

受激发射损耗显微技术中 $0/\pi$ 圆形相位板参数优化

郝 翔 匡翠方* 王婷婷 刘 旭

(浙江大学现代光学仪器国家重点实验室光电显示技术研究所, 浙江 杭州 310027)

摘要 采用光的矢量衍射理论,研究了 $0/\pi$ 圆形相位板不同设计参数对于受激发射损耗(STED)显微镜中抑制光形成中空聚焦光斑聚焦质量的影响,并进行了数值模拟。相关计算结果表明,当采用不同偏振态、不同光强分布的入射光作为 STED 光, $0/\pi$ 圆形相位板内径的合理取值范围是不同的,而系统所用物镜的数值孔径对于内径的取值影响较小。在各种不同的参数组合下,使用线偏振光和圆偏振光作为入射光时, $0/\pi$ 圆形相位板内径取值范围基本保持一致;当入射光为径向偏振光时,内径取值则相对较大;而当使用切向偏振光时,任何取值均无法在系统焦平面附近得到满意的中空聚焦光斑。

关键词 受激发射损耗显微技术,相位板,衍射理论,数值孔径

中图分类号 O439 **文献标识码** A **doi:** 10.3788/AOS201131.0318001

Optimization of $0/\pi$ Phase Plate in Stimulated Emission Depletion Microscopy

Hao Xiang Kuang Cuifang Wang Tingting Liu Xu

(State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310027, China)

Abstract By use of vectorial diffraction theory, intensity distribution around focal spot of stimulated emission depletion (STED) beam in STED microscopy is numerically calculated and influence of diverse $0/\pi$ circular phase plate to performance of focal spot is evaluated. It is demonstrated that dark spot in center of focal plane can never be expected unless proper parameter of phase plate is selected, while such parameters are diverse with various polarizations and beam shapes of incident beams. Furthermore, effect of numerical aperture is comparatively neglectable. Explicit calculation further presents that reasonable value ranges of the inner radii of the phase plate are almost the same if the STED beam is linearly or circularly polarized, which is smaller than that of system with a radially polarized incident beam and the beam with azimuthal polarization can never be the proper option for STED beam.

Key words stimulated emission depletion (STED) microscopy; phase plate; diffraction theory; numerical aperture
OCIS codes 180.2520; 050.1960; 260.5430; 230.3990

1 引 言

受激发射损耗(STED)显微技术最早是 20 世纪 90 年代^[1]提出来的,是一种基于荧光显微技术^[2]和共焦显微技术^[3,4]的,具有突破传统衍射极限的新一代超分辨显微技术。与传统的荧光显微镜一样,它也包括一个激发光源,通过显微物镜在观察样

品表面聚焦并激发出荧光,荧光在被显微物镜反向收集后最终被光子计数器接收。其独特之处在于,STED 显微镜还包括一个抑制光源,它发射出的激光经过相位板编码后,将在物镜的焦平面上形成一个中空的聚焦光斑。由于抑制光源发出的激光对于样品内荧光基团的荧光发射具有消光作用,因此,在

收稿日期: 2010-09-06; 收到修改稿日期: 2010-10-08

基金项目: 浙江省自然科学基金(Y1100408)、中央高校基本科研业务费专项资金(2010QNA5035)和现代光学仪器国家重点实验室基金资助课题。

作者简介: 郝翔(1984—),男,博士研究生,主要从事超分辨成像方面的研究。E-mail: caesarhx@gmail.com

导师简介: 刘旭(1963—),男,博士,教授,主要从事三维显示、超分辨成像和薄膜等方面的研究。

E-mail: liuxu@zju.edu.cn

* 通信联系人。E-mail: cfkuang@zju.edu.cn

激发光与抑制光的共同作用下,样品内实际可产生荧光的区域范围被压缩在中空聚焦光斑中心暗斑区域以内,由于该区域的大小远远小于衍射极限,STED显微镜也由此具有的超分辨显微能力。目前的报道中,STED显微镜的显微能力已达到十纳米量级^[5]。

相位板的合理应用是 STED 显微镜中抑制光得以在物镜焦平面上形成中空聚焦光斑的关键所在。为了在抑制聚焦点周围荧光激发效应的同时维持聚焦中心点的荧光激发,通常要求形成的中空聚焦光斑中心暗点光强小于其周围最强点光强的 1%^[6]。而为了实现方向不同的中空聚焦光斑,STED 显微镜中会使用不同的相位板设计^[1,7,8],其中 $0/\pi$ 圆形相位板主要是为了实现纵向的中空聚焦光斑。在早期的文献中,通常认为只要保证相位板中 0 相位延迟区和 π 相位延迟区的面积相等,即相位板内外径之比 $r/R=0.707$ 时即可以实现满足要求的中空聚焦光斑。理论模拟与实验都表明,在高数值孔径下,当入射的 STED 光束为圆偏振的均匀分布平面波时,这样的设计参数是合理的。但是在

实际应用时的光束强度分布往往为高斯平面波和各种类高斯波^[9,10](如 Bessel-Gauss 波、Laguerre-Gauss 波等);并且随着技术的进步,越来越多的科技工作者开始关注各种圆柱形偏振光^[11](如径向偏振光和切向偏振光)的独特性质在 STED 显微技术中的应用。因此,传统的单一参数的 $0/\pi$ 圆形相位板已经不能满足要求。

本文研究了在不同偏振态和不同光束强度分布的入射光情况下, $0/\pi$ 圆形相位板内外径之比对于所形成的中空聚焦光斑的影响,并进行了数值计算和模拟。在计算过程中,将物镜的数值孔径也列为潜在的因素进行了考量。

2 光的矢量衍射理论

如图 1 所示,在理想状况下,如果忽略所有由成像系统造成的像差,根据光的矢量衍射理论,物镜焦点附近的光场内电场强度分布可以写成^[12]:

$$\mathbf{E}(r_2, \varphi_2, z_2) = iC \int_{\Omega} \sin \theta \cdot \mathbf{A}_1(\theta, \varphi) \cdot \mathbf{A}_2(\theta, \varphi) \cdot \begin{bmatrix} p_x \\ p_y \\ p_z \end{bmatrix} \cdot \exp[i\Delta\alpha(\theta, \varphi)] \exp\{ikn[z_2 \cos \theta + r_2 \sin \theta \cos(\varphi - \varphi_2)]\} d\theta d\varphi, \quad (1)$$

式中 $\mathbf{E}(r_2, \varphi_2, z_2)$ 是焦点附近点 (r_2, φ_2, z_2) 的电场分布, C 是归一化常数, $\mathbf{A}_1(\theta, \varphi)$ 是光束的强度分布, $\mathbf{A}_2(\theta, \varphi)$ 是一个与所用成像物镜相关的 3×3 矩阵, $[p_x; p_y; p_z]$ 是描述入射光偏振方向的单位矩阵, $\Delta\alpha(\theta, \varphi)$ 是相位板相位延迟参数。

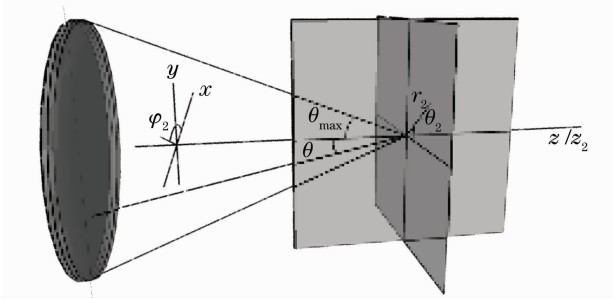


图 1 光束聚焦结构原理图
Fig. 1 Geometry of the beam focusing

在通常情况下,入射光束往往为均匀平面波、高斯波或者类高斯波(如 Bessel-Gauss 波、Laguerre-Gauss 波等)。当入射光波为均匀平面波时,

$$A_1(\theta, \varphi) = 1, \quad (2)$$

当入射光为高斯平面波时,

$$A_1(\theta, \varphi) = \exp\left[-\beta_0^2 \left(\frac{\sin \theta}{\sin \alpha}\right)^2\right], \quad (3)$$

当入射光为 Bessel-Gauss 平面波时^[13],

$$A_1(\theta, \varphi) = \exp\left[-\beta_0^2 \left(\frac{\sin \theta}{\sin \alpha}\right)^2\right] J_1\left(2\beta_0 \frac{\sin \theta}{\sin \alpha}\right), \quad (4)$$

在(2)~(4)式中, β_0 为描述光阑半径与光束束腰半径之间比例的常数;并且 $\alpha = \arcsin(NA/n)$, 其中 NA 为数值孔径。

对于经典 STED 系统来说,选择消复色差透镜作为物镜。此时, $\mathbf{A}_2(\theta, \varphi)$ 可以写为^[14,15]

$$\mathbf{A}_2(\theta, \varphi) = a(\theta) \cdot \mathbf{V}(\theta, \varphi), \quad (5)$$

式中

$$a(\theta) = \sqrt{\cos \theta}, \quad (6)$$

$\mathbf{V}(\theta, \varphi) =$

$$\begin{bmatrix} 1 + (\cos \theta - 1) \cos^2 \varphi & (\cos \theta - 1) \cos \varphi \sin \varphi & -\sin \theta \cos \varphi \\ (\cos \theta - 1) \cos \varphi \sin \varphi & 1 + (\cos \theta - 1) \sin^2 \varphi & -\sin \theta \sin \varphi \\ \sin \theta \cos \varphi & \sin \theta \sin \varphi & \cos \theta \end{bmatrix}, \quad (7)$$

相位板内外径之比 $k=r/R$ 决定了(1)式的积分区间。当 k 为定值时, $0/\pi$ 圆形相位板相位延迟参数可以表示为

$$\begin{cases} \Delta\alpha = \pi & [0 \leq \theta \leq \arcsin(k \sin \theta_{\max})] \\ \Delta\alpha = 0 & [\arcsin(k \sin \theta_{\max}) \leq \theta \leq \sin \theta_{\max}] \end{cases}, \quad (8)$$

使用自适应 Simpson 算法^[16], 规定计算区间后, 即可以很容易得到焦平面上聚焦光斑内的电场强度分布情况。

3 数值模拟计算

利用上述公式对物镜焦点附近纵向平面内的光场内的强度分布进行模拟计算。图 2 是各种常用偏振态的入射光在焦点附近纵向平面内的光场强度分布图。从图 2 中可以看出, 除了切向偏振光之外, 其他偏振态的入射光均可以实现较好的中空聚焦光斑。因此, 在文中, 仅仅以线偏振光、圆偏振光和径向偏振光作为讨论对象。

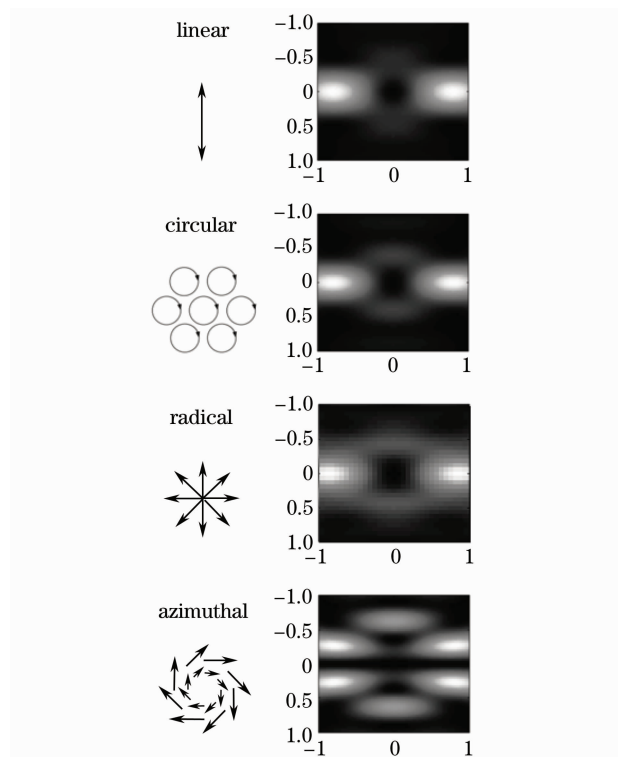


图 2 不同偏振光入射时焦点附近纵向平面内的光场强度分布图

Fig. 2 Intensity distributions around the focal spot in vertical plane under the situation of diverse polarized incidence beams

利用此结果, 假设入射光为线偏振光、圆偏振光或者径向偏振光中的一种, 光束强度分布为均匀平

面波、高斯平面波或者 Bessel-Gauss 平面波之一, 在此前提下, 考量各种数值孔径的聚焦物镜情况下 $0/\pi$ 圆形相位板内外径之比的合理取值。为了使计算符合现实情况, 当数值孔径 $NA \geq 1$ 时, 在像方使用折射率 $n=1.518$ 的浸油; 而当 $NA < 1$ 时, 像方介质为空气。以形成的中空聚焦光斑中心暗点光强小于其周围最强点光强的 1% 作为合理取值的判定条件。

图 3 所示的图表是各种不同入射光在不同偏振态下, $0/\pi$ 圆形相位板内外径之比的合理取值。图 3(a)~(c) 分别为入射光束强度分布为均匀平面波、高斯平面波和 Bessel-Gauss 平面波时的情况。综合图 3 可以看出, $0/\pi$ 圆形相位板的合理取值在各种情况下并不是一个特定值, 而表现为一个特定的取值范围, 其大小约为 0.03。在这之中, 只有当入射光为线偏振或者圆偏振的均匀平面波时, $0/\pi$ 圆形相位板内外径之比取值 $r/R=0.707$ 才是合理的, 在其他入射光情况下均与此值有所区别。当入射光为线偏振光或圆偏振光时, $0/\pi$ 圆形相位板的内外径之比的合理取值范围几乎重合, 且呈线性, 这表明此时合理取值与 NA 无关。与之相对应, 当入射光为径向偏振光时, $0/\pi$ 圆形相位板需要具有相对较大的内径才能够获得高质量的中空聚焦光斑; 且其取值范围随着 NA 的增加而呈现增加的趋势, 但当 $NA=0.8 \sim 1$ 时, 取值范围有一个突变, 造成该突变的主要原因是当 $NA=1$ 时, 在像方使用了折射率 $n=1.518$ 的浸油, 因此此时系统的像方孔径角相比于 $NA=0.8$ 时是减小的。

4 结 论

本文采用了光的矢量衍射理论, 研究了 $0/\pi$ 圆形相位板不同设计参数对于 STED 显微镜中抑制光 (STED 光) 中空聚焦光斑聚焦质量的影响, 并进行了数值模拟。结果表明, 对于不同偏振态、不同光强分布的抑制光 (STED 光), $0/\pi$ 圆形相位板内径的取值范围是不同的: 当入射光束为线偏振光或者圆偏振光时, 二者的取值范围近乎重合并呈现与数值孔径 NA 无关的特性; 而当入射光束为径向偏振光时, 合理的取值范围相较于前两者更大; 而当入射光束为切向偏振光时, 无论如何设计 $0/\pi$ 圆形相位板均无法得到有效的中空聚焦光斑。因此, 针对入射光的特性进行相位板的专门设计对于提高 STED 显微镜系统性能是非常必要的。

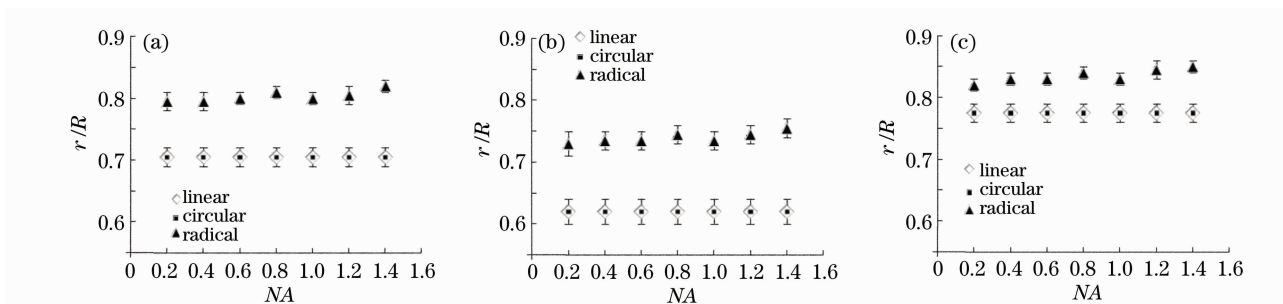


图 3 不同数值孔径和入射光情况下相位板的合理取值。入射光为(a)均匀平面波,(b)高斯平面波,(c) Bessel-Gaussian 平面波时的情况

Fig. 3 Diagram of proper design parameter for $0/\pi$ circular phase plate under the situation of diverse NA and incidence beam with different polarization. The incident beam is (a) uniform plane wave, (b) Gaussian plane wave, (c) Bessel-Gaussian plane wave

参 考 文 献

- 1 S. W. Hell, J. Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy [J]. *Opt. Lett.*, 1994, **19**(11): 780~782
- 2 Gao Wanrong, Yang Xiaochun, Huang Lin *et al.*. Signal-to-noise ratio and information capacity of a confocal scanning fluorescence microscope [J]. *Acta Optica Sinica*, 2002, **22**(10): 1229~1235
高万荣, 杨晓春, 黄琳等. 共焦扫描荧光显微镜的信噪比与信息量 [J]. *光学学报*, 2002, **22**(10): 1229~1235
- 3 Pei Hongjin, Tang Zhilie, Yang Chuping *et al.*. Influence of fluorescent wavelength on imaging property of confocal microscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2002, **22**(10): 1219~1223
裴红津, 唐志列, 杨初平等. 荧光波长对共焦显微镜成像特性的影响 [J]. *光学学报*, 2002, **22**(10): 1219~1223
- 4 Yu Qing, Yu Xiaofen, Bi Meihua. Research on high-precision acquisitive method of surface coordinate information based on parallel confocal microscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(11): 3057~3060
余卿, 余晓芬, 毕美华. 并行共焦显微探测高精度表面坐标信息获取方法 [J]. *光学学报*, 2009, **29**(11): 3057~3060
- 5 E. Rittweger, K. Y. Han, S. E. Irvine *et al.*. STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution [J]. *Nature Photonics*, 2009, **3**(3): 144~147
- 6 V. Westphal, S. W. Hell. Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope [J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2005, **94**(14): 143903
- 7 S. W. Hell. Toward fluorescence nanoscopy [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**(11): 1347~1355
- 8 D. Wildanger, J. Buckers, V. Westphal *et al.*. A STED microscope aligned by design [J]. *Opt. Express*, 2009, **17**(18): 16100~16110
- 9 Chen Baosuan, Pu Jixiong, Zhang Zhiming *et al.*. Focusing of partially coherent and circularly polarized Bessel-Gaussian beams through a high numerical-aperture [J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(6): 1664~1670
陈宝算, 蒲继雄, 张志明等. 部分相干圆偏振贝塞尔-高斯光束经高数值孔径透镜的聚焦 [J]. *光学学报*, 2009, **29**(6): 1664~1670
- 10 Zhao Zhaoxiong, Liu Yong. Effect of primary coma aberration on focusing of a circularly polarized vortex Bessel-Gaussian beams [J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37**(3): 739~742
赵肇雄, 刘勇. 初级彗差对圆偏振涡旋贝塞尔-高斯光束聚焦场的影响 [J]. *中国激光*, 2010, **37**(3): 739~742
- 11 Qiwen Zhan. Cylindrical vector beams: from mathematical concepts to applications [J]. *Adv. Opt. Photon.*, 2009, **1**(1): 1~57
- 12 B. Richards, E. Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems II. structure of the image field in an aplanatic system [J]. *Proc. R. Soc. London Ser. A*, 1959, **253**(1274): 358~379
- 13 K. S. Youngworth, T. G. Brown. Focusing of high numerical aperture cylindrical-vector beams [J]. *Opt. Express*, 2000, **7**(2): 77~87
- 14 S. Quabis, R. Dorn, M. Eberler *et al.*. Focusing light to a tighter spot [J]. *Opt. Commun.*, 2000, **179**(1-6): 1~7
- 15 Zhang Yanli, Li Xiaoyan, Zhu Jianqiang. Generation and focusing property with high-numerical aperture lens of ventorial polarized beam [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(1): 129~133
张艳丽, 李小燕, 朱健强. 矢量偏振光束的产生及其高数值孔径聚焦性质 [J]. *中国激光*, 2009, **36**(1): 129~133
- 16 K. E. Atkinson. An Introduction to Numerical Analysis [M]. New York: John Wiley & Sons., 1989