

受激辐射耗尽荧光显微镜的原理与实验装置研究进展

于建强^{1,2} 袁景和² 李英骏¹

(¹中国矿业大学(北京)深部岩土力学与地下工程国家重点实验室, 北京 100083)
²中国科学院化学研究所分子纳米结构与纳米技术实验室, 北京 100190)

摘要 介绍了四能级系统的受激辐射耗尽(STED)荧光显微镜的基本原理。按照时间顺序介绍了面包圈型耗尽光焦斑的实现方法。对于横向分辨率的改善,最初使用了光路偏移法,后来发展到均分相位板法,再到成熟的螺旋相位板法;另外还介绍了半波相位板法对轴向分辨率的改善。从宽带光源激发、连续光源激发、多色多通道、快速成相和双光子激发等方面综述了受激辐射耗尽荧光显微镜实验装置的逐步完善。最后展望了受激辐射耗尽荧光显微镜的发展前景。

关键词 显微术;超分辨;受激辐射耗尽;分辨率;联用成像

中图分类号 O436 **文献标识码** A **doi:** 10.3788/LOP49.120001

Principle and Progress of Experimental Setup on Stimulated Emission Depletion Fluorescence Microscope

Yu Jianqiang^{1,2} Yuan Jinghe² Li Yingjun¹

¹ State Key Laboratory for Geomechanics and Deep Underground Engineering,
China University of Mining and Technology, Beijing 100083, China

² Key Laboratory of Molecular Nanostructure and Nanotechnology, Institute of Chemistry,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract This paper describes an introduction in both setup and rate equations of stimulated emission depletion (STED) fluorescence microscope. The methods of generating STED beam and a series of phase plates used in STED fluorescence microscope are introduced. The development of the setup on STED fluorescence microscope, including broadband STED, continuous-wave (CW) STED, multi-color STED, fast STED and single-wavelength two-photon emission (SW2PE) STED, is described. Future prospects for the development of the STED microscope experimental setup is put forward; new laser sources, new phase plates, three-dimensional (3D) super-resolution, and a variety of imaging modalities combined imaging are the main development directions in the future.

Key words microscopy; super-resolution; stimulated emission depletion; resolution; union-imaging

OCIS codes 180.4315; 170.1790; 170.2510

1 引言

Abbe^[1]在1873年提出可见光照明的远场光学显微镜的分辨极限为200 nm左右,直到1994年Hell等^[2]提出了受激辐射耗尽(STED)荧光显微镜原理^[2],利用荧光分子的能级结构,理论上分辨率随着STED光强的增大可以无限提高^[3,4],真正实现了突破衍射极限的远场光学显微镜。

远场荧光显微镜能够实现活细胞的三维成像,被广泛地应用于生物单细胞和单分子的研究^[5~13],因此

收稿日期: 2012-08-06; **收到修改稿日期:** 2012-09-13; **网络出版日期:** 2012-10-19

基金项目: 国家自然科学基金(11074300, 21127901)、中央高校基本科研业务费专项资金(00-800015G5)和中国科学院科研装备研制项目(YZ200925)资助课题。

作者简介: 于建强(1983—),男,硕士研究生,主要从事光学超分辨成像方面的研究。E-mail: jqyu@iccas.ac.cn

导师简介: 李英骏(1961—),男,教授,博士生导师,主要从事X射线激光及光物理方面的研究。

E-mail: lj@aphy.iphy.ac.cn(通信联系人)

STED 荧光显微镜成为众多物理学家和生物学家研究的热点。1999 年德国马普生物物理化学研究所纳米生物光子学研究组 Klar 等^[14]在实验上第一次实现了 STED 荧光显微镜, 获得了 100 nm 左右的空间分辨率。2001 年该研究组通过调制 STED 光束的相位形成面包圈型焦斑, 实现了 65 nm 的横向分辨率^[15]; 将 STED 光束引入 4pi 显微镜^[16], 该研究组将轴向分辨率提高到 33 nm; 2005 年该课题组使用 STED 显微术, 实现了周期为 80 nm 的印刷电路板电路成像^[17]; 2006 年该课题组使用 STED 显微镜成像神经突触囊泡^[18], 横向分辨率达到 50 nm, 明显优于共聚焦显微镜, 实现了对单个囊泡的成像, 并且发现囊泡融合过程中新的生物学现象; 同年该课题组实现了对生物大分子的成像^[19], 获得了 15~20 nm 的空间分辨率, 大幅突破了衍射极限; 2007 年实现了对哺乳动物细胞的微管和神经元细胞的原生质膜蛋白的超分辨成像^[20], 实现了 50 nm 的横向分辨率; 2009 年该课题组实现了 5.8 nm 的分辨率^[21]。

2005 年, 陈文霞等^[22]对 STED 荧光显微术做了系统的综述。但是随着时间的推移, STED 荧光显微镜又有了很大的发展, 有必要做全面的总结。本文介绍了四能级系统的 STED 荧光显微镜的基本原理。按照时间顺序阐述了面包圈型耗尽光焦斑的实现方法。总结了用于改善横向分辨率的光路偏移法、均分相位板法和螺旋相位板法, 并介绍了半波相位板法对轴向分辨率的改善。从宽带光源激发、连续光源激发、多色多通道、快速成像和双光子激发等方面综述了 STED 荧光显微镜实验装置的逐步完善。最后展望了 STED 荧光显微镜的发展前景, 指出新型光源和新型相位板的使用、三维超分辨和多种成像方式联合成像的实现等几个方面的发展前景。

2 STED 荧光显微镜原理

2.1 四能级系统速率方程

典型的荧光分子的能级结构如图 1 所示^[2]。

图 1 中 S_0 、 S_1 分别表示荧光分子的基态和激发态, L_0 、 L_3 分别表示基态 S_0 的最低振动态和某个较高振动态, L_2 、 L_1 分别表示激发态 S_1 的最低振动态和某个较高振动态。激发光将荧光分子从 S_0 激发到 S_1 , 经过振动弛豫, 荧光分子跃迁到 S_1 的最低振动能级 L_2 , 当荧光分子从该振动能级跃迁到基态 S_0 时, 能量通常会以荧光的形式辐射出去, 这被称为自发荧光辐射过程。处于激发态的荧光分子在外界辐射影响下, 会产生与外界辐射同频率、同相位和同偏振的辐射, 这就是受激荧光辐射过程。

这种受激荧光辐射与自发荧光辐射竞争, 导致荧光态分子关闭(非自发荧光辐射状态), 称为 STED, 该外界辐射称为 STED 光。为了避免二次激发, 通常将 STED 波长设置在荧光分子发射谱的红端。利用 STED 过程实现超分辨光学成像, 需要将物镜聚焦后的 STED 光斑构造为面包圈形状, 并且围绕在激发光焦斑周围, 使得激发光焦斑中心区域的荧光分子仍然处于荧光态(可以自发辐射荧光), 而被 STED 光束照射的区域, 因发生 STED 过程而关闭(非荧光辐射状态)。从荧光分子的能级结构可知, 当荧光分子处于能级 L_2 时为荧光态, 其荧光粒子数密度直接影响自发辐射荧光的强度, 该数密度可以通过求解速率方程获得^[24]。

荧光粒子数密度遵循速率方程:

$$\begin{cases} \frac{dn_0}{dt} = \frac{I_{\text{exc}}\sigma_{01}}{h\nu_{\text{exc}}}(n_1 - n_0) + \frac{1}{\tau_{\text{vibr}}}n_3 \\ \frac{dn_1}{dt} = \frac{I_{\text{exc}}\sigma_{01}}{h\nu_{\text{exc}}}(n_0 - n_1) - \frac{1}{\tau_{\text{vibr}}}n_1 \\ \frac{dn_2}{dt} = \frac{I_{\text{STED}}\sigma_{23}}{h\nu_{\text{STED}}}(n_3 - n_2) + \frac{1}{\tau_{\text{vibr}}}n_1 - \left(\frac{1}{\tau_{\text{fluor}}} + Q\right)n_2 \\ \frac{dn_3}{dt} = \frac{I_{\text{STED}}\sigma_{23}}{h\nu_{\text{STED}}}(n_2 - n_3) - \frac{1}{\tau_{\text{vibr}}}n_3 + \left(\frac{1}{\tau_{\text{fluor}}} + Q\right)n_2 \end{cases}, \quad (1)$$

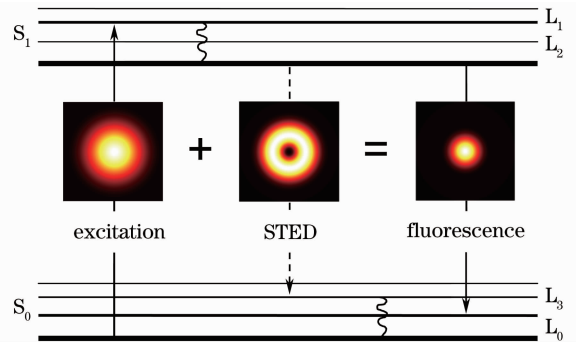


图 1 典型荧光分子的能级结构^[2]

Fig. 1 Energy level of a typical fluorophore molecule^[2]

式中 n_0 表示基态能级 L_0 的荧光粒子数密度; n_1 表示第一激发态的高振动态能级 L_1 上的荧光粒子数密度; n_2 表示第一激发态的最低振动态能级 L_2 上的荧光粒子数密度; n_3 表示基态的高振动态能级 L_3 上的荧光粒子数密度, STED 光激发的受激辐射和自发荧光辐射跃迁都会导致 n_3 的增加; I_{exc} 、 I_{STED} 分别为激发光和 STED 光的光强, λ_{exc} 、 λ_{STED} 分别为激发光和 STED 光的真空中的波长; σ_{01} 、 σ_{23} 分别为相应能级跃迁的分子吸收截面; τ_{vibr} 、 τ_{fluo} 分别为振动弛豫寿命和荧光寿命; Q 为荧光猝灭速率, h 为普朗克常量。

在通常温度条件下的孤立系统中, 初始条件和归一化条件可以近似为

$$\begin{cases} n_0|_{t=0} = 1 \\ n_i|_{t=0} = 0, \quad i = 1, 2, 3 \end{cases} \quad (2)$$

和

$$\sum_{i=0}^3 n_i = 1. \quad (3)$$

该速率方程包含了光与荧光物质相互作用的各个基本过程, 包括受激吸收、振动弛豫、自发荧光、荧光猝灭和受激辐射等。

运用矢量衍射理论^[25,26]可以获得图 1 中激发光焦斑和 STED 光焦斑的三维分布, 结合速率方程(1)式可以得到 STED 荧光显微镜的有效点扩展函数(PSF), 进而计算出理论分辨率。

2.2 实验装置

STED 荧光显微镜的原理如图 2(a) 所示^[18]。激发光经过物镜会聚形成如图 2(b) 所示的激发光焦斑(艾里斑), 艾里斑将荧光分子激发到激发态, 激发态分子可以自发地跃迁回基态辐射荧光, 称为自发辐射荧光; 而波长居于荧光辐射长波长区域[图 2(d)]的 STED 光经相位板调制和显微物镜会聚形成如图 2(c) 所示的面包圈型焦斑(Doughnut), 面包圈型焦斑使得艾里斑外缘区域的受激辐射与自发辐射竞争, 有效地减小了荧光辐射区域, 如图 2(e) 所示, 即减小了有效点扩展函数的宽度, 提高了远场光学显微镜的分辨率。荧光由同一个物镜收集, XY 方向移动样品即可实现样品的二维成像, 结合 Z 方向移动即可实现样品的三维成像。图 2(a) 中如果没有 STED 光束, 即为荧光共聚焦显微镜。

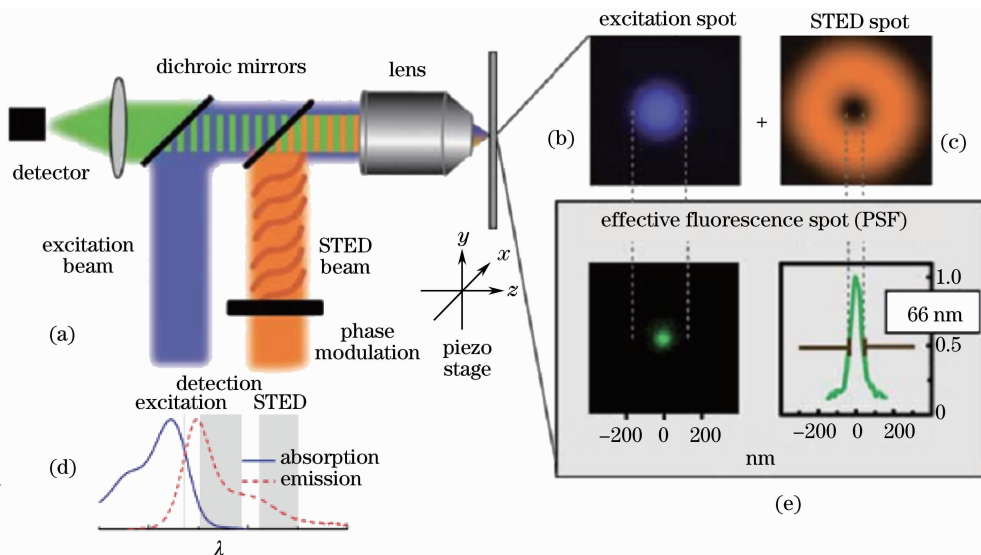


图 2 STED 荧光显微镜原理图^[18]

Fig. 2 Diagram of a STED fluorescence microscope^[18]

3 STED 光焦斑的实现方法

STED 荧光显微镜实现的核心问题是面包圈型 STED 光斑的构建。按发展的时间顺序介绍面包圈型 STED 光斑的实现方法。

3.1 光路偏移法

最初的 STED 荧光显微术^[2]是通过两束激光经显微物镜会聚后在焦斑两侧对称地形成两个焦斑来实现的,这两个焦斑可以在一维上提高横向分辨率,如图 3 所示^[2]。

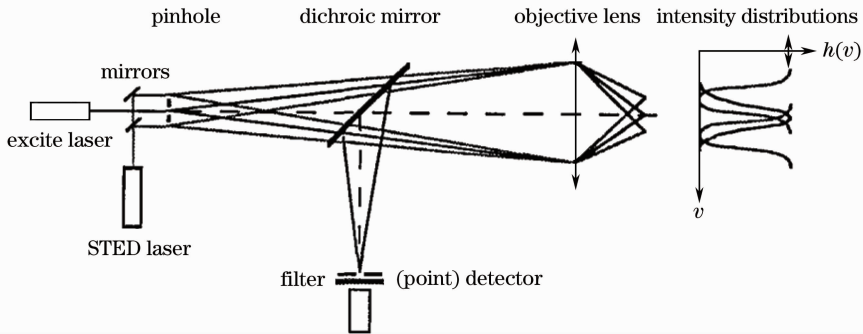


图 3 STED 荧光显微镜的原理图^[2]

Fig. 3 Principle of a STED fluorescence microscope^[2]

1999 年首次在实验上实现了 STED 荧光显微镜的超分辨成像^[14],实现的装置如图 4(a)所示,是图 3 所示装置的一部分,其中激发光为波长 383 nm、脉宽 140 fs 的脉冲紫外光;STED 光为波长 766 nm、脉宽 50 ps 的脉冲红光。此光路中没有使用相位板,而仅仅使用一路光偏移的方法使得 STED 光焦斑与激发光焦斑偏离 390 nm 左右,此时获得的有效点扩展函数如图 4(b)所示。可以看出在对 Pyridine2 纳米晶体成像时获得了 106 nm($\lambda/3.6$)的分辨率,突破了衍射极限。

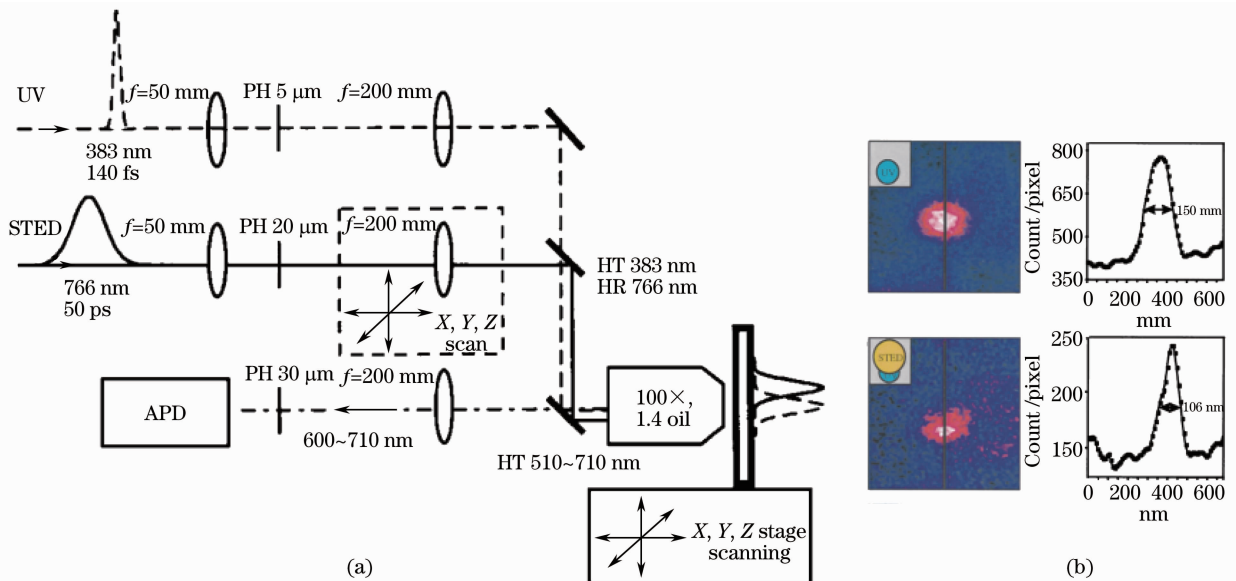


图 4 光路偏移法实现 STED 荧光显微镜^[14]

Fig. 4 STED microscope using a beam offset^[14]

2001 年, Klar 等^[27]使用光路偏离法结合使用焦斑的旁瓣能量同时实现了 STED 荧光显微镜横向和轴向分辨率的改善,其思路与以上方法基本相同,轴向分辨率由传统显微镜的 500 nm 左右提高到 200 nm 左右,横向分辨率由 200 nm 左右提高到 80 nm 左右,但是提高轴向分辨率的方法不是最佳的,因为利用旁瓣能量势必会增加 STED 光总能量,这将带来样品热损坏和信噪比差等缺点。

图 4 中只用了一束光实现 STED 光斑,只能在一维上提高分辨率,而且在这一维上的分辨率提高还是不对称的。一维对称的光路应该使用图 3 所示的装置,这无疑会增加光路实现和调试的复杂性。如果在另一维上也实现对称的超分辨,就需要四束光来构成 STED 焦斑,这将进一步增大光路的复杂性。而且成像的点扩展函数不是圆对称的,所以使用光路偏移法实现 STED 荧光显微镜不是最佳的选择。

3.2 半波相位板法

半波相位板由平板基底及其上面凸出的一个圆形平台构成,透过凸出部分的光束较之透过基底部分的光束相位延迟 π ,因此称为半波相位板,如图 5(a)所示。考虑对称性,可以将相位函数写成

$$\psi(\theta, \varphi) = \frac{\pi}{2} \text{sign}[\sin(\theta - \theta_0)] = \begin{cases} -\frac{\pi}{2}, & \theta_0 < \theta < \alpha \\ \frac{\pi}{2}, & 0 < \theta < \theta_0 \end{cases}, \quad \theta_0 = \arcsin\left(\frac{1}{\sqrt{2}} \sin \alpha\right). \quad (4)$$

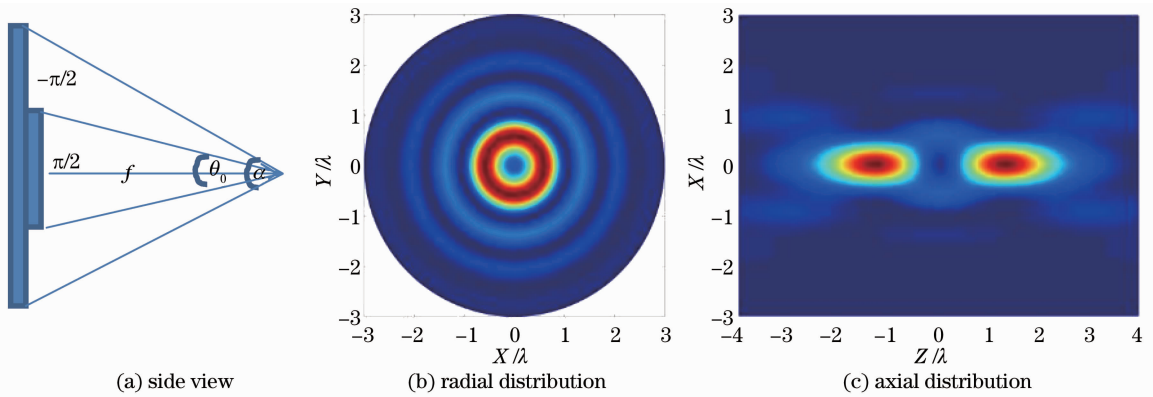


图 5 半波相位板示意图及其调制后的焦斑横向和轴向分布

Fig. 5 Diagram of half-wave phase plate and radial and axial distributions of the Airy disk after modulation

根据矢量衍射的角谱理论^[25,26],圆偏振的入射光束经过半波相位板调制后再经过物镜会聚形成的焦斑横向分布如图 5(b)所示,可以看出在焦斑横向成面色圈型焦斑分布,面色圈型焦斑可以通过 STED 激发光焦斑(艾里斑)外缘的荧光辐射,实现横向分辨率的改善。图 5(c)为焦斑轴向分布,可以看出光在轴向关于焦点对称地分离成两个光斑,这两个光斑可以通过 STED 激发光焦斑(艾里斑)前后部分的荧光辐射,实现轴向分辨率的改善。

2000 年, Klar 等^[28]使用半波相位板实现了 STED 荧光显微镜轴向超分辨,装置如图 6(a)所示,激发光使用波长为 558 nm、脉冲宽度为 0.2 ps 的脉冲激光,STED 光使用波长为 766 nm、脉冲宽度为 40 ps 的激

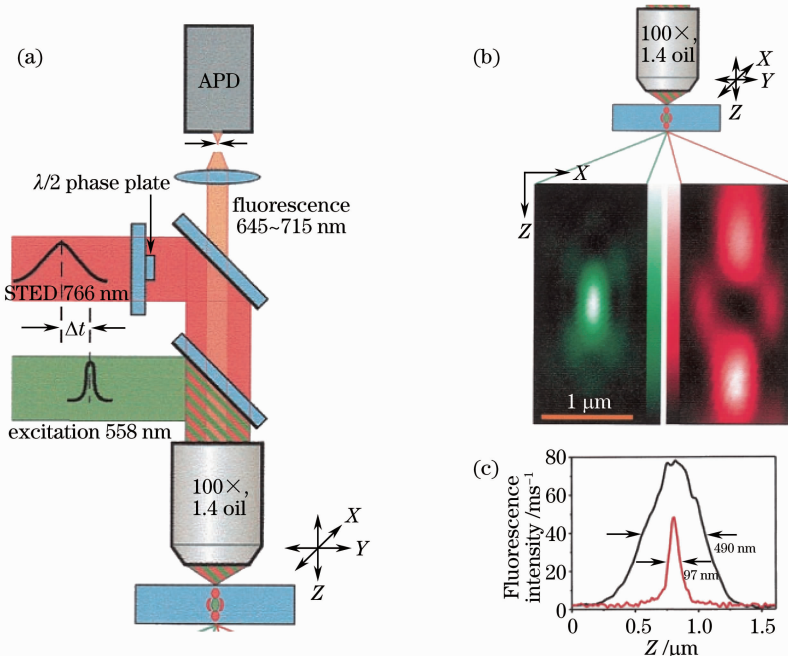


图 6 半波相位板提高横向和轴向分辨率^[28]

Fig. 6 Half-wave phase plate improves the radial and axial resolution^[28]

光, STED 光经半波相位板调制后形成的焦斑的轴向分布如图 6(b) 所示, 可以看出 STED 光焦斑形成在轴向上对称的两个光斑, 这两个光斑可以退激发焦斑激发的荧光态分子数, 进而在 Z 轴方向上减小成像的点扩展函数的宽度, 即实现轴向超分辨。

实验中对 LDS751 荧光球成像获得的有效点扩展函数如图 6(c) 所示, 可以看出轴向分辨率为 100 nm 左右, 比轴向衍射极限提高了 5 倍左右, 实现了轴向超分辨。同时横向分辨率比横向衍射极限提高了 2 倍左右。2002 年, Dyba 等^[16] 将半波相位板应用到 4pi 显微镜中构建了 STED-4pi 荧光显微镜, 对巨大芽孢杆菌 RH414 成像时获得了轴向分辨率 33 nm ($\lambda/23$) 的超分辨图像。

半波相位板能够同时实现横向和轴向分辨率的改善, 但是理论计算显示焦斑的横向光强峰值为轴向光强峰值的 1/4 左右, 如果要得到较高的横向超分辨, 就需要较强的入射光, 而入射光强度的增加会导致轴向峰值光强的增加, 这会带来成像信噪比降低和样品热损伤等问题。而且半波相位板加工制造需要严格控制凸出平台的直径, 这限制了半波相位板在实验装置中的应用和推广。

3.3 均分相位板法

二元均分相位板由均分的两部分组成, 其中一部分比另一部分有更高的厚度, 这个厚度使得其相位比另一半的相位延迟 π , 如图 7(a) 所示。考虑到对称性, 可将相位函数写成

$$\psi(\theta, \varphi) = \frac{\pi}{2} \text{sign} \cdot \sin \varphi = \begin{cases} \frac{\pi}{2}, & 0 < \theta < \pi \\ -\frac{\pi}{2}, & \pi < \theta < 2\pi \end{cases} \quad (5)$$

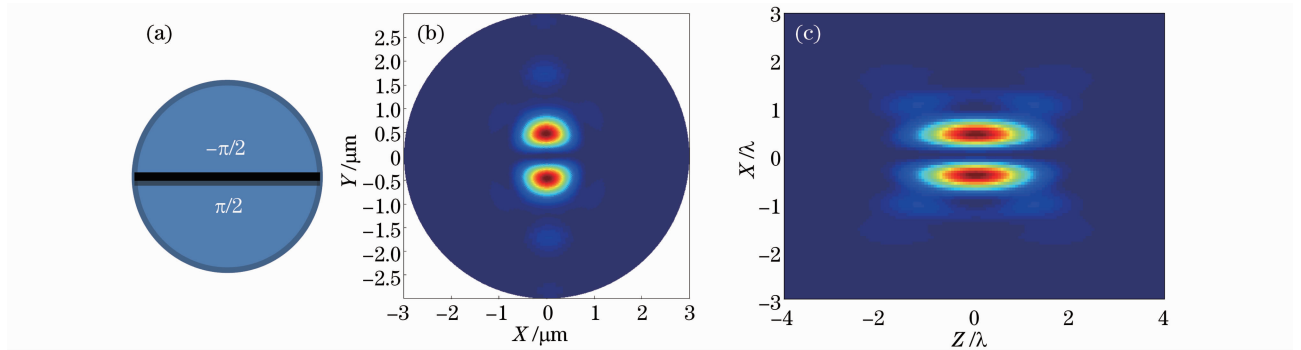


图 7 二元均分相位板及其调制后的焦斑横向和轴向分布

Fig. 7 Diagram of equally divided phase plate and radial and axial distributions of Airy disk after modulation

图 7(b) 为焦斑横向分布, 可以看出这种相位板把焦斑分成对称的两个光斑, 所以它只能在横向某一维上提高分辨率, 而另一维上还是共聚焦的分辨率; 图 7(c) 为焦斑轴向分布, 说明均分相位板没有提高轴向分辨率的能力。

为了获得二维横向超分辨, 提出了四元均分相位板, 如图 8(a) 所示。这种相位板被均匀地分成四部分, 相对的两块具有相同的相位, 其中一组相对的两部分比另一组相位延迟 π 。考虑到对称性, 可将相位函数写成

$$\psi(\theta, \varphi) = \frac{\pi}{2} \text{sign}\{\sin[2(\varphi - \pi/4)]\} = \begin{cases} \frac{\pi}{2}, & \pi/4 < \varphi < 3\pi/4, 5\pi/4 < \varphi < 7\pi/4 \\ -\frac{\pi}{2}, & 3\pi/4 < \varphi < 5\pi/4, 7\pi/4 < \varphi < 2\pi, 0 < \varphi < \pi/4 \end{cases} \quad (6)$$

图 8(b) 为焦斑横向分布, 可以看出能实现 X 方向和 Y 方向分辨率的改善, 但是其他方向分辨率的改善不均匀, 形成的 STED 荧光点扩展函数不是圆对称的, 不能给出较好的超分辨图像; 图 8(c) 为焦斑轴向分布, 可以看出这种相位板没有提高轴向分辨率的能力。

2001 年, Klar 等^[15] 总结了二元均分相位板和四元相位板在 STED 荧光显微镜中的应用, 实验装置如图 9(a) 所示, 其中 STED 光由偏振方向相互垂直的两路光组成, 每路光都在经过相位板调制后经显微镜会聚到焦平面上。二元均分相位板实物如图 9(b) 所示。经二元均分相位板调制后的单路 STED 光焦斑如

图 9(d)所示,而两路光聚焦后的叠加形状类似于 Doughnut 形状的焦斑,如图 9(e)所示。四元均分相位板实物如图 9(c)所示。经四元均分相位板调制后的 STED 光焦斑如图 9(f)所示。

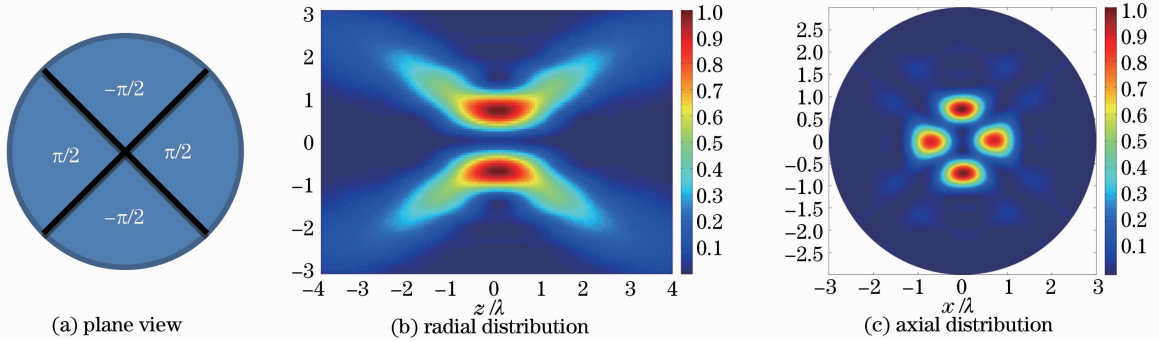


图 8 四元均分相位板及其调制后的焦斑横向和轴向分布

Fig. 8 Diagram of quadrant-divided phase plate and radial and axial distributions of Airy disk after modulation

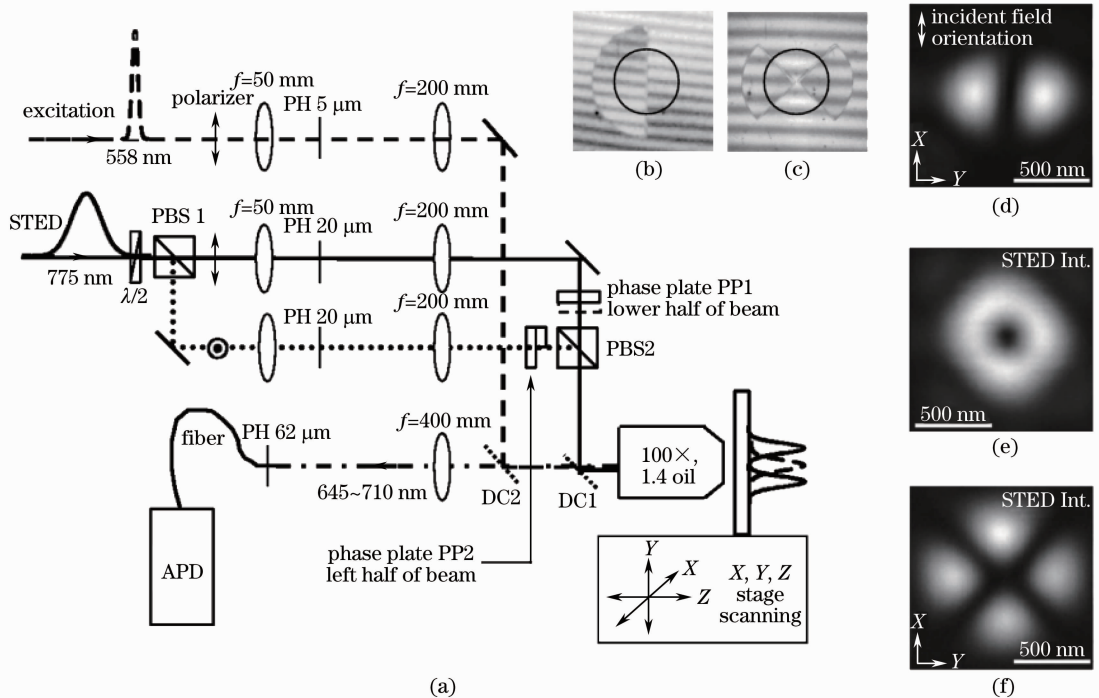


图 9 均分相位板提高横向分辨率^[15]

Fig. 9 Equally divided phase plate improves the lateral resolution^[15]

可以看出一路经四元均分相位板调制后的光束聚焦成的焦斑形状与偏振方向相互垂直的两路经二元均分相位板调制后的光束聚焦成的焦斑叠加后的形状是不同的,这是由于两路经二元均分相位板调制后的焦斑偏振方向是相互垂直的,两路光之间没有相干作用,焦斑的叠加仅仅是两路光焦斑强度的叠加,所以叠加后的焦斑形状呈封闭中空的类面色圈型焦斑结构,而一路经四元相位板调制后的光束因相干而形成非封闭的类面色圈型焦斑结构。

2003年,Westphal等^[29]利用一路均分相位板调制的 STED 光获得了 28 nm($\lambda/25$)的超分辨图像。2005年进一步将分辨率提高到 16 nm($\lambda/50$)^[3],同年又将两路均分相位板调制的 STED 光应用于观察平板印刷的纳米微结构,获得了 40 nm 超分辨图像^[17]。2006年,Bossi等^[30]将一路均分相位板应用到分子光学双稳态的研究上,获得了 48 nm 超分辨图像。

3.4 螺旋相位板法

2π 螺旋相位板是一种厚度随着角度渐变的相位板,图 10(a)为其平面图,图 10(b)为三维视图,图 10(c)为 2π 螺旋相位板调制后的光束经透镜聚焦后的焦斑横向分布^[31]。 2π 螺旋相位板透射率函数为

$$O(r, \theta, \varphi) = \exp(-i\theta), \quad 0 < \theta < 2\pi. \quad (7)$$

对应的高度函数为[如图 10(b)所示]

$$h = h_0 + h_s \frac{\phi}{2\pi}, \quad (8)$$

式中 h_0 为螺旋相位板基底厚度, $h_s = \frac{\lambda}{n - n_0}$ 为台阶厚度, n 为材料折射率, n_0 为周围介质折射率。

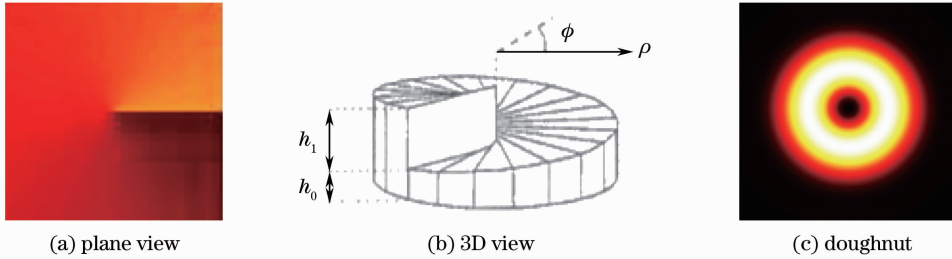


图 10 2π 螺旋相位板示意图

Fig. 10 Diagram of 2π helical phase plate

2006 年, Donnert 等^[19] 利用螺旋相位板调制 STED 光束实现了大分子尺度分辨率的生物荧光显微镜, 并在生物样品中获得了横向 15~20 nm 分辨率的成像。2008 年, Auksorius 等^[32] 使用超连续光源同时提供激发光和 STED 光实现了超连续光源激发的 STED 荧光显微镜, 其中 STED 光路使用了螺旋相位板调制, 获得了 30 nm 的横向分辨率, 而且点扩展函数是圆对称的, 2π 相位板也因此成为 STED 荧光显微镜的常用选择。

3.5 实现方法比较

光路偏移法具有光路简单的优点, 所以最初的 STED 显微镜超分辨的实现使用了光路偏移法, 但是光路偏移法装置拓展性差, 例如横向二维分辨率的改善就需要四束光来构成 STED 焦斑, 这无疑增加了光路的复杂性, 而且成像的点扩展函数不是圆对称的, 所以使用光路偏移法实现 STED 荧光显微镜不是最佳选择。

半波相位板法具有同时提高横向和轴向分辨率的优点, 但是横向分辨率的改善是受限制的, 而且面色圈型焦斑中心的基底强度对突起区域的半径非常敏感, 从而限制了它在 STED 荧光显微镜中的广泛应用。

二元均分相位板法可以在横向某一维上有效地提高分辨率, 横向二维的超分辨需要两束光构成封闭非轴对称的类面色圈型焦斑结构, 这虽然比光路偏移法简单一些, 但是也同样限制了装置的进一步拓展; 四元均分相位板调制后的光束因相干而形成非封闭的类面色圈型焦斑结构, 具有同时实现 X 方向和 Y 方向的分辨率改善的优点, 但缺点是在其他方向上分辨率的改善不均匀, 形成的 STED 荧光点扩展函数不是圆对称的, 不能给出较好的超分辨图像。二元均分相位板和四元均分相位板都没有提高轴向分辨率的能力。

螺旋相位板调制 STED 光束可以获得圆对称的面色圈型焦斑结构, 单路 STED 光便可实现横向圆对称的超分辨成像, 增加一路光即可以实现双色成像, 因此成为横向超分辨和装置拓展的常用选择。螺旋相位板法亦没有提高轴向分辨率的能力。

4 STED 荧光显微镜的发展

STED 荧光显微镜的基本原理实现以后, 出现了多方面发展的趋势, 由单色成像发展为多色成像, 由多光源激发发展到单宽带光源激发, 由单通道成像发展到多通道成像, 提高成像速度以获得时间分辨 STED 荧光显微镜成像, 改变激发模式实现双光子 STED 荧光显微镜等。

以国内外已公开发表的 STED 荧光显微镜装置的改进案例进行介绍。需要说明的是, 这些案例的分类并不是绝对的, 比如快速 STED 成像中可能也使用了连续光源激发, 多色 STED 成像也可能使用了宽带光源激发等等。我们将从方法入手重点分析各个新装置的优点, 为 STED 荧光显微镜装置的下一步改进提供参考。

4.1 宽带光源激发的 STED 荧光显微镜

2008 年, Wildanger 等^[33]使用宽带光源(Fianium SC-450 HP)设计了 STED 荧光显微镜(SC-STED), 实验装置如图 11 所示。其中宽带光源可以提供整个可见光光谱范围内的脉冲激光, 20 nm 光谱范围内对应的脉宽约 80 ps。宽带激光经偏振光分离器(PB)分成偏振方向相互垂直的两路光, 其中透射光经过基于棱镜的波长选择系统(WS)选择出 STED 光, 反射光经滤波片(EF)选择出发光, 然后将选择出的 STED 光和激发光通过各自的保偏(PM)单模光纤(SMF)输入到后半部分光路。STED 光路使用 2π 螺旋相位板对 STED 波前进行调制, 然后将激发光和调制后的 STED 光均经二向色性片(D1, D2)反射和 $\lambda/4$ 玻片变成圆偏振光, 最终经显微物镜聚焦到样品上。激发光激发焦斑内的荧光分子到激发态, STED 光退激发焦斑外缘的荧光态分子到基态, 所以仅焦斑中心区域的荧光分子能够自发辐射荧光, 自发辐射的荧光经同一个显微物镜收集, 穿过两个二向色性片和荧光带通滤波片(DF)经光纤收集系统被雪崩光电二极管(APD)探测器探测, 即完成了样品某点的荧光测量。利用三维移动样品台可以实现对样品的三维成像。

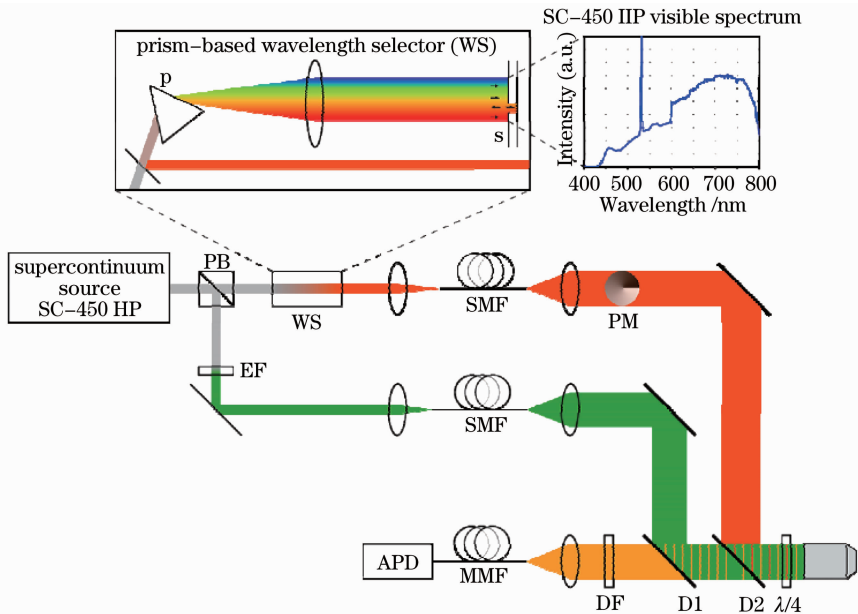


图 11 SC-STED 荧光显微镜装置示意图^[33]

Fig. 11 Sketch of a STED microscope using SC laser beams^[33]

作者使用该装置对纳米荧光微球成像, 获得了 30~50 nm 分辨率的超分辨图像, 完成了对哺乳动物 PtK2 细胞微丝微管的成像, 获得了 60~80 nm 分辨率的超分辨图像。

因为宽带光源可以提供整个可见光范围内波长的激光, 所以宽带光源激发的 STED 荧光显微镜可以实现多色成像, 多色成像时只需要选择合适的滤波片和合适的波长选择系统即可实现; 宽带光源激发的 STED 荧光显微镜装置中只使用一个光源, 不需要两光束的同步调节, 增加了装置的稳定性。

4.2 连续激光激发的 STED 荧光显微镜

2007 年, Willig 等^[34]实现了基于连续(CW)激光的 STED 荧光显微镜(CW-STED), 获得了横向 29 nm 分辨率的图像, 其实验装置如图 12 所示。除了光源不同外, 其他装置设置与一般 STED 荧光显微镜没有差别。但是该装置对于激光强度的要求有所不同。以弛豫时间为 3 ns 的荧光染料为例, 激发光强需要达到 3~10 mW 才能充分激发荧光分子到激发态, 而且激发光波长要处于荧光分子最强吸收波长, STED 光波长要处于远远偏离荧光分子吸收的位置, 以达到 STED 光充分耗尽荧光分子的目的, 这使得连续光 STED 难以充分耗尽荧光分子, 成

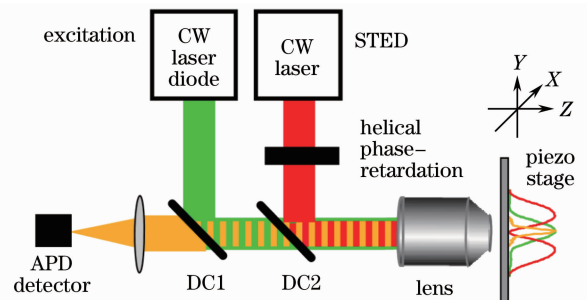


图 12 CW-STED 荧光显微镜装置示意图^[34]

Fig. 12 Sketch of a STED microscope using CW laser beams^[34]

为 CW-STED 难以实现更高分辨率的原因。

连续激光激发的 STED 荧光显微镜区别于脉冲激光激发的 STED 荧光显微镜,不需要脉冲时间延迟调节,使得装置的可移植性大大提高,只需在普通的扫描荧光共聚焦显微镜上加入螺旋相位板调制的 STED 光路即可实现 STED 荧光显微镜的超分辨成像。但相比较而言,脉冲激光可以提供更高的峰值功率,并且通过调节激发光与 STED 光的时间延迟获得最佳的超分辨,因此可以使用较小的 STED 平均功率,降低了样品热损伤的可能性。

4.3 多色 STED 荧光显微镜

2011 年, Buckers 等^[35] 设计了双色 STED 荧光显微镜,实现了超分辨双色共定位,如图 13 所示。

两对激发和 STED 光束由一个宽带激光光源提供,激发光(570 ± 2 nm 和 650 ± 2 nm)通过声光调制滤波器选出,STED 光(720 ± 10 nm 和 755 ± 15 nm)通过棱镜分光系统选出,这四束光各自通过相应的保偏光纤耦合到下级光路,相对应的一组激发光和 STED 光通过二向色性片(DC)合并成一条光路,而两组光路的偏振方向是相互垂直的,合并后的两条光路再通过偏振光分离器合并在一起入射到显微物镜中,STED 光路调制相位板使用的是螺旋相位板。

因为四束激光是从同一个宽带光源中分离出的,所以不存在脉冲的同步失调问题,但是同一组的激发光和 STED 光仍然需要通过光学延迟线调节时间延迟,两组脉冲之间需要在时间上分离开。该装置使用不同的光纤长度获得了两组脉冲之间 40 ns 的时间延迟。

两种纳米荧光微球辐射的荧光均被多带二向色性片反射,然后再经过另一个二向色性片分离开并被相应的信号收集系统收集,此装置可以实现双通道同时成像,实现超分辨的双色共定位。

4.4 快速 STED 荧光显微镜

2010 年, Moneron 等^[36] 设计了光路扫描的快速 STED 荧光显微镜,获得了 35 nm 的横向分辨率,实验装置如图 14 所示,此光路使用扫描振镜作为快扫描轴,使用压电平移台作为慢扫描轴。

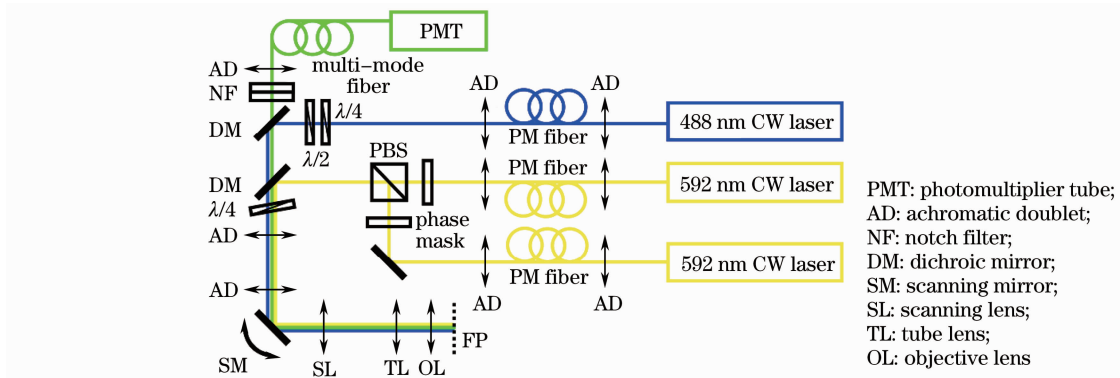


图 14 快速 STED 荧光显微镜装置示意图^[36]

Fig. 14 Setup of fast STED fluorescence microscope^[36]

2011 年, Bingen 等^[37] 使用一对沃拉斯顿棱镜设计了并行 STED 荧光显微镜,可以同时进行四组成像,大大提高了成像速度;2007 年, Westphal 等^[38] 实现了对荧光微球的动态成像,达到了 80 frame/s;2008 年,在活细胞中实现了 28 frame/s 的成像^[39]。快速 STED 荧光显微镜可以高分辨地捕获细胞内动态信息,在生

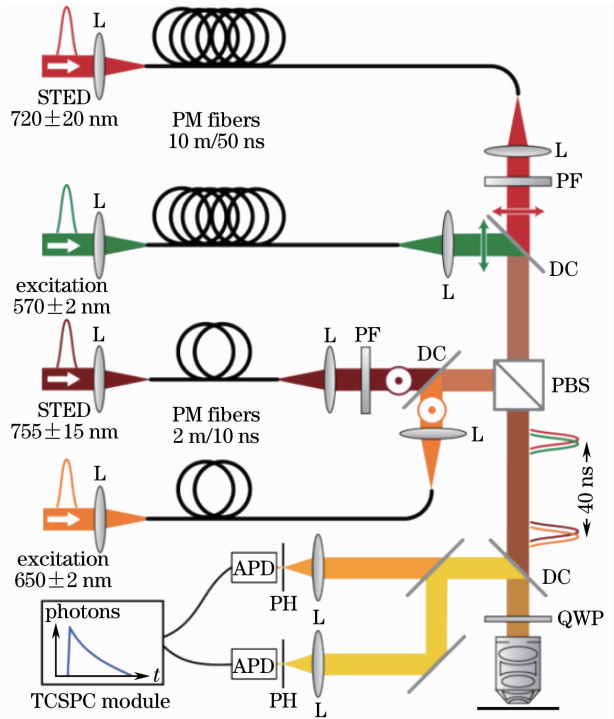


图 13 多通道多色 STED 荧光显微镜装置示意图^[35]

Fig. 13 Setup of multi-channel/multi-color STED fluorescence microscope^[35]

物单细胞和单分子研究中具有重要意义。

4.5 双光子激发的 STED 荧光显微镜

双光子激发的 STED 荧光显微镜在 STED 显微镜原理提出以后就得到了广泛的关注^[40~43],这里介绍一种单波长双光子激发的 STED 荧光显微镜(SW2PE-STED)^[44],基本原理及装置如图 15 所示。装置中只使用了一束波长为 770 nm 的激光同时作为双光子激发的激发光和 STED 光,激光经过偏振光分离器分成两束相互垂直的偏振光,其中反射光作为双光子激发的激发光,但同时必须防止单光子吸收,透射光经玻璃棒、延迟器和 100 m 的光纤将脉宽展宽到 250 ps 以获得有效的 STED 效率,STED 光经螺旋相位板调制后与激发光一起经偏振光分离器耦合成一束光,在经过 $\lambda/2$ 玻片和 $\lambda/4$ 玻片给显微镜提供照明。

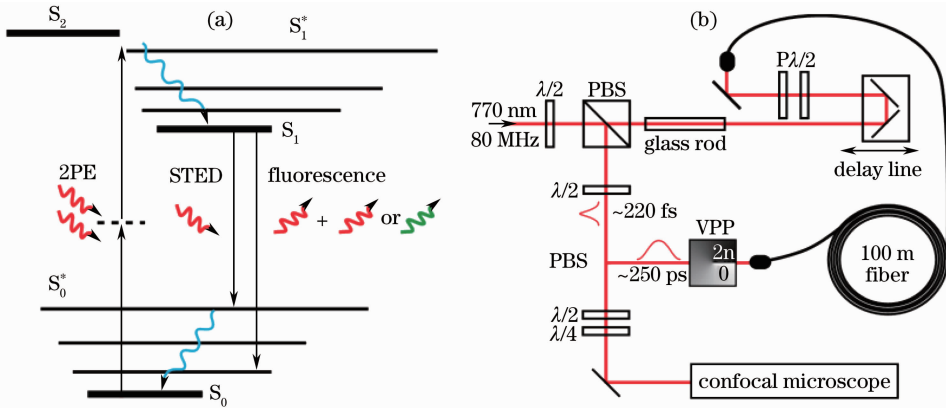


图 15 SW2PE-STED 荧光显微镜装置示意图^[44]

Fig. 15 Setup of SW2PE-STED microscope^[44]

这项技术的核心是找到一个合适的波长,既使得双光子激发的吸收截面不为零,又能保证充分的 STED 效率,同时还能够避免单光子激发。而且要有合适的光强和脉冲宽度来获得重要的荧光开关状态。双光子激发的 STED 荧光显微镜结合了双光子荧光显微镜的优点和 STED 荧光显微镜的超分辨。

5 结束语

从 1994 年 STED 荧光显微术原理的提出至今,在不到 20 年的时间内,STED 荧光显微镜获得了飞速的发展,先后经历了单纯 STED 荧光显微镜发展阶段和多元化综合成像阶段。展望未来,STED 荧光显微镜装置还有许多方面需要进一步的探索和完善。

使用半波相位板可以有效地提高 STED 荧光显微镜轴向分辨率,但是横向分辨率的改善受到了限制,而且面色圈型焦斑中心的基底强度对突起区域的半径非常敏感,限制了它在 STED 荧光显微镜中的应用。使用螺旋相位板可以有效地提高横向分辨率,但是没有轴向超分辨能力。能够同时有效地提高横向和轴向分辨率的设计将极大简化 STED 荧光显微镜的光路,获得三维超分辨成像。已有报道使用高斯-拉盖尔矢量光^[45]和高阶多模光束^[46]来实现面色圈型焦斑,这种不使用相位板即可实现面色圈型焦斑的方法,将使得 STED 显微镜的实现更加容易,系统更加稳定。新的 STED 光焦斑实现方法是 STED 荧光显微镜的重要发展方向之一。

在 STED 荧光显微镜中应用宽带激光器和连续激光器已经得到了较高的分辨率,但是这些激光器的成本都较高,有使用廉价的二极管激光器实现 STED 荧光显微镜的报道^[47],但是难以获得更高的成像分辨率。廉价同时又能获得更高分辨率超分辨成像的激光器能够减小装置成本,有利于 STED 荧光显微镜的推广和商业化应用,因此用新型激光器提供激发光和 STED 光成为 STED 荧光显微镜发展的重要方向之一。

三维超分辨实验装置已经有了较多的研究^[48~50],半波相位板具有实现三维超分辨的能力,但是横向分辨率的改善受到了限制。有报道将 STED 荧光显微镜与全内反射荧光显微镜(TIRFM)联合成像同时获得横向和轴向的超分辨^[51],但是这种方法非常复杂,并且不存在层析能力,失去了远场光学显微镜的优势。将基于螺旋相位板的 STED 荧光显微镜与 4 π 显微镜联用成像将会同时获得横向和轴向的超分辨,可以实现

三维超分辨,但系统过于复杂,稳定性难以保证。探索简便有效的三维超分辨系统也是 STED 荧光显微镜的发展方向之一。

时间分辨超分辨成像可以追踪生物体内快速的生化过程,是研究生物体运行机制的重要手段,但是 STED 荧光显微镜的时间分辨超分辨成像受到了激光光强等方面的限制,成像速度难以进一步提高。突破这些困难获得快速成像的方法是 STED 荧光显微镜的一个重要发展方向。

STED 荧光显微镜可以无损地探测细胞内的远场超分辨光学信息,但是无法获得力学、电磁学等信息。将 STED 荧光显微镜与原子力显微镜(AFM)、扫描探针显微镜(SPM)等联合成像,在对样品进行超分辨光学成像的同时,获得样品更加全面的信息,能够加深对研究目标的全面认识。这也是 STED 荧光显微镜应用拓展的重要方向。

参 考 文 献

- 1 E. Abbe. Beitrage zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung[J]. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 1873, **9**(1): 413~468
- 2 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
- 3 V. Westphal, S. W. Hell. Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope[J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2005, **94**(14): 143903
- 4 B. Harke, J. Keller, C. K. Ullal *et al.*. Resolution scaling in STED microscopy[J]. *Opt. Express*, 2008, **16**(6): 4154~4162
- 5 S. W. Hell. Far-field optical nanoscopy[J]. *Science*, 2007, **316**(5828): 1153~1158
- 6 L. Kastrop, H. Blom, C. Eggeling *et al.*. Fluorescence fluctuation spectroscopy in subdiffraction focal volumes[J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2005, **94**(17): 178104
- 7 M. Hofmann, C. Eggeling, S. Jakobs *et al.*. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins[J]. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, **102**(49): 17565~17569
- 8 M. Fernandez-Suarez, A. Y. Ting. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells[J]. *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.*, 2008, **9**(12): 929~943
- 9 B. Hein, K. I. Willig, S. W. Hell. Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell[J]. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, **105**(38): 14271~14276
- 10 Wang Yan, Zhao Lingling, Chen Tongsheng *et al.*. Study on cell cycle using fluorescence lifetime imaging microscopic system based on a streak camera[J]. *Chinese J. Lasers*, 2011, **38**(3): 0304002
王 岩, 赵聆伶, 陈同生 等. 利用基于扫描相机的荧光寿命成像显微技术研究细胞周期[J]. *中国激光*, 2011, **38**(3): 0304002
- 11 Cai Xiamei, Yu Biying, Wu Shulian *et al.*. Evaluation of myocardial ischemia by two-photon excited fluorescence *in vivo* [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2010, **47**(6): 061701
蔡吓妹, 喻碧莺, 吴淑莲 等. 大鼠早期急性心肌梗血中的荧光成像和光谱分析[J]. *激光与光电子学进展*, 2010, **47**(6): 061701
- 12 K. I. Willig, A. C. Stiel, T. Brakemann *et al.*. Dual-label STED nanoscopy of living cells using photochromism[J]. *Nano Lett.*, 2011, **11**(9): 3970~3973
- 13 K. R. Chi. Super-resolution microscopy: breaking the limits[J]. *Nature Methods*, 2009, **6**(1): 15~18
- 14 T. A. Klar, S. W. Hell. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy[J]. *Opt. Lett.*, 1999, **24**(14): 954~956
- 15 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]. *Phys. Rev. E*, 2001, **64**(6): 066613
- 16 M. Dyba, S. W. Hell. Focal spots of size $\lambda/23$ open up far-field fluorescence microscopy at 33 nm axial resolution[J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2002, **88**(16): 163901
- 17 V. Westphal, J. Seeger, T. Salditt *et al.*. Stimulated emission depletion microscopy on lithographic nanostructures[J]. *J. Phys. B: At Mol. Opt.*, 2005, **38**(9): S695~S705
- 18 K. I. Willig, S. O. Rizzoli, V. Westphal *et al.*. STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis[J]. *Nature*, 2006, **440**(7086): 935~939

- 19 G. Donnert, J. Keller, R. Medda *et al.*. Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy[J]. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, **103**(31): 11440~11445
- 20 S. Bretschneider, C. Eggeling, S. W. Hell. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy by optical shelving [J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2007, **98**(21): 218103
- 21 E. Rittweger, K. Y. Han, S. E. Irvine *et al.*. STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution [J]. *Nature. Photon.*, 2009, **3**(3): 144~147
- 22 Chen Wenxia, Xiao Fanrong, Liu Li *et al.*. Breaking through the diffraction limit of far-field optical microscopy by stimulated emission depletion (STED)[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2005, **42**(10): 51~56
陈文霞, 肖繁荣, 刘力等. 利用受激发射损耗(STED)显微术突破远场衍射极限[J]. 激光与光电子学进展, 2005, **42**(10): 51~56
- 23 E. Rittweger, B. R. Rankin, V. Westphal *et al.*. Fluorescence depletion mechanisms in super-resolving STED microscopy [J]. *Chem. Phys. Lett.*, 2007, **442**(4-6): 483~487
- 24 M. Schrader, F. Meinecke, K. Bahlmann. Monitoring the excited state of a fluorophore in a microscope by stimulated emission[J]. *Bioimaging*, 1995, **3**(4): 147~153
- 25 E. Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems. 1. An integral representation of the image field[J]. *Proc. R. Soc. Lon. Ser. A*, 1959, **253**(1274): 349~357
- 26 B. Richards, E. Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems. 2. Structure of the image field in an aplanatic system [J]. *Proc. R. Soc. Lon. Ser. A*, 1959, **253**(1274): 358~379
- 27 T. A. Klar, M. Dyba, S. W. Hell. Stimulated emission depletion microscopy with an offset depleting beam[J]. *Appl. Phys. Lett.*, 2001, **78**(4): 393~395
- 28 T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba *et al.*. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission[J]. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, **97**(15): 8206~8210
- 29 V. Westphal, L. Kastrop, S. W. Hell. Lateral resolution of 28 nm ($\lambda/25$) in far-field fluorescence microscopy[J]. *Appl. Phys. B*, 2003, **77**(4): 377~380
- 30 M. Bossi, J. Folling, M. Dyba *et al.*. Breaking the diffraction resolution barrier in far-field microscopy by molecular optical bistability[J]. *New J. Phys.*, 2006, **8**: 275
- 31 Yu Jianqiang, Yuan Jinghe, Fang Xiaohong *et al.*. Effect of excitation and depletion process on resolution of stimulated emission depletion microscopy[J]. *Acta Optica Sinica*, 2010, **30**(s1): s100405
于建强, 袁景和, 方晓红等. 受激辐射耗尽荧光显微镜的激发耗尽过程与空间分辨率计算[J]. 光学学报, 2010, **30**(s1): s100405
- 32 E. Auksoorius, B. R. Boruah, C. Dunsby *et al.*. Stimulated emission depletion microscopy with a supercontinuum source and fluorescence lifetime imaging[J]. *Opt. Lett.*, 2008, **33**(2): 113~115
- 33 D. Wildanger, E. Rittweger, L. Kastrop *et al.*. STED microscopy with a supercontinuum laser source[J]. *Opt. Express*, 2008, **16**(13): 9614~9621
- 34 K. I. Willig, B. Harke, R. Medda *et al.*. STED microscopy with continuous wave beams[J]. *Nature Methods*, 2007, **4**(11): 915~918
- 35 J. Buckers, D. Wildanger, G. Vicidomini *et al.*. Simultaneous multi-lifetime multi-color STED imaging for colocalization analyses[J]. *Opt. Express*, 2011, **19**(4): 3130~3143
- 36 G. Moneron, R. Medda, B. Hein *et al.*. Fast STED microscopy with continuous wave fiber lasers[J]. *Opt. Express*, 2010, **18**(2): 1302~1309
- 37 P. Bingen, M. Reuss, J. Engelhardt *et al.*. Parallelized STED fluorescence nanoscopy[J]. *Opt. Express*, 2011, **19**(24): 23716~23726
- 38 V. Westphal, M. A. Lauterbach, A. D. Nicola *et al.*. Dynamic far-field fluorescence nanoscopy[J]. *New. J. Phys.*, 2007, **9**: 435
- 39 V. Westphal, S. O. Rizzoli, M. A. Lauterbach *et al.*. Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement[J]. *Science*, 2008, **320**(5873): 246~249
- 40 T. Scheul, C. D. Amico, I. Wang *et al.*. Two-photon excitation and stimulated emission depletion by a single wavelength [J]. *Opt. Express*, 2011, **19**(19): 18036~18048
- 41 G. Moneron, S. W. Hell. Two-photon excitation STED microscopy[J]. *Opt. Express*, 2009, **17**(17): 14567~14573
- 42 R. J. Marsh, D. A. Armoogum, A. J. Bain. Stimulated emission depletion of two-photon excited states[J]. *Chem. Phys. Lett.*, 2002, **366**(3-4): 398~405

- 43 P. Bianchini, A. Diaspro. Fast scanning STED and two-photon fluorescence excitation microscopy with continuous wave beam[J]. *J. Microsc-Oxford*, 2012, **245**(3): 225~228
- 44 P. Bianchini, B. Harke, S. Galiani *et al.*. Single-wavelength two-photon excitation-stimulated emission depletion (SW2PE-STED) superresolution imaging[J]. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, **109**(17): 6390~6393
- 45 P. Torok, P. R. T. Munro. The use of Gauss-Laguerre vector beams in STED microscopy[J]. *Opt. Express*, 2004, **12**(15): 3605~3617
- 46 R. K. Singh, P. Senthilkumran, K. Singh. Focusing of linearly and circularly polarized Gaussian background vortex beams by a high numerical aperture system afflicted with third-order astigmatism[J]. *Opt. Commun.*, 2008, **281**(24): 5939~5948
- 47 V. Westphal, C. M. Blanca, M. Dyba *et al.*. Laser-diode-stimulated emission depletion microscopy[J]. *Appl. Phys. Lett.*, 2003, **82**(18): 3125~3217
- 48 D. Wildanger, R. Medda, L. Kastrup *et al.*. A compact STED microscope providing 3D nanoscale resolution[J]. *J. Microsc. Oxford*, 2009, **236**(1): 35~43
- 49 C. K. Ullal, S. Primpke, R. Schmidt *et al.*. Flexible microdomain specific staining of block copolymers for 3D optical nanoscopy[J]. *Macromolecules*, 2011, **44**(19): 7508~7510
- 50 A. Punge, S. O. Rizzoli, R. Jahn *et al.*. 3D reconstruction of high-resolution STED microscope images[J]. *Microsc. Res. Techniq.*, 2008, **71**(9): 644~650
- 51 M. Leutenegger, C. Ringemann, T. Lasser *et al.*. Fluorescence correlation spectroscopy with a total internal reflection fluorescence STED microscope (TIRF-STED-FCS)[J]. *Opt. Express*, 2012, **20**(5): 5243~5263