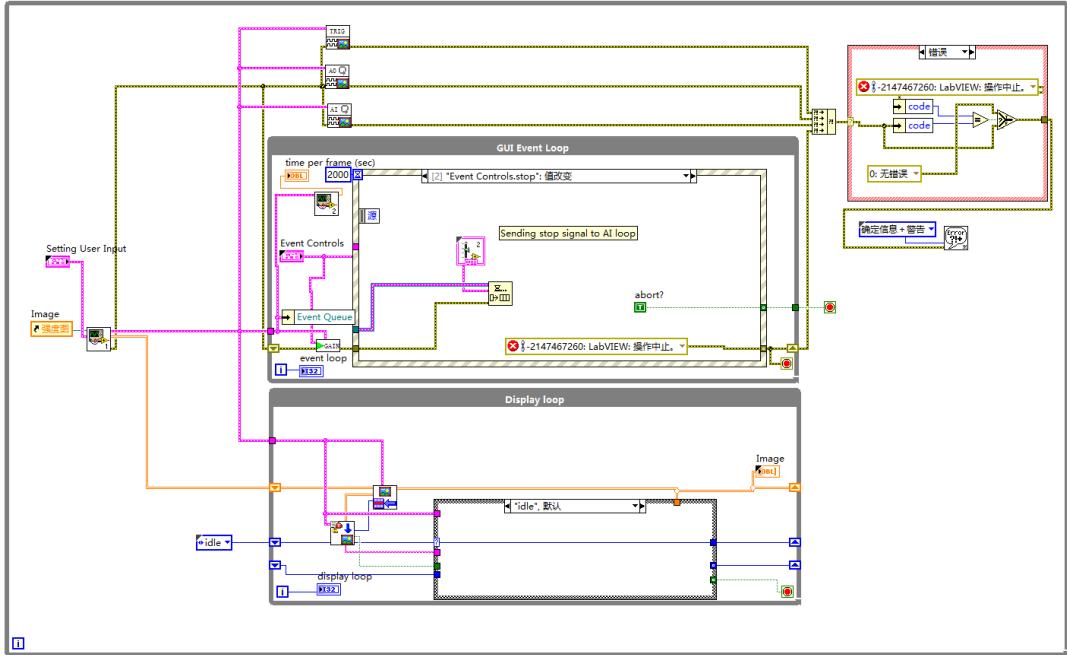


(b) 实测输出信号

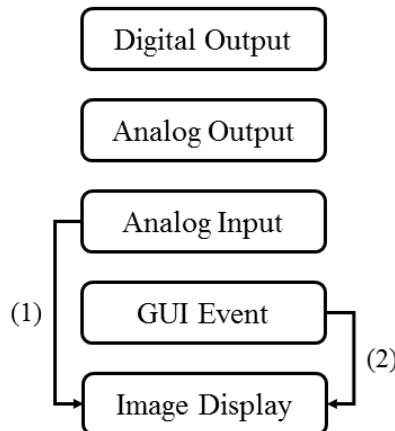
图 8: 输出的扫描信号波形示意图与实际测得的信号示意图。(a) 为扫描  $n_{size} = 8$  的图像时 X、Y 输出信号示意图; (b) 为扫描参数为默认值时的输出信号, 其中绿色 (上) 为 X 输出信号, 黄色 (中) 为 Y 输出信号, 紫色 (下) 为每帧触发信号。

号。在采集  $n_{channel}$  行 (称为一个通道) 之后, 将数据入队列到图像数据队列中, 等待图像处理与显示循环的处理, 使用 NI-DAQmx 实现。

- 图形用户界面事件: 使用 LabVIEW 事件结构捕捉前面板 (图形用户界面) 的用户事件, 包括增益调节、偏置调节、保存图片等, 并将之入队列至图形用户界面事件队列, 等待图像处理与显示循环的处理。
- 图像处理与显示: 该部分为一个有限状态机, 其状态由图形用户界面事件队列的元素



(a) 程序后面板



(b) 程序结构框图

图 9: ScanImage LabVIEW 程序结构。(a) LabVIEW 后面后面板程序截图。(b) 简化的程序框图。由上至下的五个循环分别为：数字输出、模拟输出、模拟输入、图形用户界面事件、图像处理与显示；两个箭头是生产者-消费者结构中的数据队列：(1) 图像数据队列，(2) 图形用户界面事件队列。

决定等待队列的信号。在正常成像的状态时，该循环不断出队列图像数据，并更新前面板显示的图像；在需要储存图像时，调用 NI IMAQ 的图像储存 vi 。

3). 程序终止与错误处理部分 该部分用来进行程序的错误捕获与错误处理，忽略正常结束程序的错误。并且判断需要终止程序还是重启执行程序。

按照如上思路编写的 LabVIEW 程序前面板如图 10 所示。该用户界面上实现了显微成像显示、成像参数配置、成像中操作的功能。

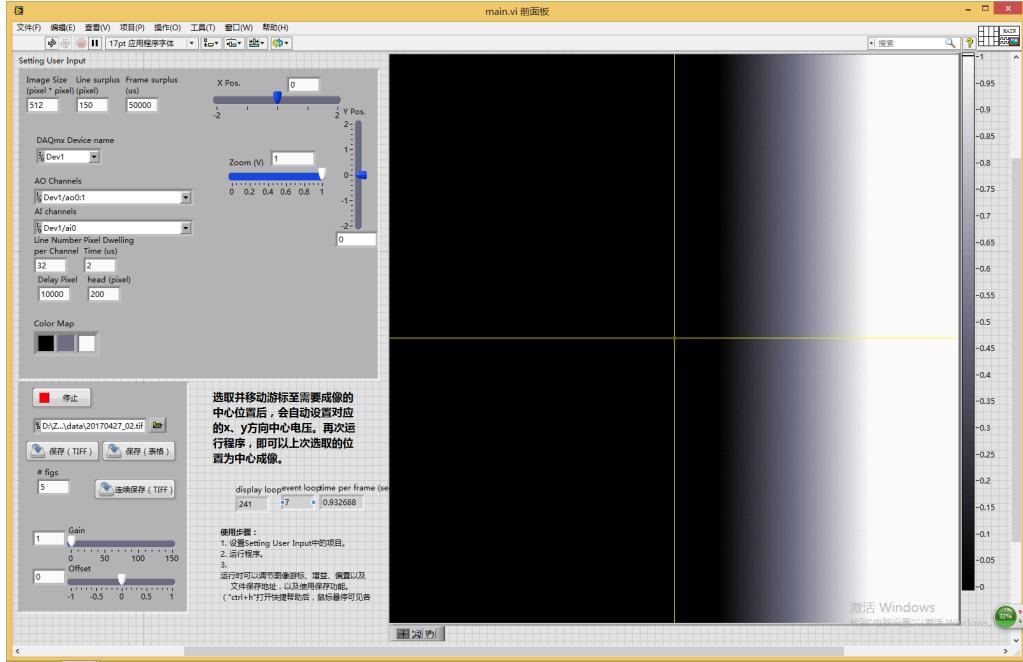


图 10: 程序的图形用户界面（前面板）

### 3.3 显微镜的性能测试

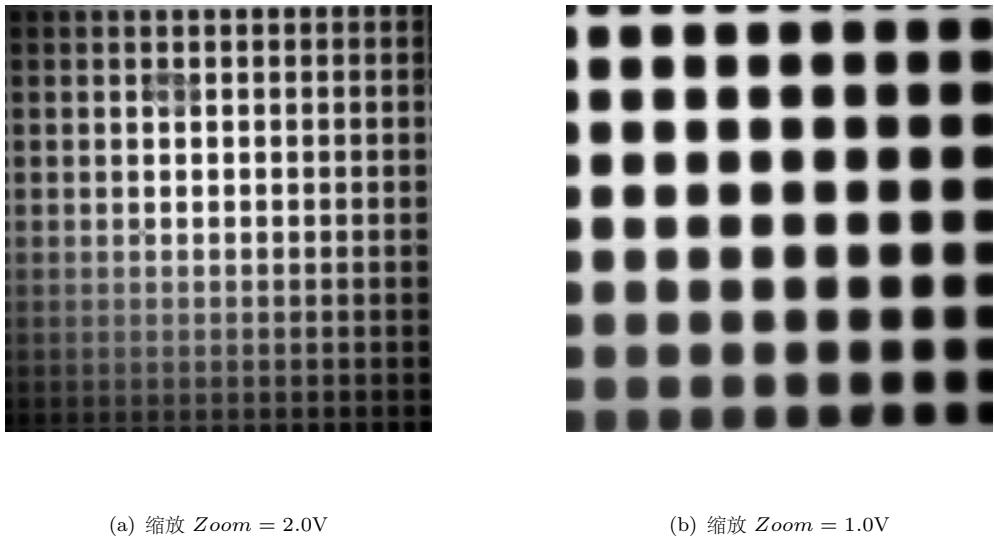
为了检验此多光子显微镜的性能，使用  $0.010\text{mm}$  的标准格子测试成像（入射激光波长  $802\text{nm}$ ，功率  $40\text{mW}$ ，无滤镜光电倍增管探测），得到如图 11 所示的  $512 \times 512$  像素的图像。可以看出标准格子样品在显微镜下可以真实、稳定地成像；每行、每通道、每帧之间没有明显的偏差与位移；所成图像的噪声主要来源于激光器的光强起伏变化。可以得知，在缩放  $Zoom = 2.0\text{V}$  与  $40\times$  物镜的条件下成像时，成像区域的边长约为  $d = 360\mu\text{m}$ 。可以计算得到本多光子显微镜的成像区域边长  $d$ （单位： $\mu\text{m}$ ）、每个像素对应的实际尺度  $d_{pixel}$ （单位： $\mu\text{m}$ ）与物镜放大倍数  $m$  和缩放（即振镜扫描电压振幅） $Zoom$ （单位： $\text{V}$ ）之间满足式 6，

$$d = 4.50 \times m \times Zoom(\mu\text{m}) \quad (6)$$

$$d_{pixel} = 8.79 \times 10^{-3} \times m \times Zoom(\mu\text{m}) \quad (7)$$

在默认成像参数下（图像大小  $512 \times 512$  像素，像素驻留时间  $t_{dwell} = 2.0\mu\text{s}$ ，每帧采样间隔时间  $t_{gap} = 50000\mu\text{s}$ ）采集每一帧图片所用时间为  $t_{loop} = 0.932\text{s}$ 。选取缩放  $Zoom = 2.0\text{V}$  时，每个像素对应的实际尺度为  $0.703\mu\text{m}$ 。

调试好光路后，使用本激光扫描多光子显微镜观察纸巾中的植物纤维（入射激光波长  $802\text{nm}$ ，功率  $40\text{mW}$ ，无滤镜， $40\times$  物镜，缩放  $Zoom = 2.0\text{V}$ ）其成像结果如图 12 所



(a) 缩放  $Zoom = 2.0V$

(b) 缩放  $Zoom = 1.0V$

图 11: 0.010mm 的标准格子样本在本显微镜系统的两种不同缩放下的成像。入射激光波长 802nm , 功率 40mW , 无滤镜光电倍增管探测, 图像大小为  $512 \times 512$  像素。

示, 可以清楚看见纸巾中的植物纤维, 其中模糊的部分是因为纸巾比较厚, 有的部分处于焦平面之外所致。

## 4 多光子显微镜的应用

使用该多光子显微镜, 可以对多种非线性材料进行多光子显微研究。

以  $\text{LiNiO}_3$  晶体的二次谐波生成显微成像为例, 其显微结果如图 13 所示。使用波长 1064nm 、功率 80mW 的不可见激光入射, 在  $\text{LiNiO}_3$  晶体粉末的作用下发生了二次谐波生成, 发出了绿光。配合  $40\times$  的物镜与 750nm 的短波通滤镜, 调节缩放  $Zoom = 2.0V$ , 可以观察到较强的二次谐波生成的光信号, 通过该系统所成图像可以较为清晰地观察到  $\text{LiNbO}_3$  晶体粉末的形态。[15]

$\text{MoS}_2$  薄膜在层数为偶数时会出现中心反演对称性的破缺, 从而可以出现二次谐波生成现象。使用波长 802nm 、功率 40mW 的激光,  $40\times$  物镜与缩放  $Zoom = 2.0V$ , 在光电倍增管前加装 750nm 的短波通滤镜, 得到显微图像如图 14(a), 其中红色箭头标识处可见微弱的二次谐波生成信号。

聚苯乙烯 (Polystyrene, PS) 是一种无色透明的芳香烃聚合物, 多用于一次性容器, 入一次性饭盒中。聚苯乙烯的芳香环中 C–H 键振动模式的 Raman 频移为  $3038\text{cm}^{-1}$  。[39] 我们使用两种不同直径的聚苯乙烯荧光小球样品进行实验, 记作样品 1 与样品 2。

对于样品 1, 使用 803nm 的脉冲激光作为泵浦光, 1064nm 的脉冲激光作为 Stokes 光; 在  $40\times$  物镜, 缩放  $Zoom = 2.0V$  的条件下, 在光电倍增管前加装了 750nm 的短波通滤镜后, 可以观察到聚苯乙烯荧光小球的相干反 Stokes Raman 散射信号。其显微成像结果如图 14(b)

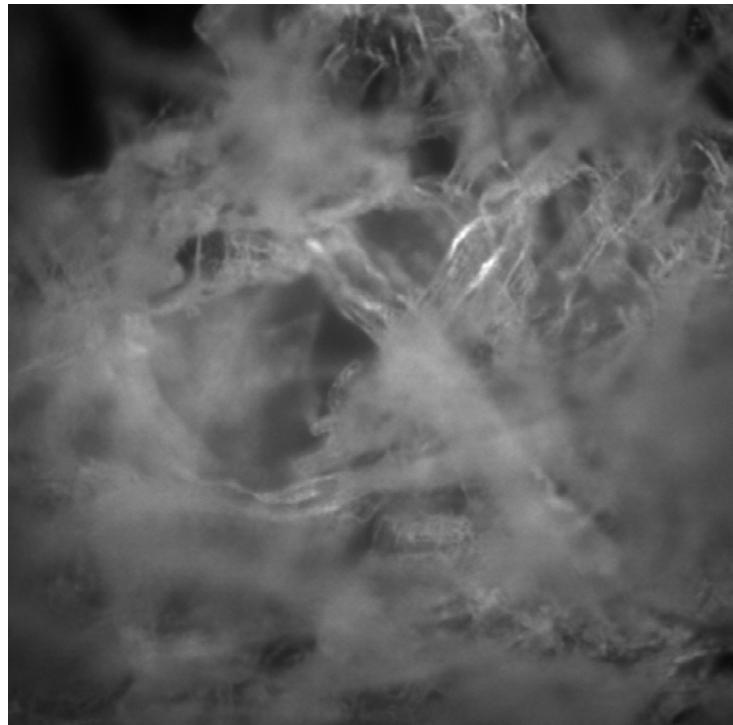
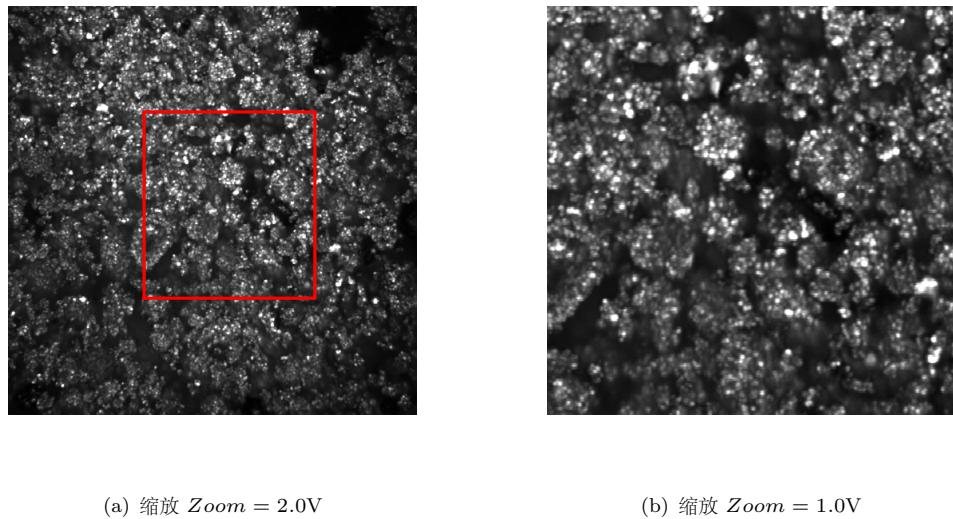


图 12: 使用调试好的多光子显微镜观察到的纸巾纤维



(a) 缩放  $Zoom = 2.0V$

(b) 缩放  $Zoom = 1.0V$

图 13: 两种缩放尺度 ( $Zoom$ ) 下,  $\text{LiNbO}_3$  晶体的二次谐波显微成像。在缩放  $Zoom = 2.0V$  时视野较大, 其中红框部分对应缩放  $Zoom = 1.0V$  的视野。

所示。

对于样品 2，仅使用 1064nm 的激光入射样本时，用  $40\times$  物镜，缩放  $Zoom = 2.0V$  加装了 750nm 短波通滤镜的光电倍增管探测不到显著的图像信号；同样条件下，使用 803nm 的激光入射样本时，光电倍增管探测到了较弱的图像信号，此为材料的双光子激发荧光信号成像，如图 14(c) 所示。同样条件下，使用 803nm 的脉冲激光作为泵浦光，1064nm 的脉冲激光作为 Stokes 光，用加装了 750nm 短波通滤镜后，可以观察到有相干反 Stokes Raman 散射信号，其显微成像结果如图 14(d) 所示。

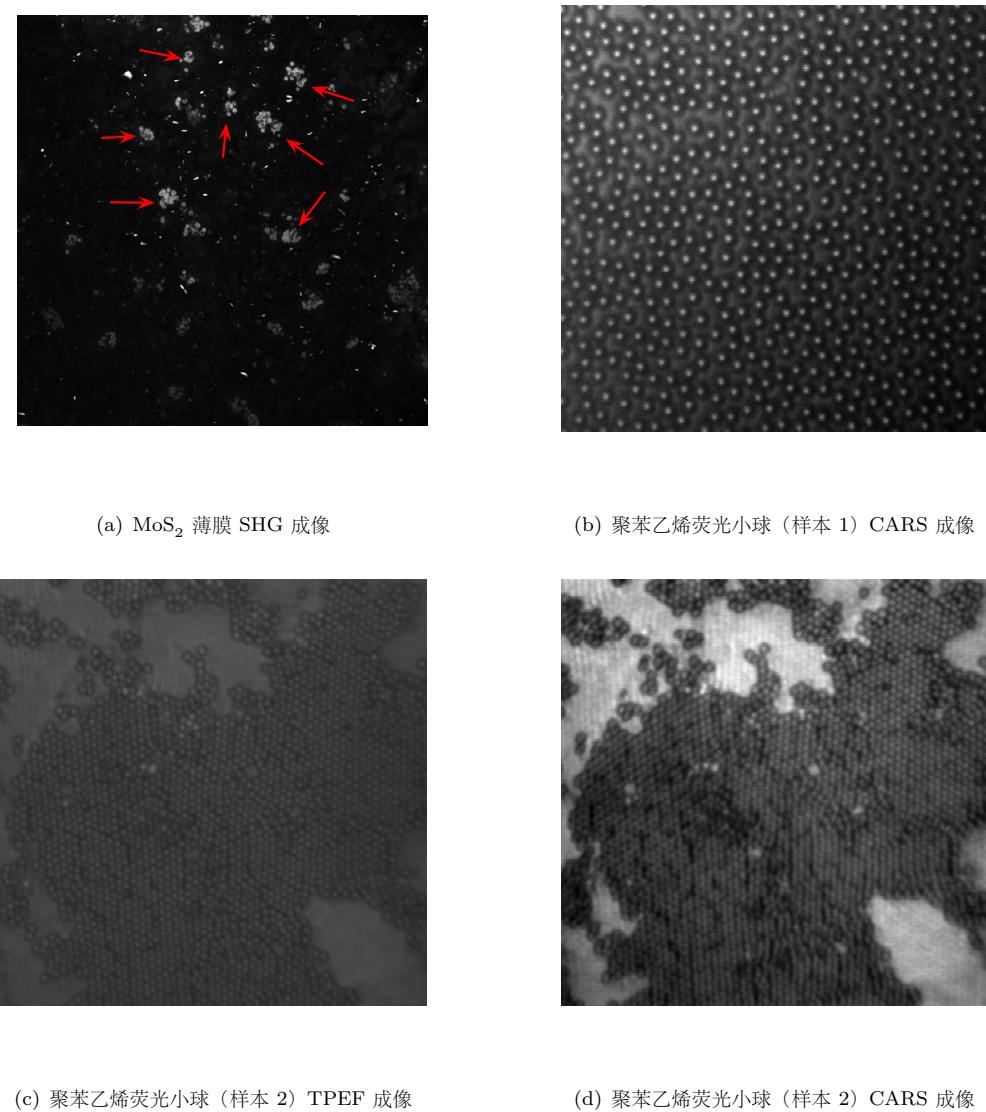


图 14：各种得线性材料在本多光子显微镜的成像。(a)  $\text{MoS}_2$  薄膜的二次谐波生成显微成像，红色箭头标识处可见二次谐波生成信号；(b) 聚苯乙烯荧光小球（样本 1）的相干反 Stokes Raman 散射显微成像；(c) 聚苯乙烯荧光小球（样本 2）的双光子激发荧光显微成像，仅使用 803nm 的泵浦光入射，信号较弱；(d) 聚苯乙烯荧光小球（样本 2）的相干反 Stokes Raman 散射显微成像，803nm 的泵浦光与 1064nm 的 Stokes 光同时入射，信号较强。

## 5 实验展望

如前文所述，本多光子显微镜系统具有很强的拓展性，可以扩增其他软、硬件。进一步地，可以通过数据采集卡 **PFI12** 端口输出的每帧触发信号控制其他仪器（如光路快门）的动作；或增加光学平台 Z 方向扫描的功能，实现样本的三维重构；也可以配合激光器的控制程序完成样品的逐点光谱扫描。

## 6 致谢

衷心感谢季敏标老师在我完成此毕业设计期间，对实验内容以及论文撰写给予的悉心的指导、敦促与启发性的建议。感谢贺若愚学长、刘琦学长等课题组中的各位学长和学姐对我在实验仪器、背景知识等方面给予的慷慨帮助。

## 7 参考文献

- [1] Maria Goppertmayer. Über elementarakte mit zwei quantensprüngen. *Annalen der Physik*, 401(3):273–294, 1931.
- [2] W. Kaiser and C. G. Garrett. Two-Photon Excitation in CaF<sub>2</sub>: Eu<sup>2+</sup>, September 1961.
- [3] Winfried Denk, James H Strickler, and Watt W Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951):73–76, 1990.
- [4] Warren R Zipfel, Rebecca M Williams, and Watt W Webb. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotech*, 21(11):1369–1377, 11 2003.
- [5] Jayant D Bhawalkar, Guang S He, and Paras N Prasad. Nonlinear multiphoton processes in organic and polymeric materials. *Reports on Progress in Physics*, 59(9):1041–1070, 1996.
- [6] Aaron M Streets, Ang Li, Tao Chen, and Yanyi Huang. Imaging without fluorescence: nonlinear optical microscopy for quantitative cellular imaging. *Analytical Chemistry*, 86(17):8506–8513, 2014.
- [7] Robert L Byer. Nonlinear optical phenomena and materials. *Annual Review of Materials Science*, 4(1):147–190, 2003.
- [8] Charles H. Camp Jr and Marcus T. Cicerone. Chemically sensitive bioimaging with coherent raman scattering. *Nature Photonics*, 9:295–305, 4 2015.

- [9] Xiaolin Nan, Eric O Potma, and X Sunney Xie. Nonperturbative chemical imaging of organelle transport in living cells with coherent anti-stokes raman scattering microscopy. *Biophysical Journal*, 91(2):728–735, 2006.
- [10] Christian W Freudiger, Wei Min, Brian G Saar, Sijia Lu, Gary R Holtom, Chengwei He, Jason C Tsai, Jing X Kang, and X Sunney Xie. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated raman scattering microscopy. *Science*, 322(5909):1857–1861, 2008.
- [11] Minbiao Ji, Daniel A Orringer, Christian W Freudiger, Shakti H Ramkissoon, Xiaohui Liu, Darryl Lau, Alexandra J Golby, Isaiah Norton, Marika Hayashi, Nathalie Y R Agar, et al. Rapid, label-free detection of brain tumors with stimulated raman scattering microscopy. *Science Translational Medicine*, 5(201), 2013.
- [12] Kevin W Eliceiri, Michael R Berthold, Ilya G Goldberg, Luis Salar Ibanez, B S Manjunath, Maryann E Martone, Robert F Murphy, Hanchuan Peng, Anne L Plant, Badri-nath Roysam, et al. Corrigendum: Biological imaging software tools. *Nature Methods*, 9(10):1031–1031, 2012.
- [13] 石顺祥, 陈国夫, 赵卫, and 刘继芳. 非线性光学 (第二版) . 西安电子科技大学出版社, 西安, 10 2012.
- [14] Paul J Campagnola, William H Mohler, Sergey V Plotnikov, and Andrew C Millard. Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins. *Proceedings of SPIE*, 4963(1):73–80, 2003.
- [15] G D Boyd, Robert C Miller, K Nassau, W L Bond, and A Savage. Linbo3: An efficient phase matchable nonlinear optical material. *Applied Physics Letters*, 5(11):234–236, 1964.
- [16] Yilei Li, Yi Rao, Kin Fai Mak, Yumeng You, Shuyuan Wang, Cory Dean, and Tony F Heinz. Probing symmetry properties of few-layer mos2 and h.bn by optical second-harmonic generation. *Nano Letters*, 13(7):3329–3333, 2013.
- [17] Linbo3 Unit Cell figure. NI-DAQmx measurement service software. created with Povray 3.6, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=163749>, 2005.
- [18] Ben Mills. Molybdenum disulfide 3d ball-and-stick model. Own work, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2976497>, 2007.
- [19] 李淳飞. 非线性光学 (第二版) . 电子工业出版社, 北京, 8 2009.

- [20] Jerome A Feldman and Thomas J Leblanc. Coordinated computing: Tools and techniques for distributed software. *Science of Computer Programming*, 5:318–320, 1985.
- [21] Neil Weste and Kamran Eshraghian. *Principles of cmos vlsi design: a system perspective*. Addison-Wesley, 2 edition, 1985.
- [22] National Instruments, 11500 Mopac Expwy, Austin, TX, USA. *Synchronization Explained*, 7 2016. <http://www.ni.com/white-paper/11369/en/>.
- [23] Remzi H. Arpaci-Dusseau and Andrea C. Arpaci-Dusseau. *Operating Systems: Three Easy Pieces*. Arpaci-Dusseau Books, 1 edition, 2012.
- [24] Application design patterns: Producer/consumer, 8 2016. <http://www.ni.com/white-paper/3023/en/>.
- [25] EKSPLA, Savanoriu Ave 237, LT-02300 Vilnius, Lithuania. *PT200 Series Datasheet*, 2017.
- [26] *Research Inverted Microscope IX83/IX73/IX53*.
- [27] Cambridge Technology, Bedford, MA, USA. *62xxH Galvometer Scanners datasheets*, 2016.
- [28] Filip Tavernier and Michiel Steyaert. *High-Speed Optical Receivers with Integrated Photodiode in Nanoscale CMOS*.
- [29] Hamamatsu Photonics K. K. *PHOTOMULTIPLIER TUBES Basics and Applications*, 2007.
- [30] Arpad Horvath. Photomultiplier tube figure, 3 2006. <https://zh.wikipedia.org/wiki/File:Photomultipliertube.svg>.
- [31] National Instruments, 11500 Mopac Expwy, Austin, TX, USA. *NI PCI-6110/6111 Specifications*, 5 2009.
- [32] National Instruments, 11500 Mopac Expwy, Austin, TX, USA. *BNC-2110 installation guide*, 10 2007.
- [33] National Instruments, 11500 Mopac Expwy, Austin, TX, USA. *What is RTSI and How is it Configured?*, 2004. <http://digital.ni.com/public.nsf/allkb/A120195AAAA9222A86256C69007C8B27>.
- [34] National Instruments. LabVIEW system design software. <http://www.ni.com/labview/>, 2017.

- [35] National Instruments. NI-DAQmx measurement service software. <https://www.ni.com/dataacquisition/nidaqmx.htm>, 2017.
- [36] Joe Armstrong. *Making reliable distributed systems in the presence of software errors*. PhD thesis, The Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden, 2003.
- [37] National Instruments, 11500 Mopac Expwy, Austin, TX, USA. *NI-DAQmx Software*, 2014. <https://www.ni.com/dataacquisition/nidaqmx.htm>.
- [38] National Instruments, 11500 Mopac Expwy, Austin, TX, USA. *NI Vision 2016 for LabVIEW Help*, 2016. [http://zone.ni.com/reference/en-XX/help/370281AC-01/imaqvision/vision\\_and\\_motion\\_pal/](http://zone.ni.com/reference/en-XX/help/370281AC-01/imaqvision/vision_and_motion_pal/).
- [39] Andreas Zumbusch, Gary R Holtom, and X Sunney Xie. Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-stokes raman scattering. *Physical Review Letters*, 82(20):4142–4145, 1999.

# 附录

## .1 ScanImage-LabVIEW 程序参数列表

表 1: 激光二维扫描的参数设置

参数	默认值	说明
$n_{size}$	512px	图像扫描的有效范围 (行、列像素数)，实际的图像扫描范围为 $n_{size} \times n_{size}$ 。
$n_{head}$	80px	由于振镜的惯性，其角度 $\theta_x(t)$ 相对电信号 $V_x(t)$ 有一定的延迟。因此在暂态过程后，需要预留一段稳态前的弛豫时间。
$n_{fro}$	150px	x 方向的振镜在扫描完一整行之后，需要返回行首。此参数为振镜返回行首所用的时间对应的像素数。
$n_{gap}$	50000px	前一帧图像采样结束到后一帧图像采样开始之间的时间间隔对应的像素数。在这段时间里可以穿插其他活动
$t_{dwell}$	$2.0\mu s$	每个像素的驻留时间 (dwell time)。
$t_{gap}$	$50000\mu s$	每一帧图片采样结束到下一帧采样开始的间隔时间。
$t_{delay}$	$10000\mu s$	在数字触发后，采样开始前的延迟等待时间。该参数是在触发外部设备时基于其他设备的响应时间配置。
$f_{AI}$	10.0MHz	模拟输入端口的采样速率。每个像素点为 $f_{AI} \times t_{dwell}$ 个模拟采样的平均。
$V_0$ 或 <i>Zoom</i>	1.0V	视野的大小对应的扫描振幅。实际扫描范围为 $V_x \in [V_{xc} - V_0, V_{xc} + V_0]$ , $V_y \in [V_{yc} - V_0, V_{yc} + V_0]$
$V_{xc}, V_{yc}$	0.0V	视野的中心位置对应的电压。实际扫描范围为 $V_x \in [V_{xc} - V_0, V_{xc} + V_0]$ , $V_y \in [V_{yc} - V_0, V_{yc} + V_0]$
$n_{line}$	32lines	每通道采样行数。数据采集卡从模拟输入端口每采样 $n_{line}$ 行数据，向计算机中的 LabVIEW 程序发送一次数据。

## .2 ScanImage-LabVIEW 程序算法

---

**Algorithm 1** ScanImage-LabVIEW Algorithm (Part 1)

---

```
1: procedure DIGITAL IN( $t_{high}$ ,  $t_{low}$ )
2:   loop
3:     Output HIGH for  $t_{high}$                                 ▷ Frame scanning period
4:     Output LOW for  $t_{low}$                                  ▷ Gap between two frames
5:   end loop
6: end procedure
7:
8: procedure ANALOG OUT(  $n_{size}$ ,  $n_{head}$ ,  $n_{fro}$ ,  $V_{max}$ ,  $t_{delay}$ ,  $t_{pixel}$ )
9:   Let  $n_{to} \leftarrow n_{size} + n_{head}$ 
10:  Wait until DO rising edge trigger.
11:  Wait for  $t_{delay}$ .
12:  for  $i = 1 : n_{size}$  do                                     ▷ For each line
13:    for  $j = 1 : (n_{to} + n_{fro})$  do                      ▷ For each pixel
14:      Wait for  $t_{pixel}$ .
15:      if  $j < n_{to}$  then                                         ▷ Scanning
16:         $V_x \leftarrow V_{max} \times j/n_{to}$ 
17:         $V_y \leftarrow V_{max} \times (i - 1)/n_{size}$ 
18:      else if  $j < n_{to} + n_{fro}$  then                         ▷ Returning
19:         $V_x \leftarrow V_{max} \times (n_{to} + n_{fro} - j)/n_{fro}$ 
20:         $V_y \leftarrow (V_{max}/n_{size}) \times [(j - n_{to})/n_{fro} + i]$ 
21:      end if
22:    end for
23:  end for
24: end procedure
```

---

(接下页)

---

**Algorithm 1** ScanImage-LabVIEW Algorithm (Part 2)

---

```
25: procedure ANALOG IN( $n_{ch}$ ,  $n_{size}$ ,  $n_{head}$ ,  $n_{fro}$ ,  $t_{delay}$ )  
26:   Let  $n_{to} \leftarrow n_{size} + n_{head}$   
27:   Wait until DO rising edge trigger.  
28:   for  $i = 1 : (n_{size}/n_{ch})$  do                                ▷ For each channel  
29:     for  $j = 1 : [n_{ch} \cdot (n_{to} + n_{fro})]$  do                ▷ For each pixel  
30:        $d_i(j) \leftarrow V_{in}$                                          ▷ Store data into array  $d$   
31:     end for  
32:     Enqueue  $d$  to data queue.  
33:   end for  
34: end procedure  
35:  
36: procedure DISPLAY( $n_{ch}$ ,  $n_{size}$ ,  $n_{head}$ ,  $n_{fro}$ )  
37:   Let  $n_{to} \leftarrow n_{size} + n_{head}$   
38:   Wait until DO rising edge trigger.  
39:   for  $i = 1 : (n_{size}/n_{ch})$  do                                ▷ For each channel  
40:     Dequeue  $d$  from data queue.  
41:     for  $j = 1 : n_{ch}$  do                                     ▷ For each line  
42:        $d_j \leftarrow d_j(n_{head} : end - n_{fro})$                   ▷ Slice the effective part  
43:     end for  
44:     Refresh  $[n_{size} \cdot (i - 1)]$ -th to  $[n_{size} \cdot i]$ -th lines with  $d$ .  
45:   end for  
46: end procedure
```

---

完整的程序代码已上传至 Github :

<https://github.com/Jeepee-Liu/ScanImage-LabVIEW>。