

基于电光调制器的高速偏振荧光显微系统

王 潇, 赵 远, 杨 凤, 尹建华

南京航空航天大学生物医学工程系, 江苏 南京 211106

摘要 为提高偏振荧光图像序列的获取速度, 提出利用电光调制器对激发光的偏振方向进行控制并配合相机记录偏振荧光图像的高速偏振荧光显微系统。对激发光路的偏振畸变进行测量和有效补偿, 以确保样本平面激发光偏振方向的精确控制。利用巨型单层囊泡样本对实验系统进行测试, 结果表明该系统能够以近视频帧率对分子方向信息进行成像, 具备监测动态样本分子方向信息的能力。

关键词 显微; 偏振荧光显微; 电光调制器; 生物分子方向; 偏振畸变

中图分类号 O439 文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201737.1118001

Fluorescence Microscopy System with High Speed Polarization Based on Electro Optical Modulator

Wang Xiao, Zhao Yuan, Yang Feng, Yin Jianhua

*Department of Biomedical Engineering, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics,
Nanjing, Jiangsu 211106, China*

Abstract To improve the acquisition speed of polarized fluorescence images, a fluorescence microscopy system with high speed polarization is proposed based on the polarization direction control of exciting light with an electro optical modulator, and polarized fluorescence images are recorded with a camera. The polarization distortion induced by the excitation optical path is measured and precisely compensated to ensure the precision of polarization direction control on sample plane. The experimental system is tested with giant unilamellar vesicles. The results show that the proposed system can effectively map the orientation information of biomolecular at a video frame rate and can be used to monitor orientation information of dynamic sample molecules.

Key words microscopy; polarized fluorescence microscopy; electro optical modulator; biomolecular orientation; polarization distortion

OCIS codes 180.2520; 230.2090; 110.5405

1 引 言

偏振作为光的一个基本特性, 在光与物质的相互作用过程中表现出对样本方向信息的敏感性, 因此偏振光被广泛应用于光学显微成像技术中, 提供强度和相位之外另一维度的对比度, 以获取样本的各项异性信息^[1]。基于荧光吸收效率对激发光偏振方向的敏感性提出的偏振荧光显微技术^[2], 通过分析荧光辐射对激发光偏振方向的响应可以获取荧光分子的方向信息, 成为研究生物分子方向及结构信息的有力工具。基于单分子荧光吸收的偏振荧光显微技术已成功用于分子方向信息的获取, 例如细胞膜磷脂分子方向排列的有序度^[3]、酵母 Septin 蛋白质方向^[4-5]以及细胞膜上及细胞核孔处蛋白质分子的方向结构^[6-7]。相比于单光子荧光吸收, 多光子荧光成像具有分辨率高、成像深度深等优点, 并且多光子荧光吸收效率对激发光偏振方向具有更高频率的响应^[8], 因此, 多光子偏振荧光显微成像可以获取生物分子更为复杂的空间结构信息, 如蛋白质分子的内部组织结构^[9]、蛋白分子排列及聚合结构^[10]、蛋白晶体结构^[11-12]以及生物组织纤维结

收稿日期: 2017-05-02; 收到修改稿日期: 2017-06-06

基金项目: 国家自然科学基金(61505079)、江苏省自然科学基金(BK20150752)

作者简介: 王 潇(1985—), 男, 博士, 讲师, 主要从事偏振荧光显微成像及生物光子学方面的研究。

E-mail: xiao.wang@nuaa.edu.cn

构^[13-14]等。另外,通过荧光偏振响应来获取分子方向,可以在纳米尺度区分不同的荧光分子,基于此有研究小组提出基于荧光偏振分析的超分辨显微方法^[15]。

上述基于荧光偏振响应分析的显微成像技术可对荧光显微成像系统激发光的偏振方向进行控制,并获取不同偏振方向激发光对应的荧光图像序列。偏振控制最传统的方法是通过波片或偏振片的旋转来实现^[3,6,9-11,16],荧光显微成像系统可以是宽光场或激光扫描显微成像系统。基于波片或偏振片旋转进行偏振方向控制的响应时间在几百毫秒量级,使得整个偏振荧光图像序列的获取非常耗时,不适用于动态样本,特别是活体生物样本的测量。为此,有研究小组提出基于液晶调制的偏振荧光显微系统^[4,17],但液晶会对温度等因素产生不稳定性,从而使得偏振控制产生偏差。相比于液晶,电光调制器(EOM)也可以实现偏振控制^[18],且响应速度为纳秒量级,性能更为稳定。有研究小组利用 EOM 进行偏振控制,在激光扫描显微系统上实现了高速的多光子偏振荧光显微成像^[19],相关技术成功应用于活体样本的研究,例如用于人体脸部皮肤胶原蛋白纤维的研究等^[14]。

本文基于宽光场荧光显微系统,利用 EOM 配合 1/4 波片(QWP)对激发光偏振方向进行快速控制,配合相机曝光记录对应的偏振荧光图像,同时在数据采集和偏振控制方面采用硬件同步的方式减少测量过程中与计算机通信和数据交换的时间,以最大程度地提高测量速度。对激发光路产生的偏振畸变进行测量和补偿,确保偏振控制的准确性。利用巨型单层囊泡(GUVs)对系统进行测试验证,结果证明该系统能以近视频帧率对分子方向信息成像,具备监测动态样本的能力。

2 实验系统

2.1 光 路

整个光路系统基于倒置荧光显微系统(IX51 型,Olympus 公司,日本)进行搭建,如图 1(a)~(c)所示。半导体激光器(Calypso 型,Cobolt 公司,美国)发出波长为 491 nm 的连续光波,将其作为激发光,激发光进入由半波片(WPH05M-488 型,Thorlabs 公司,美国)和格兰偏振器(GTH5-A 型,Thorlabs 公司,美国)组成的功率调制模块。在该模块中格兰偏振器的透射轴沿垂直方向固定,通过旋转半波片可以改变输出垂直线偏振光的功率,以适应样本和相机的曝光时间。垂直线偏振光经由 EOM(Pockels cell No 28-Np 型,Quantum

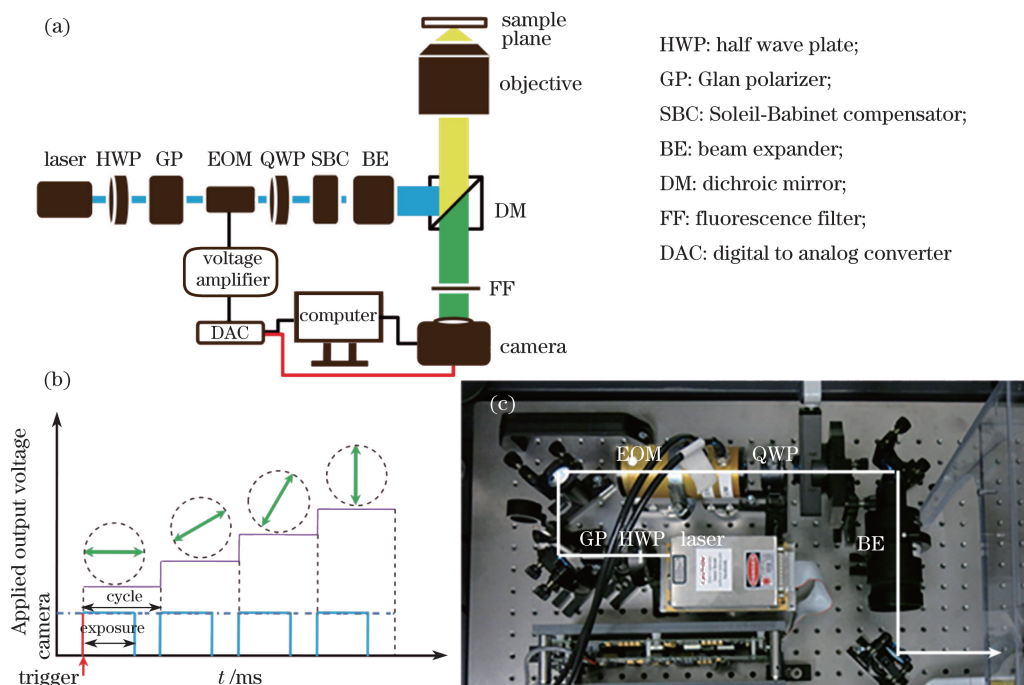


图 1 (a)高速偏振荧光显微系统示意图;(b)偏振图像采集信号控制时序;(c)偏振控制光路
Fig. 1 (a) Schematic of fluorescence microscopy system with high speed polarization; (b) control sequence of polarization image acquisition signal; (c) optical path of polarization controlling

technology 公司,美国)和 1/4 波片组成的偏振方向控制模块后变为具有不同偏振方向的线偏振光。扩束镜(BE05-10-A 型,Thorlabs 公司,美国)放大光斑的尺寸需匹配显微物镜后焦平面的入射孔径。线偏振光被二向色镜(FF499-Di01 型,Semrock 公司,美国)反射后进入显微物镜被聚焦,以照亮样本平面并激发样本。样本受激发后出射的辐射荧光经同一物镜返回,透过二向色镜和荧光滤光片后被相机(ORCA-Flash4.0 LT,Hamamatsu 公司,日本)曝光成像。

2.2 数据采集

使用数模转换卡(NI-USB-6351 型,NI 公司,美国)生成模拟电压输出信号,通过电压放大器(2350 型,Tegam 公司,美国)的放大电压信号来控制 EOM,以进行偏振控制。整个控制电路设备带宽均超过 1 MHz,从而可确保偏振控制的响应时间小于 $1 \mu\text{s}$ 。在电压信号控制生成的具有特定偏振方向的线偏振光激发下,通过相机曝光记录相应的荧光图像。为了最大程度地提高偏振荧光图像序列的获取速度,在偏振控制和相机曝光过程中减少数模转换卡、相机与计算机通信的时间,利用数据采集卡的内部存储空间预设所需偏振方向的对应电压序列以及每个电压的维持时间。相机选用动态连拍模式,设其曝光周期与偏振方向所对应的电压信号维持时间一致,相机曝光图像数量与偏振方向调制个数相同。数模转换卡输出同步信号,触发相机开始曝光第 1 幅荧光图像,之后相机根据曝光时间和曝光图像数量自动曝光记录,并利用自身内部存储空间存储整个偏振荧光图像序列,最后一次性将图像输出到计算机。具体数据采集控制序列如图 1(b)所示。

2.3 偏振控制与补偿

在系统中利用 EOM 配合 QWP 来实现入射激发光偏振方向的控制。所选 EOM 为基于泡克耳斯效应的泡克耳斯盒(No 28-NP 型,Quantum Technology 公司,美国)。泡克耳斯效应为线性电光效应,施加电场引起的快慢轴相位差与所施加电场呈线性关系,通过施加电场产生双折射效应。偏振方向控制原理如图 2 所示,其中泡克耳斯盒的主轴与 X 轴成 45° 放置,QWP 的快轴方向沿垂直方向(Y 轴)固定,与入射的垂直线偏振光方向相同。利用琼斯矩阵分析该模块进行偏振方向控制的原理。

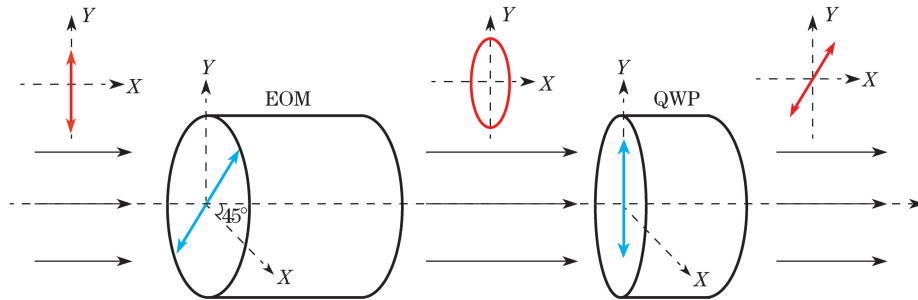


图 2 EOM 和 QWP 组成的偏振旋转模块

Fig. 2 Polarization rotation module combining EOM with QWP

垂直入射的线偏振光可表示为: $[0 \ 1]^T$;快轴成 45° 放置的泡克耳斯盒可表示为: $\cos(\Gamma/2) \begin{bmatrix} 1 & i \tan(\Gamma/2) \\ i \tan(\Gamma/2) & 1 \end{bmatrix}$,

其中 Γ 为施加电压时双折射引起的快慢轴之间的相位差;快轴垂直放置的 QWP 可表示为: $\begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -i \end{bmatrix}$ 。因此,输入

的线偏振光经 QWP 后的出射光可表示为: $\begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -i \end{bmatrix} \cdot \cos(\Gamma/2) \begin{bmatrix} 1 & i \tan(\Gamma/2) \\ i \tan(\Gamma/2) & 1 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \end{bmatrix} \propto \begin{bmatrix} \sin(\Gamma/2) \\ -\cos(\Gamma/2) \end{bmatrix}$ 。

可知,出射光仍为线偏振光,其偏振方向的旋转角度为泡克耳斯盒快慢轴引入相位差的一半。荧光偏振显微系统中,需要激发光偏振方向从 0° 到 180° 旋转,因此需要泡克耳斯盒引入 $0^\circ \sim 360^\circ$ 的相位延迟,对应的电压信号为 $0 \sim 400 \text{ V}$,偏压为 -200 V 。为此,数模转换卡生成 $\pm 2.5 \text{ V}$ 的模拟电压信号,并通过电压放大器进行 80 倍电压放大,生成的 $-200 \sim 200 \text{ V}$ 电压信号用来实现出射光从 $0^\circ \sim 180^\circ$ 的旋转。由图 3(a)可见,激发光偏振方向与模拟输出电压之间为线性关系(由于泡克耳斯效应为线性电光效应),任意所需偏振方向对应的控制电压可以通过线性差值计算得到。在偏振控制实现环节中,泡克耳斯盒具有非常高的线性度,

而选用的数模转换卡具有输出 16 bit 模拟电压的高分辨率,因此偏振方向的控制精度主要取决于电压放大器。本系统所选用电压放大器的失真度约为 0.1%,而泡克耳斯盒的灵敏度为 13 mrad/V,因此在最大偏压 200 V(−200 V)时会产生 0.15°左右的偏差,该偏差可以忽略。

激发光路中的光学器件对通过的偏振光会造成一定的偏振畸变,特别是二向色镜。为此,利用自制的偏振畸变测量工具^[20],对 QWP 到物镜后焦平面之间光路产生的偏振畸变进行了检测。具体方法为:利用偏振控制模块产生不同偏振方向的理想线偏振光,然后使用自制的偏振畸变测量工具在物镜后焦平面测量对应的偏振态(包括椭圆偏度和主轴方向两个参数),测量结果如图 3(b)所示。从图 3(b)中可以看出,激发光路中的多个光学器件对入射的线偏振光造成了一定畸变,使其在某些方向变成了椭圆偏振光。使用虚拟波片并改变其参数(包括快轴方向、相位延迟和快慢轴衰减比率),基于最小二乘法拟合上述测量的椭圆偏度和主轴方向两个参数对入射偏振方向的响应曲线,得到激发光路上的光学器件产生的偏振畸变等效于插入一个快轴方向为 13.1°、延迟为 18.7°的波片。据此,在扩束镜前插入索累-巴比涅补偿器(SBC-VIS 型,Thorlabs 公司,美国),当补偿器的快轴方向垂直于 13.1°且调节器相位延迟为 18.7°时,激发光路中光学器件导致的偏振畸变可以得到补偿。对补偿后后焦平面的偏振态再次进行测量,如图 3(b)所示,可以看出偏振畸变已被有效补偿,后焦平面偏振态与入射线偏振光保持一致。图 3(b)中紫线表示光路中各个位置的偏振态,蓝线表示 EOM 和 QWP 的快轴方向。

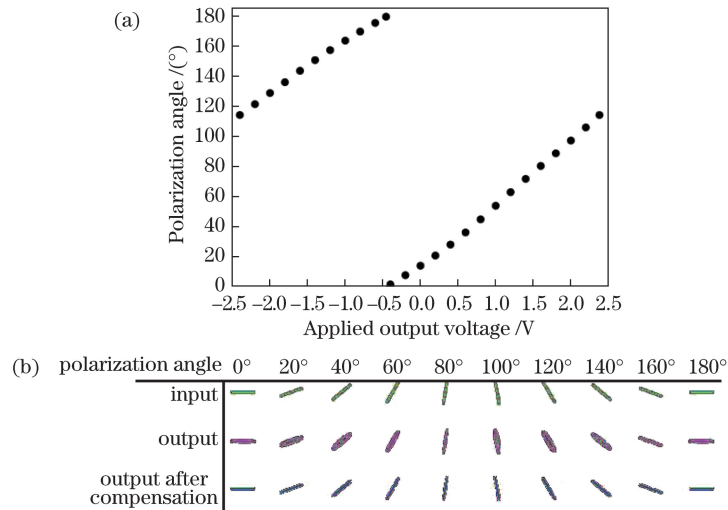


图 3 (a)偏振角度与施加输出电压的关系;(b)偏振控制模块输出的线偏振光(绿线)经激发光路偏振产生畸变后在物镜后焦平面上的偏振态(紫线)及加入索累-巴比涅补偿器补偿之后在后焦平面的偏振态(蓝线)

Fig. 3 (a) Polarization angle versus applied output voltage; (b) polarization states of distorted output linear polarization light from polarization control unit (green lines) at the back focal plane before (purple lines) and after (blue lines) compensation by Soleil-Babinet compensator

3 实验验证与分析

3.1 理论基础

荧光分子具有极性方向,其吸收效率正比于荧光吸收偶极子与电场点乘的平方^[2],因此单光子吸收的荧光辐射光强为

$$I \propto |\boldsymbol{\mu}_{\text{abs}} \cdot \boldsymbol{E}|^2 \propto \cos^2(\alpha - \rho), \quad (1)$$

式中 $\boldsymbol{\mu}_{\text{abs}}$ 为吸收偶极子矢量(方向角为 ρ), \boldsymbol{E} 为激发光的电场矢量(方向角为 α)。光学显微成像存在空间分辨极限,在可分辨的激发光斑内存在大量荧光分子,这些荧光分子的方向可以用平均极性方向角 θ 和方向偏差 Ω 来统计性地描述,如图 4(a)所示。激发光斑内偏振方向为 α 时的辐射光强可表示为

$$I(\alpha) \propto \int_{\theta-\Omega/2}^{\theta+\Omega/2} \cos^2(\alpha - \rho) d\rho. \quad (2)$$

当激发光的偏振角 α 从 0° 旋转至 180° 时,其对应的辐射光强 $I(\alpha)$ 是方向角为 2α 的余弦调制曲线,如图 4(b)所示,其最大值出现在 $\alpha = \theta$ 时,其调制幅度 R 取决于方向偏差 Ω , Ω 越小则 R 值越大, Ω 越大则 R 值越小。因此通过分析辐射荧光受激发光偏振方向 α 的调制响应,可获取光斑内与荧光分子的方向统计信息,包括 θ 和 Ω ,从而可研究被荧光分子所标记的生物分子的方向信息。

3.2 实验验证

选用 GUVs 作为测试样本对系统进行实验测试。GUVs 是通过电化学方法制备的人工球形空腔,表面覆盖单层磷脂分子膜^[21],其磷脂分子均匀排列在球形表面,具有与细胞膜相似的磷脂分子排列结构,被广泛用作标准样本来模拟细胞膜的结构和功能^[22]。在制备过程中加入荧光分子并对磷脂分子进行标记,其刚性键合链接使得荧光分子排列方向与磷脂分子相关。样本制备中选用的磷脂分子为 DOPC(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine),选用的染色荧光分子为 di-8-ANEPPQ,磷脂分子与荧光分子的摩尔比为 1000:1。这种荧光分子在键合作用后具有与磷脂分子相同的极性方向,垂直于球形表面均匀排列,如图 4(a)所示,黑色圆圈内为激发光斑内荧光分子(红线)方向的统计描述(包括平均方向 θ 和方向偏差 Ω)。图 4(b)为激发光斑内荧光分子在激发光偏振方向 α 调制下的荧光响应曲线, $\alpha = \theta$ 处为最大响应位置。

实验中激发光的偏振角 α 从 0° 旋转至 180° ,间隔为 10° ,相机曝光记录偏振荧光图像序列,相机采用 $512 \text{ pixel} \times 512 \text{ pixel}$ 的子阵列分辨率,可以达到 400 pixel/s 的曝光速度,每幅图像用时 2.5 ms ,因此整个偏振荧光图像序列的获取时间为 47.5 ms 。图 4(c)给出了在不同偏振角 α 下曝光记录的其中一个巨型囊泡样本赤道平面的荧光图像。可以看出在不同偏振方向的激发下,辐射光强分布在变化,对于同一位置,当激发光的偏振方向与该位置处荧光分子的平均方向一致时,其辐射荧光会达到最大值。

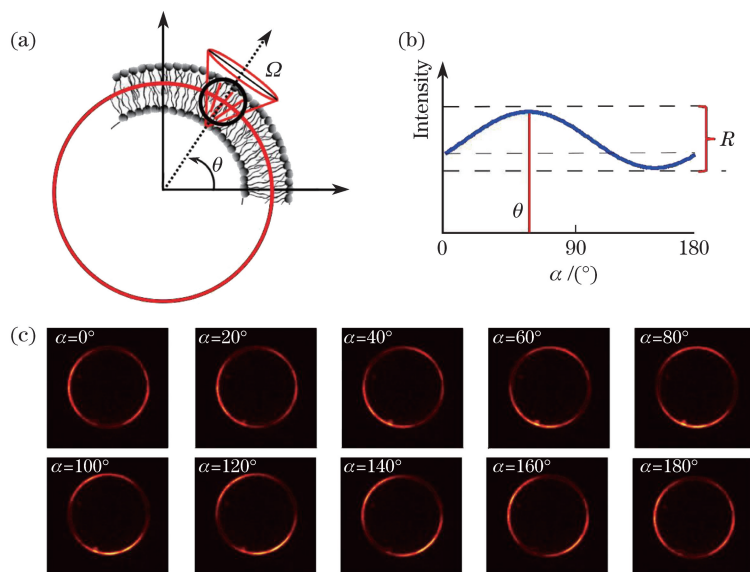


图 4 (a)巨型囊泡赤道面上磷脂分子排列示意图;(b)偏振角为 α 时的荧光强度;
(c)在不同偏振角激发光下 CCD 曝光记录的荧光图像

Fig. 4 (a) Schematics of lipid molecules at equatorial plane of giant vesicle; (b) fluorescence intensity under polarization angle of α ; (c) fluorescence images recorded by CCD at various polarization angle α

图 5(a)展示了偏振荧光图像序列叠加在一起的辐射荧光总强度。从获取的偏振荧光图像序列中对每个像素位置沿偏振方向 α 提取荧光响应曲线,图 5(b)展示了图 5(a)中 4 个不同位置(A、B、C 和 D)的荧光响应。由第 3.1 节的分析可知,偏振响应 $I(\alpha)$ 为频率为 2α 的余弦函数。据此设计拟合函数 $y = a \cdot \cos[2(\alpha - b)] + c$,对所获取的偏振响应进行以 2α 为频率的余弦拟合,其中拟合系数 a 反映响应曲线的 R , b 为光斑内荧光分子的平均方向 θ , c 为偏振响应的平均值。对上述获取的偏振荧光响应进行拟合后,可以看出偏振荧光响应符合预期的余弦分布。对获取的荧光图像序列进行数据处理,每个像素位置处荧光分子的平均方向 θ 为该位置处荧光响应曲线最大值对应的偏振方向 α ,处理结果如图 5(c)所示。从图 5(c)中可以看出,荧光分子的

平均方向 θ 沿囊泡的轮廓线从 0° 变化至 180° , 符合预期, 囊泡周围和内部荧光分子方向随机分布, 因此其最大响应位置也是随机的。同时根据 R 的定义, 满足

$$R = \frac{\max[I(\alpha)] - \min[I(\alpha)]}{\text{mean}[I(\alpha)]}, \quad (3)$$

式中 $\max()$ 代表取最大值, $\min()$ 代表取最小值, mean 代表取平均值。对每个位置的调制响应进行处理, 计算其偏振响应调制幅度 R , 计算结果如图 5(d) 所示。由图 5(d) 可以看出, 在囊泡赤道面的分子膜轮廓上, R 约为 0.05, 表面轮廓上所有位置的调制幅度保持一致, 说明激发光斑内分子排列方向的偏差 Ω 保持一致, 这与囊泡本身磷脂分子均匀排列分布的事实相符合, 意味着高速偏振显微系统在获取各个位置荧光分子的方向信息时具有相同的效率。囊泡内外由于平均荧光信号小而没有偏振响应, 所以其 R 值偏大且随机分布。

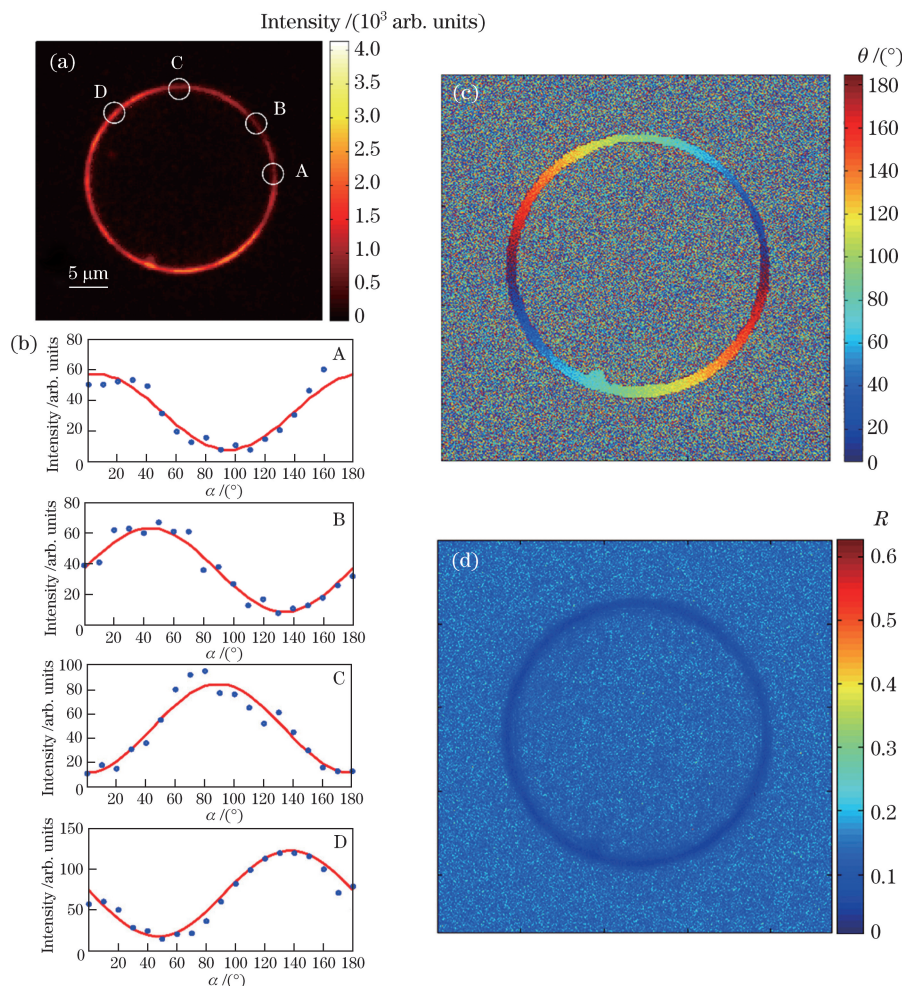


图 5 (a) 各个偏振荧光图像叠加后总的荧光强度图像; (b) 图 5(a) 中 A、B、C、D 4 个位置处荧光调制响应以及拟合后的荧光调制曲线; (c) 平均方向角 θ ; (d) 调制幅度 R

Fig. 5 (a) Total fluorescence intensity image after summing up polarization fluorescence images; (b) fluorescence modulation responses and fitting modulation curves for four points A、B、C、D in

Fig. 5(a); (c) average direction angle θ ; (d) modulated amplitude R

在上述测量中, 整个偏振荧光序列的获取时间为 50 ms 左右, 意味着系统能够以每秒 20 帧的帧率对分子方向信息进行成像。该系统中基于光电调制的偏振控制响应时间小于 $1 \mu\text{s}$, 已经非常快, 因此数据获取速度受限于荧光图像的曝光时间。继续提高系统速度可以采取如下措施: 1) 减少偏振方向 α 的个数, 从而减少每个序列中荧光图像的个数; 2) 缩短每幅荧光图像的曝光时间。根据奈奎斯特采样定律, 由于荧光偏振响应服从 2α 的正弦分布, 因此 $0^\circ \sim 180^\circ$ 的调制周期内偏振方向 α 的最少个数为 4。但由于噪声的影响, 过少的偏振响应个数会造成拟合精度的下降, 从而导致参数 R 和 θ 精度的下降。偏振个数的选取

取决于荧光强度和相机信噪比;缩短荧光图像的曝光时间,同样受限于荧光强度和相机本身曝光时间的极限。因此系统测量速度取决于样本荧光强度、相机信噪比和曝光速度性能。提高激发光强度可以增加荧光辐射强度,但同时提高了光漂白的可能性。因此在实际测量中,激发光强度、相机曝光时间以及偏振方向调制个数这几个参数要根据实际样本进行具体调节,从而在光漂白、测量精度和测量速度上达到最优平衡。

4 结 论

提出一套宽光场偏振荧光显微系统,该系统利用 EOM 对激发光的偏振方向进行高速控制,并配合相机曝光记录对应的偏振荧光图像序列。利用人工制备的 GUVs 样本对实验系统进行了测试验证,结果表明该系统能够有效获取分子方向的排列信息,其测量速度达到近视频帧率,适用于动态样本分子方向信息的获取和监测。

参 考 文 献

- [1] Cheng Yi, Tang Zhilie. Study of confocal microscopy imaging system based on stokes parameters measurement[J]. Acta Optica Sinica, 2014, 34(6): 0611005.
程怡, 唐志列. 基于斯托克斯参量测量的偏振共焦显微成像技术的研究[J]. 光学学报, 2014, 34(6): 0611005.
- [2] Rosell F I, Boxer S G. Polarized absorption spectra of green fluorescent protein single crystals: Transition dipole moment directions[J]. Biochemistry, 2003, 42(1): 177-183.
- [3] Kress A, Wang X, Ranchon H, *et al.* Mapping the local organization of cell membranes using excitation polarization-resolved confocal fluorescence microscopy[J]. Biophysical Journal, 2013, 105(1): 127-136.
- [4] DeMay By S, Noda N, Gladfelter A S, *et al.* Rapid and quantitative imaging of excitation polarized fluorescence reveals ordered septin dynamics in live yeast[J]. Biophysical Journal, 2011, 101(4): 985-994.
- [5] Vrabioiu A M, Mitchison T J. Structural insights into yeast septin organization from polarized fluorescence microscopy[J]. Nature, 2006, 443(7110): 466-469.
- [6] Kress A, Ferrand P, Rigneault H, *et al.* Probing orientation behavior of MHC class I protein and lipid probes in cell membranes by fluorescence polarization-resolved imaging[J]. Biophysical Journal, 2011, 101(2): 468-476.
- [7] Kampmann M, Atkinson C E, Mattheyses A L, *et al.* Mapping the orientation of nuclear pore proteins in living cells with polarized fluorescence microscopy[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2011, 18(6): 643-649.
- [8] Ferrand P, Gasecka P, Kress A, *et al.* Ultimate use of two-photon fluorescence microscopy to map orientational behavior of fluorophores[J]. Biophysical Journal, 2014, 106(11): 2330-2339.
- [9] Lazar J, Bondar A, Timr S, *et al.* Two-photon polarization microscopy reveals protein structure and function[J]. Nature Methods, 2011, 8(8): 684-690.
- [10] Duboisset J, Ferrand P, He W, *et al.* Thioflavine-T and Congo red reveal the polymorphism of insulin amyloid fibrils when probed by polarization-resolved fluorescence microscopy[J]. Journal of Physical Chemistry B, 2013, 117(3): 784-788.
- [11] Gasecka A, Tauc P, Lewitbentley A, *et al.* Investigation of molecular and protein crystals by three photon polarization resolved microscopy[J]. Physical Review Letters, 2012, 108(26): 263901.
- [12] Junichi K, Yoshiaki U. Domain structure analysis of $\text{Pb}(\text{Zn}_{1/3}\text{Nb}_{2/3})\text{O}_3$ -9% PbTiO_3 single crystals using optical second harmonic generation microscopy[J]. Physical Review B, 2010, 82(18): 184116.
- [13] Gusachenko I, Tran V, Houssen Y G, *et al.* Polarization-resolved second-harmonic generation in tendon upon mechanical stretching[J]. Biophysical Journal, 2012, 102(9): 2220-2229.
- [14] Tanaka Y, Hase E, Fukushima S, *et al.* Motion-artifact-robust, polarization-resolved second-harmonic-generation microscopy based on rapid polarization switching with electro optic Pockells cell and its application to *in vivo* visualization of collagen fiber orientation in human facial skin[J]. Biomedical Optics Express, 2014, 5(4): 1099-1113.
- [15] Hafi N, Grunwald M, Svan L, *et al.* Fluorescence nanoscopy by polarization modulation and polarization angle narrowing[J]. Nature Methods, 2014, 11(5): 579-584.
- [16] Wu Zhenhai, Xu Liu, Wang Juntao, *et al.* Depolarization feature and polarization control in end-pumped Nd:YAG slab laser[J]. Acta Optica Sinica, 2017, 37(1): 0114001.

- 吴振海, 徐浏, 王君涛, 等. 端抽运 Nd:YAG 板条激光器的退偏特性及偏振控制[J]. 光学学报, 2017, 37(1): 0114001.
- [17] Lesoine J F, Lee J Y, Krogmeier J R, *et al.* Quantitative scheme for full-field polarization rotating fluorescence microscopy using a liquid crystal variable retarder[J]. Review of Scientific Instruments, 2012, 83(5): 053705.
- [18] Kaneshiro J, Watanabe T M, Fujita H, *et al.* Full control of polarization state with a pair of electro-optic modulators for polarization-resolved optical microscopy[J]. Applied Optics, 2016, 55(5): 1082-1089.
- [19] DeWalt E L, Sullivan S Z, Schmitt P D, *et al.* Polarization-modulated second harmonic generation ellipsometric microscopy at video rate[J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(16): 8448-8456.
- [20] Wang X, Yang F, Yin J, *et al.* Quantifying the polarization properties of non-depolarizing optical elements with virtual distorting elements[J]. Applied Optics, 2017, 56(10): 2589-2596.
- [21] Moscho A, Orwar O, Chiu D T, *et al.* Rapid preparation of giant unilamellar vesicles[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(21): 11443-11447.
- [22] Baumgart T, Hess S T, Webb W W. Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension[J]. Nature, 2003, 425(6960): 821-824.