

# 偏振态和有效数值孔径对共聚焦全内反射显微术分辨率的影响

魏通达<sup>1,2,3</sup> 张运海<sup>3</sup> 肖昀<sup>1,2,3</sup> 唐玉国<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 吉林 长春 130033; <sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100049

<sup>3</sup>中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏 苏州 215163

**摘要** 为了研究入射光偏振态和入射光瞳有效数值孔径对共聚焦全内反射显微术(CTIRM)的分辨率,即焦点横向半峰全宽和纵向倏逝场透射深度的影响,根据Richard-Wolf矢量衍射理论,计算并讨论了线偏振、圆偏振、径向偏振和切向偏振入射光在界面处的光强分布情况;同时计算了在三种不同的有效数值孔径(1.33~1.45,1~1.45和1~1.12)时,焦点半峰全宽和倏逝场透射深度的数值结果。计算结果表明,当有效数值孔径为1.33~1.45,入射波长为532 nm时,径向偏振光在横向上可达144 nm的半峰全宽,优于线偏振的330 nm和圆偏振的360 nm,超过了衍射极限。薄且大的有效数值孔径能够获得更小的半峰全宽,其上下限的平方差越大,透射深度越小。三种数值孔径中,1~1.45时的透射深度最小,为140 nm。相比较其他偏振光,径向偏振光更适合作为共聚焦全内反射显微术的入射激发光,并能够通过优化有效数值孔径,获得样品近表面处的高横向分辨率和低轴向荧光噪声。

**关键词** 成像系统; 显微; 偏振; 衍射理论; 共聚焦; 全内反射

中图分类号 O439 文献标识码 A doi: 10.3788/LOP51.011102

## Effects of Polarization State and Effective Numerical Aperture on the Resolution in Confocal Total Internal Reflection Microscopy

Wei Tongda<sup>1,2,3</sup> Zhang Yunhai<sup>3</sup> Xiao Yun<sup>1,2,3</sup> Tang Yuguo<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun, Jilin 130033, China

<sup>2</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

<sup>3</sup>Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China

**Abstract** In order to study the effects of polarization state and effective numerical aperture on the focal full-width at half-maximum (FWHM) and evanescent depth in confocal total internal reflection Microscopy (CTIRM), according to the Richard-Wolf theory, the intensity distribution in the interface is calculated and discussed with linearly, circularly, radially and azimuthally polarized beams, respectively. Meanwhile, the numerical calculations of FWHM and depth are researched for three different effective numerical apertures (1.33~1.45, 1~1.45 and 1~1.12, respectively). The results indicate that the FWHM of radially polarized beam is 144 nm, breaking through the limitation of diffraction, which is also better than 330 nm of linearly and 360 nm of circularly polarized ones, by using 532 nm incident wave and 1.33~1.45 aperture. The sharper focus can be got with the larger and thinner aperture. Also the smaller depth of transmission can be got with the larger difference of squares of upper and lower limits, for which 140 nm is the shallowest depth with 1~1.45 aperture. Compared to other polarizations, radially polarized beam is the most suitable choice for CTIRM. And by optimizing the

收稿日期: 2013-09-09; 收到修改稿日期: 2013-10-18; 网络出版日期: 2013-12-14

基金项目: 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所“一三五”规划重大突破项目(Y052031205)、苏州市应用基础研究计划(SYG201128)

作者简介: 魏通达(1986—),男,博士研究生,主要从事光学显微成像方面的研究。E-mail: weitd@sibet.ac.cn

导师简介: 唐玉国(1967—),男,博士,研究员,博士生导师,主要从事医用光学、医用光学工程、光谱学及光谱分析仪器等方面的研究。E-mail: tangyg@sibet.ac.cn

effective numerical aperture, high horizontal resolutions and low axial fluorescent noise near the sample surface can be obtained simultaneously.

**Key words** imaging systems; microscopy; polarization; diffraction theory; confocal microscopy; total internal reflection

**OCIS Codes** 110.0180; 260.5430; 260.1960; 180.1790; 260.6970

## 1 引言

激光扫描共聚焦荧光显微术(LSCM)与传统荧光显微术相比,能够实现样品的三维扫描成像以及提供更高的分辨率,在生物和医学领域已经成为重要的技术手段,在材料领域同样也有广泛的应用<sup>[1-3]</sup>。在共聚焦光路中,设置空间针孔滤波器,滤除掉由离焦光线所激发的干扰荧光,提高了信噪比,从而在横向和轴向两个方向上的分辨率都有所提高。但共聚焦技术在轴向抑制干扰荧光的能力存在极限,典型的轴向分辨能力在500~600 nm<sup>[4]</sup>。

对于样品表面荧光分子的探测,需要一种在轴向范围内很薄层区域激发荧光、而又不受内部影响的技术,应用倏逝场激发荧光物质的全内反射荧光显微术(TIRF)很好地满足了要求<sup>[5-6]</sup>。倏逝场形成于介质界面处,其振幅随深度成e指数衰减分布,使得受激发的荧光物质被限制于界面以下很小的厚度内,相比较共聚焦成像来说,大大提高了轴向上对于干扰噪声的抑制,在轴向方面的分辨能力突破了衍射极限的限制,可用于亚细胞和单分子成像<sup>[7-9]</sup>。

近期研究表明,应用共聚焦与全内反射(TIR)相结合的技术,能够减小受激发荧光的体积<sup>[10]</sup>。在共聚焦系统的基础上,采用大数值孔径的显微物镜成像,在激发光路中心加入振幅调制装置,使入射光成圆环形状入射。圆环范围内的入射激光在两种不同折射率介质的界面处发生全反射,形成光传播常数 $k$ 为虚数的倏逝场激发样品近表面的荧光。两种技术结合的优点在于同时具备了共聚焦横向的高分辨率和全内反射对样品近表面处轴向低噪声干扰的成像特点,激发荧光区域的体积小于 $10^{-18}$ L,可实现对于单分子的检测,而且实验装置简单易行,适合用于对样品表面荧光物质的高分辨率观测<sup>[11-12]</sup>。

本文根据Richards-Wolf矢量衍射理论,对共聚焦全内反射显微术(CTIRM)进行理论分析,计算了线偏振、圆偏振、径向偏振和切向偏振光入射时在两层介质界面附近的电场分布,并研究讨论了入射光的偏振特性和有效数值孔径对于电场分布的影响。

## 2 理论原理

考虑当一束平面光波从光密介质(折射率 $n_1$ )入射到光疏介质(折射率 $n_2$ )的界面处时,满足折射定律: $n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$ ,  $\theta_1$ 和 $\theta_2$ 分别为光的入射角和折射角,临界角 $\theta_c = \arcsin(n_2/n_1)$ ,当入射角度大于临界角时,将发生全反射,同时在界面处近场内产生沿光轴方向衰减的倏逝场。应用倏逝场激发荧光,则需要入射激光全部在全反射范围内,即入射激光的角度范围从临界角到最大,即 $\theta_c \leq \theta \leq \theta_{\max}$ ,其中 $\theta_{\max} = \arcsin(NA/n_1)$ , $NA$ 为显微透射物镜的数值孔径。为了满足这一角度范围要求,在入射光路光轴中心处加入一个圆形振幅调制光阑,

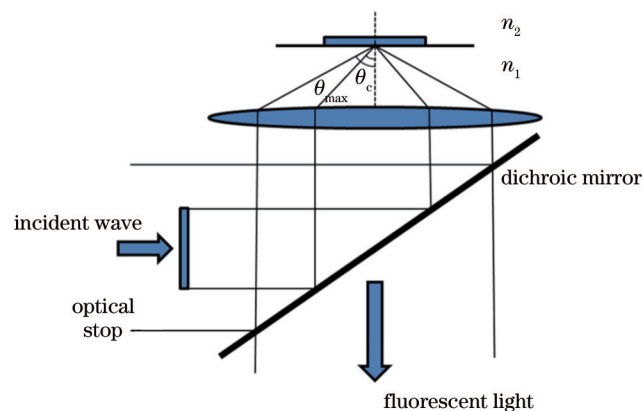


图1 共聚焦全内反射显微术原理示意图

Fig.1 Principle of CTIRM

设置光阑半径使其遮挡住入射角度小于临界角的入射光线,透过光线以光轴为轴心形成圆环形状入射,在界面近场倏逝场所激发的荧光再通过显微物镜成像。结构示意图如图1所示。

为了研究共聚焦全内反射显微术在焦平面(即两种介质界面)附近的电场分布情况,使用 Richards-Wolf 矢量衍射理论。电磁场为矢量场,该矢量衍射理论更严格地描述了其特性,根据该理论可推导出,平面光波经大数值孔径的物镜聚焦,在像方空间任意点  $P$  处,与时间无关的电场矢量  $E$  空间分布可表示为<sup>[13]</sup>

$$E(r_2, \phi_2, z_2) = -\frac{iA}{\pi} \int_{\theta_c}^{\theta_{\max}} \int_0^{2\pi} \varepsilon_2 \sqrt{\cos \theta_1} \exp[ik_0 \Phi(\theta_1)] \exp[ik_1 r_2 \sin \theta_1 \cos(\phi - \phi_2)] \exp[ik_2 z_2 \cos \theta_2] \sin \theta_1 d\phi d\theta_1, \quad (1)$$

式中  $E(r_2, \phi_2, z_2)$  为矢量,含有  $E_x, E_y, E_z$  三个分量;  $r_2, \phi_2, z_2$  为观察点的柱坐标;  $A$  为归一化常量;  $\Phi$  为像差校正函数,  $\Phi(\theta_1) = -d(n_1 \cos \theta_1 - n_2 \cos \theta_2)$ ,  $d$  是界面与物镜焦点间的距离,这里仅考虑理想状况下,焦平面与界面重合,取  $d=0$ ;  $k_0, k_1$  和  $k_2$  分别对应真空、介质1和介质2中的波数。介质2中电场强度矢量  $\varepsilon_2$  可以表示为

$$\varepsilon_2 = l_0(\theta_1) \mathbf{R}^{-1} \mathbf{P}_{(2)}^{-1} \mathbf{I} \mathbf{P}_{(0)} \mathbf{L}_{(0)} \mathbf{R} \varepsilon_0, \quad (2)$$

式中  $l_0(\theta_1)$  为切趾函数; 矩阵  $\mathbf{R}$  描述了沿  $Z$  轴的坐标旋转变换,

$$\mathbf{R} = \begin{bmatrix} \cos \phi & \sin \phi & 0 \\ -\sin \phi & \cos \phi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}; \quad (3)$$

矩阵  $\mathbf{P}_{(i)}$  描述了介质  $i$  中的坐标系旋转产生  $E_s$  和  $E_p$  分量,

$$\mathbf{P}_{(i)} = \begin{bmatrix} \cos \theta_1 & 0 & -\sin \theta_1 \\ 0 & 1 & 0 \\ \sin \theta_1 & 0 & \cos \theta_1 \end{bmatrix}, \quad (4)$$

矩阵  $\mathbf{I}$  描述了介质界面处的影响,

$$\mathbf{I} = \begin{bmatrix} t_p & 0 & 0 \\ 0 & t_s & 0 \\ 0 & 0 & t_v \end{bmatrix}, \quad (5)$$

式中的  $t_p$  和  $t_s$  为 Fresnel 系数; 矩阵  $\mathbf{L}$  描述了光透过物镜的电场变化,

$$\mathbf{L}_{(0)} = \begin{bmatrix} \cos \theta_1 & 0 & \sin \theta_1 \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin \theta_1 & 0 & \cos \theta_1 \end{bmatrix}; \quad (6)$$

式中  $\varepsilon_0$  为入射光电场强度矢量。光强度值为  $E$  的模的平方。

### 3 入射光偏振特性的影响

#### 3.1 线偏振光和圆偏振光

入射光波长选为 532 nm, 通过遮光光阑形成圆环入射到数值孔径 1.45 的物镜, 聚焦在油介质 ( $n_1 = 1.518$ ) 和水介质 ( $n_2 = 1.33$ ) 界面处。取积分范围  $\theta_c \leq \theta \leq \theta_{\max}$ , 积分步数选取 2000 步;  $x$  和  $y$  方向上计算的空间分辨率选取为 4 nm。当入射光为沿  $x$  轴线偏振光时, 矩阵  $\varepsilon_0$  可表示为  $[1, 0, 0]^T$ 。  $x$ - $y$  平面的光强  $|E|^2$  的分布, 以及三个分量光强  $|E_x|^2$ ,  $|E_y|^2$  和  $|E_z|^2$  的分布情况的计算结果如图 2(a)~(d) 所示, 可以看出三个分量分别分离成一瓣、四瓣和两瓣,  $|E|^2$  沿线偏振光偏振的方向(即  $x$  轴方向), 焦点有所分离, 这主要受  $|E_z|^2$  分离的影响。  $|E_z|^2$  的分离主要由于平面波入射, 在入瞳处相对于光轴对称位置上的光波干涉, 导致了分量上的相干相消<sup>[15]</sup>。线偏振光入射焦点处光强的极大值分离距离为 192 nm, 中心凹陷处光强为极大值光强的 58.6%。

当入射光为沿  $y$  轴线偏振光时, 矩阵  $\varepsilon_0$  可表示为  $[0, 1, 0]^T$ 。计算结果如图 2(e) 所示。可以看出与  $x$  偏振光类似, 焦点沿偏振方向分离为两瓣, 而在垂直偏振方向上并无分离现象。如图 2(f) 所示, 为圆偏振光入射时, 矩阵  $\varepsilon_0$  可表示为  $\frac{1}{\sqrt{2}}[1, i, 0]^T$ 。与线偏振光入射情况不同, 圆偏振光界面处光强分布仅有一个峰值, 且是相对于  $x$  轴、 $y$  轴均对称的圆形, 但其强度极大值小于线偏振情况。计算  $x$ 、 $y$  线偏振以及圆偏振光形成的半

峰全宽(FWHM)分别为 330 nm、116 nm 和 360 nm,如图 2(g)所示。

作为与共聚焦全内反射的对比,图 3 结出了不加入振幅调制光阑,即单独的共聚焦系统照明时的光强情况。线偏振光焦点在偏振方向有所延长,但并没有分离成两个焦点,中心处的光强仍为最大值,且由于入射面积的增大,其光强也大于共聚焦全内反射的情况。 $x$ 、 $y$  线偏振以及圆偏振光形成的半峰全宽为分别为 312 nm、168 nm 和 232 nm。

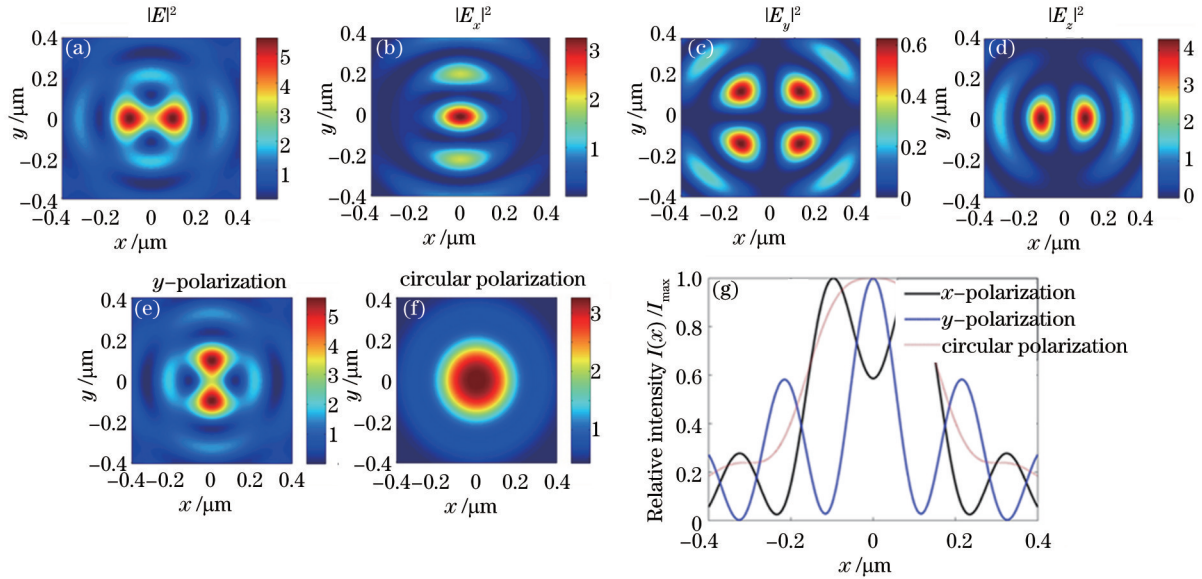


图 2 入射光光强分布。(a)  $x$  偏振;(b)  $x$  分量;(c)  $y$  分量;(d)  $z$  分量;(e)  $y$  偏振;(f) 圆偏振;(g) 切面图

Fig.2 Intensity distribution. (a) Linear polarization along  $x$  direction; (b)  $x$ -component; (c)  $y$ -component; (d)  $z$ -component; (e) linear polarization along  $y$  direction; (f) circular; (g) cross section

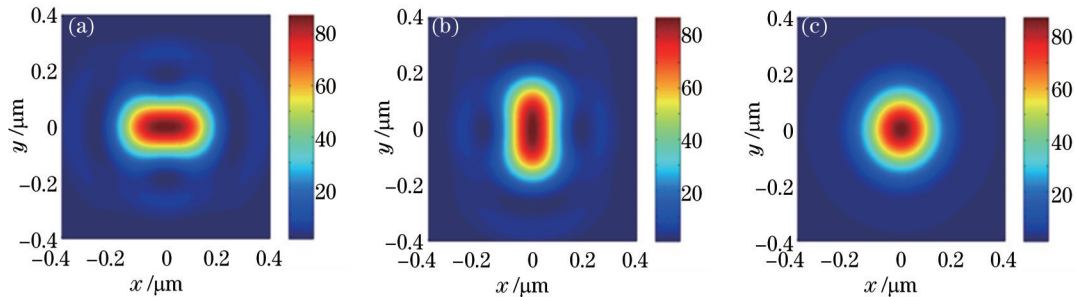


图 3 共聚焦中光强分布。(a)  $x$  偏振;(b)  $y$  偏振;(c) 圆偏振

Fig.3 Intensity distribution in confocal scheme. (a) Linear polarization along  $x$  direction; (b) Linear polarization along  $y$ ; (c) circular polarization

总体来看,在共聚焦全内反射中,线偏振光使得界面处的焦点沿偏振方向分离为两个焦点,会导致双重图像,这并不适合于微小物体的观测,而且半峰全宽略微增加,比较单独共聚焦系统的照明,实际上是模糊了焦点。圆偏振光虽然没有形成两个分离的焦点,但其半峰全宽要大于线偏振光的情况,同时也大于单独共聚焦系统的照明,焦点半峰全宽有所发散,整体横向分辨率下降。

### 3.2 径向偏振光和切向偏振光

径向偏振光是沿轴对称矢量偏振光的一种,由于其在空间分布的特性,越来越受到人们的关注。特别是在大数值孔径聚焦方面的特性,它能够形成具有很小半峰宽的光斑,可应用于超高分辨技术<sup>[16-20]</sup>。所谓径向偏振光,即在柱坐标下,偏振方向只沿径向方向。图 4(a)所示为共聚焦全内反射系统内的径向偏振光示意图,加入振幅调制光阑后,在入瞳处形成圆环形径向偏振入射光。径向偏振光矩阵  $\epsilon_0$  可表示为  $[\cos \phi, \sin \phi, 0]^T$ , 计算结果仅含有沿径向和轴向的两个电场分量  $E_r$  和  $E_z$ 。

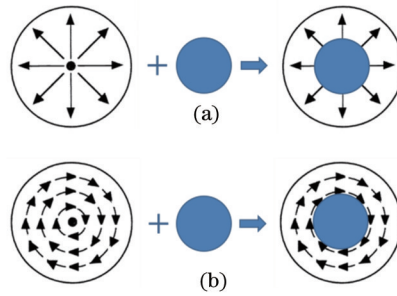


图4 共聚焦全内反射入射光示意图。(a)径向;(b)切向

Fig.4 Schematic of incident wave in CTIRM. (a) Radial; (b) azimuthal

如图5(a)~(c)所示为径向偏振光在界面处  $x-y$  平面内的光强及其分量的分布情况。可以看出,径向偏振光在界面处其轴向的分量很强,远超出径向分量。总体光强分布主要受轴向分量的影响,从而只形成了一个峰值,其半峰全宽为 144 nm,超过了衍射极限。而且研究表明它可以进一步减小<sup>[21-22]</sup>。图5(d)虚线所示单独的共聚焦照明时径向偏振光界面处的光强分布,其半峰全宽为 216 nm。

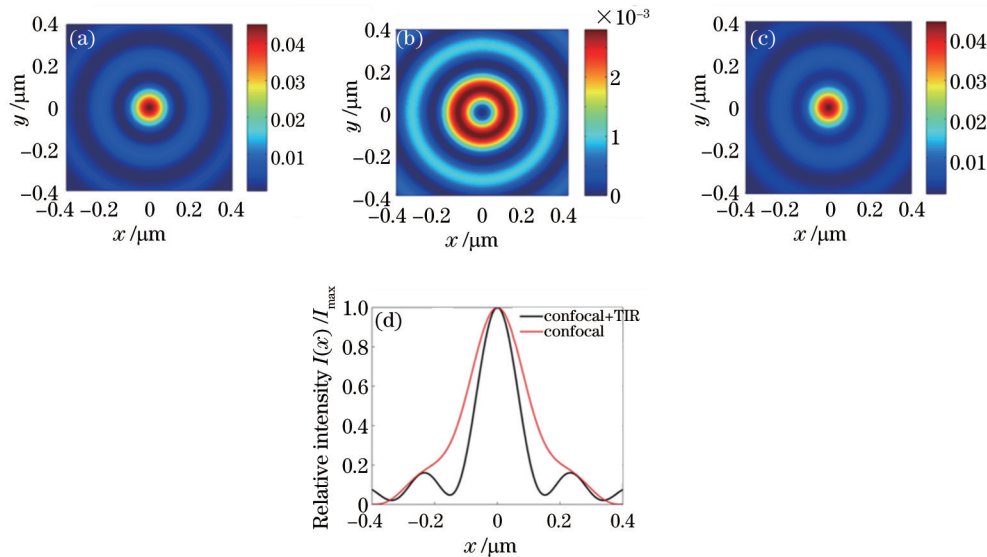


图5 径向偏振光。(a) 总体分布;(b)  $E_r$  分量;(c)  $E_z$  分量;(d) 切面图

Fig.5 Radial polarization. (a) Total distribution; (b)  $E_r$  component; (c)  $E_z$  component; (d) cross section

当入射光为线偏振时,焦点没有形成一个主峰值而是分离成两个,这是由于入射时在入瞳处相对于光轴对称位置上的光波产生干涉,导致了  $E_z$  分量的相干相消。而径向偏振光恰恰相反,在光轴上使得  $E_z$  分量相干增强,从而形成了单独一个峰值,而且其半峰全宽也要小于线偏振光入射时。特别值得注意的是,它同时也小于单独共聚焦照明时的半峰全宽。因此,用径向偏振光作为入射光,非常适合共聚焦全内反射系统,能够大大提高横向分辨能力。

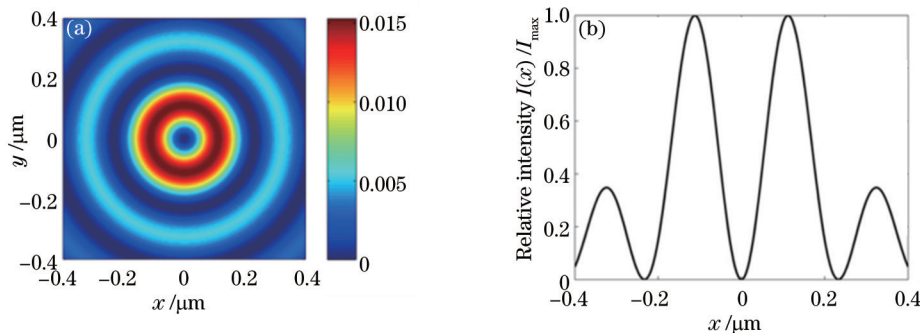


图6 切向偏振光。(a) 光强分布;(b) 切面图

Fig.6 Azimuthal polarization. (a) Intensity distribution; (b) cross section

切向偏振光是另外一种沿轴对称矢量偏振光,如图6所示,与径向偏振光相比很明显的不同在于,它沿横截面内切向方向上偏振,如图4(b)所示,其矩阵  $\epsilon_0$  可表示为  $[-\sin \phi, \cos \phi, 0]^T$ 。由计算可以看出,切向偏振光在界面处产生一个中心强度为零的环形光斑,而且没有沿光轴的电场分量,考虑到共聚焦全内反射成像技术的实际需要,这种偏振光作为入射光并不适合,这里不再做过多赘述。

#### 4 有效数值孔径的影响

显微镜的数值孔径是物镜的重要参数,决定和影响成像系统多方面的因素。在共聚焦全内反射成像系统中,由(1)式可以看出,在入射介质折射率一定时(即油介质  $n_1=1.518$ ), $NA$  主要决定着积分的上限  $\theta_{\max} = \arcsin(NA/n_1)$ , $NA$  越大则入射光的入射角度范围越大。但特别的是在共聚焦全内反射系统中,为了满足入射光线的全内反射条件,加入了振幅调制光阑,使得入射光的最小范围为全内反射临界角  $\theta_c = \arcsin(n_2/n_1)$ ,其对应的数值孔径等于介质2的折射率。因此,此时共聚焦全内反射系统入瞳处对应的入射光有效数值孔径范围为 1.33~1.45,不同于单独的共聚焦成像系统,如图7所示。

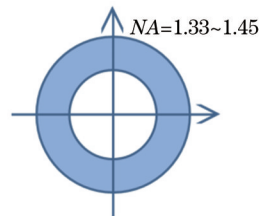


图7 共聚焦全内反射系统中有效数值孔径示意图

Fig.7 Schematic of effective numerical aperture in CTIRM

而且在倏逝场方向,有效数值孔径也直接影响着穿透深度的大小。以下主要研究不同的有效数值孔径对于有代表性的线偏振和径向偏振光所产生的半峰全宽以及倏逝场的影响。

图8(a)为在线偏振光入射情况下,界面处相对光强沿偏振方向的分布,三条曲线的有效数值孔径分别为 1.33~1.45,1~1.45 和 1~1.12,分别对应水介质-1.45物镜,空气-1.45物镜和空气-1.12物镜。计算结果可以看出,由于 1~1.45 取的有效数值孔径范围最大,其相对的光强值也是最大的。1~1.45 与 1.33~1.45 比较,其有效数值孔径下限变小,半峰全宽有所增大,从 328 nm 增加到 376 nm;中心光强相对最大值的比例由 58.6% 增大到 80.3%;但两个极大值点的间距均为 192 nm,保持不变。1~1.12 与 1~1.45 比较可以看出,其有效数值孔径上限减小,半峰全宽进一步增大为 440 nm,同时极大值间距变大到 264 nm,中心光强越为极大值的 55.5%。比较 1.33~1.45 与 1~1.12 可看出薄而且大的有效数值孔径整体效果要更优,分辨能力也更佳。

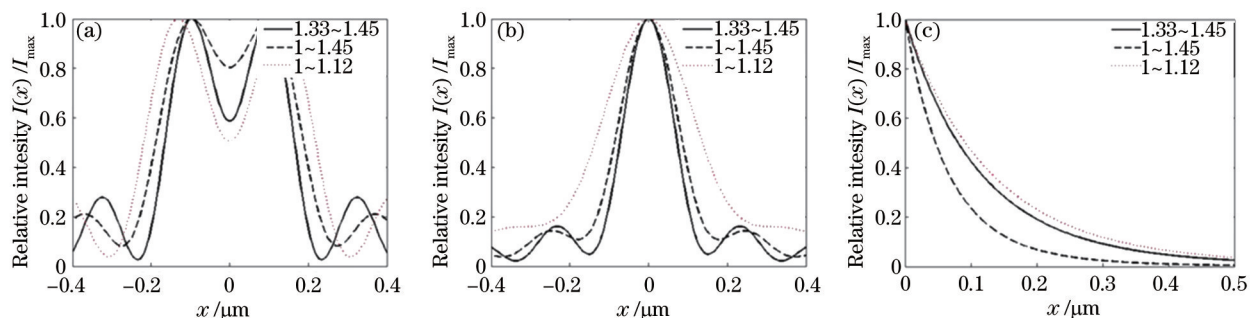


图8 不同有效数值孔径时的切面图。(a)线偏振;(b)径向偏振;(c)倏逝场

Fig.8 Cross sections with different effective NA. (a) Linear polarization;(b) radial polarization; (c) evanescent field

考虑径向偏振光入射情况,同样地,取有效数值孔径分别为 1.33~1.45,1~1.45 和 1~1.12。图8(b)所示,计算得到的径向偏振光在界面处的  $x$ - $y$  平面光强分布,最大值点始终保持在中心位置且仅为一个,它们的半峰全宽分别为 144 nm、172 nm 和 272 nm,薄且大的有效数值孔径能够获得更小的半峰全宽,变化趋势与线偏振光相同。

由此可看出,对于两种偏振光,当如图7所示的入瞳处圆环形的有效数值孔径相对薄而且大时,能够获得比较窄的半峰全宽,但同时也会损失一些入射光强度,理论上可以通过提高入射光强度的方法来补偿由

于光阑造成的光强损失;减小有效数值孔径的上下限都会使得半峰全宽变宽,意味着降低了横向上的分辨能力。对于线偏振而言,两峰分离距离与有效数值孔径上限有关,有效数值孔径上限越大则分离距离越小;中心光强与峰值的比例随有效数值孔径下限的增大而减小,同时随上限的减小而减小。

定义光强降到最大值的  $1/e^2$  时,距离界面的距离为倏逝场的透射深度。图 8(c)为倏逝场光波相对强度沿  $z$  轴的衰减变化情况,明显看出整体都是呈现  $e$  指数形式衰减。1.33~1.45、1~1.45 和 1~1.12 三种不同的有效数值孔径对应的倏逝场透射深度也不同,分别为 245 nm、140 nm 和 275 nm。其透射深度与有效数值孔径上限与下限的平方差有关,三者的平方差分别为 0.3336、1.1025 和 0.2544,平方差越大,透射深度越浅,轴向方面去除深处荧光噪声的能力也就越强。但应注意到三种不同的有效数值孔径,均不能同时满足最大的半峰全宽和最小的透射深度。

## 5 结 论

共聚焦全内反射显微技术在普通共聚焦照明系统的入射光路中加入了振幅调制光阑,使得入射光在物镜入瞳处形成圆形光环,入射角全部在大于全内反射临界角的情况下入射,实施起来简单易行,特别适合对样品近表面荧光物质的探测。对入射光不同偏振态的数值计算结果表明,当入射波长为 532 nm,有效数值孔径为 1.33~1.45 时,线偏振光经过共聚焦全内反射中的物镜会聚,在两层介质界面处形成了沿偏振方向相互分离 192 nm 的两个焦点,这不利于对微小物体的观测;而且线偏振或圆偏振光在共聚焦全内反射中形成的焦点,与仅在共聚焦中形成的焦点相比较,前者光强的半峰全宽有所增加,这意味着它一定程度上模糊了焦点,降低了横向分辨率。但是同样的条件对于径向偏振光来说,其焦点半峰全宽可达 144 nm,在横向上实现了超过衍射极限的超高分辨能力,特别适合共聚焦全内反射显微术,同时可以获得仅为 245 nm 的轴向透射深度。切向偏振光由于在界面处产生一个中心强度为零的环形光斑,而且没有沿光轴的电场分量,所以并不适用于共聚焦全内反射显微术。从对入射光有效数值孔径的数值计算可以看出,其对于焦点的半峰全宽和倏逝场的透射深度都有影响,薄且大的有效数值孔径能获得更小的半峰全宽;有效数值孔径上下限平方差越大,透射深度越浅。共聚焦全内反射显微术很好地结合了共聚焦显微与全内反射显微两种技术的优点,尤其是当使用径向偏振光作为入射光时,通过优化有效数值孔径,可获得样品近表面处的高横向分辨率和低轴向荧光噪声。

## 参 考 文 献

- 1 Jensen E C. Types of imaging, part 2: an overview of fluorescence Microscopy[J]. *Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 2012, 295(10): 1621-1627.
- 2 W E Trotman, D J Taatjes, E G Bovill. Multifluorescence confocal microscopy: application for a quantitative analysis of hemostatic proteins in human venous valves[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 931: 85-95.
- 3 B V R Tata, B Raj. Confocal laser scanning microscopy: applications in material science and technology [J]. *Bulletin of Materials Science*, 1998, 21(4): 263-278.
- 4 Jpawley. Fundamental Limits in Confocal Microscopy. In: J B pawley (ed.). *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, (2nd ed.)[M]. New York: Plenum, 1995. 19-37.
- 5 Axelrod D. Total internal reflection fluorescence microscopy [J]. *Methods in Cell Biology*, 2008, 89: 169-221.
- 6 M K Loder, T Tsuboi, G A Rutter. Live-cell imaging of vesicle trafficking and divalent metal ions by total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 950: 13-26.
- 7 Vizcay-Barrena G, Stephen E D, Martin-Fernandez M L, *et al.* Subcellular and single-molecule imaging of plant fluorescent proteins using total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) [J]. *J Experimental Botany*, 2011, 62(15): 5419-5428.
- 8 Meunier A, Jouannot O, Fulcrand R, *et al.* Coupling amperometry and total internal reflection fluorescence microscopy at ITO surfaces for monitoring exocytosis of single vesicles [J]. *Angewandte Chemie- International Edition*, 2011, 50(22): 5081-5084.
- 9 Wan Y, Ill W M A, Fan L, *et al.* Variable-angle total internal reflection fluorescence microscopy of intact cells of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Methods*, 2011, 7: 27.

- 10 J W M Chon, M Gu. Scanning total internal reflection fluorescence microscopy under one-photon and two-photon excitation: image formation [J]. *Appl Opt*, 2004, 43(5): 1063-1071.
- 11 T Ruckstuhl, S Seeger. Attoliter detection volumes by confocal total-internal-reflection fluorescence microscopy [J]. *Opt Lett*, 2004, 29(6): 569-571.
- 12 T P Burghardt, K Ajtai, J Borejdo. *In situ* single-molecule imaging with attoliter detection using objective total internal reflection confocal microscopy [J]. *Biochemistry*, 2006, 45(13): 4058-4068.
- 13 B Richards, E Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems.2. Structure of the image field in an aplanatic system [J]. *Proc R Soc Lond A*, 1959, 253(1274): 358-379.
- 14 M J Nasse, J C Woehl. Realistic modeling of the illumination point spread function in confocal scanning optical microscopy[J]. *J Opt Soc Am A*, 2010, 27(2): 295-302.
- 15 Watanabe K, Horiguchi N, Kano H, *et al.*. Optimized measurement probe of the localized surface plasmon microscope by using radially polarized illumination [J]. *Appl Opt*, 2007, 46(22): 4985-4990.
- 16 Kenny F, Lara D, Rodriguez-Herrera O G, *et al.*. Complete polarization and phase control for focus-shaping in high-NA microscopy [J]. *Opt Express*, 2012, 20(13): 14015-14029.
- 17 Fan F, Du T, Srivastava A K, *et al.*. Axially symmetric polarization converter made of patterned liquid crystal quarter wave plate[J]. *Opt Express*, 2012, 20(21): 23036-23043.
- 18 Cheng Kan, Tan Qiaofeng, Zhou Zhehai, *et al.*. Design of three-dimensional superresolution diffractive optical elements for Radially Polarized Beam[J]. *Acta Optica Sinica*, 2010, 30(11): 3295-3299.  
程侃, 谭峭峰, 周哲海, 等. 径向偏振光三维超分辨衍射光学元件设计[J]. *光学学报*, 2010, 30(11): 3295-3299.
- 19 Wang Yifan, Kuang Cuifang, Gu Zhaotai, *et al.*. Generation of polarization-adjustable cylindrical vector beams based on vortex phase modulation and interference[J]. *Acta Optica Sinica*, 2013, 33(10): 1005001.  
王轶凡, 匡翠方, 顾兆泰, 等. 基于相干涡旋位相调制的偏振可调柱状矢量偏振光的产生[J]. *光学学报*, 2013, 33(10): 1005001.
- 20 Huang Yan, Ye Hong'an, Gao Laixu, *et al.*. New method of generating vectorial polarized beams[J]. *Chinese Lasers*, 2012: 39(4): 0402004.  
黄妍, 叶红安, 高来勛, 等. 矢量偏振光束产生新方法[J]. *中国激光*, 2012, 39(4): 0402004.
- 21 Guo Ling, Li Jinsong. Phase pupil filter with cosine function for sharper focus of radially polarized beam[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2012, 49(12): 121001.  
郭玲, 李劲松. 余弦型相位光瞳滤波器缩小径向偏振光焦斑[J]. *激光与光电子学进展*, 2012, 49(12): 121001.
- 22 Chen Huifang, Liu Tao, Zhang Zaixuan. Shaper focus of radially polarized beam with a continuous phase filter[J]. *Chinese J Lasers*, 2012, 39(6): 0616001.  
陈慧芳, 刘涛, 张在宣. 连续相位滤波器缩小径向偏振光束焦斑[J]. *中国激光*, 2012, 39(6): 0616001.