

用于大景深单分子定位显微的多功能全息相位片的设计及数值模拟

李四维 吴晶晶 张赛文 李恒 陈丹妮 于斌 屈军乐

Design and numerical simulation demonstration of multi-functional holographic phase plate for large depth of field single molecular localization microscopy

Li Si-Wei Wu Jing-Jing Zhang Sai-Wen Li Heng Chen Dan-Ni Yu Bin Qu Jun-Le

引用信息 Citation: [Acta Physica Sinica](#), 67, 174202 (2018) DOI: 10.7498/aps.67.20180569

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.67.20180569>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2018/V67/I17>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[采用衍射掩模产生白光横向平顶光束](#)

Horizontal white light flat-topped beams produced by the diffraction mask

物理学报.2018, 67(14): 144202 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.67.20180030>

[基于最优化线性波数光谱仪的谱域光学相干层析成像系统](#)

Optimized linear wavenumber spectrometer based spectral-domain optical coherence tomography system

物理学报.2018, 67(10): 104208 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.67.20172606>

[基于位相变更的非相干数字全息自适应成像](#)

Adaptive imaging by incoherent digital holography based on phase change

物理学报.2018, 67(4): 044202 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.67.20172202>

[对称照明在傅里叶叠层成像中的应用](#)

Symmetric illumination in Fourier ptychography

物理学报.2017, 66(22): 224201 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.66.224201>

[面阵探测下的污染云团红外光谱仿真](#)

Simulation of pollutant-gas-cloud infrared spectra under plane-array detecting

物理学报.2017, 66(11): 114203 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.66.114203>

用于大景深单分子定位显微的多功能全息相位片的设计及数值模拟*

李四维 吴晶晶 张赛文 李恒 陈丹妮 于斌[†] 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)

(2018年3月30日收到; 2018年5月16日收到修改稿)

发展具有大轴向定位范围的单分子定位技术对于实现厚样品的超分辨成像具有重要的价值. 基于波前编码技术, 将变形多值纯相位光栅与双螺旋点扩散函数相位片相结合, 提出一种可以通过空间光调制器实现的具有高衍射效率的新型全息相位片的设计方法. 这种全息相位片可以将样品内多个层面的分子信息以双螺旋的形式成像在同一个探测面的不同位置, 在无需扫描的情况下提高双螺旋点扩散函数工程的轴向定位范围和分辨率, 解决活细胞内单分子定位和示踪技术中的大景深探测难题. 数值模拟表明, 设计的 5×5 全息相位片可以将样品内25个层面上的分子信息以双螺旋的形式成像在同一探测面上的不同位置, 相邻两个层面的间隔为 $0.5 \mu\text{m}$, 实现了轴向 $12 \mu\text{m}$ 的探测范围, 证明了设计的可行性.

关键词: 多分子追踪, 双螺旋点扩散函数, 变形光栅

PACS: 42.30.-d, 87.64.M-, 42.30.Va

DOI: 10.7498/aps.67.20180569

1 引言

在生命科学技术飞速发展的今天, 为了进一步了解和研究生命体之间的相互作用、疾病的产生机理, 人们迫切需要获得更加精确的细胞内部的结构信息. 但是, 由于光学衍射极限的存在, 常规的光学显微镜的分辨率只能达到 200 nm 左右, 难以满足现代生物医学的需要. 近年来, 单分子定位超分辨荧光显微技术的出现, 如光敏定位显微术(photoactivated localization microscopy)^[1]、随机光学重建显微术(stochastic optical reconstruction microscopy)^[2]、荧光光敏定位显微技术(fluorescence photoactivation localization microscopy)^[3]等, 它们克服了衍射极限, 达到 20 nm 的横向分辨率和 100 nm 的轴向分辨率, 有力地推动了生命科学的发展,

广泛应用于生物医学的各个领域^[4-8]. 虽然单分子定位超分辨成像系统能够实现超分辨成像, 但是较低的轴向分辨率仍有待改善. 为了克服这一问题, 文献^[9, 10]在光路中加入柱面镜, 将单分子定位显微的景深扩展到 600 nm ; Pavani和Piestun^[11]在探测光路中引入特殊相位, 将点扩散函数变为双螺旋的形式, 实现荧光分子在轴向 $\pm 2 \mu\text{m}$ 范围内的三维定位; Juetten等^[12]将探测光路分光并引入光程差, 通过计算两路光的光程差来获得荧光分子的轴向位置, 使成像景深达到 $1 \mu\text{m}$. 虽然这些方法显著地提升了单分子定位超分辨成像系统的成像景深, 但对于厚度约 $10 \mu\text{m}$ 的完整细胞而言, 现有的方法还不能满足多分子追踪时的大景深要求. 为了获取整个细胞的信息, 传统方法是对同一细胞的不同轴向位置的层面进行一系列扫描探测, 再由相

* 国家重点基础研究发展计划(批准号: 2015CB352005, 2017YFA0700500)、国家自然科学基金(批准号: 61775144, 61525503, 61620106016, 81727804, 61605127)、广东省自然科学基金(批准号: 2014A030312008, 2017A030310132)、深圳市基础研究项目(批准号: JCYJ20170818141701667, JCYJ20170818144012025, JCYJ20170412105003520, JCYJ20160308104404452, JCYJ20170818142804605)和国家留学基金(批准号: 201708440486)资助的课题.

[†] 通信作者. E-mail: yubin@szu.edu.cn

关算法将所有层面信息按照轴向位置排序合成, 还原出整个细胞内的分子信息. 但是, 在三维扫描的过程中, 不同层面的信息会相互影响, 产生背景噪声和荧光漂白, 降低分辨率. 一些研究者提出使用变形光栅对样品进行多层面探测^[13-15], 但由于变形光栅的能量主要分布在衍射的0级与±1级, 故该方法最多只能对细胞内九个不同层面同时成像, 因此, 在实现大的轴向探测范围的同时无法保持较高的轴向分辨率. Yu 等^[16]提出一种达曼变形光栅 (distorted dammann grating, DDG), 它通过达曼编码的方式将大部分的光强均匀分布在需要的几个衍射级上, 有效地提高了传统变形光栅的高衍射级效率. 但是, 达曼编码的方式对单个周期中相位分布的宽度有着严格的要求, 无法适用于空间光调制器 (spatial light modulators, SLM). 针对这一问题, Zhu 等^[17]提出了一种能够适用于 SLM 的多值纯相位光栅 (multi-value pure-phase grating, MVPPG) 编码方法. 在一个周期中, 它由多个相位值构成, 每个相位分布具有相同的宽度, 通过选取合适的相位值, 可以获得与达曼编码一样的效果. 在此基础上, 我们将 MVPPG 和 DDG 的设计思路相结合, 提出一种变形多值纯相位光栅 (distorted multi-value pure-phase grating, DMVPPG), 它不仅具有与 DDG 相同的特性, 并且解决了其无法适用于 SLM 的缺陷, 减少了光栅加工的成本与时间, 降低了使用的难度. 另外, 通过波前编码技术将双螺旋相位引入 DMVPPG 中, 获得具有复合功能的全息相位片. 这种新型的全息相位片可以将细胞

样品中不同层面的分子信息以双螺旋点扩散函数 (double-helix point spread function, DH-PSF)^[18]的形式成像在同一像平面的不同位置, 并且相互之间的光强相近. 经过理论以及数值模拟证明, 在纳米分辨多分子追踪系统中, 相比于变形光栅, 这种新型全息相位片可以获得更高的清晰度和更多细胞层的信息, 有效地提高单分子定位显微镜的成像深度.

2 原理和方法

2.1 双螺旋点扩散函数

DH-PSF 是一种特殊的点扩散函数, 在其传播横截面上, 光强分布呈现为两个相对的旁瓣, 随着物体在轴向离焦距离的变化, 原本水平方向上的两个旁瓣会发生旋转和缩放, 如图 1 所示. 而且旋转的角度与离焦距离成正比关系, 如图 2 所示. 基于这一特性, DH-PSF 可以用来对三维空间中的稀疏粒子进行横向和轴向的高精度定位^[19,20]. 传统方法获得 DH-PSF 的过程较为复杂, 需要寻找位于拉盖尔高斯 (Laguerre-Gauss, LG) 模式平面上特定直线上的 LG 模式, 将这些模式进行线性叠加得到 DH-PSF^[21], 并对其相位分布进行迭代优化^[22], 来获得高效率的相位模板. 本文中采用一种简单方法^[23]设计 DH-PSF, 基于涡旋的传播性质和螺旋光的基础理论^[24], 把 DH-PSF 解析为光瞳平面沿直径方向上的涡旋光的叠加, 其数学表达式如下:

$$E_{dh}(x, y) = \text{circ}\left(\frac{\sqrt{x^2 + y^2}}{R_{dh}}\right) \exp\left\{i \cdot \arg\left[\prod_{k=-M}^M ((x - x_k) + i(y - y_k))\right]\right\}, \quad (1)$$

式中 $i^2 = -1$; (x, y) 为相位片的光瞳坐标; (x_k, y_k) 为第 k 个螺旋光的相位奇点的坐标; R_{dh} 为光瞳半径; N_{dh} 为螺旋光的数目, 当 N_{dh} 增加时, 光强更加集中在两个旁瓣上; M 为 $(N_{dh} - 1)/2$; d 为相邻的

涡旋奇点的距离, 当 d 增大时, 两个旁瓣的相对距离会随之增大. 相比于传统方法, 该方法大幅降低了 DH-PSF 相位片的设计难度, 并且具有更高的定位精度和效率.

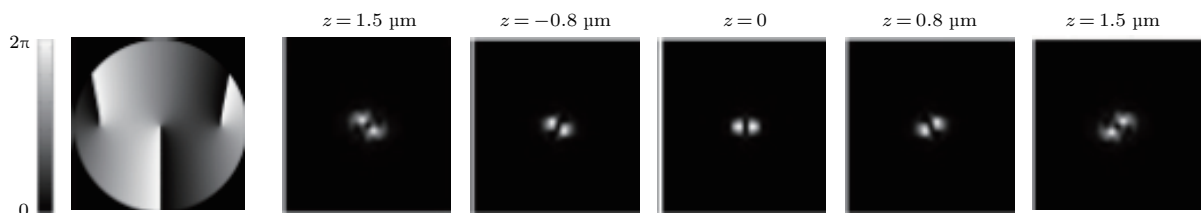


图 1 DH-PSF 相位片和 DH-PSF 在不同轴向位置的光强分布
Fig. 1. DH-PSF phase mask and DH-PSF at different axial planes.

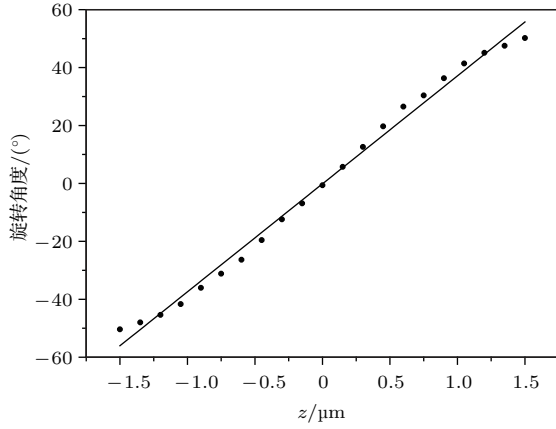


图2 DH-PSF 两个旁瓣旋转角度与 z 轴位置的关系曲线
Fig. 2. The relationship between the two lobes rotation angles of DH-PSF and the position of z axis.

2.2 变形多值纯相位光栅

DMVPPG 是通过多值相位编码技术, 对传统变形光栅 [25] 进行相位编码. 一方面, DMVPPG 与传统的变形光栅一样, 具备菲涅耳波带片的透镜作用, 在不同衍射级具有不同焦距的透镜效应; 另

一方面, 对于传统的变形光栅, 入射光能主要分布在低衍射级上, 高衍射级上的信号难以被探测, 而 DMVPPG 在需要的几个衍射级上的光强分布趋于一致, 从而能够探测到更高衍射级的信息. 本文设计的 DMVPPG 具有纯相位结构, 相比振幅光栅, 其效率大大提高. 其透过率函数可表达为

$$T_{\text{dmvppg}}(x, y) = \sum_{m=-\infty}^{\infty} C_m \exp \left[-i2m\pi \left(\frac{x}{\Lambda} + \Psi_w \right) \right], \quad (2)$$

式中 (x, y) 为 DMVPPG 为入瞳面的坐标; Λ 为 x 方向上光瞳孔径中心的光栅周期;

$$\psi_w = \frac{W_{20}}{\lambda} \sqrt{1 - \left(\frac{K}{n_0} \right)^2 \frac{(x^2 + y^2)}{R^2}},$$

R 为 DMVPPG 的光瞳半径, n_0 是聚焦区域的折射率, K 是常数, 决定变形光栅不同衍射级的焦距大小, 当光栅紧贴透镜时, K 为聚焦透镜的数值孔径, W_{20} 为光栅的离焦系数. m 为衍射级, 其对应的衍射系数 C_m 表示如下:

$$C_m = \begin{cases} \frac{1}{N} \sum_{n=1}^{N-1} \exp(i\varphi_n), & m = 0, \\ \frac{i}{2m\pi} \left[\sum_{n=0}^{N-1} \left[\exp \left(-i2m\pi \frac{n+1}{N} \right) - \exp \left(-i2m\pi \frac{n}{N} \right) \right] \cdot \exp(i\varphi_n) \right], & m \neq 0, \end{cases} \quad (3)$$

式中, N 是一个周期内被划分的块数; φ_n 是第 n 块的相位分布值它的选取直接决定了衍射级之间光强分布. 因此, 通过最优化算法 [26], 可以寻找合适的相位值来使得所需要的 β 个衍射级的光强分布相当, 即 $|C_m|^2 = |C_0|^2$. 在实际光栅相位生成中, 根据 (3) 式计算得到 φ_n , 并生成一个二值相位光栅, 在一个归一化的周期内, 其光栅条纹的每个离散的相位所占宽度为 $1/N$. 并引入 (1) 式中相同的离焦相位 ψ_w , 其透过率表达式如下:

$$T_{\text{grating}}(x, y) = \left(\sum_{m=-M_0}^{M_0} A_m \exp \left[-i2m\pi \left(\frac{x}{\Lambda} + \psi_w \right) \right] \right), \quad (4)$$

M_0 为傅里叶级数截断级, 其 m 级的衍射系数 A_m 为

$$A_m = \begin{cases} 2 \sum_{n=1}^{N-1} (-1)^n \frac{n}{N} + (-1)^N, & m = 0, \\ \frac{1}{2im\pi} \left[1 + 2 \sum_{n=1}^{N-1} (-1)^n \exp \left(-i2\pi m \frac{n}{N} \right) + (-1)^N \exp(-i2\pi) \right], & m \neq 0. \end{cases} \quad (5)$$

取 $T_{\text{grating}}(x, y)$ 的实数部分, 并将数值大于 0 的部分赋值为 1, 数值小于 0 的部分赋值为 -1, 这样可以得到一个黑白相间的光栅相位分布. 最后, 将 φ_n 的值依序赋值到黑和白的相位区域内, 将原本的二值相位转换为多值相位的形式, 如图 3 所示.

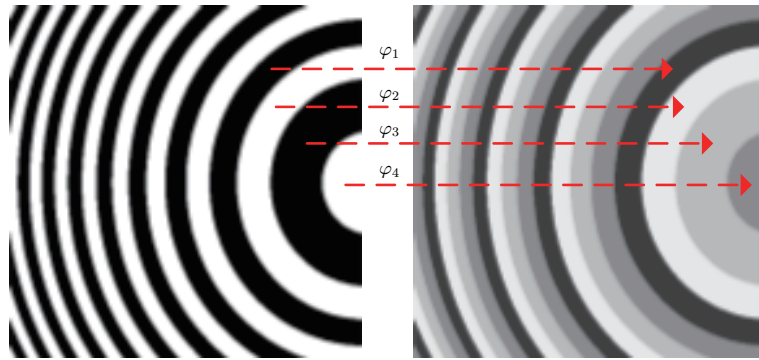


图3 变形多值纯相位光栅的设计方法
Fig. 3. The design method of DMVPPG.

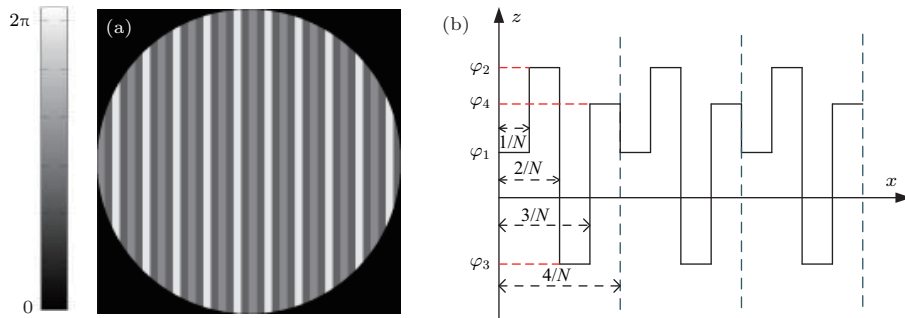


图4 多值纯相位光栅的相位分布和切面的结构 (a) 多值纯相位光栅的相位分布; (b) 多值纯相位光栅在切面上的结构
Fig. 4. Phase distributions of MVPPG and structure in the section: (a) Phase distributions of MVPPG; (b) the structure of MVPPG in the section.

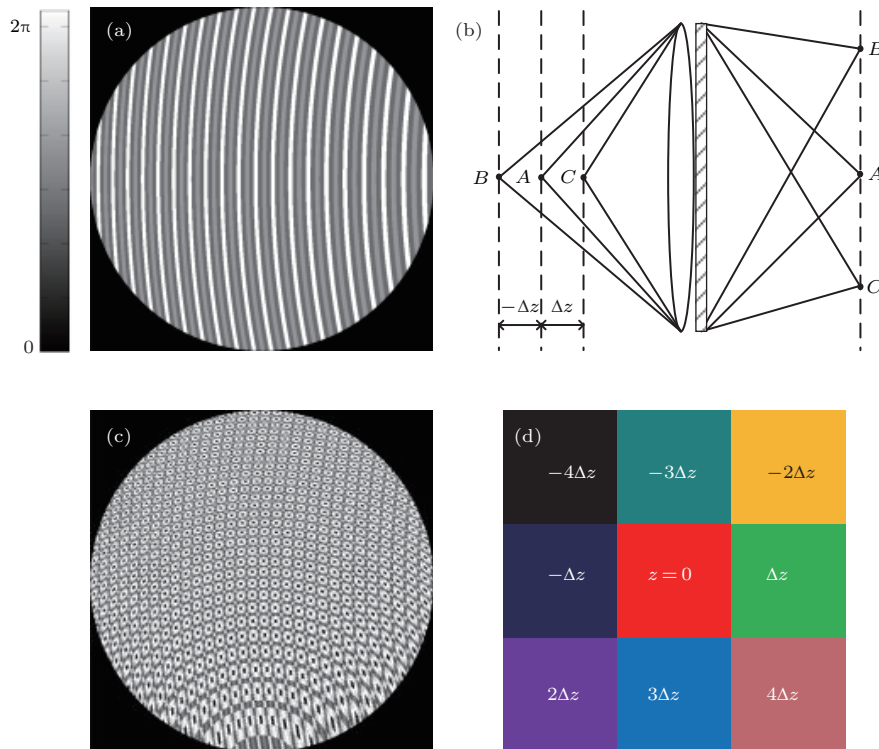


图5 变形多值纯相位光栅的相位分布及其成像原理 (a) 一维变形多值纯相位光栅的相位分布; (b) 一维变形多值纯相位光栅成像原理; (c) 二维变形多值纯相位光栅; (d) 二维变形多值纯相位光栅成像原理

Fig. 5. Phase distributions and imaging principle of DMVPPG: (a) The phase distribution of 1×5 DMVPPG; (b) the imaging principle of 1D-DMVPPG; (c) the phase distribution of 5×5 DMVPPG; (d) the imaging principle of 2D-DMVPPG.

当DMVPPG透过率函数中离焦系数 $W_{20} = 0$ 时, 光栅退化为MVPPG. 在一个归一化周期内, 光栅被等分为 N 个部分, 每个部分具有不同的相位值 φ_n , 如图4(a)所示, 其切面结构原理图如图4(b)所示; 当 $W_{20} \neq 0$, MVPPG 中加入了离焦相位 ψ_w , 其相位分布如图5(a)所示. 相位条纹产生弯曲, 在不同衍射级上引入了不同焦距的透镜效应, 其 m 衍射级对应的焦距 $f_m = \frac{R^2 n_0^2}{m K^2 W_{20}}$, 这一特性使得样品内不同轴向位置的信息(相邻的两个样品面的间隔为 Δz)从左到右的成像在同一平面, 其原理如图5(b)所示. 如果需要获得更多样品层的信息, 可以简单地将一个 $1 \times M_x$ 的DMVPPG和一个 $1 \times M_y$ 的DMVPPG正交重叠, 生成一个 $M_x \times M_y$ 阶的二维DMVPPG, 为了保持两个相邻样品面之间的距离相等, 其离焦系数 $W_{20,x}/W_{20,y}$ 应等于 M_x 或者 $1/M_y$, 其相位如图5(c)所示. 当样品面位于轴上不同位置时, 经 3×3 的DMVPPG和透镜成像在探测面, 其成像位置与物方样品位置之间的关系如图5(d)所示. 当样品面与系统的物方焦平面重合时, 即 $Z = 0$, 其成像位于探测面的正中心; 当样品面距离系统的物方焦面的距离为 $-4\Delta z$ 时, 其成像在探测面的左上角. 因此, DMVPPG可以不依靠轴向扫描来实现轴向大范围的高分辨率三维成像, 可以广泛地应用到活细胞三维显微成像、纳米尺度三维单分子定位及成像等领域.

3 新型全息相位片

新型全息相位片是通过波前编码技术, 将DMVPPG与DH-PSF结合产生的, 其相位分布为

$$\varphi_{\text{dh-dmvppg}} = \varphi_{\text{dh}} + \varphi_{\text{dmvppg}}. \quad (6)$$

它是由双螺旋相位片的相位 φ_{dh} 与变形多值纯相位光栅的相位 φ_{dmvppg} 线性叠加而成, 这种全息相

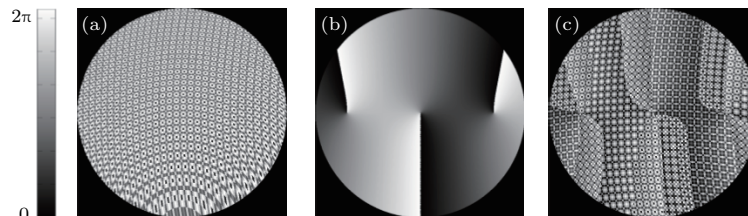


图7 二维变形多值纯光栅、双螺旋相位片以及全息相位片的相位分布 (a) 二维变形多值纯光栅的相位分布; (b) 双螺旋相位片的相位分布; (c) 全息相位片的相位分布

Fig. 7. Phase distributions of 2D-DMVPPG, DH-PSF phase mask and the new tape holographic phase mask: (a) The phase distribution of 2D-DMVPPG; (b) the phase distribution of DH-PSF phase mask; (c) the phase distribution of the new tape holographic phase mask.

位片可以将不同样品面的分子信息以双螺旋点扩散函数的形式成像在同一探测面上不同位置, 并且它们之间的光强趋于一致. 将其放入显微成像系统中, 其工作光路如图6所示. 反射式的SLM位于 $4f$ 系统的傅里叶面位置, 实验中, 全息相位片显示在SLM的液晶面板上, 通过相机一次曝光, 可以实现对细胞内不同深度的分子信息并行成像; 根据光栅参数的不同, 可以对光学系统的景深进行不同倍率的扩展; 同时, 它兼具双螺旋点扩散函数的性质, 可以对景深范围内的离散分子进行纳米精度的三维定位. 因此, 新型的全息相位片可以将原有的探测深度延展数倍, 有利于对完整细胞中的分子结构进行三维探测, 减少多次探测所带来的误差, 提高了单分子定位的定位精度.

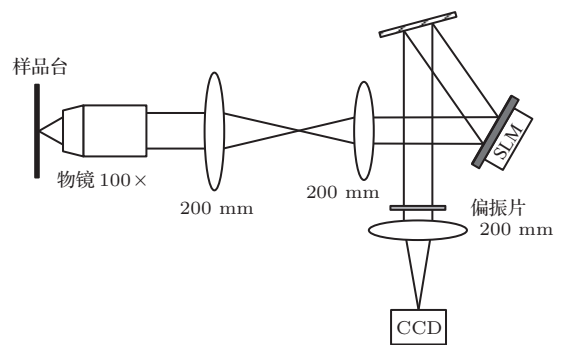


图6 基于全息相位片的大景深三维荧光显微成像系统
Fig. 6. Large depth of field 3D fluorescence microscopy imaging system based on a new type holographic phase mask.

4 数值模拟与结果分析

为了证明这种新型全息相位片可以有效提高单分子定位显微系统的探测景深, 根据图6中的光路进行数值模拟. 首先, 设计生成 5×5 的DMVPPG, 如图7(a)所示, 像素数为 600×600 , 像

素尺寸为 $10\ \mu\text{m}$; 单个周期的划分块数 $N = 4$, 对应的相位值 φ_n 分别为 1.1165π , 0.7761π , 1.8472π 和 0.7761π ; $K = 0.4841$; 周期 $\Lambda = 200\ \mu\text{m}$; x, y 方向的离焦系数分别为 $W_{20,x} = 10\lambda$, $W_{20,y} = 50\lambda$. 接着根据 (1) 式生成双螺旋相位, 其像素数和像素尺寸与 DMVPPG 相同, 如图 7(b) 所示, 其中 $N_{\text{dh}} = 9$, $d = 0.7R_{\text{dh}}$, 旋转 180° 对应的轴向范围为 $1.125\ \mu\text{m}$. 最后根据波前编码技术将两者相位结合, 生成新的全息相位片, 如图 7(c). 将全息模版放置在焦距 $f = 20\ \text{cm}$ 的 $4f$ 系统中, 在入射波长 $\lambda = 480\ \text{nm}$ 条件下根据系统参数, 可以计算出相邻衍射级对应样品面之间的距离 $\Delta z = 0.5\ \mu\text{m}$, 匹配双螺旋最佳定位精度的旋转范围为 $-40^\circ - 40^\circ$.

在物方轴上的不同位置, 依次模拟点光源来作为细胞中的分子, 两个相邻的点光源距离为 $0.5\ \mu\text{m}$, 经 $4f$ 系统后成像在 CCD 的探测面上, 根据光源的不同的轴向位置, 在焦平面的对应区域形成双螺旋点扩散函数, 如图 8 所示, 其中虚线区域为对应双螺旋点扩散函数的放大图. 当点光源位于 $4f$ 系统透镜的前焦点处, 探测面上形成清晰的双螺旋点, 位于整个视场中心, 如图 8(a) 所示, 双螺旋的两个旁瓣保持水平. 当点光源与前焦点的距离为 $0.5\Delta z$ 时, 其恰好位于物方相邻两个成像层面的中间位置, 因此衍射零级和衍射 +1 级上会同时出现光强相等的双螺旋点, 它们分别顺时针旋转 40° 和逆时针旋转 40° . 如图 8(b) 所示. 当光源距离焦点距离 $-12\Delta z$ 时, 双螺旋点分别出现在视场的左上角, 如图 8(c) 所示. 通过上面的模拟结果, 可以证明设计出的全息相位片能够达到理论上的最大扩展深度, 有效地将系统探测范围提升到 $\pm 6\ \mu\text{m}$. 相比于传统的多焦面超分辨单分子定位荧光显微系统, 大幅提高了样品的成像层数, 将样品内相邻的两个探测面的间隔缩小到 $0.5\ \mu\text{m}$, 提高了轴向的分辨率. 最后, 将每个衍射级的强度进行统计, 并进行归一化计算, 如图 9 所示. 可以看出多值相位编码有效地将光强均匀分布到所需要的 25 个衍射级上, 提高了高衍射级的光强分布. 虽然衍射级之间的光强并没有达到理论上的一致, 经分析可能是由于相位片在构成像素数较少的情况下, 随着离焦因子的增大, DMVPPG 的像素化的相位分布会与理论值存在一定误差, 光强在不同衍射级上的分布会

受到影响, 因而, 随着构成光栅的像素数增加, 像素尺寸减少, 并选择合适的离焦因子, 光栅的均匀性会随之改善. 模拟结果表明这种新型全息相位片可以实现对细胞的多层面上的分子同时成像, 并将系统的普通点扩散函数转换为双螺旋的形式, 通过双高斯拟合定位算法, 可以实现精度在 $10\ \text{nm}$ 的单分子定位, 提高了相邻细胞面之间离焦的分子的定位精度. 如将上述全息相位模板应用到单分子定位超分辨荧光显微中, 结合荧光分子的稀疏激发, 可以同时对整个细胞内多个分子进行实时追踪和定位.

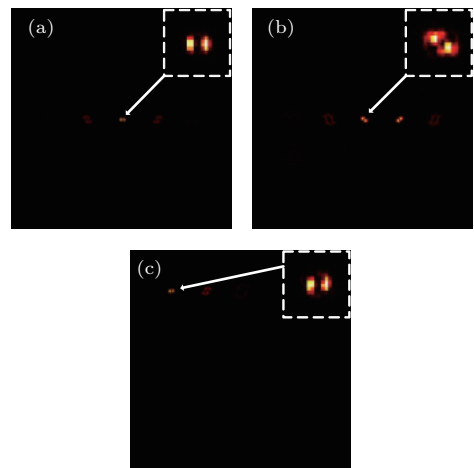


图 8 点光源处于不同轴向位置的成像结果 (a) 新型全息相位片的相位分布; (b) 点光源位于 $z = 0.5\Delta z$ 位置的成像结果; (c) 点光源位于 $z = -12\Delta z$ 位置的成像结果

Fig. 8. Imaging results of point light sources at different axial positions: (a) The image result as the point source in the $z = 0$; (b) the image result as the point source in the $z = 0.5\Delta z$; (c) the image result as the point source in the $z = -12\Delta z$.

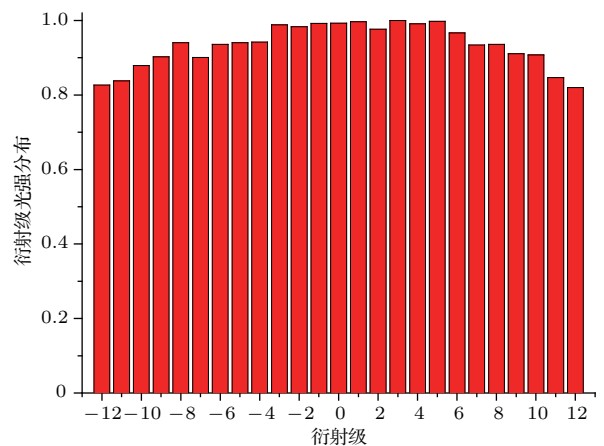


图 9 探测面上不同衍射级光强分布

Fig. 9. The intensity distribution of different diffraction orders in the detection plane.

5 总 结

本文设计的新型全息相位片在扩展了探测景深的同时有效地提高了轴向的分辨率, 并且将普通的点扩散函数转换为双螺旋的形式, 提高了单分子定位的三维定位精度. 将这种新型全息相位片通过SLM显示应用到单分子定位显微镜中, 可以实现对整个细胞中多个分子的追踪和高精度定位. 一方面, 多值相位编码可以使得所需求的衍射级上的能量分布趋于一致, 进一步提高了衍射效率, 弥补了传统变形光栅高衍射级的信号光太弱而无法探测的问题; 另一方面, 它可以有效地通过SLM来实现, 省去了光栅加工的成本与时间. 模拟结果表明: 这种方法能够将原本的单分子定位显微镜成像深度扩大数倍, 并且能量利用率高, 扩展了单分子定位显微的景深; 同时, 为完整细胞内多个生物分子实时变化的观察和追踪提供一个更好的方案, 对研究生物学中的分子机制有着重要的意义.

参考文献

- [1] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, Lindwasser O W, Olenych S, Bonifacino J S, Davidson M W, Lippincott-Schwartz L, Hess H F 2006 *Science* **313** 1642
- [2] Rust M J, Bates M, Zhuang X 2006 *Nat. Methods* **3** 793
- [3] Hess S T, Girirajan T P, Mason M D 2006 *Bio. Phys. J.* **91** 4258
- [4] Chamma I, Levet F, Sibarita J B, Sainlos M, Thoumine O 2016 *Neurophotonics* **3** 041810
- [5] Endesfelder U, Heilemann M 2014 *Nat. Methods* **11** 235
- [6] Flors C 2011 *Biopolymers* **95** 290
- [7] Patterson G, Davidson M, Manley S, Lippincott-Schwartz J 2010 *Annu. Rev. Phys. Chem.* **61** 345
- [8] Hossain S, Hashimoto M, Katakura M, Mamun A A, Shido O 2015 *Bmc. Complem. Altern. M.* **15** 1
- [9] Huang B, Wang W, Bates M, Zhuang X W 2008 *Science* **319** 810
- [10] Kao H P, Verkman A S 1994 *Bio. Phys. J.* **67** 1291
- [11] Pavani S R, Piestun R 2008 *Opt. Express* **16** 22048
- [12] Juette M F, Gould T J, Lessard M D, Mlodzianoski M J, Nagpure B S, Bennett B T, Hess S T, Bewersdorf J 2008 *Nat. Methods* **5** 527
- [13] Hajj B, Wisniewski J, El B M, Chen J, Revyakin A, Wu C, Dahan M 2014 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111** 17480
- [14] Yu B, Li H, Chen D N, Niu H B 2013 *Acta Phys. Sin.* **62** 154206 (in Chinese) [于斌, 李恒, 陈丹妮, 牛憨笨 2013 物理学报 **62** 154206]
- [15] Yousry T A, Pelletier D, Cadavid D, Gass A, Richert N D, Radue E W, Filippi M 2012 *Ann. Neurol.* **72** 779
- [16] Yu J, Zhou C, Jia W, Ma J, Hu A, Wu J, Wang W 2013 *Opt. Lett.* **38** 474
- [17] Zhu L, Sun M, Zhu M, Chen J, Gao X, Ma W, Zhang D 2014 *Opt. Express* **22** 21354
- [18] Schechner Y Y, Piestun R, Shamir J 1996 *Phys. Rev. E: Stat. Phys. Plasmas, Fluids* **54** 50
- [19] Ginni G, Sean Q, Callie F, Rafael P 2011 *Biomed. Opt. Express* **2** 3010
- [20] Thompson M A, Casolari J M, Badieirostami M, Brown P O, Moerner W E 2010 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107** 17864
- [21] Greengard A, Schechner Y Y, Piestun R 2006 *Opt. Lett.* **31** 181
- [22] Pavani S R, Piestun R 2008 *Opt. Express* **16** 3484
- [23] Grover G, Deluca K, Quirin S, Deluca J, Piestun R 2012 *Opt. Express* **20** 26681
- [24] Indebetouw G 1993 *J. Mod. Opt.* **40** 73
- [25] Blanchard P M, Greenaway A H 1999 *Appl. Opt.* **38** 6692
- [26] Zhou C, Liu L 1995 *Appl. Opt.* **34** 5961

Design and numerical simulation demonstration of multi-functional holographic phase plate for large depth of field single molecular localization microscopy*

Li Si-Wei Wu Jing-Jing Zhang Sai-Wen Li Heng Chen Dan-Ni Yu Bin[†] 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 30 March 2018; revised manuscript received 16 May 2018)

Abstract

The development of nanoscale single-molecule localization and tracking technology for multiple bio-molecules in intact cells has important significance for studying the dynamic process in life process. Since most of cells are several microns in depth, but the focal depth of traditional optical microscopes are less than one micron, the limited depth of field is the main drawback of conventional single molecular localization microscopy that prevents observation and tracking of multiple molecules in intact cells. In this paper, based on the wavefront coding technique, a new type of holographic phase plate with high efficiency is proposed and designed to extend the depth of field of single molecular localization microscopy, which combines the distorted multi-value pure-phase grating (DMVPPG) with the double-helix point spread function (DH-PSF). The DMVPPG can be used to realize multiplane imaging of several tens of layers of a sample in a single detection plane. And the DH-PSF is an engineered point spread function which encodes the lateral and axial position with high precision of a molecule in the center of its two lobes and the angle between them respectively. Using the combined holographic phase plate, the molecules in dozens layers of a whole cell can be simultaneously imaged on the same detection plane with DH-PSF. Not only can the axial resolving power be improved, but the imaging depth can also be extended without scanning. Adding such a holographic phase plate to the imaging path, the limited imaging depth problem in single-molecule-localization microscopy can be solved without sacrificing the localization accuracy. The proposed new type of holographic phase plate can also be implemented with a spatial light modulator. In the following numerical simulation experiments, the designed holographic phase plate is composed of 600×600 pixels with a pixel size of $10 \mu\text{m}$. The distance between two adjacent focal planes is designed to be $0.5 \mu\text{m}$. Such a holographic phase plate is placed on the Fourier transform plane of the detection light path. When an emitter is located on the focal plane, it can be imaged as two lobes without rotation in a center area of the field of view. If an emitter is $-6 \mu\text{m}$ away from the focal plane, the DH-PSF appears in the upper-left area of the field of view. Simulation results demonstrate that a total of 25 sample layers can be simultaneously imaged on the single detection plane and the $12 \mu\text{m}$ detection range can be achieved, thus proving the feasibility of this method.

Keywords: multi-particle tracking, double-helix point spread function, distorted grating

PACS: 42.30.-d, 87.64.M-, 42.30.Va

DOI: 10.7498/aps.67.20180569

* Project supported by the National Basic Research Program of China (Grant Nos. 2015CB352005, 2017YFA0700500), the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 61775144, 61525503, 61620106016, 81727804, 61605127), the Guangdong Natural Science Foundation, China (Grant Nos. 2014A030312008, 2017A030310132), the Shenzhen Basic Research Project, China (Grant Nos. JCYJ20170818141701667, JCYJ20170818144012025, JCYJ20170412105003520, JCYJ20160308104404452, JCYJ20170818142804605), and the China Scholarship Council (Grant No. 201708440486).

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