

可逆饱和光转移过程的荧光超分辨显微术

郝翔 匡翠方 李旻晖 刘旭

(浙江大学现代光学仪器国家重点实验室, 光电显示技术研究所, 浙江 杭州 310027)

摘要 基于可逆饱和光转移过程的荧光超分辨显微技术,从原理上打破了原有的光学远场衍射极限对光学系统极限分辨率的限制,在生物、化学、医学等多个学科拥有广泛的应用前景。回顾了近年来超分辨显微研究的历史,综述了目前常见的几种基于可逆饱和光转移过程的荧光超分辨显微方法,详细描述了各自的技术特点并对比了其优缺点,阐述了相关领域内最新的研究工作进展。

关键词 显微;超分辨;可逆饱和光转移过程;受激发射损耗显微镜;基态损耗显微镜;饱和图案激发显微镜;饱和结构光照明显微镜

中图分类号 O439 文献标识码 A doi: 10.3788/LOP49.030005

Reversible Saturable Optical Transitions Based Fluorescence Nanoscopy

Hao Xiang Kuang Cuifang Li Yanhui Liu Xu

(Institute of Photoelectric Display, State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentations, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310027, China)

Abstract The reversible saturable optical transitions (RESOLFT) based fluorescence nanoscopy, which fundamentally breaks the barrier of the diffraction limit in the far field, is expected to be widely used in biology, chemistry and medicine domain. This paper reviews the history of fluorescence nanoscopy technology, summarizes some general RESOLFT approaches, and explicitly describes their corresponding characters, especially the advantages and drawbacks. The new improvement in related domains are also shown.

Key words microscopy; superresolution; reversible saturable optical transitions; stimulated emission depletion; ground state depletion; saturated pattern excitation microscopy; saturated structured illumination microscopy

OCIS codes 180.2520; 050.1960; 180.4315; 180.5810

1 引言

基于电子束和扫描探针技术的显微成像技术,如扫描电子显微镜(SEM)和原子力显微镜(AFM)等,使人们首次可以对分子和原子量级的物体细节进行清晰准确地观察,从而极大地拓展了人们对于微观世界的认识。然而,在生物、化学和医学等多个领域,以透镜为基础的光学显微镜仍占有重要的地位,其主要原因在于与基于电子束和扫描探针技术的显微成像技术相比,光学显微镜具有无可比拟的优势:由于使用可见光作为信息载体,它的观测图像和结果更为直观;可以透过表面深入观察样品内部;并借助荧光标记等其他技术手段对于样品内部的结构和生化反应进行针对性的观察。事实上,如果光学显微镜能够具有可见光波亚波长分辨率,借助于光学层析技术,光学显微镜便可以对样品内部结构进行三维重构。然而,由于衍射极限的存在,长期以来,人们普遍认为以透镜和可见光作为媒介进行亚波长观察是不可能的。

衍射极限于18世纪由德国科学家 Abbe 首次提出^[1]。进一步研究表明,对于一般透镜,其聚焦光斑的

收稿日期: 2011-08-29; 收到修改稿日期: 2011-10-18; 网络出版日期: 2012-01-07

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(2010QNA5 035),浙江省自然科学基金(Y1100408)和浙江省教育厅科研项目基金(Y201009976)资助课题。

作者简介: 郝翔(1984—),男,博士研究生,主要从事超分辨成像方面的研究。E-mail: caesarhx@gmail.com

导师简介: 匡翠方(1977—),男,博士,副教授,主要从事超分辨显微成像方面的研究。E-mail: cfkuang@zju.edu.cn

大小用半峰全宽(FWHM)可以近似表述为^[2]:径向约为 $\lambda/2$ 、轴向约为 λ ,其中 λ 为工作波长,另外还与透镜自身的数值孔径(NA)高度相关。透镜的极限分辨率往往可以由其聚焦光斑的点扩散函数(PSF)决定,较小的聚焦光斑大小也意味着较强的极限分辨率。因此,为了使光学显微镜获取亚波长分辨率,早期的尝试往往集中在对于衍射极限公式的讨论上,即通过减小工作波长、增大数值孔径压缩聚焦光斑的大小。对于前者的研究直接导致了各种电子束显微镜的诞生,而后者则将光学显微镜推向了新的发展阶段。共焦显微镜^[3,4]是最早提出的通过小孔直接限制聚焦光斑的大小来达到消除杂散光、提高系统分辨率的方法。随后,通过对向放置的共轭双镜头模式^[5],对光学显微镜系统的有效孔径角进行扩展,人们有效提高了相对较差的光学系统轴向分辨率,其典型代表包括驻波显微镜(SWM)、非相干照明干涉图像干涉显微镜(I5M)和4Pi显微镜。一种更为直接有效的方法是提高透镜的物方折射率。现在,使用折射率 $n=1.518$ 的浸没油来将数值孔径提高至1.4的浸没式显微物镜已成为通用大数值孔径显微物镜的典型代表。一般而言,液体自身的折射率有限,因此一种更有效的办法是使用固体浸没式透镜(SIL)^[6]。然而,使用上述的方法虽然可以有效地减小透镜聚焦光斑的PSF,但仍然受限于经典的衍射极限理论,因此当使用可见光作为工作光时,其分辨率的提升是有限的。在现实中,很难获得小于100 nm的分辨率。

进一步的研究表明,在远场无法获得亚波长分辨率的主要原因在于远场一般只能收集传导波信号,而携带高频信息的倏逝波,由于其电场强度随传输距离的增加而呈指数衰减,因此被严格限制在近场区域。在了解了物理本质之后,一个直接的思路便是进入近场收集和探测近场光信号,以收集倏逝波提高系统的整体分辨率。这种思路导致了近场光学和近场扫描光学显微镜(NSOM)^[7,8]的诞生。NSOM使用光探针探测样品表面的近场光学信号,其分辨率由光探针开口大小及与样品表面的距离决定。当使用无孔径场增强型光探针时,可以获得小于25 nm的分辨率。另一种思路被称为完美透镜理论^[9]。该理论从物理上证明了当光波通过负折射率材料后,可以获得无衍射效应的聚焦光斑从而达到完美成像的作用。该理论在2000年被首次提出后,被进一步发展为超透镜(SL)理论并被得到了实践应用^[10]。在理论上,SL的分辨率是没有极限的。但在实际中,由于几乎所有的负折射率材料都为金属而存在一定的吸收,因此限制了实际可以获得的分辨率的下限。SL的另一种实现方式则摒弃了原有的负折射率模型,使用微米量级的介质小球作为中间媒介成功获得了50 nm的分辨率^[11]。但是,不管是NSOM还是SL,为了能够获取倏逝波信号,都必须将工作器件贴近样品表面,这就极大地限制了它们的应用范围。同时,也使得这些方法仅仅能获得样品表面的观测信息而无法深入样品内部进行三维观察。

鉴于现有超分辨显微系统的种种不足,人们在继续对上述系统进行进一步改进的同时,也在积极寻找其他可能的途径。荧光激发与淬灭过程的非线性特点为人们提供了新的灵感,而荧光蛋白在生物、医学领域的普遍应用使得基于荧光的超分辨显微技术具有广泛的应用前景,基于荧光的超分辨的超分辨显微技术逐渐成为科研和相关产业界的研究热点。本文综述了目前常见的几种基于可逆饱和光转过程的荧光超分辨显微方法,阐述了相关领域内最新的研究进展。

2 远场荧光显微镜

基于计算机的三维成像技术^[12]和绿色荧光蛋白及其衍生物^[13,14]的发明为光学超分辨显微的实现提供了新的途径。虽然早期的荧光显微研究中荧光染料仅仅用于对特定观察物进行定向标记示踪,如观察化学反应中的粒子聚合等,但很快人们发现了荧光染料自身拥有的非线性吸收(如荧光漂白)与发射(如荧光寿命成像)特性,从而为远场超分辨显微研究提供了新的思路。一系列新的基于荧光的超分辨显微理论和方法被提出并加以实际应用^[15]。

2.1 双光子荧光显微镜

利用荧光双光子吸收过程中较高的吸收阈值,便制成了双光子荧光显微镜^[16]。与传统的荧光显微镜不同,双光子荧光显微镜需要同时吸收两个光子才能完成一个荧光上的转换过程,因此实际有效的聚焦光斑的PSF被大为缩小,在达到超分辨显微的同时,也有效抑制了聚焦光斑旁瓣造成的探测噪声对于观察结果的影响。同时,由于PSF在三维方向上被同时压缩,因此,双光子荧光显微镜也是第一种具有实用价值的三维超分辨光学显微镜,特别适用于厚样品的观察。在双光子荧光显微镜的基础上,利用更多光子的多光子荧光

显微镜也在随后被制造成功^[17],从而使系统的分辨率得到了进一步的提升。但是,双光子荧光显微镜也具有一些无法回避的缺陷:由于双光子荧光过程中的入射光往往使用波长较长的红外光,工作波长的延长在一定程度上抵消了通过双光子荧光过程获得的超分辨率;在双光子激发过程中使用的入射光能量较大,容易在焦平面附近造成荧光染料的光漂白;由于荧光染料自身造成的光毒作用等。

2.2 随机开关与读取显微技术

随机开关与读取显微技术是包括光敏定位显微镜(PALM)^[18]、随机光学重构显微镜(STORM)^[19]、基态损耗-单分子返回显微镜(GSDIM)^[20]及它们的众多改型在内的一系列荧光超分辨显微技术的总称。虽然在原理上有所不同,随机开关与读取显微技术都是通过多幅图像合成的过程来完成整个观察过程的。在拍摄每一幅图像时,一个共同的假设前提是:只有有限个可分辨的荧光染料分子被激发,即被激发分子与分子间的距离大于光学远场衍射极限;并且在循环拍摄的过程当中,每个荧光染料分子只被激发一次。因此,在理论上,随机开关与读取显微技术是没有分辨率下限的,其极限分辨率仅仅由荧光染料分子成像后的定位拟合误差大小所决定。但是,由于在一个观察过程中,需要反复拍摄观察区域(拍摄次数由观察区域内荧光分子的密度决定),因此整个观察过程速度较慢,不适用于观察活体样品。这也是该方法的主要缺陷。

2.3 目标开关与读取显微技术

目标开关与读取显微技术,也被称为可逆饱和光转移过程(RESOLFT),主要包括受激发射损耗显微镜(STED)、基态损耗显微镜(GSD)、饱和图案激发显微镜(SPEM)和饱和结构光照明显微镜(SSIM)等几种。相较于之前的随机开关与读取显微技术,目标开关与读取显微技术最大的不同在于:观察图像是由循环扫描的方式获取的,每个荧光染料分子在整个观察过程中将被反复激发和淬灭。

3 基于可逆饱和光转移过程的荧光超分辨显微技术

通过 RESOLFT 过程^[21]可以达到超分辨显微的目的。如图 1 所示为 RESOLFT 过程的原理图。假设荧光染料分子具有两个光学状态 A 和 B[如图 1(a)所示],A→B 的转移过程可以由入射光来驱动,其转移速率可以表示为 $k_{AB} = \sigma_{AB} I$,其中 σ_{AB} 是转移截面大小, I 是入射光强度。而反转移过程 B→A 的转移速率表示由 k_{BA} 表示。反转移过程可以由任意形式的能量来驱动,如光、化学反应、热能,甚至是自发辐射等。荧光染料分子两种状态的动力学特性可以表示为

$$dN_A/dt = -dN_B/dt = k_{BA}N_B - k_{AB}N_A, \quad (1)$$

式中 N_A 和 N_B 分别为对应状态的归一化可能性密度。经过一段时间 $t \gg (k_{AB} + k_{BA})^{-1}$ 后,即可以达到动态平衡,此时 $N_A^\infty = k_{BA} / (k_{AB} + k_{BA})$ 。结合(1)式可以看出,决定荧光染料分子是否处于 A 或者 B 状态的可能性主要由入射光强度 I 决定。当 I 足够大以至于 $k_{AB} \gg k_{BA}$ 时,荧光染料分子将总是处于 B 状态即此时 $N_A^\infty \rightarrow 0$ 。如果定义饱和光强度 $I_{sat} = k_{BA} / \sigma_{BA}$,则当 $I \gg I_{sat}$ 时,荧光染料分子将总是处于 B 状态。

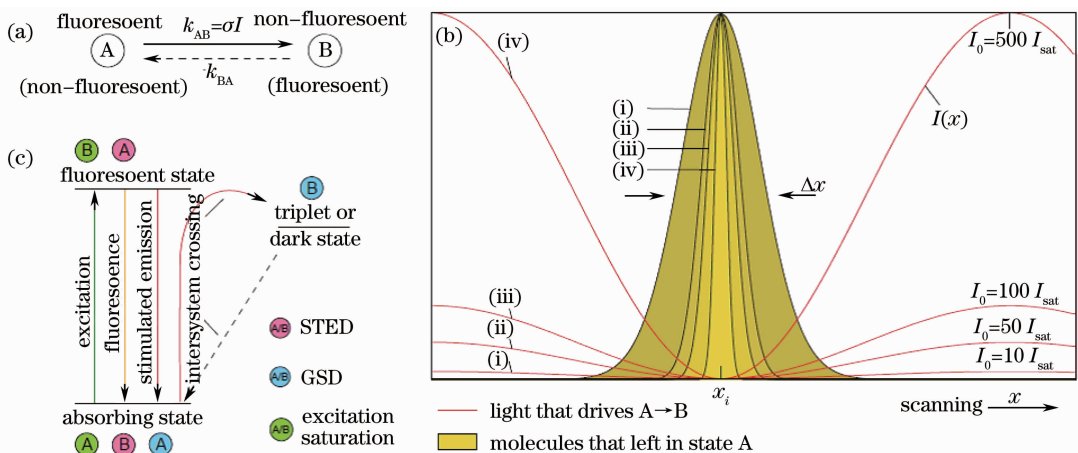


图 1 通过基于可逆饱和光转移过程的荧光超分辨显微技术实现远场超分辨的原理图

Fig. 1 Principle diagram of fluorescence superresolution microscopy by using the RESOLFT

图 1(b)表明了如何通过上述两种状态的相互转移来压缩处于状态 A 的荧光染料分子的有效面积。为了达到上述目的,入射光强度 $I=I(x)$ 在 x_i 点必须等于 0。但是在现实中,这个要求是极其难以被满足的。因此通常认为,当位于 x_i 点的激光光强小于峰值光强 I_{\max} 的 1%^[22] 即可。如果将这样的 $I(x)$ 分布作用于全部处于状态 A 的荧光染料分子群上时,并 $I_{\max} \gg I_{\text{sat}}$,则除了 x_i 点及其周围区域外,所有其他区域的荧光染料分子都将倾向于转化成 B 状态。这种倾向将随着 I_{\max}/I_{sat} 比例的增大而增大。在这种情况下,围绕 x_i 附近的状态 A 分布的半峰全宽可以表示为

$$\Delta x \approx \frac{\lambda}{\pi n \sqrt{I_{\max}/I_{\text{sat}}}} \quad (2)$$

特别地,在显微镜系统内,考虑到显微镜物镜的聚焦特性,(2)式可以进一步改写成^[23]

$$\Delta x \approx \frac{\lambda}{2NA \sqrt{1 + I_{\max}/I_{\text{sat}}}} \quad (3)$$

式中 NA 是显微物镜的数值孔径。(3)式也进一步表明,为了获取较高的分辨率,往往需要 I_{\max}/I_{sat} 维持很大的比例,即需要较高的入射光光强,而过大的入射光强对于样品来说无疑是不利的,这一点情况与双光子荧光显微镜类似。

需要注意的是,虽然图 1(b)仅示出了一维方向,但上述讨论很容易被扩展到二维平面和三维空间内。如果仅仅考虑一维方向,那么仅仅需要考虑在一维方向上通过 RESOLFT 实现超分辨和使用沟槽状的入射光强分布即可^[22,24],其中最简单的办法是使用驻波。而如果要实现二维或三维方向上的超分辨,最完善的办法是构造油炸圈饼状的中空型聚焦光斑。由于这种类型的聚焦光斑非常特殊,因此在早期的研究中往往使用偏心光路的方法^[25,26]加以替代。直到应用相位调制器件(PM)^[27,28]之后,构造多纳圈状的中空型聚焦光斑成为可能。偏振光束经过相位编码后得到的聚焦光斑可以由基于矢量光束的 Debye 公式^[29]进行计算:

$$\mathbf{E}(r_2, \varphi_2, z_2) = iC \iint_{\Omega} \sin \theta A_1(\theta, \varphi) A_2(\theta, \varphi) \begin{bmatrix} p_x \\ p_y \\ p_z \end{bmatrix} \times \exp[i\Delta\alpha(\theta, \varphi)] \exp\{ikn[z_2 \cos \theta + r_2 \sin \theta \cos(\varphi - \varphi_2)]\} d\theta d\varphi, \quad (4)$$

式中 $\mathbf{E}(r_2, \varphi_2, z_2)$ 为聚焦点附近的光强分布, (r_2, φ_2, z_2) 是以理想焦点为原点的柱状坐标系, C 为归一化系数, $A_1(\theta, \varphi)$ 为原始入射光强度分布系数, $A_2(\theta, \varphi)$ 是一个 3×3 的坐标转换矩阵, $[p_x \ p_y \ p_z]$ 是表达入射光各偏振分量的归一化琼斯矩阵, $\Delta\alpha(\theta, \varphi)$ 为由 PM 造成的各点相位延迟。根据(4)式的计算表明,使用 $0 \sim 2\pi$ 的涡旋型相位板或使用 $0 \sim \pi$ 圆形相位板^[30]即可以构造多纳圈状的中空型聚焦光斑,在实际中,前者主要应用于焦平面内的径向超分辨,而后者则多用于轴向超分辨^[31]。(4)式还表明,入射光自身的属性,如偏振态、振幅分布等也会对聚焦光斑的性质产生很大的影响^[31]。其中一个可能的有利影响是:油炸圈饼状的中空型聚焦光斑中央暗斑的半峰全宽可能会被压缩。在这种情况下,(3)式可以被进一步修正为

$$\Delta x \approx 1/(a \sqrt{I_{\max}/I_{\text{sat}}}) \quad (5)$$

式中 a 为暗斑的抛物线拟合系数。当 a 较大时(对应于暗斑的半峰全宽较小),可以获得更高的系统分辨率^[32]。这也意味着:对于相同的系统分辨率要求,较小的暗斑的半峰全宽对应着较低的入射光光强。这是一种有效的降低入射光光强、提高系统性能的方法。另一种在实验中被证明行之有效的方法是采用具有较低阈值的荧光染料如 FP595^[33]等,但是使用 FP595 伴随而来的缺陷在于^[34]:其量子效率不高,同时动态响应时间也较长,不利于提高系统的观测刷新率。

3.1 受激发射损耗显微镜

STED 显微镜是最早提出并被实验证实的基于 RESOLFT 概念的远场超分辨荧光显微技术。它于 1994 年被 Hell 首次提出^[35]并在 20 世纪末成功实现了 100 nm 左右的径向分辨率^[25]。经过多年的发展,STED 目前公开报道的最大分辨率已小于 10 nm^[36]。

STED 显微镜的基本原理^[37]如图 1(c)所示:它将荧光染料分子的基态作为状态 B,而将激发态作为状态 A,使用两束光作为激发光和 STED 光。激发光用于驱动荧光染料分子完成 B→A 的转移过程,该过程的速率很快,将在数飞秒内完成。相对而言,荧光的自发辐射速率则慢得多,往往需要数十纳秒的时间。因此,

可以在荧光自发辐射之前,通过使用 STED 光诱发染料分子完成 $A \rightarrow B$ 的转移过程而不发射荧光。将激发光聚焦成实心聚焦光斑,STED 聚焦成多纳圈状的空心聚焦光斑,两者重合即构成了 RESOLFT 系统,达到了减小有效 PSF 的目的。

3.1.1 STED 的分类

按照工作光波的类型不同,STED 可以分为基于脉冲光工作的 P-STED 和基于连续光工作的 CW-STED。

P-STED: P-STED 是最早提出的 STED 模型^[24,25,38]。这种 STED 的激发光和 STED 光分别采用同频率但展宽不同的两束不同波长的光波,相对于 STED 光,STED 的波长更为红移,且 STED 光的展宽要大于激发光以保证能够完全消光。工作时,采用“激发光-STED 光-采样”顺次进行的模式进行,荧光染料分子的瞬时能级分布可以由公式^[35]确定为

$$\begin{cases} \frac{dn_B}{dt} = h_{\text{exc}}\sigma_{BA}(n'_A - n_B) + \frac{1}{\tau_{\text{vibr}}}n'_B \\ \frac{dn'_A}{dt} = h_{\text{exc}}\sigma_{BA}(n_B - n'_A) - \frac{1}{\tau_{\text{vibr}}}n'_A \\ \frac{dn_A}{dt} = \frac{1}{\tau_{\text{vibr}}}n'_A - h_{\text{STED}}\sigma_{AB}(n_A - n'_B) - \left(\frac{1}{\tau_{\text{fluor}}} + Q\right)n_A \\ \frac{dn'_B}{dt} = h_{\text{STED}}\sigma_{AB}(n_A - n'_B) + \left(\frac{1}{\tau_{\text{fluor}}} + Q\right)n_A - \frac{1}{\tau_{\text{vibr}}}n'_B \end{cases}, \quad (6)$$

式中 h_{exc} 和 h_{STED} 分别为激发光和 STED 光的光通量密度, τ_{vib} 为振动弛豫时间, τ_{fluor} 为荧光寿命, Q 为荧光淬灭速率。 n_A, n_B, n'_A, n'_B 分别为激发态底能级、基态底能级、激发态上能级和基态上能级能级密度且 $\sum n = 1$ 。

P-STED 最大的优点在于可以获得很高的观测刷新率,由于采用扫描成像,P-STED 目前常见的单像素刷新率为 76~80 MHz,适用于记录样品动态图像如观察生物细胞样品内的生化反应等。

CW-STED: CW-STED 出现的时间较晚,直到 2007 年第一台 CW-STED 才被研制成功^[39]。由于激发光和 STED 光都采用连续激光作为光源,因此荧光染料分子的能级分布不再随时间变化,而呈现动态平衡分布,可以用公式^[39]表示为

$$\begin{cases} n_A = \frac{k_{BA}}{k_{AB} + k_{BA} + k_{\text{fluor}}} \\ n_B = \frac{k_{AB} + k_{\text{fluor}}}{k_{AB} + k_{BA} + k_{\text{fluor}}} \end{cases}, \quad (7)$$

式中 $k_{\text{fluor}} = 1/\tau_{\text{fluor}}$ 。

与 P-STED 相比,采用 CW-STED 时样品所承受的峰值 STED 光功率降低了,这主要是由于系统的分辨率由 STED 光的有效输出功率决定,在连续光照射的情况下,相当于原有的光脉冲被进一步展宽至整个荧光寿命区间,即此时,峰值 STED 光功率下降为 P-STED 情况下的 $\tau_{\text{STED}}/\tau_{\text{fluor}}$,其中 τ_{STED} 为 P-STED 中的 STED 光脉宽。在实际制造中,由于连续激光器的造价相对低廉,并且不需要使用昂贵的脉冲同步器件,因此为制造廉价的 STED 解决方案提供了可能性^[28]。同时,采用连续光照射后,荧光信号亮度会有所提高。但是,CW-STED 的平均 STED 光输出功率相比与同等分辨率的 P-STED 要高^[39],并且由(7)式可以看出,CW-STED 不可能将处于 A 状态的荧光染料分子全部转移至 B 状态,因此在工作中 CW-STED 的背景噪声较大,会在一定程度上影响实际可以获得的系统分辨率。另外,由于样品被持续照射,样品产生光漂白和光毒作用的可能性也会提高。

混合型 STED: 为了在减小 STED 光的峰值光功率的同时维持较高的信噪比,2011 年, S. W. Hell 等^[40]提出了一种新的混合型 STED 的设计方案,即使用脉冲光作为激发光,而 STED 光仍为连续激光。同时,为了防止在激发光作用的同时读取荧光信号而造成背景噪声,该系统在信号接收端增加了电子快门而构成了一个时域脉冲探测模块。这样的系统兼具了 P-STED 和 CW-STED 的优点,同时造价相对低廉。

3.1.2 STED 的多功能化

传统的 STED 功能都较为单一,只能作为荧光超分辨显微镜对样品进行观察,近年来相关工作的一个热点是 STED 与其他荧光功能模块相互结合的可能性。先后出现了如 STED-FCS^[41]、STED-4Pi^[27]、Two Photon-STED^[42,43]、Dual Color-STED^[44]、STED-FLIM^[45]、STED-SPIM^[46] 等多种多功能型 STED,使 STED 的功能大为丰富。STED 的多功能化,也是未来以 STED 为代表的荧光超分辨显微镜的发展趋势。

3.2 基态损耗显微镜

GSD 显微镜同样是由 Hell 在 1995 年首次提出^[47],但是由于种种不利因素的限制,长期以来相关的概念一直停留在纸面上。直到 2006 年,第一台 GSD 的实验装置才被制造出来并获得了约 20 nm 的横向分辨率^[48]。

GSD 的原理较 STED 更为复杂[如图 1(c)所示],涉及荧光染料分子受激发光的三重态变化,即磷光发射。当荧光染料分子受到强的 STED 光照射时,虽然绝大部分处于激发态的荧光染料分子会重新回到基态,但是仍有可能通过系间窜越(ISC)由激发态转移为三重态,再通过三重态的自发辐射作用发出磷光回到基态。由于磷光寿命 τ_{ph} (10^{-4} s)远长于荧光寿命,因此可以认为处于三重态的荧光染料分子实际上是处于一个暂稳态,这样就为三重态的能级密度富集提供了可能。当 STED 光持续照射时,会有越来越多的分子通过 ISC 进入到三重态而不发生进一步的转移。如果 STED 循环进行得足够快,那么基态的能级密度就会逐渐减小,而三重态的能级密度则逐渐增加。在理想情况下,有可能出现基态能级密度和激光态能级密度为 0 而三重态能级密度为 1 的极端情况。此时假设以基态作为荧光染料分子的状态 A,而以三重态作为荧光染料分子的状态 B,即构成了 RESOLFT 过程所要求的条件。在这种情况下,由 A→B 的转移过程由强的连续激光激发,而 B→A 则由自发的磷光发射和磷光淬灭过程完成。由于和 CW-STED 一样采用连续激光作为工作光源,因此,GSD 的能级密度分布也是一个稳定的过程,可以表示为

$$\begin{cases} n_A = \frac{k_{ph}(k_{fluor} + Q + k_{isc})}{D} \\ n_B = \frac{h_{exc}\sigma k_{isc}}{D} \end{cases}, \quad (8)$$

式中 $D = (h_{exc}\sigma + k_{fluor} + Q)(k_{ph} + k_{isc}) + k_{isc}(k_{ph} - k_{fluor} - Q)$, $k_{ph} = 1/\tau_{ph}$, k_{isc} 是系间窜越速率, σ 是荧光上转移截面大小。需要注意的是,在这里 $n_A + n_B \neq 1$,主要由于激发态底能级仍然可能存在一定的能级密度分布。

由于使用连续光源,因此 GSD 也拥有 CW-STED 的一些优点:如不需要精确的脉冲同步控制,因而成本较低;使用连续激光器峰值功率较小等。但是,由于需要保证能够构建三重态而产生大的磷光激发,因此实际使用时 GSD 的平均 STED 光功率仍然大于 CW-STED,而且由于长时间照射样品,因此样品产生荧光漂白现象的可能性大为增加。这也是 GSD 长期不能制作出实体设备的主要原因。但是,有研究人员随后开发了基于类似理论的 GSDIM^[20]系统,正是利用了这一特点。由于 GSDIM 不属于 RESOLFT 原理,因此不在本文讨论之列。

3.3 饱和图案激发显微镜

SPEM 显微镜发明于 2002 年^[49],同样也是基于 RESOLFT 原理。但是在原理上,它与 STED 显微镜正好相反:在 SPEM 体系中,它将荧光染料分子的基态作为状态 A,而将激发态作为状态 B[如图 1(c)所示]。这使它相比于 STED 显微镜拥有一个极大的优势:即 SPEM 可以使用两束波长相同的激光来分别充当激发光和 SPEM 光(即 STED 显微镜中的 STED 光),从而使得系统的构建难度大为降低,而理论上它的分辨率和工作模式可以完全套用 STED 来进行分析。因此,SPEM 曾经被认为是最简单的 RESOLFT 系统^[33]。但是,随即人们便发现 SPEM 原理本身存在着巨大的缺陷^[33]:由于激发光和 SPEM 光采用了相同的波长和激发/抑制模式,因此,通过 SPEM 获取的超分辨荧光信号是暗场信号,并且不可避免地被混杂于大量高强度荧光背景噪声中,因此整体系统的信噪比必然受到影响。同时,需要完备的图像处理算法才能将获取的超分辨荧光信号精确提取出来,这又不可避免地影响了系统的成本和刷新率。

3.4 饱和结构光照明显微镜

SSIM 显微镜是由加州大学旧金山分校的 Gustafsson^[50]在 2005 年提出的,在 RESOLFT 原理上与 SPEM 相同,因此也有人将其作为 SPEM 显微镜的一种衍生类型。但是,与 STED、GSD、SPEM 等不同,SSIM 没有试图构造油炸圈饼状的聚焦光斑,而是借用了 Lukosz 等^[51]于 1963 年提出的通过结构光照明来增强显微镜分辨率的理论,将非线性结构性光学照明部件引入到传统的显微镜上(如图 2 所示^[50]),得到了分辨率达到 50 nm 的图像。SSIM 技术的原理是将多重相互衍射的光束照射到样本上,然后从收集到的发射光模式中提取高分辨率的信息,通过衍射放大作用,得到清晰的超分辨图像。为了使各个方向的分辨率相

同,光束照射样品时存在一定的旋转。SSIM 显微镜的另一个技术突破来自于三维衍射模型的构建^[52],其基本原理与二维模型相同,通过增加一束结构光以获取轴向超分辨信息,最终达到了径向约 100 nm、轴向约 200 nm 的分辨率。虽然证明了 SSIM 具备与其他 RESOLFT 显微技术类似的三维超分辨成像和对有一定厚度的样品深度信息进行超分辨成像的能力,但是显然相比于其他方法,SSIM 的分辨率仍处于相对较低的水平。

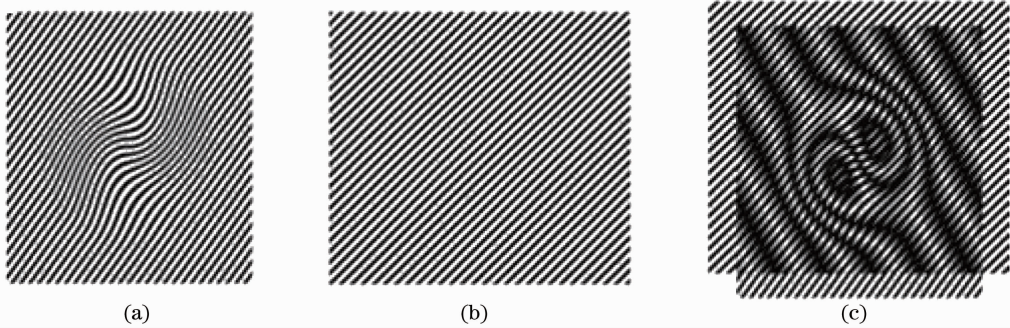


图 2 饱和结构光照明显微镜超分辨原理图

Fig.2 Principle of SSIM to achieve superresolution capability

在理论上,在不考虑样品漂白、系统实际信噪比等因素的前提下,如果仅从光学传递函数(OTF)的角度去对 SSIM 显微技术进行分析,SSIM 的 OTF 与 STED、GSD 和 SPEM 一样,都是“没有限制的”,其成像能力仅仅决定于 $\sqrt{I_{\max}/I_{\text{sat}}}$ ^[53]。因此,SSIM 的极限分辨率,还有很大的潜力可以挖掘。

4 结束语

与 20 世纪初相比,经过 100 多年的发展,进入 21 世纪,人们在光学超分辨显微成像领域已经取得了重大理论和实验突破,Abbe^[1]的远场衍射极限理论已经不再束缚光学显微成像系统的极限分辨率向更精细的领域发展。在这之中,基于荧光染料非线性效应的荧光超分辨显微技术,特别是以 STED、GSD、SPEM 和 SSIM 等为代表的 RESOLFT 显微技术展现出了与众不同的优势和良好的应用前景,成为超分辨显微成像领域内一个重要的学术分支。但是值得注意的是,虽然 RESOLFT 在理论和实验两方面都已经取得了重大的进展,并且已经出现了少量商用系统,但是仍然不能算一种理想的超分辨显微成像技术。它在成本、分辨率、使用范围等多个方面仍然存在着不足。

着眼于未来,应用和进一步完善超分辨率显微成像技术,将使人们动态、精细观察各种生物化学应用、研究其内在机理的梦想成为现实,从而对于微观世界中发生的各种现象拥有更为直观和清楚的认识。因此,超分辨率显微成像技术对于生物、化学和医药研究的未来发展、甚至是人类世界的进步而言,具有无可替代的重大作用。

参 考 文 献

- 1 E. Abbe. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung[J]. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 1873, **9**(1): 413~418
- 2 M. Born, E. Wolf. Principles of Optics[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2002
- 3 P. W. Hawkes. Theory and practice of scanning optical microscopy[J]. *Nature*, 1984, **312**(5992): 384~385
- 4 Wang Mei, Yun Maojin, Liu Liren *et al.*. Design of the super-resolution pupil filter in the confocal system[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(6): 0618001
- 5 王 美, 云茂金, 刘立人 等. 共焦显微系统中光学超分辨光瞳滤波器的设计[J]. *光学学报*, 2011, **31**(6): 0618001
- 6 M. Nagorni, S. W. Hell. Coherent use of opposing lenses for axial resolution increase in fluorescence microscopy. I. Comparative study of concepts[J]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 2001, **18**(1): 36~48
- 7 K. S. Kim, D. R. Mason, M. V. Jouravlev. Enhanced resolution beyond the Abbe diffraction limit with wavelength-scale solid immersion lenses[J]. *Opt. Lett.*, 2010, **35**(12): 2007~2009
- 8 A. Lewis, M. Isaacson, A. Harootunian *et al.*. Development of a 500-Å spatial-resolution light-microscope . 1. light is

- efficiently transmitted through gamma-16 diameter apertures[J]. *Ultramicroscopy*, 1984, **13**(3): 227~231
- 8 D. W. Pohl, W. Denk, M. Lanz. Optical stethoscopy-image recording with resolution $\lambda/20$ [J]. *Appl. Phys. Lett.*, 1984, **44**(7): 651~653
- 9 J. B. Pendry. Negative refraction makes a perfect lens[J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2000, **85**(18): 3966~3969
- 10 N. Fang, H. Lee, C. Sun *et al.*. Sub-diffraction-limited optical imaging with a silver superlens[J]. *Science*, 2005, **308**(5721): 534~537
- 11 Z. B. Wang, W. Guo, L. Li *et al.*. Optical virtual imaging at 50 nm lateral resolution with a white-light nanoscope[J]. *Nat. Commun.*, 2011, **2**(218): 1~6
- 12 J. B. Pawley. Handbook of Biological Confocal Microscopy[M]. New York: Springer, 2006
- 13 R. Y. Tsien. The green fluorescent protein[J]. *Annu. Rev. Biochem.*, 1998, **67**: 509~544
- 14 R. Y. Tsien. Imagining imaging's future[J]. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, 2003, **4**(suppl.): S16~S21
- 15 Mao Zhengle, Wang Chen, Cheng Ya. Superresolution far-field fluorescence bio-imaging: breaking the diffraction barrier [J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(9): 1283~1307
毛峥嵘, 王琛, 程亚. 超分辨远场生物荧光成像[J]. *中国激光*, 2008, **35**(9): 1283~1307
- 16 W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb. 2-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, **248**(4951): 73~76
- 17 W. W. Webb, W. R. Zipfel, R. M. Williams. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**(11): 1368~1376
- 18 E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat *et al.*. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution[J]. *Science*, 2006, **313**(5793): 1642~1645
- 19 X. W. Zhuang, M. J. Rust, M. Bates. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nat. Methods*, 2006, **3**(10): 793~795
- 20 S. W. Hell, J. Fölling, M. Bossi *et al.*. Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return[J]. *Nat. Methods*, 2008, **5**(11): 943~945
- 21 S. W. Hell, M. Dyba, S. Jakobs. Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy [J]. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2004, **14**(5): 599~609
- 22 S. W. Hell, V. Westphal. Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope[J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2005, **94**(14): 143903
- 23 K. I. Willig, J. Keller, M. Bossi *et al.*. STED microscopy resolves nanoparticle assemblies[J]. *New J. Phys.*, 2006, **8**(6): 106
- 24 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
- 25 T. A. Klar, S. W. Hell. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy[J]. *Opt. Lett.*, 1999, **24**(14): 954~956
- 26 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
- 27 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
- 28 G. Moneron, R. Medda, B. Hein *et al.*. Fast STED microscopy with continuous wave fiber lasers[J]. *Opt. Express*, 2010, **18**(2): 1302~1309
- 29 B. Richards, E. Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems. 2. structure of the image field in an aplanatic system [J]. *P. Roy. Soc. London A*, 1959, **253**(1274): 358~379
- 30 Hao Xiang, Kuang Cuifang, Wang Tingting *et al.*. Optimization of $0/\pi$ phase plate in stimulated emission depletion microscopy[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(3): 0318001
郝翔, 匡翠方, 王婷婷等. 受激发射损耗显微技术中 $0/\pi$ 圆形相位板参数优化[J]. *光学学报*, 2011, **31**(3): 0318001
- 31 X. A. Hao, C. F. Kuang, T. T. Wang *et al.*. Effects of polarization on the de-excitation dark focal spot in STED microscopy[J]. *J. Opt.*, 2010, **12**(11): 115707
- 32 S. W. Hell, B. Harke, J. Keller *et al.*. Resolution scaling in STED microscopy[J]. *Opt. Express*, 2008, **16**(6): 4154~4162
- 33 S. W. Hell. Toward fluorescence nanoscopy[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**(11): 1347~1355
- 34 M. C. Wahl, M. Andresen, A. C. Stiel *et al.*. Structure and mechanism of the reversible photoswitch of a fluorescent

- protein[J]. *P. Nat. Acad. Sci. USA*, 2005, **102**(37): 13070~13074
- 35 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
- 36 E. Rittweger, K. Y. Han, S. E. Irvine *et al.*. STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution [J]. *Nat. Photonics*, 2009, **3**(3): 144~147
- 37 Yu Jianqiang, Yuan Jinghe, Fang Xiaohong *et al.*. Effects of excitation and depletion process on resolution of stimulated emission depletion microscope[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
- 38 M. Dyba, S. W. Hell. Photostability of a fluorescent marker under pulsed excited-state depletion through stimulated emission[J]. *Appl. Opt.*, 2003, **42**(25): 5123~5129
- 39 S. W. Hell, K. I. Willig, B. Harke *et al.*. STED microscopy with continuous wave beams[J]. *Nat. Methods*, 2007, **4**(11): 915~918
- 40 S. W. Hell, G. Vicidomini, G. Moneron *et al.*. Sharper low-power STED nanoscopy by time gating[J]. *Nat. Methods*, 2011, **8**(7): 571~575
- 41 L. Kasttrup, H. Blom, C. Eggeling *et al.*. Fluorescence fluctuation spectroscopy in subdiffraction focal volumes[J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2005, **94**(17): 178104
- 42 S. W. Hell, K. I. Willig. STED-Fluorescent Light Microscopy with Two-Photon Excitation[P]. US Patent, 7863535, 2011
- 43 G. Moneron, S. W. Hell. Two-photon excitation STED microscopy[J]. *Opt. Express*, 2009, **17**(17): 14567~14573
- 44 S. O. Rizzoli, L. Meyer, D. Wildanger *et al.*. Dual-color STED microscopy at 30-nm focal-plane resolution[J]. *Small*, 2008, **4**(8): 1095~1100
- 45 M. O. Lenz, A. C. N. Brown, E. Auksorius *et al.*. A STED-FLIM microscope applied to imaging the natural killer cell immune synapse[C]. *SPIE*, 2011, **7903**: 79032D
- 46 G. S. Harms, M. Friedrich, Q. Gan *et al.*. STED-SPIM: stimulated emission depletion improves sheet illumination microscopy resolution[J]. *Biophys. J.*, 2011, **100**(8): L43~L45
- 47 S. W. Hell, M. Kroug. Ground-state-depletion fluorescence microscopy-a concept for breaking the diffraction resolution limit[J]. *Appl. Phys. B*, 1995, **60**(5): 495~497
- 48 S. W. Hell, G. Donnert, J. Keller *et al.*. Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy[J]. *P. Nat. Acad. Sci. USA*, 2006, **103**(31): 11440~11445
- 49 R. Heintzmann, T. M. Jovin, C. Cremer. Saturated patterned excitation microscopy-a concept for optical resolution improvement[J]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 2002, **19**(8): 1599~1609
- 50 M. G. L. Gustafsson. Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution[J]. *P. Nat. Acad. Sci. USA*, 2005, **102**(37): 13081~13086
- 51 W. Lukosz, M. Marchand. Optischen abbildung unter Überschreitung der beugungsbedingten auflösungsgrenze[J]. *Optica Acta; International Journal of Optics*, 1963, **10**(3): 241~255
- 52 H. Leonhardt, L. Schermelleh, P. M. Carlton *et al.*. Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy[J]. *Science*, 2008, **320**(5881): 1332~1336
- 53 S. W. Hell, A. Schönle, A. Y. Bos. Nanoscale Resolution in Far-Field Fluorescence Microscopy[M]. *Science of Microscopy*, ed. P. W. Hawkers, J. C. H. Spence, New York: Springer, 2007