arXiv:2301.03516v1 [physics.optics] 9 Jan 2023

相干斯托克斯拉曼散射显微镜（CSRS）

SANDRO HEUKE[1,*] 和 HERVÉ RIGNEAULT[1,*]

[1]艾克斯-马赛大学、*CNRS*、马赛中央理工学院、图灵生命系统中心、弗涅尔研究所，法国马赛。[*]通讯作者：*Sandro.Heuke@fresnel.fr* 和 *herve.rigneault@fresnel.fr*

摘要：我们报道了首次实现基于激光扫描的相干斯托克斯拉曼散射（CSRS，读作“sCiSsoRS”）显微成像。为克服 CSRS 成像面临的主要挑战，我们展示了如何利用窄带通滤光片和基于锁相的解调抑制荧光背景。本文展示了聚合物微球、人体皮肤、洋葱细胞、鳄梨果肉以及果蝇幼虫翅盘的近乎无背景 CSRS 成像。最后，我们通过数值分析解释并证明，在紧聚焦条件下，CSRS 能将相当一部分（最高达 100%）CSRS 光子导向后向，从而解决其他相干拉曼技术面临的一项主要障碍。我们相信，这一发现将为诸多技术进步铺平道路，例如表面检测相干拉曼多焦点成像、基于实时激光扫描的光谱学或高效内窥镜检查。

© 2023 Optica出版集团，依据Optica出版集团出版协议

1. 引言

传统明场显微镜能够提供折射率和吸收特性的信息，但无法阐明样品的化学组成。红外吸收和线性拉曼散射可以获取化学指纹 [1,2],，但无法兼顾高空间分辨率和实时成像。相干拉曼成像（CRI）弥补了这一技术空白，将化学键特异性对比与足以实现视频速率图像采集的信号强度结合起来。成熟的 CRI 显微技术包括相干反斯托克斯拉曼散射（CARS） [3, 4] 和受激拉曼散射（SRS） [5–7]。CARS 的广泛应用得益于蓝移的反斯托克斯辐射，它极大地方便了将其与线性荧光分离。在采用近红外激发波长时，标准激光扫描显微镜中的光电倍增管（PMT）可轻松检测蓝移的 CARS 辐射。SRS 之所以广受欢迎，是因为其零差信号放大消除了 SRS 图像中无处不在的非共振四波混频背景，并使日光条件下的测量成为可能。

迄今为止，相干反斯托克斯拉曼散射和受激拉曼散射掩盖了另一种名为相干斯托克斯拉曼散射（CSRS，“剪刀”）的 3rd 四波混频过程 [8–10]。该过程总会出现在任何相干反斯托克斯拉曼散射或受激拉曼散射实验中，并能对分子振子进行几乎相同的映射 [11] ——见图1。与线性拉曼显微镜中的斯托克斯发射类似，相干斯托克斯拉曼散射辐射（$2\omega_S - \omega_p$）相对于泵浦光束（ω_P）和斯托克斯光束（ω_S）的激发频率发生红移。令人惊讶的是，相干斯托克斯拉曼散射尚未应用于激光扫描显微镜。或许，这一疏忽应归因于相干反斯托克斯拉曼散射与相干斯托克斯拉曼散射光谱极为相似 [11]，使得相干斯托克斯拉曼散射乍看之下，要么是在使用可见光光源时，相当于叠加了荧光背景的相干反斯托克斯拉曼散射；要么是在采用近红外激发时，相当于辐射波长落在常见探测器高量子效率范围之外的相干反斯托克斯拉曼散射。然而，相干斯托克斯拉曼散射具有一些对成像极具价值的独特性质。(1) 在存在可利用的电子共振时，相干斯托克斯拉曼散射光谱与相干反斯托克斯拉曼散射光谱不同。例如，应用于炔烃标记染料 [12] 和微生物学中使用的标准染料 [13]时，预共振CSRS可提供互补信息。(2) 相干斯托克斯拉曼散射的红移辐射

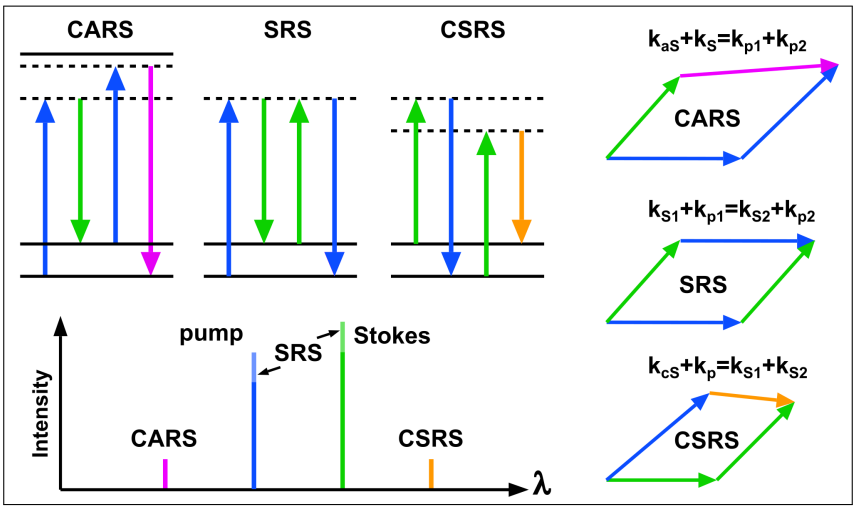

图 1. 平面波照明下相干拉曼成像技术的能级图、相对辐射波长及能量守恒。

成像在紫外或近紫外激发下具有优势，因为相干反斯托克斯拉曼散射光子 [14] 会发生过大的蓝移，无法被高效探测，而受激拉曼散射图像 [15] 则可能受到多光子吸收等各种伪影的影响 [16, 17]。因此，紫外激发的相干斯托克斯拉曼散射有望在相干拉曼成像中实现最高的空间分辨率（$\lambda_{Stokes}/[\sqrt{8}NA]$）。(3) 近红外激发波长与相干斯托克斯拉曼散射相结合，可能因其辐射的散射和吸收较低而实现更深层的组织成像 [18]。(4) 最后，也是最重要的一点：由于相位匹配几何经过调整，相干斯托克斯拉曼散射显微术可配置为使更多光向后向辐射，从而为厚样品研究、实时光谱学、多焦点成像和内窥镜检查带来突破性优势 [19]。在本文中，我们希望通过展示可见光激发光谱范围内的相干斯托克斯拉曼散射显微术，开启激光扫描相干斯托克斯拉曼散射成像领域。为了解决主要障碍，我们将展示如何利用一组带通滤光片抑制线性荧光，并结合基于锁相的检测方案将其几乎完全消除，从而为实现横向分辨率为 < 100nm的近紫外激发相干斯托克斯拉曼散射成像奠定基础。此外，我们将数值研究近红外激发下相干斯托克斯拉曼散射的空间辐射特性，为开展高效落射检测的相干斯托克斯拉曼散射实验铺平道路。

2. 实验结果与讨论

生物医学样品的相干斯托克斯拉曼散射信号很容易被线性荧光淹没。时间门控 [20],采用条纹相机进行时间分辨检测 [21]或偏振滤波，可用于降低或抑制荧光信号。然而，这些方法要么需要对标准相干拉曼显微镜进行重大改造，要么在荧光光强很大时无法奏效。在此，我们利用了皮秒激发下相干斯托克斯拉曼散射具有窄光谱带宽这一特点。因此，只需选择窄带滤光片，即可轻易抑制大部分荧光。市面上有光谱带宽低于 < 1nm 的滤光片，但要选择特定中心波长则需要昂贵的定制方案。因此，我们采用两片价格低廉、带宽约为 15 nm 但中心波长不同的带通滤光片组合。此外，我们通过相对于入射光束倾斜（<20°）来微调滤光片透射率。这样，两片倾斜调节带通滤光片便形成一条用于相干斯托克斯拉曼散射信号的锐利透射线（半高全宽<3nm），同时滤除大部分自发荧光。

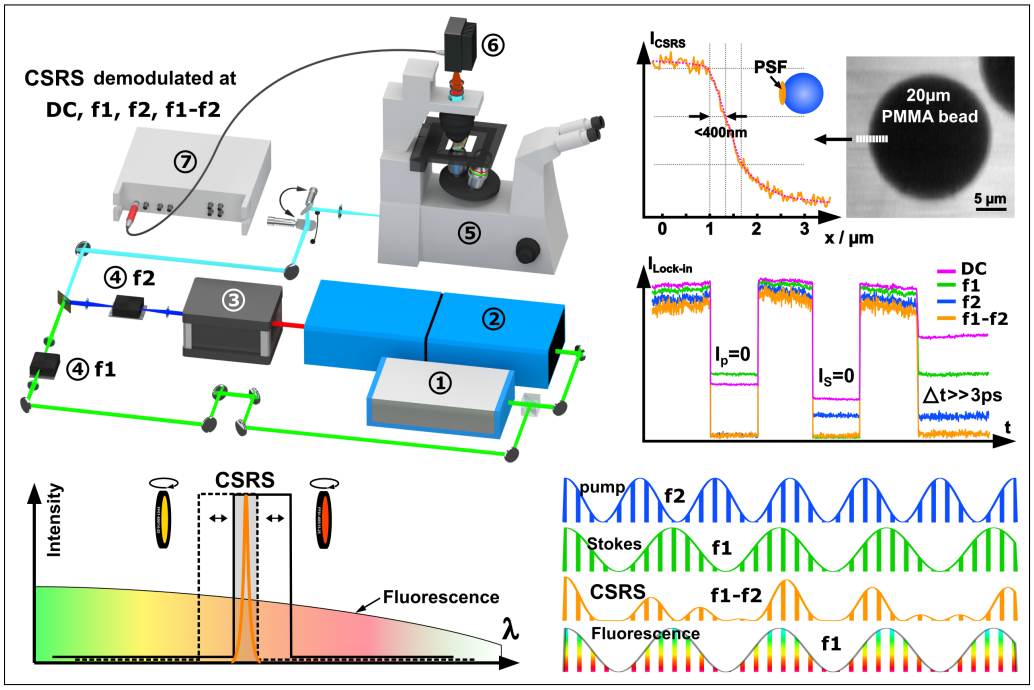

图 2. CSRS 实验装置与表征。左下：通过 2 个角度调谐窄带通滤光片将 CSRS 信号与荧光分离。右下：分别以射频 f1 和 f2 对斯托克斯光束和泵浦光束进行强度调制，可进一步抑制荧光。在 f1-f2 处获得无荧光的 CSRS 信号。中右：将泵浦脉冲与斯托克斯脉冲在时间上分离，并阻断激发光，表明与在 f1、f2 或直流频率处获得的 CSRS 信号相比，在解调频率 f1-f2 处对荧光背景的抑制效果更佳。右上：聚甲基丙烯酸甲酯微球与橄榄油界面处的强度分布表明，横向分辨率为 <400nm。左上：CSRS 实验示意图。1 镱光纤激光器，2 光学参量振荡器 (OPO)，3 二次谐波产生 (SHG)，4 声光调制器 (AOM)，激光扫描显微镜 (LSM)，6 光电倍增管 (PMT)，7 锁相放大器。

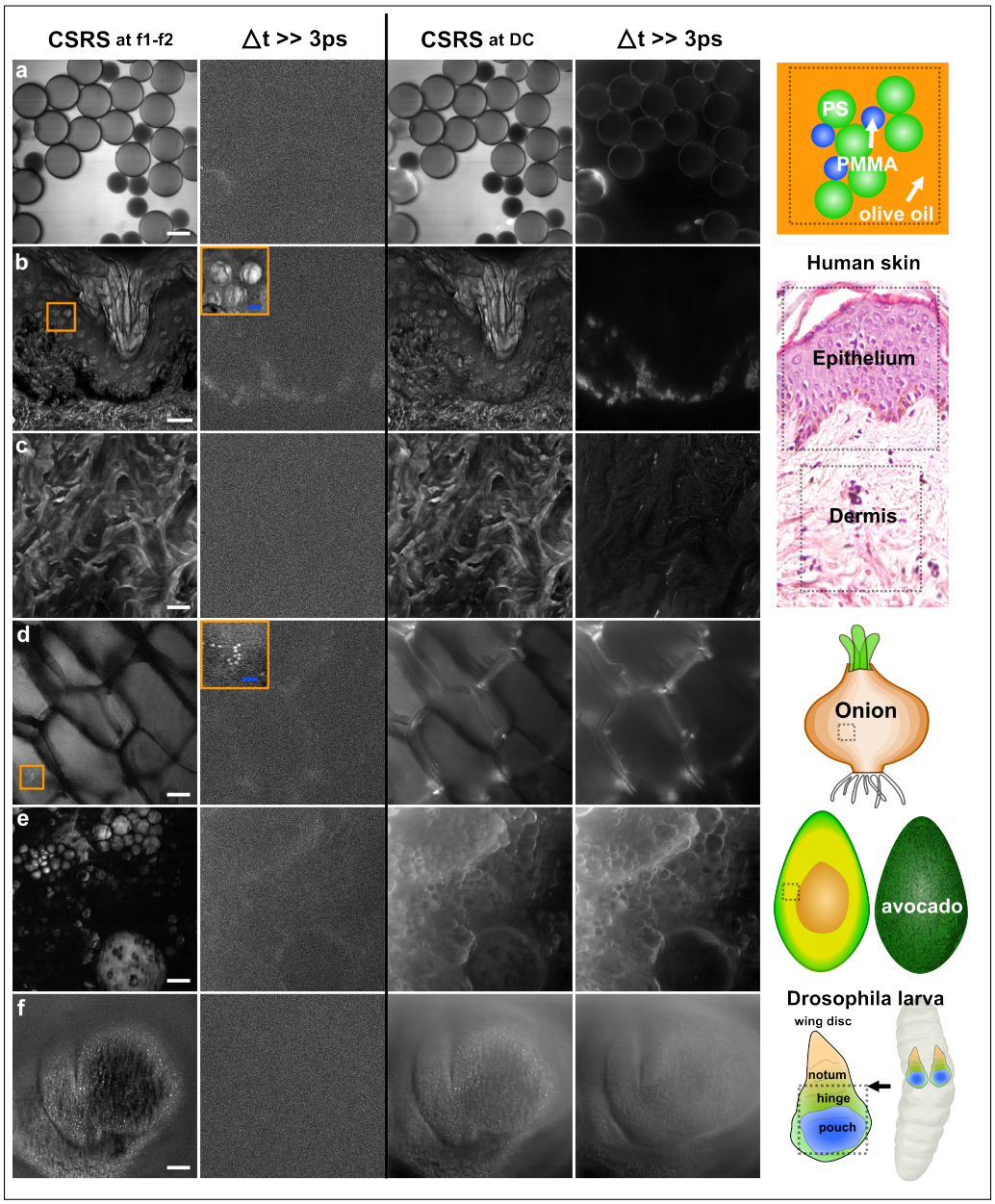

图 3. 2850 cm^{-1} 处的 LSM-CSRS。左列和右列分别显示在频率 f1-f2 = 1.47 MHz 和 0 Hz（直流）下解调的相干斯托克斯拉曼散射图像。为估算残余荧光水平，右侧展示了泵浦脉冲与斯托克斯脉冲在时间上没有重叠时采集的图像。a）聚苯乙烯（PS，30μm）和聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA，20μm）微球在橄榄油中的混合物。b）和 c）20μm 厚人体皮肤切片的上皮和真皮。d）洋葱细胞。e）鳄梨果肉中的脂滴。d）果蝇幼虫的翅盘。白色和蓝色比例尺分别为 20μm 和 5μm。

作为荧光判别的第二种方法，我们利用 CSRS 强度同时取决于两种激发光颜色这一特点，而线性荧光则只随泵浦激光或斯托克斯激光的强度变化。因此，将泵浦光束和斯托克斯光束分别以 f1 和 f2 调制，并在 f1-f2（或 f1+f2）处对信号进行解调，可仅获得依赖于两种激发光颜色的非线性信号。因此，f1-f2 解调还能够在单色激发下，将 CSRS 信号与双光子激发荧光（2PEF）区分开来。需要指出的是，双重调制也会对双色双光子荧光（2C-2PEF）敏感。不过，我们将在实验中发现，在我们的 CSRS 方法中，天然 2C-2PEF 的发射强度可以忽略不计。

为了将相干斯托克斯拉曼散射显微术应用于激光扫描显微镜，我们选择了 445nm（泵浦）和 515nm（斯托克斯）的可见光激发波长，原因如下：（1）近紫外激发下的相干斯托克斯拉曼散射是一个潜在的重要应用领域，因为相干反斯托克斯拉曼散射信号落在紫外范围内，而由于匹配发色团浓度较高，受激拉曼散射伪影会增强。（2）红移的相干斯托克斯拉曼散射辐射很容易通过普通光电倍增管探测。（3）与近红外激发相比，荧光伪影会增强。因此，如果在可见光激发下能够获得纯净的相干斯托克斯拉曼散射信号，我们的方法同样适用于近红外激发下的相干斯托克斯拉曼散射。图2a示意展示了实验实现、光谱滤波和双重调制。我们的实现方式与标准受激拉曼散射装置相似，不同之处在于：我们使用可见光激发波长，对两束光而非仅一束进行调制，并将光电二极管替换为连接到锁相放大器的光电倍增管。有关该装置的更多信息，请参见“方法：实验装置”部分。为了量化荧光抑制水平，我们研究了天然橄榄油在 2850 cm^{-1} 处的信号，分别在阻断斯托克斯光束或泵浦光束，以及移除时间脉冲重叠时进行测量。图2绘出了锁相放大器输出信号随解调频率变化的关系，频率分别为 0 Hz（直流）、f1、f2 和 f1-f2。可以看出，直流通道含有大量荧光，而在 f1 和 f2 通道中，这种伪影已得到抑制。然而，只有当激发脉冲在时间上不重叠时，差频通道 f1-f2 才会变暗。在另一项实验中，我们对橄榄油与一个尺寸为 20μm 的有机玻璃（聚甲基丙烯酸甲酯）微球之间的界面进行了成像，以估算数值孔径为 1.45 的激发物镜的横向分辨率，见图2。根据这一“刀口”相干斯托克斯拉曼散射强度剖面，我们可以推断横向分辨率低于 400nm。与预期的 $\lambda_{Stokes}/[\sqrt{8}NA]$= 515nm/[√81.49]=120nm 之间的差异，可归因于激发物镜未被充分填充以及油/微球界面弯曲。在确认获得了高分辨率、无荧光的相干斯托克斯拉曼散射图像对比度后，我们研究了激光扫描显微镜-相干斯托克斯拉曼散射是否适用于对具有不可忽略荧光水平的各种物体进行振动成像。在图3中，我们展示了测试样品和生物医学样品在直流和 f1-f2 频率下解调得到的相干斯托克斯拉曼散射图像，泵浦脉冲与斯托克斯脉冲分别处于（不）重叠状态。图像按相干斯托克斯拉曼散射信号与荧光信号的比值排列，最顶部的比值最高。比较图3a中的直流图像与 f1-f2 图像可知，对于油中的聚合物微球，只需窄带滤光片即可进行相干斯托克斯拉曼散射成像。对 20μm 厚的人体皮肤切片中的上皮和真皮进行成像时，直流通道的相干斯托克斯拉曼散射图像首次出现可见伪影，见图3b和3c。对于上皮，基底层中的黑色素会产生明显的荧光伪影。真皮中的伪影可归因于胶原蛋白和弹性蛋白的自发荧光 [22]。在对洋葱细胞、鳄梨果肉中的脂滴以及果蝇幼虫翅盘进行相干斯托克斯拉曼散射成像时，直流通道中观察到的荧光量进一步逐步增加。从图3第二行可再次确认，几乎没有荧光泄漏到 f1-f2 相干斯托克斯拉曼散射通道中，这是估算目标分子基团真实浓度的重要条件。然而，无法确定这 3 种样品中荧光的来源，但可能来自还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、黄素和叶绿素。

从更广泛的角度来看，我们想指出，其他非线性显微技术也能从窄带滤光片与解调相结合的方案中大大受益，从而抑制杂散背景信号。例如，即使在近红外激发下，植物叶片中叶绿素的双光子激发荧光信号也很容易淹没任何相干反斯托克斯拉曼散射或二次谐波产生图像对比度。对激发光进行双重调制并结合基于锁相的解调，可以净化信号，降低系统对室内光等其他光源的灵敏度，并恢复后续图像分析的可靠性。在排除相干斯托克斯拉曼散射图像对比度不可靠这一反对理由后，下一节我们将介绍一个虽不直观却能带来突破的相干斯托克斯拉曼散射显微术论点：增强的后向辐射是实现有效上向相干斯托克斯拉曼散射探测的先决条件。

3. 数值结果

本节将展示并阐释相干斯托克斯拉曼散射（CSRS）优越的后向辐射特性。在进行计算之前，我们先从启发式角度考察 CSRS 的动量守恒定律，并将其与相干反斯托克斯拉曼散射（CARS）进行比较。在平面照明下，动量守恒定律可写为 $K = k_P - k_S + k_P - k_{aS}$（CARS）[23]，以及 $K = k_S - k_p + k_S - k_{cS}$（CSRS）；其中，K、$k_P$、$k_S$、$k_{aS}$ 和 k_{cS} 分别表示物体、泵浦（探测）光束、斯托克斯光束、反斯托克斯辐射和相干斯托克斯辐射的波矢。请注意，对于均匀样品，这些定律也称为相位匹配条件，并可简化为 $k_p + k_P = k_S + k_{aS}$（CARS）和 $k_S + k_S = k_p + k_{cS}$（CSRS）。在聚焦条件下，单个波矢由入射波矢的分布取代，该分布覆盖球面的一个球冠。为确定能够有效探测的物体空间频率（K），必须找出激发波矢与发射波矢的所有组合。此操作等价于对照明埃瓦尔德球球冠与探测埃瓦尔德球球冠进行卷积。忽略偏振效应后，该卷积结果（每段弧简化为3个点）以二维形式展示于图4a中。

显然，不存在能够覆盖物体空间原点 K(0,0,0) 的上向散射相干反斯托克斯拉曼散射光子矢量组合。因此，均匀样品（如橄榄油）不会产生任何后向辐射。相反，具有高物体空间频率的结构（如小型聚合物微球或层状材料）会产生落射式相干反斯托克斯拉曼散射辐射。过去，落射式相干反斯托克斯拉曼散射偶尔被视为一种尺寸选择性对比方式，仅能突出小物体 [24]。虽然这一说法适用于大多数生物医学样品，但也确实存在大型结构，例如囊泡中的多层脂质，它们同样会向后向发射强烈的相干反斯托克斯拉曼散射辐射。因此，与其将落射式相干反斯托克斯拉曼散射视为尺寸选择性技术，不如将其视为一种探测高物体空间频率的技术。将探测波长切换至红移相干斯托克斯辐射后，所覆盖的物体支持会发生显著变化，并将原点 K(0,0,0) 纳入其中。由于探测波矢的大小减小（$|\mathbf{k}_{cS}| \ll |\mathbf{k}_{aS}|$），且泵浦矢量以复共轭形式参与运算（见公式3），现在可以找到覆盖原点 K(0,0,0) 的矢量组合。因此，即使是均匀物体也会产生相当强的 Epi-CSRS。尽管如此，由于 Epi-CSRS 物体支持的质心（即图4a中的灰色云团）与 K 空间原点并不重合，Epi-CSRS 图像也会突出含有较高频率的物体。

为了探究如何提高 Epi 与前向 Epi-CSRS 的比值，以及使用 Epi-CSRS 探测哪些物体空间频率的效率最高，我们进行了有限元模拟，结果汇总于图4b-e。数值计算所采用的方程以及重要参数见附录——数值计算。根据动量守恒定律和图4a中的矢量图，可以很容易地理解，增大泵浦波长与相干斯托克斯波长之间的波长差，可大幅降低对斯托克斯光束采用极大入射照明角的要求。此外，

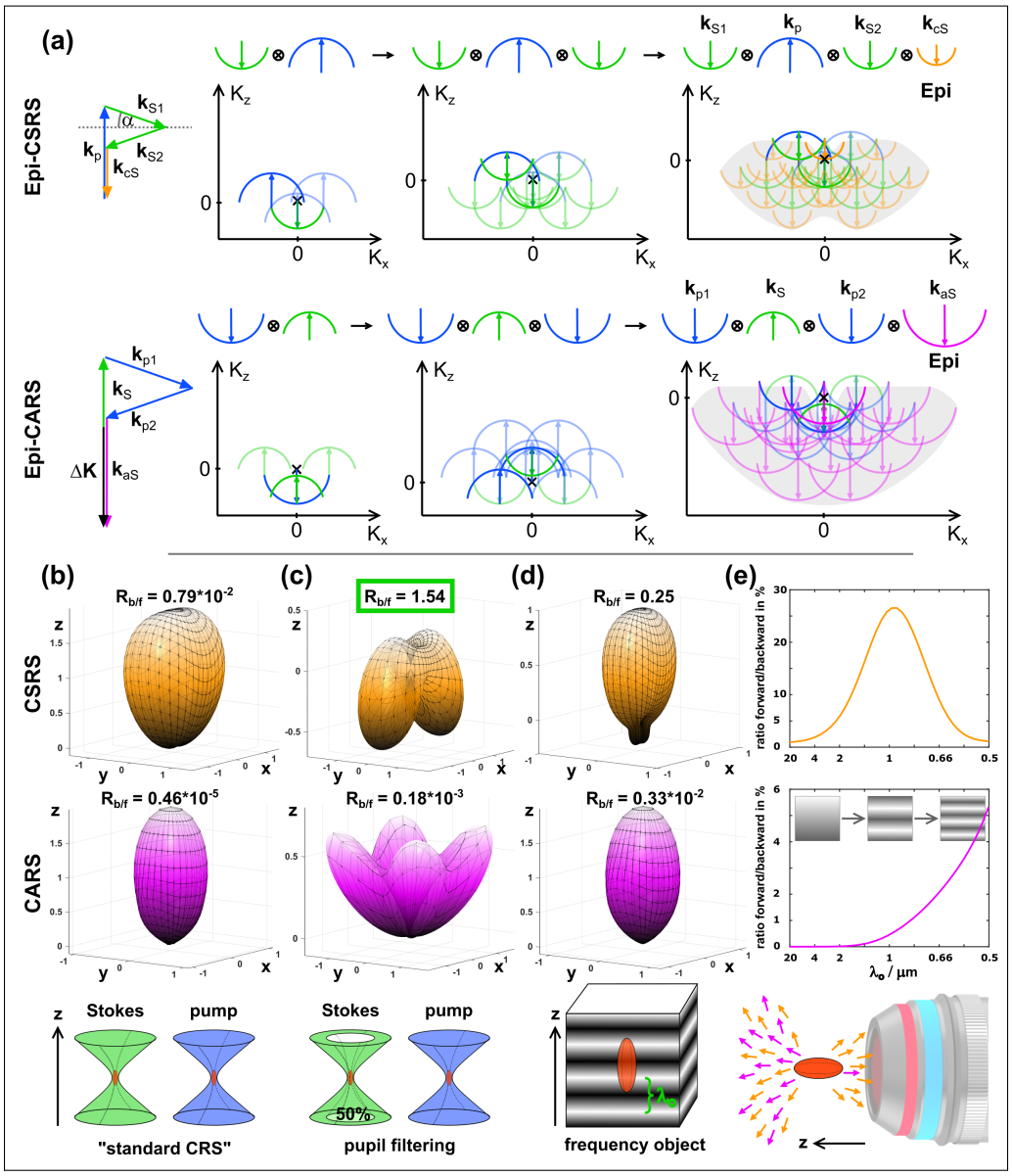

图 4. CSRS 与 CARS 的物体频率支持范围及辐射行为。a) Epi-CSRS（CARS）的物体 K 支持范围由斯托克斯光（泵浦光）、泵浦光（斯托克斯光）和斯托克斯光（探测光）的照明埃瓦尔德球与反（斯托克斯）频率处的探测埃瓦尔德球球冠进行卷积得到。请注意，只有 CSRS 能找到覆盖均匀样品频率 K(0,0,0) 的矢量组合，CARS 则不能。左侧突出显示了一个与 K(0,0,0) 相位匹配的单一波矢组合；而对 CARS 采用类似方法会导致较大的相位失配（ΔK）。b) 标准照明条件下，均匀样品的 CSRS 和 CARS 辐射行为，即泵浦光束和斯托克斯光束均匀填充物镜孔径（θ_{max}=80◦）。c) 与 b) 相同，但对 CSRS 的斯托克斯光束使用了环形瞳孔滤光器，其覆盖物镜后孔径面积的 50%。为与 CARS 公平比较，对泵浦光束使用了相同的瞳孔滤光器。d) 与 b) 相同，但用频率物体替代均匀样品，其散射密度表示为 $1+\cos(2\pi z/\lambda_o)$ 和 λ_o=1µm。e) 后向/前向辐射比（Rb/f）随物体频率 λ_o 变化的曲线。

由于大多数相干拉曼实验采用近红外激发波长，而非可见光激发波长，因此在模拟中我们使用波长 $\lambda_p = 797nm$ 和 $\lambda_S = 1030nm$，对应于相干拉曼成像中最常针对的 2850cm^{-1} 拉曼位移。在这些条件下，可在 $\lambda_{cS} = 1450nm$处观测到相干斯托克斯辐射。需要指出的是，我们的结果同样适用于可见光激发波长，只需略微增大激发角或使用更薄的环形掩模。

首先，我们计算了数值孔径为 1.49（油浸）的条件下，均匀物体的相干斯托克斯拉曼散射和相干反斯托克斯拉曼散射辐射方向图；该数值孔径对应的最大照明角为 80°。从图4b可以明显看出，相干反斯托克斯拉曼散射和相干斯托克斯拉曼散射的辐射都主要沿前向传播，不过相干斯托克斯拉曼散射的辐射分布具有更大的辐射锥。考察后向与前向光子的比值 $R_{b/f}$，数值结果表明，相干反斯托克斯拉曼散射中每10^5 个光子中后向传播的不足 1 个。需要注意的是，动量守恒定律实际上预测相干反斯托克斯拉曼散射的 $R_{b/f}=0$。因此，所得偏差必然归因于数值模型中体素数量有限。对于相干斯托克斯拉曼散射，$R_{b/f}$ 显著增大至约每 100 个光子中有 1 个。由于生物医学样品中的常见表面散射率超过 1%，我们仍须认为，后向探测的相干斯托克斯拉曼散射也只是前向产生的相干斯托克斯拉曼散射在界面处经线性散射后改变方向的结果。尽管如此，采用共聚焦探测，即在探测器前放置针孔，并使其位于激发焦点的共轭平面，或许已能获得均匀样品的真实 Epi-CSRS 图像，而 Epi-CARS 图像仍会保持暗淡。为了找到提高相干斯托克斯拉曼散射后向辐射占比的方法，我们应考虑图4a左侧与 K(0,0,0) 匹配的相干斯托克斯拉曼散射矢量图。通过减小探测较高频率的矢量组合的影响，并优先选择覆盖原点的组合，可以轻易提高后向与前向辐射的比值。利用斯托克斯光束的环形照明可以增强相干斯托克斯拉曼散射的后向辐射。实验上，在斯托克斯光束路径中使用两个锥透镜，即可在不损失功率的情况下实现这种环形照明 [25,26]。在数值模拟中，我们将斯托克斯光的入射角限制在 θ_{min}=56.5°与 θ_{max}=80°之间，这相当于覆盖物镜后焦平面面积的 50%。采用这种瞳孔滤波后，相干反斯托克斯拉曼散射的后向与前向辐射比增至每 10^4 个光子中有 2 个，而将泵浦光束和斯托克斯光束聚焦到均匀物体中时，相干斯托克斯拉曼散射的大部分辐射均沿后向传播（$R_{b/f}$=1.5）；见图4c。

作为对相干斯托克斯拉曼散射显微术物体支持的启发式推导所得的第二个重要结果，我们发现，高物体频率的存在会增加后向辐射量。为验证这一预测，我们在图4d和图4e中研究了一个物体，其非线性散射体密度（即分子基团浓度）沿光轴按 $1+\cos(K_z z)$ 调制，其中$K_z = 2\pi/\lambda_o$ 为物体频率。举例来说，图4d展示了波状结构物体的辐射行为，其 K_z=2π/1μm。结果发现，对于 Epi-CSRS，$R_{b/f}$ 增至四分之一，而 Epi-CARS 仍然极弱，几乎可以忽略。为确定 Epi-CSRS 探测效率最高的物体频率，我们计算了 $R_{b/f}$ 随 K_z的变化。由图4e可知，Epi-CSRS 在 K_z=2π/1μm 处达到峰值，而 Epi-CARS 的 $R_{b/f}$ 在 $K_z = 2\pi/0。25\mu m$ 处仍在增加。需要注意的是，$R_{b/f}$ 从未达到 1，这是由频率物体定义中的 1+ （$1+\cos(K_z z)$）所致。 1+ 意味着，在 K(0,0,0) 处，波状物体的振幅始终是散射体密度调制 K(0,0,±K_z) 处振幅的两倍；前者对应于均匀的、以向前散射为主的物体。简而言之，我们的模拟结果表明：在紧聚焦条件下，均匀样品的相干斯托克斯拉曼散射会产生不可忽略的后向辐射，而相干反斯托克斯拉曼散射则不会。通过提高高入射角斯托克斯光束的照明功率，可以增强相干斯托克斯拉曼散射的后向辐射量。此外，生物医学样品的天然结构通常并不均匀，这也会增强相干斯托克斯拉曼散射的后向辐射。

结论

我们展示了首个激光扫描显微镜相干斯托克斯拉曼散射实验。主要挑战在于，我们利用一对倾斜的带通滤光片，成功显著降低了荧光背景。通过分别以射频 f1 和 f2 对斯托克斯光束和泵浦光束进行强度调制，并对相干斯托克斯拉曼散射信号进行基于锁相的解调，可去除剩余的荧光贡献。利用相干斯托克斯拉曼散射信号对两种激发光颜色均有特征性依赖这一特点，在 f1-f2 处对该信号进行解调，可获得最佳的荧光背景抑制效果。我们在相干斯托克斯拉曼散射信号与荧光信号比值逐渐降低的样品中展示了无背景的激光扫描显微镜相干斯托克斯拉曼散射成像，样品依次为：聚合物微球、人体皮肤的上皮和真皮、洋葱细胞、鳄梨果肉以及果蝇幼虫的翅盘。在消除相干斯托克斯拉曼散射成像的主要障碍后，我们介绍并通过数值计算量化了相干斯托克斯拉曼散射的一大优势：其独特的后向辐射特性与高数值孔径物镜相结合。考虑形成激发焦斑的所有入射波矢时，可依据动量守恒定律，直观理解相干斯托克斯拉曼散射的后向辐射及其与相干反斯托克斯拉曼散射的区别。利用并矢格林函数，我们通过数值计算表明，对于均匀物体，相干斯托克斯拉曼散射主要沿前向传播；但对于沿轴向具有结构的物体，其后向分量可增至四分之一。此外，若采用环形斯托克斯照明，相干斯托克斯拉曼散射的后向信号甚至可能强于前向信号（最高可达 100%）。有了高效的落射式相干反斯托克斯拉曼散射辐射后，多种以往无法实现的相干拉曼实验便成为可能。举几个例子：落射探测式共聚焦多焦点相干斯托克斯拉曼散射；在去扫描位置放置光谱仪的落射探测式激光扫描显微镜相干斯托克斯拉曼散射成像；落射探测式相干斯托克斯拉曼散射图像扫描显微镜。因此，我们相信，这项工作只是相干斯托克斯拉曼散射显微术的第一个里程碑，未来还将取得更多进展。

方法：实验装置

一台掺镱光纤激光器（APE Emerald engine，80 MHz，2–3 ps）经倍频后，产生功率为 7 W、波长为 515 nm 的输出光。其中部分输出直接用作斯托克斯光束，以驱动 CSRS 过程。大部分 515 nm 光（4 W）用于泵浦光学参量振荡器（OPO，APE Emerald）。OPO 的信号光束可在 660–950 nm 范围内调谐，并耦合至外部二次谐波产生单元。后者在 330–475 nm 光谱范围内可产生最高 50 mW 的输出，作为 CSRS 四波混频的泵浦光束。因此，330–475 nm 的泵浦光与 515 nm 的斯托克斯光束相结合，可覆盖 1630–11000cm^{-1} 的拉曼位移范围。泵浦光束和斯托克斯光束通过二向色分束器（Semrock，FF470-Di01-25x36）和延迟台在空间和时间上重合。两束光均耦合至一台自制激光扫描显微镜，并由一枚 40 倍水浸物镜（尼康，Plan，数值孔径 = 1.15，浸没介质：水）聚焦至样品中。为获得图 2 中的微球-油界面图像，激发物镜更换为一枚 60 倍物镜（尼康，Plan Apo TIRF，数值孔径 1.45，浸没介质：油）。CSRS 辐射由一枚聚光镜（尼康，Achr-Apl，数值孔径 1.4）沿前向收集，通过 2 个倾斜的带通滤光片（Semrock FF01-620/14-25 + FF01-605/15-25）与宽带荧光背景进行光谱分离，并由光电倍增管（PMT，Thorlabs，PMT1001）检测。为进一步抑制线性荧光背景，使用 2 个声光调制器（AOM，AA，MT200-A0.5-VIS）分别以 f1 = 2.28 MHz 和 f2 = 3.75 MHz 的频率调制斯托克斯光束和泵浦光束的强度。使用锁相放大器（Zürich instruments，HF2LI）同时对 PMT 输出在直流频率、f1、f2 以及 f1-f2 = 1.47 MHz 处进行解调。锁相时间常数设为 30 µs。所有展示的 CSRS 图像均以 40 µs 的像素驻留时间记录。

附录 - 数值计算

下面我们将总结用于生成图4b-e的方程。其含义 of
变量汇总见图 5。
样品处的聚焦场由角谱表示 [27]给出：

$$\begin{bmatrix} E_x(\rho,\phi,z) \\ E_y(\rho,\phi,z) \\ E_z(\rho,\phi,z) \end{bmatrix} = \frac{ikf}{2}\exp(-ikf) \begin{bmatrix} I_{00}+I_{02}\cos(2\phi) \\ I_{02}\sin(2\phi) \\ -i2I_{01}\cos(\phi) \end{bmatrix} \quad (1)$$

其中， f 表示物镜的焦距，积分 I_{0m} 由下式给出

$$I_{0m} = \int_{\theta_{min}}^{\theta_{max}} E_{inc}(\theta)\sin(\theta)[\cos(\theta)]^{1/2} g_m(\theta)\mathrm{J_m}[k\rho\sin(\theta)]\mathrm{d}\theta \quad (2)$$

其中， g_m 分别等于 $1+\cos(\theta)$、$\sin(\theta)$ 和 $1-\cos(\theta)$，对应 $m=0,1,2$。 J_m 是m^{th} 阶贝塞尔函数，而 E_{inc} 是入射电场，我们假设其为 x 偏振，并在（环形）孔径角 $\theta_{min} \le \theta \le \theta_{max}$范围内保持恒定。反斯托克斯波长和相干斯托克斯波长处的非线性极化为：

$$\begin{aligned} P^{(3)}_{aS,a}(r) &= 3\chi^{(3)}_{abcd}(r)E_{p,b}E^*_{S,c}E_{p,d} \\ P^{(3)}_{cS,a}(r) &= 3\chi^{(3)}_{abcd}(r)E_{S,b}E^*_{p,c}E_{S,d} \end{aligned} \quad (3)$$

其中 a、b、c、d 表示极化坐标 x、y 或 z。使用 x 偏振激发时发现，即使在紧聚焦条件下，只要均匀填充物镜，$\chi^{(3)}_{xxxx}$ 仍占主导地位，超过其他所有张量分量 [27]。不过，为生成图 4c，使用了带有$\theta_{min} = 56。5°$ 和 $\theta_{max} = 80°$ 的环形掩模，因此必须纳入其他张量元。为简化起见，此处仅考虑各向同性样品，将 81 个极化率张量元缩减为 21 个非零元 [28]。在各向同性介质中，这些非零元遵循特定的对称性规则，即

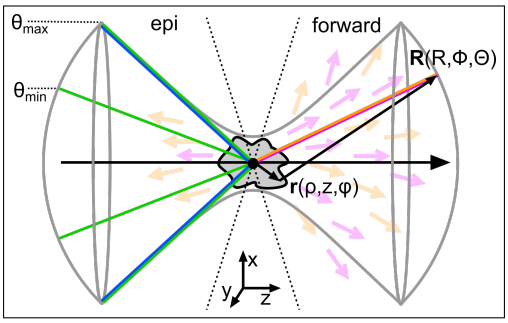

图 5. 变量定义

$\chi_{1111} = \chi_{2222} = \chi_{3333}$、
$\chi_{1122} = \chi_{1133} = \chi_{2211} = \chi_{2233} = \chi_{3311} = \chi_{3322}$, $\chi_{1212} = \chi_{1313} = \chi_{2323} = \chi_{2121} = \chi_{3131} = \chi_{3232}$, $\chi_{1221} = \chi_{1331} = \chi_{2112} = \chi_{2332} = \chi_{3113} = \chi_{3223}$。此外，它适用于 $\chi_{1111} = \chi_{1122} + \chi_{1212} + \chi_{1221}$ [28]。在模拟中，我们设定了 $\chi_{1122} = \chi_{1212} = \chi_{1221} = 1$，因此 $\chi_{1111} = 3$。非线性远场辐射分布通过并矢格林函数方法获得：

$$\begin{bmatrix} E_{q,R}(R,\Theta,\Phi) \\ E_{q,\Theta}(R,\Theta,\Phi) \\ E_{q,\Phi}(R,\Theta,\Phi) \end{bmatrix} = -\frac{\omega_q^2}{c^2}\frac{\exp(ik_q|R|)}{|R|}\iiint_{-\infty}^{\infty}\rho \mathrm{d}\rho \mathrm{d}\phi \mathrm{d}z \frac{\exp(ik_q \mathbf{rR})}{|R|} \times \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ \cos(\Theta)\cos(\Phi) & \cos(\Theta)\sin(\Phi) & -\sin(\Theta) \\ -\sin(\Phi) & \cos(\Phi) & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} P_{q,x}^{(3)}(\mathbf{r}) \\ P_{q,y}^{(3)}(\mathbf{r}) \\ P_{q,z}^{(3)}(\mathbf{r}) \end{bmatrix} \tag{4}$$

其中，q 替换为 aS 或 cS，以分别计算反斯托克斯辐射或相干斯托克斯辐射。在模拟中，我们将焦区划分为（121×121×121≈）177 万个单元，每个单元宽 50 nm，并沿 x、y 和 z 方向等间距排列。远场辐射球离散为（ΔΘ=1°, ΔΦ=2°）32400 个单元。若相干（反）斯托克斯辐射落在范围 Θ.. 0-80° 或 Θ.. 100-180°内，则分别判定其为前向或后向辐射。

经费资助

我们感谢法国国家科学研究中心（CNRS）、艾克斯-马赛大学（A-M-AAP-ID-17-13-170228-15.22-RIGNEAULT）、A*Midex（ANR- 11-IDEX-0001-02）、普罗旺斯-阿尔卑斯-蓝色海岸癌症研究中心、法国国家癌症研究所（INCa）、南部大区、法国国家研究署（ANR）项目（ANR-10-INSB-04-01、ANR-11-INSB-0006、ANR-16-CONV- 0001）、法国国家健康与医学研究院（INSERM）PC201508 和 18CP128-00 的经费支持。

数据可用性

合理请求时，可向通讯作者获取支持本研究结论的数据。

披露

作者声明不存在利益冲突。

参考文献

1. A. Bunaciu, S. Fleschin, and H. Aboul-Enein, “红外显微光谱学应用综述”，Curr. Anal. Chem. **10**, 132–139 (2013). 2. K. A. Antonio and Z. D. Schultz, “生物医学拉曼显微术的进展”，Anal. Chem. **86**, 30–46 (2013). 3. M. D. Duncan, J. Reintjes, and T. J. Manuccia, “扫描式相干反斯托克斯拉曼显微镜”，Opt. Lett. **7**, 350 (1982). 4. A. Zumbusch, G. R. Holtom, and X. S. Xie, “利用相干反斯托克斯拉曼散射进行三维振动成像”，Phys. Rev. Lett. **82**, 4142–4145 (1999). 5. P. Nandakumar, A. Kovalev, and A. Volkmer, “基于受激拉曼散射显微术的振动成像”，New J. Phys. **11**, 033026 (2009). 6. C. W. Freudiger, W. Min, B. G. Saar, S. Lu, G. R. Holtom, C. He, J. C. Tsai, J. X. Kang, and X. S. Xie, “通过受激拉曼散射显微术实现高灵敏度无标记生物医学成像”，Science **322**, 1857–1861 (2008). 7. Y. Ozeki, F. Dake, S. Kajiyama, K. Fukui, and K. It oh, “受激拉曼散射显微术灵敏度的分析与实验评估”，Opt. Express **17**, 3651 (2009). 8. P. D. Maker and R. W. Terhune, “电场强度三阶诱导极化所致光学效应的研究”，Phys. Rev. **137**, A801–A818 (1965). 9. J. B. Zheng, A. Leipertz, J. B. Snow, and R. K. Chang, “在空气和氮气中同时观测转动相干斯托克斯拉曼散射与相干反斯托克斯拉曼散射”，Opt. Lett. **8**, 350 (1983). 10. M. Cui, B. R. Bachler, and J. P. Ogilvie, “生物成像条件下相干与自发拉曼散射的比较”，Opt. Lett. **34**, 773 (2009).

11. S. A. Druet and J.-P. E. Taran, “CARS光谱学”，Prog. Quantum Electron. **7**, 1–72 (1981). 12. L. Wei, Z. Chen, L. Shi, R. Long, A. V. Anzalone, L. Zhang, F. Hu, R. Yuste, V. W. Cornish, and W. Min, “超多重振动成像”，Nature **544**, 465–470 (2017). 13. L. Wei and W. Min, “电子预共振受激拉曼散射显微术”，The J. Phys. Chem. Lett. **9**, 4294 4301 2018– ( ). 14. R. C. Prince and E. O. Potma, “迈向可见光：细胞和组织的高分辨率相干拉曼成像”，Light. Sci. & Appl. **8** (2019). 15. Y. Bi, C. Yang, Y. Chen, S. Yan, G. Yang, Y. Wu, G. Zhang, and P. Wang, “近共振增强无标记受激拉曼散射显微术，空间分辨率接近130 nm”，Light. Sci. & Appl. **7** (2018). 16. P. Berto, E. R. Andresen, and H. Rigneault, “无背景受激拉曼光谱与显微术”，Phys. Rev. Lett. **112** (2014). 17. S. Heuke, A. Lombardini, E. Büttner, and H. Rigneault, “受激拉曼增益与损耗同步检测（SRGAL）”，Opt. Express **28**, 29619–29630 (2020). 18. D. Kobat, M. E. Durst, N. Nishimura, A. W. Wong, C. B. Schaffer, and C. Xu, “利用长波长激发进行深层组织多光子显微术”，Opt. Express **17**, 13354 (2009). 19. A. Lombardini, V. Mytskaniuk, S. Sivankutty, E. R. Andresen, X. Chen, J. Wenger, M. Fabert, N. Joly, F. Louradour, A. Kudlinski, and H. Rigneault, “高分辨率多模态柔性相干拉曼内窥镜”，Light. Sci. & Appl. **7** (2018). 20. M. Kögler and B. Heilala, “时间门控拉曼光谱综述”，Meas. Sci. Technol. **32**, 012002 (2020). 21. T. Tahara and H.-O. Hamaguchi, “利用条纹相机进行皮秒拉曼光谱测量”，Appl. Spectrosc. **47**, 391 398 1993– ( ). 22. S. Heuke, N. Vogler, T. Meyer, D. Akimov, F. Kluschke, H.-J. Röwert-Huber, J. Lademann, B. Dietzek, and J. Popp, “人体皮肤的多模态成像”，Br. J. Dermatol. **169**, 794–803 (2013). 23. S. Heuke, K. Unger, S. Khadir, K. Belkebir, P. C. Chaumet, H. Rigneault, and A. Sentenac, “相干反斯托克斯拉曼傅里叶拼接成像”，Opt. Express (2019). 24. A. Volkmer, J.-X. Cheng, and X. S. Xie, “通过反向检测相干反斯托克斯拉曼散射显微术实现高灵敏度振动成像”，Phys. Rev. Lett. **87**, 023901 (2001). 25. S. Heuke, J. Zheng, D. Akimov, R. Heintzmann, M. Schmitt, and J. Popp, “轴向结构化样品的贝塞尔光束CARS”，Sci. Reports **5** (2015). 26. S. Heuke, F. B. Legesse, D. Akimov, U. Hübner, J. Dellith, M. Schmitt, and J. Popp, “贝塞尔光束相干反斯托克斯拉曼散射显微术”，J. Opt. Soc. Am. B **32**, 1773 (2015). 27. J.-X. Cheng, A. Volkmer, and X. S. Xie, “相干反斯托克斯拉曼散射显微术的理论与实验表征”，J. Opt. Soc. Am. B **19**, 1363 (2002). 28. J.-X. Cheng and X. S. Xie, 编者，相干拉曼散射显微术（细胞与临床成像系列）（CRC出版社，2016）。