

并行 STED 显微中光学系统对荧光擦除图案的影响

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 并行受激发射损耗(STED)显微术采用周期性排列的光学格子作为荧光抑制图案并行实现多点荧光擦除, 可以有效地提升显微成像的时间分辨率。本文建立了并行 STED 显微成像系统的简化光学系统模型, 在此基础上推导出受光学参数影响的并行荧光擦除图案周期公式, 来阐明辅助物镜及显微物镜对该周期的影响机理。由该公式, 解出了能产生更小周期并行荧光擦除图案的最优光学参数。数值仿真结果显示, 本文方法能产生出周期小至 $276\text{ nm} \times 276\text{ nm}$ 的正方形网格状并行荧光擦除图案。

关键词 显微; 荧光显微镜; 并行受激发射损耗; 荧光擦除图案; 光学系统参数; 数值仿真

中图分类号 TH742

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP57.091801

Effect of Optical System on the Fluorescence Depletion Pattern in the Parallelized STED Microscopy

Zhang Shuochen, Feng Jihong*

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

Abstract In a stimulated emission depletion (STED) microscopy, a periodically arranged optical lattices is used as fluorescence depletion pattern to achieve parallelized multi-point fluorescence depletion, which can effectively improve the time resolution of imaging. We propose a simple optical system model of microscopic imaging system in parallelized STED microscopy and derive out a formula to illuminate the effect mechanism of tube lens and microscope objective on parallelized fluorescence depletion pattern periodicity in the model. Then we work out the optimum optical parameters which are used to generate a parallelized fluorescence depletion pattern with smaller periodicity from our formula. The numerical simulation result shows that square lattice-like parallelized fluorescence depletion pattern with a periodicity as small as $276\text{ nm} \times 276\text{ nm}$ was generated with our method.

Key words microscopy; fluorescence microscopy; parallelized stimulated emission depletion; fluorescence depletion pattern; optical system parameters; numerical simulation

OCIS codes 180.2520; 100.6640; 260.3160; 080.1010

1 引言

受激发射损耗(STED)显微术为生命科学研究提供了一种强大的亚衍射极限尺度成像手段, 但继承自共聚焦显微镜的点扫描成像方式限制了它的成像速度, 使其难以满足许多生命科学研究的需要^[1-7]。并行 STED 显微术改进了传统 STED 显微术的荧光擦除图案, 使用空间上周期性排列的面包光圈阵列或多光束干涉产生的光学格子作为荧光擦

除图案, 有效提升了 STED 显微成像速度, 可满足蛋白质互作、细胞发育等更多微观生命活动机理研究的需要^[8-9]。

2011 年, Bingen 等^[9]使用光纤分束器首次实现了并行 STED 成像, 但受限于光学系统复杂度及可获得的损耗光激光器功率, 该方法难以实现多于四个“面包”光圈的并行荧光擦除图案。2013 年, Chmyrov 等^[10]改用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

收稿日期: 2019-09-17; 修回日期: 2019-09-20; 录用日期: 2019-09-26

* E-mail: jhfeng@bjut.edu.cn

圈所含的损耗光强过低,不能满足 STED 荧光擦除的需要。2014 年, Yang 等^[11]采用多光束干涉产生的光学格子作为并行荧光擦除图案,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。在他们的方法中,使用两对传播平面相互垂直且偏振态正交的线性偏振损耗光束产生出的正方形光学格子周期更小,且可实现均匀的横向与纵向成像分辨率,是最优的并行荧光擦除图案之一^[11-14]。2015 年, Bergermann 等^[15]配合使用迈克耳孙干涉仪及类马赫-曾德尔干涉仪同样产生出正方形网格状并行荧光擦除图案,且通过调节迈克耳孙干涉仪参考臂的光程,该方法可以实现快速轴向扫描。

已报道相关文献中,初步讨论了聚焦区域损耗光束的数量、偏振状态及其与光轴的夹角对并行荧光擦除图案的影响,但决定聚焦区域损耗光束与光轴夹角的关键光学参数对并行荧光擦除图案的影响机理尚未阐明^[11-13,15]。因此,本文将并行 STED 显微成像系统简化为一个理想光学系统模型,探究辅

助物镜及显微物镜光学参数对并行荧光擦除图案周期的影响机理,以找出能产生更小周期并行荧光擦除图案的最佳光学参数。仿真结果显示,使用最佳光学参数可以产生更小周期的正方形网格状并行荧光擦除图案,有助于提升成像分辨率。

2 基本原理

并行 STED 显微镜中,分别通过空间光调制器、渥拉斯顿棱镜或迈克耳孙干涉仪配合类马赫-曾德尔干涉仪将激光器发出的损耗光束调制成两对偏振态正交且传播平面垂直的等振幅、轴对称损耗光束;这两对损耗光自辅助物镜物方焦点处发出,斜入射由辅助物镜及显微物镜组成的显微成像系统,经显微物镜聚焦后,四束损耗光会聚于样本平面上的焦点处发生干涉,产生出正方形网格状并行荧光擦除图案^[11-13,15]。我们将这一系统简化为一个理想光学系统模型,它由辅助物镜及显微物镜组成,如图 1 所示。

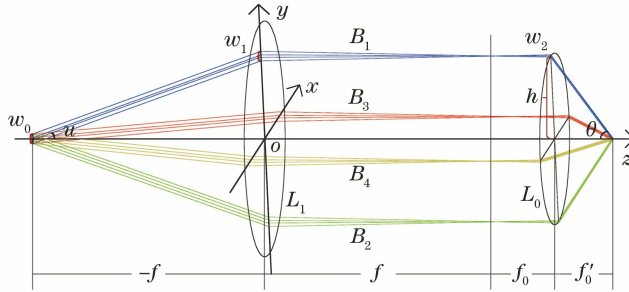


图 1 并行 STED 显微成像系统的简化理想光学系统模型

Fig. 1 Parallelized STED simplified perfect optical system model of microscopic imaging system

图 1 中 o 为坐标系原点,水平偏振光振动方向为 x 轴,竖直偏振光振动方向为 y 轴,系统光轴(显微物镜光轴)为 z 轴; L_1 为辅助物镜; L_0 为显微物镜; $B_1 \sim B_4$ 为四束损耗光束,其中 B_1, B_2 为竖直偏振光束, B_3, B_4 为水平偏振光束; u 是损耗光束入射辅助物镜 L_1 的物方倾斜角; h 是损耗光束入射显微物镜 L_0 的入射高度; θ 是损耗光束在样本平面焦点处与光轴的夹角; w_0, w_1, w_2 分别是损耗光束在辅助物镜物方焦平面上、辅助物镜上及显微物镜后孔径面上的光束直径; f 为辅助物镜焦距,因为辅助物镜放置于空气中,所以其前焦距等后焦距的负数; f_0 和 f'_0 分别为显微物镜的物方焦距与像方焦距。

根据多光束干涉原理,并行荧光擦除图案周期与聚焦区域损耗光束与光轴夹角的正弦值成反比;且根据几何光学原理,聚焦区域损耗光束与光轴的

夹角等于损耗光束入射高度 h 除以显微物镜的像方焦距 f'_0 ,而 f'_0 等于由显微物镜 NA 决定的入瞳直径 D 的一半除以显微物镜半孔径角的正切值,显微物镜的半孔径角等于 NA 除以显微物镜浸油折射率 n 的商的反正弦值^[12,13,16-19]。由此推导出受显微成像系统光学参数影响的并行荧光擦除图案周期公式为

$$P = \frac{\lambda D \sqrt{n^2 - (NA)^2} \sqrt{1 + \frac{4(NA)^2 f^2 \tan^2(u)}{D^2 [n^2 - (NA)^2]}}}{4NAfn \tan(u)}, \quad (1)$$

式中: P 为并行荧光擦除图案周期; λ 为真空中的损耗光波长。在并行 STED 显微镜使用的高 NA 平场复消色差油浸显微物镜中,以最后一组透镜的镜框为孔径光阑,且因为孔径光阑之前再无任何透镜,所以孔径光阑即为物镜入瞳,因此在本文模型中,入

瞳直径 D 等于显微物镜的后孔径直径^[20,21]。且根据几何光学原理易知,当损耗光束入射进显微物镜 NA 决定的入瞳最边缘位置时,损耗光束与光轴间

夹角最大,据此约束条件可以求得受损耗光束物方倾斜角 u 影响的最佳辅助物镜焦距 f_{optimum} 表达式^[19]

$$f_{\text{optimum}} = \frac{\sqrt{D^2 (NA)^2 n^2 - 4DNAn\omega_0 \tan(u) \sqrt{n^2 - (NA)^2} + DNAn}}{4NAn \tan(u)} \quad (2)$$

将(2)式代入(1)式中可消去自变量 f ,整理后得到受损耗光束入射显微成像系统的物方倾斜角 u 影响的并行荧光擦除图案周期公式:

$$P = \frac{\lambda D \sqrt{n^2 - (NA)^2} \sqrt{1 + \frac{[\sqrt{D^2 (NA)^2 n^2 - 4DNAn\omega_0 \tan(u) \sqrt{n^2 - (NA)^2} + DNAn]^2}{4D^2 n^2 [n^2 - (NA)^2]}}}{\sqrt{D^2 (NA)^2 n^2 - 4DNAn\omega_0 \tan(u) \sqrt{n^2 - (NA)^2} + DNAn}} \quad (3)$$

由实际情况可知,并行荧光擦除图案周期一定为实数,所以要求被开方数大于等于 0,再结合物方倾斜角的物理意义,解得物方倾斜角 u 的定义域为

$$0 < u \leq \arctan \left[\frac{D^2 (NA)^2 n^2}{4DNAn\omega_0 \sqrt{n^2 - (NA)^2}} \right] \quad (4)$$

3 分析与讨论

为揭示光学参数对并行荧光擦除图案周期的影响机理,对受物方倾斜角 u 影响的并行荧光擦除图案周期公式(3)进行一阶求导,导函数如下所示:

$$\begin{cases} \frac{dP}{du} = \frac{\lambda D \omega_0 [n^2 - (NA)^2] [\tan^2(u) + 1]}{[D^2 (NA)^2 n^2 + DNAnB - 4DNAn\omega_0 \tan(u) \sqrt{n^2 - (NA)^2} - 2\omega_0 \tan(u) B \sqrt{n^2 - (NA)^2}]^2} \\ B = \sqrt{D^2 (NA)^2 n^2 - 4DNAn\omega_0 \tan(u) \sqrt{n^2 - (NA)^2}} \end{cases} \quad (5)$$

由(5)式可见,导函数表达式十分复杂,为更直观地展现物方倾斜角对并行荧光擦除图案周期的影响规律,本文理论计算了并行荧光擦除图案周期的导函数(5)式、原函数(3)式及最佳辅助物镜焦距(2)式随物方倾斜角 u 增大的变化曲线。在理论计算过程中,参照参考文献[22]中例 1 所示结构,建立了一个 $NA=1.4$ 、后孔径直径为 8.51 mm 的平场复消色差油浸显微物镜,物镜浸油的折射率 $n=1.515$,且损耗光束直径 $\omega_0=1$ mm,损耗光束在真空中的波长为 760 nm。在此条件下,由(4)式算得物方倾斜角 u 定义域的上限为 82.688° ,且考虑损耗光束与光轴夹角的可实现调控精度,令物方倾斜角 u 从 0.01° 开始以 0.01° 为步长逐步增加到 82.68° ,理论计算结果如图 2 所示。

并行荧光擦除图案周期的导函数随物方倾斜角 u 的变化曲线如图 2(a) 所示,可见在定义域内导函数 dP/du 恒大于零,所以在定义域范围内原函数并行荧光擦除图案的周期 P 随物方倾斜角 u 增大而单调递增,如图 2(b) 中的实线所示。同时,最佳辅

助物镜焦距 f_{optimum} 随物方倾斜角 u 的变化曲线如图 2(b) 中的虚线所示,随物方倾斜角 u 增大,最佳辅助物镜焦距 f_{optimum} 单调减小。所以当损耗光束入射显微成像系统的物方倾斜角越小且辅助物镜焦距越大时,系统所产生的并行荧光擦除图案周期越小。

在实际情况中标准透镜可取得的最大焦距为 1000 mm,通过特殊定制可以取得更大焦距的辅助物镜,但考虑到光学系统中过长传播距离对损耗光束能量的衰减及定制透镜带来的成本上升等副作用,可以认为显微成像系统中最佳的辅助物镜焦距为可获得标准透镜的最大焦距 1000 mm,且图 2(b) 虚线中与之最为匹配的物方倾斜角为 0.24° ,所以可以认为损耗光束入射显微成像系统的最佳物方倾斜角 $u=0.24^\circ$ 。与此同时,在最佳辅助物镜焦距和最佳物方倾斜角条件下,损耗光束直径改变对并行荧光擦除图案周期的影响非常小可以忽略,所以可以认为激光器出射光束的原始直径就是损耗光束入射显微成像系统时的最佳光束直径。

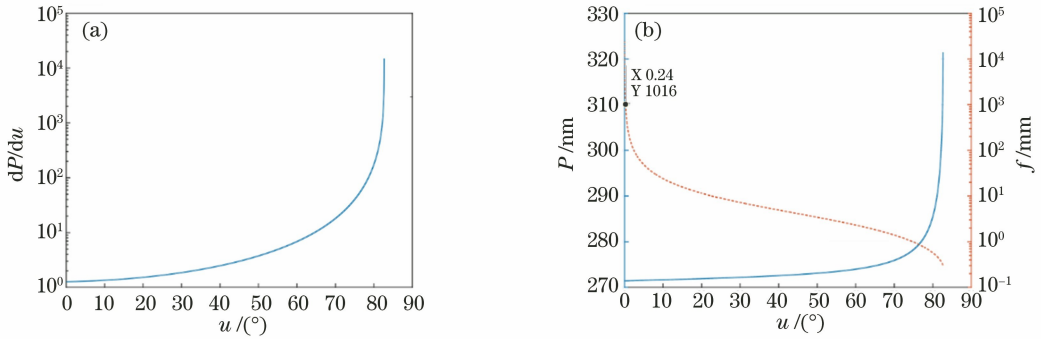


图2 理论计算结果。(a)并行荧光擦除图案周期的导数 dP/du 随物方倾斜角 u 增大的变化曲线；

(b)并行荧光擦除图案周期 P 及最佳辅助物镜焦距 $f_{optimum}$ 随物方倾斜角 u 增大的变化曲线

Fig. 2 Theoretical calculation results. (a) Derived function of parallelized fluorescence depletion patterns periodicity dP/du with inclination angle of object space u ; (b) parallelized fluorescence depletion patterns periodicity P and the optimum tube lens focal length $f_{optimum}$ with inclination angle of object space u

本文使用 Zemax 软件按图 1 所示系统设计光路装置,仿真研究了最佳光学参数所产生的并行荧光擦除图案。在仿真过程中,使用四个波长为 760 nm 且光束大小为 1 的等功率线性偏振高斯光源来模拟四束损耗光 $B_1 \sim B_4$,使用一个焦距为 1000 mm 的双胶合消色差透镜作为辅助物镜,使用上文理论计算中参照参考文献[22]中例 1 所示结构建立的平场复消色差油浸物镜作为显微物镜,该显微物镜的 $NA=1.4$ 、后孔径直径为 8.51 mm 且浸油

折射率为 1.515。为探测损耗光束干涉产生的并行荧光擦除图案,在样本平面焦点处同轴放置两个轴向间距为 1 nm、横纵半宽均为 830 nm 的矩形探测器,令它们分别探测水平偏振损耗光束或竖直偏振损耗光束干涉产生的相干照度。因两探测器间距远小于衍射极限,所以可以认为它们分别接收到并行荧光擦除图案的水平偏振分量和竖直偏振分量,两探测器探测结果叠加,即可得到样本平面上并行荧光擦除图案的光照强度分布,仿真结果如图 3 所示^[23-25]。

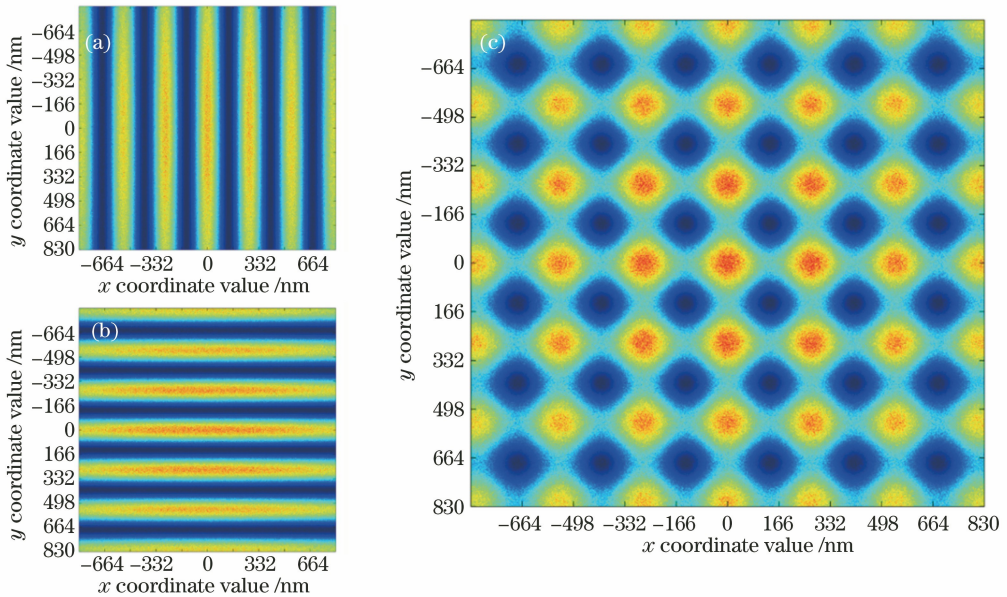


图3 并行荧光擦除图案的仿真结果。(a)水平偏振损耗光束在聚焦区域产生的干涉图样；

(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

Fig. 3 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

图 3(a)为探测器 1 接收到的水平偏振损耗光束 B_3 、 B_4 在样本平面上干涉产生的相干照度分布,它是一组空间上横向(x 方向)周期性排列的竖直光学条纹;图 3(b)为探测器 2 接收到的竖直偏振损耗光束 B_1 、 B_2 在样本平面上干涉产生的相干照度分布,它是一组空间上纵向(y 方向)周期性排列的水平光学条纹;二者叠加后,得到并行荧光擦除图案在样本平面上的光照强度分布:一个周期小至 $276\text{ nm} \times 276\text{ nm}$ 的正方形光学格子,如图 3(c)所示。该仿真图案周期为此条件下衍射极限(271.429 nm)的 1.017 倍,且与此条件下由(3)式算得到的理论计算周期相一致,仿真周期与理论计算周期期间的误差仅为 1.65%。而另一方面,已报道方法在同样损耗光波长下,使用 $NA=1.49$ 的显微物镜仅产生出周期小至 $290\text{ nm} \times 290\text{ nm}$ 的正方形光学格子,该图案周期为此条件下衍射极限(255.034 nm)的 1.137 倍^[11]。这一数据对比说明(3)式可以预测受并行 STED 显微成像系统光学参数影响的并行荧光擦除图案周期,它揭示了辅助物镜焦距及损耗光束入射显微成像系统的物方倾斜角对并行荧光擦除图案周期的影响机理,且可由(2)式、(5)式计算出能产生更小周期并行荧光擦除图案的最佳光学参数。

4 结 论

本文将并行 STED 显微镜中辅助物镜和显微物镜组成的显微成像系统简化为一个理想光学系统模型,基于此模型推导出受显微成像系统光学参数影响的并行荧光擦除图案周期公式,该公式揭示了光学参数对并行荧光擦除图案周期的影响机理。通过本文提出的公式,可计算出产生更小周期并行荧光擦除图案的最佳光学参数,提高成像分辨率,有助于促进并行 STED 显微成像技术的发展。

参 考 文 献

- [1] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy [J]. *Optics Letters*, 1994, 19(11): 780-782.
- [2] Klar T A, Hell S W. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy [J]. *Optics Letters*, 1999, 24(14): 954-956.
- [3] Huang B, Babcock H, Zhuang X W. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells [J]. *Cell*, 2010, 143(7): 1047-1058.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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, 杨皓曼, 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.
- [7] 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.
- [8] Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. SHORT COMMUNICATION [J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 198(2): 82-87.
- [9] Bingen P, Reuss M, Engelhardt J, et al. Parallelized STED fluorescence nanoscopy [J]. *Optics Express*, 2011, 19(24): 23716-23726.
- [10] Chmyrov A, Keller J, Grotjohann T, et al. Nanoscopy with more than 100, 000 'doughnuts' [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(8): 737-740.
- [11] Yang B, Przybilla F, Mestre M, et al. Large parallelization of STED nanoscopy using optical lattices [J]. *Optics Express*, 2014, 22(5): 5581-5589.
- [12] Yang B, Fang C Y, Chang H C, et al. Polarization effects in lattice - STED microscopy [J]. *Faraday Discussions*, 2015, 184: 37-49.
- [13] 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.
- [14] Keller J, Schönle A, Hell S W. Efficient fluorescence inhibition patterns for RESOLFT microscopy [J]. *Optics Express*, 2007, 15(6): 3361-3371.
- [15] Bergermann F, Alber L, Sahl S J, et al. 2000-fold

- parallelized dual-color STED fluorescence nanoscopy [J]. *Optics Express*, 2015, 23(1): 211-223.
- [16] Yuan L, Wang G P, Huang X K. Arrangements of four beams for any Bravais lattice [J]. *Optics Letters*, 2003, 28(19): 1769-1771.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Li X T, Cen Z F. Geometrical optics, aberrations and optical design [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2014: 35-56.
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: 35-56.
- [20] Zhang Y M. Apply optics [M]. Beijing: Publishing House of Electronics Industry, 2008: 394-408.
张以谟. 应用光学 [M]. 北京: 电子工业出版社, 2008: 394-408.
- [21] Warren J S. Modern optical engineering [M]. Zhou H X, Cheng Y F, Transl. 4th ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2011: 140-160.
沃伦 J 史密斯. 现代光学工程 [M]. 周海宪, 程云芳, 译. 第 4 版. 北京: 化学工业出版社, 2011: 140-160.
- [22] Hachioji. Immersion microscope objective: US5517360 [P]. 1996-05-14.
- [23] Liang Q T. Physical optics [M]. 5th ed. Beijing: Electronic Industry Press, 2018: 48-117.
梁铨廷. 物理光学 [M]. 第 5 版. 北京: 电子工业出版社, 2018: 48-117.
- [24] Ji J R. Higher optics course-basic electromagnetic theory of optics [M]. Beijing: Science Press, 2007: 97-131.
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: 97-131.
- [25] Liao Y B. Polarization optics [M]. Beijing: Science Press, 2003: 45-63.
廖延彪. 偏振光学 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 45-63.