

超衍射极限相干反斯托克斯拉曼散射显微成像 技术及其探测极限分析*

刘伟²⁾ 陈丹妮¹⁾ 刘双龙¹⁾ 牛憨笨^{1)†}

1) (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)

2) (天津大学精密仪器与光电子工程学院, 天津 300072)

(2013年3月27日收到; 2013年4月17日收到修改稿)

理论上提出一种突破衍射极限限制的相干反斯托克斯拉曼散射显微成像方法, 并对其探测极限进行分析. 通过引入环形附加探测光与艾里斑周边的声子作用, 实现点扩展函数的改造, 提高相干反斯托克斯拉曼散射显微成像系统的横向空间分辨率. 随着分辨率的提高, 信号强度也随之降低, 尤其当应用于生物学、医学研究时, 样品分子数密度通常很低, 这将导致信号探测更加困难. 因此分析系统的探测极限, 确定超分辨体积元内的最小可探测分子数是展开超衍射极限相干反斯托克斯拉曼散射显微成像实验研究的重要前提. 当泵浦光、斯托克斯光、探测光光强均达到极大值, 分辨率约 40 nm 三维空间内, 超衍射极限相干反斯托克斯拉曼散射显微成像系统的散粒噪声信噪比由曝光时间与样品分子数密度决定. 曝光时间若取 20 ms, 探测极限约为 10^3 , 样品分子数目只有大于探测极限, 才能保证信号可以从噪声背景中提取出来.

关键词: 突破衍射极限, 相干反斯托克斯拉曼散射, 非线性光学, 探测极限

PACS: 42.25.Fx, 42.65.Dr, 42.65.-k, 87.64.-t

DOI: 10.7498/aps.62.164202

1 引言

相干反斯托克斯拉曼散射 (coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS) 是一种基于分子键振动的非标记光学显微成像方法^[1]. 相比自发拉曼, CARS 具有高灵敏度、高空间分辨率等优点. 然而受衍射极限限制, 目前 CARS 显微成像技术的空间分辨率仅能达到横向约 300 nm, 轴向约 800 nm. 如何突破衍射极限限制, 获得纳米尺度的空间分辨率成为目前研究 CARS 显微成像技术的首要任务. 近年来, 发展了多种突破荧光显微镜衍射极限的方法, 主要有以下几种: 光敏定位显微 (photoactivated localization microscopy, PALM)^[2]、随机光学重构显微 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)^[3] 和受激发射耗尽 (stimulated emission depletion, STED)^[4,5]. 其中

STED 利用环形光使点扩展函数周边的荧光分子产生受激辐射而被耗尽, 从而将荧光发射区域限制到一个比衍射极限限制激发光斑更小的区域. 由于一般分子不发荧光或发很弱的荧光, 因此, 荧光显微成像方法需对所研究的分子进行复杂的荧光标记处理以提供化学特异性. 荧光标记对活体细胞所引起的毒性, 以及荧光团自身的光致漂白和光损伤都是无法回避的问题, 尤其不利于活体细胞的研究. 超衍射极限 CARS 克服了荧光显微镜需要标记的固有缺陷并具有纳米尺度的分辨本领, 因此, 无须引入外源性标记在分子水平上观察和研究活体细胞的结构和功能, 确定细胞内特定分子的分布将成为可能, 必将对生命科学、细胞分子生物学以及临床医学等的发展产生重要影响.

目前关于超分辨 CARS 显微成像方法的报道主要停留在理论阶段. 这些理论方法可以归结为以下三种^[6-9]: 第一种方法是利用一束环形光使点扩

* 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: hbnui@szu.edu.cn

展函数周边分子的振动能级实现粒子数反转, 环形光周边将不会再有声子与探测光作用产生反斯托克斯信号, 从而使点扩展函数的范围减小; 第二种方法是在点扩展函数周边形成环形局域振荡场, 其与反斯托克斯信号频率相同, 相位相反, 通过干涉使点扩展函数的范围减小; 第三种方法采用结构光照明来提高空间分辨率, 这种方法虽然在实验上已经获得了约 120 nm 的横向空间分辨率, 但是不符合超分辨显微成像技术空间分辨率小于 100 nm 的要求, 不属于真正意义上的超分辨. 此外, 以上几种方法都仅限于对分子的单一化学键成像, 不能准确地识别不同种类的分子. 因此, 我们提出一种基于宽带时间分辨 CARS 的超分辨方法, 称为附加探测光引起声子耗尽 (another probe beam induced phonon depleted, APIPD)^[10], 这种方法通过引入一束环形附加探测光, 与艾里斑周边的声子相互作用, 而艾里斑中心的声子仍与高斯型探测光作用. 两路探测光波长不同, 因此在艾里斑周边和中心产生的反斯托克斯信号波长也不同, 通过滤光的方法将二者分离, 从而对扩展函数进行改造, 实现超分辨. APIPD 不但可以同时分子多个化学键成像, 而且可以有效抑制非共振背景, 因此可以更准确地识别分子. 随着分辨率的提高, 信号强度也随之降低. 只有信号强度大于背景噪声, 才能保证信号被有效提取出来, 超分辨方法才可能实现. 因此, 分析超分辨 CARS 显微成像系统的信噪比成为目前迫切需要展开的工作.

本文从全量子理论角度对时间分辨 CARS 过程进行分析, 从理论上验证了 APIPD 方法的可行性, 得到改造后点扩展函数的表达式. 全量子理论

描述不仅可以简化时间分辨 CARS 过程, 得到信号强度表达式, 更重要的是可以估算泵浦光与斯托克斯光光强的定义域, 这一点是半经典理论分析做不到的. 通过全量子理论计算超分辨体积元内的信号强度, 并对噪声强度进行估算, 由此得到信噪比表达式并估算系统的探测极限, 只有超分辨体积元内的目标分子数目大于探测极限, 才能保证信号可以从噪声背景中分离.

2 理论基础

2.1 全量子理论分析时间分辨 CARS

全量子理论绘景下的时间分辨 CARS 过程可以分解为两步, 如图 1(a) 所示. $|e\rangle$ 和 $|g\rangle$ 分别对应分子的振动、激发态、振动基态. 分子场以及所有的入射光场都是量子化的. 泵浦光、斯托克斯光、探测光均为飞秒脉冲, 当泵浦光的中心频率 ω_L 与斯托克斯光的中心频率 ω_S 之差满足分子某一化学键的振动频率 ω_v 时, 即 $\omega_L - \omega_S = \omega_v$, 共振激发产生相干声子, 这个过程称为受激拉曼散射过程 (stimulated Raman scattering, SRS), 也是全量子理论描述时间分辨 CARS 过程的第一步^[11]. 第二步为具有一定时间延迟的探测光与相干声子相互作用产生反斯托克斯信号. SRS 过程产生的相干声子与非相干声子的主要区别有两点: 第一, 相干声子具有相同的相位, 而非相干声子的相位是杂乱的; 第二, 相干声子处于非平衡态, 属于玻色子, 而非相干声子由温度决定并服从玻色-爱因斯坦分布, $n_v^{\text{Bose}} = [\exp(\hbar\omega/KT) - 1]^{-1}$.

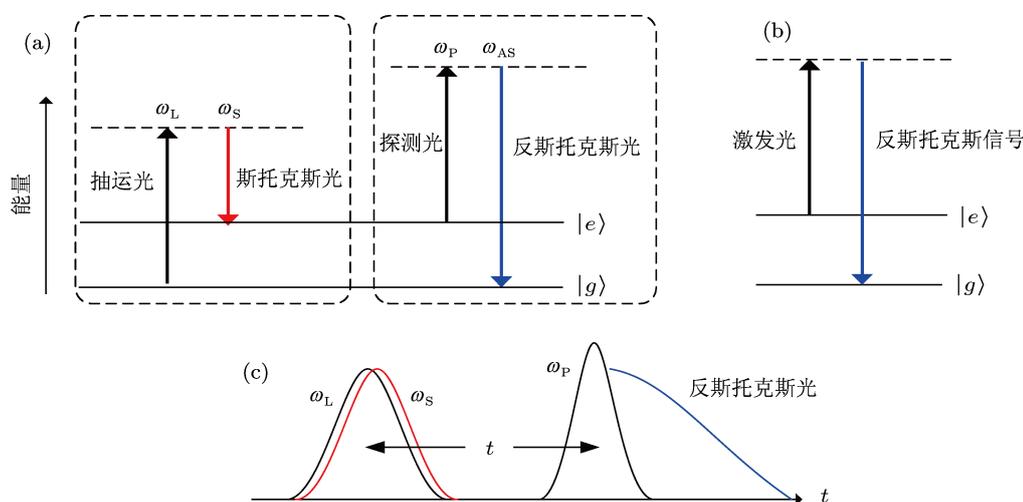


图 1 (a) 时间分辨 CARS 过程, 左为泵浦光与斯托克斯光共同作用共振激发产生相干声子; 右为探测光光子与相干声子相互作用; (b) 自发拉曼反斯托克斯过程; (c) 时间分辨 CARS 激发光的时域关系

首先计算第一步 SRS 过程产生的相干声子数目. 产生相干声子的过程可以描述为: 当泵浦光与斯托克斯光共同作用于分子时, 湮灭一个泵浦光子, 同时产生一个斯托克斯光子与一个相干声子, 产生的相干声子的数目与增加的斯托克斯光子的数目以及减少的泵浦光光子的数目相同. 为简化起见, 假设一个分子只有一个振动键. 基于费米黄金准则 (Fermi's golden rule) 的分子跃迁速率方程, 可以计算单位时间内增加的斯托克斯光子数目, 即产生的相干声子数目 [12].

$$\frac{dn_v}{dl} = N \frac{\pi e^4 \omega_L \omega_S}{2 \epsilon_0^2 \hbar^2 V^2 \mu_L^2 \mu_S^2} \frac{\mu_S}{c} |\alpha_R|^2 n_L^* [n_S^* + 1] \times \delta(\omega_S - \omega_L + \omega_L), \quad (1)$$

式中 n_v 为相干声子数目, N 为体积元 V 内的分子数目, l 为相互作用长度, α_R 为跃迁极化率, ω_L 与 ω_S 为泵浦光与斯托克斯光的中心频率, e 为电子电荷. ϵ_0 为真空介电常数, c 为真空中光速, \hbar 为普朗克常量, δ 为狄拉克函数, μ_L 与 μ_S 分别为泵浦光与斯托克斯光折射率系数, n_L^* 与 n_S^* 为某一时刻泵浦光与斯托克斯光子数目, 分别满足 $n_L^* = n_L - n_v$, $n_S^* = n_S + n_v$. 泵浦光与斯托克斯光均为高斯脉冲, I_L 与 I_S 为聚焦处平均光强, $n_L = I_L \mu_L V / \hbar \omega_L c$, $n_S = I_S \mu_S V / \hbar \omega_S c$. 因此, $n_v \ll n_L, n_S$, (1) 式中 $n_L^* \approx n_L$, $n_S^* \approx n_S$. 产生相干声子的过程为瞬态过程. 原子末态的均匀展宽导致式中 δ 函数可以转换为洛伦兹线形, 当 $\omega_L - \omega_S = \omega_v$ 时,

$$\delta(\omega_S - \omega_L + \omega_L) \rightarrow \frac{\Gamma/\pi}{(\omega_S - \omega_L + \omega_v)^2 + \Gamma^2} = \frac{1}{\pi\Gamma},$$

Γ 为线宽, 与退相时间 T_2 有关, $\Gamma = 1/T_2$. 因此, (1) 式简化计算为

$$n_v = \frac{I_S \mu_S V}{\hbar \omega_S c} \cdot I_L g l, \quad (2)$$

其中

$$g = N_0 \frac{e^4 \omega_S}{2 \epsilon_0^2 \hbar^3 c^2 \mu_S \mu_L} |\alpha_R|^2 \frac{1}{\Gamma}$$

为增益系数, N_0 为分子数密度.

相干声子数目受到饱和作用的影响不可能随入射光功率的增加而无限增加 [13]. 一个激光脉冲作用时间内, 相干声子数目 n_v^{pulse} 的最大值就是体积元内的分子数目, 即所有的分子都处于振动激发态.

$$n_v^{\text{pulse}} = \frac{I_S \mu_S V}{\hbar \omega_S c} \cdot I_L g \tau \leq N, \quad (3)$$

聚焦区域横截面积约为 10^{-9} cm^2 , 对应聚焦体积元 V 约为 $8 \times 10^{-14} \text{ cm}^3$. 增益系数 g 约为 $N_0 \times 10^{-31} \text{ cm/W}$. τ 为脉宽, 约为 100 fs. n_v^{pulse} 由 (3) 式可得, $I_L I_S \leq 10^{18} \text{ W}^2/\text{cm}^4$. 泵浦光、斯托克斯光光子与分子作用是一一对应的, 因此二者最大平均功率密度具有相同的数量级, 约为 10^9 W/cm^2 . 当泵浦光与斯托克斯光的功率密度超过此阈值, 继续增加的光子将不会激发出相干声子, 只会引入光致损伤. 实验过程中由于采用的飞秒激光脉冲的光谱展宽, 泵浦光与斯托克斯光功率密度要略高于理论上的约 10^9 W/cm^2 才能引起声子饱和.

其次分析时间分辨 CARS 过程的第二步. 如图 1(b) 所示, 自发拉曼反斯托克斯过程中参与的非相干声子由热激发产生, 服从玻色-爱因斯坦分布, 相位杂乱无章, 产生的信号方向在空间 4π 立体角范围内 [14]

$$P_A = N \left(\frac{\partial \sigma}{\partial \Omega} \right)_A n_v^{\text{Bose}} I \Omega_{\text{collection}}, \quad (4)$$

P_A 为反斯托克斯信号功率, I 为入射光功率密度, $\Omega_{\text{collection}}$ 为收集角度, 由物镜数值孔径决定, $(\partial \sigma / \partial \Omega)_A$ 为自发拉曼微分散射截面, n_v^{Bose} 为服从玻色-爱因斯坦分布的非相干声子数. 不同于自发拉曼反斯托克斯过程, 时间分辨 CARS 第二步中与探测光作用的声子是由第一步产生的相干声子, 这些声子处于非平衡态并且具有相同的相位. 探测光的延迟时间 t 远小于声子的退相时间, 因此可以忽略声子弛豫. 三束激发的时域关系如图 1(c) 所示. 自发拉曼散射信号方向在空间 4π 立体角范围内, CARS 优于自发拉曼的一个重要特征是其良好的方向性, 信号范围集中在空间 10^{-4} sr 范围内. 因此 CARS 过程中相干声子与探测光光子作用的散射截面提高约五个数量级 [15]. 从某种意义上说, 相干过程相当于增加散射截面. 对低浓度样品, 相邻分子间距离比较大, 相干声子的能量不能在分子间相互传递. 时间分辨 CARS 过程的第二步中, 产生的反斯托克斯光子数为

$$n_{\text{CARS}}^{\text{low}} = n_v^{\text{pulse}} \cdot n_p \cdot \frac{1}{A_{\text{foc}}} \partial \sigma_C \cdot \Delta t f_{\text{rep}}. \quad (5)$$

对高浓度样品而言, 相干声子的能量可以在相邻分子之间自由传递, 反斯托克斯光子数不仅正比于相干声子数目, 同时与体积元内的分子数目有关.

$$n_{\text{CARS}}^{\text{high}} = N \cdot n_v^{\text{pulse}} \cdot n_p \cdot \frac{1}{A_{\text{foc}}} \partial \sigma_C \cdot \Delta t f_{\text{rep}}, \quad (6)$$

$n_{\text{CARS}}^{\text{low}}$ 与 $n_{\text{CARS}}^{\text{high}}$ 分别为低浓度与高浓度样品中产生的信号强度, n_p 为脉冲内的探测光光子数目, N

为体积元内的分子数, Δt 为曝光时间, f_{rep} 为重复频率. 泵浦光、斯托克斯光与探测光通过大数值孔径的物镜聚焦到样品中, 聚焦面面积为 A_{foc} . 由于脉冲内相干声子数目 n_v^{pulse} 正比于分子数密度 N_0 , 因此在低浓度和高浓度样品中产生的时间分辨 CARS 信号强度分别与分子数密度成线性和平方的关系^[16]. 在高、低浓度的交叉区域, 信号强度与分子数密度的关系介于线性与平方之间, 即 $n_{\text{CARS}} \propto N^\alpha$, ($1 < \alpha < 2$). 以酒精的水溶液作为样品, 实验中泵浦光与斯托克斯光中心频率之差等于酒精分子在 2900 cm^{-1} 附近的 C—H 键伸缩振动的频率. 在实验条件相同的前提下, 分别记录不同体积比时的信号强度, 每点记录 20 次取平均以消除信号波动对结果的影响, 经数据拟合后结果如图 2 所示. 实验结果表明, 当体积比小于 20% 时, 信号强度与分子数密度呈严格的线性关系. 实验结果与理论分析相符合.

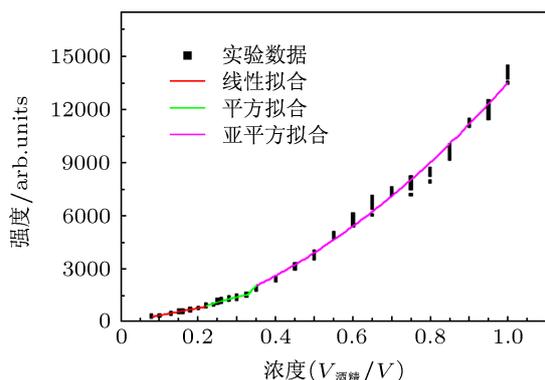


图 2 时间分辨 CARS 信号强度与分子数的关系

2.2 超分辨理论方法

理论上提出一种附加探测光引起声子耗尽 (another probe beam introduced phonon depleted, APIPD) 的超分辨方法. 该方法通过引入一束波长不同的环形附加探测光与艾里斑周边的相干声子作用, 实现点扩展函数的改造. 泵浦光与斯托克斯光均为飞秒激光脉冲, 二者频差满足分子某一振动谱频率, 同时到达样品激发相干声子. 泵浦光与斯托克斯光作用结束时环形光到达, 与艾里斑周边的相干声子作用, 环形光也为飞秒脉冲. 环形光作用结束后, 高斯型探测光到达, 此时艾里斑周边的声子已大部分与附加探测光作用, 只有留在中心的声子能够与高斯型探测光作用. 泵浦光、斯托克斯光和环形光均为飞秒脉冲, 因此环形光与相干声子之间的延迟时间

以及高斯探测光与环形光之间的延迟时间都远小于声子的退相时间, 可以忽略声子的弛豫. 时间延迟可以有效抑制非共振背景, 提高时间分辨 CARS 显微成像系统的灵敏度. 此外, 如果采用飞秒激光脉冲泵浦光子晶体光纤产生的超连续谱光源同时作为泵浦光和斯托克斯光, 对生物分子振动光谱范围 $100\text{—}3500 \text{ cm}^{-1}$, 只要两路探测光的波长差足够大, 可以产生两组波长范围没有交叉的宽带时间分辨 CARS 信号, 选择适当的带通滤光片可将其完全分离. APIPD 超分辨方法结合超连续谱光源, 可以在突破衍射极限限制的同时获取分子完整 CARS 谱信息, 能够更好地识别分子、更准确地定位分子.

基于 2.1 中全量子理论, 对 APIPD 超分辨方法进行理论分析. 时间分辨 CARS 第一步中产生的相干声子数由泵浦光、斯托克斯光强度决定, (2) 式中光强为平均光强, 仅能计算相干声子数目而不能得到其空间分布信息. 将泵浦光 ω_L , 斯托克斯光 ω_S , 环形附加探测光 ω_{P1} 以及高斯探测光 ω_{P2} 光强分别以正余玄函数平方的形式表示其空间分布

$$f_L(r) = I_L^{\text{max}} \cos^2(\pi r \mu_L \sin \alpha / \lambda_L), \quad (7a)$$

$$f_S(r) = I_S^{\text{max}} \cos^2(\pi r \mu_S \sin \alpha / \lambda_S), \quad (7b)$$

$$f_{P1}(r) = I_{P1}^{\text{max}} \cos^2(\pi r \mu_{P1} \sin \alpha / \lambda_{P1}), \quad (7c)$$

$$f_{P2}(r) = I_{P2}^{\text{max}} \cos^2(\pi r \mu_{P2} \sin \alpha / \lambda_{P2}), \quad (7d)$$

因此, 单位时间内聚焦体积元内相干声子的分布为

$$n_v = \frac{f_S(r) \mu_S V}{\hbar \omega_{Sc}} \cdot f_L g l, \quad (8)$$

改造后的点扩展函数表达式为

$$h^*(r) = f_{P2}(r) \cdot \frac{f_S(r) \mu_S V}{\hbar \omega_{Sc}} \cdot f_L g l \times \left[1 - \frac{f_{P1}(r) \mu_{P1} V}{\hbar \omega_{Sc}} \frac{1}{A_{\text{foc}}} \partial \sigma_C \right], \quad (9)$$

$$h(r) = \begin{cases} h^*(r) & 1 \geq \frac{f_{P1}(r) \mu_{P1} V}{\hbar \omega_{Sc}} \frac{1}{A_{\text{foc}}} \partial \sigma_C \\ 0 & \text{其他} \end{cases}. \quad (10)$$

将泵浦光、斯托克斯光、探测光与附加探测光的空分布表达式代入 (10) 式, 求得点扩展函数的半高全宽 (full width at half maximum, FWHM) 为

$$\Delta r = \sqrt{2} \frac{\lambda}{\pi n \sin \alpha \sqrt{3+K}} \approx \frac{0.9}{\sqrt{3+K}} \cdot \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}, \quad (11)$$

(11) 式中忽略四路光的波长差以及折射率差, 统一记为 λ 和 n . 环形附加探测光的引入使产生有效信号的区域缩小到艾里斑中心位置. 分辨率的提高取决于环形光强度因子 $K = I_{P1}^{\text{max}} / I_{P2}^{\text{max}}$. 随着环形光光

强的增加, 点扩展函数的 FWHM 随之降低, 理论上如果 K 趋向于无穷大, 聚焦区域将无限减小, 甚至到亚细胞尺度. 即使没有引入环形光, 即 $K = 0$, 由于非线性效应, CARS 显微成像系统的空间分辨率仍比线性显微镜提高了约 $\sqrt{3}$ 倍.

2.3 超分辨 CARS 显微成像系统的信噪比

APIPD 中, 艾里斑周边的声子与环形附加探测光作用, 只有留在中心的声子与高斯探测光作用产生信号, 因此, 信号强度随分辨率的提高而降低, 也就是说, 分辨率的提高是以牺牲信号强度为代价的. 分辨率越高, 与高斯探测光作用的声子数目越少, 信号强度就会越低. 尤其当 CARS 应用于生物学、医学等研究时, 研究对象往往是分子数密度极低的细胞样品, 这将使信号探测更加困难. 因此, 理论分 CARS 超分辨显微成像系统的探测极限 (detection limit, DL), 确定超分辨体积元内的最小可探测分子数目对 APIPD 实验研究具有重要的指导意义. 只有超分辨体积元内的分子数目大于 DL, 产生的信号强度才能高于噪声电平, 才能得到突破衍射极限限制的 CARS 显微图像.

APIPD 中, 两路探测光与声子之间均存在一定的时间延迟, 因此可以有效抑制非共振背景, 提高信噪比. 超分辨体积元内产生的反斯托克斯光子撞击探测器光敏面产生光电子, 探测器收集的光电子数目 n_e 等于信号光光子数 n_{sr} 与探测器量子效率 η 的乘积, 即 $n_e = n_{sr} \cdot \eta$. 因此, 超分辨 CARS 显微成像系统的信噪比 (signal to noise ration, SNR) SNR_e 可以表示为

$$SNR_e = \frac{n_e}{n_{noise}} = \frac{n_e}{\sqrt{n_e^2 + n_{CCD}^2 + n_{readout}^2 + RIN}}, \quad (12)$$

式中 n_{noise} 为系统噪声, 包括散粒噪声、探测器噪声 (暗电流噪声 n_{CCD} , 读出噪声 $n_{readout}$) 和激光器的相对强度噪声 RIN (relative intensity noise) 等. 暗电流噪声 n_{CCD} 表现为泊松分布, 它是曝光时间内产生的热电子的均方根, $n_{CCD} = \sqrt{I_D \Delta t}$, I_D 为暗电流, Δt 为积分时间. 温度对暗电流噪声的影响很明显, 因此, 带制冷技术的高性能探测器可以在较低的温度下进行工作, 一定曝光时间内, 其暗电流噪声和探测器的读出噪声都可以忽略. 随着激光技术的发展, 激光脉冲的相对强度噪声 RIN 可以被有效抑制, 因此忽略探测器噪声与激光相对强度噪声,

只考虑散粒噪声对信噪比的影响. 散粒噪声服从泊松分布, 强度等于信号强度 n_e 的平方根, 即 $\sqrt{n_e}$.

$$SNR_e = \frac{n_e}{n_{noise}} \approx \sqrt{n_e} = \sqrt{n_{sr} \cdot \eta}. \quad (13)$$

CARS 信号一般位于可见光区域, 在此区域探测器的量子效率通常会高于 90%. 由 (13) 式可知, 为分析系统的散粒噪声信噪比, 首先要得到超分辨体积元内的信号强度. 虽然半经典理论处理 CARS 过程可以得到信号强度表达式, $I_{as} \propto |\chi^{(3)}|^2 I_L I_S I_P$, 其中 $\chi^{(3)}$ 为三阶非线性极化率, I_L, I_S, I_P 分别为泵浦光、斯托克斯光、探测光光强. 然而, 半经典理论得到的信号强度表达式中三束激发光的光强没有定义域, 信号强度可以随光强的增加而无限增强. 三束激发光扮演角色相同, 任意一束光强增加, 信号强度都随之增加. 因此我们采用全量子理论分析时间分辨 CARS 过程, 在得到信号强度的同时, 对激发光的定义域进行分析. 由全量子理论分析时间分辨 CARS 第一步可知, 受相干声子饱和限制, 泵浦光与斯托克斯光光强具有相同的定义域, 当二者功率密度高于该阈值, 增加的光功率将不会引起声子数目以及反斯托克斯信号强度的增加, 激发光的总功率受生物样品损伤阈值的限制. 因此, 全量子理论分析可以成功定义激发光功率密度, 激发光的功率密度决定了信噪比的理论分析结果. 需要指出的是全量子理论分析仅对时间分辨 CARS 过程有效, 对其他四波混频现象无能为力. 由 (5) 与 (13) 式, 对低浓度样品而言, 超分辨 CARS 显微成像系统的中散粒噪声信噪比为

$$SNR_e^{low} = \sqrt{n_v^{sr,low} \cdot n_p^{sr} \cdot \frac{1}{A_{sr}} \partial \sigma_C \cdot \Delta t f_{rep} \cdot \eta}. \quad (14)$$

3 理论分析结果

由于环形附加探测光的引入对点扩展函数的改造, APIPD 超分辨显微成像技术中的空间分辨率不仅受物镜数值孔径与波长限制, 同时与环形光强度因子 K 有关. 由 (11) 式可知, 当 $K = 50$ 时, 横向分辨率 Δr 约为 41 nm, 此时 APIPD 显微成像方法的空间分辨率相比较阿贝衍射极限限制的空间分辨率提高大约五倍. 以 $K = 50$ 为例, 对比传统 CARS 显微镜与 APIPD 超分辨显微镜点扩展函数如图 3 所示.

对低浓度样品, APIPD 超分辨显微成像系统噪声与信号强度相当时就无法将信号从噪声背景中提取出来, 此时体积元内的样品分子数目称为 DL.

当声子数、高斯探测光功率密度均达到最大值, 体积元与曝光时间一定, 由 (13) 式可以计算超分辨系统的探测极限, 当体积元内的样品分子数目小于 DL, 则信号将会淹没在噪声背景中不可探测.

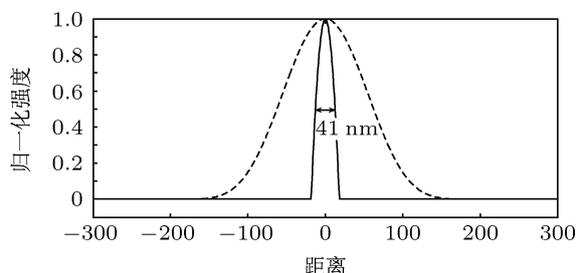


图3 以 $K = 50$ 为例, 对比改造后的点扩展函数 (实线) 与传统显微镜的点扩展函数 (虚线)

相干声子饱和决定了超分辨体积元内的声子数目最大等于分子数目. 生物样品损伤阈值决定入射激光脉冲的平均功率密度小于 $10 \text{ mW}^{[17]}$, 因此当 K 约为 50 (此时对应的横向分辨率约为 40 nm) 时, 附加探测光的峰值功率密度约为高斯型探测光的 50 倍, 在没有引入光致损伤前提下, 由附加探测光的峰值光功率密度决定的高斯探测光功率密度约为 $2 \times 10^{10} \text{ W/cm}^2$. 脉冲重复频率为 80 MHz , 脉宽为 100 fs . 三维空间约为 40 nm 范围内, 体积元 V_{sr} 约 $6.7 \times 10^{-17} \text{ cm}^3$. 以 C—H 键伸展振动 2900 cm^{-1} 为例, 其自发拉曼微分散射截面约为每分子 $2.5 \times 10^{-29} \text{ cm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{sr}^{-1}$, 相干散射截面 $\partial\sigma_{\text{C}}$ 约为 $2.5 \times 10^{-24} \text{ cm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1}$. 探测器的量子效率 η 约为 90%. 以上参数确定的前提下, 当信号刚刚可以从噪声背景中提取出来 ($\text{SNR}_e = \sqrt{2}$) 时, 理论计算探测极限与曝光时间成反比. 长时间曝光可以增加信号强度, 降低读出噪声, 然而探测器暗电流噪声会随曝光时间的增加而增加, 逐渐在

噪声成分中占据主导地位, 导致不可以忽略系统的其他噪声影响而只保留散粒噪声, 同时长曝光时间不利于 CARS 应用于生物学、医学研究, 因此曝光时间通常限制在几十毫秒到几百毫秒. 表 1 所示为探测极限与积分时间的关系. 当曝光时间为几十毫秒时, 此时在三维空间约 40 nm 体积元内, 探测极限的量级约为 10^3 . 当该体积元内的分子数目少于这样一个数量时, 反斯托克斯信号将淹没于噪声背景中不可探测.

表 1 探测极限 DL 与曝光时间的关系

曝光时间	DL
20 ms	$\sim 10^3$
200 ms	$\sim 10^2$

4 结论

基于全量子理论分析时间分辨 CARS 过程, 本文理论上提出一种实现超分辨 CARS 纳米显微成像方法, 并对其探测极限进行分析. 全量子理论分析不仅可以得到信号强度表达式, 而且可以得到激发光功率密度定义域. 理论分析表明, 当忽略其他噪声影响而只考虑散粒噪声影响, 三维超分辨体积元约为 40 nm 范围内, 探测极限与曝光时间成反比, 当曝光时间为几十毫秒的数量级时, 探测极限的量级约为 10^3 . 只有超分辨体积元内的分子数目大于这样一个数量时, 反斯托克斯信号才能从噪声背景中提取出来.

感谢深圳大学光电所郑瑞生教授与屈军乐教授在声子能量传递方面的讨论.

[1] Evans C L, Xie X S 2008 *Annu. Rev. Anal. Chem.* **1** 883
 [2] Hajek K M, Littleton B, Turk D, McIntyre T J, Rubinsztein-Dunlop H 2010 *Opt. Express* **18** 19263
 [3] 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
 [4] Hell S W, Wichmann J 1994 *Opt. Lett.* **19** 780
 [5] Chen D N, Liu L, Yu B, Niu H B 2010 *Acta Phys. Sin.* **59** 6954 (in Chinese) [陈丹妮, 刘磊, 于斌, 牛慧琴 2010 物理学报 **59** 6954]
 [6] Beeker W P, Groß P, Lee C J, Cleff C, Offerhaus H L, Fallnich C, Herek J L, Boller K 2009 *Opt. Express* **17** 22632
 [7] Nikolaenko A, Krishnamachari V V, Potma E O 2009 *Phys. Rev. A* **79** 13823

[8] Hajek K M, Littleton B, Turk D, McIntyre T J, Rubinsztein-Dunlop H 2010 *Opt. Express* **18** 19263
 [9] Nan X, Cheng J X, Xie X S 2003 *J. Lipid Res.* **44** 2202
 [10] Liu W, Niu H B 2011 *Phys. Rev. A* **83** 23830
 [11] Vallée F, Bogani F 1991 *Phys. Rev. B* **43** 12049
 [12] Loudon R 1983 *The Quantum Theory of Light* (Oxford: Clarendon Press)
 [13] El-Diasty F 2011 *Vib. Spectrosc.* **55** 1
 [14] Portnov A, Rosenwaks S, Bar I 2008 *Appl. Phys. Lett.* **93** 41115
 [15] Begley R F, Harvey A B, Byer R L 1974 *Appl. Phys. Lett.* **25** 387
 [16] Cui M, Bachler B R, Ogilvie J P 2009 *Opt. Lett.* **34** 773
 [17] König K 2001 *J. Microsc.* **200** 83

Diffraction barrier breakthrough in coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy and detection limit analysis*

Liu Wei²⁾ Chen Dan-Ni¹⁾ Liu Shuang-Long¹⁾ Niu Han-Ben^{1)†}

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

2) (College of Precision Instrument and Opt-Electronics Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

(Received 27 March 2013; revised manuscript received 17 April 2013)

Abstract

We provide an approach to breaking the diffraction limit in coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy and report a theoretical analysis of detection limit (DL) for it. The additional probe beam, whose profile is doughnut shaped and wavelength is different from the size of Gaussian probe beam, interacts with the coherent phonons at the rim of the diffraction-limited spot to increase the resolution by re-engineering the point spread function of the system. The signal strength reduces with the size of focal volume decreasing, besides, when CARS is used in biology, the molecules of interest are usually in low concentration, which makes the signal detection more difficult. Accordingly, a remaining crucial problem is whether the reduced signal generated in the suppressed focal volume can be detected from the noise background and the analysis of DL, so it is an important precise in implementation of CARS nanoscopy. We describe T-CARS process with full quantum theory and estimate the extreme power density levels of the pump and Stokes beams determined by saturation behavior of coherent phonons. When the pump and Stokes intensities reach such extreme values and total intensity of the excitation beams arrives at a maximum tolerable by most biological samples in a certain suppressed focal volume, the DL of T-CARS nanoscopy correspondingly varies with the exposure time. For an attainable spatial resolution of ~ 40 nm in three dimensions and a reasonable exposure time of 20 ms, the DL in the suppressed focal volume is approximately $\sim 10^3$. The signal can be well detected from the noise fluctuation only if the number of molecules of interest exceeds this limit.

Keywords: break through the diffraction limit, coherent anti-Stokes Raman scattering, nonlinear optics, detection limit

PACS: 42.25.Fx, 42.65.Dr, 42.65.-k, 87.64.-t

DOI: 10.7498/aps.62.164202

* 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 Project of Shenzhen, China (Grant Nos. JCYJ20120613173049560, GJHS20120621155433884).

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