

# Analysis of Effect of High Numerical Aperture on the Resolution in STED Microscopy

Hong Zhang, Jihong Feng#, Sen Zhang, Xinwei Gao

College of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

\*Corresponding author: jhfeng@bjut.edu.cn

## Abstract

In this paper we analyze the effect of high numerical aperture (NA) on the depletion beam's intensity distribution in stimulated emission depletion (STED) microscopy. Based on the Debye vector diffraction integral formula, we analyze the STED depletion beam which passes through a vortex  $0/2\pi$  phase plate and then through a high NA lens in the STED microscopy. The research shows that the full width half maximum (FWHM) of the depletion beam decreases when the NA increases; however, the FWHM remains unchanged when the NA varies from 1.15 to 1.30; on the contrary, it increases unexpectedly when NA is 1.35 and 1.4. These results suggest that the resolution in STED microscopy increases when the NA increases generally, but it is not true that the larger the NA is, the higher the resolution will preliminarily be.

**Keywords:** *stimulated emission depletion microscopy; resolution; intensity distribution; numerical aperture; full width half maximum*

## 高数值孔径对 STED 超分辨显微成像技术的影响

张弘, 冯继宏, 张森, 高辛未

北京工业大学, 100124

**摘要:** 在本文中, 我们分析了不同高数值孔径对受激发射损耗 (STED) 显微中损耗光光强分布的影响。根据 Debye 矢量衍射积分公式, 模拟计算了 STED 显微成像中, 损耗光经过  $0/2\pi$  螺旋相位板, 再经过高数值孔径 (NA) 透镜时的聚焦特性。从结果中我们可以得到, 当数值孔径增大时, 损耗光的半高宽 (FWHM) 大小会减小, 但是当 NA 从 1.15 变到 1.30 时, 半高宽保持不变, 当 NA=1.35, 1.4 的时, 半高宽有向上增加的趋势。结果表明: 一般来说当 NA 增大时, STED 显微的分辨率是提高了, 但是不能严格地说, 数值孔径越大, STED 显微镜的分辨率越大。

**关键字:** 受激发射损耗显微; 分辨率; 光强分布; 数值孔径; 半高宽

## 引言

由于受到衍射极限的限制, 生物学家无法利用传统的显微技术观测到小于 200nm 的细胞器内部结构<sup>[1]</sup>。德国马普生物物理化学研究所的 Stefan Hell 教授发明的受激发射损耗显微成像突破了衍射极限, 可以观测到衍射极限外的细胞结构。受激发射损耗显微成像可以快速的进行活体成像, 可选择的荧光探针多, 且对荧光染料依赖程度低<sup>[2]</sup>, 在生命科学中有着重要的价值, 因此, 备受关注。

受激发射损耗显微成像通过引入一束损耗光以受激发射的方式减小有效荧光的发光面积, 激发光激发样品的荧光基团形成一个艾里斑, 损耗光生成中空型的面包圈抑制艾里斑周围的荧光强度, 使我们仅看到中心的强度<sup>[3-4]</sup>。显微成像分辨率直接由聚焦光斑所激发的荧光光斑尺寸所决定, 因此, 在 STED 显微镜中, 压缩聚焦光斑的点扩散函数 (PSF) 成为提高分辨率的重要途径<sup>[5-6]</sup>。

1999 年 Stefan Hell 小组通过对损耗光路的平移使得损耗光束在入射到显微物镜之前和激发光束之间形

成一个横向上的平移，从而使得损耗光束经显微物镜聚焦后的光斑和相应的激发光斑之间形成一个横向错位，这种方法在横向和纵向上都具有一定的拖尾现象<sup>[7]</sup>。2001 年又提出通过采用一块  $0/\pi$  位相板对损耗光束进行相位调制，这种方法需要两束损耗光，结构复杂，不便于调解<sup>[8]</sup>。目前，为了使损耗光为面包圈型的聚焦光斑，实现方法是在高数值孔径下利用  $0/2\pi$  螺旋相位板对入射光进行相位编码<sup>[9-10]</sup>。一束损耗光经过  $0/2\pi$  螺旋相位板后，损耗光的相位发生改变，最后经过大高数值透镜聚焦成面包光圈，数值孔径在形成面包光圈时起到关键作用<sup>[11]</sup>。自 1959 年提出矢量衍射积分公式对激光束经过数值孔径透镜聚焦进行研究以来，许多学者对数值孔径聚焦的研究和应用产生了广泛的兴趣<sup>[12-15]</sup>。在这些研究中，并没有明确的分析高数值孔径对损耗光聚焦光斑光强分布的影响。

在本文中，我们分析了高数值孔径下，损耗光斑的半高宽度 (FWHM) 大小，在显微成像技术，可以用 FWHM 来描述显微镜的分辨率，因为 STED 显微镜成像分辨率直接由聚焦光斑所激发的荧光光斑尺寸所决定。结果表明：一般来说当 NA 增大时，STED 显微的分辨率是提高了，但是不能严格地说，数值孔径越大，STED 显微镜的分辨率越大。

## 1 理论推导

受激发射损耗显微成像通过引入一束损耗光以受激发射的方式减小有效荧光的发光面积，激发光激发样品的荧光基团形成一个艾里斑，损耗光生成中空型的面包圈抑制艾里斑周围的荧光强度，使我们仅看到中心的强度，要实现 STED 显微镜的超分辨成像，必须使照射到荧光样品上的 STED 光为中空形的聚焦光斑，目前的实现方法都是在大数值孔下利用不同的位相板对入射光进行位相调制实现的<sup>[16-17]</sup>。高数值孔径下，偏振光的聚焦光斑形貌特征可以通过 Richard and Wolf 矢量衍射方法进行计算分析。图 1 为矢量聚焦模型。

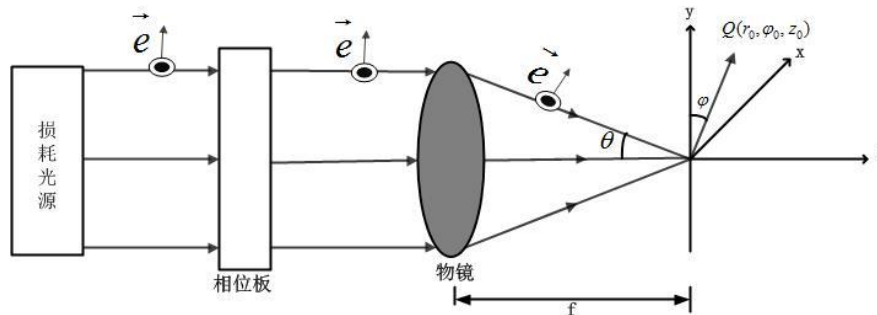


图 1. 损耗光经过  $0/2\pi$  螺旋相位板和高数值孔径的简单装置

通过利用 Richard and Wolf 矢量衍射理论方法，在点 Q 附近的电磁场可以通过 Debye 积分获得<sup>[2]</sup>：

$$\vec{E}(r_0, \varphi_0, z_0) = ic \iint \sin \theta A_1(\theta, \varphi) A_2(\theta, \varphi) \begin{bmatrix} p_x \\ p_y \\ p_z \end{bmatrix} e^{ikn(z_0 \cos \theta + r_0 \sin \theta \cos(\varphi - \varphi_0))} e^{i\varphi} d\theta d\varphi \quad (2-1)$$

其中， $A_2(\theta, \varphi)$  是一个与成像透镜结构相关的  $3 \times 3$  矩阵， $[p_x, p_y, p_z]$  是与入射光偏振对应的单位矩阵， $A_2(\theta, \varphi) = \sqrt{\cos \theta} \cdot v(\theta, \varphi)$ ， $a(\theta) = \sqrt{\cos \theta}$ ， $z_0 = 0$ ，

$$V(\theta, \varphi) = \begin{bmatrix} 1 + (\cos \theta - 1) \cos^2 \varphi & (\cos \theta - 1) \cos \varphi \sin \varphi & -\sin \theta \cos \varphi \\ (\cos \theta - 1) \cos \varphi \sin \varphi & 1 + (\cos \theta - 1) \sin^2 \varphi & -\sin \theta \sin \varphi \\ \sin \theta \cos \varphi & \sin \theta \sin \varphi & \cos \theta \end{bmatrix};$$

入射光是线性偏振光时， $\begin{bmatrix} p_x \\ p_y \\ p_z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$ 。整理得到 (2-2) 式。

$$\vec{E}(r_0, \varphi_0, z_0) = ic \iint_{\Omega} \sin \theta \sqrt{\cos \theta} e^{i\varphi} e^{iknr_0 \sin \theta \cos(\varphi - \varphi_0)} \begin{bmatrix} 1 + (\cos \theta - 1) \cos^2 \varphi \\ (\cos \theta - 1) \cos \varphi \sin \varphi \\ \sin \theta \cos \varphi \end{bmatrix} d\theta d\varphi \quad (2-2)$$

经过一些数学变换的后得到  $x, y$  方向上的振幅分量  $E_x$  和  $E_y$ 。

$$E_x = \pi c \int_0^\alpha \sin \theta \sqrt{\cos \theta} \cos \theta d\theta \left[ \frac{1}{2} J_3(t) \cos 3\varphi - \frac{3}{2} J_1(t) \cos \varphi + \frac{i}{2} J_3(t) \sin 3\varphi - \frac{i}{2} J_1(t) \sin \varphi \right] \\ + \pi c \int_0^\alpha \sin \theta \sqrt{\cos \theta} d\theta \left[ -\frac{1}{2} J_1(t) \cos \varphi + \frac{5i}{2} J_1(t) \sin \varphi - \frac{i}{2} J_3(t) \sin 3\varphi - \frac{1}{2} J_3(t) \cos 3\varphi \right] \quad (2-3)$$

$$E_y = \pi c \int_0^\alpha \sin \theta \sqrt{\cos \theta} (\cos \theta - 1) d\theta \left[ \frac{1}{2} J_3(t) \sin 3\varphi - \frac{1}{2} J_1(t) \sin \varphi + \frac{i}{2} J_3(t) \cos 3\varphi + \frac{i}{2} J_1(t) \cos \varphi \right] \quad (2-4)$$

其中  $t = k * r * n * \sin \theta$ ,  $k = 2\pi / \lambda$ ,  $\theta$  孔径角度,  $\varphi$  为相位延迟因子。  $J_n(t)$  是第一类  $n$  阶贝塞尔函数, 塞尔函数是特殊函数, 只能近似计算。

## 2 结果与分析

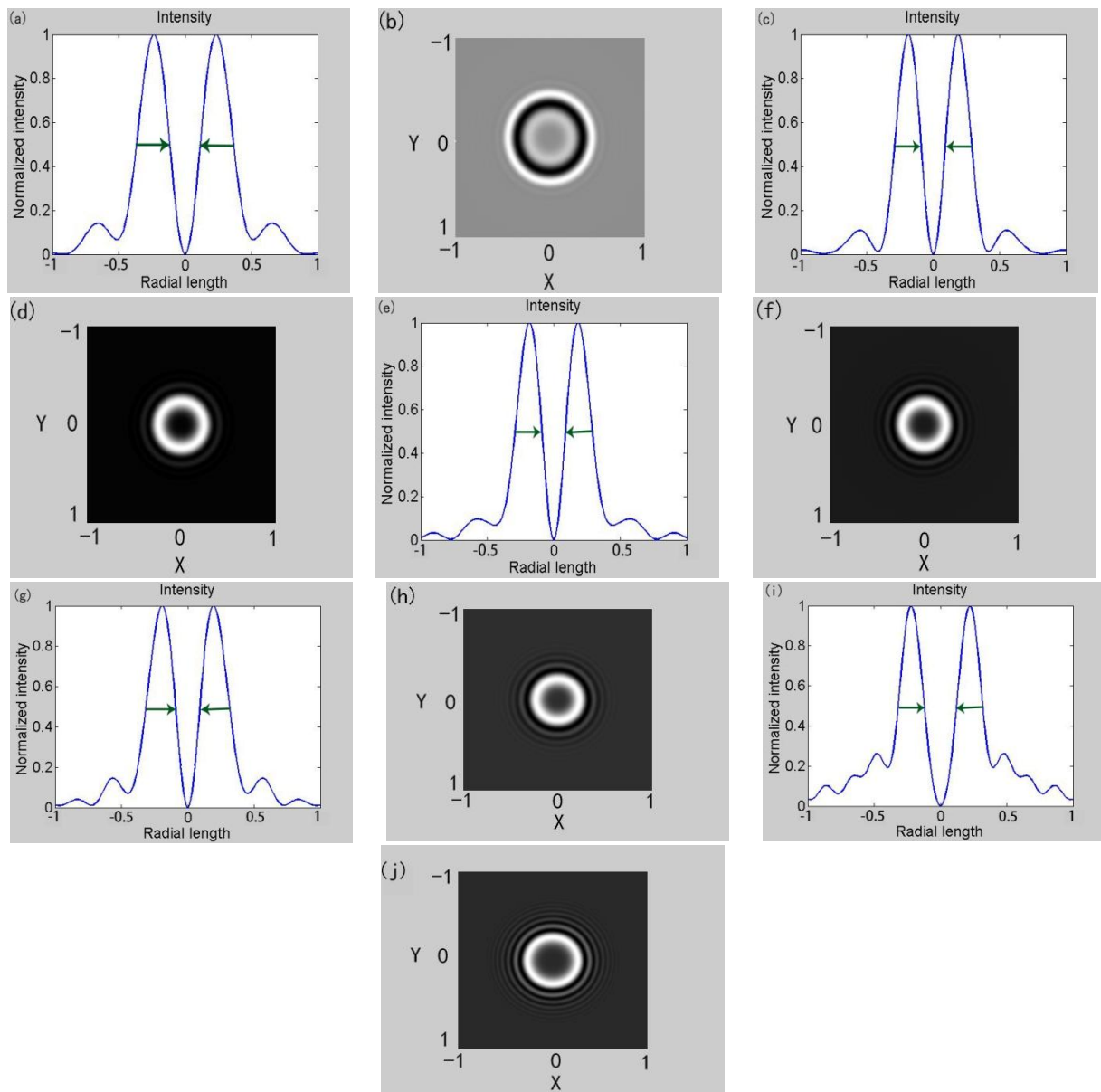


图 2. (a), (c), (e), (g), and (i) 是  $NA=0.8, 1.0, 1.1, 1.2, 1.4$  时, 损耗光聚焦光斑的横截面分布图。

(b), (d), (f), (h), and (j) 是  $NA=0.8, 1.0, 1.1, 1.2, 1.4$  时, 损耗光聚焦光斑的归一化光强分布图。

为了研究高数值孔径对损耗光聚焦光斑光强分布的影响, 用 Matlab 对上述建立的矢量衍射数学模型进行模拟计算, 计算中, 相对折射率为 1.518。在  $NA=0.7-1.4$  之间, 等间隔的选取 15 个数值孔径, 得到损耗

光的光强分布图。NA 为 0.8, 1.0, 1.1, 1.2, 1.4 时损耗光聚焦光斑光强分布图, 如图 2 所示。

为了反应数值孔径和损耗光聚焦光斑的半高宽之间的关系, 计算了上述 15 个不同数值孔径对应的半高宽度, 结果如表 1 所示。数值孔径和半高宽的变化曲线, 如图 3 所示。

表 1 不同数值孔径下的半高宽值

NA	0.70	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	1.00	1.05	1.10	1.15	1.20	1.25	1.30	1.35	1.40
FWHM	0.35	0.33	0.31	0.30	0.29	0.28	0.27	0.26	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.26	0.27

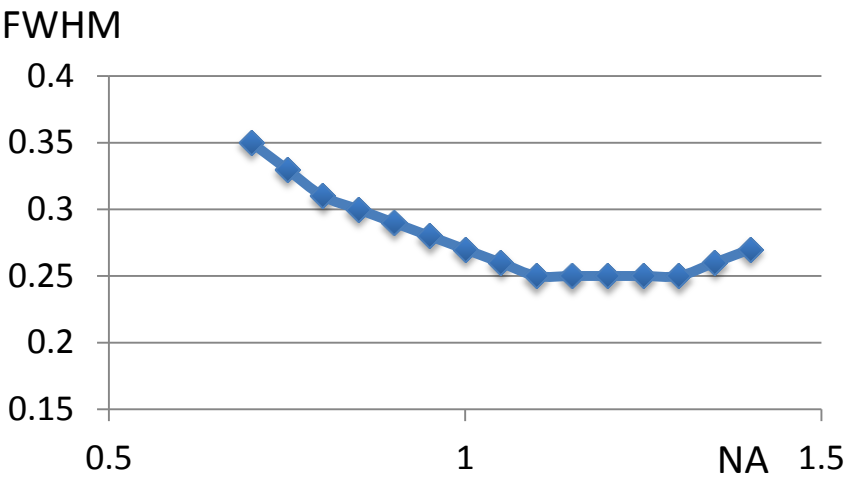


图 3. STED 损耗光的半高宽度随 NA 的变化曲线

一般来说, 当数值孔径增加时, 光学显微镜的分辨率也增加。从图 3 STED 损耗光的半高宽度随 NA 的变化曲线可以看出, 在数值孔径取 0.7-1.1 时, 损耗光聚焦光斑的半高宽度随着数值孔径的增大变窄, STED 的分辨率增加; 当数值孔径从 1.15 增加到 1.30 时, 半高宽的大小保持不变; 更重要的是, 当数值孔径 NA=1.35, 1.4 时, 半高宽有向上增加的趋势

3 结论

总之, 被螺旋相位板整形的激光束经过高数值孔径透镜聚焦后, 数值孔径的大小会影响损耗光聚焦光斑的光强分布。不同的数值孔径会对损耗光聚焦光斑光强分布和半高宽度产生不同影响, 随着数值孔径的增大, 半高宽度逐渐变小, 最后趋于饱和。一般来说当 NA 增大时, STED 显微的分辨率是提高了, 但是不能严格地说, 数值孔径越大, STED 显微镜的分辨率越大。

REFERENCES

[1] S. W. Hell, J. Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy[J]. Opt.Lett., 1994, 19(11): 780-782.

[2] Huang Bo, Babcock Hazen, Zhuang Xiaowei. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells[J].Cell, 2010, 143(7): 1047-1058.

[3] Hao Xiang, Kuang Cuifang, Wang Tingting. Effects of polarization on the de-excitation dark focal spot in STED microscopy[J]. Journal Of Optics, 2010, 12(11).

[4] I. Testa, N. T. Urban, S. Jakobs, et al. Nanoscopy of Living Brain Slices with Low Light Levels[J]. Neuron, 2012, 75(6): 992-1000.

[5] S.W. Hell, Breaking Abbe’s barrier: diffraction-unlimited resolution in far-field microscopy[J]. Cytometry Part A, 2007, 71A(9): 742-742.

[6] G. Moneron, S. W. Hell. Two-photon excitation STED microscopy[J]. Opt.Express, 2009, 17(17): 14567-14573.

- [7] Klar T A , Hell S W. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy[J]. Opt Lett, 1999, 24(14) : 954-956.
- [8] T. A. Klar, E. Engel, S. W. Hell. Breaking Abbe's diffraction resolution limit in fluorescence microscopy with stimulated emission depletion beams of various shapes [J]. Physical Review E, 2001, 64(6): 066613.
- [9] V. Westphal, C. M. Blanca, M. Dyba, et al, Laser-diode-stimulated emission depletion microscopy[J]. Applied Physics Letters, 2003, 82(18): 3125-3127.
- [10] V. Westphal, L. Kastrup, S. W. Hell. Lateral resolution of 28 nm ( $\lambda/25$ ) in far-field fluorescence microscopy[J]. Appl. Phys, 2003, 77(4): 377-380.
- [11] D. Wildanger, J. Buckers, V. Westphal, et al, A STED microscope aligned by design[J]. Optics Express, 2009, 17(18): 16100-16110.
- [12] G.M. Lerman, U. Levy. Tight focusing of spatially variant vector optical fields with elliptical symmetry of linear polarization[J]. Opt. Lett., 2007, 32(15): 2194-2196.
- [13] J. W. M. Chon, X. Gan, M. Gu. Splitting of the focal spot of a high numerical-aperture objective in free space[J]. Appl. Phys. Lett., 2002, 81(9): 1576-1578.
- [14] Chen Baosuan, Pu Jixiong. Focusing of elliptically polarized vortex beams through a high numerical-aperture objective[J]. Chinese Physics B, 2010, (7): 249-254.
- [15] Hao Xiang, Kuang Cuifang, Wang Tingting, et al. Phase encoding for sharper focus of the azimuthally polarized beam [J]. Opt. Lett., 2010, 35( 23): 3928-3930.
- [16] Kuang Cuifang, Hao Xiang, Liu Xu, et al. Formation of sub-half-wavelength focal spot with ultra long depth of focus [J]. Optics Communications, 2011, 284(7): 1766-1769.
- [17] Xue Yi, Kuang Cuifang, Li Shuai., et al. Sharper fluorescent super-resolution spot generated by azimuthally polarized beam in STED microscopy [J]. Optics Express, 2012, 20(16) : 17653-17666.

## 【作者简介】



<sup>1</sup>张弘（1990-），女，汉，硕士研究生，超荧光分辨显微镜，2013-至今，北京工业大学，

Email: zhanghong16@emails.bjut.edu.cn

<sup>2</sup>冯继宏（1965-），男，汉，研究生导师，副研究员，生物医学光子学与仪器，

Email: jhfeng@bjut.edu.cn

<sup>3</sup>张森（1990-），男，汉，硕士研究生，PCR 光电检测，2014-至今，北京工业大学，

Email: zhangsen@emails.bjut.edu.cn

<sup>4</sup>高辛未（1991-），女，汉，硕士研究生，PCR 光电检测，2015-至今，北京工业大学，

Email: gaixinwei@emails.bjut.edu.cn