

# 利用衍射光学元件调制轴对称偏振光提高荧光显微镜纵向分辨率

曹国威<sup>1</sup> 李永平<sup>2</sup> 毕国强<sup>3</sup>

<sup>1</sup>中国电子科技集团第三十八研究所光电集成研究中心, 安徽 合肥 230088  
<sup>2</sup>中国科学技术大学物理学院, 安徽 合肥 230026; <sup>3</sup>中国科学技术大学生命科学学院, 安徽 合肥 230026

**摘要** 利用荧光蛋白激活状态的可逆特性, 提出了一种提高荧光显微镜纵向分辨率的方法。针对不同数值孔径的显微系统, 通过合理选择带涡旋相位的轴对称偏振光作为激活光和退活光, 并设计衍射光学元件对其进行调制, 从而实现百纳米级的纵向选择激活。而且, 通过调节激活光和退活光的光强比率  $R$ , 可以控制荧光蛋白最大激活概率满足单分子荧光显微技术的需求, 同时进一步降低纵向选择激活层半峰全宽 (FWHM) 至 25.7 nm, 并且约 90% 的激活荧光蛋白位于 30 nm 厚的激活层中 ( $R=500$ )。

**关键词** 衍射光学; 超分辨成像; 纵向选择激活; 轴对称偏振光

中图分类号 O436.1 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL201340.0410001

## Improve Axial Resolution of Fluorescent Microscopy Using Cylindrical Vector Beams Modulated by Diffractive Optical Elements

Cao Guowei<sup>1</sup> Li Yongping<sup>2</sup> Bi Guoqiang<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Optical-Electronic Integration Research Center, China Electronics Technology Group Corporation  
No. 38 Research Institute, Hefei, Anhui 230088, China

<sup>2</sup>School of Physical Sciences University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China

<sup>3</sup>School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China

**Abstract** A novel method to improve the axial resolution of fluorescent microscopy using photo-switching characteristics of fluorescent protein is proposed. For microscopy with different numerical apertures, a 100-nm axially-selective-activation is achieved by using cylindrical vector beams with vortex phase as activation and deactivation beams which are modulated by designed diffractive optical elements. Furthermore, adjusting the power ratio  $R$  of the activation beam and deactivation beam will make the maximum activation probability of fluorescent protein suitable for single-molecule microscopy. The numerical calculation based on Cy5 demonstrates that along the  $z$  axis the activation probability has a single peak with full-width at half-maximum (FWHM) of only 25.7 nm and about 90% of activated molecules are located in a 30-nm-thick layer around zero point (for  $R=500$ ).

**Key words** diffractive optics; super-resolution imaging; axially-selective-activation; vector beam

**OCIS codes** 050.1970; 100.6640; 180.2520

## 1 引言

为了突破衍射极限, 科学家们开发了一系列显微技术, 比如 X 射线显微镜<sup>[1]</sup>、电子显微镜<sup>[2]</sup>、原子力显微镜<sup>[3]</sup>和近场扫描光学显微镜<sup>[4]</sup>等, 对于生命科学来讲, 可见光波段的远场荧光显微镜具有非接触、无损伤和可探测样品内部的优势。2006 年 Bietzig 等<sup>[5]</sup>提出了光敏定位显微镜 (PALM), 实现

了一个衍射限制区域 (DLR) 内高达  $10^4 \sim 10^5 \mu\text{m}^{-2}$  的标记密度, 其图像横向分辨率约为 20 nm。Rust 等<sup>[6]</sup>提出了随机光学重构显微镜 (STORM), 更是实现了三维超衍射极限成像。在用上述超分辨率成像技术观测厚样本时, 纵向分辨率一般要落后于横向分辨率。为了解决这个问题, 可以利用荧光蛋白的可逆转换性质, 实现纵向选择激活。Chen 等<sup>[7]</sup>利

收稿日期: 2012-12-10; 收到修改稿日期: 2012-12-18

作者简介: 曹国威 (1987—), 男, 博士, 工程师, 主要从事衍射光学元件方面的研究。E-mail: cgw2003@mail.ustc.edu.cn

用两束经过调制的驻波进行非相干叠加,使得只有纵向很薄区域内的分子被激活,从而进一步提高纵向分辨率。但是上述方法中需要采用4束激光,实验装置的设置也比较繁琐。为了解决这个问题,本文利用经过衍射光学元件(DOE)调制的轴对称偏振光,可以很方便地实现纵向选择激活,选择激活层厚度最小可以达到25.7 nm,为进一步重构超分辨图像提供了很好的基础。

## 2 背景介绍

### 2.1 纵向选择激活

单分子定位显微技术中采用的荧光蛋白一般采用激活光照射从而激活进入荧光态,并利用特定波长的激光激发从而发出荧光,随后被漂白光照射,使被激发荧光的蛋白不再被激活。但是有些荧光蛋白可以在荧光态和非荧光态间可逆切换,比如Cy5和Alexa 647等,激活光可以使上述荧光蛋白转换为荧光态,而退活光则反之。文献[7]中采用驻波荧光显微技术(SWFM),利用两束激活光干涉形成激活光驻波场,并采用两束退活光干涉形成退活光驻波场,其光场可以表示为

$$\begin{aligned} I_{\lambda_i} &= I_i [1 + R_i \cos(2k_i z \cos \theta_i + \varphi_i)], \\ k_i &= 2n_i \pi / \lambda_i, \end{aligned} \quad (1)$$

式中*i*表示两束驻波,当*i* = 1时为激活光,当*i* = 2时为退活光,*I<sub>i</sub>*为常数,*R<sub>i</sub>*为光强比率,取决于干涉光振幅的比率, $\lambda_i$ 为波长,*n<sub>i</sub>*为折射率。

因为激活率和退活率与光强呈线性关系,分别为  $k_{\text{on}} = \eta_1 I_{\lambda_1}$ ,  $k_{\text{off}} = \eta_2 I_{\lambda_2}$ , 所以此光场中荧光蛋白保持在激活态的概率为

$$p = \frac{1}{1 + \frac{\eta_2 I_{\lambda_2}(z)}{\eta_1 I_{\lambda_1}(z)}}. \quad (2)$$

利用这个方法,通过调整两束激光的光强比和入射角度,可以使纵向激活层仅有100 nm。

由此可以想到,实现纵向选择激活的更直接的方法是选择两束光分别作为激活光和退活光,其中激活光的聚焦场要求在焦点附近的横向分布和纵向分布都尽量均匀,而退活光则可以采用一种中空的光场分布。上述两种光场都可以利用轴对称偏振光来实现。

### 2.2 轴对称偏振光

轴对称偏振光是一种矢量偏振光束,其偏振及相位在光束横截面上呈轴对称分布,一般的轴对称光可以描述为

$$\mathbf{E}(r, \varphi) = l_0 P(r_i) (\hat{\mathbf{r}} \cos \phi_0 + \hat{\boldsymbol{\phi}} \sin \phi_0), \quad (3)$$

式中  $l_0$  为入瞳平面内振幅的极值,  $\phi_0$  表示偏振方向与径向夹角,  $\hat{\mathbf{r}}$  和  $\hat{\boldsymbol{\phi}}$  分别表示径向和角向单位矢量,  $P(r_i)$  为透镜孔径函数。入射光束束腰位置与透镜入瞳平面重合,并假定聚焦透镜满足正弦条件  $r_i/f = \sin \theta$ ,  $r_i$  为入射光束径向坐标,  $f$  为透镜焦距,  $\theta$  表示波矢与光轴之间的夹角。入射光束振幅分布满足贝塞尔-高斯分布,即  $P(r_i) = J_n(\beta r_i) \exp(-r_i^2/\omega_0^2)$ , 式中  $J_n$  是第一类  $n$  阶贝塞尔函数,  $\omega_0$  表示基模高斯光束的束腰半径,  $\beta$  为常数因子,决定了振幅分布。对下文中计算所采用的径向偏振光而言,  $n = 1$ , 并选取  $\beta\omega_0 = 2$ 。

在强聚焦条件下,轴对称光的聚焦场为<sup>[8]</sup>

$$\mathbf{E}_f = \begin{bmatrix} E_r \\ E_\phi \\ E_z \end{bmatrix} = A \int_0^{\theta_{\max}} P(\theta) \begin{bmatrix} \cos \phi_0 \cos \theta \cdot J_1(kr \sin \theta) \\ \sin \phi_0 \cdot J_1(kr \sin \theta) \\ i \cos \phi_0 \sin \theta \cdot J_0(kr \sin \theta) \end{bmatrix} \sin \theta \exp(ikz \cos \theta) d\theta, \quad (4)$$

式中  $A = \pi l_0 f / \lambda$ ,  $k = 2\pi / \lambda$ ,  $P(\theta)$  为透镜的切趾函数,  $P(\theta) = P(r_i) \sqrt{\cos \theta}$ 。

采用环带状 DOE 对轴对称光进行调制, DOE 的透射率为

$$T(\theta) = \begin{cases} T_1, & \theta_{\min} \leq \theta < \theta_1 \\ T_2, & \theta_1 \leq \theta < \theta_2 \\ \vdots & \vdots \\ T_N, & \theta_{N-1} \leq \theta < \theta_{\max} \end{cases}, \quad (5)$$

式中  $\theta_{\max} = \arcsin(NA)$ , 单位为弧度,  $NA$  为数值孔径。对于径向偏振光来讲,通过合理设置 DOE 的

环带结构,其聚焦场分布如图1(a)和(b)所示,为一中空的“光泡”结构,可以选择作为退活光场。图1中所示“光泡”结构的产生主要取决于 DOE 结构,而与偏振模式没有必然联系,所以通过设计 DOE 调节线偏振光也可以获得“光泡”结构,但是其分布不再是轴对称的,而会在原偏振方向上拉长,如图1(c)和(d)所示,这样对后续提高横向分辨率是不利的,所以主要针对轴对称偏振光进行讨论。

为了获得符合要求的激活光场,可以在轴对称偏振光中引入涡旋相位,则其入射光场变为

$$\mathbf{E}(r, \phi) = E_0(r) (\cos \phi_0 \cdot \hat{\mathbf{r}} + \sin \phi_0 \cdot \hat{\boldsymbol{\phi}}) \exp(im\phi), \quad (6)$$

式中  $m$  表示拓扑数。相应的聚焦场经计算可得为<sup>[9]</sup>

$$\mathbf{E}_f = \begin{bmatrix} E_r \\ E_\phi \\ E_z \end{bmatrix} = A \cdot i^m \cdot \exp(im\phi) \int_0^{\theta_{\max}} P(\theta) \begin{bmatrix} i \cos \phi_0 \cos \theta \cdot (J_{m+1} - J_{m-1}) - \sin \phi_0 (J_{m+1} + J_{m-1}) \\ \cos \phi_0 \cos \theta \cdot (J_{m+1} + J_{m-1}) + i \sin \phi_0 (J_{m+1} - J_{m-1}) \\ 2 \cos \phi_0 \sin \theta \cdot J_m \end{bmatrix} \sin \theta \exp(ikz \cos \theta) d\theta. \quad (7)$$

采用带涡旋相位 ( $m=1$ ) 的径向偏振光, 其焦点处光强分布为如图 2 所示, 其纵向和横向分布都比较均匀, 可以选作激活光。

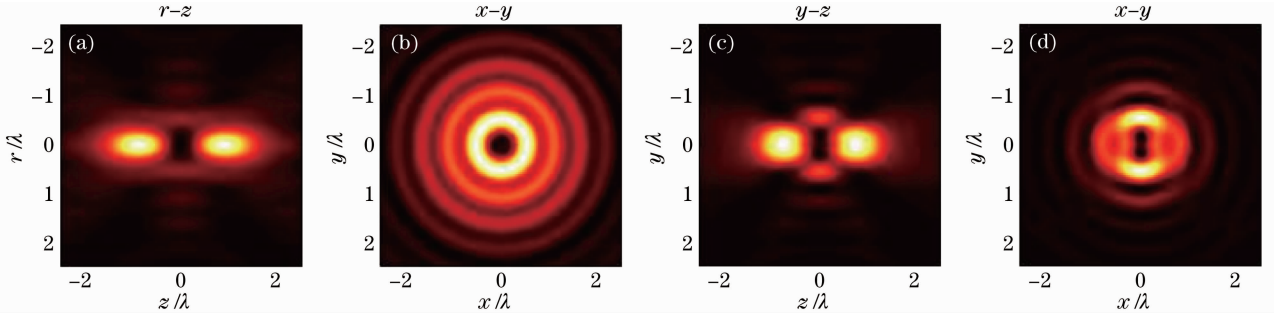


图 1 (a), (b) 径向偏振光和 (c), (d) 线偏振光产生三维“光泡”

Fig. 1 3D “optical bubble” created by (a), (b) radially polarized and (c), (d) linearly polarized beams

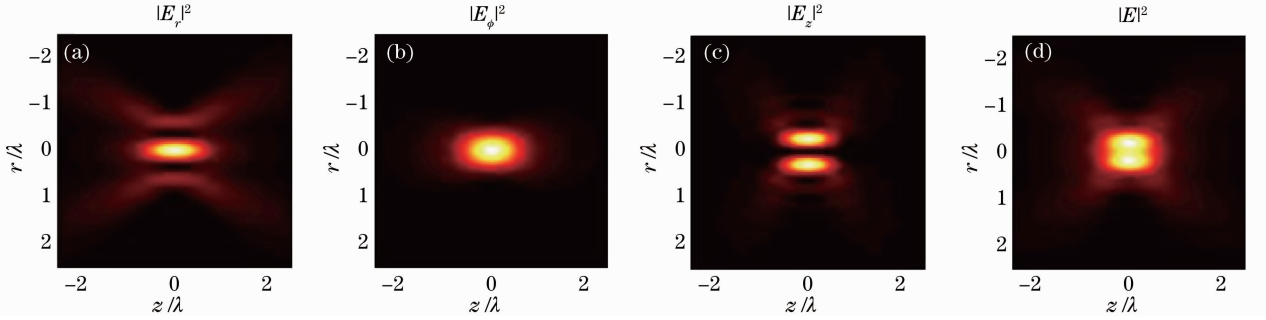


图 2 带涡旋相位 ( $m=1$ ) 的径向偏振光在焦点附近的光强分布。(a)  $|E_r|^2$ ; (b)  $|E_\phi|^2$ ; (c)  $|E_z|^2$  和 (d)  $|E|^2$

Fig. 2 Intensity distributions around focus of radially polarized beam with vortex phase ( $m=1$ ). (a)  $|E_r|^2$ ; (b)  $|E_\phi|^2$ ; (c)  $|E_z|^2$ ; (d)  $|E|^2$

如上所述, 采用轴对称偏振光作为激活光和退活光, 并合理地选择偏振模式和涡旋相位拓扑数, 通过优化调节 DOE 的参数, 便可以实现高精度的纵向选择激活。

### 3 不同数值孔径成像系统讨论

要观测的实验样本采用 Cy5 标记, 相应的激活光波长  $\lambda_{\text{act}} = 514 \text{ nm}$ , 退活光波长  $\lambda_{\text{deact}} = 647 \text{ nm}$ , 二者比率  $\lambda_{\text{deact}}/\lambda_{\text{act}} = 1.26$ , 以下图中的坐标均以激活光波长为单位。激活率响应参数和退活率响应参数分别为  $\eta_{\text{act}} = 0.2667$  和  $\eta_{\text{deact}} = 0.3636$ 。

荧光蛋白保持激活态的概率可以表述为

$$p = \frac{1}{1 + \frac{\eta_{\text{deact}} I_{\text{deact}}(z)}{\eta_{\text{act}} I_{\text{act}}(z)}}. \quad (8)$$

由(8)式可知, 只需要调制两束轴对称偏振光, 获得合适的焦面光场分布  $I_{\text{act}}(z)$  和  $I_{\text{deact}}(z)$ , 就可以使  $p-z$  分布在  $z=0$  附近(即焦点前后)足够窄, 从而使得纵向上只有很薄的样本被激活。下面针对不同数值孔径的显微成像系统分别进行讨论。

#### 3.1 $NA=1$ 的成像系统

对  $NA=1$  的显微系统, 设置光束参数如下: 激活光为拓扑数  $m=1$  的带涡旋相位的径向偏振光, 而退活光为 DOE 调制的径向偏振光, 并选取退活光强与激活光强比率  $R=60$ 。DOE 采用 3 环带结构, 其透射率函数为

$$T(\theta) = \begin{cases} -1, & 0 \leq \theta < 0.7854 \\ 0, & 0.7854 \leq \theta < 1.1153 \\ 1, & 1.1153 \leq \theta < \theta_{\max} \end{cases} \quad (9)$$

此设定下的焦面附近光场分布和荧光激活态概

率  $p$  分布如图 3 所示,其中  $p$  分布在  $z=0$  附近为单峰分布,其半峰全宽(FWHM)  $\omega_{1/2}=66.8$  nm。

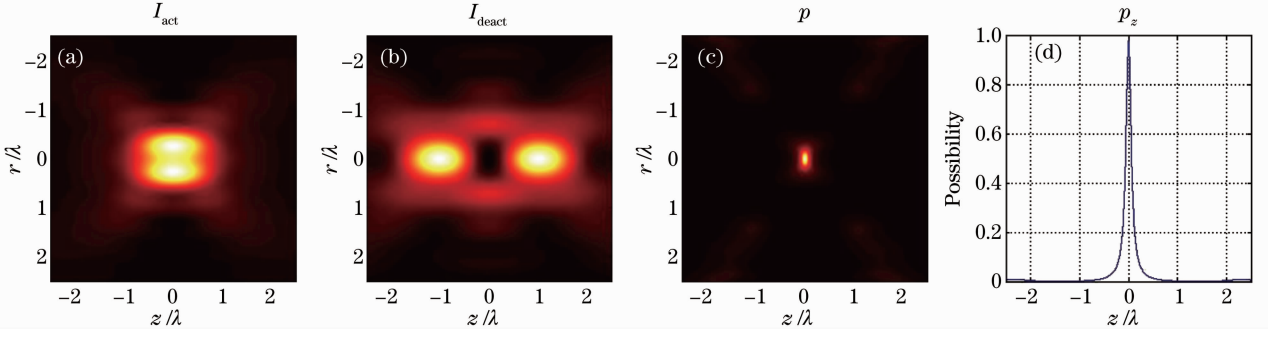


图 3 NA=1 时焦面附近光场分布。(a) 激活光;(b) 退活光;(c) 荧光分子激活态概率  $p$  的分布;  
(d)  $p$  随纵向距离  $z$  的变化

Fig. 3 Intensity distributions of (a) activation beam and (b) deactivation beam around focus; (c) distribution of activation probability and (c) that along the  $z$  direction with  $NA=1$

$R=60$  时,  $\omega_{1/2}=66.8$  nm, 此时有 90% 的激活态蛋白集中在 80 nm 厚的样本内, 如图 4(b) 所示。也可以通过增大  $R$  来得到更小的 FWHM, 如图 4(a) 所示。当  $R$  增大至 500 时, FWHM 可以达到 25.7 nm, 已经接近 STORM 可以达到的最大  $z$  向分辨率, 同时

约有 90% 的激活态蛋白集中于 30 nm 厚的样本内。此外, 基于 PALM 技术的显微成像一般要求每次采集的图像中荧光蛋白分布要足够稀疏, 所以激活概率不宜过大, 虽然本设定中  $p_{\max}$  可以通过增大  $R$  来降低, 但最小也超过了 85%, 仍需进一步优化设计。

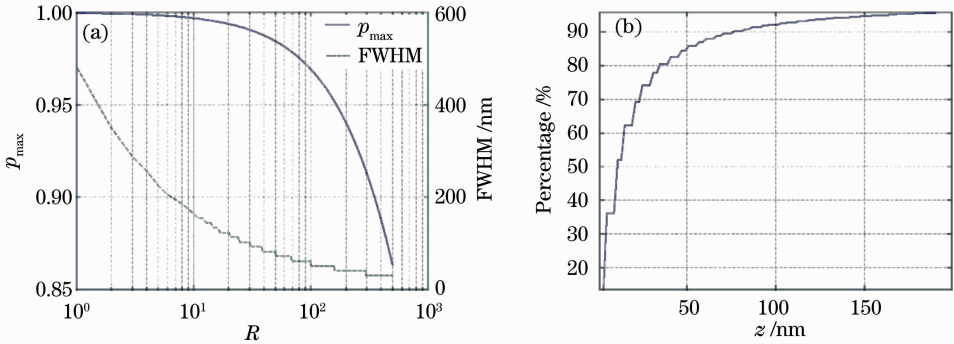


图 4 NA=1 时(a) 概率最大值  $p_{\max}$  和概率分布的 FWHM 随  $R$  的变化;(b) 激活态荧光蛋白总数(百分比)沿样本厚度  $z$  的分布( $R=60$ )

Fig. 4 (a)  $p_{\max}$  and FWHM as functions of the power ratio  $R$ ; (b) plot of percentage of total activated molecules in the central peak as a function of occupied thickness  $z$  ( $R=60$ ).  $NA=1$

### 3.2 数值孔径 $NA=1.3$ 的成像系统

对于显微系统中一般采用的浸没式透镜, 其  $NA$  一般大于 1, 下面以  $NA=1.3$  的系统为例进行讨论。激活光与退活光的选择不变,  $R=60$ , 而 DOE 的设定修改为 4 环带结构, 其透射率函数为

$$T(\theta) = \begin{cases} 1, & 0 \leq \theta < 0.3 \\ -1, & 0.3 \leq \theta < 0.39 \\ 1, & 0.39 \leq \theta < 0.95 \\ -1, & 0.95 \leq \theta < \theta_{\max} \end{cases} \quad (10)$$

这种设定下可以获得的荧光蛋白激活概率分布如图 5 所示,  $p_{\max}=63.09\%$ ,  $\omega_{1/2}=71.96$  nm。90% 的激活态蛋白集中于 120 nm 厚的样本内, 如图 6(b) 所示。

改变  $R$  可以控制  $p_{\max}$  和  $\omega_{1/2}$ , 如图 6(a) 所示, 可见随着  $R$  的增大,  $p_{\max}$  和  $\omega_{1/2}$  均呈下降趋势,  $R=500$  时,  $\omega_{1/2}=51.4$  nm,  $p_{\max}=17.02\%$ , 此激活概率可以基本满足 PALM 实验的要求。进一步改变第一环带位置为 0.1, 在  $R=500$  时,  $\omega_{1/2}=73.0$  nm,  $p_{\max}=7.83\%$ , 可见通过优化 DOE 结构, 激活概率分布仍有进一步的优化空间。

由上述讨论可知, 针对不同的应用环境, 如显微系统的  $NA$  不同, 通过选择合适的轴对称偏振光, 设计相应的 DOE 环带结构, 并根据需求调节光强比  $R$ , 可以实现在  $z$  向精确选择激活荧光分子, 且其激活精度在几十纳米以内, 为进一步重构超分辨图像提供了很好的基础。

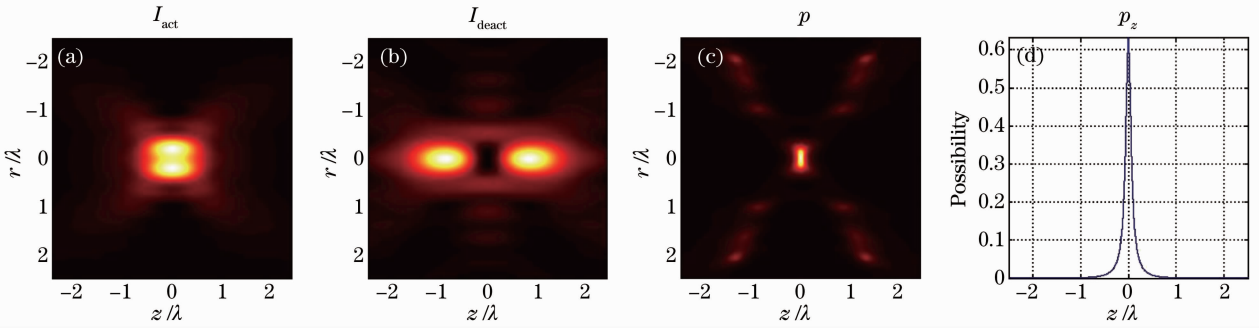


图5  $NA=1.3$  时焦面附近光场分布。(a)激活光;(b)退活光;(c)荧光分子激活态概率  $p$  的分布;  
(d)  $p$  随纵向距离  $z$  的变化

Fig. 5 Intensity distributions of (a) activation beam and (b) deactivation beam around focus; (c) distribution of activation probability and (d) that along the  $z$  direction with  $NA=1.3$

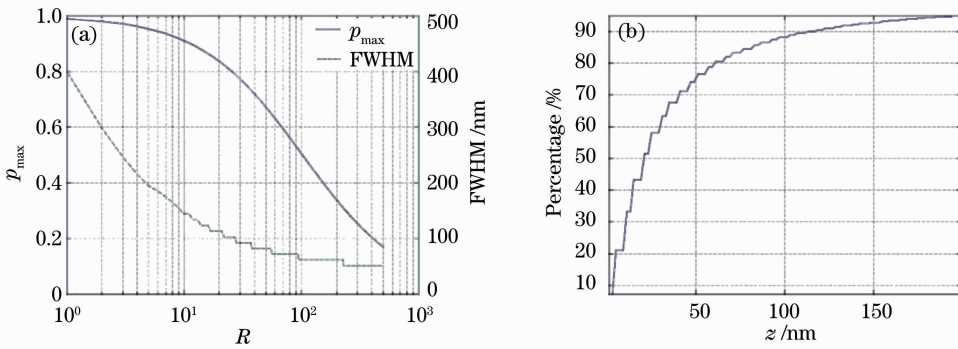


图6 当  $NA=1.3$  时(a)概率最大值  $p_{\max}$  和概率分布的 FWHM 随  $R$  的变化;(b)激活态荧光蛋白总数(百分比)随样本厚度  $z$  的分布( $R=60$ )

Fig. 6 (a)  $p_{\max}$  and FWHM as functions of the power ratio  $R$ ; (b) plot of percentage of total activated molecules in the central peak as a function of occupied thickness  $z$  ( $R=60$ ).  $NA=1.3$

## 4 结 论

通过合理地选择轴对称偏振光作为荧光蛋白的激活光和退活光,针对不同  $NA$  的显微系统设计相应的 DOE 结构,并调节退活光与激活光的光强比,可以获得足够薄的纵向荧光蛋白激活层以及合适的荧光蛋白激活态概率。通过对 Cy5 的数值模拟,实现了纵向选择激活荧光分子,可以获得  $\omega_{1/2} = 25.7$  nm 的选择激活层,从而为纵向超分辨率定位提供了一种可行的方法。与 SWFM 相比,这种方法只需要调整两束激光,降低了实验装置的调整难度,是一种简便可行的三维超分辨成像方法。

## 参 考 文 献

- 1 D. Attwood. New opportunities at soft X-ray wavelengths[J]. *Phys. Today*, 1992, **45**(8): 24~31
- 2 L. Reimer. Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis[M]. Berlin; Springer, 1998

- 3 Jintao Yang, Wendong Xu. Scanned cantilever atomic force microscope with large scanning range[J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2006, **4**(10): 580~582
- 4 E. H. Synge. A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region[J]. *Philos. Mag.*, 1928, **6**(35): 356
- 5 E. Betzig, R. Sougrat, O. W. Lindwasser *et al.*. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, **313**(5793): 1642~1645
- 6 M. J. Rust, M. Bates, X. W. Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, **3**(10): 793~795
- 7 D. Chen, B. Yu, J. Qu *et al.*. Background suppression by axially selective activation in single-molecule localization microscopy[J]. *Opt. Lett.*, 2010, **35**(6): 886~888
- 8 Zhao Yiqiong. Optimum Design of Diffractive Optical Elements for Beam Shaping and the Application[D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2005
- 9 赵逸琼. 优化设计衍射光学元件用于矢量光束整形及其应用研究[D]. 合肥: 中国科技大学, 2005
- 9 K. Huang, P. Shi, G. W. Cao *et al.*. Vector-vortex Bessel-Gauss beams and their tightly focusing properties [J]. *Opt. Lett.*, 2011, **36**(6): 888~890