

基于和频效应和环形光的超分辨红外显微成像方法

陈丹妮¹, 李亚晖^{2,3}, 刘伟¹, 刘正一¹

- (1. 深圳大学 光电工程学院 光电子器件与系统(教育部/广东省)重点实验室, 广东 深圳 518060;
2. 中国科学院西安光学精密机械研究所 瞬态光学技术国家重点实验室, 陕西 西安 710119;
3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 提出了一种结合和频效应和环形光照明的远场超分辨红外显微成像方法。红外光、不同频率的环形和高斯可见光同时共轴激发样品, 当红外光频率等于样品分子某一共振频率时, 样品分子吸收红外光到达振动激发态, 环形和高斯可见光与共振分子作用分别产生无效和有效的和频信号。利用三束光的矢量光场表达式和模型能级系统的速率方程进行数值模拟发现, 当总可见光足够强时, 可使总和频信号饱和, 环形和高斯可见光与共振分子的作用出现竞争, 通过提高环形可见光光子流密度超过饱和光子流密度, 并降低高斯可见光光子流密度, 可有效地抑制环形区域有效和频信号的产生, 从而达到压缩 PSF 的目的, 在物镜数值孔径 0.6 的情况下, 通过数值模拟得到有效和频信号 PSF 半高宽为 56 nm。

关键词: 红外吸收; 超分辨显微成像; 衍射极限; 高分辨

中图分类号: O439 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3788/IRLA201847.0804003

Super-resolution infrared microscopy based on VSFG and donut-beam illumination

Chen Danni¹, Li Yahui^{2,3}, Liu Wei¹, Liu Zhengyi¹

- (1. Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, College of Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China;
2. State Key Laboratory of Transient Optics and Photonics, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics of CAS, Xi'an 710119, China;
3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: A method of far-field super-resolution infrared microscopy was presented by using vibrational sum-frequency generation (VSFG) and donut-beam illumination. To achieve this, one Gaussian-shaped visible beam and one donut-shaped visible beam with different wavelengths were combined with an infrared beam coaxially to excite the sample. When the frequency of the infrared light was as the same as the resonant frequency of the molecules, the molecules absorbed the energy of the infrared photon and were excited to the vibrational excited state. The photons in the donut-shaped and the Gaussian-shaped visible beams both interacted with the excited molecules, and generated useful and useless SFG signal respectively. Simulations based on the vectorial field of the three beams and rate equations demonstrated that, when the

收稿日期: 2018-05-14; 修订日期: 2018-06-11

基金项目: 国家自然科学基金(61335001, 11774242, 61235012, 61705144); 国家重点基础研究发展计划(2012CB825802, 2015CB352005); 国家重大科学仪器设备开发专项(2012YQ15009203); 深圳市科技计划(JCYJ20160308104404452, JCYJ20170818142804605)

作者简介: 陈丹妮(1976-), 女, 副研究员, 博士, 主要从事光学显微成像方面的研究。Email: danny@szu.edu.cn

visible intensity was improved to a certain level, the SFG signal tended to be saturated, then the donut-shaped visible photons and the Gaussian-shaped photons competed with each other. By increasing the photon flux density of the donut-shaped visible light to be larger than the saturated value, and reducing the photon flux density of the Gaussian-shaped visible light, the useful SFG signal in the donut-shaped area was suppressed effectively, which means the effective PSF was shrunked. With an objective which has a small numerical aperture (NA) 0.6, a simulated resolution as high as 56 nm was obtained.

Key words: infrared absorption; super-resolution microscopy; diffraction limit; high-resolution

0 引言

在生物医学研究中,获取细胞内分子的振动谱并用于成像是细胞研究的重要手段之一^[1]。基于分子的红外(Infrared, IR)吸收和拉曼散射都可以获得分子的振动谱,且无需对目标样品进行标记,因此不会由于引入外来标记物而对其产生可能的损害。红外吸收和拉曼散射产生的机理不同,两者具有互补性,结合两者可以获得细胞中生物分子振动的完整信息。尽管存在衍射极限的限制,基于拉曼散射的相干反斯托克斯拉曼散射、受激拉曼散射和自发拉曼散射显微成像技术可在亚微米尺度上获得振动谱成像^[2]。然而,对于红外吸收谱来说,由于入射光波长在中红外波段,导致基于红外吸收谱的成像系统的空间分辨率低,限制了其在生物成像中的应用。为了提高红外吸收显微成像的空间分辨率,近年来发展了几种突破红外衍射极限的成像方法,包括宽场成像和点扫描成像两种模式。宽场红外超分辨成像利用的是结构照明的方法^[3-4],提高红外显微的空间分辨率,但受限于成像的原理,该方法对于分辨率的提高能力有限。点扫描的方法包括两种方式。一是瞬时荧光探测红外(Transient Fluorescence Detected Infrared, TFD-IR)光谱显微技术^[5],它是红外和可见/紫外光双共振光谱显微技术,若红外光使样品分子产生共振,则可见/紫外光可使共振分子跃迁到电子能级从而产生瞬时荧光,反之,无瞬时荧光的产生,这样就可以通过探测瞬时荧光来获得样品的红外谱,并且瞬时荧光只在红外光和可见/紫外光聚焦光斑重叠处产生,这就使得红外显微的分辨率提高到可见/紫外衍射极限。TFD-IR光谱显微的缺点是只能应用于荧光样品,对于非荧光样品需用荧光染料

标记,为了克服这一缺点发展了基于振动和频(Vibrational Sum-Frequency Generation, VSFG)的红外超分辨显微^[6-7],VSFG属于二阶非线性过程且不涉及电子激发能级,应用更加广泛。Satoshi Kogure等人对一个肺癌的A549培养细胞用红外光和可见光入射进行成像,当红外光频率等于分子某一共振频率时可产生和频信号,且分辨率大约为 $1.1\ \mu\text{m}$,而当红外光频率不等于任一分子共振频率时,无和频信号产生,证明了和频信号的产生是由分子振动引起的,有效地将红外吸收信号转变为和频发射信号,分辨率由可见光衍射极限而非红外衍射极限决定^[7]。虽然VSFG可将红外成像分辨率从红外衍射极限提高到可见光衍射极限,但仍不能达到纳米分辨显微的要求。另外一种方法则借鉴了受激发射耗尽荧光显微^[8-9]的思想,基于振动耗尽的红外超分辨显微(Vibrational-Depletion IR, VD-IR)^[10-11],利用频率相同且等于样品某一共振频率的环形和高斯红外光作为泵浦光,首先入射样品,随后另一束高斯红外光作为探测光,在相对于泵浦光延迟一个小于共振能级寿命的时间后入射样品,对比两种泵浦下探测光吸收的差异最终实现点扩散函数的改善,实现超分辨。VD-IR还可以采用更简单的实现方式,例如:只采用一束高强度的环形泵浦光使样品达到饱和吸收,当延迟到达的高斯分布探测光入射样品时,只有近中心区域才能产生有效的探测光吸收,且区域大小随着环形光的强度增加而减小,从而使得系统的分辨率超越衍射极限的限制^[12]。VD-IR的缺点是使用的泵浦和探测光频率相同,为了探测中心区域的红外吸收,要使两束光不同步入射样品,且信号收集要精确地控制开关。

为了更好地利用上述两种方法的优点,同时避

免它们的不足,文中提出了一种结合和频效应和环形光裁剪点扩展函数获得红外超分辨显微成像的方法。该方法需要引入三束光,分别为高斯分布的红外光,环形分布的可见光 1 和高斯分布的可见光 2,其中红外光频率等于样品分子某一共振频率,环形和高斯可见光的频率不同。三束光同时入射样品,红外光与样品作用产生共振分子,环形可见光和共振分子作用产生无效的和频信号,而高斯可见光和共振分子作用产生有效的和频信号。当共振分子数一定时,入射的总可见光足够强可以使产生的和频信号饱和,通过提高环形光光强在环形区域可抑制有效和频信号的产生,从而达到压缩点扩展函数的目的,不仅使红外显微成像分辨率突破了红外光对应的衍射极限,还突破了可见光的衍射极限,理论上可以实现真正意义的纳米分辨显微;另外,由于高斯和环形的可见光频率不同,产生的有效和无效和频信号频率不同,可通过加入滤波片的方法来获得有效和频信号,避免了 VD-IR 对收集信号的时间开关操作。文中建立了利用环形光和和频效应实现超分辨红外显微成像的理论模型;利用三束激发光的聚焦光场表达式和模型能级系统的耦合微分速率方程对成像点扩展函数进行模拟分析,模拟表明在单位时间入射的环形可见光峰值光子密度,即环形可见光峰值光子流密度 $\max(h_{v1})$ 大于饱和光子流密度 $h_{vis,sat}$ 的条件下,提高环形可见光光子流密度 h_{v1} ,降低高斯可见光光子流密度 h_{v2} ,可有效压缩点扩展函数,在聚焦物镜 $NA=0.6$, $\max(h_{v2})=0.05h_{vis,sat}$, $\max(h_{v1})=100h_{vis,sat}$ 的情况下,得到的有效和频信号光子密度 n_{SFG2} 点扩展函数半高宽为 56 nm。相比于传统的红外吸收显微成像分辨率 $\sim \lambda_{IR}=3\ 500\text{ nm}$,提高了 61.5 倍,相比于传统的振动和频红外显微成像分辨率 $\sim \lambda_{v2}=700\text{ nm}$,提高了 11.5 倍。

1 理论模型

和频过程能级图如图 1 所示, g 和 e 分别表示分子的电子能级基态和激发态。能级 L_0 和 L_1 分别表示基态 g 中振动基态和振动激发态,两能级振动频差为 Ω_v ,能级 L_2 和 L_3 为虚能级。结合和频效应和环形光裁剪点扩展函数实现超分辨红外显微成像的原理图如图 2 所示。引入频率分别为 ω_{v1} 、 ω_{v2} 和 ω_{IR} 的环

形可见光 E_{v1} 、高斯可见光 E_{v2} 和高斯红外光 E_{IR} ,其中 $\omega_{v1} \neq \omega_{v2}$ 且 $\omega_{IR} = \Omega_{v0}$ 。三束光同时共轴聚焦入射样品,

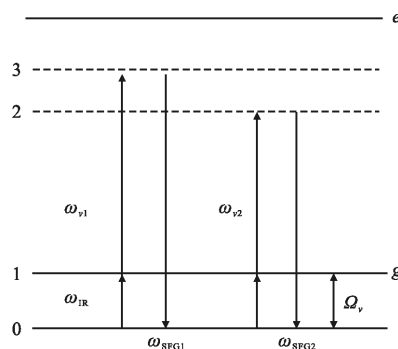


图 1 和频过程能级图

Fig.1 Schematic diagram of VSGF generation

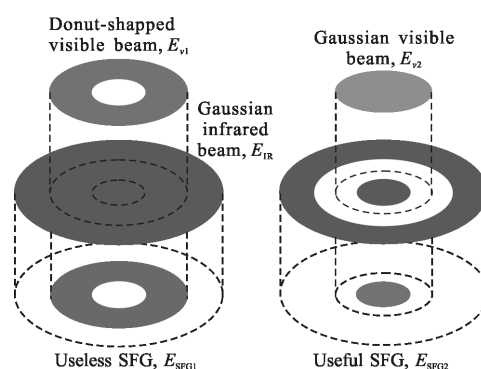


图 2 利用和频效应和环形光实现超分辨红外显微的原理图

Fig.2 Schematic diagram of super-resolution infrared microscopy based on VSGF and donut-shaped light

样品分子吸收红外光到达振动激发态 L_1 ,一部分共振分子与环形可见光作用产生频率为 $\omega_{SFG1} = \omega_{v1} + \omega_{IR}$ 的无效和频信号光 E_{SFG1} ,一部分与高斯可见光作用产生频率为 $\omega_{SFG2} = \omega_{v2} + \omega_{IR}$ 的有效和频信号光 E_{SFG2} 。假设处于 L_1 的共振分子吸收一个可见光子到达虚态后立即回到基态 L_0 产生一个和频信号光子,即虚态 L_2 和 L_3 的寿命为零,在只考虑振动弛豫的情况下,分子在能级 L_0 和 L_1 上的布居数随空间和时间的变化 $n_0(r, t)$ 和 $n_1(r, t)$ 可由以下的速率方程表示:

$$\begin{aligned} \frac{dn_0}{dt} &= h_{IR}\sigma_{01}(n_1 - n_0) + \frac{n_1}{\tau_{vib}} + h_{v1}\sigma_{12}n_1 + h_{v2}\sigma_{13}n_1 \\ \frac{dn_1}{dt} &= h_{IR}\sigma_{01}(n_0 - n_1) - \frac{n_1}{\tau_{vib}} - h_{v1}\sigma_{12}n_1 - h_{v2}\sigma_{13}n_1 \\ \frac{dn_{SFG}}{dt} &= \frac{dn_{SFG1}}{dt} + \frac{dn_{SFG2}}{dt} = (h_{v1}\sigma_{12}n_1 + h_{v2}\sigma_{13}n_1)m \\ h_{SFG} &= \frac{dn_{SFG}}{dt} = \frac{dn_{SFG1}}{dt} + \frac{dn_{SFG2}}{dt} = h_{SFG1} + h_{SFG2} \end{aligned}$$

式中： $\sigma_{01}(\mathbf{r})$ 、 $\sigma_{12}(\mathbf{r})$ 和 $\sigma_{13}(\mathbf{r})$ 分别为 $L_0 \rightarrow L_1$ 、 $L_1 \rightarrow L_2$ 和 $L_1 \rightarrow L_3$ 的吸收截面(单位： m^{-2})； τ_{vib} 为振动弛豫时间(单位： s)； $m(\mathbf{r})$ 为样品分子面密度(单位： m^{-2})； h_{SFG} 、 h_{SFG1} 和 h_{SFG2} 分别为样品在单位时间单位面积产生的总和频信号光子数、无效和频信号光子数和有效和频信号光子数(单位： $\text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$)； n_{SFG} 、 n_{SFG1} 和 n_{SFG2} 分别为样品在单位面积产生的总和频信号光子数、无效和频信号光子数和有效和频信号光子数(单位： m^{-2})。 $h_{\text{IR}}(\mathbf{r}, t)$ 、 $h_{\text{v1}}(\mathbf{r}, t)$ 和 $h_{\text{v2}}(\mathbf{r}, t)$ 分别为入射的红外、环形可见光和高斯可见光的光子流密度(单位： $\text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$)，可表示为 $h_j = \frac{I_j}{h\omega_j}$ ， $j = \text{IR}, \text{v1}, \text{v2}$ ， I_j 为三束入射光的对应光功率密度(单位： W/m^2)。

文中数值分析中，采用对通过 2π 螺旋相位片的 x 方向线偏振的高斯光产生的螺旋光 $\mathbf{E}_{\text{v2}}^{\text{inc}}$ 聚焦得到环形可见光，入射的高斯可见光 $\mathbf{E}_{\text{v2}}^{\text{inc}}$ 和红外光 $\mathbf{E}_{\text{IR}}^{\text{inc}}$ 也沿 x 轴方向偏振。图 3 为入射光聚焦小球样品光线图，三束光均为沿 $+z$ 轴方向传输的束腰半径为 ω_0 的高斯光束，且充满透镜入射。此时，它们作为共线耦合进入显微镜的激发光 $\mathbf{E}_j^{\text{inc}}$ ，在不同方向(θ, φ)上的电场强度可以分别表示为：

$$\mathbf{E}_j^{\text{inc}}(\theta, \varphi) = E_0 \exp(-f^2 \sin^2 \theta / \omega_0^2) \mathbf{A}_j(\varphi) \quad (1)$$

式中：下标 $j = \text{v1}, \text{v2}, \text{IR}$ ，分别表示通过螺旋相位片的环形可见光、高斯可见光和红外光， $\mathbf{A}_{\text{v1}}(\varphi) = e^{i\varphi}$ ， $\mathbf{A}_{\text{v2}}(\varphi) = \mathbf{A}_{\text{IR}}(\varphi) = 1$ 为相位因子； E_0 为中心光线的电场强度； f 为聚焦物镜的焦距； θ 为光线与 z 轴所成的角，如图 3 所示。

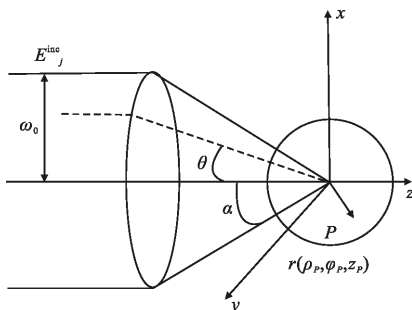


图 3 入射光聚焦小球样品光线图

Fig.3 A focused beam incident on a small bead

在柱坐标系下计算三束光的聚焦光场，物镜光轴的焦点处为 O 点，对于聚焦场中坐标为 $\mathbf{r}(\rho_p, \varphi_p, z_p)$

的任意一点 P ，其聚焦场可表示为：

$$\begin{aligned} \check{\mathbf{E}}_j(\rho_p, \varphi_p, z_p) = & -\frac{ik_j f}{2\pi} e^{-ik_j f} \int_0^\alpha \int_0^{2\pi} d\theta d\varphi E_j^{\text{inc}} \sqrt{\cos\theta} \cdot \\ & \sin\theta e^{ik_j z_p \cos\theta} e^{ik_j \rho_p \sin\theta \cos(\varphi - \varphi_p)} [1 + (\cos\theta - 1)\cos^2\varphi] \hat{\mathbf{i}} + \\ & [(\cos\theta - 1)\cos\varphi \sin\varphi] \hat{\mathbf{j}} \sin\theta \cos\varphi \hat{\mathbf{k}}, \\ & j = \text{v1}, \text{v2}, \text{IR} \end{aligned}$$

式中： $k_j = 2n\pi/\lambda_j$ ，为波矢， n 为透镜与样品之间的介质折射率， λ_j 为激发光的波长； α 为物镜半孔径角； $\hat{\mathbf{i}}$ 、 $\hat{\mathbf{j}}$ 和 $\hat{\mathbf{k}}$ 分别为 x 、 y 和 z 方向单位矢量。可见沿 x 方向偏振的电场经过聚焦后在 x 、 y 和 z 方向均有电场分量。在 $\text{NA} = 0.6$ 的情况下，对聚焦光场模拟可以发现，未经过螺旋相位片的线偏振光的聚焦光场的 x 偏振分量 E_x 的光场强度分布与总电场 \mathbf{E} 相近，且 $\max|E_y|^2 / \max|E_x|^2 = 3.4 \times 10^{-4}$ ， $\max|E_z|^2 / \max|E_x|^2 = 0.04$ ；而经过螺旋相位片的螺旋线偏振光的聚焦光场， $\max|E_y|^2 / \max|E_x|^2 = 8.4 \times 10^{-4}$ ， $\max|E_z|^2 / \max|E_x|^2 = 0.14$ 。可见三束入射光的聚焦光场在 y, z 方向的电场强度分量相对于 x 方向的电场强度分量很小，所以只考虑 x 方向电场分量。图 4 为三束入射光聚焦光场分别归一化后的强度分布图，实线为红外光，虚线为可见环形光，点划线为高斯可见光。从图中可以看出，红外光聚焦光场范围远大于两束可见光的聚焦场范围，由于在可见光焦斑范围内红外光变化缓慢，可近似认为该区域内红外光光强为一常数。产生和频信号的截面 σ_{12} 、 σ_{13} 取决于激发光场偏振方向和频率，由于三束光均沿 x 方向偏振，虽然环形和高斯可见光频率不同，但两者相差不大，所以可以假设 $\sigma_{12} = \sigma_{13} = \sigma_{\text{SFG}}$ 。

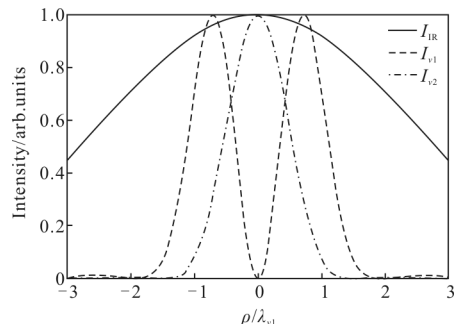


图 4 三束入射光聚焦光场归一化强度分布图

Fig.4 Normalized intensity distribution of focused light field of the three incident beams

在样品各处 \mathbf{r} 、能级 L_0 和 L_1 上的粒子布居几率

分别为 0.4 和 0.6 的初始条件下,同时入射环形和高斯可见光,根据速率方程可以计算 r 处产生的总和频信号光子密度 n_{SFG} ,如图 5 所示,可见 n_{SFG} 随 $h_{\text{vis}}\sigma_{\text{SFG}}$ 增大而增大, $h_{\text{vis}}=h_{\text{v1}}+h_{\text{v2}}$ 为总可见光光子流密度。当 $h_{\text{vis}}\sigma_{\text{SFG}}$ 足够大时可以使 n_{SFG} 饱和,因此,这里定义当使能级 L_1 上的粒子布居几率减半时,所需的可见光光子流密度为饱和光子流密度 $h_{\text{vis,sat}}=6.8\times 10^{-8}/\sigma_{\text{SFG}}$ 。当 σ_{SFG} 一定时,若 $h_{\text{vis}}\ll h_{\text{vis,sat}}$, n_{SFG} 与 h_{vis} 呈线性关系, $n_{\text{SFG}}\propto h_{\text{vis}}$,两束可见光竞争与共振分子作用产生和频信号的关系不明显;若 $h_{\text{vis}}>h_{\text{vis,sat}}$, n_{SFG} 与 h_{vis} 呈非线性关系, $n_{\text{SFG}}\propto h_{\text{vis}}/(1+h_{\text{vis}}/h_{\text{vis,sat}})$,两束可见光竞争与共振分子作用产生和频信号,有效和频信号光子密度 n_{SFG2} 取决于高斯可见光光子流密度 h_{v2} 占总可见光光子流密度 h_{vis} 的比例 K ,可表示为 $n_{\text{SFG2}}(r)=Kn_{\text{SFG}}(r)$,其中比例因子 $K=h_{\text{v2}}(r)/h_{\text{vis}}(r)$ 。所以当环形可见光光子流密度超过饱和光子流密度时,可明显地抑制环形区域高斯可见光和共振分子的作用产生和频信号,从而达到压缩点扩展函数实现超分辨的目的。由于无效和有效和频信号频率不同,可通过加入滤波片的简单方式分离出中心区域的有效和频信号。

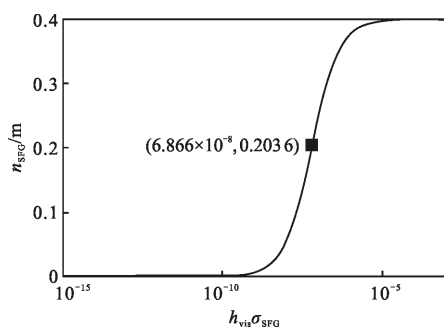


图 5 总和频信号光子密度 n_{SFG} 随 $h_{\text{vis}}\sigma_{\text{SFG}}$ 变化曲线图
Fig.5 Changing curve of total SFG photon flux density n_{SFG} with $h_{\text{vis}}\sigma_{\text{SFG}}$

2 数值模拟与分析

假定入射三束光的波长分别为环形可见光 $\lambda_{\text{v1}}=600\text{ nm}$ 、高斯可见光 $\lambda_{\text{v2}}=700\text{ nm}$ 和高斯红外光 $\lambda_{\text{IR}}=3\ 500\text{ nm}$,聚焦物镜数值孔径 $\text{NA}=0.6$,入射光束充满透镜,即 $\omega_0=f\sin\alpha$ 。在红外光一定、可以使得可见光焦斑范围内样品分子在能级 L_1 上布居几率达到 0.4 的初始条件下,同时入射高斯和环形可见光,对样品

产生的总和频信号 n_{SFG} 、比例因子 $K(r)$ 和有效和频信号 n_{SFG2} 点扩展函数进行数值模拟,结果如图 6 所示。图 6(a)、(c)、(e) 分别为焦平面上 ($z=0$) 比例因子 $K(r)$ 保持不变的情况下,改变可见光光子流密度总和时对应的结果。此时,两束可见光光子流密度峰值比例 $\max(h_{\text{v2}})/\max(h_{\text{v1}})=0.01$ 不变,同时增大或减小 h_{v1} 和 h_{v2} , $[\max(h_{\text{v1}}), \max(h_{\text{v2}})]=B[h_{\text{vis,sat}}, 0.01h_{\text{vis,sat}}]$, 改变放大倍数 B , 得到总和频信号光子密度 n_{SFG} (图 6(a)), K 值 (图 6(c)) 和有效和频信号光子密度 n_{SFG2} (图 6(e)) 随 ρ 的变化曲线,图中蓝线、红线、黄线和紫线分别代表 $B=1, 10, 100$ 和 500 的情况。图 6(b)、(d)、(f) 分别为焦平面上,在 h_{v2} 保持不变且峰值 $\max(h_{\text{v2}})=0.05h_{\text{vis,sat}}$ 的情况下,改变 h_{v1} 得到的总和频信号光子密度 n_{SFG} 、 K 值和有效和频信号光子密度 n_{SFG2} 随 ρ 的变化曲线,图中蓝线、红线、黄线和紫线分别代表 $\max(h_{\text{v1}})=[0.5, 1, 10, 100]h_{\text{vis,sat}}$ 的情况。为方便显示,图中用 $R=\max(h_{\text{v1}})/h_{\text{vis,sat}}$ 表示这四种情形。图 6(e)、(f) 中的虚线为不加环形可见光情况下,即传统的 VSFG 的点扩展函数参照曲线。

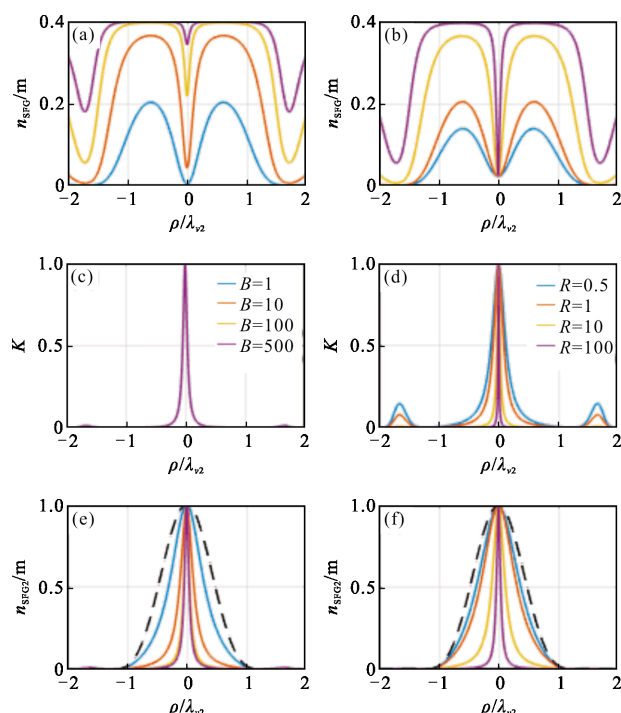


图 6 不同情况下,总和频信号光子流密度 n_{SFG} , K 值和有效和频信号光子密度 n_{SFG2} 沿径向 ρ 的变化曲线
Fig.6 Total SFG photon flux density n_{SFG} , the K value, and useful SFG photon flux density n_{SFG2} along radial direction ρ at different situations

由图 6(a)、(c)、(e)可见,虽然比例因子 $K(r)$ 相同,但不同的放大倍数 B 得到的有效和频信号光子密度 n_{SFC2} 点扩展函数不同。当 $\max(h_{v2}) < h_{\text{vis,sat}}$ 时,增大放大倍数 B 可以明显地压缩点扩展函数,如图 6(e)中蓝线 $B=1$,对应 $h_{v2}=0.01h_{\text{vis,sat}}$,点扩展函数半高宽(FWHM)为 $0.608\lambda_{v2}=426\text{ nm}$;红线 $B=10$,对应 $h_{v2}=0.1h_{\text{vis,sat}}$,点扩展函数 FWHM 为 $0.24\lambda_{v2}=168\text{ nm}$ 。而当 $\max(h_{v2}) > h_{\text{vis,sat}}$ 时,再增大 B 值,点扩展函数不再明显变窄,如图 6(e)中黄线 $B=100$,对应 $h_{v2}=h_{\text{vis,sat}}$,点扩展函数 FWHM 为 $0.055\lambda_{v2}=77\text{ nm}$,紫线 $B=500$,对应 $h_{v2}=5h_{\text{vis,sat}}$,点扩展函数 FWHM 为 $0.05\lambda_{v2}=70\text{ nm}$ 。这是由于高斯可见光 h_{v2} 达到饱和光子密度时,总和频信号将饱和,如图 6(a)中黄线;此后再增加 h_{v2} ,信号不会明显增加,如图 6(a)中紫线,再乘以比例因子 K 得到的有效和频信号也不会有太大变化,有效和频信号点扩展函数 FWHM 的极限为 $0.04\lambda_{v2}=56\text{ nm}$ 。由图 6(b)、(d)、(f)可见在高斯可见光 h_{v2} 不变的情况下,环形可见光 h_{v1} 越高,得到的有效和频信号光子密度 n_{SFC2} 点扩展函数越窄。当 $\max(h_{v1}) < h_{\text{vis,sat}}$ 时,如图 6(f)蓝线 $\max(h_{v1})=0.5h_{\text{vis,sat}}$,点扩展函数 FWHM 为 $0.376\lambda_{v2}=527\text{ nm}$;红线 $\max(h_{v1})=h_{\text{vis,sat}}$,点扩展函数 FWHM 为 $0.312\lambda_{v2}=437\text{ nm}$,点扩展函数虽有变窄,但是效果并不是很明显,最多只能从 VSFG 成像的分辨率 $\lambda_{v2}=700$ 提高到 437 nm ;当 $\max(h_{v1}) > h_{\text{vis,sat}}$ 时,如图 6(f)黄线 $\max(h_{v1})=10h_{\text{vis,sat}}$,点扩展函数 FWHM 为 $0.12\lambda_{v2}=168\text{ nm}$,红线 $\max(h_{v1})=100h_{\text{vis,sat}}$,点扩展函数 FWHM 为 $0.04\lambda_{v2}=56\text{ nm}$,点扩展函数明显变窄。综上所述,为了实现超分辨红外显微成像,在环形可见光光子流密度峰值 $\max(h_{v1}) > h_{\text{vis,sat}}$ 的条件下,提高环形可见光光子流密度 h_{v1} ,降低高斯可见光光子流密度 h_{v2} ,使得环形区域内高斯可见光光子占总可见光光子的比例 K 减小,从而抑制环形区域内有效和频信号的产生,达到压缩点扩展函数,提高分辨率的目的。

3 结论

文中提出了一种结合和频效应和环形光裁剪点扩展函数来实现超分辨红外显微成像的方法,红外光、不同频率的高斯和环形可见光同时入射具有红外活性的样品。样品分子吸收红外光到达振动激发态,当总可见光光子流密度大于饱和光子流密度时,可见光光子和共振分子作用产生的总和频信号光子

密度出现饱和,高斯和环形可见光之间竞争与共振分子作用产生有效和无效和频信号,提高环形光光子流密度使其超过饱和光子流密度,同时降低高斯可见光子流密度,这样在环形区域环形光与共振分子作用占主导,抑制了高斯可见光与共振分子作用产生的有效和频信号,而在中心区域高斯可见光与共振分子作用占主导产生有效和频信号,达到了压缩点扩展函数的目的;根据半经典波动理论得到的三束光聚焦光场表达式,结合速率方程模拟了在振动能级粒子布居几率为 0.4 的初始条件下,两束可见光同时入射样品时高斯可见光和共振分子作用产生的有效和频信号横向点扩展函数,模拟表明在环形可见光光子流密度峰值 $\max(h_{v1})$ 大于饱和光子流密度 $h_{\text{vis,sat}}$ 的条件下,提高环形可见光光子流密度 h_{v1} ,降低高斯可见光光子流密度 h_{v2} ,可有效地压缩点扩展函数,在聚焦物镜 $NA=0.6$ 、 $\max(h_{v2})=0.05h_{\text{vis,sat}}$ 、 $\max(h_{v1})=100h_{\text{vis,sat}}$ 的情况下,得到的有效和频信号光子密度 n_{SFC2} 点扩展函数半高宽为 56 nm 。该方法将传统探测红外吸收谱转变为探测和频发射谱来获取样品分子的振动谱,突破了红外光衍射极限,还利用环形光裁剪点扩展函数,突破可见光衍射极限,在理论上可实现红外纳米超分辨显微成像。

参考文献:

- [1] Hu Chunguang, Zha Ridong, Ling Qiuyu, et al. Super-resolution microscopy applications and development in living cell [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2017, 46(11): 1103002. (in Chinese)
胡春光, 查日东, 凌秋雨, 等. 超分辨显微技术在活细胞中的应用与发展[J]. *红外与激光工程*, 2017, 46(11): 1103002.
- [2] Cheng J, And E O P, Xie S X. Coherent anti-Stokes Raman scattering correlation spectroscopy: probing dynamical processes with chemical selectivity [J]. *Journal of Physical Chemistry A*, 2002, 106(37): 8561-8568.
- [3] Hendaoui N, Mani A, Liu N, et al. A method to overcome the diffraction limit in infrared microscopy using standing waves in an attenuated total reflection configuration [J]. *Optics Communications*, 2017, 382: 574-579.
- [4] Li Y H, Chen D N, Niu H B. A method for achieving super resolution vibrational sum-frequency generation microscopy by structured illumination [J]. *IEEE Photonics Journal*, 2017, 9(3): 390708.

- [5] Sakai M, Kawashima Y, Takeda A, et al. Far-field infrared super-resolution microscopy using picosecond time-resolved transient fluorescence detected IR spectroscopy [J]. *Chemical Physics Letters*, 2007, 439(1): 171-176.
- [6] Inoue K, Fujii M, Sakai M. Development of a non-scanning vibrational sum-frequency generation detected infrared super-resolution microscope and its application to biological cells [J]. *Applied Spectroscopy*, 2010, 64(3): 275-281.
- [7] Kogure S, Inoue K, Ohmori T, et al. Infrared imaging of an A549 cultured cell by a vibrational sum-frequency generation detected infrared super-resolution microscope [J]. *Optics Express*, 2010, 18(13): 13402.
- [8] Wichmann J, Hell S W. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy [J]. *Optics Letters*, 1994, 19(11): 780-782.
- [9] Wei Tongda, Zhang Yunhai, Yang Haomin. Super resolution imaging technology of stimulated emission depletion [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2016, 45(6): 0624001. (in Chinese)
魏通达, 张运海, 杨皓旻. 受激辐射损耗超分辨成像技术研究[J]. *红外与激光工程*, 2016, 45(6): 0624001.
- [10] Peremans A, Silien C, Liu N, et al. A framework for far-field infrared absorption microscopy beyond the diffraction limit[J]. *Optics Express*, 2012, 20(28): 29694-29704.
- [11] Pita I, Hendaoui N, Liu N, et al. High resolution imaging with differential infrared absorption micro-spectroscopy. [J]. *Optics Express*, 2013, 21(22): 25632-25642.
- [12] Liu Hongji, Liu Shuanglong, Niu Hanben, et al. A super-resolution infrared microscopy based on a doughnut pump beam [J]. *Acta Physica Sinica*, 2016, 65(23): 234203. (in Chinese)
刘鸿吉, 刘双龙, 牛憨笨, 等. 基于环形抽运光的红外超分辨显微成像方法 [J]. *物理学报*, 2016, 65(23): 234203.