

# 基于环形光瞳提高荧光辐射差分超分辨显微镜的 成像分辨率

邓素辉<sup>1,2</sup>, 胡杰<sup>1</sup>, 肖轶平<sup>1</sup>, 刘明萍<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南昌大学信息工程学院, 江西 南昌 330031;

<sup>2</sup>中国科学院上海应用物理研究所物理生物实验室, 上海 201800

**摘要** 荧光辐射差分(FED)显微术利用实心光斑扫描的一幅共聚焦图像减去空心光斑扫描的负共聚焦图像, 实现了超分辨成像。使用简单的环形光瞳滤波器提高了无变形 FED 的成像分辨率。在空心焦斑光路上使用合适的环形光瞳滤波器, 压缩空心焦斑的尺寸; 同时, 在实心焦斑的光路上允许使用更高数值孔径的孔径光阑, 获得更小的、与空心焦斑相匹配的实心光斑分布; 两方面作用下, 提高了 FED 的空间分辨率。

**关键词** 显微; 空间分辨率; 环形光瞳; 荧光辐射差分显微技术; 超分辨成像

中图分类号 TH742

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201939.0718001

## Improvement of Imaging Resolution of Fluorescence Emission Difference Super-Resolution Microscopy with Annular Pupil

Deng Suhui<sup>1,2</sup>, Hu Jie<sup>1</sup>, Xiao Yiping<sup>1</sup>, Liu Mingping<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Information Engineering School of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330031, China;

<sup>2</sup>Division of Physical Biology, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences,  
Shanghai 201800, China

**Abstract** Super-resolution imaging can be achieved by fluorescence emission difference (FED) microscopy through the subtraction of a negative confocal image scanned by a hollow focal spot from a confocal image scanned by a solid focal spot. This study proposes an easily accessible annular pupil filter to enhance the resolution of deformation-free FED imaging. The hollow spot size is reduced by an appropriate annular pupil filter in the light path of hollow spot. Meanwhile, a diaphragm with a high numerical aperture is permitted for the beam of a solid focal spot, and a small solid focal spot which is matching well with the hollow focal spot is achieved. The spatial resolution of FED microscopy is increased under the effects of these two aspects.

**Key words** microscopy; spatial resolution; annular pupil; fluorescence emission difference microscopy; superresolution imaging

**OCIS codes** 330.6130; 100.2980; 100.6640; 180.1790

## 1 引 言

激光共聚焦扫描成像显微镜由于其具有高分辨率及三维成像功能, 被广泛应用于生命科学研究中。光学衍射极限的存在会使激光共聚焦显微镜的成像分辨率受到限制, 其焦斑大小约为  $0.61\lambda/NA$ , 其中  $\lambda$  是真空中的激发光波长,  $NA$  为物镜的数值孔径<sup>[1]</sup>。为提高激光共聚焦成像技术的分辨率, 基于

激光共聚焦显微成像系统, 发展了多种突破光学衍射极限的超分辨成像技术。受激发射损耗显微镜<sup>[2]</sup>(STED)可以在激光共聚焦扫描成像显微镜平台上, 另外增加一路中心光强为零的环形焦斑的损耗光路, 使环形焦斑与激发焦斑相叠加<sup>[3-4]</sup>。被损耗光覆盖的分子因为发生受激发射现象, 非线性地压制焦斑周围的荧光, 缩小荧光光斑, 从而实现超越光学衍射极限的超高分辨率成像。STED 的分辨率正比

收稿日期: 2019-01-23; 修回日期: 2019-03-02; 录用日期: 2019-03-21

基金项目: 国家自然科学基金(61665006, 61865011)、江西省杰出青年人才资助计划(20162BCB23012)、江西省青年科学基金重点项目(20171ACB21018)

\* E-mail: mpliu@ncu.edu.cn

于损耗光的光强,损耗光光强越大,分辨率越高<sup>[5]</sup>。但实际实验中,分辨率受限于生物样品能承受的损耗光光强及高激光功率引发的光毒性等<sup>[6]</sup>。为了减小损耗光激光功率,光可逆荧光蛋白等探针常被应用于该类技术中<sup>[7]</sup>。另一种基于激光共聚焦显微成像平台发展的超分辨技术是浙江大学匡翠方课题组提出荧光辐射差分<sup>[8-9]</sup>(FED)显微术,该技术先获取一幅实心焦斑扫描的激光共聚焦图像后,再使用相同波长的空心焦斑扫描得到一幅负共聚焦荧光图像,两幅图像相减,缩小荧光光斑进而获得超分辨成像。因此,FED的点扩展函数(PSF)就是两种照明模式下的PSF的差值。该方法的优势在于系统简单,且使用较低的光强就可以实现约 $0.25\lambda$ 的超衍射极限的分辨率<sup>[10]</sup>。

一般情况下,FED成像中,由于实心焦斑和空心焦斑的PSF分布有差异,尤其是主瓣强度轮廓不匹配,故相减后的PSF会产生负值旁瓣。当这些负值旁瓣被设为零值时,有可能引起图像有效信号的丢失,进而引起图像变形<sup>[10]</sup>。为消除负值旁瓣引起的图像变形,实心光斑和空心光斑的主瓣强度轮廓分布要求基本重合。为改善FED成像在这一方面的相关问题,在FED方法中引入饱和激发的非线性效应<sup>[11-12]</sup>,能产生较大的实心激发焦斑和压缩空心焦斑,在一定程度上缓解了负旁瓣引起的图像变形,也实现了约 $\lambda/6$ 的高成像分辨率<sup>[11]</sup>。但也注意到,使用较大激光功率的饱和激发,会引起生物样品的荧光漂白,产生一定的光毒性;而使用较低光强,线性激发的FED实现的分辨率相对较低。Rong等<sup>[13]</sup>则使用角向偏振光形成较小的暗孔用于负共聚焦成像,并同时使用较小直径的径向偏振光实心焦斑进行实心焦斑激发,稍微改善了线性激发FED的分辨率和缓解了图像变形的问题,在100 nm荧光小球图像中实现了约 $0.25\lambda$ 的分辨率。You等<sup>[14]</sup>在右旋圆偏振的激发光中插入逆时针螺旋相位板进行调制,同时使用孔径光阑限制较小的数值孔径(约0.6倍的显微物镜数值孔径)来进一步扩大实心光斑的尺寸,缩小与使用螺旋相位板得到的环形焦斑分布的差异,消除了负值旁瓣,提高了成像质量,这种方法被称为消除失真的荧光辐射差分法(dfFED)。本文提出在dfFED成像中,在线性激发条件下,使用容易实现的环形光瞳滤波器,在消除负值旁瓣引起的图像畸变的同时进一步提高dfFED的空间分辨率。即在空心光斑的光路上插入环形光瞳滤波器,缩小空心焦斑的尺寸,同时允许使用更小

的实心光斑与之相匹配而消除变形畸变,两方面作用下提高dfFED的空间分辨率。数据表明,本方法可将实心激发光斑限制的孔径光阑的数值孔径提高至0.8倍的物镜数值孔径,使共聚焦PSF与负共聚焦PSF主瓣轮廓比较吻合,相减因子取值为0.95,负值旁瓣被消除,空间分辨率提高至 $0.18\lambda$ 。为证明环形光瞳滤波器使用提高了FED的分辨率及消除了图像变形的结论,本文针对三角形、网格形状和辐射状荧光样品的成像进行仿真模拟,对结论进行了验证。

## 2 基本原理

系统的光路示意图如图1所示。图1中,PBS是偏振分光镜;VPP是螺旋相位板;D是光阑;AP是环形光瞳滤波器;HWP是半波片;QWP是 $1/4$ 波片;RM是全反镜;L1,L2,L3,L4,L5是透镜;PH是针孔;OL是物镜;Det是光电探测器。激发光源通过PBS后,将光分成两束。第一束光用于产生实心光斑,第二束光形成空心焦斑。在第一束光的光路中,通过在右旋圆偏振的光路中插入逆时针螺旋相位板及使用光阑限制数值孔径,对实心光斑进行扩大。在第二束的光路中,通过在左旋圆偏振的光路中插入逆时针螺旋相位板及使用环形光瞳,实现较小的环形焦斑。右旋圆偏振和左旋圆偏振光的获取是通过控制两束光路中的半波片及 $1/4$ 波片来实现的。两束光随后再经过另一个PBS进行合束后,通过二向色镜反射进入物镜,并对样品进行激发。产生的荧光经过物镜接收,进入光电探测器中实现信号的获取。

根据FED的成像原理,在焦平面直角坐标 $(x,y)$ 处,FED的PSF( $I_{\text{FED}}$ )由以下表达式给出<sup>[14]</sup>:

$$I_{\text{FED}}(x,y) = I_{\text{cl}}(x,y) - \gamma \times I_{\text{c2}}(x,y), \quad (1)$$

$$I_{\text{cl}}(x,y) = I_{\text{solid}}(x,y) \times I_{\text{det}}(x,y) \otimes P(x,y), \quad (2)$$

$$I_{\text{c2}}(x,y) = I_{\text{hollow}}(x,y) \times I_{\text{det}}(x,y) \otimes P(x,y), \quad (3)$$

式中: $I_{\text{cl}}$ 是扩大的实心焦斑激发的激光共聚焦PSF; $I_{\text{c2}}$ 是空心焦斑激发的共聚焦PSF; $I_{\text{solid}}$ 是扩大后的实心光的激发PSF,它是在右旋圆偏振光中插入逆时针螺旋相位板经过物镜聚焦实现的; $I_{\text{hollow}}$ 是空心光的激发PSF,它是在左旋圆偏振光中插入逆时针螺旋相位板经过物镜聚焦实现的; $\gamma$ 是相减因子; $I_{\text{det}}$ 是探测光PSF; $P(x,y)$ 是探测器前面的针孔函数; $\otimes$ 表示为卷积操作。以下计算分析的是激发光波长与荧光波长近似相等,及针孔尺寸为无限小

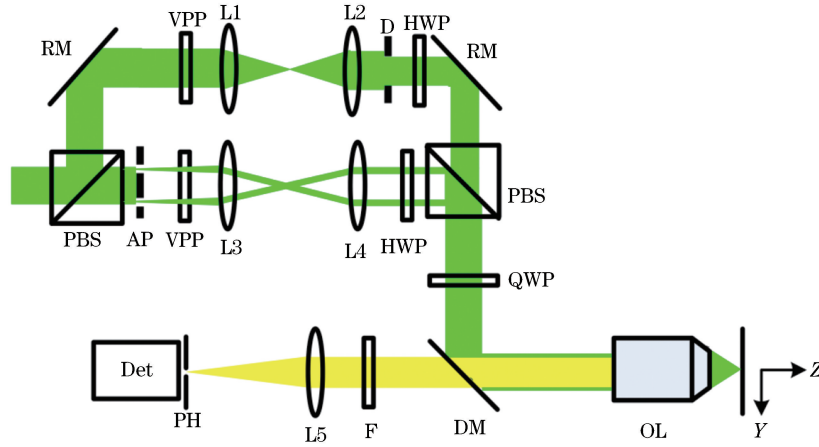


图 1 光路示意图

Fig. 1 Schematic of light path

的点探测的情形。

为了计算 PSF, 根据矢量德拜-沃尔夫衍射理论<sup>[15-17]</sup>, 在经过高数值孔径物镜聚焦后, 焦点附近的光场振幅分布表示为

$$\mathbf{E}(x, y, z) = \begin{bmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{bmatrix} = -\frac{if}{\lambda} \int_{\theta_{\min}}^{\theta_{\max}} \int_0^{2\pi} E_0 \sqrt{\cos \theta} T_0(\theta) \varphi_p(\phi) \times \exp[ik(x \sin \theta \cos \phi + y \sin \theta \sin \phi + z \cos \theta)] \times \begin{bmatrix} \cos \theta \cos^2 \phi + \sin^2 \phi \pm i \sin \phi \cos \phi (\cos \theta - 1) \\ \sin \phi \cos \phi (\cos \theta - 1) \pm i (\cos \theta \sin^2 \phi + \cos^2 \phi) \\ -\sin \theta (\cos \phi \pm i \sin \phi) \end{bmatrix} \sin \theta d\theta d\phi, \quad (4)$$

式中:  $\mathbf{E}(x, y, z)$  是高数值孔径物镜聚焦后, 焦点附近  $(x, y, z)$  点的振幅分布; PSF 值为  $I = |E_x|^2 + |E_y|^2 + |E_z|^2$ ;  $\theta$  和  $\phi$  分别是物镜聚焦后的光束会聚半角和方位角;  $E_0$  是初始的振幅分布;  $T_0(\theta)$  为光瞳滤波器振幅分布函数;  $f$  为透镜的焦距;  $k = 2\pi n/\lambda$  为波数,  $n$  代表折射率;  $0 \sim 2\pi$  螺旋相位板引入的相位为  $\varphi_p(\phi)$ 。在以上方程的矩阵中, 正号表示为左旋圆偏振光, 负号表示为右旋圆偏振光<sup>[17]</sup>。 $\theta_{\max}$  和  $\theta_{\min}$  表示插入的孔径光阑或环形光瞳滤波器限制的最大和最小会聚半角。在实心光激发光路中,  $\theta_{\max}^{\text{solid}} = \arcsin(NA_{\max}^{\text{solid}}/n)$ ,  $\theta_{\min}^{\text{solid}} = 0$ ,  $NA_{\max}^{\text{solid}}$  为插入的光阑限制的最大数值孔径。在空心光斑光路中, 使用环形光瞳滤波器缩小环形焦斑的尺寸, 环形光瞳滤波器中间区域是透过率为零的实心区域, 外圈为全透明的环状区域。因此, 该光路中, 有  $\theta_{\max}^{\text{hollow}} = \alpha = \arcsin(NA/n)$ ,  $\alpha$  为物镜的最大数值孔径角,  $\theta_{\min}^{\text{hollow}}$  是环形光瞳内径对应的会聚半角, 其对应的数值孔径为  $NA_{\min}^{\text{hollow}}$ 。计算中, 选取的参数为: 物镜数值孔径  $NA = 1.4$ , 折射率  $n = 1.518$ 。

### 3 分析与讨论

一般来说, 环形光瞳滤波器内径的会聚角设置得越大, 越能缩小焦斑(空洞)的尺寸<sup>[18]</sup>。首先分析了在光路中插入  $NA_{\min}^{\text{hollow}} = 0.9NA$  的环形光瞳对空心焦斑的影响, 其 PSF 分布如图 2 所示。和没有插入环形光瞳滤波器的情形相比, 空心焦斑的尺寸变窄, 但旁瓣也更加明显。采用激光共聚焦系统进行成像, 该旁瓣会被进一步压制, 如图 3 中实线所示, 该曲线给出了空心焦斑扫描的共聚焦成像 PSF。为减小荧光辐射差分成像中的负旁瓣引起的图像失真, 实心焦斑 PSF 需要与空心焦斑 PSF 重合。因此, 需要在右旋圆偏振光中插入逆时针螺旋相位板及使用比物镜稍小的数值孔径对实心光斑进行扩大。计算表明, 在实心光斑的光路中使用  $NA_{\max}^{\text{solid}} = 0.8NA$  的孔径光阑时, 实心焦斑的共聚焦 PSF 分布能与使用环形光瞳获得的较小空心焦斑的共聚焦 PSF 分布匹配较好, 两个 PSF 主瓣边缘轮廓几乎完全重合, 如图 3 所示。

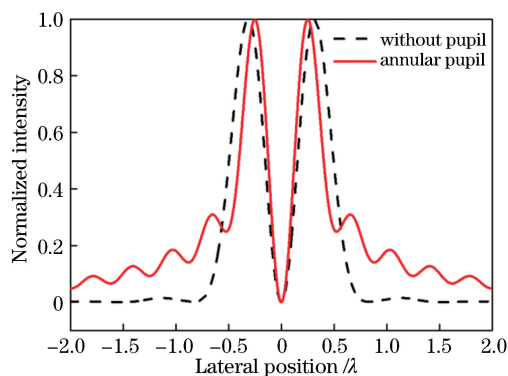


图 2 空心焦斑的归一化 PSF 分布

Fig. 2 Normalized PSF distributions of hollow focal spots

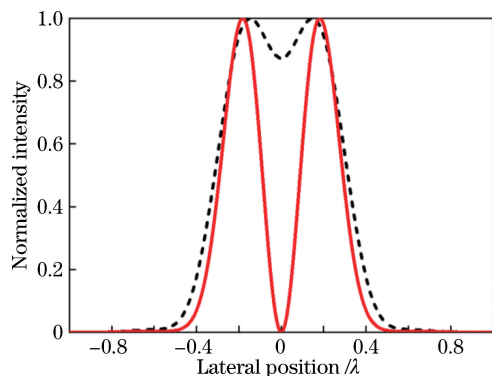


图 3 共聚焦模式下,扩大后的实心光斑(虚线)和使用环形光瞳缩小后的空心焦斑(实线)归一化 PSF 分布

Fig. 3 Normalized PSF distributions of extended solid spot (dashed curve) and hollow focal spot with reduced size by using annular pupil (solid curve) under confocal mode

为方便比较,图 4(a)中给出一般的共聚焦成像的 PSF;图 4(b)给出没有使用光瞳滤波器的 dfFED 成像<sup>[12]</sup>的 PSF,其中实心焦斑是在右旋圆偏振光中插入逆时针螺旋相位板、使用 0.6NA 的数值孔径进行扩大的;图 4(c)是使用光瞳滤波器的 dfFED 成像的 PSF。图 4(b)和图 4(c)的计算使用了相同的相减因子: $\gamma=0.95$ 。相比于图 4(b)没有使用环形光瞳滤波器的情况,图 4(c)展示了更小的 PSF 的半峰全宽 (FWHM)。这一点在中心强度轮廓曲线 [图 4(d)]中表现更加明显。数据表明,没有使用环形光瞳 dfFED 的 PSF 的 FWHM 大小为  $0.21\lambda$ ,最小值为 0,第一旁瓣大小为 11%;使用环形光瞳 dfFED 的 PSF 的 FWHM 大小为  $0.18\lambda$ ,最小值为  $-0.037$ ,第一旁瓣大小为 10.4%。因此,在最小值稍下降及第一旁瓣高度基本保持不变的情况下,使用环形光瞳滤波器的 dfFED 的分辨率提高了 14.3%。相比于一般的激光共聚焦成像 PSF [图 4(a),

FWHM 为  $0.31\lambda$ ],使用光瞳滤波器的 dfFED 分辨率改善了 42%。

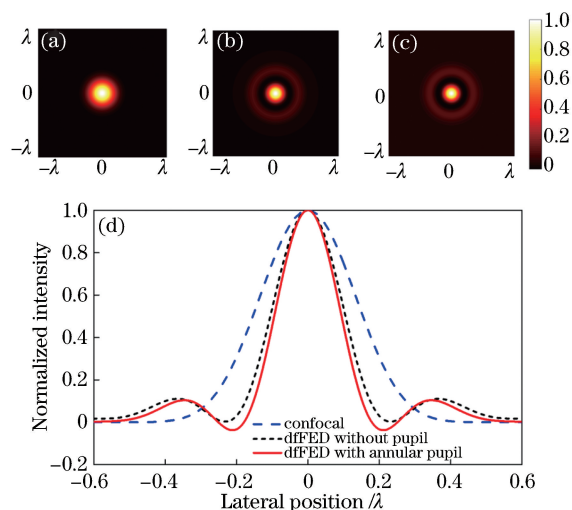


图 4 不同成像模式下的归一化 PSF 分布。(a)普通激光共聚焦成像;(b)无光瞳滤波器的 dfFED 成像;(c)使用了环形光瞳滤波器的 dfFED 成像;(d)对应的 (a), (b)和(c)的中心强度轮廓曲线

Fig. 4 Normalized PSF distributions under different imaging modes. (a) Conventional confocal imaging; (b) dfFED imaging without pupil filter; (c) dfFED imaging with annular pupil filter; (d) corresponding intensity profiles of (a), (b), and (c) along central axis

## 4 仿 真

为验证环形光瞳有利于 dfFED 分辨率提高的结论,首先将由 6 个等强度点构成的三角形作为样品,其相邻两点间隔为  $0.32\lambda$ ,如图 5(a)所示。没有使用光瞳的 dfFED 成像效果如图 5(b)所示,使用光瞳滤波器的 dfFED 成像如图 5(c)所示。模拟成像是由图 4 中的各自的 PSF 与样品的卷积计算而得。相比于图 5(b)中的较为模糊的成像效果,图 5(c)中三角形的 6 个点能被较为清晰地分辨出来,图像质量得到明显改善。图 5(d)给出图 5(b)和图 5(c)中虚线的归一化强度轮廓曲线,该图表明加入光瞳后的 dfFED 成像展示出更高的分辨能力,信噪比也明显改善。按照瑞利判据<sup>[19-20]</sup>,当两个像斑重叠区的强度不超过峰值强度的 73.5%时,两个点能被分辨。根据这个判据,图 5(d)的数据显示,没有使用光瞳的 dfFED 成像两点中间的强度高于 73.5%,而使用环形光瞳滤波器的 dfFED 成像中间的强度值远低于 73.5%。这些数据表明,使用环形光瞳后的 dfFED 能分辨出之前不能分辨的两个点,



分辨能力得到了加强。

随后对由 6 条等强度线组合构成的网格样品进行仿真,如图 6(a)所示,相邻两条平行线之间间隔为  $0.8\lambda$ 。没有使用光瞳的 dfFED 成像如图 6(b)所示,使用光瞳滤波器的 dfFED 成像如图 6(c)所示。图 6(d)给出了图 6(b)和图 6(c)中虚线的归一化强度轮廓线。根据瑞利判据,两种情况都能分辨出相邻的细线,但使用了环形光瞳后的 dfFED 图像中,每根线呈现出更小的 FWHM 及较高的信噪比,由此表明分辨能力得到增强。

还对辐射状样品进行仿真验证,如图 7(a)所示。没有使用光瞳的 dfFED 成像如图 7(b)所示,使用光瞳滤波器的 dfFED 成像如图 7(c)所示。相比图 7(b),图 7(c)给出了对比度和分辨率更高的成像。图 7(d)给出了图 7(b)和图 7(c)中虚线的归一化强度轮廓线,相比于没有使用光瞳的 dfFED 成像,加入环形光瞳后的 dfFED 成像展现了更加显著的波峰和波谷,显示了更多的细节信息。

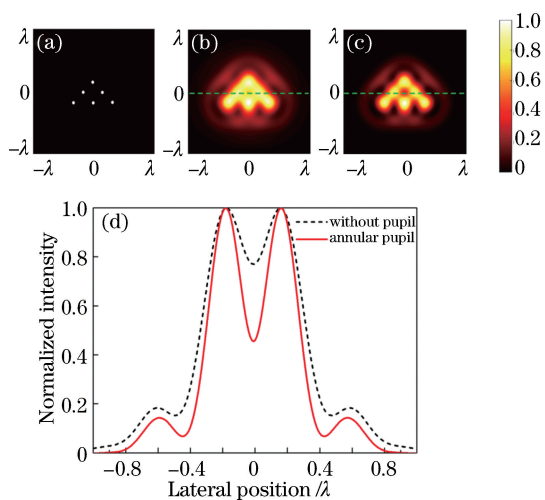


图 5 含有 6 个点的样品仿真结果。(a)样品分布;(b)没有光瞳的 dfFED 成像;(c)加入环形光瞳后的 dfFED 成像;(d)沿着(b)和(c)中虚线的归一化强度轮廓线

Fig. 5 Simulated results of sample consisting of six points. (a) Sample pattern; (b) dfFED imaging without pupil; (c) dfFED imaging with annular pupil; (d) normalized intensity profiles along dashed lines shown in (b) and (c)

## 5 结 论

结果表明,在 dfFED 中,使用环形光瞳滤波器,能够有效地提高图像分辨率。在空心光斑的光路中插入环形光瞳滤波器,一方面缩小了空心光斑的尺

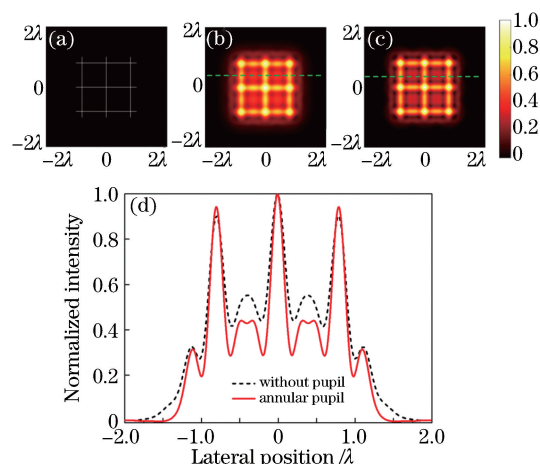


图 6 含有 6 根线的样品仿真结果。(a)样品分布;(b)没有光瞳的 dfFED 成像;(c)加入环形光瞳后的 dfFED 成像;(d)沿着(b)和(c)中虚线的归一化强度轮廓线

Fig. 6 Simulated results of sample consisting of six lines. (a) Sample pattern; (b) dfFED imaging without pupil; (c) dfFED imaging with annular pupil; (d) normalized intensity profiles along dashed lines shown in (b) and (c)

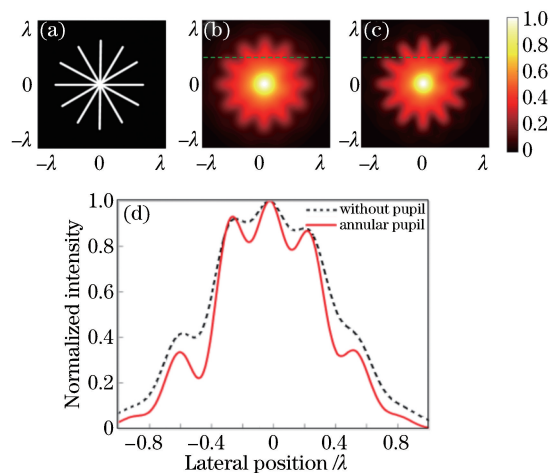


图 7 辐射状样品的仿真结果。(a)样品分布;(b)没有光瞳的 dfFED 成像;(c)加入环形光瞳后的 dfFED 成像;(d)沿着(b)和(c)中虚线的归一化强度轮廓线

Fig. 7 Simulated results of spoke-like sample. (a) Sample pattern; (b) dfFED imaging without pupil; (c) dfFED imaging with annular pupil; (d) normalized intensity profiles along dashed lines shown in (b) and (c)

寸,另一方面允许实心焦斑的数值孔径从  $0.6NA$  提高至  $0.8NA$ ,获得更小的与空心光斑强度分布相匹配的实心光斑,在相减因子  $\gamma=0.95$  下,消除了负值旁瓣,双方面作用下实现了 dfFED 的 PSF 进一步缩小,实现  $0.18\lambda$  的空间分辨率,将 dfFED 成像分

辨能力提高了 14.3%。利用数值仿真实验,模拟了三角形、网格形状和辐射状的样品的成像,进一步证明了使用环形光瞳滤波器能够有效改善 dFED 方法的图像质量。该研究将有利于推动荧光辐射差分成像在生命科学的实际应用。

## 参 考 文 献

- [1] Abbe E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung [J]. Archiv Für Mikroskopische Anatomie, 1873, 9(1): 413-418.
- [2] 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.
- [3] Klauss A, König M, Hille C. Upgrade of a scanning confocal microscope to a single-beam path STED microscope [J]. PLoS ONE, 2015, 10 ( 6 ): e0130717.
- [4] Du J C, Deng S H, Hou S G, *et al.* Superresolution imaging of DNA tetrahedral nanostructures in cells by STED method with continuous wave lasers [J]. Chinese Optics Letters, 2014, 12(4): 041101.
- [5] Hell S W. Microscopy and its focal switch [J]. Nature Methods, 2009, 6(1): 24-32.
- [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, 杨皓旻, 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] 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.
- [8] Kuang C F, Li S, Liu W, *et al.* Breaking the diffraction barrier using fluorescence emission difference microscopy [J]. Scientific Reports, 2013, 3: 1441.
- [9] Wang W S, Zhao G Y, Kuang C F, *et al.* Integrated dual-color stimulated emission depletion (STED) microscopy and fluorescence emission difference (FED) microscopy [J]. Optics Communications, 2018, 423: 167-174.
- [10] Segawa S, Kozawa Y, Sato S. Resolution enhancement of confocal microscopy by subtraction method with vector beams [J]. Optics Letters, 2014, 39(11): 3118-3121.
- [11] Zhao G Y, Kuang C F, Ding Z H, *et al.* Resolution enhancement of saturated fluorescence emission difference microscopy [J]. Optics Express, 2016, 24 (20): 23596-23609.
- [12] Zhu D, Liu W, Zhang Z, *et al.* Enhancement of fluorescence emission difference microscopy using conjugated vortex phase modulation [J]. Journal of Microscopy, 2018, 272(2): 151-159.
- [13] Rong Z H, Kuang C F, Fang Y, *et al.* Super-resolution microscopy based on fluorescence emission difference of cylindrical vector beams [J]. Optics Communications, 2015, 354: 71-78.
- [14] You S T, Kuang C F, Rong Z H, *et al.* Eliminating deformations in fluorescence emission difference microscopy [J]. Optics Express, 2014, 22 ( 21 ): 26375-26385.
- [15] Richards B, Wolf E. Electromagnetic diffraction in optical systems. II. Structure of the image field in an aplanatic system [J]. Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 1959, 253(1274): 358-379.
- [16] Deng S H, Liu L, Cheng Y, *et al.* Effects of primary aberrations on the fluorescence depletion patterns of STED microscopy [J]. Optics Express, 2010, 18(2): 1657-1666.
- [17] Singh R K, Senthilkumaran P, Singh K. Effect of primary spherical aberration on high-numerical-aperture focusing of a Laguerre-Gaussian beam [J]. Journal of the Optical Society of America A, 2008, 25(6): 1307-1318.
- [18] Deng X Q, Liu L, Yang L S, *et al.* Super-resolution in 3-D confocal surface profilometry [J]. Acta Optica Sinica, 2001, 21(7): 853-856.  
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.
- [19] Li S, Kuang C F, Hao X, *et al.* Enhancing the performance of fluorescence emission difference microscopy using beam modulation [J]. Journal of Optics, 2013, 15(12): 125708.
- [20] Zhao K H, Zhong X H. Optics: Volume 1 [M]. Beijing: Peking University Press, 1984: 228-229.  
赵凯华, 钟锡华. 光学: 上册 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1984: 228-229.