

文章编号: 0253-2239(2006)05-0720-6

受激发射损耗荧光显微镜的模型设计 及参量优化*

陈文霞 肖繁荣 刘 力 王桂英

(中国科学院上海光学精密机械研究所强场激光物理国家重点实验室, 上海 201800)

摘要: 受激发射损耗荧光显微镜利用荧光饱和和激发态荧光受激损耗的非线性关系,通过限制损耗区域,可突破远场光学显微术的衍射极限分辨率并实现三维成像。基于对粒子速率方程组的修正,建立了描述荧光团各能级粒子数概率时间特性的模型,并定义了时间平均损耗效率判据。采用高斯函数模拟两束入射激光脉冲通过对模型的数值计算,模拟了激发脉冲的 SIED 激光脉冲的光强、脉冲宽度以及两束光的延迟时间等参量与损耗效率之间的关系,并获得了各参量的最佳值,优化了损耗效率,为提高系统分辨率提供了有效的途径。

关键词: 显微; 损耗效率; 粒子数概率; 光强; 脉冲宽度; 延迟时间

中图分类号: O437 文献标识码: A

Model Design and Parameter Optimization of Stimulated Emission Depletion Fluorescence Microscopy

Chen Wenxia Xiao Fanrong Liu Li Wang Guiying

(State Key Laboratory of High Field Laser Physics, Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

Abstract: The imaging technology of stimulated emission depletion (STED) fluorescence microscopy utilizes the nonlinear relationship between the fluorescence saturation and the excited state stimulated depletion. It implements 3D imaging and breaks the diffraction barrier of the far-field light microscopy by restricting depletion zone at a sub-diffraction spot. A model on the revision of the particle velocity equations was found to depict the temporal characteristics of the energy level population probability of fluorescent prob, and the criterion called time average depletion efficiency was defined. Gaussian function was used to simulate the two incident laser pulse, and the relationship between the depletion efficiency and the parameters, such as intensity, duration, delay time of both laser pulses, was obtained respectively by numerical simulation, and the optimal value of these parameters was gained to improve the depletion efficiency is obtained. It is an effective approach to advance the system resolution.

Key words: microscopy; depletion efficiency; population probability; intensity; pulse duration; delay time

1 引 言

随着生物学的蓬勃发展,人们对显微术提出了超高分辨的三维成像的要求。共焦扫描显微术利用聚焦光束穿透高散射介质可对活细胞进行三维成像,因而在生物学的研究中有着广泛的应用^[1],但它的分辨率受到了衍射极限分辨率的限制。近场光学显微术在空间成像上具有超高分辨力^[2],但由于缺

乏层析能力,因而无法实现超分辨的三维成像。

近来有一种既可突破远场光学显微术衍射极限分辨率又能三维成像的技术——受激发射损耗(STED)显微术问世,它利用荧光饱和与激发态荧光受激损耗的非线性关系,即利用一束波长位于荧光发射谱红边的激光猝灭焦斑上的激发态荧光分子,并通过限制受激辐射衰减的区域,从而获得小于

* 国家自然科学基金(60408007,260527004)和国家 973 计划(2002BC713808)资助课题。

作者简介: 陈文霞(1980~),女,广东潮州人,中国科学院上海光学精密机械研究所硕士研究生,主要从事超分辨率三维成像:受激发射损耗荧光显微镜的研究。E-mail: wenxia@siom.ac.cn

收稿日期: 2005-06-13; 收到修改稿日期: 2005-08-26

衍射极限的发光点。据报道,德国的 Hell 小组利用该技术对生物样品成像,获得了 $33 \text{ nm}(\lambda/23)$ 的轴向分辨率^[3]和 $28 \text{ nm}(\lambda/25)$ 的横向分辨率^[4]。

1994 年, Hell 等给出了这种非线性显微术的模型和机理分析,但沿用了一般粒子速率方程组。他们抓住了粒子的抽运与受激损耗之间非线性关系的主线,但忽略了粒子跃迁中的一些细节。本文通过修正粒子速率方程组,把受激发射损耗光(STED)相对应的基态高振动能级独立出来,而将其他的荧光下能级合并成一个新的能级,这样只有那些发射荧光并被探测到的粒子才跃迁到该能级,并以该能级上的粒子数概率来衡量损耗效率。而且他们利用矩形脉冲模拟输入脉冲,但在实际工作中输入的激光脉冲一般是高斯型的,故而在我们的模拟计算中均采用了高斯型激光脉冲,从而更精确地模拟实验,使得出的优化参量更有实际指导意义。经过修正的模型除了成功地描述受激发射损耗荧光显微镜成像的物理机理外,还能更好地描述物理作用的细节,可以精确地获得参量的最佳值。

2 理论分析

2.1 关键问题

受激发射损耗荧光显微镜的设计有两个关键的问题,一个是针对受激辐射光斑的形状,利用光瞳滤波函数的变化控制光斑空间分布^[5],使该光斑仅存在一个空间零点;另一个是针对激发光和受激辐射光的参量选择,设计一套通过受激辐射途径,可高效率损耗激发态荧光分子的参量,如:光谱信息、光强、

脉冲宽度、延迟时间等。

理想的受激发射损耗光的强度空间分布是中心区域光强为零,周围光强远大于零。这样确保荧光光斑的中心不受受激发射光的影响,避免了可发射荧光粒子数的损耗,而在外围区域的荧光分子被强烈损耗。只有焦点中心的荧光分子尺度的区域可发射出荧光,因此,理论上的空间分辨率能达到分子尺度。但是实际上分辨率受到光斑中心极小值有限宽度和深度的共同限制,宽度越小,分辨率越高;深度越大,损耗效率越高,系统的分辨率将会更高。我们采用修正了的速率方程组建立数学模型,来模拟样品各能级粒子数概率的时间变化行为,并优化了光强、脉冲宽度、延迟时间等参量,提高了损耗效率,解决了上述第二个关键问题。

2.2 模型建立

考虑到大多数的荧光团样品都是四能级系统,因此我们也采用四能级图来表示典型的荧光团的受激吸收以及随后的受激辐射和荧光发射过程,如图 1 所示。根据玻尔兹曼分布理论,初始时刻粒子基本上分布在基态 S_0 的低振动能级 L_0 上,被激发光照射的荧光分子中的粒子从 L_0 跃迁到第一激发态 S_1 的高振动能级 L_1 ,随后粒子振动弛豫到 L_2 ,即荧光态。此时用一束具有特定波长和焦斑形状的激光诱导荧光态粒子[图 1(b)],使其产生受激辐射而损耗可发荧光的分子,损耗区域由焦斑形状限制,其内部的分子中的粒子跃迁至 L_3 ,而其外部分子中的粒子发射荧光后分布于基态的各个荧光下能级,最后弛豫到 L_0 。

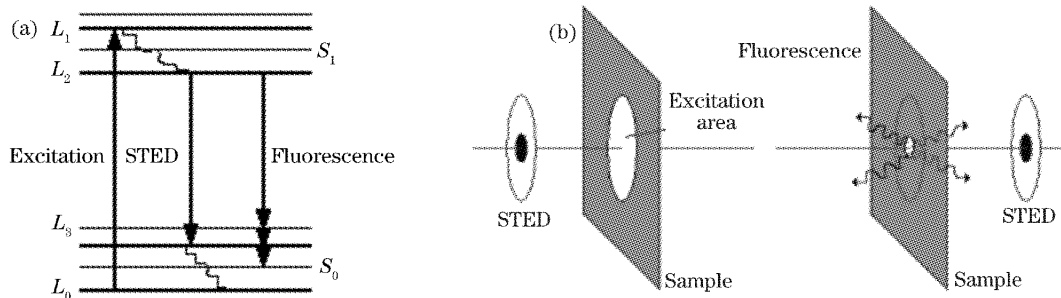


图 1 (a) 荧光团的能级图^[6], (b) 受激发射损耗荧光显微镜的原理图

Fig. 1 (a) Energy levels of a typical fluorophore, (b) principle of STED fluorescence microscopy

荧光态粒子的衰减有受激辐射与荧光发射两种途径。根据跃迁定则,受激辐射至 L_3 的粒子可重激发;而通过荧光发射的粒子中,只有发射光谱与损耗激光的光谱重合的粒子才可以重激发至激发态,即分布在 L_3 的粒子的行为与众不同。因此我们把除 L_3 外的其它荧光下能级合并,记为 L_4 。由于激光

光谱比荧光光谱窄得多,选择合适的滤光镜能把波长位于激光光谱中的光滤去,那么实验最终探测的信号是以 L_4 为下能级的粒子发出的荧光。

荧光团的能级 $L_i (i=0, 1, 2, 3, 4)$ 的粒子数概率 $n_i(t) (i=0, 1, 2, 3, 4)$ 的速率可用一套耦合微分方程组来描述,它涵盖了光与粒子之间的各种相互作用,

包括受激吸收、振动弛豫、受激辐射、荧光猝灭以及荧光发射等过程。

$$\frac{dn_0}{dt} = \frac{I_E \sigma_{01} (n_1 - n_0)}{h\nu_E} + \frac{1}{\tau_v} (n_3 + n_4), \quad (1)$$

$$\frac{dn_1}{dt} = \frac{I_E \sigma_{01} (n_0 - n_1)}{h\nu_E} - \frac{1}{\tau_v} n_1, \quad (2)$$

$$\frac{dn_2}{dt} = \frac{I_S \sigma_{23} (n_3 - n_2)}{h\nu_S} + \frac{1}{\tau_v} n_1 - \left(\frac{1}{\tau_f} + Q \right) n_2, \quad (3)$$

$$\frac{dn_3}{dt} = \frac{I_S \sigma_{23} (n_2 - n_3)}{h\nu_S} - \frac{1}{\tau_v} n_3 - \omega \left(\frac{1}{\tau_f} + Q \right) n_2, \quad (4)$$

$$\frac{dn_4}{dt} = (1 - \omega) \left(\frac{1}{\tau_f} + Q \right) n_2 - \frac{1}{\tau_v} n_4. \quad (5)$$

该微分方程组的初值条件为: $n_0(t=0) = 1$ 和 $\sum_i n_i = 1$ 。 ω 是落在 L_3 的荧光分子的权重因子, Q 是荧光猝灭率, τ_f 和 τ_v 分别是荧光寿命和振动弛豫寿命; σ_{01} 和 σ_{23} 是分子吸收截面; I_E 和 I_S 以及 $h\nu_E$ 和 $h\nu_S$ 分别是激发光和受激发射损耗光的局域光强和光子能量。 $I_E \sigma_{01} (n_1 - n_0) / (h\nu_E)$ 是激发光诱导的 L_1 和 L_2 间的吸收和辐射, $I_S \sigma_{23} (n_3 - n_2) / (h\nu_S)$ 是受激发射

损耗光诱导的荧光受激发射和 L_3 的重激发, $(1/\tau_f + Q)n_2$ 是荧光态粒子的自发辐射衰减和猝灭, $\omega(1/\tau_f + Q)n_2$ 和 $(1 - \omega)(1/\tau_f + Q)n_2$ 分别是发射荧光后落在 L_3 和 L_4 的粒子变化率, $(1/\tau_v)n_i$ 是 L_i 能级的粒子数概率的振动弛豫衰减。

若选择荧光团样品的荧光谱为 650~800 nm, 并将激发光和受激发射损耗光的中心波长分别调整为 560 nm 和 765 nm。 荧光谱宽约为 100 nm, 而激光谱宽远窄于荧光谱宽(小于 7 nm^[7]), 可选择 6 nm 的带宽滤光镜将夹杂在荧光中的激光滤除。 假设荧光场强度的概率密度与波长的关系服从正态分布, 按照概率统计理论可计算出荧光分子发射后落在 L_3 的概率(即权重因子) $\omega = 0.04042$ 。 而由于多普勒效应的影响, 激光光谱线成高斯线型, 以脉冲的峰值位置为中心, 取脉冲的有效寿命为脉冲宽度的 2 倍, 根据概率统计理论, 这集中了高斯脉冲 99.54% 的能量。 单周期的激发光和受激发射损耗光的光强分布函数为

$$I_E(t) = \begin{cases} I_{EP} \exp\left[-\frac{(t - \tau_E)^2}{(\tau_E/2)^2}\right], & 0 \leq t \leq 2\tau_E \\ 0, & \text{else} \end{cases} \quad (6)$$

$$I_S(t) = \begin{cases} I_{SP} \exp\left[-\frac{(t - \Delta t - \tau_S)^2}{(\tau_S/2)^2}\right], & \Delta t \leq t \leq \Delta t + 2\tau_S \\ 0, & \text{else} \end{cases} \quad (7)$$

τ_E 和 τ_S 以及 I_{EP} 和 I_{SP} 分别为激发光和受激发射损耗光的脉冲宽度和峰值光强。 延迟时间 Δt 是指受激发射损耗脉冲的起始时刻减去激发脉冲起始时刻的时间差, 若 $\Delta t > 0$, 说明受激发射损耗后到达样品, 反之, 则是受激发射损耗先到达样品。

微分方程组描述了样品各能级粒子数概率的时间变化行为, 为了更直观地表达受激发射损耗光在 1 个周期的积累效果, 我们定义了判据 L_4 能级的时间平均损耗效率^[8]

$$\epsilon(I_S) = 1 - \int_0^T n_4[t, I_S(t)] dt / \int_0^T n_4(t, 0) dt,$$

T 为脉冲周期, ϵ 越大意味着各参量的组合优化得越好。

3 模拟计算及分析

采用 MATLAB 软件作为模拟计算的平台, 选择“定步长龙格-库塔”算法来编程求解微分方程组, 计

算精度为 5 位有效数字。 本实验室激光器的脉冲频率为 80 MHz, 脉冲周期 $T = 1.25 \times 10^{-8}$ s, 积分步长定为 $d = 10^{-13}$ s, $\sigma_{01} = 4 \times 10^{-16}$ cm², $\sigma_{23} = 2 \times 10^{-16}$ cm², $\tau_f = 2 \times 10^{-9}$ s, $\tau_v = 0.2 \times 10^{-12}$ s, $Q = 10^8$ s⁻¹。

3.1 受激发射损耗光强与损耗效率

峰值光强与损耗效率的关系如图 2 所示, 当 $I_{SP} \leq 10^6$ W/cm², ϵ 基本上保持在零附近, 损耗效率和受激发射损耗光的关系 $\eta = d\epsilon/dI_S$ 也为零, 即当峰值光强小于阈值 ($I_{th} \approx 10^6$ W/cm²), 受激发射损耗光基本上不起作用。 当 10^6 W/cm² $\leq I_{SP} \leq 2 \times 10^8$ W/cm², ϵ 随着 I_{SP} 的增加而快速增大, 从 0.026 上升到 0.980(曲线 A), 或 0.019~0.968(曲线 B)。 并且在 $10^7 \leq I_{SP} \leq 2 \times 10^8$ W/cm², 曲线近似为直线, 斜率达到最大值, η 也在此范围取得最大值。 所以为了使受激发射损耗光有高的工作效率, I_{SP} 应在此范围取值, 而且为了提高分辨力, 要尽量选取最大的值, 所以最佳的光强为 $I_{SPO} \approx 2 \times 10^8$ W/cm²。 随着 I_{SP} 的继续增加, η 约为零, ϵ 趋于饱和, 近似为 100%, 此时继

续增大受激发射损耗光强,并不能有效提高荧光损耗效率。我们可得结论:在 $I_{SP} \leq 10^6 \text{ W/cm}^2$ 或 $I_{SP} \geq 2 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$, ϵ 不依赖光强, n_4 时间特性一致。当 $10^6 \leq I_{SP} \leq 2 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$, n_4 对 I_{SP} 非常敏感,接下来将分析比较各个光强范围的 n_4 时间特性。

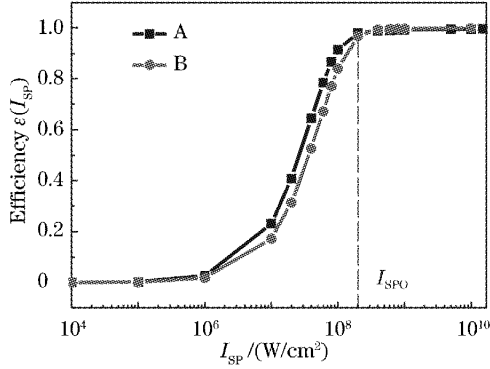


图 2 受激发射损耗光的峰值光强与损耗效率的函数关系

Fig. 2 Depletion efficiency as a function of the peak intensity I_{SP}

由方程(3)可知,当峰值光强小于阈值时,受激发射损耗光对荧光态的受激跃迁速率远小于振动弛豫速率和荧光发射效率,快的振动弛豫使得振动能级接近倒空,即 $n_1 \approx 0, n_3 \approx 0$,受激发射损耗的激发和重激发作用以及上能级的粒子补充作用可以忽略。因此荧光态的粒子数概率可近似为指数衰减分布,即 $n_2(t) \propto \exp[-(1/\tau_1 + Q)t]$,这意味着 n_2 是由荧光发射率和猝灭率决定的。在此情况下 n_4 的变化率与 n_2 基本相同,如图 3 所示。由图 3 插图可得曲线的衰减常量约为 2 ns,与理论相符合。随着受激发射损耗光强的增大 n_4 时间衰减常量逐渐减小,因为该过程中受

激发射损耗的作用及振动弛豫作用越来越显著,它们共同制约着 n_4 的时间特性。当 $I_{SP} \geq 2 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$, 荧光发射的作用已经可以忽略,即荧光损耗效率接近 100%, n_4 的时间变化特性主要由振动弛豫作用决定,图 3 主曲线衰减时间为 3.5 ps。而当 $10^6 \leq I_{SP} \leq 2 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$, ϵ 强烈依赖于 I_{SP} , n_4 曲线的衰减常量介于中间,如 $I_{SP} = 10^7 \text{ W/cm}^2$ 的曲线的衰减常量约为 160 ps。此外,在微分方程组中, σ_{23} 与 I_S 起着同样的作用,所以我们可以选择具有大 σ_{23} 的荧光团作为荧光探针,以提高损耗效率。

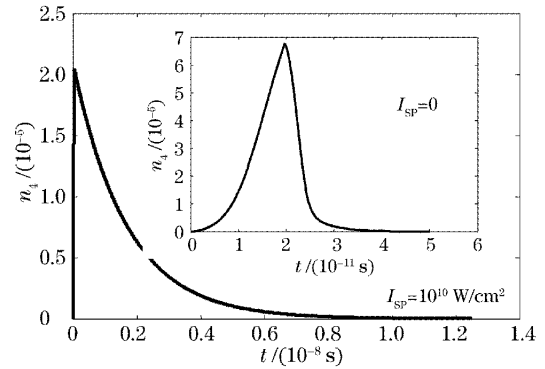


图 3 L_4 能级的粒子数概率的时间行为

Fig. 3 Temporal behavior of population probability n_4

3.2 受激发射损耗光脉冲宽度与损耗效率

损耗效率与受激发射损耗光脉冲宽度的关系由图 4(a)所示,各曲线在 ϵ 达到峰值之前,随着 τ_s 的增加, ϵ 都急速增大。并且 I_{SP} 越大, ϵ 越大,增长速度也越快,也越快到达峰值,各曲线的峰值分别为: A: 450~486 ps, B: 81~89 ps, C: 17~19 ps。当 τ_s 大于各自的最佳范围后, ϵ 随 τ_s 的增加而缓慢下降。

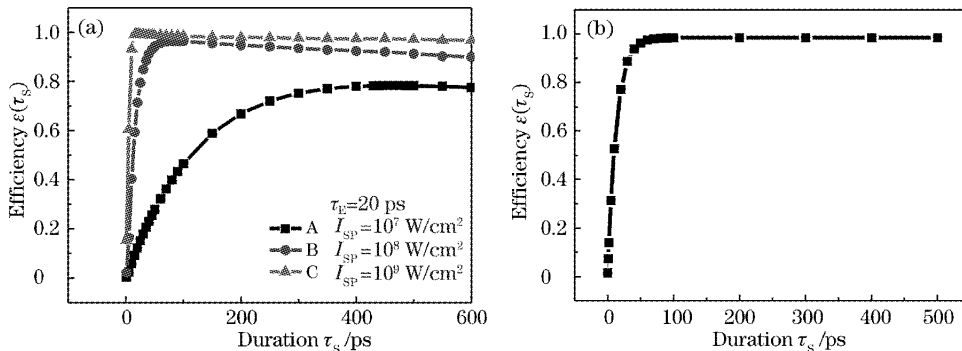


图 4 受激发射损耗脉冲宽度与损耗效率的函数关系。(a) 用修正的速率方程组和高斯脉冲模拟的曲线, (b) 用一般的速率方程组和矩形脉冲模拟的曲线,条件与(a)中 B 曲线相同

Fig. 4 Depletion efficiency as a function of pulse duration τ_s . (a) Simulated curve with improved rate equation set and Gaussian pulse, (b) simulated curve with common rate equation set and rectangle pulse, in which the condition is the same as that of curve B in Fig. 4(a)

对比图 4(a)的 B 曲线与图 4(b)图,可见在各参量完全相同的条件下,两曲线存在一些差别。图 4(a)中 B 曲线先随 τ_s 的增加而上升至 81~89 ps 处到达峰值后缓慢下降;而图 4(b)曲线先随 τ_s 的增加而上升,在 200 ps 附近达到饱和状态,此后曲线保持与横轴平行。可见修正过的模型在描述受激发射损耗荧光显微镜成像的物理机理的主线外,还能更好地描述物理作用的细节。

由于荧光态的典型寿命约为 1~5 ns,为了避免重激发,受激发射损耗脉冲须比荧光发射作用结束得快,所以 $2\tau_s + \Delta t$ 有约为 200~1000 ps 的上限^[9];受激发射损耗脉冲须比 L_3 的弛豫作用结束相对慢,因此 $2\tau_s + \Delta t$ 的下限约为 1~2 ps。

3.3 激发光光强与损耗效率

计算模拟结果表明:损耗效率不随 I_{EP} 的变化而变化。定义单周期 n_4 的和 $S(I_E) = \int_0^T n_4(t, I_E) dt$ 来衡量收集的信号光。计算得 S 随 I_{EP} 增加而增大。虽然 I_{EP} 不影响损耗效率,但考虑到实验中还存在背景光,为了提高分辨力,需提高信噪比,那么就要增大探测到的信号,所以应该选择大光强的激发光。

3.4 激发光脉冲宽度与损耗效率

无论增大光强还是脉冲宽度,都增加了每个脉冲的光子数,这导致基态上更多的粒子被抽运,继而到达荧光态,发射荧光,最终被探测器收集,所以损耗率与脉冲宽度的关系与光强一样, ϵ 不随脉冲宽度的变化而变化(见图 5 中的 A、B 曲线)。但是图 5 中 C 曲线不服从上述规律,当激发光脉冲宽度小于 25 ps 时,损耗效率也保持不变。但大于 25 ps 后, ϵ 急速下降,以至趋近于零。因为脉冲宽度小时,激发脉冲比受激发射损耗脉冲快结束,受激发射损耗光能

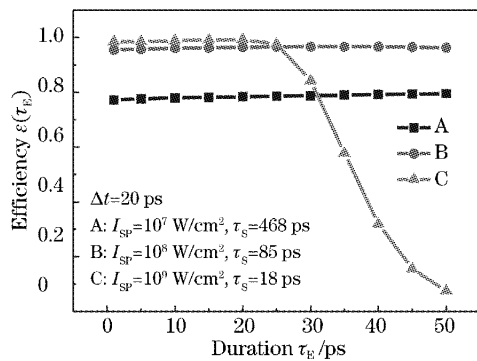


图 5 激发光脉冲宽度与损耗效率的函数关系

Fig. 5 Depletion efficiency as a function of the exciting laser pulse duration τ_E

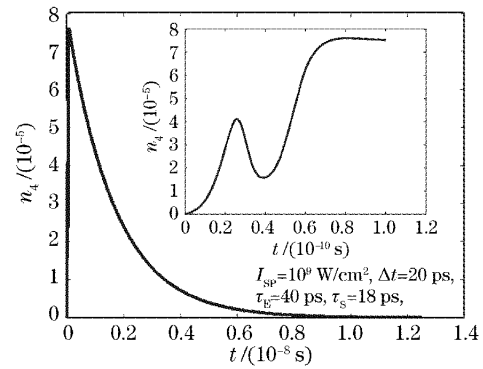


图 6 L_4 能级的粒子数概率的时间行为

Fig. 6 Temporal behavior of population probability n_4

脉冲宽度为 40 ps 的时间特性如图 6 所示,曲线的衰减时间常量略小于 2 ns,表明受激发射损耗的作用非常弱。结合各参量观察插图,可见在 20 ps 处,受激发射损耗脉冲开始作用于样品, n_4 上升的速度逐渐减小,再过几皮秒 n_4 达到极大值,而后受激发射损耗光脉冲起主导作用, n_4 受损耗,40 ps 时达到极小值,此后激发光脉冲占主导作用,粒子数开始回升,直到 80 ps 时,激发光脉冲离开,此后粒子数以荧光寿命为时间常数开始衰减。所以要实现有效损耗,必须使得受激发射损耗脉冲慢于激发脉冲结束。

3.5 延迟时间与损耗效率

延迟时间与损耗效率的关系如图 7 所示,A、B 曲线随激发脉冲宽度的变化而相对平移,平移量约等于两组 τ_E 的差值。它们的最佳延迟时间分别为 -40~-35 ps 和 -25~-20 ps,此时两脉冲峰值近似重合。只需选择合适的时间延迟使两曲线近似重合,所以 τ_E 对 ϵ 的影响不明显;再比较 B、D 曲线,D 曲线的最佳延时为 -11~-5 ps,相对 B 曲线平移 17 ps,并且由于 τ_s 偏离了最佳值,损耗效率曲线整体下降。而 C 曲线由于 $\tau_s \approx \tau_E$,所以在上升阶段

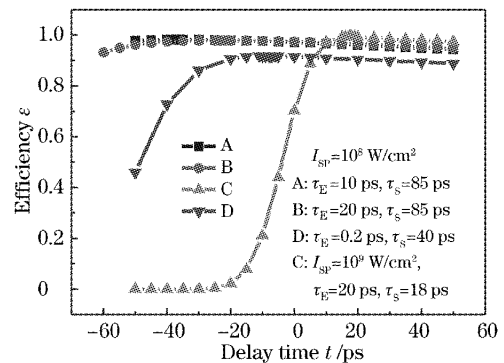


图 7 延迟时间与损耗效率的函数关系

Fig. 7 Depletion efficiency as a function of the delay time

ϵ 对 Δt 非常敏感, 当 $\Delta t \leq 4$ ps 时, 因为受激发射损耗脉冲比激发脉冲先结束, 荧光态后继的粒子无法损耗, 导致损耗效率急剧下降甚至为 0, $\Delta t > 4$ ps 后 ϵ 随 Δt 增加而增大, 在 15~20 ps 达到最大值, 随后缓慢下降。由此可见, 最佳的 Δt 主要依赖于 τ_E 和 τ_S , 而 ϵ 又直接依赖于 I_{SP} 、 τ_S 和 Δt , 因此最佳的组合可为 $I_{SP} = 10^8$ W/cm², $\tau_E = 8 \sim 12$ ps, $\tau_S = 81 \sim 89$ ps, $\Delta t = -40 \sim 35$ ps。

3.6 多脉冲周期情况

我们还模拟了 3 个脉冲周期的 n_4 的时间特性。当 I_{SP} 小于受激发射损耗光强阈值时, 由于长的衰减时间常量, 残留的粒子积累到下一个周期, 因此 n_4 的峰值略大于前周期的。而大于光强阈值时, 衰减时间常数减小, 下个脉冲到来之前, 基本上没有粒子残留下来, 每个周期的 n_4 曲线一致, 损耗效率不变, 每个脉冲互不影响。

4 结 论

我们对样品激发态的粒子数概率时间特性建立了数学模型, 它除了描述受激发射损耗荧光显微镜成像的物理机理的主线外, 还更好地描述物理作用的细节。根据此模型进行了数值模拟, 尤其是探讨了在受激发射损耗光作用下损耗效率与各参量的关系。综上所述, 各参量所变化规律可归纳如下:

1) I_{SP} 小于阈值时, 受激发射损耗光不起作用, 损耗效率 ϵ 近似为零; 大于阈值后, ϵ 迅速增大, 曲线斜率达到最大值, 后 ϵ 达到饱和状态;

2) ϵ 不依赖于 I_E , 但增大 I_E 可提高信噪比;

3) ϵ 随 τ_S 的增加而增大, 达到峰值后缓慢下降;

4) 当受激发射损耗脉冲慢于激发脉冲离开样品时, 损耗率与 τ_E 关系与 I_E 一样, 不随 τ_E 的变化而变化, 反之则 ϵ 减小;

5) 在该值下, 两束脉冲的作用时间段得到有效配置, 可获得最高的损耗效率; 对于不同 τ_S 和 τ_E , 存在由它们共同决定的最优化的 Δt 值;

6) 优化条件下的粒子衰减时间常量远小于脉冲的间隔, 各个脉冲不相互影响。各参量的最佳组合可为: $I_{SP} = 10^8$ W/cm², $\tau_E = 8 \sim 12$ ps, $\tau_S = 81 \sim 89$ ps, $-40 \leq \Delta t \leq 35$ ps。此外, 在 4π 系统中^[3],

利用波长 780 nm 的两束光的干涉场作为受激发射损耗光瞳, 采用该修正模型得到的系统分辨力为 34.3 nm, 与实验更吻合。由此可见, 对于受激发射损耗荧光显微镜, 时间控制是提高系统分辨力的一种高效技术。

通过上述数值模拟和分析, 我们期望分辨力能达到分子尺度, 并且由于其具有层析能力而可三维成像。此外它可应用于共焦扫描系统, 还可与全内反射显微镜结合而实现空间控制^[10]。受激发射损耗荧光显微镜在观察、探测、成像等领域将发挥越来越重要的作用。

参 考 文 献

- 1 Deng Xiaoqiang, Liu Li, Yang Lisong *et al.*. Super-resolution in 3-D confocal surface profilometry[J]. *Acta Optica Sinica*, 2001, **21**(7): 853~856 (in Chinese)
邓小强, 刘力, 杨莉松等. 超分辨在共焦三维形貌检测术中的应用[J]. *光学学报*, 2001, **21**(7): 853~856
- 2 Wang Chen, Wang Guiying, Xu Zhizhan. The application of total internal reflection fluorescence microscopy in single fluorophore molecules axial imaging[J]. *Acta Physica Sinica*, 2004, **53**(5): 1325~1330 (in Chinese)
王琛, 王桂英, 徐至展. 全内反射荧光显微术应用于单分子荧光的纵向成像[J]. *物理学报*, 2004, **53**(5): 1325~1330
- 3 Marcus Dyba, Stefan W. Hell. Focal spots of size $\lambda/23$ open up far-field fluorescence microscopy at 33 nm axial resolution[J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2003, **88**(16): 163901
- 4 V. Westphal, L. Kastrop, S. W. Hell. Lateral resolution of 28 nm ($\lambda/25$) in far-field fluorescence microscopy[J]. *Appl. Phys. B*, 2003, **77**: 377~380
- 5 Deng Xiaoqiang, Wang Guiying, Xu Zhizhan. 3-D super-resolution pupil filter[J]. *Chin. J. Lasers*, 2001, **A28**(5): 459~462 (in Chinese)
邓小强, 王桂英, 徐至展. 三维超分辨光瞳滤波器[J]. *中国激光*, 2001, **A28**(5): 459~462
- 6 Stefan W. Hell, Jan Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission; stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy [J]. *Opt. Lett.*, 1994, **19**(11): 780~782
- 7 Thomas A. Klar, Stefan Jakobs, Marcus Dyba *et al.*. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission[J]. *PNAS*, 2000, **97**(15): 8206~8210
- 8 Thomas A. Klar, Egbert Engel, Stefan W. Hell. Breaking Abbe's diffraction resolution limit in fluorescence microscopy with stimulated emission depletion beams of various shapes[J]. *Phys. Rev. E*, 2001, **64**(6): 066613
- 9 Marcus Dyba, Stefan W. Hell. Photostability of a fluorescent marker under pulsed excited-state depletion through stimulated emission[J]. *Appl. Opt.*, 2003, **42**(25): 5123~5129
- 10 George E. Cragg, Peter T. C. So. Lateral resolution enhancement with standing evanescent waves[J]. *Opt. Lett.*, 2000, **25**(1): 46~48