



二向色分光镜的平整度与反射波前畸变

王振才 北京鼎信优威光子科技有限公司

在一些高级显微镜应用中，例如超分辨成像、TIRF 单分子成像等，一个不容忽视的问题：二向色分光镜由于平整度的问题产生的反射波前畸变！但是，往往这些应用的研究者都不是特别懂光学原理这块。因此，实验做了之后结果不好，却不知道为什么。尤其是在构建方法的过程中，没有专业老师指导是非常痛苦的。话不多说，如果您是做材料或是生物专业的，有超分辨成像、TIRF 单分子成像相关的应用，那您往下瞧着。

Reflected wavefront error (RWE): 反射波前误差

Transmitted wavefront error (TWE): 透射波前误差

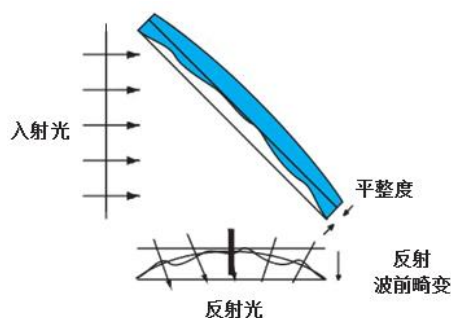
首先，我们在说平整度的时候说的是二向色镜的平整度，今天我们较的是二向色镜的真儿。二向色分光镜的平整度不好，会产生波前畸变。其中包括透射波前畸变和反射波前畸变两种。其中，重点是反射波前畸变。

对于透射光，除了光束轴的轻微位移之外，这种弯曲对透射波前误差 (TWE) 的影响很小。

然而，对于反射光，尤其是非垂直角度的入射光，与平面的偏差（见图 1）对反射波前误差 (RWE) 有两个影响：

- (1) 焦平面可能偏移位置，
- (2) 光束可能引起光学像差（例如像散）。

波前畸变会降低对比度或降低分辨率，从而降低图像质量。



图[1]: 光线以一定角度入射到二向色分光镜上，平坦度的偏差会导致反射波前误差

在几个显微镜应用中，减小波前畸变对于实现显微镜方法是至关重要的。指定和选择使波前像差最小化的光学滤光片对于最大化光学系统性能是重要的。

本文阐述如何选择用于高性能显微镜方法的光学滤光片，并提供关于 Semrock 滤光片平整度&波前畸变的指导。

- **首先，造成波前畸变的原因是什么？**

滤光片通常由平面上的多层薄膜涂层和平行的玻璃基片衬底组成。衬底平整度存在变化，另外，溅射薄膜对玻璃和熔融石英基片施加应力，并使它们弯曲成不同的曲率度。

如何最大限度地控制表面曲率？

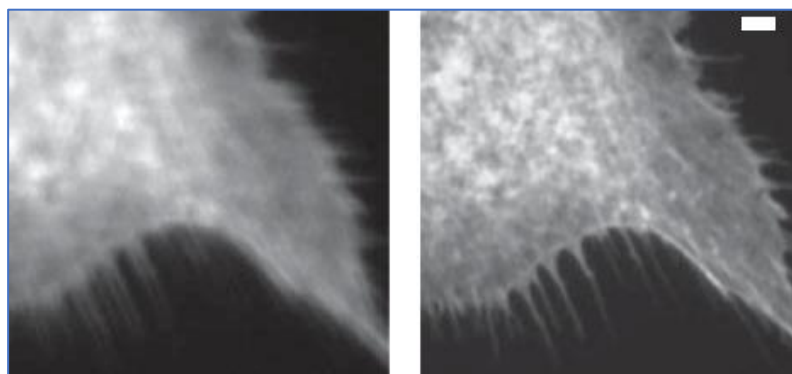
一、专有的制造方法

二、使用较厚的基材；

这些较厚的基材可提供较大的刚度，因此对由这些涂层施加的应力具有更大的抵抗力。

- **其次，波前畸变会造成什么样的影响？**

在一些显微镜方法中，可以通过镜头或照相机调整来校正焦平面偏移，但是在其他情况下，这种偏移不能被调整，并且因此可能妨碍适当的功能。另外值得关注的是，光学像差会降低图像质量，如图[2]所示，并可能影响显微镜的方法。



曲率半径： ~6

~1275

图[2]：图像序列显示基板弯曲对图像质量的影响。较低的曲率半径意味着较大的基板弯曲。随着曲率半径减小（并且弯曲增加），图像质量下降。在 BX41 显微镜 (Olympus Corporation of the Americas, Center Valley, PA, USA) 上成像的牛肺动脉内皮细胞中的 F-肌动蛋白的图像 (FluoCells®Prepared Slide #1, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) 一个 40×, 0.75NA 物镜和 Retiga 相机 (QImaging, Surrey, BC, 加拿大)]

- **最后，哪些应用需要考虑波前畸变问题以及解决方案？**

由于成像质量的潜在退化，确定何时二向色分光镜的平整度对于显微镜方法是关键的是重要的。

表[1]列出了流行的显微镜技术的例子，其中关键的是具有高平整度的二色性。如本表所示，高平整度要求可适用于照射（激发）和检测（发射）光路。

表 1: 几种流行显微镜技术中需要考虑 反射波前平整度 (RWE)

显微镜技术	平整度&反射波前畸变 (激发)	平整度&反射波前畸变 (发射)
宽场荧光显微镜	非-关键	关键
全内反射荧光 (TIRF)显微镜	关键	关键
随机切换重构显微镜 (PALM, STORM, etc.)	关键	关键
受激发射损耗 (STED) – 脉冲显微镜	关键	非-关键
共聚焦单点扫描显微镜	关键	非-关键
多激光束应用显微镜	关键	无应用

在确定对于给定应用的合适的平整度需求中，最重要的参数通常是照射到二向色分光镜表面的光束的直径。表 2 显示了最适合应用的 Semrock 二向色镜产品，及**最大光束直径值**的要求。

表 2: Semrock 平整度/ RWE 分类以及推荐的二向色分光镜信息以及最大允许光束直径值

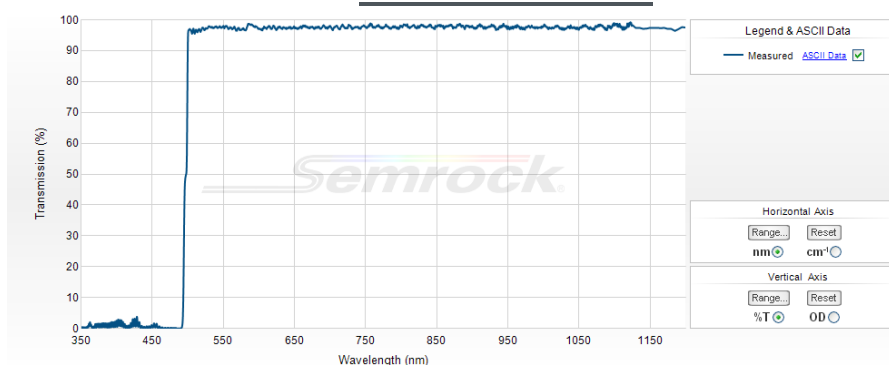
平整度 /RWE 分类	应用	曲率半 径	最大反射光束 直径, mm	RWE (632.8nm) PV	二向色镜系列; 型号举 例
超分辨 /TIRF	TIRF, PALM, STORM, STED	~1275m	22.5	<0.2λ	BrightLine Laser (Di03-R405-t3-)
		~255m	10	<1λ	BrightLine Laser (Di03-R405-t1-)
分通道 成像	对一个像素上的发射信 号, 分通道检测	~1275m	37	<0.2λ	BrightLine Image- splitting (FF509-FDi02-t3-)
		~100m	10	<2λ	BrightLine Image- splitting (FF509-FDi01-)
激光器	共聚焦, 多光束 (分离/同 步)	~30m	2.5	<6λ	BrightLine Laser (Di02-R405-) RazorEdge* (LPD01-488RU-) Laser MUX™ (LM01-503-)
标准 Epi 荧 光	宽场荧光	~6m	无应用	>>6λ	BrightLine (FF495-Di03-)

好像还是没说清楚，来，举个栗子！



488 nm laser BrightLine®
single-edge super-resolution / TIRF dichroic
beamsplitter

Part Number: Di03-R488-t1-25x36



主要参数--平整度：

反射波前误差（1 毫米厚） <1λPV **RWE** at 632.8 nm

反射波前误差（3 毫米厚） <0.2λPV **RWE** at 632.8nm

补充：我们测量的表面平整度参数被称为“峰 - 谷”（P-V）变形，并且以“波/英寸”（或 λ / inch ）表示，一般在 632.8nm，通过激光干涉仪测量确定。试图达到严格的平坦度规格时，直径（通光孔径）和基材厚度最为重要...涂层厚度是次要的。

上文已经说了，平整度主要与厚度有关。平整度越高，厚度就越厚。这里，平整度分两个级别，用反射波前误差来表示：<1λPV（1 毫米厚）的和 <0.2λPV（3 毫米厚）的。

Semrock 的超分辨率/ TIRF 二向色镜有两种厚度可供选择，可提供业界领先的平整度，使激光束斑点的焦点偏移和光学波前像差最小化。对于流行的成像和超分辨率技术，如 TIRF, PALM, STORM, 结构照明和 STED, 这绝不是简单的一个广告, It's useful absolutely!

关于平整度更多内容，可参考：

https://www.semrock.com/technical-faq.aspx#FAQ_13

<https://www.semrock.com/white-papers.aspx>