

双光子荧光与相干反斯托克斯拉曼散射显微成像技术的实验研究

侯国辉 罗腾 陈秉灵 刘杰 林子扬 陈丹妮 屈军乐

Experimental study on two-photon fluorescence and coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy

Hou Guo-Hui Luo Teng Chen Bing-Ling Liu Jie Lin Zi-Yang Chen Dan-Ni Qu Jun-Le

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 66, 104204 (2017) DOI: 10.7498/aps.66.104204

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.66.104204>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2017/V66/I10>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

相干反斯托克斯拉曼散射显微成像技术研究

Research on coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy

物理学报.2016, 65(6): 064204 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.064204>

拉曼散射与自陡峭效应对皮秒孤子传输特性的影响

Influence of Raman scattering effect and self-steepening effect on the propagation characteristic of picosecond solitons

物理学报.2015, 64(5): 054207 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.054207>

氘含量对 DKDP 晶体横向受激拉曼散射增益系数的影响

Influence of deuteration degree on the transverse stimulated Raman scattering gain coefficient of DKDP crystal

物理学报.2015, 64(3): 034213 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.034213>

低双折射光纤中拉曼增益对光偏振态的影响

Effect of Raman gain on the state of polarization evolution in a low-birefringence fiber

物理学报.2015, 64(3): 034212 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.034212>

拉曼增益对双折射光纤中孤子传输特性的影响

Effect of Raman gain on the characteristic of soliton transmission in birefringence optical fiber

物理学报.2014, 63(9): 094208 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.63.094208>

双光子荧光与相干反斯托克斯拉曼散射显微成像技术的实验研究*

侯国辉 罗腾 陈秉灵 刘杰 林子扬 陈丹妮[†] 屈军乐[‡]

(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, 深圳 518060)

(2017年1月12日收到; 2017年3月13日收到修改稿)

双光子荧光与相干反斯托克斯拉曼散射同属于三阶非线性效应, 二者之间的差异与联系是一个值得研究的问题. 本文基于自行搭建的超连续谱近红外宽带相干反斯托克斯拉曼散射显微成像系统进行光谱成像, 同时通过理论与实验对比分析了双光子荧光与相干反斯托克斯拉曼散射图像存在差异的原因. 结果表明, 具有亚微米以上横向分辨率的相干反斯托克斯拉曼散射成像系统, 可以使用较大尺寸的荧光珠进行双光子荧光成像, 通过解卷积得到双光子荧光成像的系统分辨率, 并将它近似等效于相干反斯托克斯拉曼散射成像系统的当下分辨率. 如果需要得到相干反斯托克斯拉曼散射成像系准确的分辨率结果, 就必须使用尺寸比相干反斯托克斯拉曼散射成像系统实际分辨率小的球形样品进行实验测量.

关键词: 相干反斯托克斯拉曼散射, 拉曼光谱, 荧光, 非线性光学

PACS: 42.65.Dr, 36.20.Ng, 32.50.+d, 42.65.-k

DOI: 10.7498/aps.66.104204

1 引言

基于分子自身的特性, 无需引入外源探针进行标记的相干反斯托克斯拉曼散射 (coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS) 显微成像技术^[1]属于三阶非线性效应, 所以具有较高的空间分辨率. 由于成像的过程中引入了斯托克斯光的缘故, 相比于自发放拉曼散射, 信号增强了 10^6 量级^[2], 但同时也引入了非共振背景. 为了更加容易理解该技术, 我们从时间分辨的角度把CARS过程分解成两个作用阶段: 第一阶段, 频率不同的两个光分别为 (ω_P) 和 (ω_S) , 当它们之间的差值 $\omega_P - \omega_S$ 正好与分子的拉曼振动能级相匹配, 分子就会跃迁至第一振动激发态, 与此同时, 抽运光由于与分子发生非完全弹性碰撞失去一部分能量而变成新增的斯托克斯光, 这个阶段对应的就是受激拉曼散射

(stimulated Raman scattering, SRS), 对于这个阶段, 如果应用时关心的是抽运光的损耗, 那么它就是受激拉曼损耗^[3] (stimulated Raman loss, SRL), 如果关心的是新生成的斯托克斯光的增量, 那么它就是受激拉曼增益^[4] (stimulated Raman gain, SRG), 此阶段自动满足动量守恒; 第二阶段, 对于第一阶段处于振动激发态的分子, 吸收一个频率为 (ω'_P) 的光子, 跃迁至更高的虚能态, 由于不稳定而返回基态, 同时释放一个更高频率 ω_{AS} 的光子 $\omega_{AS} = \omega_P - \omega_S + \omega'_P$, 此过程满足能量守恒与动量守恒. 其中, 动量守恒也就是相位匹配条件, 两个阶段合起来就是CARS过程. 双光子激发荧光^[5,6] (two-photon excited fluorescence, TPEF) 也是一个三阶非线性过程, 因为双光子荧光的信号强度与双光子吸收截面成正比, 双光子吸收截面与三阶非线性极化率的虚部成正比. 而采用近红外两

* 国家重大科学仪器设备开发专项(批准号: 2012YQ15009203)、国家自然科学基金(批准号: 61235012)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2015CB352005, 2012CB825802)资助的课题.

[†] 通信作者. E-mail: danny@szu.edu.cn

[‡] 通信作者. E-mail: jlqu@szu.edu.cn

个不同中心频率的激光脉冲分别作为抽运光 (ω_P) 和斯托克斯光 (ω_S), 如果满足分子中的电子同时吸收两个 (ω_P) 或两个 (ω_S) 的光子, 或者 $\omega_P + \omega_S$ 的能量, 从基态能级跃迁至电子上能级, 然后经过振动弛豫达到第一单线激发态的最低振动能级时, 处于第一单线激发态最低振动能级的电子可通过自发辐射跃迁回到基态的过程. 它们的能级表述过程如图 1 所示. 其中, ge 表示基态电子能级, gv 表示基态第一振动激发态能级, fe 表示第一电子能级, fev 表示第一电子激发态上的振动能级, virtual 表示引入的虚能级.

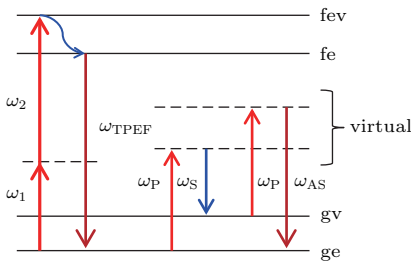


图 1 TPEF 与 CARS 能级原理图

Fig. 1. The Energy diagram for TPEF and CARS.

同是三阶非线性效应, TPEF 和 CARS 的差异是什么? 本文通过宽带近红外光源进行成像实验, 将这两个不同的过程合二为一进行对比. 同时, 将与信号有关的三阶非线性极化率 $\chi^{(3)}$ 分解成两个部分, 即分子中的电子同时吸收两个光子的能量达到电子上能级然后发射荧光的 TPEF 部分, 以及拉曼共振跃迁与形成 CARS 信号有关的部分 (包含共振信号与非共振信号部分). 而非共振部分通常被称为非共振背景, 在一定程度上会淹没共振信号, 所以形成了几种抑制的方法 [7-10]. 而非共振背景也就是没有被充分利用的干扰项, 一旦被利用, 它就是信号. 该干扰项是非线性四波混频过程特有的产物. 而 CARS 效应的共振部分本质上就是拉曼特征峰在 CARS 信号产生的过程中引入了斯托克斯光的缘故, 使其比自发拉曼散射的信号增强了 5 个数量级, 同时由于过程中使用的是激光光源, 所以方向性比较好, 这就是相干共振增强的内在因素. 为了同时清晰地呈现这两个作用过程, 我们利用实验室自己搭建的近红外宽带 CARS 成像系统对实验室现有的聚苯乙烯荧光微球 (激发光谱峰 488 nm 与发射光谱峰 520 nm) 进行光谱成像. 因为形成的信号是一个宽带光谱, 所以采用前向点扫描的方式

通过光谱仪同时记录宽带 CARS 信号与双光子荧光信号, 然后再根据感兴趣的波长或波数进行图像重构, 便可以获得样品的荧光分布图像或者感兴趣的化学键的分布图像. 结果表明, 荧光材料同时吸收两个频率 (可以是同频, 也可以是不同频率) 的光子跃迁至更高的电子激发态能级, 然后经过自发辐射跃迁回到基态并发射荧光信号; 同时, 处于拉曼振动上能级的分子, 在满足相位匹配条件的探测光诱导下回到基态能级, 产生 CARS 信号. 本文通过实验给出了在 0.75 NA 的物镜, 对聚苯乙烯荧光珠样品尺寸大于艾里斑尺寸的情况下, 实际测量的结果显示 CARS 图像偏小, 而双光子荧光图像的尺寸比较接近实际尺寸, 得到系统双光子荧光成像模式下的分辨率 [11]. 产生这种结果的原因正是由于相位匹配条件的影响, 导致同是三阶非线性过程, 成像结果却存在一定的差异. 这意味着对于 CARS 系统的分辨率测量, 不能用尺寸大于系统点扩展函数的样品. 同时, 此结果也告诉我们, 对于实际的物理过程, 一旦发生就会有相应的信号产生, 这就是 CARS 过程中非共振背景存在的原因, 它的存在是 CARS 过程中引入了斯托克斯光的缘故.

2 理 论

在平面波近似的条件下, 在远离单光子电子共振的前提下, 抽运光与斯托克斯光光场的偏振平行通过微扰论 [12] 获得 $\chi_{1111}^{(3)}$,

$$\chi_{1111}^{(3)} = \chi_{NR} + \frac{A_T}{\omega_T - 2\omega_P - i\Gamma_T} + \frac{A_T}{\omega_T - 2\omega_S - i\Gamma_T} + \frac{A_T}{\omega_T - (\omega_P + \omega_S) - i\Gamma_T} + \sum_R \left[\frac{A_R}{\omega_R - (\omega_P - \omega_S) - i\Gamma_R} \right], \quad (1)$$

其中, χ_{NR} 表示非共振电子贡献, T 代表双光子和频吸收电子能级跃迁, R 表示分子拉曼振动能级跃迁, A 表示振幅强度, ω 表示光子频率, Γ 表示弛豫率.

双光子荧光的吸收截面正比于三阶非线性极化率的虚部, 于是有信号强度 I_f ,

$$I_f \propto \text{Im} \left[\frac{A_T}{\omega_T - 2\omega_P - i\Gamma_T} + \frac{A_T}{\omega_T - 2\omega_S - i\Gamma_T} \right]$$

$$+ \frac{A_T}{\omega_T - (\omega_P + \omega_S) - i\Gamma_T}], \quad (2)$$

对于 CARS 过程而言, 有

$$I_{as} \propto \left| \chi_{NR} + \sum_R \left[\frac{A_T}{\omega_R - (\omega_P - \omega_S) - i\Gamma_R} \right] \right|^2 \times \sin^2 \left(\frac{\Delta k l}{2} \right). \quad (3)$$

进一步, 对于频率差 $\omega_P - \omega_S$ 不处于拉曼共振峰位置的信号, 表达式退化为

$$I_{NR} \propto |\chi_{NR}|^2 \sin^2 \left(\frac{\Delta k l}{2} \right). \quad (4)$$

这就是远离拉曼共振峰位置的非共振信号, 其他文献都将其称为非共振背景, 它具有与 CARS 信号相同的特性: 1) 满足相位匹配条件; 2) 方向性. 在前向紧聚焦 CARS 成像的过程中, 弱信号具有不可忽略的影响. 因为分子共振部分的振动退相时间与非共振部分信号弛豫时间相当这一情况, 在宽带 CARS 生物显微成像进行组分定量时是难以避免的问题.

上述表达式给出了双光子荧光信号与四波混频 CARS 信号的差异, 主要凸显在相位匹配条件 Δk 上. 如果将两个信号产生的方式定义为二次发射, 那么对于双光子荧光而言, 就是自发辐射. 自发辐射具有全立体角空间等概率发射的特性; 而四波混频发射的信号可以称之为相干诱导发射, 需要满足相位匹配条件, 而相位匹配条件的实质就是动量守恒, 也就是方向性.

3 实验系统

我们的成像实验系统如图 2 所示. 锁模钛宝石激光振荡级的重要参数包括: 脉冲宽度 120 fs, 中心波长 782 nm, 重复频率 76 MHz, 平均输出功率 1.3 W. 输出的激光脉冲先经过光隔离器之后由分光平板分成两路, 一路送入光子晶体光纤产生超连续谱 (800—1200 nm), 另一路经过一维电动位移台 (其作用是使两路分开的脉冲在样品位置时间上重合), 在位移台之后, 可以选择性地插入 1 nm 的窄带通滤光片, 用于双脉冲成像的抽运与探测. 最后, 两路光在合束镜的反射表面合为一束送入前向紧聚焦光谱显微成像装置. 因为是前向宽带光谱测量, 所以我们采用三维纳米位移台进行样品扫描成像, 其重复精度小于 2 nm.

其中, 一维电动位移平台的时间延迟的调节精度达到 6.7 fs, 产生的前向光谱信号由 QE65 pro (charge coupled device, CCD) 光谱仪 (光谱响应范围 200—1000 nm) 探测接收. 相比于激光中心波长 782 nm 与 800—1200 nm 的超连续谱而言, 产生的光谱信号是蓝移的, 也就是说信号的波长小于 782 nm. 所以, 在信号收集时, 先将光谱仪用商家已经生产好的截止波长为 790 nm 的短波通滤光倾斜一定的角度来滤除超连续谱与激光的影响. 其中的扩束器是将光束直径扩大, 使准平行的光束按照一定的比例填充物镜的后光瞳, 或者充满物镜的后光瞳, 当充满时说明物镜的数值孔径 (numerical aperture, NA) 得到了充分利用, 也是成像分辨率最佳的时候.

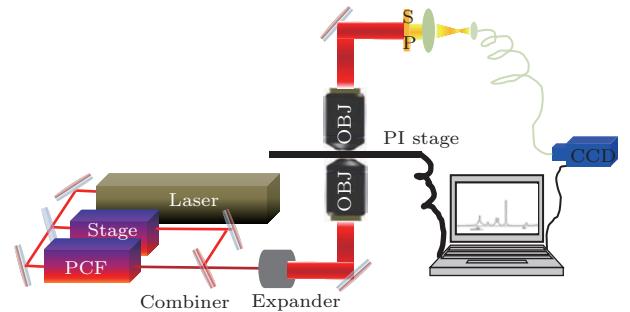


图 2 超连续 CARS 和 TPEF 成像光路示意图
Fig. 2. Two-pulse super-continuum CARS and TPEF microscopy setup.

4 结果与讨论

由于我们主要采用的是 0.75 NA 物镜 (干镜), 通过前向紧聚焦方式进光谱成像, 而物镜的工作距离都是 0.51 mm, 所以样品都是夹在两片 0.17 mm 厚的盖玻片之间, 采用的样品主要为干样品.

在满足系统合轴、齐焦、满物镜后光瞳的前提下, 利用实验室现有的 1.01 μm 的干聚苯乙烯荧光珠 (激发与发射峰对应 488 nm 与 520 nm) 进行光谱成像, 成像过程中样品处的激光约 12 mW, 超连续谱的功率约 4 mW, 光谱仪的积分时间为 50 ms. 然后, 根据聚苯乙烯材料的明显宽带, CARS 在拉曼峰位^[13] 1000, 2870 与 3040 cm^{-1} 分别进行图像重构, 对应图 3 (a)—(c). 同时, 根据荧光发射波段 500—600 nm 也就是图 3 (e) 中的 3878—7212 cm^{-1} 进行图像重构, 得到的结果如图 3 (d) 所示. 图 3 (g) 和图 3 (h) 是以波长与波数为横轴信号对应的光谱曲线.

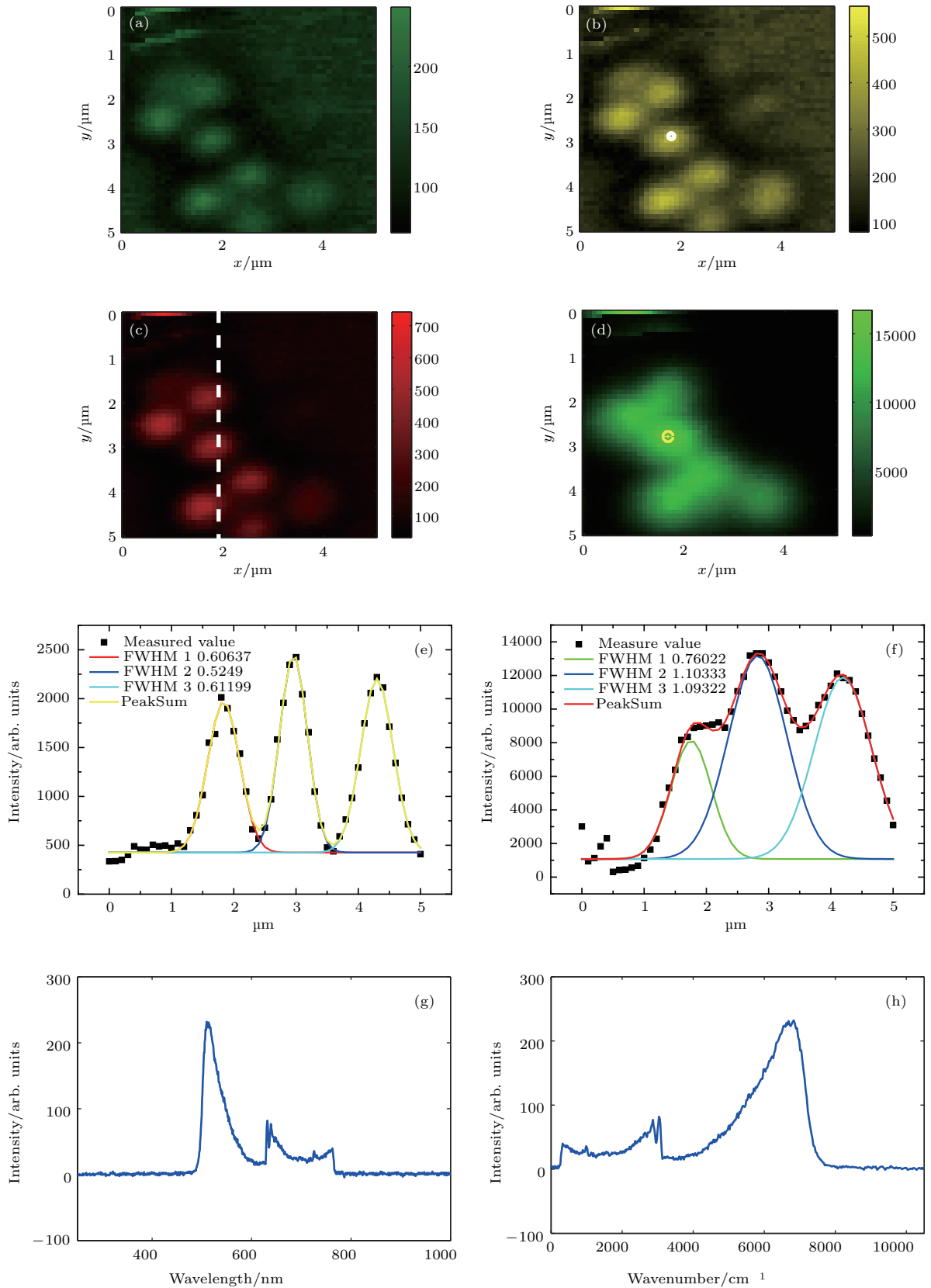


图3 (网刊彩色) 不同波数重建的CARS图像、双光子荧光图像及图(d)中的黄点处对应的光谱
 Fig. 3. (color online) CARS image reconstruct at different wavenumber, the TPEF image and the spectrum at yellow point in (d): (a) CARS image at 1000 cm^{-1} ; (b) CARS image at 2870 cm^{-1} ; (c) CARS image at 3040 cm^{-1} ; (d) florescence of $1.01\text{ }\mu\text{m}$ PS beads; (e) CARS FWHM across the white line; (f) TPEF FWHM across the white line; (g), (h) CARS and TPEF spectral with Wavelength and Wavenumber at the yellow point in (d).

图 3(e) 与图 3(f) 对应的是穿过白色线位置的路径, 白色的曲线依次经过上中下三个珠子. 获得对应路径上的测量强度值分布后, 采用 origin 曲线拟合工具选择高斯函数进行多峰曲线拟合. 从图 3(c) 可以看到, 白色直线正好穿过中间那颗珠子的中轴线, 并非会通过上下两颗珠子的中轴线, 这也是在双光子荧光成像时得到的半高宽为 $0.76022 \mu\text{m}$ 的原因. 选择中间的珠子原因是从 CARS 重构的图像来看, 周围珠子的信号对其影响比较小, 轮廓比较清晰. 因此, 选择对中间珠子的中心直径测量的拟合半高宽 (full width at half maximum, FWHM), 图 3(e) 表示 CARS 信号的半高宽, 中间的珠子拟合结果是 $0.5249 \mu\text{m}$. 图 3(f) 表示双光子荧光对中间珠子测量值进行拟合的结果为 $1.1033 \mu\text{m}$. 由卷积定理: $d^2 + PSF^2 = FWHM^2$, 其中, d 是样品直径, PSF 是系统的点扩展函数 (point spread function) 的横向半高宽, 也就是系统的横向分辨率, 对于双光子荧光解卷积后的分辨率为 $0.4404 \mu\text{m}$. 但是, 对于 CARS 而言, 当分子直径大于点扩展函数时, 这种去卷积的方式就会失灵. 因为此时珠子的直径是 $1.01 \mu\text{m}$, 实际测量的 FWHM 值是 $0.5249 \mu\text{m}$. 从实际的测量结果来看, CARS 测量的结果与双光子荧光的比值是 0.476 , 其测量结果与实际珠子的直径的比值是 0.520 . 此差异是 CARS 过程的相位匹配条件所造成的. 所以, 对于 CARS 过程, 如果想要得到准确的系统分辨率, 就需要采用尺寸比系统实际分辨率小的样品进行测量.

图 3(a) 与图 3(b) 中, 右上角存在明显的非共

振背景, 而此背景是玻璃的信号, 而玻璃在常温常压下不具有特征拉曼峰, 或者说不存在明显的拉曼峰, 或者说即使有也与非共振背景相当. 从图中可以得到该非共振背景的三个特殊性质: 1) 方向性, 也就是相位匹配特性; 2) 频差特性, 如果采用单频四波混频, 可以清晰地看到它就是位于本该是拉曼共振峰的反斯托克斯信号位置, 它隶属于非线性四波混频 CARS 过程, 却又高于它, 因为即使没有拉曼共振峰, 它仍会存在, 它是受激拉曼散射过程特有的现象, 因为挡掉任意一个照射样品的光信号都会消失.

同时, 在成像的过程中, 我们分别挡掉激光于宽带近红外超连续谱, 避免它们同时照射到样品, 此时宽带 CARS 信号消失, 只剩余 TPEF 信号, 其中激光单独照射样品产生双光子荧光信号, 说明发生的是相同频率双光子和频激发荧光样品, 两路光同时照射样品产生的双光子信号大于各自单独激发的荧光信号总和, 说明同时也发生了不同频率双光子和频激发荧光样品.

然后, 我们采用 280 nm 干的聚苯乙烯微球进行 CARS 成像, 每一个像素的积分时间 50 ms 一次, 样品处的总功率 9.5 mW , 超连续谱在样品处的功率是 2 mW . 图 4 是测量值进行高斯曲线拟合得到的半高宽 507.03 nm , 通过卷积定理理解卷积之后的实际分辨率是 422.70 nm . 其中, 聚苯乙烯珠周围的圆环之外是玻璃的非共振信号, 从色度 bar 来看, 蓝色表示信号的强弱. 此结果是由于聚苯乙烯珠与盖玻片的折射率存在一定的差异所造成的, 也就是相位失配所造成的.

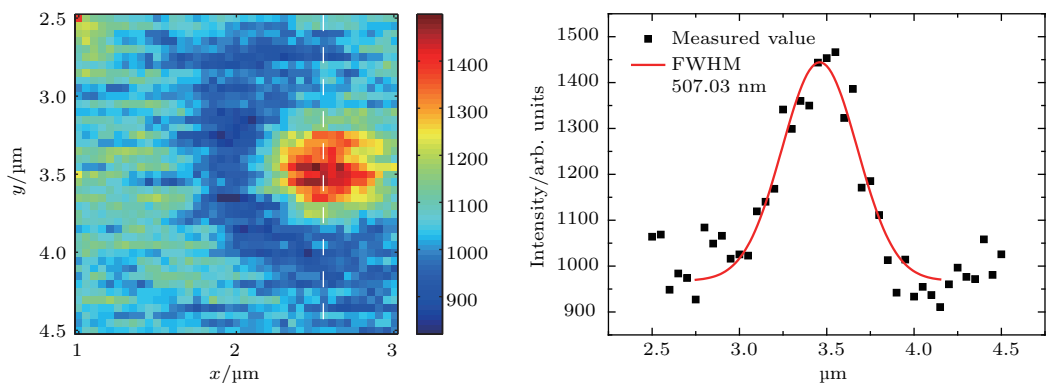


图 4 (网刊彩色) 280 nm 聚苯乙烯珠图像与测量值的半高宽拟合值 507.03 nm

Fig. 4. (color online) The CARS imaging of 280 nm polystyrene bead and its measured FWHM is 507.03 nm.

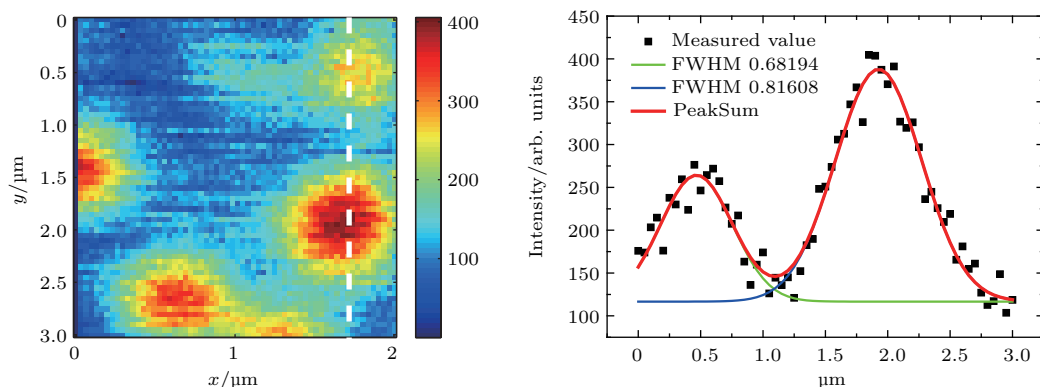


图5 (网刊彩色) 190 nm 荧光珠双光子荧光图像与所测量的半高宽值 816.08 nm

Fig. 5. (color online) The TPEF imaging of 190 nm fluorescent PS beads and its measured FWHM is 816.08 nm along the white line.

经过解卷积之后的CARS图像分辨率422.70 nm, 与通过解卷积TPEF图像之后的结果440.4 nm基本一致. 而两者又同属于三阶非线性效应, 所以从这个层面上来说, 可以先通过双光子荧光进行测量, 然后再通过去卷积的方式得到系统的TPEF分辨率近似等效于CARS成像系统的分辨率. 此时, 并未进行光束扩束, 也就是光束并未填满物镜的后光瞳, 采用190 nm直径的荧光珠, 进行双光子荧光测量, 结果如图5所示.

图5中的分辨率测量是沿着图中所示的直线位置, 通过高斯函数拟合的半高宽是816.08 nm, 与190 nm解卷积之后的半高宽是793.65 nm. 此结果说明对于TPEF而言, 不管尺寸大小, 周围的折射率分布对其成像结果并没有太多影响. 而对于CARS而言, 不管样品实际尺寸如何, 周围环境的折射率差异都会存在影响, 就会引入相位失配, 其结果就会像图4中280 nm的聚苯乙烯珠一样, 在样品的周围存在强度差异.

5 结 论

我们利用钛宝石激光器激发光子晶体光纤产生近红外超连续谱与激光形成的双脉冲宽带CARS光谱显微成像技术研究同为三阶非线性效应的TPEF与CARS, 它们在微米或亚微米成像时, 双光子成像结果与实际的样品的大小基本一致. 但是, CARS成像的结果受到周围环境折射率差异引起的相位失配的影响, 造成成像结果比实际尺寸小, 至于小多少, 可以通过本文给出的测量方式, 直接通过测量获得准确值. 这样做还可以降低成像探测器对探测灵敏度的要求, 但是对于分辨率比较高

的CARS成像系统, 若希望获得分辨率的准确值, 就需要用于测量分辨率的样品比实际的分辨率小的材料, 测量之后通过解卷积获得. 因为人们通常总是将双光子荧光与二次谐波效应成像放在一起对比, 二次谐波的“二”字与双光子荧光的“双”字, 都表示二的意思, 还有就是在做二次谐波实验的时候, 经常会出现双光子荧光信号, 但是实际上双光子荧光的信号强度正比于三阶非线性极化率的虚部. 同时, 对1.01 μm 的聚苯乙烯荧光珠的光谱成像的结果表明, 我们的近红外宽带CARS成像系统具有两种模式(双光子荧光及宽带CARS)同时成像的能力. 这将有利于我们获得探测样品更加详细的信息, 实现从材料(双光子荧光)到分子(CARS)成像研究. 而细节的分子信息又包含在宽带CARS信号里面, 又因为高阶非线性效应, 具有焦点激发的特性, 致使它们具有较高的空间分辨率. 所以, 具有较高空间分辨率并能提供较为丰富的信息使得它们在生命科学及材料科学等领域具有重要的应用价值.

参考文献

- [1] Potma E O, Xie X S N 2008 *Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy* (New York: Oxford University Press) pp412–435
- [2] Potma E O, Xie X S N 2008 *Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy* (New York: Oxford University Press) pp164–186
- [3] Zhang D, Slipchenko M N, Cheng J X 2011 *Phys. Chem. Lett.* **2** 1248
- [4] Nestor J R 1978 *Chem. Phys.* **69** 1778
- [5] Göppert-Mayer M 1931 *Ann. Phys.* **9** 273
- [6] So P T C, Dong C Y, Masters B R, Berland K M 2000 *Ann. Rev. BioMed. Eng.* **2** 399

- [7] Song J J, Eesley G L, Levenson M D 1976 *Appl. Phys. Lett.* **29** 567
- [8] Lotem H, Lynch R T J, Bloembergen N 1976 *Phys. Rev. A* **14** 1748
- [9] Oudar J L, Smith R W, Shen Y R 1979 *Appl. Phys. Lett.* **34** 758
- [10] Lee Y J, Cicerone M T 2008 *Appl. Phys. Lett.* **92** 15
- [11] Isobe K, Kawano H, Takeda T, Suda A, Kumagai A, Mizuno H, Miyawaki A, Midorikawa K 2012 *Biomed. Opt. Express* **3** 1594
- [12] Cheng J X, Volkmer A, Xie X S 2002 *Opt. Soc. Am. B* **19** 1363
- [13] [http://riodb01ibase.aist.go.jp/sdbs/\[2017.1.12\]](http://riodb01ibase.aist.go.jp/sdbs/[2017.1.12])

Experimental study on two-photon fluorescence and coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*

Hou Guo-Hui Luo Teng Chen Bing-Ling Liu Jie Lin Zi-Yang

Chen Dan-Ni[†] Qu Jun-Le[‡]

(Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, College of Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

(Received 12 January 2017; revised manuscript received 13 March 2017)

Abstract

Two-photon excitation fluorescence (2PEF) and coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) are both third-order nonlinear optical processes, but for a long time, the true relationship and differences between them are not clearly understood. For decades, the second harmonic generation has been studied in conjunction with two-photon excitation fluorescence, so it was thought that the latter was a second-order nonlinear optical process. In order to make the two nonlinear interaction processes clear enough, the two nonlinear interaction processes are worthy to study at the same time. In this paper, firstly, we give the relationships between the 2PEF, CARS signal and their third-order nonlinear susceptibility, respectively; secondly, we use our own near infrared super-continuum CARS microscopy system to study both processes. In doing so, we describe the relationship between their third-order nonlinear susceptibility and the signal. The reconstructed images derived from CARS and those derived from 2PEF differ significantly when imaging the same 1.01 μm fluorescence polystyrene beads. If the lateral spatial resolution of the CARS imaging system is larger than the fluorescence polystyrene beads, the measured size cannot be used to calculate the real spatial resolution of the CARS system. However, the resolution of the 2PEF microscopy system can be obtained through the de-convolution of the 2PEF image, which is approximately equivalent to the current resolution of the CARS imaging system, which is measured using 280 nm polystyrene beads. The images of 280 nm polystyrene beads and 190 nm fluorescent polystyrene beads also exhibit differences between the two samples and the environment around them, respectively. This means that although CARS and 2PEF are both third-order nonlinear optical processes, they have their own properties. In particular, CARS is a third-order nonlinear optical oscillation process which is caused by the phasing match condition, but 2PEF is not influenced by the phasing match condition. The phase matching condition is responsible for the differences around the sample in the images of the 280 nm pure polystyrene beads, but not for the 190 nm fluorescent polystyrene beads. The de-convolution results for the 1.01 μm fluorescence polystyrene beads and the 280 nm pure polystyrene beads are very similar, so we can use the de-convolution results for 2PEF by the 1.01 μm fluorescence polystyrene beads to approximate the current measure condition and the resolution of the CARS imaging system. If we want to gain a more accurate resolution from the CARS imaging system, the spherical sample should be smaller than the lateral spatial resolution of this system.

Keywords: coherent anti-Stokes Raman scattering, Raman spectra, fluorescence, nonlinear optics

PACS: 42.65.Dr, 36.20.Ng, 32.50.+d, 42.65.-k

DOI: 10.7498/aps.66.104204

* Project supported by the Special Funds of the Major Scientific Instruments Equipment Development of China (Grant No. 2012YQ15009203), the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 61235012), and the National Basic Research Program of China (Grant Nos. 2015CB352005, 2012CB825802).

[†] Corresponding author. E-mail: danny@szu.edu.cn

[‡] Corresponding author. E-mail: jlqu@szu.edu.cn