

文章编号: 0253-2239(2010)s100405

受激辐射耗尽荧光显微镜的激发耗尽过程与空间分辨率计算

于建强^{1,2} 袁景和^{2*} 方晓红² 李英骏¹

¹中国矿业大学(北京)理学院, 北京 100083
²中国科学院化学研究所分子纳米结构与纳米技术实验室, 北京 100190

摘要 通过四阶 Runge-Kutta 算法求解荧光介质的速率方程, 详细分析了受激辐射耗尽(STED)显微镜的激发过程和耗尽过程中的荧光态分子数密度转移过程, 得到了高斯时间脉冲激发光将基态荧光分子抽运到荧光态所用的时间与激发光强度的关系, 得到了高斯时间脉冲耗尽光将荧光态分子经过受激辐射跃迁到基态所用时间与 STED 光强的关系, 模拟了一个激发周期内的激发和耗尽过程, 得到了 STED 显微镜激发光和耗尽光之间的最佳延迟时间, 此模拟结果对实验装置参数设置有指导作用。

关键词 显微; STED 显微镜; 空间分辨率; 荧光分子激发和耗尽; 同步延迟时间

中图分类号 O436 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS201030.s100405

Effects of Excitation and Depletion Process on Resolution of Stimulated Emission depletion Microscope

Yu Jianqiang^{1,2} Yuan Jinghe² Fang Xiaohong² Li Yingjun¹

¹ School of Science, China University of Mining and Technology (Beijing), Beijing 100083, China
² Key Laboratory of Molecular Nanostructure and Nanotechnology, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract The rate equations of fluorophore are solved with Runge-Kutta algorithm, and the process of the excitation and the depletion in stimulated emission depletion (STED) microscope is analyzed in detail. Gaussian shaped pulse is used to simulate their excitation and the depletion process. The pump time versus the exciting time and intensity, the depletion time versus the intensity of depletion beam are calculated. With the simulation in an exciting and depletion period, the best synchronization delay time between the excited beam and the STED beam in STED microscope is achieved. These results will play an important role in the microscope setup.

Key words microscopy; STED microscope; resolution; exciting and depletion; synchronization delay

OCIS codes 180.4315; 030.0030

1 引 言

Stefan Hell^[1]在 1994 年提出了受激辐射耗尽(STED)显微术理论, 突破传统荧光光学显微镜成像的衍射极限, 可以极大地提高远场光学显微镜空

间分辨率, 有望实现活细胞单分子超分辨三维成像, 因此成为现阶段超分辨研究的重要发展方向。

普通光学显微镜的横向空间分辨率大约为 $\Delta r \approx \lambda / (2NA)$, 其中 λ 为激发光波长, NA 为显微物

收稿日期: 2010-03-19; 收到修改稿日期: 2010-05-19

基金项目: 国家 973 计划(2007CB815105)、国家自然科学基金(10874242)、中国科学院科研装备研制项目(YZ200925)资助课题。

作者简介: 于建强(1983—), 男, 硕士研究生, 主要从事光物理等方面的研究。E-mail: jquy@iccas.ac.cn

导师简介: 李英骏(1961—), 男, 教授, 主要从事 X 射线激光及光物理方面的研究。E-mail: lyj@aphy.iphys.ac.cn

* 通信联系人。E-mail: jhyuan@iccas.ac.cn

镜的数值孔径。对于活细胞成像,激发光波长 λ 通常为可见光(约 500 nm),数值孔径 $NA \approx 1$,因此一般光学显微镜的横向分辨率大致在 250 nm 左右。通过引入 STED 概念,将激发光焦斑周围的荧光态分子退激发,可以实现纳米级空间分辨率,其分辨率可以近似表达为 $\Delta r \approx \lambda / (2NA \sqrt{1 + I_{\text{STED}}/I_s})$ ^[2,3],其中 I_{STED} , I_s 分别代表 STED 光的强度和有机染料半淬灭强度。理论上,只要 STED 光足够强,则空间分辨率可以无限制地提高,但是考虑到荧光分子漂白等现象,STED 光强总要低于一定的极限值。德国的马普研究所 Hell 研究组已经利用 STED 技术获得了 $\lambda/25$ 的横向分辨率和 $\lambda/23$ 的轴向分辨率^[4]。

本文使用四阶 Runge-Kutta 算法求解了荧光介质的速率方程,分析了 STED 显微镜的激发过程和耗尽过程中的荧光分子数密度转移过程,模拟了一个激发周期内的激发和损耗过程;根据菲涅耳衍射积分公式导出了入射准直高斯光束在焦点附近的光场分布,得到了激发光和 STED 光聚焦后的光强在横向和轴向的分布以及其产生的空间分辨率,得到了最高空间分辨率对应的最佳 STED 光强度以及同步延迟时间,为 STED 光学显微镜的设计提供了依据。

2 理论基础

典型的荧光分子能级结构如图 1 所示,其中 S_0, S_1 分别表示荧光分子的基态和激发态, L_0, L_3 分别表示基态 S_0 的最低振动态和某个较高振动态, L_2, L_1 分别表示激发态 S_1 的最低振动态和某个较高振动态。激发光将荧光分子从 S_0 激发到 S_1 ,经

过振动弛豫,荧光分子跃迁到 S_1 的最低振动态 L_2 ,当荧光分子从该振动态跃迁到基态 S_0 时,能量通常会以荧光的形式辐射出去,被称为自发荧光辐射过程。处于激发态的荧光分子在外界辐射影响下,会产生与外界辐射同频率、同相位和同偏振的辐射,这就是受激荧光辐射过程。这种受激荧光辐射与自发荧光辐射竞争,导致荧光态分子关闭(非自发荧光辐射状态),称为受激辐射耗尽(STED),该外界辐射称为受激辐射耗尽光。为了避免二次激发,通常将 STED 光波长设置为荧光分子发射谱的红端。利用 STED 过程实现高空间分辨光学成像,需要将物镜聚焦后的 STED 光斑构造为面包圈形状,并且围绕在激发光焦斑周围,使得激发光焦斑中心区域的荧光分子仍然处于荧光态(可以自发辐射荧光),而被 STED 光束照射的区域,因发生受激辐射耗尽过程而关闭(非荧光辐射状态)。从荧光分子的能级结构可知,当荧光分子处于能级 L_2 时为荧光态,其荧光分子数密度直接影响自发辐射荧光的强度,该数密度可以通过求解速率方程获得。

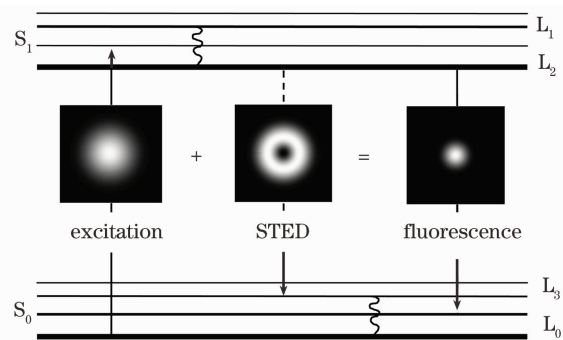


图 1 荧光分子能级图

Fig. 1 Energy levels of a typical fluorophore
荧光分子数密度遵循下列速率方程^[5]:

$$\begin{cases} \frac{dn_0}{dt} = \frac{I_{\text{EXC}}\sigma_{01}}{h\nu_{\text{EXC}}}(n_1 - n_0) + \frac{1}{\tau_{\text{VIBR}}}n_3 \\ \frac{dn_1}{dt} = \frac{I_{\text{EXC}}\sigma_{01}}{h\nu_{\text{EXC}}}(n_0 - n_1) - \frac{1}{\tau_{\text{VIBR}}}n_1 \\ \frac{dn_2}{dt} = \frac{I_{\text{STED}}\sigma_{23}}{h\nu_{\text{STED}}}(n_3 - n_2) + \frac{1}{\tau_{\text{VIBR}}}n_1 - \left(\frac{1}{\tau_{\text{FLUOR}}} + Q\right)n_2 \\ \frac{dn_3}{dt} = \frac{I_{\text{STED}}\sigma_{23}}{h\nu_{\text{STED}}}(n_2 - n_3) - \frac{1}{\tau_{\text{VIBR}}}n_3 + \left(\frac{1}{\tau_{\text{FLUOR}}} + Q\right)n_2 \end{cases}, \quad (1)$$

式中 n_0 表示基态能级 L_0 的荧光分子数密度; n_1 表示第一激发态的高振动态能级 L_1 上的荧光分子数密度; n_2 表示第一激发态的最低振动态能级 L_2 上的荧光分子数密度; n_3 表示基态的高振动态能级 L_3

上的荧光分子数密度,STED 激发的受激辐射和自发荧光辐射跃迁都会导致 n_3 的增加; I_{EXC} , I_{STED} 分别为激发光和 STED 光的强度, λ_{EXC} , λ_{STED} 分别为激发光和 STED 光的波长; σ_{01} , σ_{23} 分别为相应能级跃

迁的分子吸收截面； τ_{VIBR} 、 τ_{FLUO} 分别为振动弛豫寿命和荧光寿命； Q 为荧光淬灭速率， h 为普朗克常量。在通常温度条件下和孤立系统中，初始条件和归一化条件可以近似为

$$\begin{cases} n_0|_{t=0} = 1 \\ n_i|_{t=0} = 0, i = 1, 2, 3 \end{cases}, \quad (2)$$

和

$$\sum_{i=0}^3 n_i = 1, \quad (3)$$

该速率方程包含了光与荧光物质相互作用的各个基本过程，包括受激吸收、振动弛豫、自发荧光、荧光猝灭、受激辐射等。

3 STED 荧光显微术激发和耗尽过程模拟

采用四阶 Runge-Kutta 算法^[6]求解上述速率方程，对荧光分子的激发和受激耗尽过程进行了模拟。其中高斯型激发光和 STED 光束脉冲宽度均设为 $\tau_{\text{EXC}} = \tau_{\text{STED}} = 300$ ps，激发光和 STED 光波长分别为 $\lambda_{\text{EXC}} = 540$ nm 和 $\lambda_{\text{STED}} = 650$ nm，荧光平均寿命 $\tau_{\text{FLUO}} = 2$ ns，振动弛豫平均寿命 $\tau_{\text{VIBR}} = 0.1$ ps，荧光淬灭速率 $Q = 10^8$ s⁻¹，吸收截面 $\sigma_{01} = \sigma_{23} = 10^{-16}$ cm²，算法积分步长为 1 ps。

3.1 激发过程

荧光分子处于能级 L_2 时为荧光态，为此模拟了在不同激发光峰值强度下的荧光态分子数密度随时间的变化关系(图 2)，其中曲线 a, b, c 和 d 分别对应于 $I_{\text{EXC}} = 3$ MW/cm², 30 MW/cm², 300 MW/cm² 和 3 GW/cm²，曲线 e 为激发光脉冲形状。

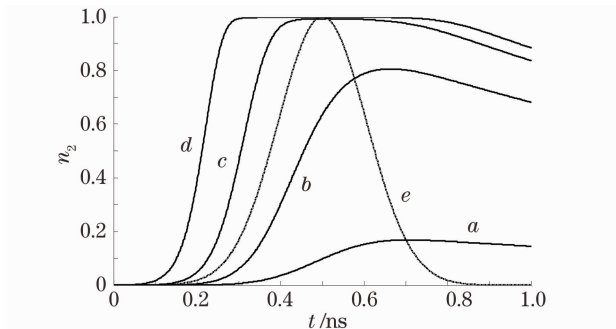


图 2 激发过程

Fig. 2 Excited process

从图 2 可以看出，激发光脉冲峰值强度越大，荧光态分子数密度增加越快，曲线 a 对应于 $I_{\text{EXC}} = 3$ MW/cm²，荧光态分子数密度在激发光脉冲有效激发时间内小于 0.2，此时荧光自发辐射强度较低，

不能产生充分的荧光态激发，当然也较少产生荧光漂白；曲线 b 对应于 $I_{\text{EXC}} = 30$ MW/cm²，此时荧光分子数密度可达 0.8，已经实现有效的荧光态激发，有较强的荧光自发辐射，同时也不会对介质产生明显的荧光漂白；随着激发光强度的增加(曲线 c 和 d)，在光脉冲峰值强度到来之前($t < 0.5$ ns)，焦斑内荧光分子已经几乎全部激发，此为饱和激发，极易产生光漂白现象。所以对于设定的荧光染料分子，激发光强在 3~30 MW/cm² 量级是适当的，此时可以保证有较强的荧光辐射，同时又能够避免明显的光漂白。

3.2 受激辐射耗尽过程

为了研究 STED 光脉冲强度对荧光态分子耗尽过程的影响，模拟了不同 STED 峰值强度下荧光态分子数密度 n_2 的变化情况如图 3 所示，其中曲线 a, b, c, d, e 和 f 分别对应于 $I_{\text{STED}} = 0, 10$ MW/cm², 30 MW/cm², 100 MW/cm², 1 GW/cm² 和 10 GW/cm²。其中曲线 a 显示了自发荧光辐射过程中荧光态分子数密度 n_2 变化情况。

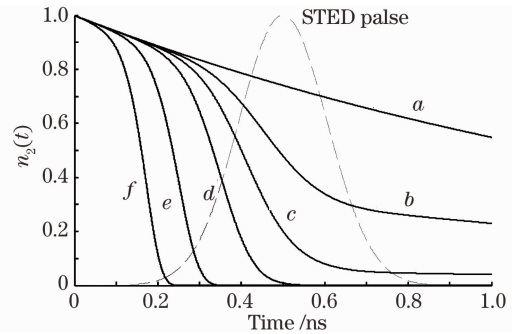


图 3 不同 STED 强度下的受激辐射耗尽过程

Fig. 3 Stimulated emission depletion process under different STED intensities

从图 3 可以看出，随着 STED 光脉冲峰值强度的增加耗尽速度加快，曲线 a 对应于自发荧光辐射过程，此时粒子数密度以指数形式缓慢衰减；曲线 b 对应于 $I_{\text{STED}} = 10$ MW/cm² 的情况，分子数密度在 STED 光脉冲基本结束后仍然有 30% 左右处于荧光态，还具有自发荧光辐射能力，将会造成一定的荧光背景，因此不能提供理想的空间分辨率；当 $I_{\text{STED}} = 30$ MW/cm² 时，在 STED 脉冲基本结束时分子数密度已经降低到 10% 以下(曲线 c)，此时的光强基本可以满足通过 STED 实现提高空间分辨率的需要；随着 STED 光强的增加(曲线 $d \sim f$)，荧光态分子数密度所需耗尽时间减小，在不损害样品活性的前提下，STED 峰值光强越大越有利于耗尽荧光态分子，获得高的空间分辨率。

3.3 单激发周期模拟

在实际的 STED 显微术中,需要同步的激发和 STED 两束光分别实现荧光分子的激发和退激发,一个激发脉冲和一个 STED 脉冲组成一个激发周期。为了获得最佳 STED 光强,模拟了不同 STED 光强下荧光态分子数密度 n_2 的变化。

一个激发周期内荧光态分子数密度 n_2 随时间变化关系如图 4 所示,其中激发光峰值强度均设定为 $I_{\text{exc}} = 30 \text{ MW/cm}^2$,STED 光峰值强度分别设定为: $0, 3 \text{ MW/cm}^2, 30 \text{ MW/cm}^2, 300 \text{ MW/cm}^2, 3 \text{ GW/cm}^2$,STED 光脉冲与激发光脉冲之间的同步时间延迟为 100 ps 。

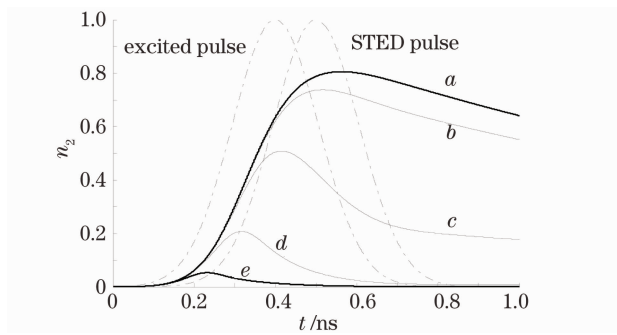


图 4 单周期模拟

Fig. 4 Simulation of single cycle

图 4 中,曲线 a 表示自发荧光辐射过程,此时荧光态分子数密度已达到 0.8 以上,荧光分子得到较充分的激发,然后荧光态分子数密度经过自发辐射荧光而减小;曲线 b, c 和 d 分别表示 STED 光峰值强度为 $3, 30, 300 \text{ MW/cm}^2$ 时的荧光态分子数密度随时间的变化情况,在这些 STED 强度下,光脉冲结束后仍然残留部分荧光态分子,可以自发辐射荧光,形成荧光背景而影响空间分辨率的提高;当 $I_{\text{STED}} = 3 \text{ GW/cm}^2$ (曲线 e) 时,则几乎能够完全耗尽荧光态分子,所以对于我们设定的荧光染料分子及仪器参数,STED 光强达到 1 GW/cm^2 量级能量密度是合适的。

4 光斑计算

可以通过对 STED 光束的波前调制获得面包圈形状的 STED 光斑,如图 5 所示。其中 P 表示渐变 2π 位相板,显微物镜 L 的焦距为 f 。为了描述方便,建立如图所示物方坐标系 $Oxyz$ (对应的柱坐标为 (r, θ, z)) 和像方坐标系 $O'-x'y'z'$ (对应的柱坐标为 (r', θ', z')),其中 O 为物镜光心, O' 为物镜焦点, z 轴为光轴。入射准直高斯光束经过渐变 2π 位相板 P 调制后,再经物镜衍射到像方空间,研究了物镜几何光学焦点附近的激发光场和 STED 光场分布。

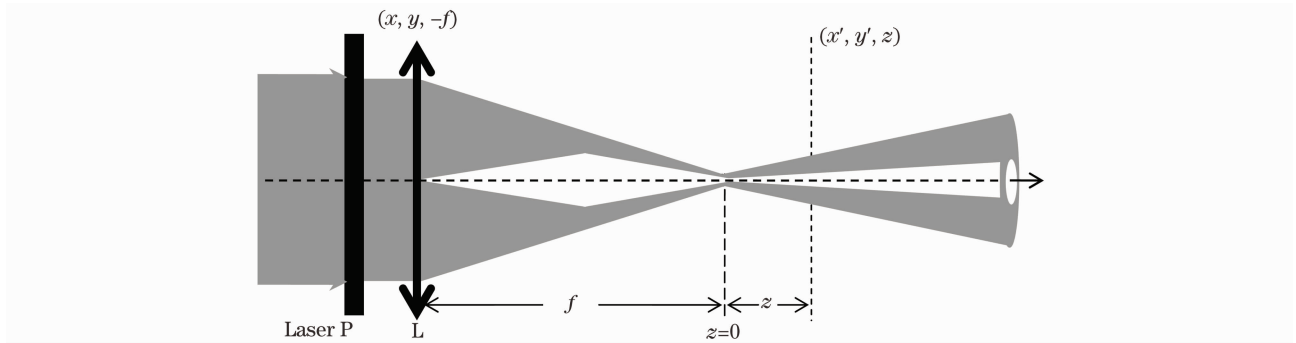


图 5 通过波前调制获得面包圈形焦斑

Fig. 5 Doughnut disk with wavefront modulation

准直高斯光束的复振幅表示为 $E(x, y, z) = A \exp\left(-\frac{x^2 + y^2}{\omega_0^2}\right) \exp(-ikz)$ (其中 ω_0 为高斯光束的束腰半径, k 为波数), 渐变 2π 位相板振幅透射率函数为 $T(r, \theta, z) = t \exp(-i\theta)$, $0 < \theta < 2\pi$ (其中 $t \approx 1$ 为振幅透射率), 显微物镜的相位延迟因子为 $\exp(-ik \frac{x^2 + y^2}{2f}) = \exp(-ik \frac{r^2}{2f})$ (其中 f 为物镜的像方焦距), 根据菲涅耳-基尔霍夫衍射积分公式可以得到衍射光场复振幅分布为

$$E(r', \theta', z) = \frac{A t \exp\left[\frac{ik r'^2}{2(z+f)}\right] \exp(ikz)}{i\lambda(z+f)} \times \int_0^{2\pi} \int_0^a \exp\left[-\frac{r^2}{\omega_0^2} - \frac{ik}{2f} r^2 + \frac{ik}{2(z+f)} r^2 - \frac{ik}{z+f} r r' \cos(\theta - \theta') - i\theta\right] r dr d\theta, \quad (4)$$

式中 a 为显微物镜口径的半径。进一步得到面包圈光斑强度分布为 $I(r', \theta', z) = |E(r', \theta', z)|^2$ 。其实

在(4)式中去掉渐变 2π 相位板透射率函数即为激发光衍射斑复振幅分布。

模拟时设 $\omega_0 = 2.5 \text{ mm}$, $f = 3 \text{ mm}$, 入射激发光

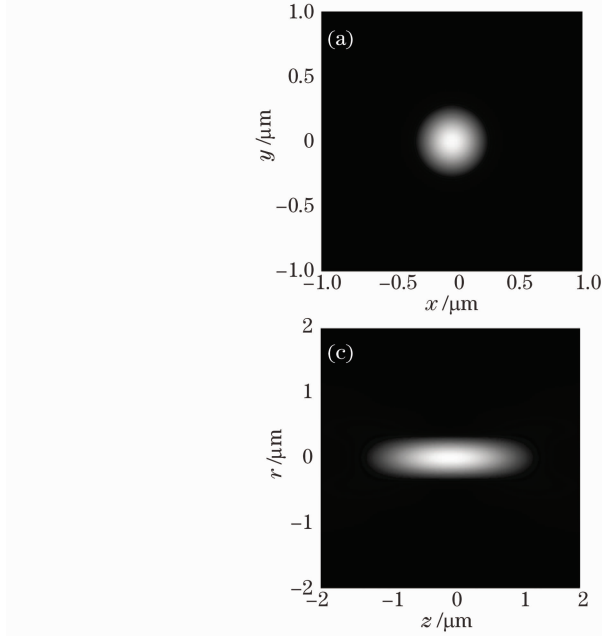


图 6 焦斑光强横向和轴向分布

Fig. 6 Lateral and Axial distribution of Intensity in focal spot

其中图 6(a) 为激发光在焦平面的光强分布图像, 根据瑞利判据可知最小分辨尺寸约为 400 nm ; 图 6(b) 为 STED 光在焦平面形成的光强分布, 可以看出中心 ($r=0$) 处为极小值。图 6(c) 为激发光焦点附近的光强轴向分布, 轴向分辨尺寸大于 $1 \mu\text{m}$, 远大于横向分辨尺寸, 图 6(d) 为 STED 光焦点附近的光强轴向分布, 在轴向为中空光束。

5 分辨率及参数选择

设焦点附近不同径向位置处荧光态分子数密度随时间变化关系为 $n_2(r, t)$, 于是自发荧光辐射强度为

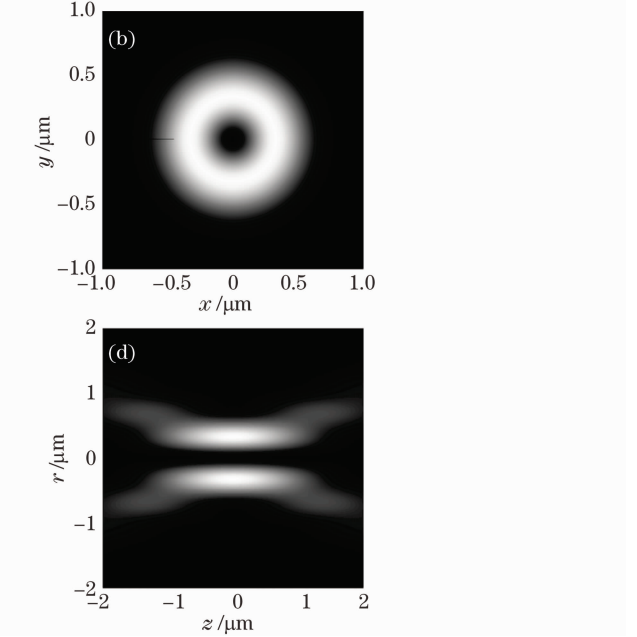
$$I(r, t) = I_{\max}(r, t)\eta(r, t)n_2(r, t), \quad (5)$$

式中 $\eta(r, t)$ 为自发荧光辐射在荧光态分子数密度演化中所占的比例, 可表达为

$$\eta(r, t) = \frac{1/\tau_{\text{FLUO}}}{I_{\text{STED}}(r, t)\sigma_{23}/(h\nu_{\text{STED}}) + (1/\tau_{\text{FLUO}}) + Q}. \quad (6)$$

模拟时设入射激发光在聚焦前的峰值强度为 0.5 W/cm^2 , 同步延迟时间为 100 ps , 入射 STED 光在聚焦前的峰值强度为 660 W/cm^2 , 则自发荧光辐射强度随横向距离的函数关系如图 7 所示, 为了能够更清楚地看到激发光、STED 光、荧光强度的对

聚焦前的峰值强度为 0.5 W/cm^2 , 入射 STED 光聚焦前的峰值强度为 660 W/cm^2 , 得到焦点处 ($z=0$) 焦斑的横向分布如图 6 所示。



比, 对纵坐标强度做了对数。其中曲线 a 和 b 分别表示激发光和 STED 光在焦平面上的峰值强度分布, 曲线 c 为焦点处荧光发射峰值强度分布。可以计算出自发荧光辐射区域的半峰全宽为 28 nm , 而激发光的焦斑半峰全宽为 368 nm , 分辨率得到约 13 倍的改善。

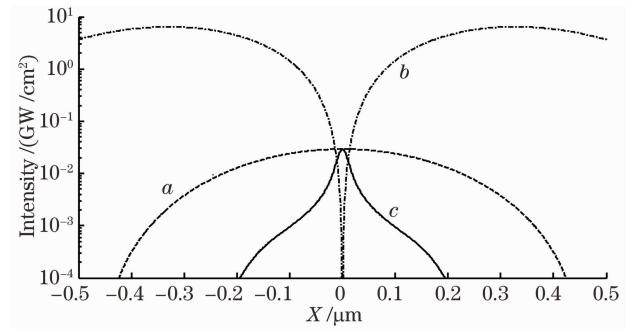


图 7 自发荧光辐射区域横向分布

Fig. 7 Lateral distribution of fluorescence intensity

随着 STED 光强的增加, 分辨率会得到更大的提高。图 8 为不同 STED 强度下的空间分辨率, 其中激发光峰值光强为 3 MW/cm^2 , 曲线 a, b 和 c 分别对应于 $I_{\text{STED}} = 6.4 \text{ GW/cm}^2, 0.64 \text{ GW/cm}^2$ 和 64 MW/cm^2 。

从图 8 中可以看出当 STED 强度为 6.4 GW/cm^2 , 焦斑半峰全宽为 20 nm (曲线 a); 而当 STED 强度为

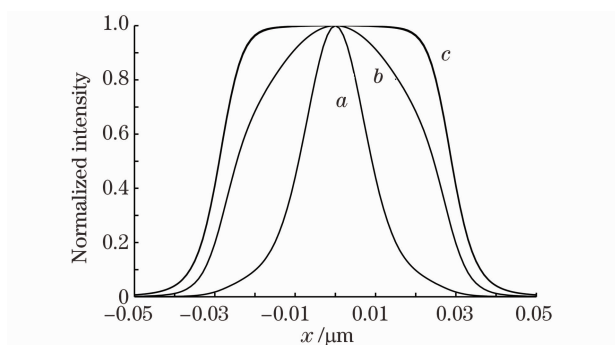


图 8 不同 STED 光强下的空间分辨率

Fig. 8 Resolution under different STED intensities

0.64 GW/cm² 时, 焦斑半峰全宽为 50 nm(曲线 *b*), 比曲线 *a* 有明显展宽; 当 STED 强度为 64 MW/cm² 时, 焦斑半峰全宽为 58 nm(曲线 *c*), 分辨率更低。当耗尽光峰值光强进一步减小时, 将会出现较强的次级大, 严重影响空间分辨率的提高。要得到优于 50 nm 的空间分辨率, 对于文中的

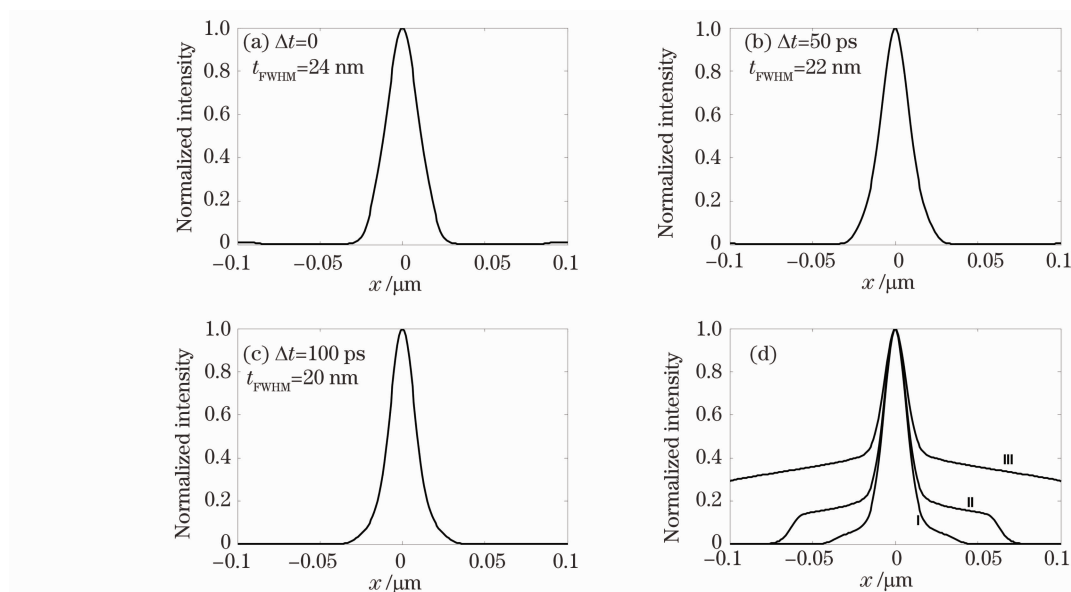


图 9 分辨尺寸与时间延迟的函数关系

Fig. 9 Function relations of resolution and delay time

在激发光和 STED 光强度分别为 3 MW/cm², 6.4 GW/cm² 时, 通过计算得出当脉冲宽度大于 400 ps 时, 有较强的自发荧光辐射背景, 需要更高的 STED 光强与自发荧光辐射竞争。当脉冲宽度为 100 ps, 时间延迟 $\Delta t=200$ ps 时, 得到的最小分辨尺寸为 28 nm, 大于脉冲宽度为 300 ps 时的最小分辨尺寸 20 nm, 这是因为太短的 STED 脉冲不能有效

荧光分子, STED 光强度应不小于 0.64 GW/cm²。

在激发光和 STED 光强度分别为 3 MW/cm², 6.4 GW/cm² 时, 还模拟了同步延迟时间对空间分辨率的影响, 如图 9 所示, 其中图 9(a) 为同步延迟时间 $\Delta t=0$ 时的自发荧光辐射区域横向分布, 其半高宽为 24 nm; 图 9(b) 为 $\Delta t=50$ ps 时的自发荧光辐射区域横向分布, 其半高宽为 22 nm; 图 9(c) 为 $\Delta t=100$ ps 时的自发荧光辐射区域横向分布, 其半高宽为 20 nm。传统上认为, 两束脉冲的同步延迟时间应该小于分子振动弛豫时间(一般小于 1 ps), 以有效耗尽荧光态分子^[7]。但是由于 STED 脉冲为高斯形, 且强度很高, 其脉冲前沿已经能够有效地对荧光态分子进行耗尽, 因此适当的同步延迟反而会提高空间分辨率。

图 9(d) 中曲线 *I*, *II* 和 *III* 分别对应于同步延迟时间 $\Delta t=0.2, 0.5, 1$ ns 时的自发荧光辐射区域横向分布, 可以明显看到一个较大的背景, 这是因为同步延迟时间过长以至于 STED 光还未来到时就已经有自发荧光辐射产生, 从而降低空间分辨率。总结图 9, 最佳同步时间延迟为 $\Delta t \approx 100$ ps。

地耗尽荧光态分子数。因此为了获得最佳的横向空间分辨率, 最佳的脉冲宽度应该在 300 ps 左右, 相应的最佳延迟时间在 100 ps 左右。

6 结 论

太小的激发光强度不足以引起充分的荧光分子激发, 难以探测; 太高的激发光强度则容易导致光漂

白或其他非线性过程,使荧光分子失去辐射能力。通过模拟可知,对于所选定的荧光染料分子,激发光强在 $3\sim 30\text{ MW/cm}^2$ 量级是适当的。

随着 STED 光光强的增加,荧光态分子数密度所需耗尽时间减小,在不损害样品活性的前提下,STED 光峰值光强越大越有利于耗尽荧光态分子,获得高的空间分辨率。对于所选定的荧光染料分子,激发光强在 1 GW/cm^2 量级是适当的。

传统上认为,两束脉冲的同步延迟时间应该小于分子振动弛豫时间,以有效耗尽荧光态分子。但是由于 STED 脉冲为高斯形,且强度很高,其脉冲前沿已经能够有效地对荧光态分子进行耗尽,因此适当的同步延迟反而会提高空间分辨率。对于选定的荧光分子及设备参数,通过模拟可知,当激发和 STED 脉冲宽度为 300 ps 时,最佳同步时间延迟为 $\Delta t \approx 100\text{ ps}$ 。

通过模拟,得到了 STED 荧光光学显微镜最佳激发光强、STED 光强以及同步延迟时间等信息,为

STED 荧光光学显微镜的设计奠定了理论基础。

参 考 文 献

- 1 Stefan W. Hell, Jan Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy[J]. *Optics Letters*, 1994, **19**(11): 780~782
- 2 V. Westphal, S. W. Hell. Nanoscale Resolution in the focal plane of an Optical Microscope[J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2005, **94**(14): 143903
- 3 B. Harke, J. Keller, C. K. Ullal *et al.*. Resolution scaling in STED microscopy[J]. *Opt. Express*, 2008, **16**(6): 4154~4162
- 4 V. Westphal, L. Kastrup, S. W. Hell. Lateral resolution of 28nm ($\lambda/25$) in far field fluorescence microscopy[J]. *Appl. Phys. B*, 2003, **77**(4): 377~380
- 5 Zhou Bingkun *et al.*. *Laser Principle*[M]. Beijing: National Defense Industry Press, 2004: 9~14
周炳琨. 等编著. *激光原理(第五版)*[M]. 北京: 国防工业出版社, 2004: 9~14
- 6 Guan Zhi, Lu Jinfu. *Numerical Methods*[M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2006: 286~293
关 治, 陆金甫. *数值方法*[M]. 北京: 清华大学出版社, 2006: 286~293
- 7 Martin Schrader, Franziska Meinecke, Karsten Bahlmann *et al.*. Monitoring the excited state of a fluorophore in a microscope by stimulated emission[J]. *Bioimaging*, 1995, **3**(4): 147~153