

受激发射损耗显微中数值孔径对偏振光 聚焦特性的影响

张弘 冯继宏 张森

北京工业大学生命科学与生物医学工程学院, 北京 100124

摘要 受激发射损耗(STED)显微可以打破衍射极限,观测到小于200 nm的细胞器内部结构。利用径向偏振光通过大数值孔径(NA)成像可以提高STED系统的分辨率。计算了径向偏振光径向光强分布和纵向光强分布,并分析了数值孔径变化时径向光强分布和纵向光强分布的变化。结果表明:纵向聚焦光斑比径向聚焦光斑小,且随着NA的增大,径向偏振光径向聚焦光斑和纵向聚焦光斑尺寸均变小,强度曲线图的半峰全宽(FWHM)也变小,光强分布更加集中。因此,增大NA可以提高STED显微成像系统的分辨率。

关键词 成像系统;受激发射损耗显微;径向偏振光;聚焦特性;数值孔径;光强分布

中图分类号 O436.1

文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP53.041101

Effect of Numerical Aperture on Focal Spot of Radially Polarized Beam in Stimulated Emission Depletion Microscopy

Zhang Hong Feng Jihong Zhang Sen

College of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

Abstract Stimulated emission depletion (STED) microscopy can break the diffraction limit, which enables scientists to discern cell details smaller than 200 nm. By radially polarized beam through the high numerical aperture (NA) lens, the resolution of STED microscopy systems can be improved. The distribution of radial intensity and axial intensity is calculated, furthermore, the effect of NA on the distribution of radial intensity and axial intensity is analyzed. The research shows that the size of axial focal spot is smaller than that of the radial focal spot, the spot size decreases when the NA increases, the full width at half maximum (FWHM) of the depletion beam decreases as well, and the intensity distribution becomes more concentrated. The increase of NA can improve the resolution of STED microscopy systems.

Key words imaging systems; stimulated emission depletion microscopy; radially polarized beam; focusing properties; numerical aperture; intensity distribution

OCIS codes 110.0180; 110.3055; 100.2960

1 引言

随着偏振光的发展,入射光的偏振特性对分辨率的影响逐渐成为研究热点,常用的偏振光有线偏振光、圆偏振光、径向偏振光^[1]。径向偏振光是一种典型的矢量光束,在振幅及偏振态分布上均具有轴对称性,由于这种特殊的偏振特性,经过大数值孔径(NA)透镜强聚焦作用后的矢量光束在焦点附近得到较强的横向、纵向偏振光场,因而在焦点处可以得到很小的焦斑^[2],这种性质可以应用于高分辨率成像、激光扫描显微系

收稿日期: 2015-09-29; 收到修改稿日期: 2015-11-19; 网络出版日期: 2016-02-17

基金项目: 国家留学基金(015000514115013)

作者简介: 张弘(1990—),女,硕士研究生,主要从事超分辨显微镜等方面的研究。

E-mail: zhanghong16@emails.bjut.edu.cn

导师简介: 冯继宏(1964—),男,副研究员,主要从事生物医学光学检测、成像与仪器等方面的研究。

E-mail: jhfeng@bjut.edu.cn(通信联系人)

统、数据存储、光镊系统等领域^[3-5]。径向偏振光在聚焦时有更小的聚焦光斑直径,用径向偏振光作为超分辨荧光显微成像系统的照明光源,能够提高成像的分辨率^[6-7],在受激发射损耗(STED)显微成像中,损耗光的聚焦特性受到越来越多的关注。

受到衍射极限的限制,生物学家无法利用传统的显微技术观测到小于 200 nm 的细胞器内部结构^[8]。德国马普生物物理化学研究所 Hell 等^[9]发明的受激发射损耗显微成像突破了衍射极限,可以观测到衍射极限外的细胞结构。受激发射损耗显微成像可以快速地进行活体成像,可选择的荧光探针多,且对荧光染料依赖程度低,在生命科学中有着重要的研究价值^[10],因此备受关注。

受激发射损耗显微成像通过引入一束损耗光,以受激发射的方式减小有效荧光的发光面积,激发光激发样品的荧光基团形成一个艾里斑,损耗光生成中空型面包圈抑制艾里斑周围的荧光强度,使得仅能看到中心的强度^[11-12]。显微成像分辨率由聚焦光斑所激发的荧光光斑尺寸直接决定,因此,在 STED 显微镜中,压缩聚焦光斑的点扩展函数(PSF)成为提高分辨率的重要途径^[13-14]。有效地减小聚焦光斑的大小可以提高显微系统的分辨率。根据径向偏振光的性质,研究其在径向和纵向上的聚焦特性,可以进一步分析受激发射损耗显微成像系统的分辨率。

本文根据 Debye 矢量衍射积分公式,研究了 STED 显微成像中,损耗光经过 $0/2\pi$ 螺旋相位板,再经过大数值孔径透镜时的聚焦特性。计算了径向偏振光径向光强分布和纵向光强分布,并分析了当数值孔径变化时,径向光强分布和纵向光强分布的变化情况。结果表明得到的纵向聚焦光斑比径向聚焦光斑小,随着 NA 的增大,径向偏振光径向聚焦光斑和纵向聚焦光斑尺寸都变小,强度曲线图的半峰全宽(FWHM)也变小,光强分布更加集中。增大 NA 可以提高受激发射损耗显微成像系统的分辨率。

2 聚焦光场的理论计算

在 STED 系统中,利用径向偏振光经过 $0/2\pi$ 螺旋相位板对相位进行编码^[15],通过大数值孔径聚焦成像。图 1 所示为径向偏振光经过 $0/2\pi$ 螺旋相位板后,被大数值孔径聚焦的聚焦模型,可以用 Richards & Wolf 矢量衍射理论计算得到焦平面附近的光场分布为^[16-18]

$$\mathbf{E}(r_0, \varphi_0, z_0) = ic \iint \sin \theta A_1(\theta, \varphi) A_2(\theta, \varphi) \begin{bmatrix} p_x \\ p_y \\ p_z \end{bmatrix} \exp\{ikn[z_0 \cos \theta + r_0 \sin \theta \cos(\varphi - \varphi_0)]\} \exp(i\varphi) d\theta d\varphi, \quad (1)$$

式中 $A_1(\theta, \varphi)$ 为入射光的强度函数,在仿真中一般设为 1, $A_2(\theta, \varphi)$ 是一个与成像透镜结构相关的 3×3 矩阵,

$\begin{bmatrix} p_x \\ p_y \\ p_z \end{bmatrix}$ 是与入射光偏振对应的单位矩阵^[16], $A_2(\theta, \varphi) = \sqrt{\cos \theta} \cdot \mathbf{v}(\theta, \varphi)$, $\mathbf{v}(\theta) = \sqrt{\cos \theta}$,

$$\mathbf{v}(\theta, \varphi) = \begin{bmatrix} 1 + (\cos \theta - 1) \cos^2 \varphi & (\cos \theta - 1) \cos \varphi \sin \varphi & -\sin \theta \cos \varphi \\ (\cos \theta - 1) \cos \varphi \sin \varphi & 1 + (\cos \theta - 1) \sin^2 \varphi & -\sin \theta \cos \varphi \\ \sin \theta \cos \varphi & \sin \theta \cos \varphi & \cos \theta \end{bmatrix}.$$

当入射光为径向偏振光时, $\begin{bmatrix} p_x \\ p_y \\ p_z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos \theta \\ \sin \theta \\ 0 \end{bmatrix}$, 整理得到

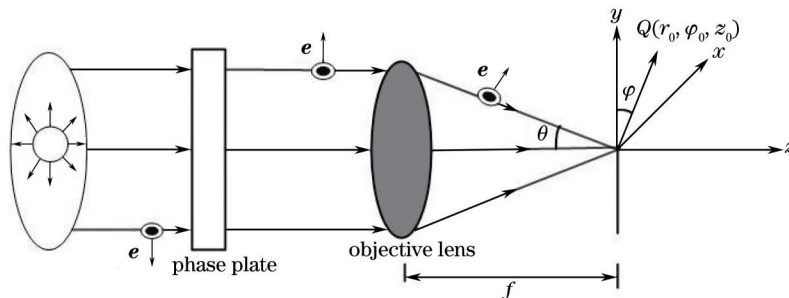


图 1 径向偏振光聚焦模型

Fig.1 Focal spot model of radially polarized beam

$$\mathbf{E}(r_0, \varphi_0, z_0) = -ic \iint \sin \theta \sqrt{\cos \theta} \exp\{ikn[z_0 \cos \theta + r_0 \sin \theta \cos(\varphi - \varphi_0)]\} \begin{bmatrix} \cos \theta \cos \varphi \mathbf{e}_x \\ \cos \theta \sin \varphi \mathbf{e}_y \\ \sin \theta \mathbf{e}_z \end{bmatrix} d\theta d\varphi. \quad (2)$$

由关系式 $\mathbf{e}_\varphi = \mathbf{e}_y \cos \varphi - \mathbf{e}_x \sin \varphi$, $\mathbf{e}_r = \mathbf{e}_x \cos \varphi + \mathbf{e}_y \sin \varphi$, 可以得到径向和纵向分量为

$$\mathbf{E}_r = -ic \iint \sin \theta \sqrt{\cos \theta} \cos \theta \cos(\varphi - \varphi_0) \exp\{ikn[z_0 \cos \theta + r_0 \sin \theta \cos(\varphi - \varphi_0)]\} d\theta d\varphi, \quad (3)$$

$$\mathbf{E}_z = -ic \iint \sin^2 \theta \sqrt{\cos \theta} \exp\{ikn[z_0 \cos \theta + r_0 \sin \theta \cos(\varphi - \varphi_0)]\} d\theta d\varphi. \quad (4)$$

相位延迟因子 φ 可以根据

$$\int_0^{2\pi} \cos(n\varphi) \exp(ikr \sin \theta \cos \varphi) d\varphi = 2\pi i^n J_n(krn \sin \theta) \quad (5)$$

进行化简, 得到径向偏振光焦平面光场的径向偏振分量和纵向偏振分量为

$$\mathbf{E}_r(r, \varphi, z) = 2c \int_0^\alpha \sin(2\theta) \sqrt{\cos \theta} J_1(krn \sin \theta) \exp(iknz \cos \theta) d\theta, \quad (6)$$

$$\mathbf{E}_z(r, \varphi, z) = 2ic \int_0^\alpha \sin^2 \theta \sqrt{\cos \theta} J_0(krn \sin \theta) \exp(iknz \cos \theta) d\theta, \quad (7)$$

式中 $k = 2\pi/\lambda$, θ 为孔径角度, φ 为相位延迟因子, $J_n(t)$ 为第一类 n 阶贝塞尔函数。

根据(6)、(7)式, 用 Matlab 可以模拟得到图 2 所示径向光强分布 $|\mathbf{E}_r|^2$, 图 3 所示纵向光强分布 $|\mathbf{E}_z|^2$, 图 4 所示焦平面上的总强度分布 $|\mathbf{E}|^2$ 。

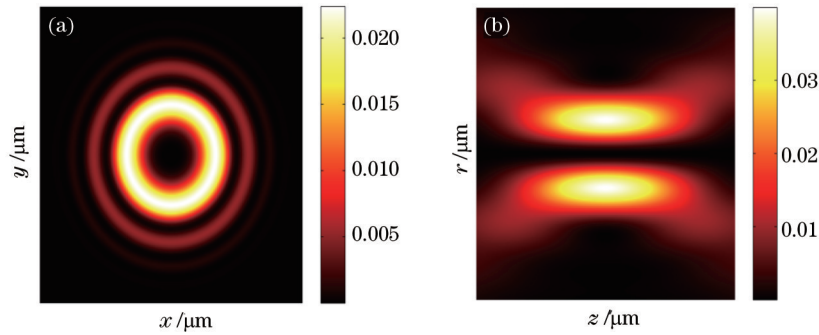


图 2 径向偏振光在 NA 为 1.32 时的径向强度分布。(a) 横切焦斑图; (b) 纵切焦斑图

Fig.2 Radial intensity distribution of radially polarized beam with NA of 1.32. (a) Transverse focal spot; (b) longitudinal focal spot

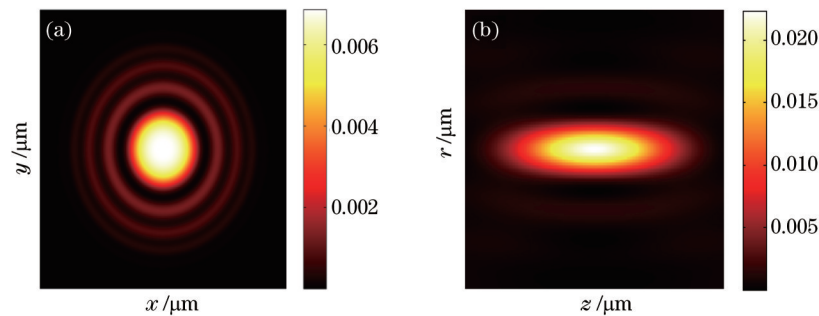


图 3 径向偏振光在 NA 为 1.32 时的纵向强度分布。(a) 横切焦斑图; (b) 纵切焦斑图

Fig.3 Axial intensity distribution of radially polarized beam with NA of 1.32. (a) Transverse focal spot; (b) longitudinal focal spot

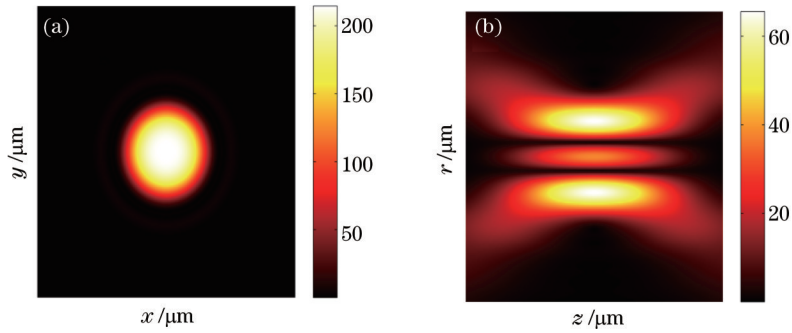


图4 径向偏振光在NA为1.32时的总强度分布。(a) 横切焦斑图; (b) 纵切焦斑图

Fig.4 Total intensity distribution of radially polarized beam with NA of 1.32. (a) Transverse focal spot; (b) longitudinal focal spot

3 模拟结果分析

显微成像分辨率直接由聚焦光斑所激发的荧光光斑尺寸所决定,因此在STED显微镜中,压缩聚焦光斑的点扩展函数成为提高分辨率的重要途径^[19]。有效地减小聚焦光斑的大小可以提高显微系统的分辨率。所以,根据径向偏振光的性质,研究其在径向和纵向上的聚焦特性,可以进一步分析STED显微成像系统的分辨率,为提高显微成像系统的分辨率奠定理论基础。

为了使损耗光为面包圈型的聚焦光斑,在大数值孔径下利用 $0/2\pi$ 螺旋相位板对入射光进行相位编码^[20-21]。大数值孔径直接影响STED显微成像系统的分辨率。显微成像系统的分辨率分为径向分辨率和纵向分辨率,分别研究了大数值孔径对径向聚焦光斑和纵向聚焦光斑的影响。

图5所示为NA为0.8、1.0、1.2时径向强度分布的横切焦斑图和纵切焦斑图。图6所示为NA为0.8、1.0、

表1 径向焦斑和纵向焦斑FWHM随NA的变化

Table 1 FWHM of radial and axial focal spots with different NA values

NA	Radial FWHM / μm	Axial FWHM / μm
0.8	0.88	0.74
1.0	0.70	0.60
1.2	0.58	0.54

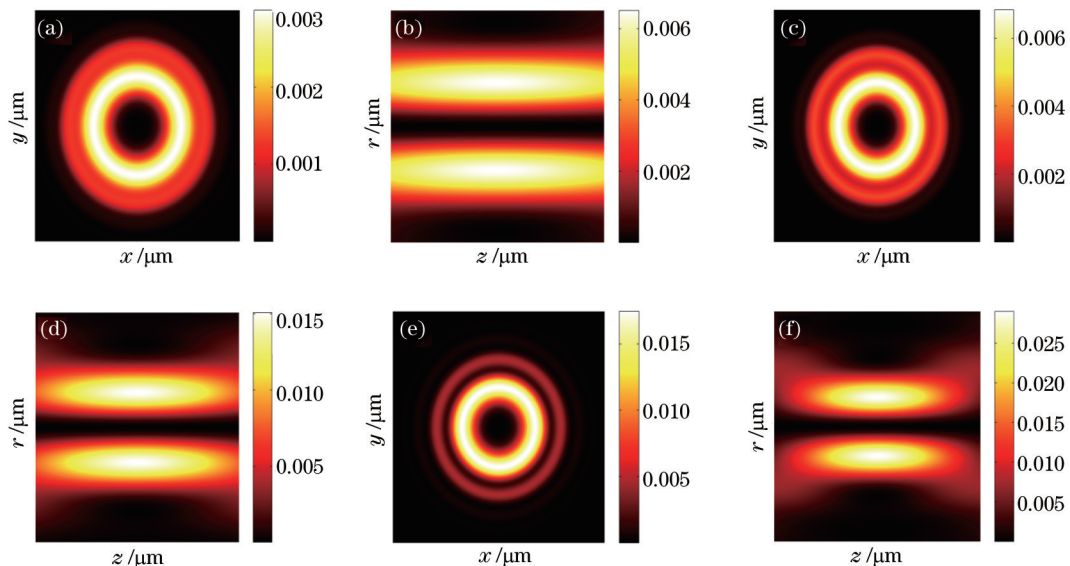


图5 (a) (c) (e) NA为0.8、1.0、1.2时的径向强度分布横切焦斑图; (b) (d) (f) NA为0.8、1.0、1.2时的径向强度分布纵切焦斑图

Fig.5 (a) (c) (e) Transverse focal spots of radial intensity distribution with NA of 0.8, 1.0, 1.2, respectively;

(b) (d) (f) longitudinal focal spots of radial intensity distribution with NA of 0.8, 1.0, 1.2, respectively

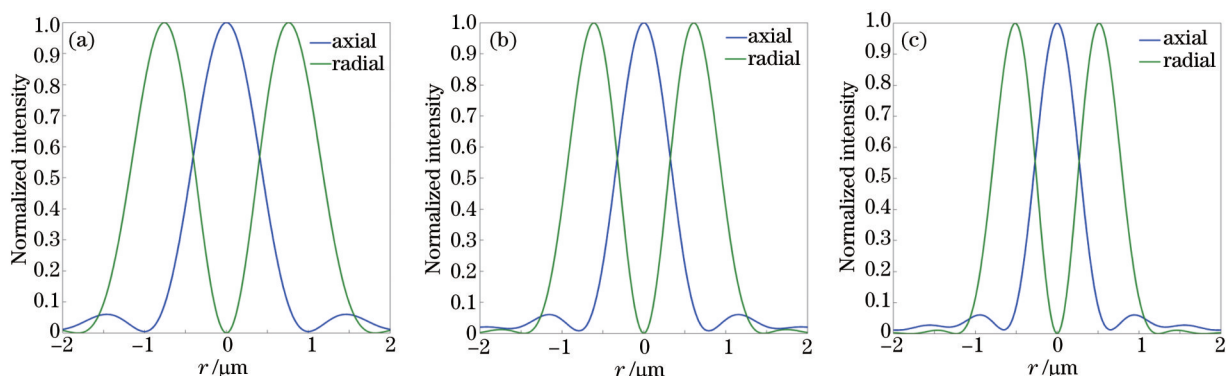


图6 不同数值孔径时径向偏振光的径向和纵向强度曲线。(a) $NA=0.8$; (b) $NA=1.0$; (c) $NA=1.2$

Fig.6 Radial intensity and axial intensity of radially polarized beam under different numerical apertures.

(a) $NA=0.8$; (b) $NA=1.0$; (c) $NA=1.2$

1.2 时的径向聚焦光斑分布图和纵向聚焦光斑分布图。表 1 所示为径向聚焦光斑和纵向聚焦光斑 FWHM 随 NA 的变化。由图 5 可知,随着 NA 增大,光强分布更加集中。由图 6 和表 1 可知,纵向聚焦光斑比径向聚焦光斑小,当 NA 由 0.8 变为 1.2 时,径向和纵向的聚焦光斑都变小,径向聚焦光斑 FWHM 由 0.88 减小到 0.58,纵向聚焦光斑 FWHM 由 0.74 减小到 0.54。因此,增大 NA 可以提高 STED 显微成像系统的分辨率。

4 结 论

得到的纵向聚焦光斑比径向聚焦光斑小,且随着 NA 的增大,径向偏振光径向聚焦光斑和纵向聚焦光斑尺寸都变小,强度曲线图的半峰全宽也变小。当 NA 由 0.8 变为 1.2 时,径向和纵向聚焦光斑都变小,径向聚焦光斑 FWHM 由 0.88 减小到 0.58,纵向聚焦光斑 FWHM 由 0.74 减小到 0.54,光强分布更为集中。因此,增大 NA 可以提高 STED 显微成像系统的分辨率。

参 考 文 献

- Xiao Yun, Zhang Yunhai, Yang Haomin, *et al.*. Focusing of high numerical aperture azimuthally polarized beams[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2015, 52(3): 031801.
肖 昀, 张运海, 杨皓旻, 等. 大数值孔径物镜下角向偏振光聚焦特性研究[J]. 激光与光电子学进展, 2015, 52(3): 031801.
- Yan Jie, Lu Yonghua, Wang Pei, *et al.*. Study of focal spot of radially polarized beam[J]. Acta Optica Sinica, 2010, 30(12): 3597-3603.
阎 杰, 鲁拥华, 王 沛, 等. 径向偏振光聚焦光斑研究[J]. 光学学报, 2010, 30(12): 3597-3603.
- Lieb M A, Meixner A J. A high numerical aperture parabolic mirror as imaging device for confocal microscopy[J]. Opt Express, 2001, 8(7): 458-474.
- Ren Guangsen, Wu Wuming, Ning Yu, *et al.*. Tight focusing of a radially polarized coherent beams array[J]. Chinese J Lasers, 2014, 41(1): 0102003.
任广森, 吴武明, 宁 禹, 等. 径向偏振相干光束阵列的深聚焦[J]. 中国激光, 2014, 41(1): 0102003.
- Zhou Z H, Tan Q F, Jin G F. Focusing of high polarization order axially-symmetric polarized beams[J]. Chin Opt Lett, 2009, 7(10): 938-940.
- Youngworth K S, Brown T G. Inhomogeneous polarization in scanning optical microscopy[C]. SPIE, 2000, 3919: 75-85.
- Zhan Q W, Leger J R. Microellipsometer with radial symmetry[J]. Appl Opt, 2002, 41(22): 4630-4637.
- Huang B, Hazen B, Zhuang X W. Breaking the diffraction barrier: Super-resolution imaging of cells[J]. Cell, 2010, 143(7): 1047-1058.
- Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy[J]. Opt Lett, 1994, 19(11): 780-782.
- Wu Meirui, Yang Xibin, Xiong Daxi, *et al.*. Structured illumination fluorescence microscopy: Diffraction-limit breaking principle and application in life science[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2015, 52(1): 010003.
吴美瑞, 杨西斌, 熊大曦, 等. 结构光照明荧光显微镜突破衍射极限的原理和在生命科学中的应用[J]. 激光与光电子学进展, 2015, 2015, 52(1): 010003.

- 11 Hao X, Kuang C F, Wang T T, *et al.*. Effects of polarization on the de-excitation dark focal spot in STED microscopy[J]. *J Opt*, 2010, 12(11): 115707.
- 12 Testa I, Urban N T, Jakobs S, *et al.*. Nanoscopy of living brain slices with low light levels[J]. *Neuron*, 2012, 75(6): 992-1000.
- 13 Hell S W. Breaking Abbe's barrier: Diffraction-unlimited resolution in far-field microscopy[J]. *Cytometry Part A*, 2007, 71A(9): 742-743.
- 14 Moneron G, Hell S W. Two-photon excitation STED microscopy[J]. *Opt Express*, 2009, 17(17): 14567-14573.
- 15 Xiong Mengsu, Ding Panfeng, Pu Jixiong. Analysis on the beam characteristic of Gaussian beam passing multi-level spiral phase plate[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2015, 52(8): 081902.
熊梦苏, 丁攀峰, 蒲继雄. 高斯光束经过多阶螺旋相位板后光束特性研究[J]. *激光与光电子学进展*, 2015, 52(8): 081902.
- 16 Richards B, Wolf E. Electromagnetic diffraction in optical systems. II. Structure of the image field in an aplanatic system [J]. *Proc Roy Soc A*, 1959, 253(1247): 358-379.
- 17 Wolf E. Electromagnetic diffraction in optical systems. I. An integral representation of the image field[J]. *Proc Roy Soc A*, 1959, 253(1274): 349-357.
- 18 Youngworth K S, Brown G. Focusing of high numerical aperture cylindrical-vector beams[J]. *Opt Express*, 2000, 7(2): 77-87.
- 19 Guo Xiaohu, Zhao Yuejin, Dong Liquan, *et al.*. Analysis of effect of phase plate decenter on wavefront coding imaging[J]. *Chinese J Lasers*, 2015, 42(8): 0809002.
郭小虎, 赵跃进, 董立泉, 等. 相位板偏心对波前编码系统的成像影响分析[J]. *中国激光*, 2015, 42(8): 0809002.
- 20 Westphal V, Blanca C M, Dyba M, *et al.*. Laser-diode-stimulated emission depletion microscopy[J]. *Appl Phys Lett*, 2003, 82(18): 3125-3127.
- 21 Westphal V, Kastrop L, Hell S W. Lateral resolution of 28 nm ($\lambda/25$) in far-field fluorescence microscopy[J]. *Appl Phys*, 2003, 77(4): 377-380.

栏目编辑: 吴秀娟