

文章编号 1004-924X(2014)05-1157-08

偏振态、相位和振幅对受激辐射损耗中 损耗光焦斑的影响

魏通达^{1,2,3}, 张运海³, 唐玉国^{1,3*}

(1. 中国科学院 长春光学精密机械与物理研究所, 吉林 长春 130033;

2. 中国科学院大学, 北京 100049;

3. 中国科学院 苏州生物医学工程技术研究所, 江苏 苏州 215163)

摘要:针对受激辐射损耗(STED)超分辨显微术分辨率不够高的问题,研究了损耗光偏振态、相位和振幅多种物理量对焦斑的影响,以形成半峰全宽窄的圆环形损耗光焦斑。根据 Richards-Wolf 矢量衍射理论,建立了偏振态、相位和偏振态作用下的损耗光焦斑模型;计算了不同偏振态、不同相位振幅调制参数下损耗光焦斑的分布情况;通过优化各参量得到有效激发荧光的分布。计算结果表明,应用切向偏振时的损耗光焦斑半峰全宽优于应用径向偏振和圆偏振;相位和振幅的调制作用均能减小半峰全宽;优化后有效激发荧光的理论半峰全宽仅为 13.2 nm。采用损耗光的偏振态、相位和振幅对损耗光焦斑进行整形,能够有效减小半峰全宽,获得较高的理论分辨率,比仅使用单一物理量的效果更好;应用切向偏振光能够获得高质量的损耗光焦斑和超衍射极限的分辨能力,根据不同实际情况选择相位或振幅调制的方法可进一步提高分辨率。

关键词:超分辨率显微术;受激辐射损耗;偏振;相位;振幅

中图分类号:TH742.9 文献标识码:A doi:10.3788/OPE.20142205.1157

Effect of polarization, phase and amplitude on depletion focus spot in STED

WEI Tong-da^{1,2,3}, ZHANG Yun-hai³, TANG Yu-guo^{1,3*}

(1. Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences,
Changchun 130033, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences,
Suzhou 215613, China)

* Corresponding author, E-mail: tangyg2013@sina.cn

Abstract: As Stimulated Emission Depletion (STED) super-resolution microscopy has a lower resolution, this paper explores the effects of multiphysical variables including light polarization, phases and amplitudes on the focal spots, in order to form a ring-shape depletion focus spot with sharper Full Width at Half Maximum (FWHM) and to increase the resolution of the microscopy. According to Richards-Wolf vector theory, the models of depletion focus spots were established under the actions of

收稿日期:2013-03-21;修订日期:2013-04-11.

基金项目:中科院苏州生物医学工程技术研究所“一三五”规划重大突破资助项目(No. Y052031205);苏州市应用基础研究计划资助项目(No. SYG201128)

polarization, phase and amplitude, the focus spot distribution was calculated in different polarization, phase and amplitude conditions and the distribution of effective fluorescent excitation was obtained by optimizing the parameters. The results show that: by using azimuthal polarization light as depletion, the FWHM is better than those of radial or circular ones; modulations of phase and amplitude are able to reduce the FWHM, and the theoretical value of effective fluorescent excitation FWHM is only 13.2 nm after optimization. By using polarization state, phase and amplitude to modulate the depletion focus spot, the FWHM can be reduced and a higher resolution can be obtained, which is more effective than that using only single physical variable. Moreover, the high quality depletion focus spot and super-resolution ability can be obtained with azimuthal polarization light in STED and the resolution can further be optimized by phase or amplitude modulations based on different realities.

Key words: super-resolution microscopy; Stimulated Emission Depletion (STED); polarization; phase; amplitude

1 引言

远场超分辨显微技术突破了传统光学衍射极限的限制,在满足较高分辨力的同时,克服了电子显微镜对观测样品破坏程度过大的缺点,从而成为生物医学和材料科学领域强有力的观测手段和研究热点^[1-5]。目前,超分辨显微术有多种类型,受激辐射损耗(Stimulated Emission Depletion, STED)是其中重要的一种,它于 1994 年由 HELL 提出^[6],是最早也是最直接地克服光学衍射极限的远场光学显微术。与共聚焦显微技术相同^[7],STED 通过逐点、逐层扫描荧光的方式来进进行三维成像,因此它可以通过改造共聚焦显微系统来实现。STED 技术成像速度快,能够观察活细胞,现已成功用于精确定位和观察细胞器、病毒等细胞的三维空间分布^[8]。

典型 STED 显微成像系统需要两路激光,一路激光在物镜焦点处形成近似艾利分布的焦斑,用以激发样品内荧光物质的荧光,这路激光称为激发光;另一路激光在物镜焦点处形成中央光强为零的圆环形焦斑,用以减小激发荧光区域,这路激光称为损耗光(STED 光)。损耗光圆环形焦斑分布直接影响 STED 系统的分辨率^[9-10],其半峰全宽(Full Width at Half Maximum, FWHM)越小,STED 系统分辨率就越高。目前,损耗焦斑形成机理的研究是一个热点问题。已有的 STED 系统大多通过在损耗光中引入 $0\sim 2\pi$ 涡旋相位来在物镜焦点处形成一个圆环形焦斑^[11],也有通过损耗光光束的偏振态来形成圆环形损耗焦斑的系统^[12-14]。

影响损耗光焦斑分布的因素主要有光束的振幅、相位、偏振态等,目前大都采用单一物理量来对损耗光焦斑进行整形,但这些方法生成的圆环形焦斑的内环区域较大,因而有效荧光发射区域也较大,从而导致 STED 的系统分辨率较低。本文研究了光束的振幅、相位和偏振态 3 个影响因素对损耗光焦斑形成的影响,采用多种物理量优化的方法对损耗光焦斑进行了细微而复杂的整形,减小了半峰全宽,获得了较高的理论分辨率。

2 原理模型

2.1 焦斑光强分布模型

典型的 STED 原理如图 1 所示,一束激发光通过物镜在焦平面处形成近似艾利分布的焦斑(截面 1 所示);另外一束损耗光(STED)通过相位板后再聚焦形成圆环形焦斑(截面 2 所示)。两种焦斑空间重叠,因受 STED 作用,重叠部分处于荧光激发态的粒子数被损耗而不产生荧光,能够产生荧光的有效激发区域大大缩小(截面 3 所

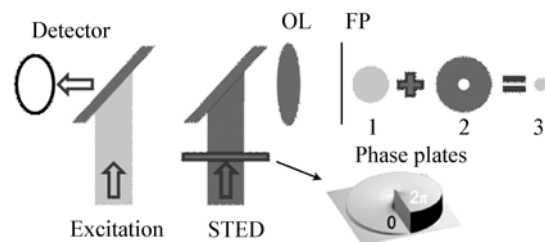


图 1 受激辐射损耗显微术原理

Fig. 1 Principle of STED

示)。探测器记录有效荧光激发区域产生的荧光, 在控制系统的控制下, 通过逐点、逐层扫描, 以及图像处理^[15]得到样品的三维荧光图像。

Richards-Wolf 矢量衍射理论^[16]模型描述了一般物镜焦点处的光波场分布, 本文在该模型的基础上引进了物镜光瞳处光波的振幅、相位和偏振态, 借以研究这些物理量对焦斑的影响。平面光波经物镜聚焦在像方空间任意点 P 处, 改进后的电场 E 的空间分布模型公式为:

$$\mathbf{E}(r_1, \phi_1, z_1) = -\frac{iA}{\pi} \int_0^{\theta_{\max}} \int_0^{2\pi} \boldsymbol{\varepsilon}_1(\cos \theta)^{1/2} \cdot$$

$$\exp[ik\psi(\theta)] \exp[iknr_1 \sin \theta \cos(\phi - \phi_1)] \times \exp[iknz_1 \cos \theta] D(\phi, \theta) \sin \theta d\phi d\theta, \quad (1)$$

式中: $\mathbf{E}(r_1, \phi_1, z_1)$ 为矢量, 含有 $\mathbf{E}_x, \mathbf{E}_y, \mathbf{E}_z$ 3 个分量; r_1, ϕ_1, z_1 为观察点的柱坐标; A 为归一化常量; $\theta_{\max} = \arcsin(NA/n)$, 为数值孔径为 NA 的物镜最大入射角度; $\psi(\theta)$ 为像差校正函数, 这里仅考虑无像差的理想条件; k 为真空中的波数; $D(\phi, \theta)$ 为相位调制函数, 可以写成:

$$D(\phi, \theta) = D_1(\phi, \theta), D_2(\phi, \theta), D_3(\phi, \theta), \quad (2)$$

其中: D_1, D_2 和 D_3 分别用于相位涡旋调制、区域相位调制和区域振幅调制。电场强度矢量 $\boldsymbol{\varepsilon}_1$ 为:

$$\boldsymbol{\varepsilon}_1 = l_0(\theta) \mathbf{R}^{-1} \mathbf{L} \mathbf{R} \boldsymbol{\varepsilon}_0, \quad (3)$$

其中: $l_0(\theta)$ 为切趾函数; \mathbf{R} 为沿 Z 轴的坐标旋转变换矩阵,

$$\mathbf{R} = \begin{pmatrix} \cos \phi & \sin \phi & 0 \\ -\sin \phi & \cos \phi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}; \quad (4)$$

\mathbf{L} 为光透过物镜的电场变化矩阵,

$$\mathbf{L} = \begin{pmatrix} \cos \theta & 0 & \sin \theta \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin \theta & 0 & \cos \theta \end{pmatrix}; \quad (5)$$

$\boldsymbol{\varepsilon}_0$ 为入射光电场强度矢量。

上述公式中, 相位调制函数 $D(\phi, \theta)$ 和入射光电场强度矢量 $\boldsymbol{\varepsilon}_0$ 反映了光瞳处光波振幅、相位和偏振态对焦斑的影响。光强可由电场强度的平方表示, 在得到物镜焦点处激发光和损耗光的电场强度分布后即可获得焦点处的光强分布。

激发光和损耗光的焦斑在焦平面空间内重叠, 经过 STED 过程得到的有效荧光激发光强 I_{fl} 与激发光和损耗光的强度分布情况有关, I_{fl} 表

示为^[17]:

$$I_{\text{fl}} = I_{\text{exc}} \exp(-\alpha I_{\text{sted}}), \quad (6)$$

其中: I_{exc} 和 I_{sted} 分别为激发光和损耗光的光强; σ 为受激辐射截面; $\alpha = \frac{|\mathbf{E}_{\text{exc}} \cdot \mathbf{E}_{\text{sted}}|}{\sqrt{I_{\text{exc}} \cdot I_{\text{sted}}}}$, 为激发光电场和损耗光电场的标量积, 用于描述受激辐射损耗物理过程中, 激发光和损耗光的共偏振程度对损耗效率的影响, αI_{sted} 为归一化数值。为了获得高损耗效率, 激发光与损耗光的偏振态应相同^[18]。

2.2 偏振态、相位和振幅的调制模型

2.2.1 偏振态调制模型

入射光偏振态对损耗光焦斑的影响很大。由式(3)可知, 不同的偏振态主要体现在入射光电场强度矢量 $\boldsymbol{\varepsilon}_0$ 的表达式不同, 从而得到不同的焦斑分布。常用的偏振态形式是线偏光和圆偏光, 也有在 STED 系统中采用径向偏振光和切向偏振光形成损耗光焦斑。

激光发出的光束偏振态一般为线偏光, 线偏振的电场强度矢量为 $\boldsymbol{\varepsilon}_{01} = (1, 0, 0)^T$ 或 $\boldsymbol{\varepsilon}_{01} = (0, 1, 0)^T$, 分别表示 x 向和 y 向线偏振光。

通过 $1/4$ 波片可以把线偏振光转换为圆偏振光, 圆偏振光的电场强度矢量为 $\boldsymbol{\varepsilon}_{0c} = (1/\sqrt{2}, i/\sqrt{2}, 0)^T$ 。

切向偏振光是一种典型的圆柱涡旋偏振光束, 其截面如图 2(a) 所示, 其偏振方向沿着光束圆形截面的切线方向, 并绕光束中心轴成轴对称

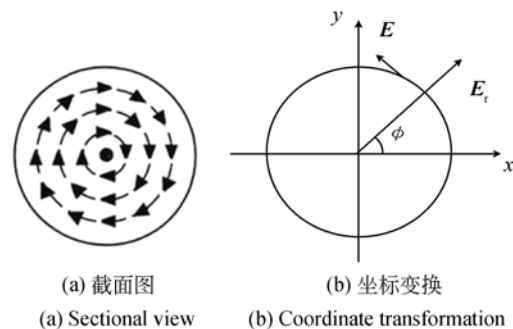


图 2 切向偏振光示意图

Fig. 2 Schematic diagram of azimuthal polarization light

涡旋分布。通过液晶阵列^[19-20]可以把线偏振光转化为切向偏振光, 切向偏振光的电场强度矢

量为：

$$\mathbf{e}_{0a} = \begin{pmatrix} -\sin \phi & \cos \phi & 0 \\ \cos \phi & \sin \phi & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\sin \phi \\ \cos \phi \\ 0 \end{pmatrix}. \quad (7)$$

同理可得，径向偏振光的电场强度矢量 $\mathbf{e}_r = (\cos \phi, \sin \phi, 0)^T$ 。

2.2.2 相位调制模型

在 STED 系统中相位调制主要有两种，一种采用涡旋相位调制，用以形成圆环焦斑， $0 \sim 2\pi$ 涡旋相位板如图 1 所示。在涡旋相位下，式(2)改写为：

$$D_1(\phi, \theta) = \exp(i\phi). \quad (8)$$

另一种是 0 相位和 π 相位呈阶梯状区域分布的相位调制，用以减小焦斑的 FWHM。如图 3 所示，损耗光路中使用图 3(b)所示的区域相位，

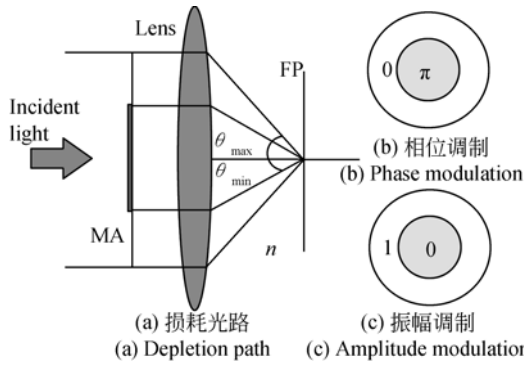


图 3 损耗光路相位和振幅调制示意图

Fig. 3 Schematic diagram of phase and amplitude modulations in depletion path

中间圆形区域为 π 相位的延迟板，而周围环形区域的相位延迟为 0，因此入射角度小于 θ_{max} 的光线将附加 π 相位的延迟。此时式(2)为：

$$D_2(\phi, \theta) = \begin{cases} \exp(0 \times i) = 1, & \theta_{min} \leq \theta \leq \theta_{max} \\ \exp(i\pi) = -1, & \theta < \theta_{min}, \theta > \theta_{max} \end{cases}. \quad (9)$$

2.2.3 振幅调制模型

如图 3(c)所示，采用圆环形区域振幅调制也可以对损耗光焦斑进行整形，圆形光阑挡住入射角度小于 θ_{min} 的光线，使剩余损耗光束成圆环形入射到物镜光瞳中，此时的区域振幅调制函数为：

$$D_3(\phi, \theta) = \begin{cases} 1, & \theta_{min} \leq \theta \leq \theta_{max} \\ 0, & \theta < \theta_{min}, \theta > \theta_{max} \end{cases}. \quad (10)$$

定义环形因子 $\delta = \theta_{min} / \theta_{max}$ ， δ 表示了相位振幅调制光阑的内外径所对应入射角度的比值。这里定义 δ_p 和 δ_a 分别为相位调制环形因子和振幅调制环形因子。

3 结果和分析

3.1 不同偏振态的焦斑分布

本文分别仿真计算了切向偏振光、径向偏振光和圆偏振光形成损耗光焦斑的情况。计算时选取浸油物镜的数值孔径 $NA=1.4$ ，介质油的折射率 $n=1.518$ ，损耗光波长为 599 nm。定义损耗光强为最大值的一半时所对应的内圆环直径为损耗光焦斑的 FWHM。

3.1.1 切向偏振光情况

切向偏振光应用于 STED 时的计算结果如图 4(a)所示。由图可以看出，焦斑为中心处光强为零的圆环形，由于切向偏振光的特殊性质，光波在光轴对称位置处的相位差为 π ，导致光波在焦点位置因干涉而相干相消，产生一个中心光强为零的圆环形焦斑，并不需要涡旋相位调制；其偏振方向在入射到物镜前后始终垂直于光传播方向，因此没有沿光轴方向的电场分量。此时的 FWHM 为 160 nm。

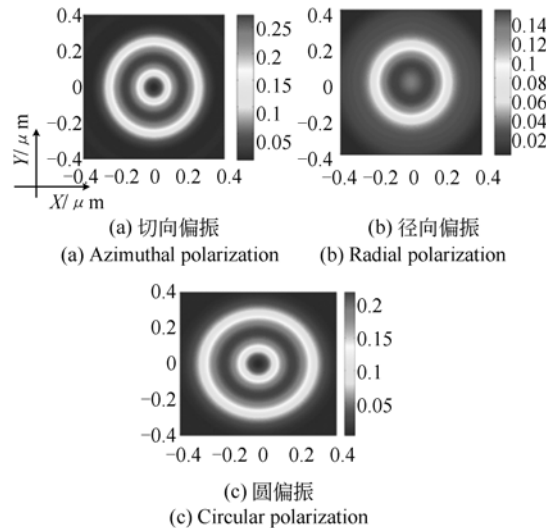


图 4 不同偏振态损耗焦斑光强分布

Fig. 4 Intensity distributions of focus spots with different polarizations

3.1.2 径向偏振光情况

同样，经计算得到了径向偏振光焦斑，结果如图 4(b)所示。焦斑的中心光强不完全为 0，这将导致中心处被激发的荧光也被损耗掉，不能形成

有效的激发, 从而造成 STED 系统整体分辨能力的下降。由于焦平面内分量中心不为零, 径向偏振光不太适合用于形成损耗光焦斑。

3.1.3 圆偏振光情况

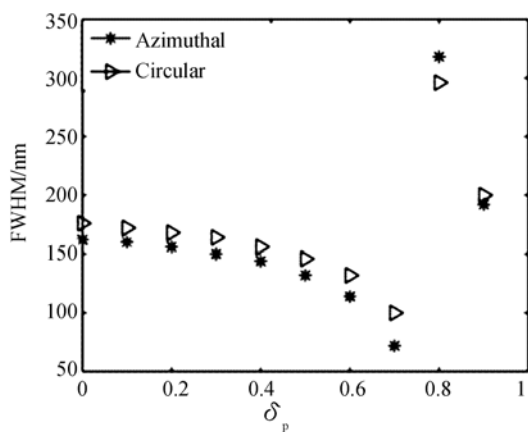
圆偏振光通过 $0 \sim 2\pi$ 涡旋相位调制得到的焦斑的中心光强为零, 如图 4(c) 所示, 其 FWHM 为 176 nm。同切向偏振光相比, 圆偏振光下的 FWHM 更大, 但圆环焦斑环带上的光强度小于切向偏振光, 此外圆偏振光存在沿光轴方向的电场分量。整体上看, 切向偏振光焦斑优于圆偏振光。

由于径向偏振光作为损耗光时焦斑中央光强不为零, 不适合 STED 系统要求, 因此采用切向偏振光和圆偏振光来形成损耗光焦斑。在用偏振态对焦斑进行整形的基础上, 进一步采用区域相位和振幅对焦斑进行整形, 以减小损耗光焦斑的 FWHM, 提高 STED 系统的整体分辨率。

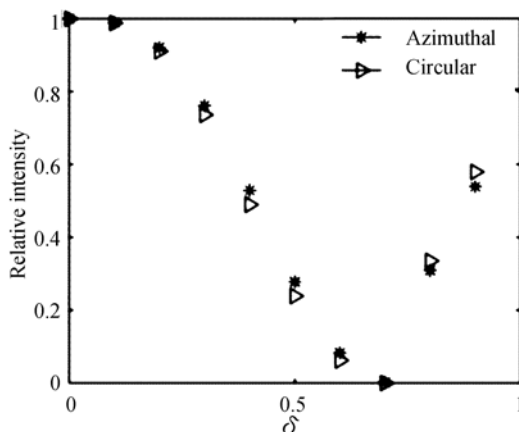
3.2 区域相位调制

相位调制环形因子 δ_p 和损耗光焦斑 FWHM 的关系如图 5(a) 所示。从图中可以看出, 随着 δ_p 从 0 增大到 0.9, 在 δ_p 小于 0.7 时, FWHM 持续变小, 并在 $\delta_p = 0.7$ 附近切向偏振光焦斑的 FWHM 达到最小值 72 nm; 之后开始变大, 甚至大于不施加相位调制的情况, 从而失去了调制的意义。

图 5(b) 为相位调制环形因子 δ_p 和相对光强度值的关系, 在 δ_p 小于 0.7 时, 相对光强变小; 在 δ_p 达到 0.7 附近时, 相对光强最小, 接近为零。由此可以看出, 当相位调制 δ_p 小于 0.7 时, 可以通过增大 δ_p 来减小损耗光的 FWHM, 但相对光强的逐渐变小会造成光能量的损失, 使信噪比变差。在实际焦斑整形时需综合平衡 FWHM 和相对光强值, 并根据信噪比确定一个合适的相位调制环形因子。



(a) 对半峰全宽的影响
(a) Effect on FWHM



(b) 对相对光强的影响
(b) Effect on relative intensity

图 5 相位调制对半峰全宽和相对光强影响

Fig. 5 Effect of phase modulation on FWHM and relative intensity

由图 5 可知, 相位调制对切向偏振光和圆偏振光的影响相似。对比圆偏振光, 切线偏振焦斑的 FWHM 更小, 但它们的能量损失相近。

3.3 区域振幅调制

在对损耗光焦斑进行振幅调制时, 环形因子 δ_a 分别取 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 和 0.95, FWHM 的计算结果如图 6(a) 所示。由图可以看出, 随着 δ_a 的增加, 损耗光焦斑的 FWHM 呈持续减小的趋势, 当 $\delta_a = 0.95$ 时, 切向偏振光的 FWHM 为 132 nm, 约为 0.22λ ($\lambda = 599$ nm)。但是由于入射光的减少, 光强也会逐渐减小, 如图 6(b) 所示, $\delta_a = 0.95$ 时, 相对光强值接近为零。在实际中需根据信噪比确定一个合适的振幅调制环形因子。

由图 6 可知, 振幅调制对切向偏振光和圆偏振光的影响相似。对比圆偏振光, 切线偏振光焦斑的 FWHM 更小, 但它们的能量损失相近, 因而切线偏振光更适合用于形成损耗光焦斑。

相位调制和振幅调制均能减小损耗光束焦斑的 FWHM, 但式 (9)、式 (10) 表明, 两种方法本质上都是通过损失光能量来实现提高分辨率的。通常可通过提高入射光强的手段来补偿由于调制造成的光能量损失, 此外文中使用的是一阶相位振幅调制, 更高阶的调制能够更好地控制光能损失。值得注意的是, 当两种调制方式都将切线偏振光焦斑的 FWHM 减小至 132 nm 时, 振幅调制

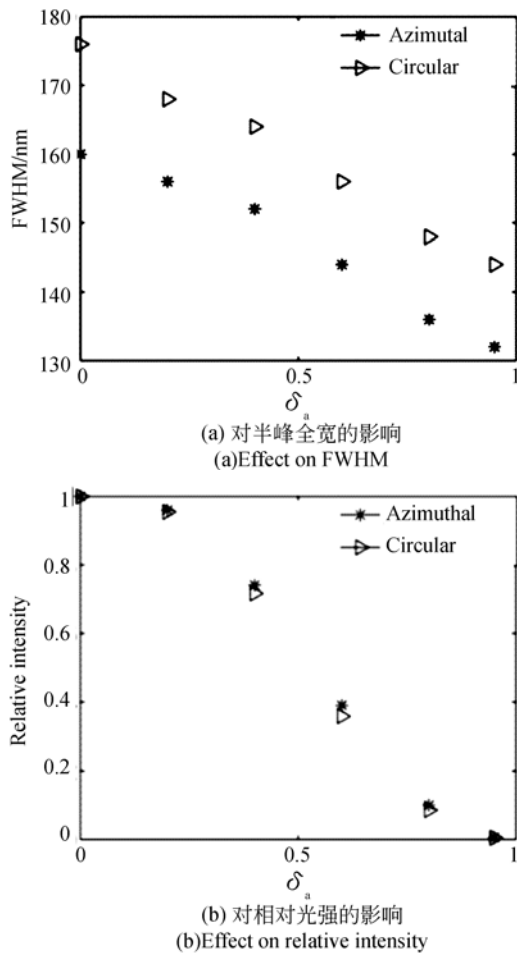


图 6 振幅调制对半峰全宽和相对光强影响

Fig. 6 Effect of amplitude modulation on FWHM and relative intensity

的相对光强接近为零,而相位调制却保留了接近 30% 的光强;而且在接近零光强时,相位调制的 FWHM 为 72 nm,要小于振幅调制的 132 nm。由此可见,理论上通过相位调制来提高分辨率效果要优于振幅调制。但从实际出发,相位调制对入射光波长的要求比较严格,环形因子 δ_p 的可调程度也低;而振幅调制可适用于任何波长,而且根据光强和分辨率的要求,环形因子 δ_a 也较易调节。由此可见,二者各有优劣,可以根据需要选择调制方式。

4 有效荧光激发分析

根据式(6)计算有效荧光激发区域的光强分布。激发光强 I_{exc} 采用 532 nm 波长的切向偏振光,受激截面值 $\sigma=100$, 损耗光强 I_{sted} 采用的激

光波长为 599 nm, 偏振态为切向偏振光, 位相取均匀位相, 得到的激发光和有效荧光激发的光强分布分别如图 7(a)、7(b) 所示。其中有效荧光激发为圆形光点, FWHM 为 16.8 nm, 约为激发焦斑的 11%, 远远小于激发焦斑的 FWHM, 具有超衍射极限的分辨能力。图 7(c) 为损耗光、激发光和有效荧光激发的相对光强切面图。

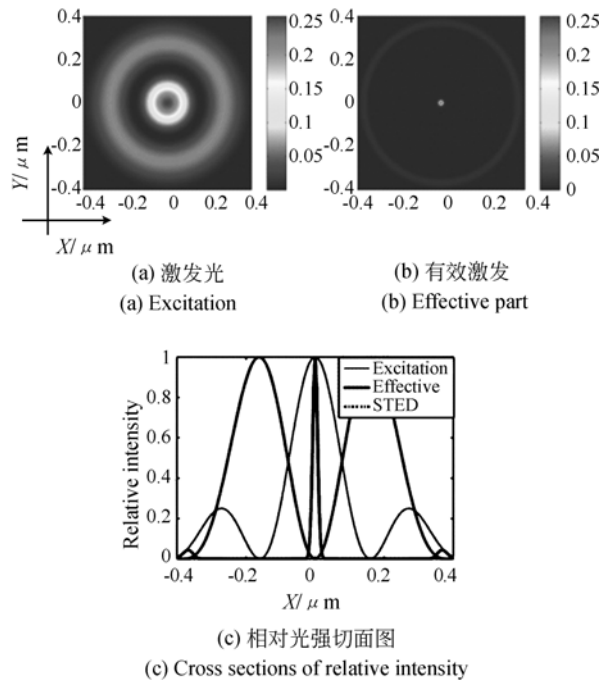


图 7 光强分布及其切面图

Fig. 7 Intensity distributions and its cross sections

由于相位和振幅区域分割调制都能减小损耗光焦斑的 FWHM, 对有效激发光的影响作用相同, 因此本文以振幅区域分割调制方法为例进行实验。采用振幅区域分割调制时, 由于损耗环形焦斑的 FWHM 减小, 得到的有效激发光的 FWHM 也逐步减小, 在 $\delta_a=0.95$ 时 FWHM 减小到 13.2 nm, 约为 0.025λ ($\lambda=532 \text{ nm}$), 如图 8 所示。而无调制圆偏振光入射时有效荧光激发的 FWHM 约为 0.04λ ^[11]。

综上所述, 通过调制和优化损耗光的偏振态、相位和振幅, 可对损耗光进行焦斑整形, 从而减小有效激发光的 FWHM, 提高 STED 系统的分辨率。对损耗光偏振态、相位和振幅进行更高阶的调制和优化, 理论上可以获得质量更好的损耗光焦斑, 但这样会涉及更多的变量, 使参数调节更加细微, 使用条件更加苛刻, 计算也更加复杂。

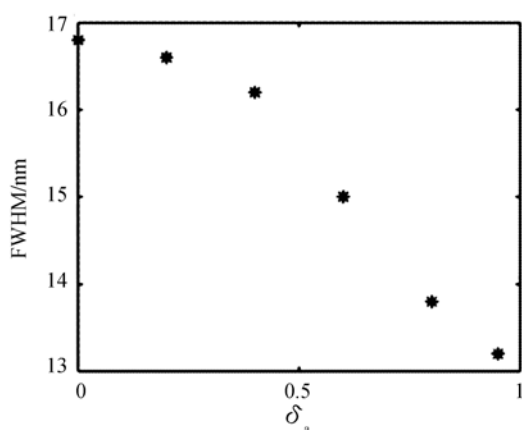


图8 有效半峰全宽随环形因子的变化关系

Fig. 8 Relationship between effective FWHM and annular factor

5 结 论

本文根据 Richards-Wolf 矢量衍射理论, 建立了偏振态、相位和偏振态作用下损耗光焦斑的模型, 研究了损耗光偏振态、相位和振幅 3 种物理量对焦斑的影响, 计算了不同的偏振态和相位振幅调制参数下损耗光焦斑的分布情况, 通过优化

各参量得到了有效激发荧光的分布。结果表明, 不同的入射光偏振态得到的焦斑分布情况不同, 应用切向偏振调制损耗光时, 不需要额外的相位调制就可以获得理想的环形焦斑, 同时 FWHM 小于径向偏振和圆偏振, 能量损失也较少, 最适合用于 STED 显微术。在进行相位调制和振幅调制时, 均采用区域分割调制法来研究光阑环形因子的影响。两种调制均能减小损耗焦斑的 FWHM, 但是也造成了光能量的损失, 损失的能量可通过提高入射光强来补偿。在理论上相位调制的效果要优于振幅调制, 但振幅调制在实际应用中更具灵活性。

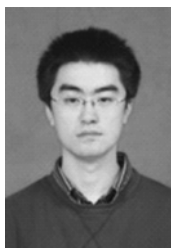
本文采用损耗光的偏振态、相位和振幅对损耗光焦斑进行整形, 减小了 FWHM, 获得了较高的理论分辨率, 比仅考虑单一物理量调制的效果更好。应用切向偏振光的 STED 显微术可获得超衍射极限的分辨率, 并可通过相位或振幅调制的方法进一步提高焦斑的 FWHM, 优化后有效激发荧光的理论 FWHM 仅为 13.2 nm。本文不仅为提高 STED 显微技术的分辨率提供了依据, 还为超高分辨光学仪器的研制起到指导作用。

参考文献:

- [1] SCHERMELLEH L, HEINTZMANN R, LEONHARDT H. A guide to super-resolution fluorescence microscopy [J]. *Journal of Cell Biology*, 2010, 190(2):165-175.
- [2] VAND DE LINDE S, ENDESFELDER U, MUKHERJEE A, et al.. Multicolor photoswitching microscopy for subdiffraction-resolution fluorescence imaging [J]. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2009, 8(4):465-469.
- [3] BADDELEY D, CHAGIN V O, SCHERMELLEH L, et al.. Measurement of replication structures at the nanometer scale using super-resolution light microscopy [J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(2):8.
- [4] BETZIG E, PATTERSON G H, SOUGRAT R, et al.. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793):1642-1645.
- [5] RUST M J, BATES M, ZHUANG X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10):793-795.
- [6] HELL S W, WICHMANN J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy [J]. *Optics Letters*, 1994, 19(11):780-782.
- [7] ZHANG Y H, HU B, DAI Y K, et al.. A new multichannel spectral imaging laser scanning confocal microscope [J]. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2013, 2013:8.
- [8] RITTWEGER E, HAN K Y, IRVINE S E, et al.. STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution [J]. *Nature Photonics*, 2009, 3(3):144-147.
- [9] GALIANI S, HARKE B, VICIDOMINI G, et al.. Strategies to maximize the performance of a STED microscope [J]. *Optics Express*, 2012, 20(7):7362-7374.
- [10] KROMANN E B, GOULD T J, JUETTE M F, et al.. Quantitative pupil analysis in stimulated emis-

- sion depletion microscopy using phase retrieval [J]. *Optics Letters*, 2012, 37(11):1805-1807.
- [11] BOKOR N, IKETAKI Y, WATANABE T, *et al.*. On polarization effects in fluorescence depletion microscopy [J]. *Optics Communications*, 2007, 272(1):263-268.
- [12] KHONINA S N, GOLUB I. How low can STED go? Comparison of different write-erase beam combinations for stimulated emission depletion microscopy [J]. *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision*, 2012, 29(10):2242-2246.
- [13] KHONINA S N, GOLUB I. Enlightening darkness to diffraction limit and beyond: comparison and optimization of different polarizations for dark spot generation [J]. *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision*, 2012, 29(7):1470-1474.
- [14] XUE Y, KUANG C F, LI S, *et al.*. Sharper fluorescent super-resolution spot generated by azimuthally polarized beam in STED microscopy [J]. *Optics Express*, 2012, 20(16):17653-17666.
- [15] 宋建中. 图像处理智能化的发展趋势[J]. *中国光学*, 2011, 4(5):431-440.
- SONG J ZH. Development trend of image processing intelligence [J]. *Chinese Optics*, 2011, 4(5):431-440. (in Chinese)
- [16] 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 of London Series a-Mathematical and Physical Sciences*, 1959, 253(1274):358-379.
- [17] TOROK P, MUNRO P R T. The use of Gauss-Laguerre vector beams in STED microscopy [J]. *Optics Express*, 2004, 12(15):3605-3617.
- [18] XUE Y, KUANG C F, HAO X, *et al.*. A method for generating a three-dimensional dark spot using a radially polarized beam [J]. *Journal of Optics*, 2011, 13(12):125704.
- [19] 林旭东, 薛陈, 刘欣悦, 等. 自适应光学波前校正器技术发展现状[J]. *中国光学*, 2012, 5(4):337-351.
- LIN X D, XUE CH, LIU X Y, *et al.*. Current status and research development of wave front correctors for adaptive optics [J]. *Chinese Optics*, 2012, 5(4):337-351. (in Chinese)
- [20] 芦永军, 曹召良, 曲艳玲, 等. 液晶波前校正器动态位相响应特性研究[J]. *液晶与显示*, 2012, 27(6):730-735.
- LU Y J, CAO ZH L, QU Y L, *et al.*. Dynamic phase response of liquid crystal wave front corrector [J]. *Chinese Journal of Liquid Crystal and Displays*, 2012, 27(6):730-735. (in Chinese)

作者简介:



魏通达(1986—),男,吉林长春人,博士研究生,2009年于哈尔滨工业大学获得学士学位,主要研究方向为激光共聚焦显微成像、受激辐射损耗等超分辨显微光学成像技术。E-mail: weitd@sibet.ac.cn

导师简介



唐玉国(1967—),男,吉林蛟河人,研究员,博士生导师,1989年,1991年于吉林工业大学分别获得学士、硕士学位,1995年于长春光机所获得博士学位,主要从事医用光学、医用光学工程、光谱学及光谱分析仪器等方面的研究。E-mail:tangyg@sibet.ac.cn

(版权所有 未经许可 不得转载)