

高效双螺旋点扩展函数相位片的设计与实验研究*

李恒 于斌 陈丹妮 牛憨笨†

(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)

(2013年1月31日收到; 2013年3月4日收到修改稿)

双螺旋点扩展函数具有随离焦连续旋转变化的特性, 结合单分子定位方法可用于厚样品三维超分辨成像及分子定位追踪研究. 但双螺旋点扩展函数不足之处是光能利用率低, 对于光子数受限的荧光显微成像而言其应用受限. 本文通过对双螺旋点扩展函数在空域、频域和拉盖尔-高斯模式面等三个不同域中进行约束优化. 模拟结果表明, 优化后的双螺旋点扩展函数的光能效率提高了 30 多倍. 同时, 基于最优设计方案制备了相位片, 并实验验证了该设计的正确性. 与文献报道相比较, 本文结果在成像深度和光能利用率方面都有所改善.

关键词: 双螺旋点扩展函数, 超分辨成像, 轴向定位, 优化算法

PACS: 42.30.-d, 42.30.Lr, 87.64.M-, 87.64.-t

DOI: 10.7498/aps.62.124201

1 引言

近年来, 单分子定位显微成术 (single-molecule localization microscopy, SMLM) 的发展, 如光敏定位显微术 (photoactivated localization microscopy, PALM)^[1]、随机光学重建显微术 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)^[2]、荧光光敏定位显微技术 (fluorescence photoactivation localization microscopy, FPALM)^[3] 等, 突破了光学衍射极限的限制, 空间分辨率达到 20 nm 左右, 使得人们能够在分子水平下对细胞内精细结构、功能和某些动态过程进行观察, 有力地推进了生命科学等诸多领域的发展^[4-7]. 从本质上讲, 它们都是利用荧光标记本身的开关效应, 通过稀疏激发、分时成像、质心定位以及图像合成来实现纳米分辨成像^[8]. 结合具有轴向分辨能力的方法, 如柱面镜法^[9]、双焦面探测法^[10]、荧光干涉法^[11]以及双螺旋点扩展函数法 (double helix point spread function, DH-PSF)^[12], 则可实现三维纳米分辨成像. 其中, DH-PSF 通过特殊设计相位板, 改变系统的高斯型点扩展函数形成双螺旋的结构形式, 利用两螺旋点之间连线的旋转方向来确定荧光分子的轴向位置. 与其他方法相比,

DH-PSF 具有更大的焦深范围, 并且在整个焦深范围内, 点扩展函数的形状近似不变, 仅随轴向位置的变化它们之间连线的旋转方向发生改变, 相较于其他点扩展函数形状发生变化的方法, 更便于精确实现轴向定位.

然而, DH-PSF 方法存在光能利用效率较低的问题. 由于 SMLM 需实现单分子所发荧光的探测, 这时信号很弱, DH-PSF 方法对荧光光能的损失使得该方法难以获得广泛的应用. 若能通过改进解决此问题, 由于其焦深大将会大大改变目前的应用局面^[13].

本文首先介绍 DH-PSF 形成原理以及该方法目前存在的主要问题; 在此基础上, 通过优化设计和理论模拟, 获得最佳设计方案^[14,15]; 最后, 加工制作出优化的相位板. 理论模拟和实验结果表明, 本文设计和研制出的 DH-PSF 相位板其光能利用率达到原始双螺旋点扩展函数的 30 倍以上, 使该方法在荧光显微纳米成像方面的广泛应用成为可能.

2 DH-PSF 原理

DH-PSF 是利用一组特定的拉盖尔-高斯 (Laguerre-Gauss, LG) 模式光束相干叠加而成, 在

* 国家重点基础研究发展计划 (批准号: 2012CB825802)、国家自然科学基金 (批准号: 61235012, 61178080, 11004136, 60878053)、国家重大科学仪器设备开发专项 (批准号: 2012YQ15009203) 和深圳市科技计划 (批准号: JCYJ20120613173049560, GJHS20120621155433884) 资助的课题.

† 通讯作者. E-mail: hbniu@szu.edu.cn

三维空间的分布呈双螺旋形,其横截面随轴向位置不变,利用双螺旋的旋转角度可以精确确定其轴向位置 [16,17].

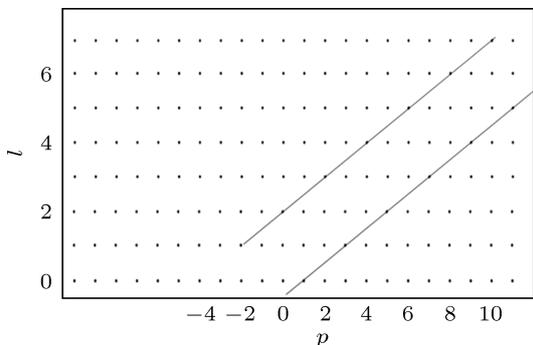


图1 拉盖尔-高斯模式面

实现 DH-PSF 的主要方法是通过位于 LG 模式面 (如图 1 所示) 上特定直线上的 LG 模式的等权重线性叠加,例如,通过 LG 模式 (0, 1), (1, 3), (2, 5), (3, 7), (4, 9), (5, 11) 等 (l, p) 模式的等权重叠加形成一个新的光场分布函数,即双螺旋旋转光束 [11]. 基

于 LG 函数的傅里叶变换的不变特性 [16], 该光场分布函数如作为光学传递函数应用到光学成像系统中,则光学系统的点扩展函数将变为 DH-PSF, 其旋转速率由 LG 模式平面上所对应的直线斜率决定. 因此,我们可以通过在标准成像系统中的傅里叶面位置引入具有上述叠加光场复振幅分布的特殊掩模板来实现 DH-PSF.

然而,如图 2(a) 所示,基于 LG 模式直接组合的 DH-PSF 系统存在的主要缺点是: 1) 旋转点扩展函数的振幅型掩模板产生很高的吸收率,导致有用的光子数大幅减少; 2) 虽然光能主要集中在 PSF 的两个主峰位置,但有一部分能量被分到旁瓣上 (箭头所示),使有用的光子数进一步减少. 因此,在掩模板作用下,虽然也可以产生 DH-PSF,但是两个主峰处的光子数利用率只有 2% 左右. 正由于如此,人们发展了形成 DH-PSF 的相位板,但由于高阶衍射的存在,旁瓣仍会占用一部分光能 [11], 这是我们不希望出现的现象.

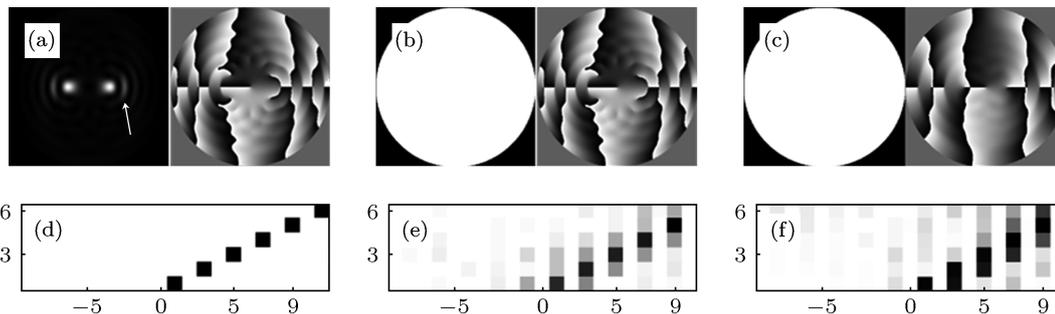


图2 DH-PSF 传递函数 (a) 原始 DH-PSF; (b) 高效 DH-PSF 的初始估计; (c) 高效 DH-PSF 优化结果; (d), (e), (f) 分别是 (a), (b), (c) 的 LG 模式分解分布图

为了提高 DH-PSF 系统的光能利用率,我们通过优化算法设计了相位片,使 DH-PSF 两个主峰的强度得以提高. 与原始 DH-PSF 掩模板相比,目前的 DH-PSF 相位板需具备以下几个特点: 首先,理论上讲应是纯相位调制,从而尽可能避免掩模板本身的光吸收; 其次,在给定的离焦范围内,始终保持双螺旋光束; 最后,光能应集中在主峰,尽量减少旁瓣上的光能分布.

3 高效 DH-PSF 相位片的设计

3.1 优化算法

目前,基于相位恢复的衍射光学元件设计方法主要是针对一个输入平面到单一输出平面的相位

恢复问题,即二维相位恢复问题. 我们所要设计的相位板的主要功能是当光束通过相位板以后在垂直于光束传播方向 z 的各个不同位置输出平面上的光束均满足特定的分布,即实现单一输入平面到多个输出平面的振幅相位恢复问题,也即三维振幅相位恢复问题.

如图 3(a) 所示,入射光束经光学调制后产生特定三维光场空间分布. 相位板置于 $4f$ 系统的频谱面,输出面与相位板面形成菲涅尔变换关系,形成在传播方向 Z 轴的不同垂直位置 (横截面) 的光场分布,如图 3(b) 所示. 设计流程如下: 选定频谱面上的相位板初始值作为输入函数,通过与输出面的菲涅耳变换关系得到在不同 n 个输出截面的光场分布,光场分布利用复振幅表示,将各光场分布的 n 个振幅量分别用期望值替代,结合原始相位值得到

期望的复振幅分布, 进而对 n 个期望函数进行菲涅尔逆变换得到对应频谱面的复振幅分布, 加权平均后, 得到迭代过程所需的新的输入函数, 并将其引入到下一个循环当中. 在上述计算中, 通常定义各个复振幅所占权重是均等的.

把每个输出平面的约束条件以集合的形式进行描述, 从而得到满足每个输出平面光场不同要求的输入面光场函数, 通过多次迭代过程直到程序收

敛得到最优化结果, 即为我们所要设计的优化算法. 衍射光学元件一般都是复振幅调制, 衍射效率往往很低, 因此设计纯相位调制的光学元件非常重要. 在上述优化算法中, 需要将单一输入平面到多个输出平面的振幅相位恢复问题转变为纯相位恢复问题. 因此, 在优化算法中, 除了对输出面引入约束限制, 同时还需要对输入面进行约束限制, 从而得到纯相位调制的相位恢复算法.

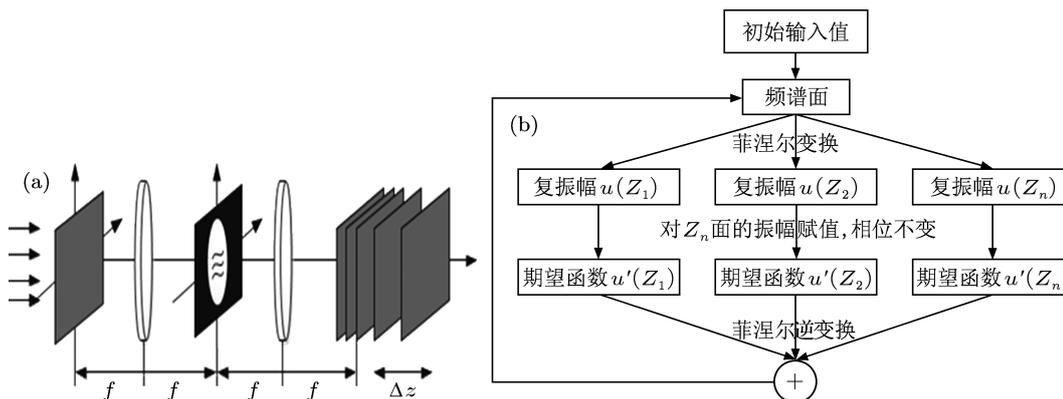


图3 优化算法流程 (a) 单一输入面产生不同轴向位置特定光场的三维空间分布; (b) 投影限制集算法流程图

3.2 高效 DH-PSF 优化

为了获得高效纯相位 DH-PSF 相位板, 在有限设计自由度的情况下, 可利用前一节提到的优化迭代算法来实现. 在设计中, 除了在空域和傅里叶域引入约束外, 还需要对相位板所用的 LG 模式进行约束, 以实现 DH-PSF 相位板的进一步优化. 迭代优化算法的基本思路如下.

首先, 相位板初始值的选择对优化结果的影响非常大, 不合适的初始值会造成其迭代次数的增加以及迭代不收敛等问题. 因此, 在迭代优化算法中需要提供一个有效的相位板初始估计值. 从 LG 模式或者 LG 模式叠加光束的特性来看, 光场相位起决定性的作用. 当 LG 模式的振幅用常量替代, 光束在远场的强度分布仍然与原始 LG 模式光束一样. 也就是说, 即便假设 LG 模式光束的振幅为常量, 如图 1 LG 模式面中, 位于倾斜直线上的 LG 模式的纯相位叠加所表现出的传递特性仍为随离焦连续旋转. 因此, 可以通过 LG 模式传递特性的分解来解释上述特性. 类似于光场的空间频谱分析, 任一光场 $f(x,y)$ 同样可分解为不同 (l,p) 模数的基函数的 $LG_{l,p}$ 线性叠加^[16]. 具体方程为

$$f(x,y) = \sum C_{l,p} \cdot LG_{l,p}, \quad (1)$$

其中系数 $C_{l,p}$ 为

$$C_{l,p} = \iint f(x,y) \cdot LG_{l,p}^* drd\phi. \quad (2)$$

例如 $f(x,y)$ 为位于 LG 模式面内倾斜直线上的 LG 模式叠加后的复振幅函数 $Ae^{-i\phi}$, 如图 2(a) 所示; 则对应的 $C_{l,p}$ 中 (l,p) 在 LG 模式面中分布如图 2(d) 所示; 当振幅 A 为常数, 只保留相位量, 即纯相位形式的光场分布函数, 如图 2(b) 所示; 分解后可以得到 $C_{l,p}$ 为复振幅权值函数, 对应的 (l,p) 在 LG 模式面中分布如图 2(e) 所示, 即这些模式仍然分布在原始倾斜直线所在的带状区域内, 因此在空间传播的双螺旋光束随 z 变化的强度分布仍保持原先的旋转速率, 但效率提高了 21 倍, 同时满足了纯相位和双螺旋光束的要求. 但应注意此时对旁瓣的影响, 即光能利用率的影响还未做到最优化. 因此, 对迭代优化算法来说, 引入该纯相位形式的光场分布作为相位板的初始估计是极为有利的. 另外, 为了加以比较, 引入两组均匀分布随机数作为初始估计, 优化算法的迭代次数增加一倍多才收敛, 并且由于随机量的引入, 迭代的结果也会不尽相同, 如图 4 所示. 其次, 优化的效果较引入纯相位光场分布的结果要差. 综合考虑, 我们选择引入该纯相位形式的光场函数作为初始估计完成程序优化.

其次, 为了得到高效 DH-PSF, 我们还在 LG 模

式域、空间域和频率域中引入以下约束条件: 1) 产生的 PSF 沿传播方向连续旋转, 即 DH-PSF; 2) DH-PSF 的主峰强度达到最大; 3) DH-PSF 相位板满足振幅为常量的纯相位分布.

为了保证产生的 PSF 沿传播方向连续旋转, 需要使合成光场 $f(x,y)$ 按方程 (1) 分解得到的 LG 模式沿 LG 模式面内相应斜线带状区域内分布. 因此, 我们可在 LG 模式面内引入新的约束条件, 即将分解得到的不同 LG 模式重新乘以权重因子 w 获得新的光场分布函数:

$$f'(x,y) = \sum w(l,p) \cdot C_{l,p} \text{LG}_{l,p}, \quad (3)$$

式中权重因子 w 可以利用以下函数计算得到:

$$d(l,p) = \prod_{k=1}^N [(l-l_k)^2 + (p-p_k)^2]^\gamma, \quad (4)$$

式中 l 和 p 表示 LG 模式的模数, l_k 和 p_k 则表

示沿上述斜线对应的 LG 模式的 l, p 值, N 为沿斜线所选取的模式数量, γ 为确定沿斜线条状区域宽度的参量, 则给定 LG 模式在斜线所处位置条带的权重值 $w_{lg}(l,p)$ 由下式给出: $w_{lg}(l,p) = \max[d(l,p)] - d(l,p)$.

由于 DH-PSF 在连续旋转时的光束特性会随着离焦量的变化而发生改变, 为了使 3D 点扩展函数的双主峰强度达到最大, 因此, 在空间域要对 3D 点扩展函数在 $[-\pi/2, \pi/2)$ 旋转范围内的不同轴向位置横截面大小、旋转速率以及强度分布施加约束进行优化. 在选择离焦面个数方面, 为保证迭代优化的收敛性、优化效率以及合适的程序运算时间, 我们在 $[-\pi/2, \pi/2)$ 旋转范围内选用了 9 个不同离焦面进行迭代优化计算. 优化结果使光束沿轴向的横截面强度分布形成类高斯函数形式, 并使 DH-PSF 的双主峰强度值达到最优化.

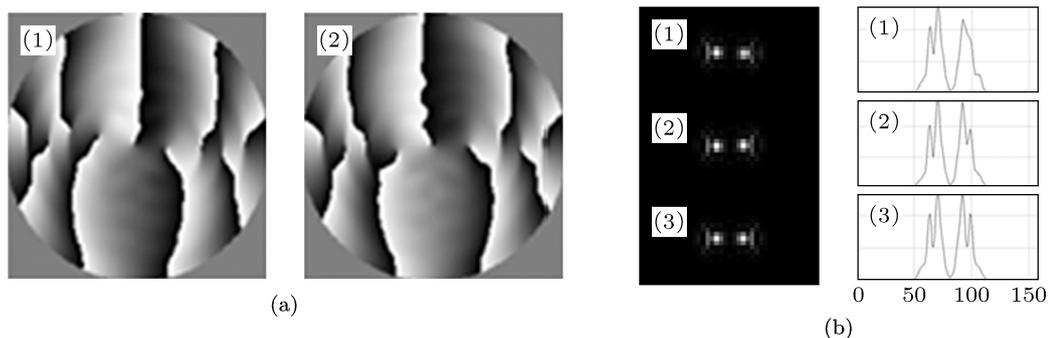


图 4 模拟比较 (a) 随机均匀分布作为设计初始估计优化相位板; (b) 均匀分布结果 (1), (2) 与纯相位初始估计结果 (3) 对比

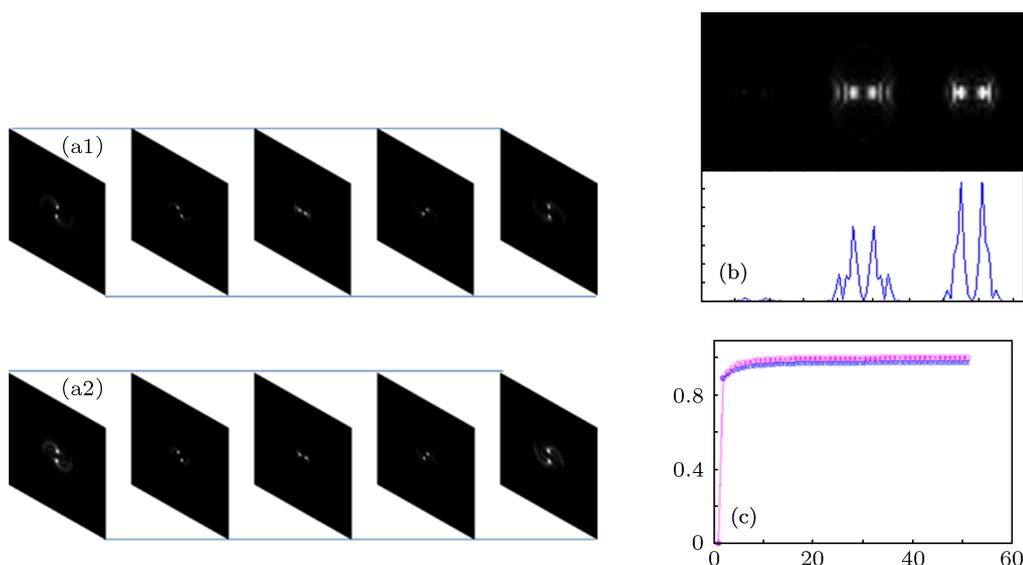


图 5 DH-PSF 模拟结果 (a) 离焦面 5 个层面点扩展函数分布: (a1) 初始条件下分布情况, (a2) 高效 DH-PSF 分布; (b) 原始 DH-PSF(左)、初始条件(中)及高效 DH-PSF(右)焦面位置强度对比; (c) 高效 PSF 迭代过程中两个主峰强度比

虽然初始估计是纯相位光场分布函数,但是由于前面两个约束条件的限制仅仅满足 DH-PSF 的空间传播特征,迭代优化后并非能得到纯相位的光场分布函数,为了保证相位板的光场分布是纯相位的,在频率域引入第三个约束条件,即将 DH-PSF 相位板的振幅量取常数.基于上述约三个约束条件,经迭代优化后,可得到高效 DH-PSF 相位板的最优值,如图 2(c) 和 (f) 所示.

基于上述算法,我们对 DH-PSF 初始估计及高效 DH-PSF 进行模拟比较,经过 20 次迭代后,优化趋于收敛,如图 5(a) 所示.峰值强度得到改善,螺旋点的侧叶强度减弱,见图 5(a2).经对比,初始条件 DH-PSF 主峰强度为原始 DH-PSF 主峰强度的 21 倍,而高效 DH-PSF 主峰的强度值为原始旋转点扩展函数主峰强度的 33 倍,效率明显改善.虽然 DH-PSF 的两个主峰强度通过空间域的约束均获得提高,但是其中一个主峰强度的增长速度相对要稍大于另一个,如图 5(c) 所示.

4 相位片制作及实验

基于上述方法设计了高效 DH-PSF 相位片,设计参数为:通光直径 $D = 5 \text{ mm}$,工作波

长 $\lambda = 670 \text{ nm}$,物镜放大倍率 M 为 100,数值孔径 NA 为 1.4, DH-PSF 螺旋点旋转 180° 对应的轴向距离范围为 $4 \mu\text{m}$.我们借助中国科学院光电技术研究所微细加工光学技术国家重点实验室的微细加工技术在融石英基底上实现该相位片的制备,如图 6(a) 所示.

为了测试 DH-PSF 相位片的性能,搭建了如图 6(b) 所示的光学系统,利用波长 670 nm 的半导体激光器通过空间滤波器后形成点光源,该点光源经过一组焦距 180 mm 透镜 L1, L2 构成的 $4f$ 系统后,成像到 CCD 相机上,在 L2 透镜前焦面即 $4f$ 系统傅里叶面放置相位片后产生双螺旋点扩展函数,其中孔径光阑紧贴相位片放置,光阑根据相位片大小确定.将 L1 透镜置于一维位移台上调整,通过不断移动位移台以得到不同位置处螺旋点扩展函数的分布,将相位片移除即可得到系统所对应的标准点扩展函数图像,如图 6(c) 所示.实验中通过相同系统测试了标准的 PSF 图像,对标准 PSF 及高效 DH-PSF 峰值强度值 I_1, I_2 进行比较:曝光时间 $t = 10 \text{ ms}$ 时, $I_1/I_2 = 5.70$; $t = 20 \text{ ms}$ 时, $I_1/I_2 = 7.06$; $t = 25 \text{ ms}$ 时, $I_1/I_2 = 7.02$,与文献 [18] 提到的强度比相比有所改善.

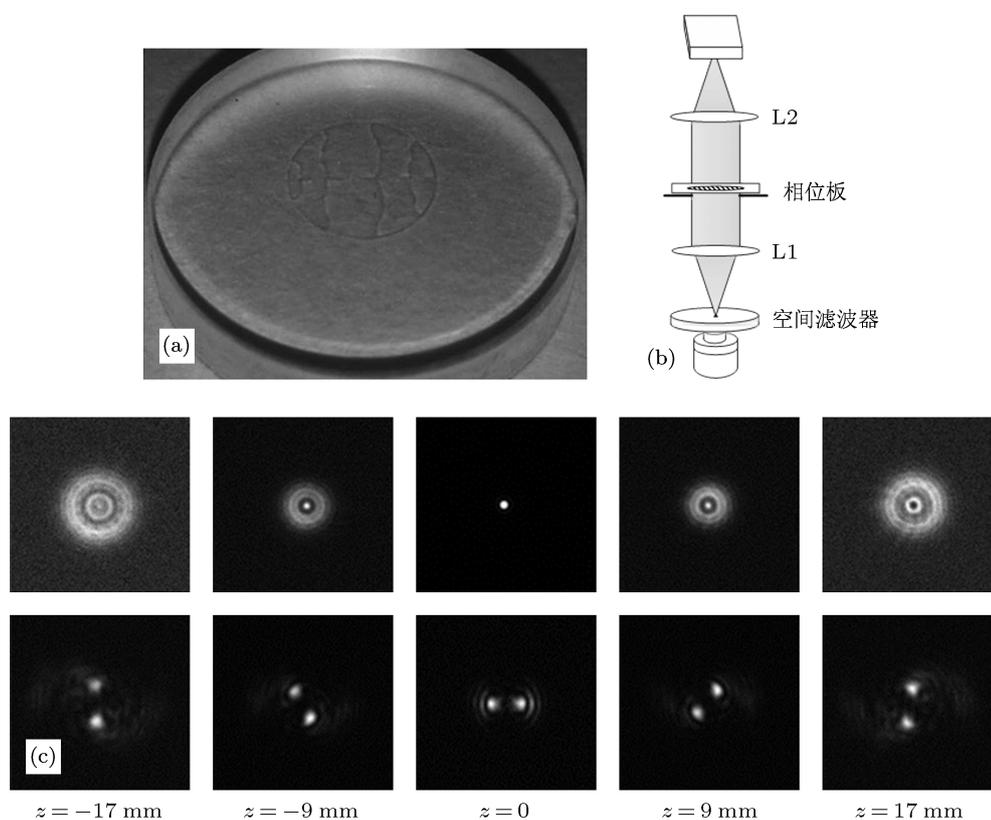


图 6 (a) 高效 DH-PSF 相位片制作; (b) 利用相位片实验验证结构图; (c) 高效 DH-PSF 与标准点扩展函数对比

5 结论

本文对 DH-PSF 的局限性进行分析, 对于 DH-PSF 光能利用率低的问题, 提出相应的解决方法. 在不影响其固有特性的情况下, 通过优化算法提高光能利用效率. 模拟结果表明, 高效 DH-PSF 的光能利用率能够达到原始 DH-PSF 的 30 多倍, 大大提高了其利用率, 使得该方法对于在有限光子数场合的应用成为可能. 同时在加工制备相位板的基础

上, 实验验证了 DH-PSF 相位板的有关性能. 与单分子定位成像方法相结合, 可用于厚样品的超分辨成像及分子的定位追踪, 为我们实现完整细胞的三维超分辨成像创造了非常有利的条件.

感谢中国科学院光电技术研究所微细加工光学技术国家重点实验室的杜春雷研究员、邓启凌研究员和史立芳博士在相位板加工方面给予的支持.

-
- [1] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, Lindwasser O W, Olenych S, Bonifacino J S, Davidson M W, Lippincott-Schwartz J, 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 K, Mason M D 2006 *Biophys. J.* **91** 4258
 - [4] Xie X S, Yu J, Yang W Y 2006 *Science* **312** 228
 - [5] Chen D N, Liu L, Yu B, Niu H B 2010 *Acta Phys. Sin.* **59** 6948 (in Chinese) [陈丹妮, 刘磊, 于斌, 牛憨笨 2010 物理学报 **59** 6948]
 - [6] Herbert S, Soares H, Zimmer C, Henriques R 2012 *Microsc. Microanal.* **18** 1419
 - [7] Jones S A, Shim S H, He J, Zhuang X 2011 *Nat. Methods* **8** 499
 - [8] Ober R J, Ram S, Ward E S 2004 *Biophys. J.* **86** 1185
 - [9] Huang B, Wang W, Bates M, Zhuang X 2008 *Science* **319** 810
 - [10] Ram S, Prabhat P, Ward E S, Ober R J 2009 *Opt. Express* **17** 6881
 - [11] Shtengel G, Galbraith J A, Galbraith C G, Lippincott-Schwartz J, Gillette J M, Manley S, Sougrat R, Waterman C M, Kanchanawong P, Davidson M W 2009 *PNAS* **106** 3125
 - [12] Pavani S R P, Piestun R 2008 *Opt. Express* **16** 3484
 - [13] Pavani S R P, Piestun R 2008 *Opt. Express* **16** 3484
 - [14] Piestun R, Shamir J 2002 *Proc. IEEE* **90** 222
 - [15] Levy U, Mendlovic D, Zalevsky Z, Shabtay G, Marom E 1999 *Appl. Opt.* **38** 6732
 - [16] Piestun R, Schechner Y Y, Shamir J 2000 *JOSA A* **17** 294
 - [17] Greengard A, Schechner Y Y, Piestun R 2006 *Opt. Lett.* **31** 181
 - [18] Grover G, Quirin S, Fiedler C, Piestun R 2011 *Biomed. Opt. Express* **2** 3010

Design and experimental demonstration of high-efficiency double-helix point spread function phase plate*

Li Heng Yu Bin Chen Dan-Ni Niu Han-Ben[†]

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

(Received 31 January 2013; revised manuscript received 4 March 2013)

Abstract

Double helix point spread function possesses continuously rotating invariant features with defocus, and it can be used for performing nano-resolution image of thick samples and for studying singleparticle tracking by combining the single-molecule localization method. However, the inadequacy of the original double helix point spread function is that the transfer function efficiency is very low, so it is difficult to achieve photon limited applications for the bio-imaging. The double-helix point spread function is optimized by introducing an iterative algorithm so that the constraints of the point spread function can be optimized best in three different domains: the Laguerre-Gauss modal plane, the spatial domain, and the Fourier domain. The simulation results show that the peak intensity of high efficiency double helix point spread function is 30 times higher than the original one. The design and fabrication of the phase plate are also proposed. The experimental results are in good agreement with the theoretical predictions, thus proving the feasibility of this method.

Keywords: double helix point spread function, super-resolution imaging, axial localization, optimization algorithm

PACS: 42.30.-d, 42.30.Lr, 87.64.M-, 87.64.-t

DOI: 10.7498/aps.62.124201

* Project supported by the National Basic Research Program of China (Grant No. 2012CB825802), the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 61235012, 61178080, 11004136, 60878053), the Special Funds of the Major Scientific Instruments Equipment Development of China (Grant No. 2012YQ15009203), and the Science and Technology Planning of Shenzhen, China (Grant Nos. JCYJ20120613173049560, GJHS20120621155433884).

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