基于光楔的并行受激发射损耗荧光擦除 图案产生方法

张硕晨,冯继宏*

北京工业大学生命科学与生物医学工程学院,智能化生理测量与临床转化北京市国际科技合作基地,北京100024

摘要 提出了一种基于光楔的全新的并行荧光擦除图案产生方法,使用光楔及配套反光镜来调控损耗光束入射辅助物镜时的物方倾斜角,可充分利用显微物镜的数值孔径,产生出周期更小的并行荧光擦除图案。仿真结果显示: 当使用数值孔径为1.4 的显微物镜且损耗光波长为760 nm时,所提方法能产生出周期为282.0 nm×283.6 nm的 正方形网格状并行荧光擦除图案,能实现更高的成像分辨率。

关键词 医用光学;荧光显微镜;并行受激发射损耗;荧光擦除图案;光楔;几何光学;数值仿真
 中图分类号 TH742
 文献标志码 A
 doi: 10.3788/CJL202047.0207031

Method for Generating Parallelized Fluorescence Depletion Patterns Based on Optical Wedges

Zhang Shuochen, Feng Jihong*

College of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Intelligent Physiological Measurement and Clinical Translation, Beijing International Base for Scientific and Technological Cooperation, Beijing 100024, China

Abstract Herein, a novel method for generating parallelized fluorescence depletion patterns based on optical wedges is proposed. Optical wedges and matching reflectors are used to control the stimulated emission depletion (STED) beam inclination angle of the tube lens object space to make full use of the numerical aperture of the microscope objective to produce parallelized fluorescence depletion patterns with small periodicity. Simulation results show that a square lattice-like parallelized fluorescence depletion pattern with periodicity as small as 282.0 nm × 283.6 nm is generated when the wavelength of the STED beam is 760 nm and numerical aperture of the microscope objective is 1.4, thereby achieving relatively high imaging resolution.

Key words medical optics; fluorescence microscopy; parallelized stimulated emission depletion; fluorescence depletion patterns; optical wedge; geometric optics; numerical simulation OCIS codes 170.2520; 180.2520; 100.6640; 080.2740; 080.1665

1引言

并行受激发射损耗(STED)显微术是一种新型的超分辨成像技术,它突破了传统STED显微成像技术的点扫描成像方式,采用空间上周期性排列的"面包"光圈或光学格子作为荧光擦除图案实现并行STED成像,可有效提升成像速度,更好地揭示蛋白质相互作用等微观生命活动的机制^[1-8]。2011年,Hell等^[3]使用光纤分束器调制出4个呈周期性排列的"面包"光圈,首次实现了并行STED成像,但

因裝置过于复杂,而且激光器的功率有限,该方法难 以实现更大规模的并行 STED 成像。2013 年,Hell 等^[9]通过衍射光栅产生出多达 10 万个"面包"光圈 的并行荧光擦除图案,但每个"面包"光圈所含的损 耗光强过低,仅能满足可逆荧光蛋白的荧光关闭需 求。2014 年,Yang 等^[10]采用多光束干涉产生出较 大规模的并行荧光擦除图案,并用其实现了超分辨 成像;其中,由两对正交偏振损耗光束干涉产生的正 方形网格状并行荧光擦除图案的周期更小,且可保 证均匀的横纵成像分辨率,是最好的并行荧光擦除

收稿日期: 2019-08-30; 修回日期: 2019-11-14; 录用日期: 2019-12-11

^{*} E-mail: jhfeng@bjut.edu.cn

图案之一[11]。

根据多光束干涉原理,相关文献已报道了三种 较大规模正方形网格状并行荧光擦除图案的产生方 法,它们分别基于空间光调制器、沃拉斯顿棱镜或迈 克耳孙干涉仪结合类马赫-曾德尔干涉仪来调制出 两对呈轴对称的正交偏振损耗光束。令这4束损耗 光自辅助物镜物方焦点处斜入射由显微物镜及辅助 物镜组成的并行 STED 显微成像系统,4 束损耗光 经显微物镜聚焦后于样本平面焦点处相遇,并干涉 产生出正方形网格状并行荧光擦除图案[10,12-13]。当 两对呈轴对称的正交偏振损耗光束干涉产生正方形 网格状并行荧光擦除图案时,样本平面焦点处的损 耗光束与光轴间的夹角决定了干涉光束间的光程 差,焦点处的损耗光束与光轴之间的夹角越大,并行 荧光擦除图案的周期越小[14-16]。根据 STED 原理, 正方形网格状并行荧光擦除图案中相邻亮条纹间的 距离越近(周期越小),正方形网格中心的零光强区 域就越小,擦除得到的荧光光斑也就越小,因此更小 周期的并行荧光擦除图案可以实现更高的成像分辨 率[1,10,12]。但受限于激光器的功率,大规模并行 STED 成像非常困难^[10,12-13,17]。本文采用模拟来验 证新方法的有效性。

在已报道的方法中,受空间光调制器衍射效率 所限,空间光调制器法造成的损耗光的能量损失很 大,因而较少采用^[10];虽然沃拉斯顿棱镜法造成的 损耗光的能量损失较少,但双折射晶体对损耗光束 的分束角固定,所以该方法难以灵活地调控损耗光 束入射并行 STED 显微成像系统的物方倾斜角,使 其不能充分利用显微物镜数值孔径产生出更小周期 的并行荧光擦除图案^[10,13];而干涉仪法虽然可调控 损耗光束入射并行 STED 显微成像系统的物方倾 斜角,但其装置极其复杂,若要调制出两对呈轴对称 的正交偏振损耗光束,需要频繁地调整损耗光束的 偏振方向,并使被调制光束多次反复穿过偏振分光 棱镜,从而造成了很大的光能量损失^[12]。鉴于此, 本文提出了一种基于光楔的全新的并行荧光擦除图 案产生方法,通过调整光楔的楔角、倾斜角及配套反 光镜的倾斜角来调控损耗光束入射并行 STED 显 微成像系统的物方倾斜角,使损耗光束外径与显微 物镜的后孔径内切,以充分利用显微物镜数值孔径 产生出周期更小的并行荧光擦除图案。仿真结果显 示,当损耗光波长为 760 nm 且使用数值孔径为 1.4 的显微物镜时,本方法能产生出周期为 282.0 nm× 283.6 nm的正方形网格状并行荧光擦除图案。

2 基本原理

根据多光束干涉原理,正方形网格状并行荧光 擦除图案由如图 1 所示的两对传播平面垂直且偏振 态 正 交 的 等振 幅轴 对称线性偏振损耗光束产 生^[14-16]。图中,B1、B2、B3、B4 分别代表空间中传播 的 4 束损耗光,其中 B1、B2 为竖直偏振光,B3、B4 为水平偏振光,它们在样本平面上与光轴的夹角分 别记为 θ_1 、 θ_2 、 θ_3 、 θ_4 。为研究这 4 束损耗光干涉产 生的并行荧光擦除图案,将损耗光简化为平面波,所 以图 1 中第 j 束损耗光电场的复振幅矢量 E_j 在极 坐标系下的表达式为^[14-16,18]

 $E_{j}(r) = A \exp[i(k_{j} \cdot r + \varphi_{j})]e_{j}$ 。 (1) 式中:A 为损耗光的振幅;i 为虚数单位; k_{j} 为第j 束 损耗光的波矢量;r 为极坐标系的自变量; φ_{j} 为第j束损耗光的初相位; e_{j} 为第j 束损耗光的偏振矢量。



图 1 损耗光束在聚焦区域处的传播示意图 Fig. 1 Propagation diagram of STED beams in focus

聚焦区域损耗光束间的干涉现象符合叠加原 理,即:相同偏振态的损耗光束间发生干涉,其相遇 处的时间平均光强分布等于相同偏振态损耗光束电 矢量之和与其共轭复数乘积的一半;而偏振态正交的损耗光束间不发生干涉,其相遇处的时间平均光强分布等于它们各自光强之和^[19-20]。因此,本文推

导出的图 1 所示 4 束损耗光在样本平面产生出的并 行荧光擦除图案在直角坐标系下的时间平均光强分 布表达式 *I*(*x*,*y*,*z*)为^[13,17,20]

$$\begin{cases} I(x, y, z) = \\ A^{2} \{2 + \cos[B + (\varphi_{1} + \varphi_{3} - \varphi_{2} - \varphi_{4})]\} \\ B = \frac{2\pi n}{\lambda} [(\cos \theta_{1} + \cos \theta_{3} - \cos \theta_{2} - \cos \theta_{4})z - ' \\ (\sin \theta_{3} + \sin \theta_{4})x - (\sin \theta_{1} + \sin \theta_{2})y] \end{cases}$$
(2)

式中:n 为显微物镜浸油的折射率;λ 为损耗光在真 空中的波长。根据三角函数的性质,由(2)式可解得 并行荧光擦除图案的横向周期 P_x与纵向周期 P_y的 表达式为

$$P_x = \frac{\lambda}{n(\sin\theta_3 + \sin\theta_4)},\tag{3}$$

$$P_{y} = \frac{\lambda}{n(\sin\theta_{1} + \sin\theta_{2})} \,. \tag{4}$$

因为图 1 中的 4 束损耗光关于光轴对称,即损 耗光束与光轴的夹角均相同,所以并行荧光擦除图 案周期的表达式可简化为

$$P = \frac{\lambda}{2n\sin\theta},\tag{5}$$

式中:θ为样本平面上损耗光束与光轴之间的夹角;

P为并行荧光擦除图案的周期。由(5)式可见,并 行荧光擦除图案周期与夹角θ成反比。

在并行 STED 显微成像系统中,4 束损耗光束 B1~B4 自辅助物镜物方焦点处以轴对称的方式 斜入射辅助物镜,经辅助物镜折射后正入射显微 物镜。由几何光学原理易知:损耗光束入射显微 物镜的入射高度等于辅助物镜焦距与损耗光束入 射辅助物镜的物方倾斜角正切值的乘积;经显微 物镜聚焦后,焦点处的损耗光束与光轴间的夹角 正比于损耗光束入射显微物镜的入射高度,当损 耗光束的外径与显微物镜的后孔径内切时入射高 度最大,此时样本平面焦点处损耗光束的边缘光 线与光轴之间的夹角等于显微物镜的半孔径 角^[21-22]。所以,调控损耗光束入射并行 STED 显 微成像系统的物方倾斜角,令损耗光束外径与显 微物镜后孔径内切,可使样本平面焦点处损耗光 束的边缘光线与光轴间的夹角达到显微物镜数值 孔径所能允许的最大值。

3 光学系统设计

本文提出了一种基于光楔的全新的并行荧光擦 除图案产生方法,其光路装置如图 2 所示。



图 2 基于光楔的并行荧光擦除图案产生方法的光路装置

Fig. 2 Optical setup of parallelized fluorescence depletion patterns generation method based on optical wedge

u

从光源发出的随机偏振损耗光束被偏振分光棱 镜 PBS 分束后,水平偏振光直接正入射由 BS1、 OF1、OW1、R2 和 R3 组成的子系统,而竖直偏振光 则经 R1 反射后正入射由 BS2、OF2、OW2、R5 和 R6 组成的子系统。在基于光楔 OW1 的子系统中, 入射光首先被 BS1 分为两束。其中,透射光束 B4 经 OF1、OW1 折射后与光轴呈一顺时针夹角 u,该 夹角的大小由 OW1 的楔角及其倾斜角决定,如图 3 (a)所示。图中 I_1 、 I'_1 、 I_2 和 I'_2 分别是 B4 穿过光楔 前后表面时的入射角及折射角。根据折射定律,本 文推导得到的夹角 u 的表达式为[21]

$$= \sin^{-1}\left\{n_{\rm ow}\sin\left[a + \sin^{-1}\left(\frac{\cos b}{n_{\rm ow}}\right)\right]\right\} + b - a - \frac{\pi}{2}, \tag{6}$$

式中:a 为光楔的楔角;b 为光楔相对于光轴的倾 斜角;now为光楔玻璃材料的折射率。在损耗光束 B4 穿过平板玻璃 OF1 和光楔 OW1 调控该光束与 光轴间夹角的过程中,平板玻璃 OF1 用于抵消损 耗光束 B4 经光楔 OW1 折射所产生的垂轴偏移。 由式(6)可见,较小的楔角有利于提升夹角 u 的调 控精度,当楔角很小时,光楔可近似看作是一块平 板玻璃,所以在本方法中令 OF1 与 OW1 厚度相 同且倾角相反即可基本消除 B4 经 OW1 折射所产 生的垂轴偏移。而反射光束 B3 经 R2、R3 反射后, 于 OW1 后表面与透射光束 B4 合束,形成一对在 *xoz* 平面内传播的轴对称水平偏振损耗光束。在 合束点处,损耗光束 B3 与光轴的夹角 u'由配套反 光镜 R3 的倾斜角 c、光楔的楔角 a 及倾斜角 b 决



定,如图 3(b)所示。图中 R₁及 R'₁、R₂及 R'₂分别 为 B3 在 R3、OW1 后表面上的入射角及反射角。 为保证损耗光束 B3 与 B4 关于光轴对称,即 u'等 于 u,本文推导得出的反光镜倾斜角 c 的表达式 为^[21]

$$c = \frac{3}{2}b - \frac{3}{2}a - \frac{\pi}{4} + \frac{1}{2}\sin^{-1}\left\{n_{\text{ow}}\sin\left[a + \sin^{-1}\left(\frac{\cos b}{n_{\text{ow}}}\right)\right]\right\}.$$
 (7)



图 3 损耗光束与光轴夹角的调控机制示意。(a)透射损耗光束与光轴夹角的调控机制示意; (b)反射损耗光束与光轴夹角的调控机制示意

Fig. 3 Schematic diagrams of control mechanism of the angle between STED beam and optical axis. (a) Schematic diagram of control mechanism of the angle between transmission STED beam and optical axis; (b) schematic diagram of control mechanism of the angle between reflection STED beam and optical axis

另一方面,基于 OW2 的子系统通过与上述同 样的原理,将入射光束调制成一对在 voz 平面内传 播的呈轴对称的竖直偏振损耗光束 B1、B2, 且它们 与光轴的夹角同样等于 u。之后,从 OW1、OW2 后 表面上发出的损耗光束对 B3、B4 和 B1、B2 分别通 过由 L1、L2、R4 及 L3、L4 构成的两套一倍扩束镜 传递到分光棱镜 BS3 的分光面上进行合束,且合束 点与辅助物镜 L5 间的距离等于 L5 的物方焦距 f_{5} , 如图 2 所示[23]。最终合束后,因为一倍扩束镜的角 放大率为1,且损耗光束对于入射面与出射面是平 行的,所以从辅助物镜 L5 物方焦点处斜入射辅助 物镜的两对正交偏振损耗光束(B1、B2和B3、B4)的 物方倾斜角,与其在光楔后表面处与光轴的夹角 u 相同^[22,24-25]。之后,4 束损耗光经 L5 及显微物镜 (objective)组成的开普勒望远镜系统聚焦到样本平 面(sample)上发生干涉,产生出正方形网格状并行 荧光擦除图案。

4 实验仿真

本文基于图 2 所示的光路装置,用模拟仿真的 方法研究了基于光楔的并行荧光擦除图案的产生方 法。在仿真过程中,本文选用光束大小为 1、波长为 760 nm 的随机偏振高斯光源作为损耗光光源,采用 数值孔径为 1.4 的平场复消色差油浸物镜作为显微 物镜,其结构参数参见文献[26]中的例 1。之后,在 样本平面上连续放置两个轴向间距为 1 nm 且横纵 向半宽均等于 1000 nm 的矩形探测器,令它们分别 探测水平偏振光或竖直偏振光产生的相干照度。因 为两探测器的间距远小于衍射极限,所以可认为两 探测器分别接收到并行荧光擦除图案的水平或竖直 偏振分量。根据光波的叠加原理,两探测器相干照 度数据之和即为样本平面上的并行荧光擦除图案, 结果如图 4 所示^[20]。

探测器 1 负责接收样本平面上水平偏振光产生的相干照度,探测结果如图 4(a)所示。可见,水平偏振损耗光束 B3、B4 在聚焦区域发生干涉,产生出了在横向(x 方向)呈周期性排列的竖直光学条纹的归一化行截面光强变化曲线如图 4(d)所示,图中曲线共包含 1000个数据采样点,采样点的横坐标代表该点在探测器上的空间位置,纵坐标代表该点处探测器接收到的归一化光强度。图 4(d)中最左端第一波峰的横坐标为 118,最右端第 6 波峰的横坐标为 823,因为矩形探测器的横向半宽为 1000 nm,所以采样点横坐

标增加1个单位代表探测器上该点位置变化2 nm, 由此算可得组成并行荧光擦除图案的呈周期性排列 的竖直光学条纹在水平方向(*x* 方向)的平均峰峰距 离,即并行荧光擦除图案在水平方向(*x* 方向)的周 期为 282.0 nm。

探测器 2 负责接收样本平面上竖直偏振光产生的相干照度,其探测结果如图 4(b)所示。可见,竖 直偏振损耗光束 B1、B2 在聚焦区域干涉产生出了 在纵向(y 方向)呈周期性排列的水平光学条纹。这 组周期性排列的水平光学条纹的归一化列截面光强 变化曲线如图 4(e)所示,图中曲线共包含 1000 个 数据采样点,采样点的横坐标代表该点在探测器上 的空间位置,纵坐标代表该点处探测器接收到的归 一化光强度。图 4(e)中最左端第一波峰的横坐标 为 120,最右端第 6 波峰的横坐标为 829,因为矩形 探测器的纵向半宽也为 1000 nm,所以采样点横坐 标增加 1 个单位同样代表探测器上该点位置变化 2 nm,由此可计算得到组成并行荧光擦除图案的呈 周期性排列的水平光学条纹在竖直方向(y方向)的 平均峰峰距离,即并行荧光擦除图案在竖直方向(y 方向)的周期为 283.6 nm。

将上述周期性排列的竖直光学条纹和水平光学 条纹非相干叠加后,就可得到并行荧光擦除图案,即 一个周期为282.0 nm×283.6 nm 的正方形光学格 子,如图 4(c)所示。仿真结果显示,在波长为 760 nm的损耗光下,本文所提方法使用数值孔径为 1.4 的显微物镜产生出了周期为282.0 nm× 283.6 nm的正方形网格状并行荧光擦除图案,该图 案周期为此条件下衍射极限(271.43 nm)的 1.04 倍。而在同样波长的损耗光下,已报道方法使用数 值孔径为 1.49 的显微物镜仅产生出了周期约为 290 nm×290 nm 的正方形网格状并行荧光擦除图 案,该图案周期为此条件下衍射极限(255.03 nm)的 1.14 倍^[10]。这一数据对比表明:在同样的条件下, 本方法能产生出周期更小的并行荧光擦除图案,可 以实现更高的成像分辨率。



图 4 并行荧光擦除图案的仿真结果。(a)水平偏振损耗光束在聚焦区域产生的干涉图样;(b)竖直偏振损耗光束在聚焦区域产生的干涉图样;(c)所有损耗光束在聚焦区域产生的并行荧光擦除图案;(d)表图(a)中 y=0 处的行截面光强分 布;(e)图(b)中 x=0 处的列截面光强分布

- Fig. 4 Simulation results of parallelized fluorescence depletion patterns. (a) Interference patterns produced by horizontal polarization STED beams in focus; (b) interference patterns produced by vertical polarization STED beams in focus;
 (c) parallelized fluorescence depletion patterns produced by all STED beams in focus; (d) row cross section intensity of figure (a) at y=0; (e) column cross section intensity of figure (b) at x=0
- 5 结 论

本文提出了一种基于光楔的全新正方形网格状 并行荧光擦除图案产生方法,通过调控损耗光束入 射辅助物镜的物方倾斜角,可更充分地利用显微物 镜的数值孔径,产生出周期更小的并行荧光擦除图 案^[10]。而且,在产生并行荧光擦除图案过程中,不 必调整损耗光束的偏振方向,本方法比已报道方法 更简单方便,而且避免了因频繁调整损耗光束偏振 方向而造成的损耗光强的损失^[12]。

参考文献

- Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulatedemission-depletion fluorescence microscopy [J]. Optics Letters, 1994, 19(11): 780-782.
- [2] Klar T A, Hell S W. Subdiffraction resolution in farfield fluorescence microscopy [J]. Optics Letters, 1999, 24(14): 954-956.
- [3] Bingen P, Reuss M, Engelhardt J, et al. Parallelized STED fluorescence nanoscopy [J]. Optics Express, 2011, 19(24): 23716-23726.
- [4] Huang B, Babcock H, Zhuang X W. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells
 [J]. Cell, 2010, 143(7): 1047-1058.
- [5] Jin L J, He Y, Qu L X, et al. Analysis of new super-resolution microscopy technology[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2018, 55(3): 030006.
 金录嘉,何洋,瞿璐茜,等.新型超分辨显微技术浅析[J].激光与光电子学进展, 2018, 55(3): 030006.
- [6] Peng D M, Fu Z F, Xu P Y. Fluorescent proteins and super-resolution microscopy [J]. Acta Optica Sinica, 2017, 37(3): 0318008.
 彭鼎铭, 付志飞, 徐平勇. 荧光蛋白与超分辨显微成 像[J]. 光学学报, 2017, 37(3): 0318008.
- [7] Xu Y W, Zhang Y H, Yang H M, et al. Imaging technology of reduced photobleaching based on controllable light exposure-confocal microscopy [J]. Chinese Journal of Lasers, 2018, 45(4): 0407001. 徐依雯,张运海,杨皓旻,等.基于可控光剂量的低 荧光漂白共聚焦成像技术[J].中国激光, 2018, 45 (4): 0407001
- [8] Li H, Xia X Y, Chen T A, et al. Applications of two-photon excitation fluorescence lifetime imaging in tumor diagnosis [J]. Chinese Journal of Lasers, 2018, 45(2): 0207010.
 李慧,夏先园,陈廷爱,等.双光子荧光寿命成像在 肿瘤诊断研究中的应用[J].中国激光, 2018, 45 (2): 0207010
- [9] Chmyrov A, Keller J, Grotjohann T, et al. Nanoscopy with more than 100, 000 'doughnuts' [J]. Nature Methods, 2013, 10(8): 737-740.
- [10] Yang B, Przybilla F, Mestre M, et al. Large parallelization of STED nanoscopy using optical lattices [J]. Optics Express, 2014, 22 (5): 5581-5589.
- [11] Keller J, Schönle A, Hell S W. Efficient fluorescence inhibition patterns for RESOLFT microscopy [J].

Optics Express, 2007, 15(6): 3361-3371.

- [12] Bergermann F, Alber L, SahlS J, et al. 2000-fold parallelized dual-color STED fluorescence nanoscopy [J]. Optics Express, 2015, 23(1): 211-223.
- [13] Yang B, FangC Y, Chang H C, et al. Polarization effects in lattice - STED microscopy [J]. Faraday Discussions, 2015, 184: 37-49.
- [14] Cai L Z, Yang X L, Wang Y R. All fourteen Bravais lattices can be formed by interference of four noncoplanar beams [J]. Optics Letters, 2002, 27 (11): 900-902.
- [15] Yuan L, Wang G P, Huang X K. Arrangements of four beams for any Bravais lattice [J]. Optics Letters, 2003, 28(19): 1769-1771.
- [16] Yang X L, Cai L Z, Wang Y R, et al. Interference of four umbrellalike beams by a diffractive beam splitter for fabrication of two-dimensional square and trigonal lattices[J]. Optics Letters, 2003, 28(6): 453-455.
- Xiao Y, Zhang Y H, Shi Y Q, et al. The study on optical lattice formed by four-beam interference [J]. Optik, 2016, 127(22): 10421-10427.
- [18] Ji J R. Higher optics course-basic electromagnetic theory of optics [M]. Beijing: China Science Publishing & Media Ltd., 2007: 1-44.
 季家镕.高等光学教程:光学的基本电磁理论[M]. 北京:科学出版社, 2007: 1-44.
- [19] Liao Y B. Polarization optics [M]. Beijing: China Science Publishing & Media Ltd., 2003: 45-63.
 廖延彪.偏振光学 [M].北京:科学出版社, 2003: 45-63.
- [20] Liang Q Y. Physical optics fifth edition[M]. 5th ed. Beijing: Publishing House of Electronics Industry, 2018: 48-117.
 梁铨延.物理光学[M].5版.北京:电子工业出版 社, 2018: 48-117.
- [21] Li X T, Cen Z F. Geometrical optics, aberrations and optical design [M]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology Press, 2014: 10-56.
 李晓彤, 岑兆丰. 几何光学・像差・光学设计[M]. 杭州:浙江大学出版社, 2014: 10-56.
- [22] Zhang Y M. Apply optics [M]. 3th ed. Beijing: Publishing House of Electronics Industry, 2008: 18-126.
 张以谟.应用光学[M].3版.北京:电子工业出版 社, 2008: 18-126.
- [23] Laikin M. Lens design [M]. Zhou H X, Cheng Y F, Transl. 4th ed. Beijing: China Machine Press, 2012: 143-144.
 莱金.光学系统设计 [M].周海宪,程云芳,译.4 版.北京:机械工业出版社, 2012: 143-144.
- [24] Tian Q, Liao Y B, Sun L Q. Engineering optics [M].

Beijing: Tsinghua University Press, 2006: 35-71. 田芊, 廖延彪, 孙利群. 工程光学 [M]. 北京:清华 大学出版社, 2006: 35-71.

[25] Smith W J. Modern optical engineering[M]. Zhou H X, Cheng Y F, Transl. 4th ed. Beijing: Chemical Industry Press Co., Ltd., 2011: 98-124.

史密斯.现代光学工程[M].周海宪,程云芳,译.4 版.北京:化学工业出版社,2012:98-124.

[26] Suzuki T. Immersion microscope objective: US5517360[P]. 1996-05-14.