

相干反斯托克斯拉曼散射显微成像技术研究

刘双龙 刘伟 陈丹妮 屈军乐 牛憨笨

Research on coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy

Liu Shuang-Long Liu Wei Chen Dan-Ni Qu Jun-Le Niu Han-Ben

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 65, 064204 (2016) DOI: 10.7498/aps.65.064204

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.064204>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2016/V65/I6>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

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>

976 nm 激光抽运二氧化硅微球级联拉曼散射激光的研究

Study of cascaded raman scattering laser in silica microsphere pumped by 976 nm laser

物理学报.2013, 62(22): 224207 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.224207>

相干反斯托克斯拉曼散射显微成像技术研究*

刘双龙 刘伟[†] 陈丹妮 屈军乐 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)

(2015年9月11日收到; 2015年11月23日收到修改稿)

基于全量子理论对相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)过程进行了分析,在此基础上搭建了单频CARS显微成像系统,获得了不同尺寸聚苯乙烯微球高对比度的CARS显微图像.为了标定成像系统的空间分辨率,采用逐点扫描方式对直径为110 nm聚苯乙烯微球成像,从而重构出系统的点扩展函数.结果表明:该CARS显微成像系统的横向空间分辨率约为600 nm,而由阿贝衍射极限决定的理论空间分辨率约为300 nm.分析了导致分辨率降低的原因,并提出了解决方案.为实现纳米分辨的CARS显微成像打下了坚实的基础.

关键词: 相干反斯托克斯拉曼散射, 显微成像, 分辨率

PACS: 42.65.Dr, 87.64.-t, 42.50.-p

DOI: 10.7498/aps.65.064204

1 引言

随着对生物学和生命科学等研究的深入,人们迫切地希望能从亚显微水平、甚至单分子水平来原位、活体、实时地观测细胞器的结构、功能以及物质间的相互作用,这对于生命活动的理解以及疾病的诊断具有重要的意义.光学显微镜自问世以来,就作为一种观察微细结构的工具而被使用和不断改进.然而,受到光学衍射极限的限制,普通光学显微镜已无法满足人们对亚细胞结构进行观测的要求.电子显微镜的出现,使显微镜的空间分辨率达到纳米量级、甚至埃米量级.然而,电子显微镜所需要的真空环境不利于生物样品的存活,因而无法用于对活体组织和活细胞进行成像.随后出现的扫描隧道显微镜和原子力显微镜虽然也具有十分高的空间分辨率,但它们仅限于对样品表面成像,而且对生物组织也可能造成损伤,无法观测细胞内的精细结构及代谢过程.与普通光学显微镜相比,荧光显微镜具有灵敏度高、荧光对比度高以

及可选择性激发等优点.近年来,基于荧光显微的成像技术得到迅速发展,已具有纳米尺度的空间分辨率,这些超分辨荧光显微技术主要分为近场显微和远场显微两类,其中近场显微方法主要有近场扫描光学显微^[1]、全内反射荧光显微等^[2].这些近场探测技术的成像深度有限,一般为几个纳米到数十个纳米,这就限制了其只能用来对样品表面的结构和组分进行探测,而无法获得样品的内部信息.远场荧光显微方法主要有受激发射损耗显微^[3]、随机光学重建显微^[4]、光敏定位显微等^[5],这些超分辨方法使荧光显微镜的分辨率得到极大提高(可达到10—20 nm),从而使细胞内精细结构的观察成为可能.荧光显微技术需对细胞内分子进行荧光标记处理以提供化学特异性,而荧光标记处理对细胞功能的影响以及荧光探针自身的光致漂白和光损伤都是无法回避的问题.

相干反斯托克斯拉曼散射(coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS)技术可以在无需外援性标记的情况下,根据物质分子的振动或者

* 国家重点基础研究发展计划(批准号: 2012CB825802, 2015CB352005)、国家自然科学基金(批准号: 61235012, 61178080, 11004136)、国家重大科学仪器设备开发专项(批准号: 2012YQ15009203)和深圳市科技计划项目(批准号: JCYJ20120613173049560, GJHS20120621155433884)资助的课题.

[†] 通信作者. E-mail: liuwe1616029@163.com

[‡] 通信作者. E-mail: hbniu@szu.edu.cn

转动特性获取待测样品的分子组成和分布信息, 因此具有良好的化学特异性^[6]. 同时, CARS所采用的近红外激发波长对细胞组织的光损伤较小, 对于长时间的活体研究更为有利; 除此之外, CARS还具有高灵敏度、高空间分辨率、高数据获取速率等优点, 在生物和医学研究领域有着广泛的应用前景. CARS技术与微弱信号探测技术、光学显微技术相结合, 不仅可以对样品进行光谱研究, 还可以对样品内的微细结构进行显微成像. 1982年, Duncan等^[7]首次提出CARS显微成像技术, 并对洋葱表皮细胞进行了CARS显微成像; 随后, Zumbusch等^[8]采用中心波长分别为855 nm, 1155 nm的抽运光和斯托克斯光对聚苯乙烯微球进行了显微成像, 获得了其横向分辨率为0.307 μm 的显微图像; 2002年, Cheng等^[9]采用数值孔径为1.2的水镜获得了0.2 μm 聚苯乙烯微球的横向分辨率为0.28 μm 、纵向分辨率为0.75 μm 的显微图像. 为了提高CARS显微成像系统的空间分辨率, Huang研究组^[10]将径向偏振光代替原有的线偏振高斯光束作为激发光, 将其横向分辨率提高了约10%; Heuke等^[11]采用贝塞尔光束作为激发光, 将其横向分辨率提高到了原有分辨率的1.33倍; Hajek等^[12]提出采用结构照明与宽场CARS显微技术相结合的方法, 理论上可将其横向空间分辨率提高到122 nm. 由于受到光学衍射极限的限制, 这些CARS显微成像仍未能突破光学衍射极限的限制, 而基于近场扫描显微技术、表面增强效应的CARS超分辨显微成像方法无法观测细胞的内部结构^[13-15]. Beeker等^[16-18]提出的点扩展函数耗尽法仍处于理论研究阶段, 这些方案尽管有可能获得纳米的空间分辨率, 但其所需要的化学特异性只能由分子中的单一化学键提供, 而通过单一化学键来实现分子的识别与定位显然是不够准确的, 因而其在实际生物学的应用仍会受到较大限制. 在我们提出的附加探测光引起声子耗尽方案中, 环形分布的附加探测光用来耗尽点扩展函数范围内周边的声子, 而点扩展函数中心的声子仅与高斯型探测光作用, 从而实现点对扩展函数的改造, 以获得纳米的空间分辨率^[19]. 在此基础上, 若采用超连续谱激光作为抽运光与斯托克斯光^[20,21], 可同时激发样品分子中的多个甚至全部的化学键的共振, 获得分子的完整CARS谱, 从而在纳米的空间内准确地识别与定位分子.

实现纳米分辨CARS显微成像是一个世界性

难题, 在此之前, 须将单频CARS显微成像系统优化到最佳状态, 尽可能地消除一切对提高成像空间分辨率不利的因素, 使此成像系统的横向空间分辨率尽可能接近理论极限值, 为实现纳米分辨的CARS显微成像奠定基础. 聚苯乙烯是由苯乙烯单体经自由基加聚反应合成的聚合物, 它在500—1800 cm^{-1} 内具有较明显的拉曼特征峰, 且商用化的聚苯乙烯球粒具有粒径均匀、球型形貌好等优点, 常用来标定拉曼成像系统的空间分辨率. 因此, 本文基于全量子理论对CARS过程进行了分析, 在此基础上搭建了单频CARS显微成像系统, 并对不同尺寸的聚苯乙烯微球进行了显微成像, 获得了具有高对比度的CARS显微图像. 此外, 采用直径为110 nm聚苯乙烯微球对聚焦光斑进行逐点扫描, 得到了该显微成像系统的空间分辨率. 最后对这一结果进行了分析, 找到了一些导致分辨率降低的原因, 并提出了相关解决方案, 这为实现纳米分辨的CARS显微成像打下了坚实的基础.

2 基本原理

CARS过程基于三阶非线性效应, 通常采用两束中心频率不同的激光脉冲分别作为抽运光(ω_P)和斯托克斯光(ω_S)来激发样品分子键共振, 当两束激光脉冲的频差与待测样品中分子固有振动模式的振动频率一致时($\omega_R = \omega_P - \omega_S$), 分子的固有振动模式得到共振增强, 并在探测光(ω_{PR})的作用下产生反斯托克斯信号($\omega_{AS} = \omega_P - \omega_S + \omega_{PR}$), 其能级图如图1所示.

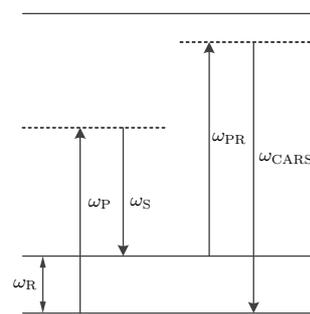


图1 CARS过程的能级示意图

Fig. 1. Diagram of CARS process.

在全量子理论下, CARS过程可分为两步: 1) 具有拉曼活性的分子化学键在抽运光和斯托克斯光的激发下, 产生大量的相干声子; 2) 这些相干声子与探测光光子作用, 产生反斯托克斯光子.

在第一步过程中, 抽运光和斯托克斯光脉冲同时到达样品激发分子键共振, 在湮没一个抽运光光子的同时产生一个斯托克斯光子和一个相干声子, 产生的相干声子数量为^[22,19]

$$\frac{dn_v}{dl} = N \frac{\pi e^4 \omega_P \omega_S}{2 \varepsilon_0^2 \hbar^2 V^2 \mu_P^2 \mu_S^2} \frac{\mu_S}{c} |\alpha_R|^2 n_P^* [n_S^* + 1] \times \delta(\omega_S - \omega_P + \omega_v), \quad (1)$$

其中, n_v 为产生的相干声子数目, l 为相互作用长度, N 为体积元 V 内的分子数目 (同时假设一个分子只有一个振动键), e 为电子电荷; ε_0 为真空介电常数; \hbar 为普朗克常数; ω_P , ω_S , μ_P , μ_S 分别为抽运光、斯托克斯光的中心频率和折射率; ω_v 为分子键的拉曼振动频率; n_P^* , n_S^* 分别为某时刻抽运光光子和斯托克斯光光子的数目; α_R 为拉曼跃迁极化率. 由于相干声子是在某一瞬间产生的, 因而(1)式中的狄拉克函数可近似用洛伦兹线型来表示, 当 $\omega_P - \omega_S$ 趋近于 ω_v 时, 则有

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

式中的 Γ 是与分子退相时间有关的参量. 同时, 抽运光光子和斯托克斯光光子的数目可用抽运光和斯托克斯光强度表示, 其关系式为: $I_j = n_j(\hbar\omega_j c/\mu_j V)$, 因而相干声子数目为

$$n_v = \frac{I_S \mu_S V}{\hbar \omega_S c} \cdot I_P g l, \quad (3)$$

其中, I_P , I_S 分别为抽运光和斯托克斯光强度, g 为增益系数

$$g = N_0 \frac{e^4 \omega_S}{2 \varepsilon_0^2 \hbar^3 c^2 \mu_S \mu_P} |\alpha_R|^2 \frac{1}{\Gamma}. \quad (4)$$

在 CARS 的第二个过程中, 产生的相干声子随后与探测光光子作用, 产生反斯托克斯光子. 对于低浓度样品, 相邻分子间的距离较大, 声子的能量不能在分子间相互传递, 因而产生的反斯托克斯光子数目为

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

式中 n_{Pr} 为探测光光子数目, A_{foc} 为聚焦光斑面积, Δt 为曝光时间, f_{rep} 为重复频率. 而在高浓度样品中, 声子的能量可以在分子间自由传递, 因而产生的反斯托克斯光子数目还与体积元内的分子数目有关, 即

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

由于光波的衍射特性, 激光束被显微物镜聚焦后会在焦平面上产生一个模糊的光斑——艾里斑, 其光斑横向尺寸为 $\sigma = 0.5 \times \lambda/NA$ (半高全宽), 因而入射光在物镜后焦平面的空间光强分布可表示为:

$$f(r) = I_0 \exp\left(-\frac{16 \ln 2 \times NA^2}{\lambda^2} r^2\right), \quad (7)$$

式中, $f(r)$ 和 I_0 分别为入射光的空间强度分布和峰值功率密度, λ 为入射光中心波长, NA 为聚光的数值孔径. 若不考虑抽运光、斯托克斯光的波长差, 并统一记为 λ , 则由(5)—(7)式可以得到系统点扩展函数的半高全宽为

$$\Delta r = \frac{0.5\lambda}{\sqrt{3}NA}. \quad (8)$$

3 聚苯乙烯微球的显微成像

单频 CARS 成像系统如图 2 所示, 钛宝石激光器 (MaiTai HP) 输出的飞秒脉冲来抽运光学参量振荡器 (optical parameters oscillator, OPO) 以产生 CARS 实验中所需的抽运光 (探测光) 和斯托克斯光, 即 OPO 输出的未耗尽基频光 (中心波长为 820 nm、脉冲宽度为 160 fs) 作为斯托克斯光, 信号光 (波长调谐范围为 490—750 nm) 作为抽运光和探测光, 在本实验中未采取时间分辨探测, 即抽运光、斯托克斯光和探测光是同时到达样品的. 实验中所采用的样品为平铺在盖玻片上的聚苯乙烯微球, 当信号光的中心波长调谐到 655 和 725 nm 时, 可实现对聚苯乙烯分子中波数为 3066 和 1603 cm^{-1} 化学键的探测, 此时 CARS 信号的中心波长分别为 545 和 649 nm.

图 2 中的半波片用来调节抽运光 (探测光) 的偏振态, 使抽运光和斯托克斯光为沿同方向振动的线偏振光; 时间延迟系统用来实现抽运光和斯托克斯光间的脉冲同步. 两束光在空间上完全重合后送入一倒置显微镜, 并被显微物镜 (数值孔径为 0.95, 放大倍率为 40) 聚焦于样品上, 三维纳米定位台带动样品移动, 实现聚焦光斑对聚苯乙烯微球的逐点扫描. 产生的 CARS 信号采用数值孔径为 0.85 的聚光镜进行收集, 并经两片短波通滤光片后被光纤光谱仪探测. 此外, 为了提高 CARS 光谱的谱分辨率, 成像系统中还加入了窄带干涉滤光片, 其带宽为 1 nm.

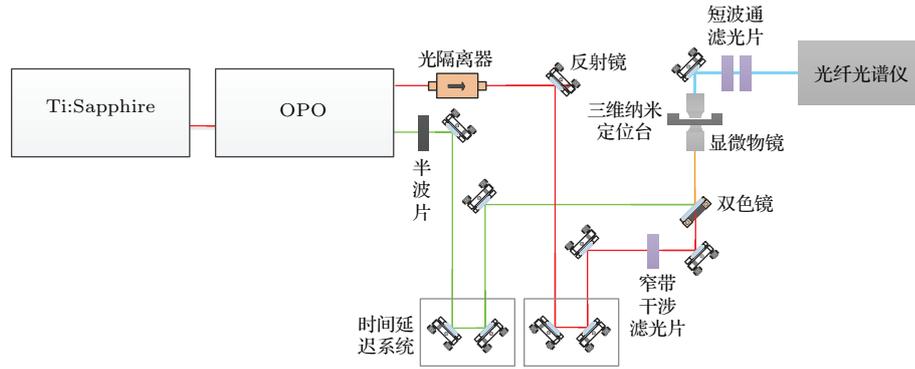


图2 单频 CARS 成像系统的结构示意图

Fig. 2. Schematic of traditional CARS microscope.

基于虚拟仪器开发软件 (LabView), 我们自主编写程序对 Physik Instrumente 公司的三维纳米定位台和 OceanOptics 公司的光纤光谱仪进行控制, 实现聚苯乙烯微球的二维逐点扫描成像, 其原理如图 3 所示. 图中的绿色圆点表示纳米定位台的驻停位置, 蓝色小方格为该驻停点代表的像素, 橙色虚线箭头代表纳米定位台的行进方向. 纳米定位台带动聚苯乙烯微球移动到驻停位置后, 光谱仪记录并存储当前位置的光谱信息, 然后纳米定位台带动聚苯乙烯微球移动到下一个驻停位置, 如此循环下去, 直到完成对整个成像区域的逐点扫描. 因而, 我们在每一个驻停点位置均可获得一组光谱数据, 再根据光谱强度得到各驻停点位置的光强度, 从而重构出聚苯乙烯微球的 CARS 显微图像.

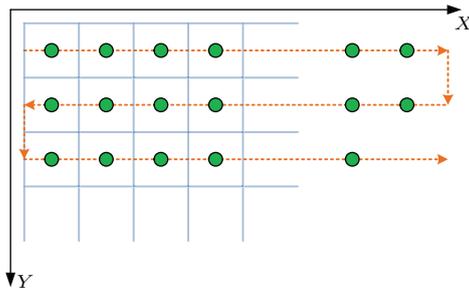


图3 聚苯乙烯微球的二维扫描示意图

Fig. 3. Bidirectional X-Y scanning of polystyrene beads.

首先, 我们对 $4.6 \mu\text{m}$ 的聚苯乙烯微球进行了 CARS 显微成像, 实验中采用的抽运光波长为 655 nm , 斯托克斯光波长为 820 nm , 对应的分子化学键为 3066 cm^{-1} . 当抽运光、斯托克斯光功率分别为 $2.3, 0.5 \text{ mW}$ 时, 得到聚苯乙烯的 CARS 光谱如图 4 所示, 图中的点线为实验中采集得到的 CARS 光谱, 实线为拟合曲线, 纵坐标为 CARS 信

号的相对强度. 从图中可以看出: 产生的 CARS 信号中心波长为 546 nm , 半高宽约为 6.2 nm , 且具有很好的信噪比.

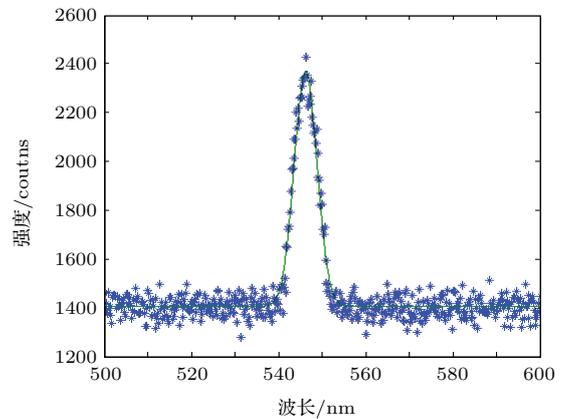


图4 (网刊彩色) 聚苯乙烯微球的 CARS 光谱

Fig. 4. (color online) CARS spectrum of polystyrene beads.

由于聚苯乙烯微球的 CARS 信号仅产生在 $540\text{--}552 \text{ nm}$ 的波长范围内, 因而在逐点扫描过程中, 每个像素上的光强度为该驻停点上 $540\text{--}552 \text{ nm}$ 范围内光谱强度的累积量, 重构出的聚苯乙烯微球 CARS 显微图像如图 5 所示. 图 5 中 (a)—(c) 图像尺寸分别为 $15 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$, $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$, 单步扫描步长为 $0.5, 0.2$ 和 $0.1 \mu\text{m}$, 图中的光强度均采取了归一化处理. 从图中可以看出, 随着扫描步长的减小, 显微图像中聚苯乙烯微球具有更平滑、清晰的边缘, 图像质量明显变好. 图 5 (b) 中显微图像有大有小的原因是: 盖玻片固定时受力不均匀, 导致聚苯乙烯微球的球心不在同一高度上. 调节显微镜使显微物镜的焦平面与聚苯乙烯微球的球心处在同一高度, 此时的 CARS 信号最强, 得到聚苯乙烯微球的显微图像

如图 5(c) 所示, 该图像具有较好的对比度, 并且聚苯乙烯微球的轮廓清晰可见.

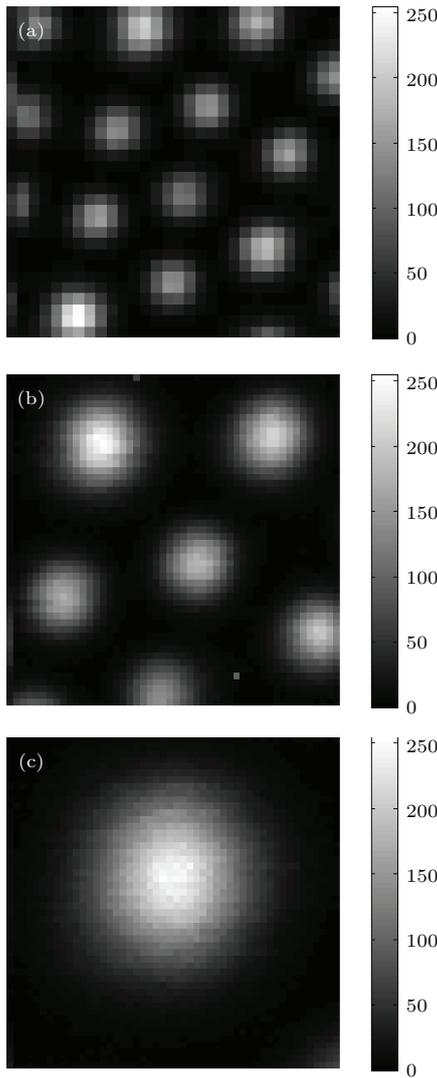


图 5 4.6 μm 聚苯乙烯微球的 CARS 显微图像 (a) 扫描步长 0.5 μm ; (b) 扫描步长 0.2 μm ; (c) 扫描步长 0.1 μm
 Fig. 5. CARS image of 4.6 μm polystyrene beads with step size (a) 0.5 μm , (b) 0.2 μm , (c) 0.1 μm .

在相同的入射光功率下, 我们对 1.37 μm 的聚苯乙烯微球进行了 CARS 显微成像, 结果如图 6 所示, 图像尺寸为 3.5 $\mu\text{m} \times 3.5 \mu\text{m}$, 单步扫描步长为 0.05 μm . 由于聚苯乙烯微球平铺在盖玻片上且微球的直径较小, 而聚焦光斑的轴向尺寸较大 ($2\lambda/NA^2$), 因而每个驻停点上的光强度不仅包含聚苯乙烯微球的 CARS 信号, 也有盖玻片的非共振背景, 如图左下角的“背景噪声”. 当然, 这种非共振背景可以通过时间分辨探测、偏振探测等方法进行抑制 [23–25]. 图中聚苯乙烯微球周围的一圈暗条纹主要是由聚苯乙烯微球和周围非共振介质 (空气) 间的折射率差引起的, 且当聚苯乙烯与周围介质的

三阶非线性极化率间的相位差越大, 这种暗条纹现象越明显 [26].

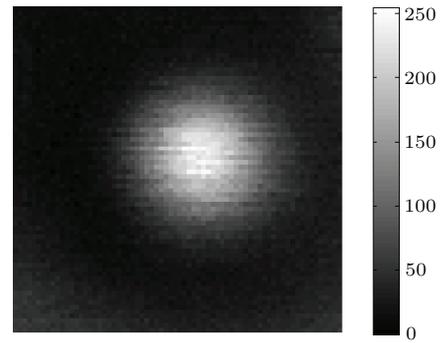


图 6 1.37 μm 聚苯乙烯微球的 CARS 显微图像
 Fig. 6. CARS image of 1.37 μm polystyrene beads.

为了标定出 CARS 显微成像系统的横向空间分辨率, 需采用尺寸更小的聚苯乙烯微球来扫描聚焦光斑, 从而重构出系统的点扩展函数. 由于在相同的抽运光和斯托克斯光功率下, 聚苯乙烯微球尺寸越小, 其产生的 CARS 信号越弱, 且信噪比越低, 因而需适当增加抽运光和斯托克斯光功率. 当抽运光和斯托克斯光功率分别为 7.5 mW, 1.5 mW 时, 110 nm 聚苯乙烯微球的 CARS 显微图像如图 7(a) 所示, 其图像尺寸为 1.5 $\mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$, 单步扫描步长为 0.05 μm . 从图中看出聚苯乙烯微球的结构十分完整, 且其周围也有一圈暗条环, 微球的下半部分 CARS 强度突然变低的原因是显微物镜与聚苯乙烯微球间发生了轻微的离焦, 后续工作会考虑加入轴向防漂移系统来减小这个不利因素对 CARS 显微成像的影响. 图 7(b) 给出了该聚苯乙烯微球 CARS 显微图像沿半径方向的截面图, 图中点线为实际 CARS 归一化强度随位置的变化关系, 实线为拟合曲线, 高斯曲线拟合结果表明该显微图像的半高全宽为 603 nm.

由于 CARS 显微成像采用的是逐点扫描成像, 且扫描的步长较小, 因此 CARS 显微图像的获取是一个卷积的过程, 即: $Im(x, y) = Ob(x, y) * PSF + Noise$, 其中 $Ob(x, y)$ 和 $Im(x, y)$ 分别为物函数与像函数, PSF 和 $Noise$ 分别为成像系统的点扩展函数和探测器噪声. 在计算 CARS 成像系统的空间分辨率时, 需对像函数进行反解卷积计算, 实际上可用一简单的近似算法来代替这一过程 [7], 即: $\Delta = \sqrt{\Delta_1^2 - \Delta_2^2}$ (Δ_1 为像函数的半高全宽, Δ_2 为聚苯乙烯微球等效的半高全宽, Δ 为成像系统的实际空间分辨率). 对于 110 nm 的聚苯乙

烯微球, 其等效半高全宽约为 58 nm, 由此可得到 CARS 显微成像系统的横向空间分辨率为 600 nm.

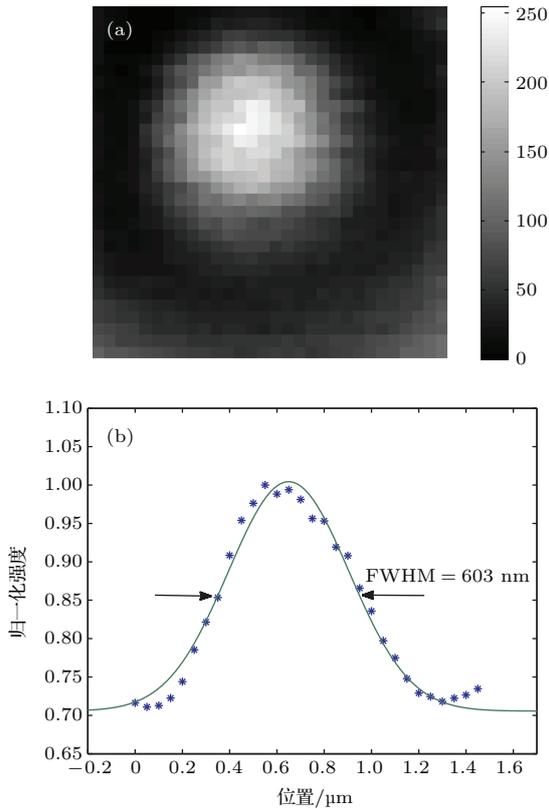


图 7 (网刊彩色) (a) 110 nm 聚苯乙烯微球的 CARS 显微图像; (b) CARS 强度随位置的变化关系

Fig. 7. (color online) (a) CARS image of 1.37 μm polystyrene beads; (b) variation of normalized CARS intensity with position.

上述所得的分辨率远低于 CARS 显微成像的理论空间分辨率, 这是由多方面原因引起的, 如: 光学平台的振动、样品的漂移和抖动、周围环境(空气对流)等. 为了进一步提高 CARS 显微成像的空间分辨率, 可采取以下方法来降低这些不利因素对 CARS 显微成像的影响: 更换具有更好隔振效果的光学平台, 采用快速扫描装置(如扫描振镜)和高灵敏度的探测器以缩短成像时间, 尽量压缩光程以提高成像系统稳定性, 采用半封闭式系统以减小气流对成像的影响等.

4 结 论

本文介绍了 CARS 显微成像的基本原理, 在此基础上搭建了单频 CARS 显微成像系统, 利用该系统对不同尺寸的聚苯乙烯微球进行了显微成像, 获得了其具有高对比度的 CARS 显微图像. 通过逐

点扫描对直径为 110 nm 聚苯乙烯微球进行显微成像, 得到系统的横向空间分辨率约为 600 nm. 由于受到样品的漂移和抖动、周围环境(空气对流)等因素的影响, 该成像系统的横向空间分辨率要远低于其理论值. 在接下来的工作中, 我们将采取相关措施以减小这些因素对系统分辨率的影响, 以期获得接近于理论值的空间分辨率, 这是实现纳米分辨 CARS 显微成像的基础.

参考文献

- [1] Courjon D, Bainier C 1994 *Reports on Progress in Physics* **57** 989
- [2] Axelrod D, Burghardt T P, Thompson N L 1984 *Annual Rev. Biophys. Bioengin.* **13** 247
- [3] Hell S W, Wichmann J 1994 *Opt. Lett.* **19** 780
- [4] Rust M J, Bates M, Zhuang X 2006 *Nature Methods* **3** 793
- [5] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, Lindwasser O W, Olenych S, Bonifacino J S 2006 *Science* **313** 1642
- [6] Begley R F, Harvey A B, Byer R L 1974 *Appl. Phys. Lett.* **25** 387
- [7] Duncan M D, Reintjes J, Manuccia T J 1982 *Opt. Lett.* **7** 350
- [8] Zumbusch A, Holtom G R, Xie X S 1999 *Phys. Rev. Lett.* **82** 4142
- [9] Cheng J X, Jia Y K, Zheng G F, Xie X S 2002 *Biophys. J.* **83** 502
- [10] Lu F, Zheng W, Huang Z 2009 *Opt. Lett.* **34** 1870
- [11] Heuke S, Legesse F B, Akimov D, Hübner U, Dellith J, Schmitt M, Popp J 2015 *JOSA B* **32** 1773
- [12] Hajek K M, Littleton B, Turk D, McIntyre T J, Rubinsztein-Dunlop H 2010 *Opt. Express* **18** 19263
- [13] Namboodiri M, Khan T Z, Bom S, Flachenecker G, Materny A 2013 *Opt. Express* **21** 918
- [14] Lin J, Er K Z J, Zheng W, Huang Z 2013 *Appl. Phys. Lett.* **103** 083705
- [15] Upputuri P K, Wu Z, Gong L, Ong C K, Wang H 2014 *Opt. Express* **22** 12890
- [16] Beeker W P, Groß P, Lee C J, Cleff C, Offerhaus H L, Fallnich C, Herek J L, Boller K J 2009 *Opt. Express* **17** 22632
- [17] Beeker W P, Lee C J, Boller K J, Groß P, Cleff C, Fallnich C, Offerhaus H L, Herek J L 2010 *Phys. Rev. A* **81** 012507
- [18] Beeker W P, Lee C J, Boller K J, Groß P, Cleff C, Fallnich C, Offerhaus H L, Herek J L 2011 *J. Raman Spectrosc.* **42** 1854
- [19] Liu W, Niu H B 2011 *Phys. Rev. A* **83** 023830
- [20] Liu X, Liu W, Yin J, Qu J L, Lin Z Y, Niu H B 2011 *Chin. Phys. Lett.* **28** 34202
- [21] Liu S L, Chen D N, Liu W, Niu H B 2013 *Acta Phys. Sin.* **62** 184210 (in Chinese) [刘双龙, 陈丹妮, 刘伟, 牛憨笨 2013 物理学报 **62** 184210]

- [22] Liu W, Chen D N, Liu S L, Niu H B 2013 *Acta Phys. Sin.* **62** 164202 (in Chinese) [刘伟, 陈丹妮, 刘双龙, 牛憨笨 2013 物理学报 **62** 164202]
- [23] Volkmer A, Book L D, Xie X S 2002 *Appl. Phys. Lett.* **80** 1505
- [24] Cheng J X, Book L D, Xie X S 2001 *Opt. Lett.* **26** 1341
- [25] Potma E O, Evans C L, Xie X S 2006 *Opt. Lett.* **31** 241
- [26] Gachet D, Billard F, Sandeau N, Rigneault H 2007 *Opt. Express* **15** 10408

Research on coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*

Liu Shuang-Long Liu Wei[†] Chen Dan-Ni Qu Jun-Le Niu Han-Ben[‡]

(Key Laboratory of Optoelectronics Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, College of Opto-Electronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

(Received 11 September 2015; revised manuscript received 23 November 2015)

Abstract

In this paper, we analyze the process of coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) based on quantum theory and set up a traditional point-scanning CARS microscope. With this microscope, high-contrast images of polystyrene microspheres are obtained. By scanning polystyrene beads with 110 nm diameter, we reconstruct the point spread function (PSF) of the system. And the full width at half maximum of the PSF shows a lateral resolution about 600 nm, which is larger than the theoretical value (~ 300 nm). Therefore, we propose several resolution-improvement approaches, which lay a strong foundation for the realization of nano-CARS microscopy.

Keywords: coherent anti-Stokes Raman scattering, microscopy, resolution

PACS: 42.65.Dr, 87.64.-t, 42.50.-p

DOI: 10.7498/aps.65.064204

* Project supported by the National Basic Research Program of China (Grant Nos. 2012CB825802, 2015CB352005), the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 61235012, 61178080, 11004136), 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: liuwei616029@163.com

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