

基于光强传输方程相位成像的宽场相干反斯托克斯拉曼散射显微背景抑制

郑娟娟 姚保利 邵晓鹏

Nonresonant background suppression in wide-field coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with transport of intensity equation based phase imaging

Zheng Juan-Juan Yao Bao-Li Shao Xiao-Peng

引用信息 Citation: [Acta Physica Sinica](#), 66, 114206 (2017) DOI: 10.7498/aps.66.114206

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.66.114206>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2017/V66/I11>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

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

[Experimental study on two-photon fluorescence and coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy](#)

物理学报.2017, 66(10): 104204 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.66.104204>

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>

基于光强传输方程相位成像的宽场相干反斯托克斯拉曼散射显微背景抑制*

郑娟娟¹⁾ 姚保利^{2)†} 邵晓鹏¹⁾

1) (西安电子科技大学物理与光电工程学院, 西安 710071)

2) (中国科学院西安光学精密机械研究所, 瞬态光学与光子技术国家重点实验室, 西安 710119)

(2016年12月17日收到; 2017年3月31日收到修改稿)

相干反斯托克斯拉曼散射 (CARS) 显微能够对样品的特殊化学组分进行选择性地成像, 无需荧光标记, 在生物医学领域被广泛应用. 然而, 传统的 CARS 图像往往存在非共振背景信号. 本文将基于光强传输方程的单光束相位成像技术用于 CARS 显微成像, 来抑制 CARS 的非共振背景信号. 该方法通过记录样品在三个相邻平面上的 CARS 图像, 然后利用光强传输方程获取 CARS 光场的相位分布, 最后利用共振 CARS 信号和非共振背景信号在相位上的差异, 实现了对背景噪声的抑制. 该方法无需参考光, 通过三次测量可完成 CARS 的背景噪声抑制, 具有良好的应用前景.

关键词: 相干反斯托克斯拉曼散射显微, 相干成像, 相位成像, 背景噪声

PACS: 42.65.Dr, 42.30.Rx, 42.25.Kb, 42.30.-d

DOI: 10.7498/aps.66.114206

1 引言

相干反斯托克斯拉曼散射 (coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS) 显微成像是一种无需荧光标记、通过探测特定分子的振动来进行三维成像的显微技术. 该方法也是目前极具潜力的活体成像的重要手段之一, 可以对生物体内脂类 (不易被标记)、药物等特定小分子物质, 以及核酸、蛋白质等生物大分子进行无标记成像. CARS 的成像过程是抽运光和斯托克斯光相互作用的非线性四波混频过程. 假定抽运光和斯托克斯光的频率分别为 ω_P 和 ω_S , 当频率差 $\omega_P - \omega_S$ 与样品中的分子振动频率一致, 将激发出频率为 $\omega_{AS} = 2\omega_P - \omega_S$ 的反斯托克斯 (anti-Stokes) 光. CARS 过程涉及四个光子相互作用, 该过程满足动量守恒和能量守

恒关系, 其中 CARS 信号的强度与激发光强度有以下关系: $I_{CARS} \propto |\chi^{(3)}|^2 I_P^2 I_S$ [1,2], 式中, I_{CARS} 表示 CARS 信号的强度, I_P 和 I_S 分别代表抽运光与斯托克斯光的强度. 一般情况下, 三阶电极化张量 $\chi^{(3)}$ 包括共振部分 $\chi_R^{(3)}$ 和非共振部分 $\chi_{NR}^{(3)}$. 其中, 共振部分来自于特定的化学键的振动, 是人们所关注的信息; 非共振部分来自于极化过程中分子内电子的贡献, 它的存在使得 CARS 成像出现背景噪声, 降低了 CARS 图像的信噪比.

迄今为止, 人们对 CARS 成像的背景抑制已经开展了大量研究, 例如, 已经提出了反向探测法 [3]、偏振法 [4]、时间分辨法 [5] 和空间相位控制法 [6] 等来抑制背景噪声. 利用相位成像来抑制 CARS 的背景噪声已逐渐成为该研究的主流方法: 共振和非共振信号在相位上相差 $\pi/2$, 这使得通过相位成像来

* 国家自然科学基金 (批准号: 61605150, 61475187, 61575154, 61377008)、中央高校基本科研业务费专项资金 (批准号: JB160511, XJS16005, JBG160502)、the “Thüringer Ministerium für Bildung, Wissenschaft und Kultur” (TMBWK, projects: B578-06001, 14.90HWP, B714-07037), and the “Carl Zeiss Stiftung” and the Federal Ministry of Education and Research, Germany (FKZ: 13N10508) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: yaobl@opt.ac.cn

抑制背景噪声成为可能. 光学外差探测方法^[7-12]就是通过这一点实现共振和非共振 CARS 信号的分离: 该方法在 CARS 显微镜的基础上, 引入一个独立的参考光, 和分子辐射出的 CARS 光场进行干涉, 利用相移技术可以从干涉图样中分离出共振信号和背景信号, 达到去除背景噪声的目的. 该方法有较高的精度, 但是需要引入一个独立的参考光场和 CARS 光场进行干涉, 增加了装置的复杂性. 同时, 该方法对环境扰动(例如振动、温度变化等)比较敏感. 近期研究人员采用波前探测器来获取 CARS 复振幅的相位, 这种方法不需要参考光, 可以进行相位成像^[13,14]. 然而, 该方法需要价格昂贵的高精度波前探测器, 并且其空间分辨率受到了微透镜孔径的限制, 不能满足生物成像对分辨率方面的要求. 我们也曾提出基于强度迭代的单光束相位成像技术来分离去除 CARS 成像中的背景噪声^[15], 该方法需要记录一系列的强度分布, 通过迭代算法重构出 CARS 信号的相位分布.

光强传输方程 (transport of intensity equation, TIE), 于 1983 年由 Teague^[16] 利用亥姆霍兹方程在傍轴近似条件下首次推导得出. TIE 是一个二阶椭圆型偏微分方程, 阐明了平行于光轴方向上光强度的变化量与光波的相位之间的定量关系. 与基于强度迭代的单光束相位成像技术^[15]相比, 该方法无需通过迭代来恢复相位, 而是利用样品像面附近的三幅光强分布(直接测量), 通过数值求解光强传输方程, 直接获取物光波的相位分布. 相比于传统基于干涉的相位测量方法, 该方法具有无需参考光、对照明光相干性要求低(可利用传统明场显

显微镜中的卤素灯科勒照明或 LED 照明)、无需相位解包裹(直接获得绝对相位)、无需复杂的光学系统及苛刻的实验环境等诸多独特优势. 在 TIE 相位成像的应用方面: Roddier^[17] 将光强传输方程 TIE 应用于自适应光学领域. Nugent 等^[18,19] 成功地将基于 TIE 的相位成像技术应用于 X 射线衍射成像与中子射线成像领域. 近年来, 基于 TIE 的相位成像技术还被广泛应用于电子显微学^[20]、光学显微定量相位成像^[21,22]. 例如, 左超等^[23] 将光强传输方程理论应用在活细胞的动态高分辨率定量相位显微成像等.

本文将基于光强传输方程的相位成像应用于 CARS 显微, 实现了对 CARS 非共振背景信号的有效抑制. 该方法通过记录样品像面附近三个相邻空间平面上的 CARS 强度图像, 然后采用光强传输方程获取 CARS 光场的相位分布, 实现了对背景噪声的抑制. 这种抑制背景噪声的方法无需参考光, 装置简单, 实用性强, 对于高信噪比 CARS 成像具有一定的借鉴意义.

2 基于 TIE 的 CARS 相位成像技术

基于 TIE 的 CARS 相位成像所采用的实验装置如图 1 所示: 一波长为 532 nm 的 Neodymium-Vanadate 激光器用来抽运一个 Titanium-Sapphire 激光器, 输出重复频率为 76 MHz, 波长为 829.93 nm 的脉冲激光. 输出的激光经光束分束器分成两束: 第一束光被用作斯托克斯光, 另一束经过一光学参量放大器 OPO, 产生在 600—1000 nm

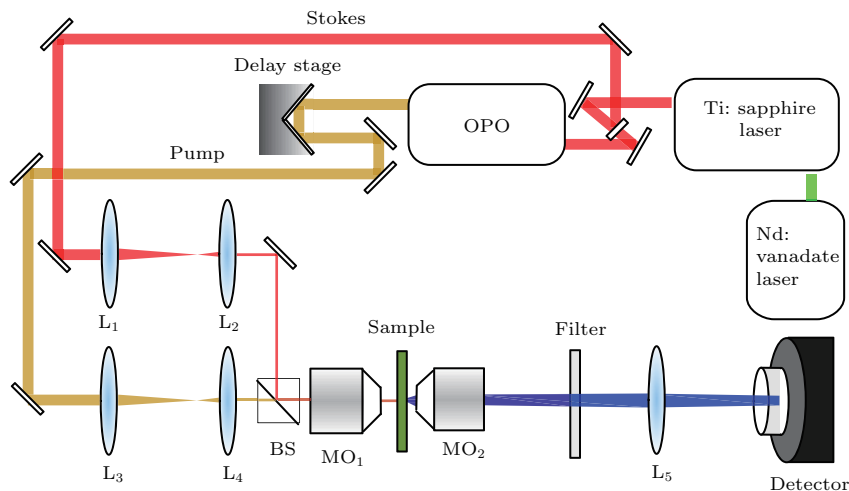


图 1 (网刊彩色) CARS 相位成像装置示意图

Fig. 1. (color online) Schematic setup for CARS phase imaging.

范围内波长可调谐的抽运光。抽运光和斯托克斯光分别经过望远镜系统 L_3-L_4 和 L_1-L_2 缩束5倍,然后通过二向色分光镜BS的合束作用实现空间上重合在一起。通过调节时间延迟装置,使得抽运光和斯托克斯光在时间上实现脉冲重合。重合的两束光经过物镜 MO_1 聚焦到样品上。产生的CARS信号通过物镜 MO_2 和透镜 L_5 组成的望远镜系统成像到CMOS相机上。滤光片(Semrock FF01-650/SP-25和FF01-563/9-25)用来滤掉抽运光和斯托克斯光。该成像系统总放大倍率为60倍,成像视场大小为 $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ 。物镜 MO_2 的数值孔径为0.75,决定了成像装置的横向分辨率为458 nm。

在CARS成像过程中,通过调节抽运光的波长,使得抽运光和斯托克斯光的频率差与样品的共振频率相匹配。当调节斯托克斯光和抽运光之间的频率差与样品中分子的振动键相匹配时,样品在共振模式下辐射出共振CARS信号 $E_{\text{CARS}}^{\text{R}}$ 。当斯托克斯光和抽运光的频率差调到远离样品分子的振动区域时,样品在非共振模式下产生CARS背景信号 $E_{\text{CARS}}^{\text{NR}}$ 。非共振CARS场和共振CARS场可以分别表示为^[13-15]

$$\begin{aligned} E_{\text{CARS}}^{\text{R}} &\propto \left(\chi_1^{\text{NR}} + \chi_2^{\text{NR}} + \text{Re}(\chi_1^{\text{R}}) \right. \\ &\quad \left. + \text{Im}(\chi_1^{\text{R}}) \right) E_{\text{P}}^2 E_{\text{S}}^*, \\ E_{\text{CARS}}^{\text{NR}} &\propto (\chi_1^{\text{NR}} + \chi_2^{\text{NR}}) E_{\text{P}}^2 E_{\text{S}}^*. \end{aligned} \quad (1)$$

如(1)式所示,在共振模式下,总CARS光场 $E_{\text{CARS}}^{\text{R}}$ 包括三部分。第一部分是来自我们感兴趣的样品成分的共振CARS信号,另外两部分分别来自我们感兴趣的样品和周围介质的非共振CARS信号。非共振的CARS光场 $E_{\text{CARS}}^{\text{NR}}$ 由两部分组成:一部分是来自我们感兴趣的样品成分辐射的非共振CARS信号,另一部分是由样品周围介质的三阶非线性极化效应 χ_1^{NR} 和 χ_2^{NR} 产生的非共振信号。这里, χ_1^{NR} 和 χ_2^{NR} 是实数,分别被定义为感兴趣样品的非共振CARS信号和背景的非共振CARS信号的三阶非线性极化系数。 χ_1^{R} 是复数,被定义为感兴趣样品的共振CARS信号的三阶非线性极化系数。 E_{P} 和 E_{S} 分别表示抽运光和斯托克斯光复振幅分布。与非共振CARS场的相位相比,共振CARS中的共振极化系数的虚部将导致共振CARS的相位多增加一定

的相移。从(1)式可以得出共振和非共振CARS场的相位差($\varphi_{\chi} = \varphi_{\text{CARS}}^{\text{R}} - \varphi_{\text{CARS}}^{\text{NR}}$)^[13-15]:

$$\begin{aligned} \varphi_{\chi} &= \varphi_{\text{CARS}}^{\text{R}} - \varphi_{\text{CARS}}^{\text{NR}} = \text{Ang} \left\{ \frac{E_{\text{CARS}}^{\text{R}}}{E_{\text{CARS}}^{\text{NR}}} \right\} \\ &= \text{Ang} \left\{ \frac{\chi_1^{\text{NR}} + \chi_2^{\text{NR}} + \text{Re}(\chi_1^{\text{R}}) + \text{iIm}(\chi_1^{\text{R}})}{\chi_1^{\text{NR}} + \chi_2^{\text{NR}}} \right\}, \end{aligned} \quad (2)$$

φ_{χ} 常被称为振动相位。由(2)式可知,当没有共振信号时, φ_{χ} 等于零;有共振信号存在时,由共振和非共振CARS场的比值决定 φ_{χ} 的值, φ_{χ} 的具体范围在0到 $\pi/2$ 之间。反之言之,利用该相位差异可以实现CARS光场的去背景: $I_{\text{CARS}}^{\text{bf}} \propto I_{\text{CARS}}^{\text{R}} \cdot \sin^2 \varphi_{\chi}$ 。这里, $I_{\text{CARS}}^{\text{bf}}$ 表示去除背景噪声后的CARS光场, $I_{\text{CARS}}^{\text{R}}$ 表示共振模式下CARS信号的总强度。在本文提出的方法中,我们对共振模式和非共振模式下的CARS光场分别进行相位成像,最后得到 φ_{χ} ,从而对非共振信号进行抑制。

在本文提出的方法中,为了求解CARS光场(如共振模式下的CARS光场 $E_{\text{CARS}}^{\text{R}}$)的相位分布,我们记录沿轴向方向样品像平面附近三个空间平面内的强度图样 $I_{-1}(x, y)$, $I_0(x, y)$ 和 $I_1(x, y)$,如图2所示。根据光TIE,这三个强度分布和光场的相位存在以下关系:

$$\nabla[I_0 \nabla \varphi_0] = -\frac{2\pi}{\lambda} \frac{I_1 - I_{-1}}{2z}, \quad (3)$$

这里, $\varphi_0(x, y)$ 为像平面的相位。 $\nabla = \nabla_x \mathbf{e}_x + \nabla_y \mathbf{e}_y$ 是在 x - y 平面的二维梯度算符; \mathbf{e}_x , \mathbf{e}_y 是单位方向矢量; λ 是光波波长; z 是相邻平面间的距离。在求解 $\varphi_0(x, y)$ 过程中,用一个辅助函数 $\nabla \psi$ 来取代(3)式中 $I_0 \nabla \varphi_0$ ^[24-26]:

$$\nabla^2 \psi = -\frac{2\pi}{\lambda} \frac{I_1 - I_{-1}}{2z}, \quad (4)$$

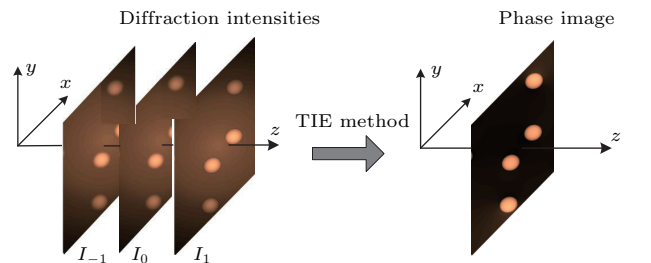


图2 (网刊彩色) TIE-CARS 相位成像示意图
Fig. 2. (color online) Schematic diagram for TIE-CARS phase imaging.

这里, $\nabla^2\psi = \frac{\partial^2\psi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2\psi}{\partial y^2}$ 是拉普拉斯算符, (4) 式是一个二维泊松方程. 利用傅里叶变换特性 $\text{FT}\{\nabla^2\psi\} = -(\kappa_x^2 + \kappa_y^2) \cdot \text{FT}\{\psi\}$, (4) 式可写成

$$\text{FT}\{\psi\} = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{1}{\kappa_x^2 + \kappa_y^2} \text{FT}\left\{\frac{I_1 - I_{-1}}{2z}\right\}, \quad (5)$$

这里, $\text{FT}\{\cdot\}$ 是二维傅里叶变换算符; κ_x 和 κ_y 分别是在 x 和 y 方向的频谱坐标. 通过对 (5) 式取逆傅里叶变换可解出 $\psi(x, y)$. 再利用 $I_0\nabla\varphi_0 = \nabla\psi$, 可以重构相位导数 φ_x 和 φ_y . 最终, 通过利用 Frankot–Chellappa 算法 [27–29] 对相位梯度进行积分可以再现出 CARS 光场的相位分布:

$$\begin{aligned} &\varphi_0(x, y) \\ &= \text{IFT}\left\{\frac{-i\kappa_x\text{FT}\{\varphi_x\} - i\kappa_y\text{FT}\{\varphi_y\}}{2\pi(\kappa_x^2 + \kappa_y^2)}\right\}, \quad (6) \end{aligned}$$

这里, $\text{FT}\{\cdot\}$ 和 $\text{IFT}\{\cdot\}$ 分别指傅里叶变换算符和逆傅里叶变换算符. 该方法仅需要记录三幅强度分布

就可以再现出物光场的相位分布, 具有相位获取速度快的优点. 这个方法直接重构了相位, 避免了传统相位成像 [30–34] 中的相位解包裹程序. 然而, 上述方法是通过求解相位函数的导数, 然后通过 (6) 式的积分来获取被测场的相位分布. 因此, 该方法仅可以用于相位连续变化的样品.

利用该方法可以求解出在共振模式下 CARS 光场的相位分布 $\varphi_{\text{CARS}}^{\text{R}}$ 和非共振模式下 CARS 光场的相位分布 $\varphi_{\text{CARS}}^{\text{NR}}$, 那么两者相位分布之差为 $\varphi_{\chi} = \varphi_{\text{CARS}}^{\text{R}} - \varphi_{\text{CARS}}^{\text{NR}}$. 利用 φ_{χ} 可以实现 CARS 光场背景抑制 [8–10]:

$$I_{\text{CARS}}^{\text{bf}} \propto I_{\text{CARS}}^{\text{R}} \cdot \sin^2 \varphi_{\chi}, \quad (7)$$

这里, $I_{\text{CARS}}^{\text{R}} = |E_{\text{CARS}}^{\text{R}}|^2$ 表示共振模式下的 CARS 总强度. 利用 (7) 式可知, 无背景的背景 CARS 信号 $I_{\text{CARS}}^{\text{bf}}$ 能够从共振模式下的 CARS 强度中提取出来.

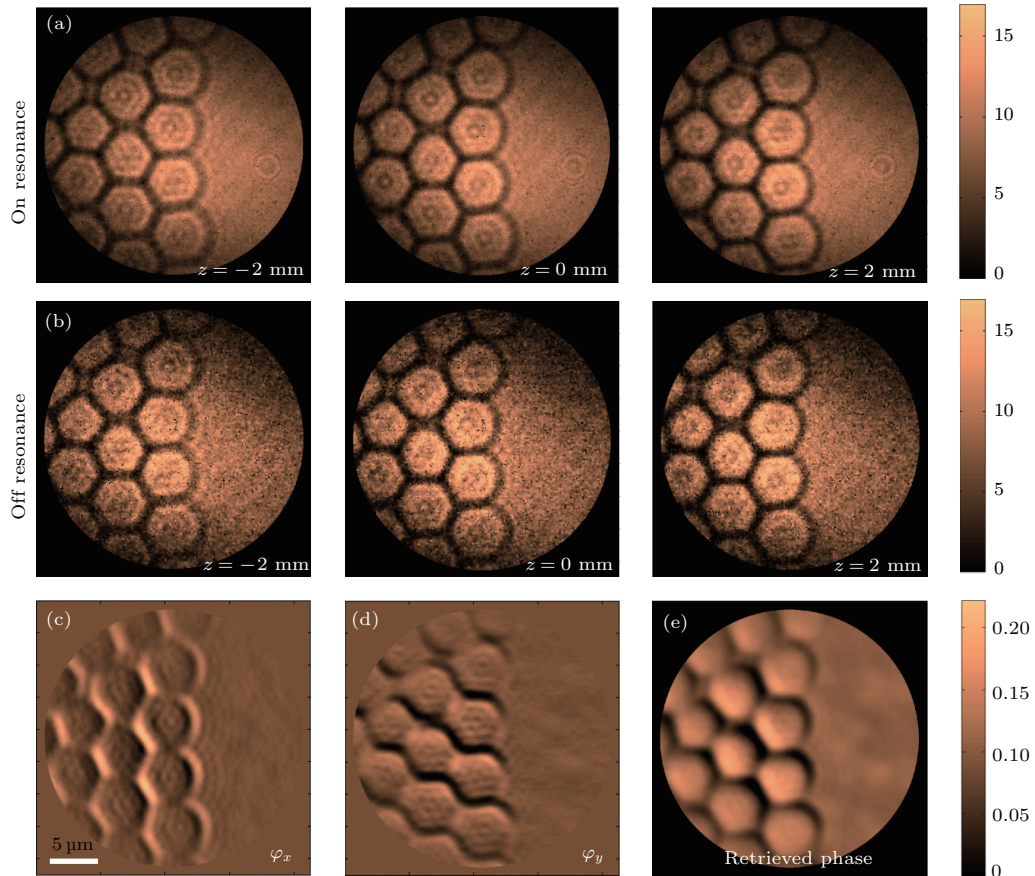


图3 (网刊彩色) 基于 TIE 方法的 CARS 相位成像 (a), (b) 共振 CARS 和非共振 CARS 分别在 $z = -2, 0, 2$ mm 处的强度分布; (c), (d) 共振 CARS 在 x 和 y 方向的相位梯度; (e) 再现出的共振 CARS 场的相位分布

Fig. 3. (color online) TIE based CARS phase imaging: (a) and (b) Intensity distributions at the position $z = -2, 0, 2$ mm of the CARS field under resonant and nonresonant mode, respectively; (c) and (d) the phase derivatives of the resonant CARS along x and y direction, respectively; (e) the reconstructed phase of the resonant CARS field by integrating the phase derivations in (c) and (d).

3 实验结果

我们对基于 TIE 方法的 CARS 相位成像实验进行了验证. 将直径为 $5\ \mu\text{m}$ 的聚苯乙烯粒子浸在折射率为 1.59 的 ZnI_2 溶液中作为样品, 其中 ZnI_2 溶液是用来减小聚苯乙烯粒子与周围非共振介质之间的折射率差. 我们调节 OPO 的抽运光的输出波长(光谱宽度 $0.4\ \text{nm}$)至 $668.5\ \text{nm}$, 和聚苯乙烯的拉曼振动光谱 $2915\ \text{cm}^{-1}$ 相匹配, 此时对应共振 CARS 成像模式. 通过沿轴向方向在样品的像平面附近移动探测器, 记录彼此间隔为 $2\ \text{mm}$ 的三幅 CARS 的强度图像, 其强度分布分别如图 3(a) 所示. 同时, 调节 OPO 的输出波长至 $675\ \text{nm}$, 此时为非共振成像模式. 同样记录间隔为 $2\ \text{mm}$ 的三幅 CARS 强度图像, 如图 3(b) 所示.

利用 (3)—(6) 式, 可以得到共振和非共振模式下的 CARS 场的相位分布. 图 3(c) 和图 3(d) 显示了共振 CARS 在 x 和 y 方向的相位梯度, 而图 3(e) 表示共振模式下 CARS 场的相位分布 $\varphi_{\text{CARS}}^{\text{R}}$. 利用相同方法我们也计算了非共振模式 CARS 光场的相位分布 $\varphi_{\text{CARS}}^{\text{NR}}$. 利用 (7) 式可以得到抑制背景后的 CARS 强度图像, 如图 4(b) 所示. 与传统的 CARS 图像(如图 4(a) 所示)相比, 图 4(a) 中聚苯乙烯粒子和周围的 ZnI_2 溶液之间都存在 CARS 信号, 而图 4(b) 中聚苯乙烯粒子被高亮度地显示出来, 非共振背景得到了很好的抑制.

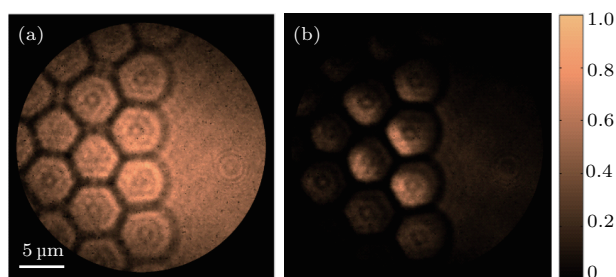


图 4 (网刊彩色) 基于 TIE 相位成像技术的 CARS 背景抑制 (a) 共振 CARS 在 $z = 0\ \text{mm}$ 处的强度分布; (b) 聚苯乙烯无背景的 CARS 强度.

Fig. 4. (color online) CARS imaging with background suppression based on TIE: (a) Intensity distribution of the resonant CARS image of polystyrene beads at $z = 0\ \text{mm}$ position; (b) intensity distribution of the resonant CARS image after background suppression.

为了更好地验证 TIE 相位成像技术在 CARS 去背景上的可行性和有效性, 我们将该技术与文献 [15] 中报道的基于迭代法 CARS 相位成像技术

在 CARS 去背景上进行了比较. 基于迭代的 CARS 相位方法 [15] 需要记录不同轴向距离下的多幅 CARS 强度图像(如图 5(a) 中 $I_{-3}, I_{-2}, \dots, I_2, I_3$ 所示), 通过在这 7 幅图像之间反复迭代获得 CARS 光场的相位分布. 最后, 利用相位图像得到去背景后的 CARS 强度分布, 如图 5(b) 所示. TIE 相位成像技术只需记录 CARS 光场在像面附近的三幅强度图像(图 5(a) 中 I_{-1}, I_0, I_1), 采用 TIE 方法获取 CARS 的相位图像. 利用 (7) 式可以得到去背景后的 CARS 强度分布, 如图 5(c) 所示. 图 5(d) 定量比较了图 5(a)—图 5(c) 中三条虚线对应的强度分布. 方便起见, 我们将图像信噪比定义为: CARS 共振信号(来自聚苯乙烯小球中心)与背景噪声(无聚苯乙烯小球区域强度分布的平均值)之间的比值. 传统 CARS 成像、基于迭代的方法以及基于 TIE 相位成像方法对应的信噪比分别为: 2.8 ± 0.2 , 102.4 ± 4.6 , 53.2 ± 3.0 . 三者的比较说明, 基于相位成像的 CARS 去背景技术都可以有效地抑制 CARS 成像中的背景噪声. 虽然基于迭代的方法 [15] 具有更好的噪声抑制能力, 但是需要记录更多的强度图像. 基于 TIE 相位成像方法仅仅需要记录三幅强度分布, 可以将信噪比提高 10 倍以上, 更加适合于快速 CARS 相位成像. 需要说明的是, 本文报道的方法以及其他相位成像技术不能提高由系统衍射极限所决定的成像分辨率, 仅能减小背景噪声和相位畸变对成像分辨率的影响.

4 结 论

CARS 显微能够在无需荧光标记的前提下对样品的特殊化学键进行选择性地成像. 在 CARS 成像过程中, 获取的 CARS 图像往往存在着非共振背景信号. 本文从实验上证明了采用 TIE 方法可以有效地抑制宽场 CARS 成像中的非共振背景噪声. 该方法是基于光传输的单光束相位成像方法, 可以在不需要参考光的前提下实现相位成像, 本文利用该方法实现了去除 CARS 成像中的背景噪声. 该方法仅需要记录三幅强度分布就可以再现出物光场的相位分布, 相位成像速度快. 这个方法直接重构了相位, 避免了传统相位成像中的相位解包裹程序. 与此同时, 本文的方法也存在不足, 该方法是通过求解相位函数的导数, 然后通过积分来获取被测场的相位分布. 因此, 该方法仅可以用于相位连续变化的样品.

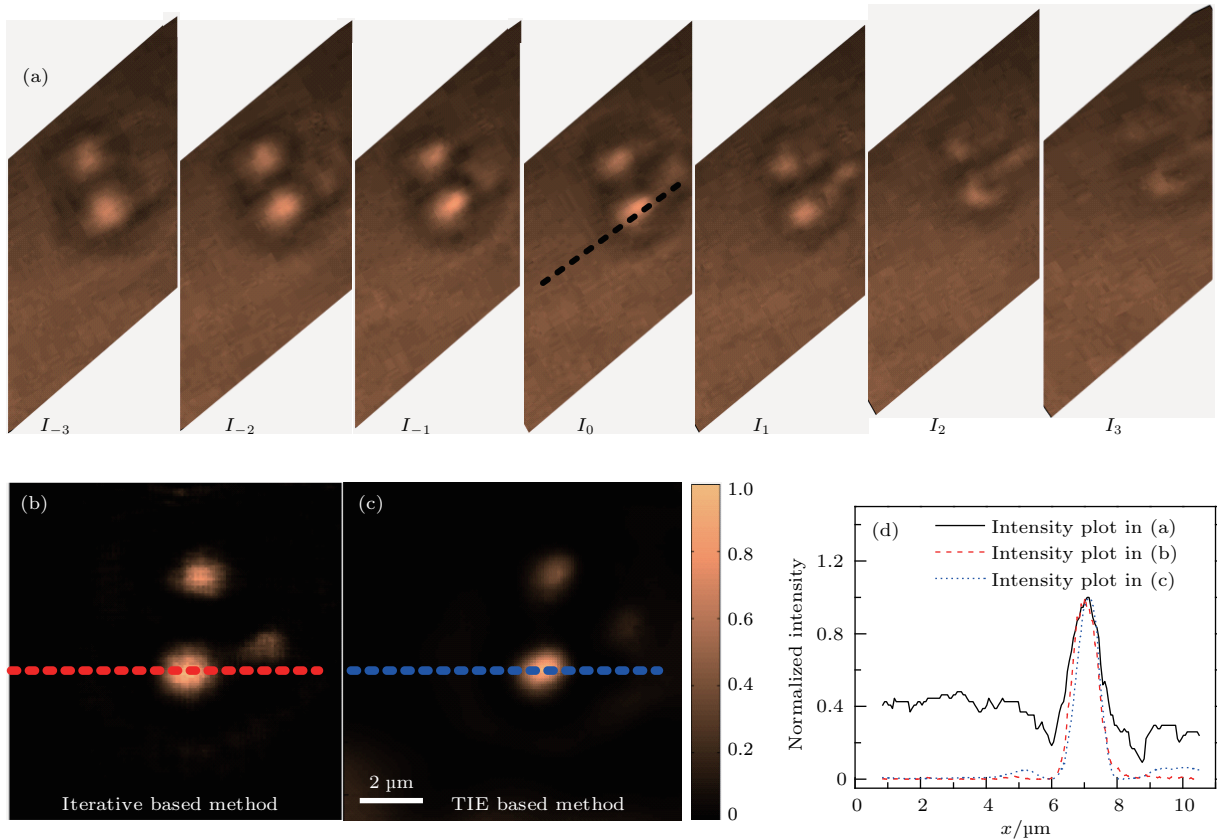


图5 (网刊彩色) 基于TIE相位成像技术与迭代相位成像技术的CARS背景抑制比较 (a) 在共振模式下CCD沿轴向依次移动2 mm所得的7幅CARS强度图像; (b) 利用迭代方法^[15]从 $I_{-3}, I_{-2}, \dots, I_2, I_3$ 中所得到的去背景后的CARS图像; (c) 利用TIE相位成像方法从 I_{-1}, I_0 和 I_1 中得到的去背景后的CARS图像; (d) 图(a), (b), (c)中的虚线对应的强度分布

Fig. 5. (color online) Comparison of the proposed method with the reported iterative phase imaging method^[15] on CARS background suppression: (a) 7 intensity distributions recorded of the resonant CARS field at different axial position with the interval of 2 mm; (b) obtained CARS image with background suppression from $I_{-3}, I_{-2}, \dots, I_2, I_3$ by using the iterative method; (c) obtained CARS image from I_{-1}, I_0, I_1 by using TIE based method; (d) intensity profile of the dashed line in (b) and (c).

参考文献

- [1] Chen T, Yu Z L, Zhang X N, Xie X S, Huang Y Y 2011 *Sci. China: Chem.* **41** 1 (in Chinese) [陈涛, 虞之龙, 张先念, 谢晓亮, 黄岩谊 2011 中国科学: 化学 **41** 1]
- [2] Zhang S W, Chen D N, Liu S L, Liu W, Niu H B 2015 *Acta Phys. Sin.* **64** 223301 (in Chinese) [张赛文, 陈丹妮, 刘双龙, 刘伟, 牛憨笨 2015 物理学报 **64** 223301]
- [3] Volkmer A, Cheng J X, Xie X S 2001 *Phys. Rev. Lett.* **87** 023901
- [4] Cheng J X, Book L D, Xie X S 2001 *Opt. Lett.* **26** 1341
- [5] Volkmer A, Book L D, Xie X S 2002 *Appl. Phys. Lett.* **80** 1505
- [6] Krishnamachari V V, Potma E O 2007 *J. Opt. Soc. Am. A* **24** 1138
- [7] Potma E O, Evans C L, Xie X S 2006 *Opt. Lett.* **31** 241
- [8] Jurna M, Korterik J P, Otto C, Offerhaus H L 2007 *Opt. Express* **15** 15207
- [9] Jurna M, Korterik J P, Otto C, Herek J L, Offerhaus H L 2008 *Opt. Express* **16** 15863
- [10] Jurna M, Korterik J P, Otto C, Herek J L, Offerhaus H L 2009 *Phys. Rev. Lett.* **103** 043905
- [11] Evans C L, Potma E O, Xie X S 2004 *Opt. Lett.* **29** 2923
- [12] Akimov D, Chatzipapadopoulos S, Meyer T, Tarcea N, Dietzek B, Schmitt M, Popp J 2009 *J. Raman Spectrosc.* **40** 941
- [13] Berto P, Gachet D, Bon P, Monneret S, Rigneault H 2012 *Phys. Rev. Lett.* **109** 093902
- [14] Berto P, Jesacher A, Roeder C, Monneret S, Rigneault H, Ritsch-Martens M 2013 *Opt. Lett.* **38** 709
- [15] Zheng J, Akimov D, Heuke S, Schmitt M, Yao B, Ye T, Lei M, Gao P, Popp J 2015 *Opt. Express* **23** 10756
- [16] Teague M R 1983 *J. Opt. Soc. Am.* **73** 1434
- [17] Roddier F 1988 *Appl. Opt.* **27** 1223
- [18] Nugent K A, Gureyev T E, Cookson D F, Paganin D, Barnea Z 1996 *Phys. Rev. Lett.* **77** 2961
- [19] McMahon P J, Allman B E, Jacobson D L, Arif M, Werner S A, Nugent K A 2003 *Phys. Rev. Lett.* **91** 145502
- [20] Bajt S, Barty A, Nugent K A, McCartney M, Wall M, Paganin D 2000 *Ultramicroscopy* **83** 67
- [21] Kou S S, Waller L, Barbastathis G, Sheppard C J R 2010 *Opt. Lett.* **35** 447
- [22] Gorthi S S, Schonbrun E 2012 *Opt. Lett.* **37** 707

- [23] Zuo C, Chen Q, Sun J S, Asund A 2016 *Chin. J. Lasers* **43** 0609002 (in Chinese) [左超, 陈钱, 孙佳嵩, Asund A 2016 中国激光 **43** 0609002]
- [24] Teague M R 1982 *J. Opt. Soc. Am.* **72** 1199
- [25] Frank J, Altmeyer S, Wernicke G 2010 *J. Opt. Soc. Am. A* **27** 2244
- [26] Zuo C, Chen Q, Yu Y, Asundi A 2013 *Opt. Express* **21** 5346
- [27] Frankot R T, Chellappa Z 1988 *IEEE Trans. Patt. Anal. Mach. Intell.* **10** 439
- [28] Gao P, Pedrini G, Osten W 2013 *Opt. Lett.* **38** 5204
- [29] Gao P, Pedrini G, Zuo C, Osten W 2014 *Opt. Lett.* **39** 3615
- [30] Shi K, Li H, Xu Q, Psaltis D, Liu Z 2010 *Phys. Rev. Lett.* **104** 093902
- [31] Gao P, Pedrini G, Osten W 2013 *Opt. Lett.* **38** 1328
- [32] Popescu G, Ikeda T, Goda K, Best-Popescu C A, Laposata M, Manley S, Dasari R R, Badizadegan K, Feld M S 2006 *Phys. Rev. Lett.* **97** 218101
- [33] Alexandrov S A, Hillman T R, Gutzler T, Sampson D D 2006 *Phys. Rev. Lett.* **97** 168102
- [34] Barty A, Nugent K A, Paganin D, Roberts A 1998 *Opt. Lett.* **23** 817

Nonresonant background suppression in wide-field coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with transport of intensity equation based phase imaging*

Zheng Juan-Juan¹⁾ Yao Bao-Li^{2)†} Shao Xiao-Peng¹⁾

¹⁾ (School of Physics and Optoelectronic Engineering, Xidian University, Xi'an 710071, China)

²⁾ (State Key Laboratory of Transient Optics and Photonics, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Xi'an 710119, China)

(Received 17 December 2016; revised manuscript received 31 March 2017)

Abstract

Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy is a valuable tool for label-free imaging of biological samples, since it enables providing contrast via vibrational resonances of a specific chemical bond. However, in a conventional CARS image the Raman resonant anti-Stokes radiation is often superimposed by a nonresonant contribution arising from the electronic part of the polarization. The situation becomes worse if a sample is composed of a significant amount of water, where a strong nonresonant background over the whole image is obtained.

To date, various approaches including Epi, polarization sensitive, time-resolved, and CARS phase imaging have been implemented to suppress the undesirable nonresonant background in CARS microscopy. Notably, optical heterodyne based phase imaging schemes are of particular interest due to their intrinsic ability to retrieve $\text{Im}(\chi^{(3)})$, which is proportional to the Raman resonant signal. Nevertheless, all the reported phase imaging methods that require an independent reference wave lead to an increase in the setup complexity, thus making the measurement sensitive to external perturbations. In order to simplify the setup, single-beam scheme has also been utilized for vibrational CARS imaging by using wave-front sensors to acquire the phase of the complex anti-Stokes amplitude. However, this method demands highly accurate wave-front sensors.

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 61605150, 61475187, 61575154, 61377008), the Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (Grant Nos. JB160511, XJS16005, JBG160502), the 'Thüringer Ministerium für Bildung, Wissenschaft und Kultur' (TMBWK, projects: B578-06001, 14.90 HWP, B714-07037), and the 'Carl Zeiss Stiftung' and the Federal Ministry of Education and Research, Germany (FKZ: 13N10508).

† Corresponding author. E-mail: yaobl@opt.ac.cn

In this paper we present a reference-less CARS phase imaging technique to suppress nonresonant CARS background based on transport of intensity equation (TIE). Resonant CARS radiation $E_{\text{CARS}}^{\text{R}}$ can be obtained when the frequency difference between the pump and Stokes beams is tuned to match a molecular vibration frequency (Raman resonant mode). In contrast, the nonresonant background $E_{\text{CARS}}^{\text{NR}}$ can be obtained when the frequency difference between the pump and Stokes beams does not match a molecular vibration frequency (Raman resonant mode). Considering the fact that there is a phase shift of $\pi/2$ between the resonant and non-resonant CARS field, the phase imaging of both resonant and nonresonant CARS field can provide a background-free image. In implementation, three intensity images of the CARS field under resonant mode are recorded at three neighboring planes by moving the CCD camera along the axial direction. In the meantime, three images of the CARS field under non-resonant mode are also recorded. Considering the fact that the TIE links the intensity distributions in three neighboring planes (through which a beam transverses) with the phase distribution of the field, the phase images of the CARS field under both resonant and nonresonant modes are reconstructed from the recorded intensity images. The phase difference φ_{χ} between the resonant CARS field and the non-resonant CARS field is calculated. Eventually, the CARS background is efficiently suppressed by using the relation $I_{\text{CARS}}^{\text{bf}} \propto I_{\text{CARS}}^{\text{R}} \cdot \sin^2 \varphi_{\chi}$.

Compared with conventional CARS background suppression techniques, the proposed method is robust against environmental disturbance, since it does not require an additional reference beam. Furthermore, the proposed method is easy to incorporate in a conventional CARS configuration. Therefore, the proposed method has the potential to become a versatile technique to image deep tissue with low background signal.

Keywords: coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy, coherent imaging, phase imaging, nonresonant background

PACS: 42.65.Dr, 42.30.Rx, 42.25.Kb, 42.30.-d

DOI: [10.7498/aps.66.114206](https://doi.org/10.7498/aps.66.114206)