

多光束超分辨显微成像系统的设计 与光束重合度优化

张 力^{1,2}, 刘铁诚³, 陈 旭⁴, 余彬彬⁴, 张金仓¹, 王中阳²

(1. 上海大学 物理系, 上海 200444; 2. 中国科学院 上海高等研究院, 上海 201210; 3. 中国科学院 上海光学精密机械研究所, 上海 201800; 4. 上海理工大学 光电信息与计算机工程学院, 上海 200093)

摘要: 为了提升超分辨显微成像系统的分辨能力, 自主设计并搭建了一套多光束超分辨显微成像系统。该成像系统包括有 3 束激光束, 分别为 405 nm 实心激发光束、488 nm 实心激发光束以及 488 nm 空心损耗光束。通过 Labview 程序控制纳米位移台与单光子探测器间的数据采集, 采用 80 nm 金纳米颗粒探针扫描方式对该成像系统进行纳米尺度的光束调制, 完成了多光束显微成像系统的光学调节, 主要包括有多光束的光斑整形、多光束间的光束空间重合度优化以及对应光斑强度分布的仿真模拟。通过已知绿色荧光蛋白样品的测试结果, 说明了该方法对于系统中光束空间重合度的提升作用与效果。

关键词: 多光束超分辨; 金纳米颗粒; 光斑整形; 重合度优化

中图分类号: O 438 文献标志码: A

Design of Multi-beam Super-Resolution Microscopic Imaging System and Optimization of Beam Coincidence Degree

ZHANG Li^{1,2}, LIU Tiecheng³, CHEN Xu⁴, YU Binbin⁴, ZHANG Jinchang¹, WANG Zhongyang²

(1. Department of Physics, University of Shanghai, Shanghai 200444, China; 2. Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China; 3. Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China; 4. School of Optical-electrical and Computer Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: In order to improve the resolution of the super-resolution microscopic imaging system, a multi-beam super-resolution microscopic imaging system was designed and set up. The imaging system includes three laser beams: 405 nm excitation solid beam, 488 nm excitation solid beam, and 488 nm annular beam. Labview was used to control the data collection between the nano-stage and the single photon detector and 80 nm gold nanoparticle probe was used to modulate the laser beam on nanoscale. It mainly includes the light beam shaping of multi-beam, the optimization of the coincidence degree, and simulation of intensity distribution. From the test results of the green fluorescent protein sample, it illustrates by using this method, the spatial coincidence degree of beams can be improved in the system.

收稿日期: 2018-06-12

基金项目: 国家科技部项目 (16YFC0100603); 上海市科委科研项目 (18DZ1100403)

第一作者: 张 力 (1992-), 男, 硕士研究生. 研究方向: 超分辨显微成像、新型超分辨光存储方案. E-mail: zhangli@sari.ac.cn

通信作者: 王中阳 (1969-), 男, 教授. 研究方向: 超分辨光存储技术、纳米结构量子器件以及能量转移转换机制. E-mail: wangzy@sari.ac.cn

Keywords: multi-beam super-resolution; gold nanoparticle; beam shaping; coincidence degree optimization

光学显微成像技术可以进行实时、动态观察，有着对样品损伤较小的优点，在生物学及细胞生物学等方面有着广泛的应用^[1-2]，但由于光学“衍射极限”的存在，导致其成像分辨率限制在了 200 nm 左右，极大地阻碍了其进一步发展。例如，细胞内的一些细胞器、核糖体、线粒体等，无法利用光学显微技术观察其中的精细结构。于是 Hell 等^[3]于 1994 年在共聚焦显微技术的基础上，提出了受激辐射损耗技术 (stimulated emission depletion, STED)，并于 1999 年由 Klar 等^[4]首次完成实验上的验证。该技术利用两束激光调制的方法实现了数十纳米的分辨率，成功地使光学显微成像的分辨率突破了光学“衍射极限”限制。该技术中的两束激光光束，其中一束作为激发光，另外一束则作为损耗光，两束光束经物镜聚焦照射作用于样品表面，聚焦区域在空间上严格重合。而 STED 系统分辨率的限制主要取决于损耗光束强度 I_m 与激发光束强度 I_s 的比值，为了获得较高的系统成像分辨率，要求 $I_m \gg I_s$ ，这使得损耗光束对细胞样品的损害较大，不利于细胞的长时间成像^[5]。因此，科研工作者们为了降低高功率损耗光对细胞样品的“光毒性”作用，提出了 G-STED 技术^[6]，高掺 Tm^{3+} 稀土纳米粒子^[7-8]，以及采用时序控制多束光束和材料开关性质的 RESOLFT 显微技术^[9]等 STED 技术的优化改进方案。其中，RESOLFT 显微技术是基于材料的光开关性质的 STED 技术优化方案，需要通过 3 束激光光束的调制来实现超分辨的效果，而这些多光束超分辨显微技术的核心在于光束的整形以及重合度的调节。

本文通过金纳米颗粒探针扫描的方式，对多光束超分辨显微系统的光束光强分布整形，包括实心光束和损耗光束的光斑整形、以及多波长光束的重合度调节进行分析模拟，并通过绿色荧光蛋白的测试结果来说明重合度提升对系统的优化效果。这一研究对多光束超分辨显微成像系统的优化和成像分辨率的提高具有指导意义。

1 多光束超分辨显微系统的设计与控制

多光束超分辨系统的三维立体光路图如图 1

所示。其中，L1~L7 为透镜；VPP 为涡旋相位板；M 为反射镜；PBS 为偏振分束器；HWP 为半波片；QWP 为四分之一波片；BS 为分束镜；OL 为显微物镜；DC 为二向色镜；APD 为单光子探测器。该系统所选用的激光波长为 405 nm 与 488 nm。首先，半导体激光器发出 488 nm 与 405 nm 的激光分别通过单模光纤进行光斑整形。488 nm 激光经过 L1 进行准直，并通过 HWP(用于调节分束后的激光强度比)与 PBS，分为两束。其中一束经过 L4 与 L5 进行扩束，另一束则经过 L6 与 L7 扩束后，通过 VPP(VPP-1a, RPC Photonics, 美国)调制形成中空光束，在 PBS2 处进行合束。同时，405 nm 激光通过单模光纤整形后经过 L2 准直，经过 HWP1 与 QWP1，与合束后的 488 nm 光束在 DC(ZT442dc, Chroma, 美国)处进行 3 束光束的合束。合束后的 3 束光束经过 HWP2 与 QWP2，再经过浸油物镜 OL(100X, NA1.40, Olympus, 日本)聚焦到样品表面。测试样品发出的荧光信号由物镜进行收集，经过 BS 分光，通过带通滤光片(FF01-531/40, Semrock, 美国)滤除激光后聚焦到光纤中，经 APD(SPCM-AQRH-14-FC, PerkinElmer, 德国)收集。

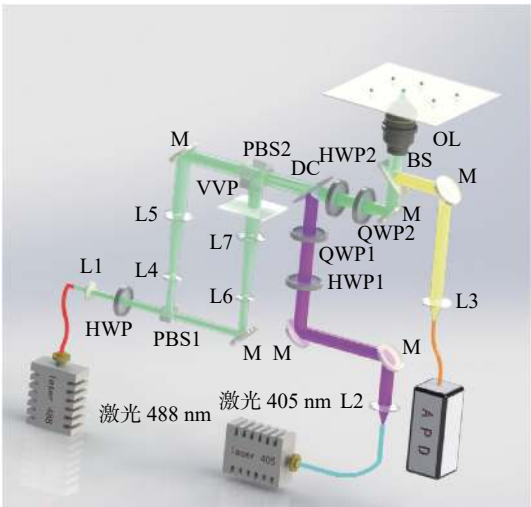


图 1 多光束超分辨显微成像系统光路图
Fig.1 Optical layout of multi-beam super-resolution microscopic imaging system

光学系统的调节采用金纳米颗粒探针调节，单光子探测器收集的信号为激光的信号，因此需将带通滤光片摘除，在光路中并未示意。为实现样品的

连续扫描, 对位移台、数据采集卡、以及单光子探测器进行了级联控制, 如图 2 所示。样品固定在三维纳米位移台 (P-733.3CD, Physik Instrument, 德国) 上, 通过 Labview 编程软件控制数据采集卡 (USB-6343, National Instruments, 美国) 从模拟输出出口 AO 串口输出模拟电压信号, 该电压信号用于控制位移台的扫描移动, 并通过数据采集卡的 PFI 串口收集 APD 的光子数信号, 最后对应位置一一填入相应的光子数数值, 实现点对点的扫描方式, 从而获得信号的强度分布信息。

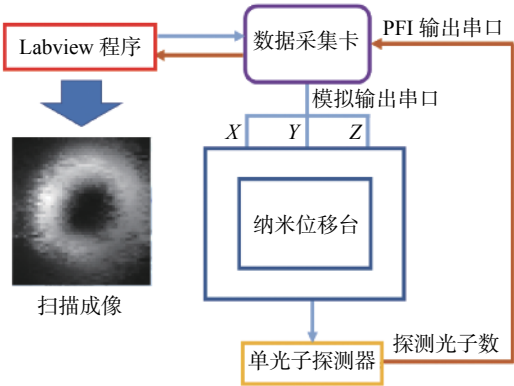


图 2 软件扫描控制流程图

Fig.2 Flow chart of scanning control for software

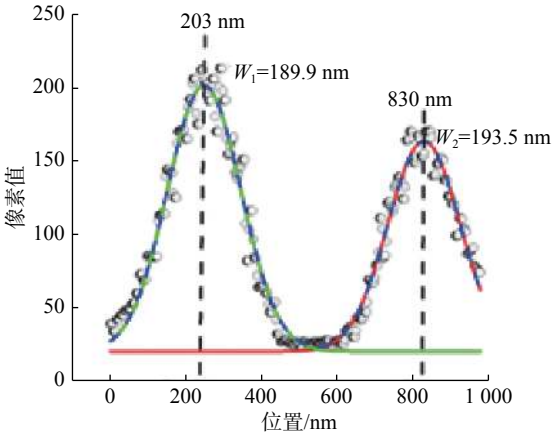
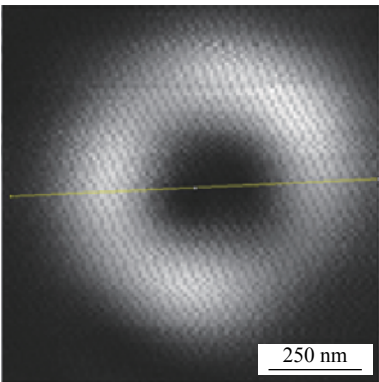
2 多光束系统的调节与实现

根据图 1 设计光路完成系统光路的搭建, 包括有多光束的准直、扩束与重合以及涡旋相位板的调节等。然而由于色差和激光发散度的原因, 经物镜聚焦后的多束光束聚焦区域并未完全重合, 因此需要进一步进行光斑整形及重合度调节。本文采用 80 nm 金纳米颗粒探针 对光斑进行扫描的方式进行

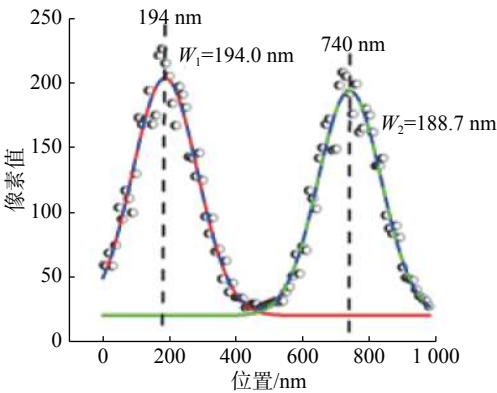
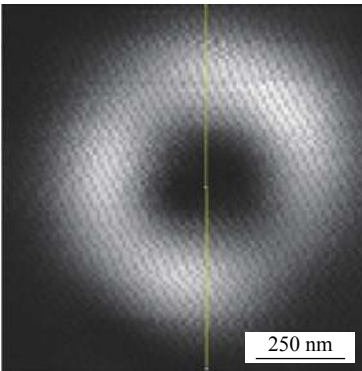
系统优化, 激光照射到金纳米颗粒上会产生激光增强的效果, 收集对应位置的激光光子数, 可以获得该点处的激光强度分布, 因此通过金纳米颗粒扫描便可获得光斑的整体分布情况。

采用金纳米颗粒对系统进行调节主要分为光斑形状的调节和多束光束的重合度调节。在调节过程中先调节好空心损耗光束, 再将实心光束以损耗光束为标准进行调节。

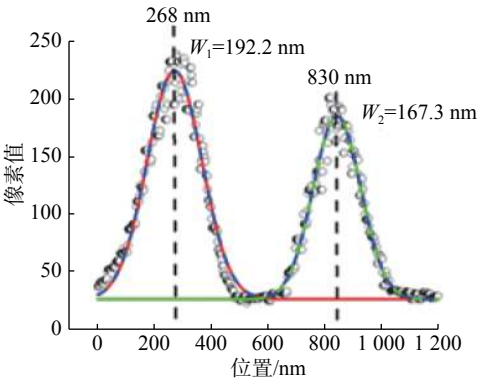
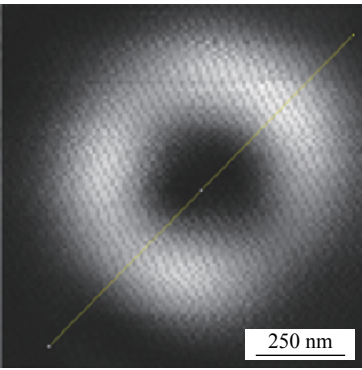
空心损耗光束的整形主要包括有两方面的问题: 一是空心光束的形状, 包括光斑是否是圆形, 损耗光束的中心强度是否为零; 二是环形光斑的强度分布是否均匀。对于系统的成像分辨率而言, 以上的标准中最重要的是损耗光的中心强度是否为零, 其主要是通过调节进入物镜光束的偏振方向以及涡旋相位板的位置。首先, 通过调节涡旋相位板 XY 方向的位置, 使激光光斑上出现一个肉眼可见的“黑心”, 并将黑心调节到光斑中心; 然后, 通过微调四分之一波片 (一般先将光束调成左旋圆偏光^[10-11]进入物镜) 来调节光斑的强度分布, 使其强度分布均匀; 最后, 对获得的空心光斑强度分布进行分析, 通过软件拟合检测空心光束中心强度是否为零, 即可完成损耗光束的整形调节。本系统空心光束整形调节结果如图 3 所示, 图 3(a)~(d) 分别为损耗光束强度沿着 X 方向、Y 方向、一三和二四象限对角线方向的分布。对强度分布分别进行双峰拟合, 可得出双峰 W_1 , W_2 的间距分别为 627, 546, 562, 521 nm, 对应的高斯峰的半峰全宽 (full width at half maxima, FWHM) 在 165 ~ 195 nm 之间, 损耗光束中心强度接近于零, 由此可以看出光束的强度沿各方向分布十分均匀。以此作为损耗光调节的标准, 根据调节获得的强度分布, 进行拉盖尔-高斯拟合, 从而获得在焦面处的损耗光束的强



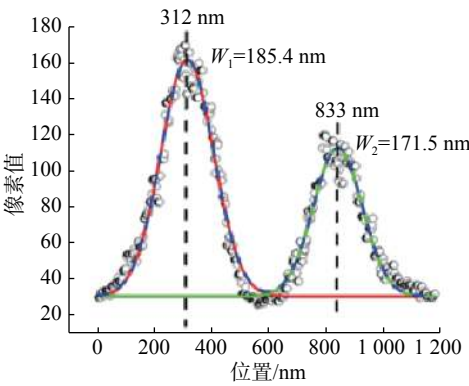
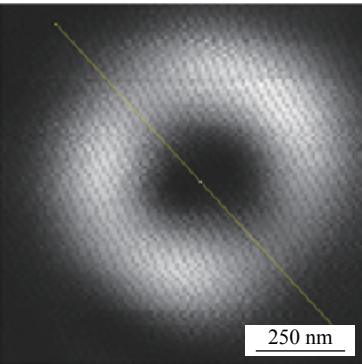
(a) X 方向光强分布



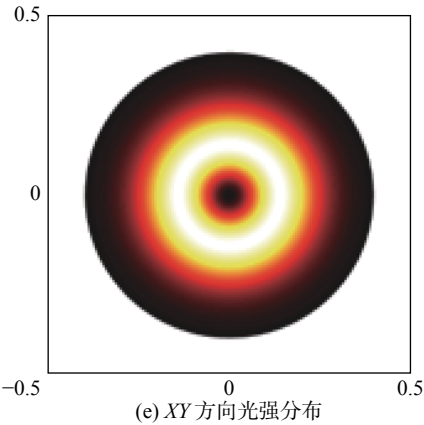
(b) Y方向光强分布



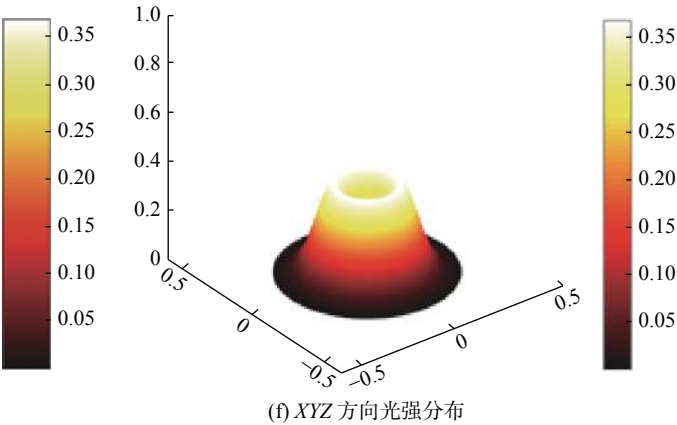
(c) 一、三象限光强分布



(d) 二、四象限光强分布



(e) XY方向光强分布



(f) XYZ方向光强分布

图3 空心损耗光束的分布和拉盖尔-高斯涡旋光束的强度拟合

Fig.3 Distribution of STED beam and intensity fitting of Laguerre-Gauss vortex beam

度分布结果, 并以此损耗光束为基准进行另两束实心光束的整形和重合度调节。

实心光束的形状调节与空心光束相类似, 以 488 nm 空心光束为基准, 调节 488 nm 实心光束进入物镜的角度, 使得光束沿物镜光轴进入物镜即可得到 488 nm 实心光束焦面处强度分布。对于 405 nm 实心光束, 由于相位存在差异, 通过调节 QWP1 和 HWP1 进行偏振补偿, 优化后的 405 nm 实心光束的强度分布以及光斑形状如图 4(a)所示。

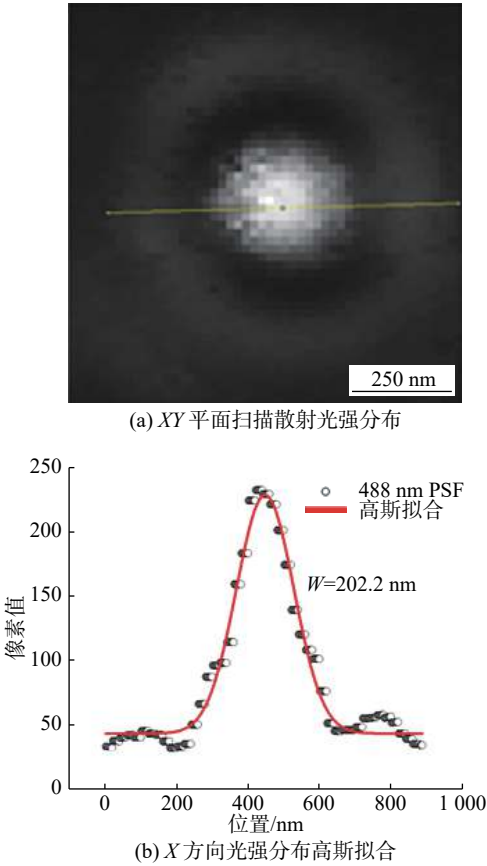


图 4 405 nm 光束空间扫描强度分布

Fig. 4 Spatial scanning intensity distribution of 405 nm laser beam

对 405 nm 实心光束 X 方向的光强分布进行高斯拟合, 得到其在焦面处的光斑强度分布, 如图 4(b)所示, 其半高全宽值 W 为 202.2 nm。然而图 4(a)与图 3(a)所得光斑分布图是在不同的聚焦面上获得的, 即在 Z 方向上存在差异, 这是由于 3 束光束的发散度以及色差造成的, 因此对光束聚焦处的强度分布进行 XZ 方向扫描, 扫描结果如图 4(c)所示。可以看出对应的焦深约为 1 μm (扫描出有 2 个光斑是因为扫描范围为 9 μm , 扫描范围较大, 同时扫描了 2 个金纳米颗粒)。

根据实际测量的光束焦面处的强度分布以及焦深情况, 对其进行模拟仿真, 即可获得实心光束与空心损耗光束在空间上的强度分布情况, 模拟结果如图 5 所示。

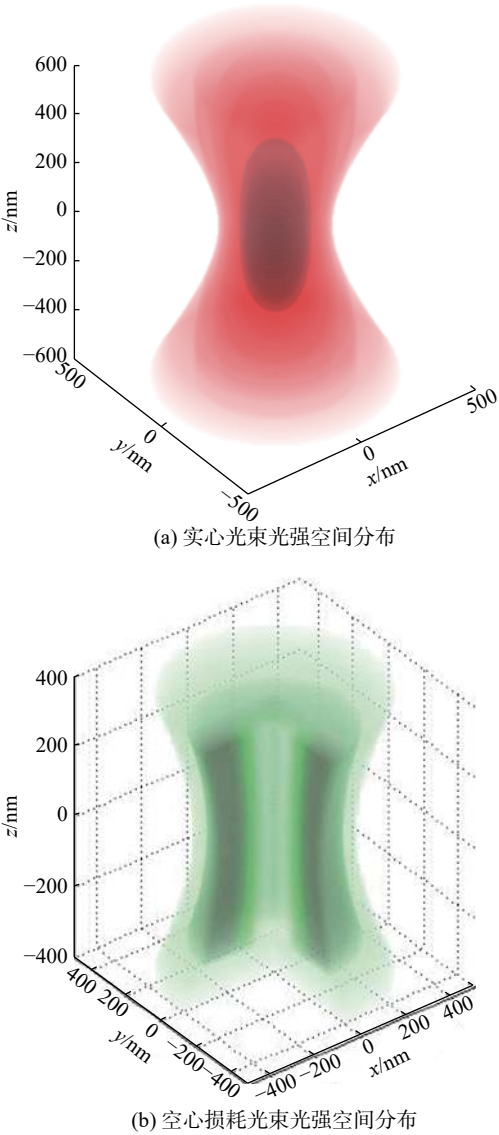


图 5 聚焦光束的空间分布拟合

Fig.5 Spatial distribution fitting of the focused beam

由于高倍物镜对不同波长激光聚焦时色差的影响和不同光束发散度的差异,使得3束光束的聚焦区域在Z方向存在较大的差别,因此,对于多光束的重合度的调节首先要使得聚焦区域在Z方向重合。本文采用的方案是以中空损耗光束为基准,将另两束实心光束调节与其重合。首先,通过调节透镜L5与L2的前后位置,用于调节光束发散度,使3束光束在Z方向上重合,保证在同一焦面处能分别扫描出3束光束的激光强度分布;其次,调节激光入射物镜的角度,用于调节焦面处光束的XY坐标位置,使其在XY焦面处光束的强度分布可以相互叠加重合。

405 nm 实心光束、488 nm 中空损耗光束以及 488 nm 实心光束进行扫描获得的强度分布信

息如图 6(a)~(c)所示,扫描范围 1 μm , 图像获得过程中应先在较大扫描范围内进行扫描,将 3 束光束调节重合, 再在 1 μm 范围内进行细调。图 6(d)为 3 束光束强度分布叠加后的图片,并对 3 束光束的强度分布进行高斯拟合即可得到图 6(e)中的强度分布。由图 6(e)可以看出, 405 nm 实心光束在焦面处的 W 比 488 nm 实心光束要大一些,这是由于 405 nm 光束为了与 488 nm 光束焦面在 Z 方向重合,调节了发散度,所以并不是聚焦最好的情况,从而造成其光束在焦面处的光斑尺寸较大。图 6(f)则是根据图 6(e)的光束强度分布信息进行的仿真模拟,由此可以直观地看出 3 束光束在焦面处的强度重合关系。

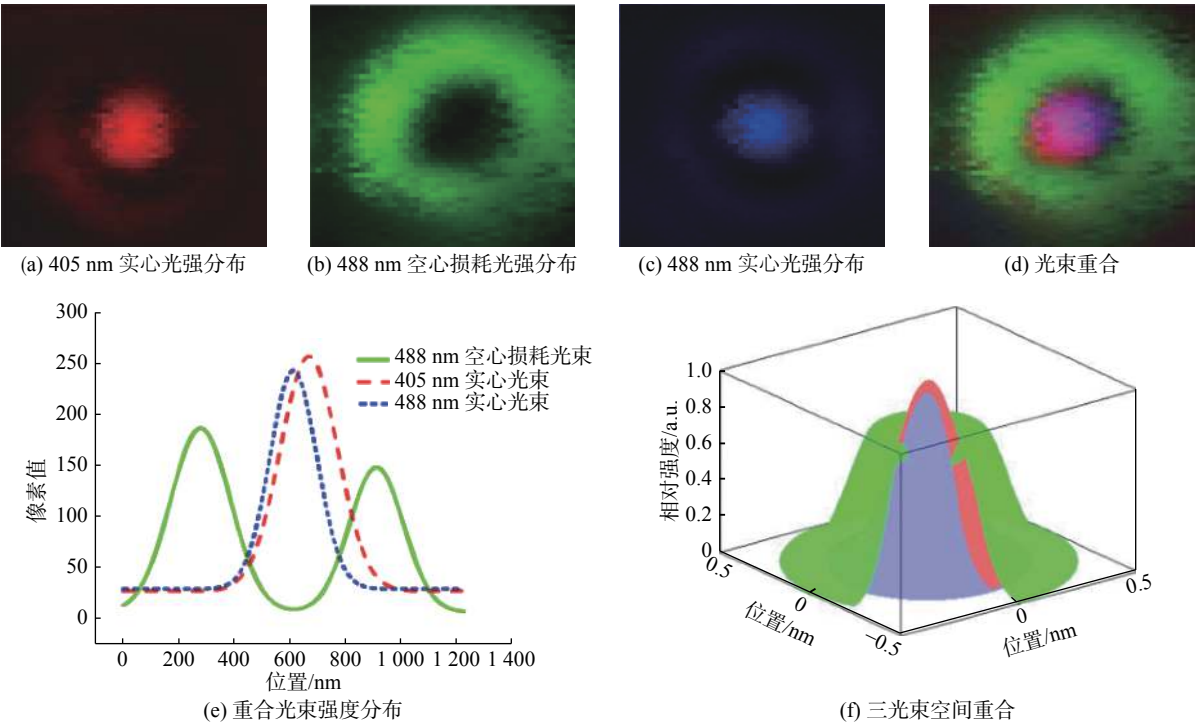


图 6 单光束及多光束强度分布与仿真

Fig.6 Intensity distribution and simulation of single beam and multi-beam

3 多光束系统的测试与分析

为验证系统优化后的重合度提升效果,采用绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)样品对重合度的提升进行测试表征。绿色荧光蛋白具有荧光开关性质,即当用 488 nm 激光照射 GFP 后,此时 GFP 处于荧光“off-state”,再用 488 nm 激光作为激发光照射 GFP,产生的荧光强度较

弱;而当用 405 nm 激光照射 GFP, GFP 处于荧光“on-state”,仍用 488 nm 激光作为激发光照射 GFP,则此时产生的荧光强度较强。因此,通过 2 个声光调制器(acousto-optical modulator, AOM)控制 488 nm 实心光束与 405 nm 实心光束的开关,通过 Labview 软件编写时序控制程序,分别控制光束的照射时间,从而对材料的光开关特性进行测试。

上述调节过程只是完成了系统的初步调节, 仅进行了光斑形状调节, 未进行系统光束的重合度优化。采用 GFP 样品进行测试, 488 nm 实心光束持续照射, 405 nm 实心光束采用脉冲方式照射, 488 nm 激光功率密度为 2.4 kW/cm^2 , 405 nm 激光功率密度为 0.56 kW/cm^2 , 405 nm 激光照射时间为 300 ms, 间隔时间 2 s, 曝光时间为 10 ms, 得到光开关对比度仅为 $50\,000 : 10\,000 = 5 : 1$; 然而在完成重合度调节后, 如图 7 所示, 重复上述实验, 488 nm 激光功率密度为 0.24 kW/cm^2 , 405 nm 激光功率密度为 0.056 kW/cm^2 , 405 nm 激光照射时间为 300 ms, 间隔时间 2 s, 曝光时间为 10 ms, 得到光开关对比度为 $350\,000 : 9\,000 \approx 39 : 1$ 。由此可以看出, 在优化后的系统上测试 GFP, 虽然减低了激光功率, 但是光开关对比度更高, 说明蛋白的转换效率得到了提高, 进一步也说明了系统重合度的优化结果符合预期。

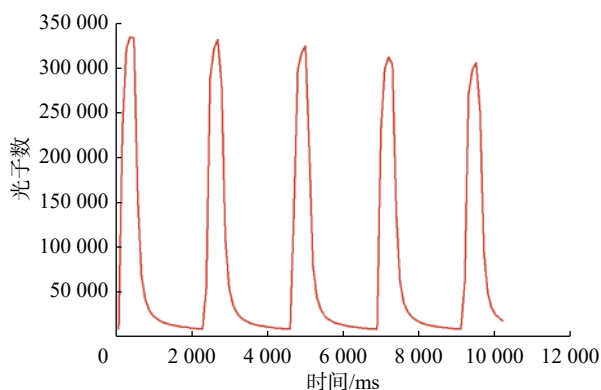


图 7 绿色荧光蛋白的光开关测试结果

Fig.7 Test results of GFP optical switch

4 结 论

随着生物医学的发展, 对成像技术的要求越来越高, STED 技术以及基于该技术上的改进方案有着广泛的应用前景。目前基于 STED 技术的改进方案的核心还在于中空损耗光束、实心光束的整形以及多光束的重合度调节。本文利用 80 nm 金纳米颗粒探针首先对多光束的光斑形状进行调节, 包括中空损耗光束、实心光束的光斑形状和强度分布调节; 然后通过调节光束发散度以及光束的入射角度, 完成多光束的重合度调节; 最后对调节后的光束强度分布进行仿真模拟, 通过焦面处的强度分布信息可以直观地分析光束的重合度关系。此外, 对优化的系统进行了绿色荧光蛋

白的开关性质测试, 开关对比度达到 $39 : 1$, 说明该调解方法有效地提升了系统光束的重合度。该研究对进一步优化 STED 系统、实现多光束超分辨系统, 以及提升成像分辨率具有一定的指导及经验性意义。并通过使用声光调制器, 对多束光束的开关及照射时间进行控制, 使得该套系统在超分辨光存储以及超分辨光刻方面有着较大的应用价值。

参考文献:

- [1] HEIN B, WILLIG K I, HELL S W. Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(38): 14271–14276.
- [2] MUELLER V, RINGEMANN C, HONIGMANN A, et al. STED nanoscopy reveals molecular details of cholesterol- and cytoskeleton-modulated lipid interactions in living cells[J]. *Biophysical Journal*, 2011, 101(7): 1651–1660.
- [3] 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.
- [4] KLAR T A, HELL S W. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy[J]. *Optics Letters*, 1999, 24(14): 954–956.
- [5] GROTHJOHANN T, TESTA I, LEUTENEGGER M, et al. Diffraction-unlimited all-optical imaging and writing with a photochromic GFP[J]. *Nature*, 2011, 478(7368): 204–208.
- [6] VICIDOMINI G, MONERON G, HAN K Y, et al. Sharper low-power STED nanoscopy by time gating[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(7): 571–573.
- [7] LIU Y J, LU Y Q, YANG X S, et al. Amplified stimulated emission in upconversion nanoparticles for super-resolution nanoscopy[J]. *Nature*, 2017, 543(7644): 229–233.
- [8] YANG X S, XIE H, ALONAS E, et al. Mirror-enhanced super-resolution microscopy[J]. *Light: Science & Applications*, 2016, 5(6): e16134.
- [9] GROTHJOHANN T, TESTA I, REUSS M, et al. rsEGFP2 enables fast RESOLFT nanoscopy of living cells[J]. *eLife*, 2012, 1: e00248.
- [10] 蔡亚楠, 汪召军, 梁言生, 等. 受激发射损耗显微中空空心损耗光的光强分布优化研究[J]. *光学学报*, 2017, 37(3): 86–94.
- [11] YOUNGWORTH K S, BROWN T G. Focusing of high numerical aperture cylindrical-vector beams[J]. *Optics Express*, 2000, 7(2): 77–87.