

## 3D 激光扫描共聚焦显微镜计量特性分析及测试

崔建军<sup>1</sup>, 杜 华<sup>1</sup>, 朱小平<sup>1</sup>, 薛 梓<sup>1</sup>, 闫勇刚<sup>2</sup>, 陈 恺<sup>1,2</sup>

(1. 中国计量科学研究院, 北京 100013;

2. 河南理工大学 机械与动力工程学院, 河南 焦作 454000)

**摘要:** 为了合理评定激光扫描共聚焦显微镜(Laser Scanning Confocal Microscope, LSCM)的测量性能, 提出了一种用于检验 LSCM 计量特性的测试方法。首先, 依据 LSCM 成像原理, 对其技术特点, 特别是轴向分辨率和横向分辨率等进行了理论分析; 然后对其计量特性的参数指标进行了归纳, 并提出相应的性能测试方法。具体包括采用线间隔为微米级的网格板等作为标准器, 测试 LSCM 的放大倍数和光学横向分辨率; 采用纳米级高度台阶样板测试 LSCM 的光学轴向分辨率和轴向定位特性; 采用激光干涉仪测试样品台工作性能等。实验证明: 该方法能够满足当前普遍应用的 LSCM 的性能测试需求。

**关键词:** 激光扫描共聚焦显微镜; 放大倍数; 测量分辨率; 非线性误差; 光学相干层析成像

**中图分类号:** TB921 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3788/IRLA201847.0817005

## Measurement characteristics analysis and test of 3D laser scanning confocal microscope

Cui Jianjun<sup>1</sup>, Du Hua<sup>1</sup>, Zhu Xiaoping<sup>1</sup>, Xue Zi<sup>1</sup>, Yan Yonggang<sup>2</sup>, Chen Kai<sup>1,2</sup>

(1. National Institute of Metrology, Beijing 100013, China;

2. School of Mechanical and Power Engineering, Henan Polytechnic University, Jiaozuo 454000, China)

**Abstract:** In order to evaluate the measurement performance of laser scanning confocal microscope (LSCM) accurately, one measurement approach for checking LSCM was presented. Firstly, based on the imaging principle, the technical characteristics of LSCM, especially the vertical resolution and lateral resolution were analyzed in theory; then main parameters of the measurement characteristics were summarized, and the corresponding performance testing method were proposed. Such as the amplification and the lateral optical resolution of the LSCM were tested with the nanometer and sub micronmeter line spacing grid standard plates; the axial optical resolution and the axial positioning characteristics of the LSCM were tested with the nanometer height steps; the performances of the sample stage were tested with the laser interferometer. The experimental results show that this method can meet the current performance requirements of LSCM.

**Key words:** laser scanning confocal microscope; enlargement factor; measurement resolution; nonlinear errors; optical coherence tomography

收稿日期: 2018-03-13; 修订日期: 2018-04-17

基金项目: 国家自然科学基金(51675497); 北京市自然科学基金(3162034); 国家重点研发计划专项(2017YFF0206305); 河南省高等学校重点科研项目(16A413006); 质检总局科研项目(ANL1617)

作者简介: 崔建军(1977-), 男, 副研究员, 博士, 主要从事长度计量、干涉测量、光纤光栅传感技术方面的研究。Email: ycuij@163.com

## 0 引言

目前,激光扫描共聚焦显微镜(Laser Scanning Confocal Microscope, LSCM) 是一种分辨率很高的现代光学显微镜,在生物医学、精密测试、半导体、微电子等领域<sup>[1-2]</sup>有着广泛的应用,在精密测量领域,它也用于测量台阶高度、非球形貌检测、微细结构测试等方面,是表面形貌检测的重要技术方法<sup>[3]</sup>。

在实际测试时,样品的表面由于粗糙程度,形状相对于物相焦平面的倾斜程度、透光性能以及样品台的移动特性等均会影响实际形貌探测的成像分辨能力和测量准确性<sup>[4]</sup>。除了被测样品的属性对测量结果有影响以外,LSCM 本身的测量性能(也可称计量特性)对测量的准确性也有着直接的影响。因此,对 LSCM 的计量特性进行测试和分析非常重要。但是,由于传统三维显微扫描测量仪器,例如触针轮廓仪等仪器的性能测试方法,不能直接适用于非接触式测量的 LSCM;因此,传统用于平面信息探测的光学显微镜测试方法也难以满足 LSCM 性能测试需要。

2012 年,英国诺丁汉大学 Richard K. Leach 等在英国国家物理研究所对 LSCM 的校准进行了研究,提出 LSCM 扫描表面形貌时,其计量特性包括:测量噪声、测量平面度误差、样品台位移的非线性误差、放大倍数、轴向位移分辨率等,并设计了一种圆形的分辨率板用于检测 LSCM 的横向测量分辨率<sup>[5]</sup>;2015 年,加拿大国家研究理事会的 Beraldin J A 等对 3D 显微测量仪器的测试标准器进行了进一步研究<sup>[6]</sup>;2016 年,哈尔滨工业大学刘俭等对 LSCM 的横向分辨率的评定技术进行了研究,并进一步提出了光学显微三维测量的解耦合准则<sup>[7-8]</sup>。但是国内外对 LSCM 的性能测试方法仍旧没有形成普遍认同的校准方法。目前商用的 LSCM 越来越多,不同厂家的技术指标和检验方法存在诸多差异。为了比较和评估不同 LSCM 的测量性能,迫切需要一种准确而全面的性能测试方法。

文中依据测量原理,对激光扫描共聚焦显微镜的计量特性进行了分析和探讨,提出和使用微纳米样板和纳米台阶高度标准等测试标准器对 LSCM 计量特性进行了测试实验。这对发展和提升激光扫

描共聚焦显微镜的性能计量技术十分重要。

## 1 LSCM 层析扫描方法

### 1.1 LSCM 的层析显微原理

LSCM 在传统光学显微镜的基础上,用激光作为光源,采用逐点扫描的方式成像。再利用精密调焦技术与现代图像处理技术,实现了三维空间形貌的高分辨率扫描。基本原理如图 1 所示。

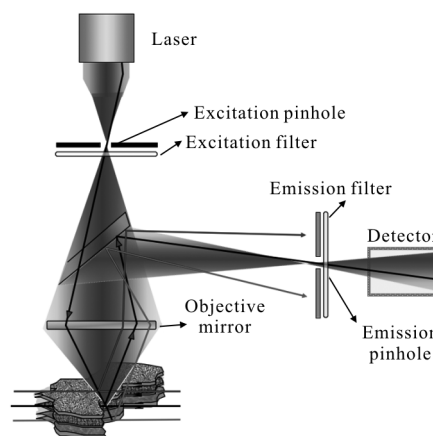


图 1 激光扫描共聚焦显微镜基本原理

Fig.1 Basic principle of the LSCM

图 1 展开,得到等效光路的物理模型<sup>[9-10]</sup>,见图 2。

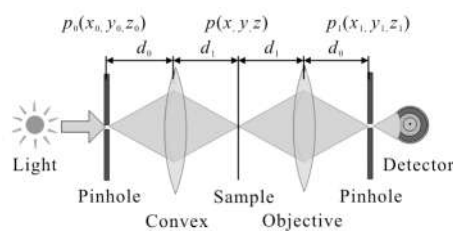


图 2 LSCM 等效光路

Fig.2 LSCM equivalent optical path

成像时,激光通过针孔,经聚光镜会聚并投射至放置样品的焦平面上,反射的激光通常再经物镜共轭焦点处的针孔后进入探测器,使得探测器仅能收集样品在物镜焦平面的信息。从而抑制了非焦平面的像点对焦平面像点的干扰,也抑制了焦平面内非探测点对探测点的干扰,极大地改善了成像的分辨率。

设光源沿光轴,经针孔、样品、探测针孔的位置矢量分别为  $p_0(x_0, y_0, z_0)$ 、 $p(x, y, z)$ 、 $p_1(x_1, y_1, z_1)$ ,则光在样品  $p$  点的光学复振幅分布为:

$$U(p) = \int_{-r}^r \delta(p_0) A_1(p_0, M_1 p) dp_0 \quad (1)$$

式中： $r$  为圆形物镜的半径； $A_1$  为物镜的空间光学振幅的点扩散函数。忽略光的相位因子，则有：

$$A_1(x, y, z) = \int_{-r}^r \int_{-r}^r Q(\xi, \eta, z) \times \exp\left[\frac{ik}{d}(\xi z + \eta y)\right] d\xi d\eta \quad (2)$$

式中： $Q(\xi, \eta, z)$  为物镜的光瞳函数； $\xi, \eta$  为过程变量。

$$M_1 = \begin{bmatrix} m & & \\ & m & \\ & & -m^2 \end{bmatrix} \quad (3)$$

式中： $M_1$  为物镜的放大因子，其元素  $m$  为物距  $d_1$  和像距  $d_0$  的放大比率，即  $m = d_1/d_0$ 。

以反射式 LSCM 为例，样品物函数设为  $T(p)$ ，样品扫描位置为  $p_s$ ，样品反射后的光场分布为：

$$U(p, p_s) = \left[ \int_{-r}^r \delta(p_0) A_1(p_0 + M_1 p) dp_0 \right] \times T(p_s - p) \quad (4)$$

由透镜成像原理，得探测空间  $c$  的光学振幅分布为：

$$U(p_c, p_s) = \int_{-r}^r \left[ \int_{-r}^r \delta(p_0) A_1(p_0 + M_1 p) dp_0 \right] \times T(p_s - p) \times A_2(p + M_2 p_c) dp \quad (5)$$

式中： $A_2$  为聚焦镜的三维振幅点扩散函数； $M_2$  是其放大因子。则探测器置于  $p_{c0}$  接收到的样品反射光强为：

$$I(p_s) = \int_{-r}^r |U(p_c - p_s)|^2 \delta(p_{c0} - p_s) dp_c \quad (6)$$

用  $|p_c - p_{c0}|$  表示探测点距光轴的横向距离，设经针孔光阑后的圆形探测器响应函数：

$$D(p_c) = \delta(p_c - p_{c0}) \begin{cases} 1 & |p_c - p_{c0}| < r_k \\ 0 & |p_c - p_{c0}| \geq r_k \end{cases} \quad (7)$$

代入公式(4)，复杂运算后，可得：

$$I(p_s) = \left| [A_1(M_1 p_s) A_2(p_s + M_2 p_c) * T(p_s)] \right|^2 \quad (8)$$

若探测器无偏置，有  $|p_c - p_{c0}| = 0$ ，LSCM 点扩散函数为：

$$A(p) = A_1(M_1 p) A_2(p) \quad (9)$$

则有：

$$I(p_s) = \left| A(p_s) * T(p_s) \right|^2 \quad (10)$$

说明 LSCM 是从点光源传播至点探测的振幅点扩散函数为  $A$  的相干成像系统，\* 为三维卷积符号。推导中的聚光镜参数同物镜，而光的传播方向相

反<sup>[11]</sup>。

## 1.2 基于点扩散函数的空间分辨率影响因素分析

$$v = \frac{2\pi}{\lambda} p \sin \alpha \quad (11)$$

$$u = \frac{8\pi}{\lambda} z \sin^2 \frac{\alpha}{2} \quad (12)$$

用归一化的横向光学坐标公式(11)和轴向光学坐标公式(12)表示公式(9)，则得点扩散函数公式(13)：

$$A(v, u) = A_1(v, u) A_2(v, u) \quad (13)$$

公式(9)经傅里叶变换后，可得 LSCM 系统传递函数：

$$I(v, u) = |A_1(v, u)|^2 |A_2(v, u)|^2 \quad (14)$$

容易推导普通光学显微镜的光强的点扩散函数为：

$$I(v, u) = |A_1(v, u)|^2 \quad (15)$$

理论上，理想的 LSCM 分辨率必然优于普通光学显微镜。实际的共焦系统，探测针孔大小十分关键，设针孔归一化半径  $r_k$ ，则探测器的响应函数  $D(p)$  为：

$$D(p) = \text{circ}\left(\frac{p}{r_k}\right) \quad (16)$$

推导参考公式(6)，可得实际 LSCM 的探测光强：

$$I(p_s) = \left| A_1(M_1 p_s) \right|^2 \left| \left[ A_2(p)^2 * D\left(\frac{p}{M_2}\right) \right] \right| \quad (17)$$

上式也可描述为：

$$I(v, u) = |A_1(v, u)|^2 |A_2(v, u)|^2 * D(v) \quad (18)$$

综上，除去探测点的位置影响探测光强的大小，作为系统参数的针孔半径大小与形状直接影响 LSCM 可探测到的光强信号。与普通显微镜相比，LSCM 的分辨率除了与光学系统的参数、光源参数、探测器参数等有密切关系，针孔参数对仪器系统最终的横向及轴向分辨率也有重要影响<sup>[12-13]</sup>。因此，有些影响测量特性的参数也取决于制造工艺，而非仅仅源自理论，因此测量性能的检验十分重要。

以上推导仅是基于较为理想的 LSCM，对于物镜数值孔径较大的情形以及更具体且复杂的各种测量情形，可参见肖昀等人的研究成果<sup>[13]</sup>。

## 2 计量特性及测试标准器

依据 LSCM 的技术特点，一般认为商用 LSCM 的主要计量特性应至少包括<sup>[5-8]</sup>：(1) 横向光学分辨

率;(2) 轴向光学分辨率;(3) 显微放大倍数;(4) 轴向定位特性 (含轴向位移分辨率);(5) 样品台  $xy$  方向平动的位移准确性, 及  $xy$  两轴方向的正交误差;(6) 其他能够引起测量误差的影响因素(如: 测量重复性、稳定性、温漂等), 可在前 5 项测试过程中, 通过多次测量或不同时间不同状态进行数据比较来获得。如上几种计量特性的量值大小, 既有源自光学原理的, 也有源自仪器设计结构和制造工艺方面, 甚至也是综合影响的结果。

### 2.1 横向光学分辨率

横向光学分辨率是指能够分辨出横向两点或者两线间的最小距离, 取决于物镜数值孔径  $NA$  和光源波长  $\lambda$ 。依据 Rayleigh 准则, 荧光共聚焦或传统光学显微镜的横向分辨率为:

$$d_{xy}=0.61 \lambda/NA \quad (19)$$

或用比  $d_{xy}$  稍小的艾里斑(Airy Disk)的半高宽(FWHM)来表示, 在实验中 FWHM 或更容易测量。

$$FWHM=0.51 \lambda/NA \quad (20)$$

对于针孔直径 (Pinhole ,PH) 大于一个艾里斑 (Airy Unit, AU) 的 LSCM, 即  $PH>1$  AU, 也符合上面公式的描述<sup>[13]</sup>。当  $PH\leq 0.25$  AU 时, LSCM 的点扩散函数更细窄<sup>[14]</sup>, 此时有:

$$FWHM=0.37 \lambda/NA \quad (21)$$

对于透射式荧光共聚焦显微镜, 公式(21)的波长  $\lambda$  为激励光源波长  $\lambda_{ex}$  和荧光波长  $\lambda_{em}$  的平均效应, 此时:

$$\lambda=\sqrt{\frac{2\lambda_{em}\lambda_{ex}}{\lambda_{em}+\lambda_{ex}}} \quad (22)$$

实际系统由于物镜等的光学损耗和影响, 横向分辨率会有所降低。

### 2.2 轴向光学分辨率

轴向光学分辨率通常是指对于 LSCM 是指其在扫描测量时, 共焦光学系统能够感知到被测对象高度发生变化时的最小高度, 很大程度上取决于光源波长  $\lambda$ , 物镜的数值孔径  $NA$ 、样品折射率  $n$ 。

$$d_z=1.40 \lambda n/NA^2 \quad (23)$$

若也用 FWHM 表示, 当  $PH>1$  AU, 则有:

$$FWHM=\frac{0.88\lambda_{ex}}{n-\sqrt{n^2-NA^2}} \quad (24)$$

当  $PH\leq 0.25$  AU 时, 则:

$$FWHM=\frac{0.64\lambda}{n-\sqrt{n^2-NA^2}} \quad (25)$$

与轴向分辨率非常相关且常用表征仪器性能的指标是光学切片厚度 (Optical Slice Thickness, OST)<sup>[14]</sup>:

$$d_z=\frac{0.64\lambda}{n-\sqrt{n^2-NA^2}} \quad (26)$$

它也可用 FWHM 表示, 当  $PH>1$  AU, 有:

$$FWHM=\sqrt{\left(\frac{0.88\lambda_{ex}}{n-\sqrt{n^2-NA^2}}\right)^2+\left(\frac{\sqrt{2}nPH}{NA}\right)^2} \quad (27)$$

以上是 LSCM 在理论上的光学判据, 实际测量系统首先需要位移系统在三维方向上的重复定位精度优于光学分辨率, 至少不大于分辨率的三分之一。其次, 若公式中涉及到材料折射率  $n$  的情形, 会令仪器性能评价变得难以精确复现, 性能测试时也需要酌情尽量消除或降低  $n$  对测量结果的影响。

根据 LSCM 的具体类型和使用领域, 也可参考采用一些逐渐被认可方法和指标去进行分析评价, 例如对于荧光共聚焦显微镜而言, OST 更能体现实用性能, OST 可用荧光珠进行分析, 但是由于荧光饱和度和折射率等的影响, 有时测得的分辨率不够准确, 荧光珠的直径可用溯源后的扫描电镜进行测试。

实际测试中, 被测对象的反射性能对轴向分辨率也有重要影响。作为仪器的一项指标, 轴向分辨率的测试应采用统一的测试标准器和一致的评定方法, 排除因被测对象属性不同或分析方法不同而引起其在量值上差异。为了消除被测对象的影响, 选择品质优异的 1~100 nm 的纳米高度台阶样板进行测试和分析<sup>[15-16]</sup>。这些样板的高度可以通过溯源后的原子力显微镜、X 射线衍射仪或椭圆偏仪等进行定值, 得到台阶高度样板的扩展不确定度最小可达到 0.3~5 nm, 相应包含因子  $k=2$ 。

### 2.3 轴向定位特性

LSCM 除了普通光学显微镜具有的各种平面像差, 也存在空间立体成像误差, 这是由于物镜系统调焦定位系统存在轴向定位误差。轴向定位特性主要由于驱动扫描镜头的轴向位移系统决定, 而非光学系统。例如, 轴向位移分辨率反映的是轴向定位系统的最小位移分辨能力, 它不能低于轴向光学分辨率,

否则无法识别到轴向扫描时的光强曲线的 FWHM。在很多领域 LSCM 系统的轴向位移分辨率被视作为仪器的轴向分辨率,而在 LSCM 光学理论中的轴向分辨率是轴向光学分辨率,或者亦可用概念光学切片厚度来表征。总之,仪器轴向位移分辨率和 LSCM 轴向光学分辨率反映的是仪器的两种不同属性。

仪器的轴向定位特性除了轴向位移分辨率,还应包括:重复定位精度和定位精度等,为了便于测试,常用示值误差表示。若 LSCM 系统轴向定位存在较大误差,仪器常常提供用于修正的比例系数,这样能够提高轴向定位精度。定位系统中还包括位移传感器,它也存在非线性误差、回程误差、重复性误差,这些误差通常难以减小,这些误差的综合结果影响和决定了系统的轴向定位特性。

测试 LSCM 轴向定位特性,可采用系列台阶高度样板来实现,测试时通过移动定位系统获得光强极大值所对应的高度位置,而非计算光学系统的 FWHM。

### 2.4 显微放大倍数

LSCM 和传统显微镜一样具有多个不同放大倍数的物镜,不同的物镜对应不同的放大倍数,但是由于制造和系统装调而引起的偏差等,实际显微放大倍数与理论放大倍数会稍有偏差。另外,物镜驱动系统的非线性和放大比例误差等也使得实际  $x$  方向和  $y$  方向的显微放大倍数存在一定的误差。

物镜的显微放大倍数可以采用标准网格板,目前标准网格板的测量范围可以从小于  $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ ~ $100\text{ mm}\times 100\text{ mm}$  以上,刻线间距从  $0.01\sim 100\text{ }\mu\text{m}$  以上。图 3 是线间隔为  $1.0\text{ }\mu\text{m}$  的网格板,在扫描电子

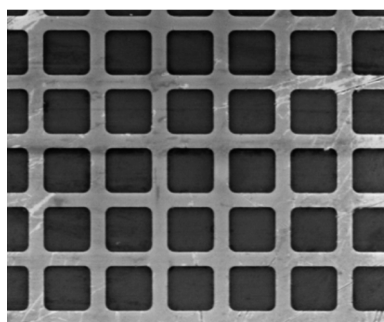


图 3 LSCM 专用线间隔标准板  
Fig.3 Pitch standard for LSCM

显微镜下的观察图样。

这些标准网格板可通过高精度二维线纹计量标准装置、可溯源的扫描电子显微镜等进行溯源,或通过测量和计算衍射光栅级次,实现标准网格板线间隔参数的量值溯源,溯源后网格板线间距的扩展不确定度最小可达到几十纳米甚至亚纳米级<sup>[17]</sup>。

### 2.5 样品台的定位特性

样品台是否具有优异的定位性能,对于 LSCM 而言也十分关键。在扫描样品表面形貌特征时,样品台的  $xy$  方向平动的位移准确性(包括:定位重复性、位移示值的比例误差、俯仰角摆特性等), $xy$  两轴运动方向垂直夹角的正交误差,它们都对测量结果产生直接影响,甚至也包括样品台平面与 LSCM 镜头轴向移动方向垂直正交的角度误差<sup>[18-19]</sup>。

样品台的定位特性可采用激光干涉仪进行测试,目前商用激光干涉仪的线性测量不确定度已经普遍优于  $U=10\text{ nm}+1\times 10^{-6}L$ , $L$  为位移示值,测角不确定度可到  $1''$ ,相应的包含因子  $k=3$ 。也可采用标准网格板进行扫描测试。

## 3 实验分析

### 3.1 横向光学分辨率

可采用光学分辨率检验板,来测试 LSCM 的横向光学分辨率,见图 4。

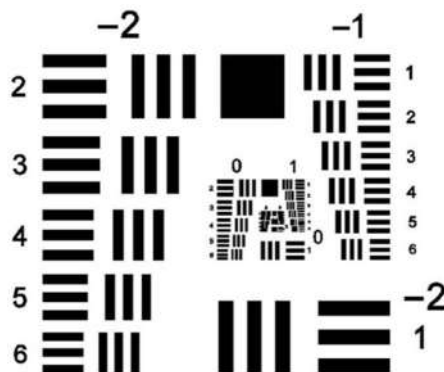


图 4 LSCM 横向分辨率标准板  
Fig.4 Lateral resolution standard for LSCM

对于透射光照明系统,可用负版的光学分辨率检验板。随着纳米压印技术的发展,刻线线宽制造可以达到几个纳米。

测量时,将光学分辨率检测板放置于样品台上,调整  $x$  向  $y$  向运动,选定合适的测量视场,调整  $z$  向

物镜高度进行聚焦,初调光学分辨率检测板至 LSCM 的焦平面,在普通光学显微模式下,找到可以识别的最小图形区域,然后进行扫描测试。

LSCM 的扫描结果较普通显微镜要清晰,但是由于 LSCM 的成像是三维立体的,在判别线宽尺寸时,线宽边缘侧墙的形状也有影响。选用亚微米级线宽,用 LSCM 测得的峰值半高宽 FWHM,来表征横向光学分辨率。

近年来,随着结构光照明等技术的发展,光学显微术的横向光学分辨率越来越高,今后还需要进行更深入的研究。

### 3.2 显微放大倍数测试

LSCM 通常含有多个不同放大倍数的物镜系统可供选择,为了讨论方便,选择物镜放大倍数为最大的情形进行分析。实验发现当线间隔为 1.0 μm 时,得到较清晰图像,如图 5 所示。

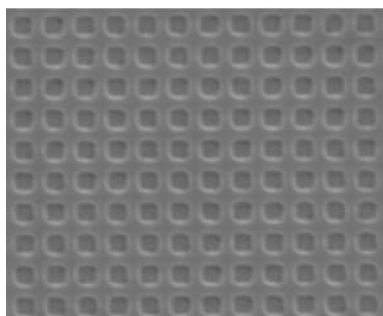


图 5 LSCM 横向分辨率实测图

Fig.5 Lateral resolution test for LSCM

它与实际图形(图 3)有区别,测量图中线宽边缘存在模糊区域,每个小方格变成小圆点,这是受到光学分辨率的影响。

物镜放大倍数的测量是通过扫描并计算视场内网格板像中  $x$ 、 $y$  方向上各条刻线对应边缘的位置  $P_i$ , 得到与网格板的实际边缘的间距  $M$  相比较,取其中最大偏差值  $d_{max}$  与对应标准值的百分比作为比例放大倍数  $N$  的误差  $P$ 。

$$P = \frac{N - M}{M} \times 100 \quad (14)$$

测试时,实际网格板的刻线的边缘不平整,有一定的边缘粗糙度;仪器横向光学分辨率也影响测量结果;网格板放置位置调整不理想也会引入误差。在 100 μm 的视场范围内,不确定度分析见表 1。

表 1 物镜放大倍数测试不确定度分析

Tab.1 Measurement uncertainty analysis of objective magnification

Source of uncertainty	Sensitivity coefficient $c_i$	Uncertainty component $u(x_i)/\mu\text{m}$
Standard grid board	1	0.01
Lateral resolution error	1	0.1
Aiming error	1	0.1
Composite uncertainty		0.15

相应的扩展不确定度约为:  $U=0.30 \mu\text{m}, k=2$ 。

### 3.3 轴向定位特性及轴向光学分辨率测试

采用系列台阶高度样板对轴向定位特性进行测试,见图 6。对轴向定位系统的示值偏差进行分析,算出其示值误差规律。如果示值偏差与示值大小成固定比例变化,也可以按比例进行修正,从而一定程度上提高轴向定位的准确性。

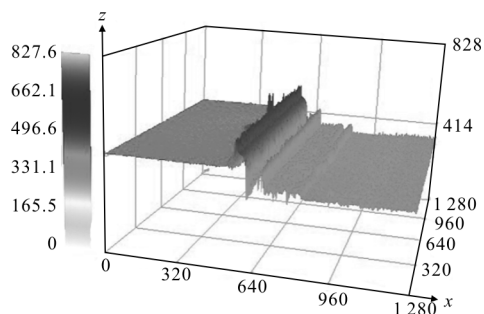


图 6 台阶片测量调焦深度

Fig.6 LSCM focusing depth measurement with step height

表 2 中的 1 000 nm 的台阶高度样板的高度值的扩展不确定度为 5 nm( $k=3$ ),用 nm 为单位的数据

表 2 LSCM 轴向定位特性测量结果

Tab.2 Measurement result of LSCM axial orientation characteristics

Bench height /nm	Measurement mean value/nm	Variation of indication/nm
50±(1)	56	±7
500±(5)	492	±10
1 000±(5)	1 049	±13
4 500±(10)	4 537	±16
10 000±(15)	10 032	±21

1 000±(5) 表示。LSCM 的测量平均值则为 56 nm, 而单次测量值相对其平均值的最大偏差范围为±13 nm; 测量平均值与台阶高度标准值相差了 49 nm, 该示值误差若不进行计量测试, 则很难发现, 也难以判断其量值范围。

轴向光学分辨率测试也以台阶高度仅有几至几十纳米高的台阶样板作被测煤质, 采用 Z 扫描模式, 获得焦点为中心上下移动时的光强曲线, 并计算 FWHM, 再得到相应的轴向光学分辨率或光学切片厚度。

若 LSCM 探测光强信号不易得到, 可采用自动层析扫描进行测量, 这样的情况下或通过扫描台阶高度样板特意制造的台阶边缘的起伏不平区域进行分析。

台阶高度样板的不平区域的形貌数据用分辨率更高的仪器, 例如原子力显微镜等, 先进行扫描, 然后将二者的微区数据进行比较, 也能大致分析出仪器的轴向光学分辨率。若台阶高度为 50 nm, 台阶处再设计几纳米或十几纳米的沟槽, 如果在扫描成像图中都能清晰可见, 则分辨率可达到几个纳米, 见图 6。

### 3.4 样品台性能测试

通过修正示值比例系数和  $x$ 、 $y$  方向夹角可以提高 LSCM 的测量准确性, 而有些误差特性的属性比较固定, 则不能再进行修正。采用激光干涉仪对样品台的  $x$  方向和  $y$  方向在(100  $\mu\text{m}$ ×100  $\mu\text{m}$ )范围的位移和俯仰角摆特性进行测试, 测试结果见表 3。

表 3 样品台性能测试

Tab.3 Performance test of sample platform

Test item	Movement direction	Measurement value
Repeatability positioning accuracy / $\mu\text{m}$	$x$	0.135
	$y$	0.147
Proportionality factor of indicating value	$x$	1.019
	$y$	1.026
Angle pitch/( $^{\circ}$ )	$x$	9.2
	$y$	9.6
Angle deflection/( $^{\circ}$ )	$x$	8.7
	$y$	8.2
Included angle of $x$ and $y$ /( $^{\circ}$ )	$\alpha$	89.4

## 4 结 论

文中通过分析 LSCM 的成像原理, 研究了实际 LSCM 系统的轴向光学分辨率和横向光学分辨率等的影响因素和作用模式; 然后进一步设立了一套检验 LSCM 计量特性的参数体系和参数指标; 同时提出相应的性能测试方案, 包括采用亚微米级线间隔的网格板等作为标准器, 实现了 LSCM 的放大倍数和横向光学分辨率的测试; 通过纳米级高度台阶样板实现了 LSCM 的轴向位移分辨率和轴向定位特性的测试; 通过激光干涉仪实现了样品台工作性能的测试等。目的是给出了一套 LSCM 系统的计量特性测试方法, 以满足当前普遍应用的激光扫描共聚焦显微镜的性能测试需求。其中, 横向光学分辨率的测试方法还有进一步完善的空间, 例如参考适用于传统显微镜的分辨率板, 研制图形更微小的分辨率板, 或者研制可适用于多种三维扫描测量仪器的纳米级三维分辨率板, 使得分辨率测试更精准, 使相应评估方法更科学。

有时 LSCM 配套计算机的图形显示分辨率也会影响测量的准确性, 这需要软件程序进行合理匹配。

不同厂家生产不同系列的 LSCM, 相应的功能和特色指标也有所差异, 除了必要的技术指标, 有时对一些特色指标也可参照厂家验收标准等技术资料进行增项测试, 最终才能够有效保证所用 LSCM 处于良好工作状态。

### 参考文献:

[1] Mao Heng, Tao Louis, Chen Liangyi. Application and development of adaptive optics to three-dimensional in vivo deep tissue fluorescent microscopy [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2016, 45(6): 0602001. (in Chinese)  
毛珩, Tao Louis, 陈良怡. 自适应光学技术在深层动态荧光显微成像中的应用和发展 [J]. 红外与激光工程, 2016, 45(6): 0602001.

[2] Zhou Xiaoqin, Hou Qiang, Liu Qiang, et al. Research status and tendency of measurement techniques for geometric features of micro/nano structures [J]. *Journal of Beijing University of Technology*, 2015, 41(3): 327-339. (in Chinese)  
周晓勤, 侯强, 刘强, 等. 微纳结构几何特征检测技术的研究现状与发展趋势 [J]. 北京工业大学学报, 2015, 41(3): 327-339.

- [3] Qiu Lirong, Zhao Weiqian, Wang Xu, et al. Error analysis for a laser differential confocal radius measurement system [J]. *Applied Optics*, 2015, 54(5): 1078–84.
- [4] Cui Jianjun. Lateral resolution test for confocal laser scanning microscope [J]. *Key Engineering Materials*, 2014, 609–610(11): 1159–1164.
- [5] Giusca C L, Leach R K. Calibration of the Metrological Characteristics of Imaging Confocal Microscopes (ICMs)[M]. Britain: National Physical Laboratory, 2012: 17–62.
- [6] Beraldin J A, Mackinnon D, Courmoyer L. Metrological characterization of 3D imaging systems: progress report on standards developments [J]. *Anatomical Record*, 2015, 151(2): 107–117.
- [7] Liu Jian, Li Mengzhou, Li Qiang, et al. Decoupling criterion based on limited energy loss condition for groove measurement using optical scanning microscopes [J]. *Measurement Science & Technology*, 2016, 27(12): 125014.
- [8] Liu Jian, Gu Kang, Li Mengzhou, et al. 3D measurement decoupling criterion in optical microscopy [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2017, 46(3): 0302001. (in Chinese)  
刘俭, 谷康, 李梦周, 等. 光学显微三维测量解耦合准则[J]. *红外与激光工程*, 2017, 46(3): 0302001.
- [9] Li Yao, Yang Yongying, Wang Chen, et al. Point diffraction in terference detection technology [J]. *Chinese Optics*, 2017, 10(4): 391–414. (in Chinese)  
李瑶, 杨甬英, 王晨, 等. 点衍射干涉检测技术[J]. *中国光学*, 2017, 10(4): 391–414.
- [10] Cole R W, Jinadasa T, Brown C M. Measuring and interpreting point spread functions to determine confocal microscope resolution and ensure quality control [J]. *Nature Protocols*, 2011, 6(12): 1929–1941.
- [11] Xiao Yun, Zhang Yunhai, Wang Zhen, et al. Effect of incident laser on resolution of LSCM [J]. *Optics and Precision Engineering*, 2014, 22(1): 31–38. (in Chinese)  
肖昉, 张运海, 王真, 等. 入射激光对激光扫描共聚焦显微镜分辨率的影响[J]. *光学精密工程*, 2014, 22(1): 31–38.
- [12] Yu Qing, Yu Xiaofen, Cui Changcai, et al. Survey of parallel light source technology in parallel confocal measurement [J]. *Chinese Optics*, 2013, 6(5): 652–659. (in Chinese)  
余卿, 余晓芬, 崔长彩, 等. 并行共焦测量中的并行光源技术综述[J]. *中国光学*, 2013, 6(5): 652–659.
- [13] Zeiss M F C. Confocal laser scanning microscopy [J]. *Journal of Microscopy*, 1995, 178(3): 261–266.
- [14] Cui Jianjun, Gao Sitian. Nanometer film thickness metrology and traceability based on grazing incidence X-ray reflectometry [J]. *Acta Physica Sinica*, 2014, 63(6): 060601. (in Chinese)  
崔建军, 高思田. 基于 X 射线掠射法的纳米薄膜厚度计量与量值溯源研究[J]. *物理学报*, 2014, 63(6): 060601.
- [15] Cui Jianjun. Study on metrological traceability through fabry-perot laser interferometer or atomic lattice spacing for micro displacement measurement [D]. Tianjin: Tianjin University, 2014. (in Chinese)  
崔建军. 基于 Fabry-Perot 干涉与原子晶格间距的微小位移计量及溯源研究[D]. 天津: 天津大学, 2014.
- [16] Zhang Mingkai, Gao Sitian, Lu Rongsheng, et al. Ultraviolet scanning linewidth measuring system [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2015, 44(2): 625–631. (in Chinese)  
张明凯, 高思田, 卢荣胜, 等. 紫外扫描线宽测量系统的研究[J]. *红外与激光工程*, 2015, 44(2): 625–631.
- [17] Sun Licun, Meng Weidong, Li Qiang, et al. Calculation and measurement of depth of field for microscope equipped with electronic ocular [J]. *Optics and Precision Engineering*, 2013, 21(5): 1151–1159. (in Chinese)  
孙丽存, 孟伟东, 李强, 等. 电子目镜显微镜景深的确定与测量[J]. *光学精密工程*, 2013, 21(5): 1151–1159.