

无标记光学显微成像技术及其在生物医学的应用

曹怡涛^{1,2}, 王雪^{1,2}, 路鑫超^{1*}, 黄成军^{1,2**}

¹中国科学院微电子研究所健康电子研发中心, 北京 100029;

²中国科学院大学微电子学院, 北京 100049

摘要 基于荧光标记的显微成像技术是目前用于生物医学成像研究的主要方法,然而,荧光标记面临光漂白、光猝灭、难以特异性标记及荧光干扰等瓶颈,因此,无标记显微成像技术的发展受到越来越多的关注。介绍了四种无标记光学显微成像技术:相干拉曼散射显微成像技术、光热显微成像技术、表面等离激元显微成像技术以及干涉散射显微成像技术。对这四种技术的基本原理进行了阐述,并介绍了它们在生物医学领域的应用,包括生物分子、病毒、细胞的形态与动力学研究。最后对四种成像技术的性能进行了比较,总结了每种方法的优势、局限性与应用前景。

关键词 显微; 无标记; 生物医学; 生物分子; 活细胞; 病毒

中图分类号 Q-336

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202259.0617012

Label-Free Optical Microscopy Technique and Its Biomedical Applications

Cao Yitao^{1,2}, Wang Xue^{1,2}, Lu Xinchao^{1*}, Huang Chengjun^{1,2**}

¹Health Electronics Center, Institute of Microelectronics of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100029, China;

²School of Microelectronics, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract Currently, microscopic imaging methods based on fluorescent labeling are the mainstream approaches in biomedical research. However, fluorescent labeling faces bottlenecks, such as photobleaching, photo quenching, specific labeling difficulty, and fluorescence disturbance. Therefore, the development of label-free microscopic imaging techniques has attracted numerous attentions. In this review, four label-free optical microscopy techniques are described: coherent Raman scattering imaging, photothermal imaging, surface plasmon resonance imaging, and interference scattering imaging. The basic principles of these techniques are illustrated, and their applications in biomedical fields, including morphology of biomolecules, viruses, and cells, as well as biodynamics, are described. Finally, the performance of the four imaging techniques is compared, and the advantages, limitations, and application prospects are summarized.

Key words microscopy; label-free; biomedical science; biomolecules; living cells; viruses

收稿日期: 2021-12-29; 修回日期: 2022-01-23; 录用日期: 2022-01-27

基金项目: 中国科学院科研装备研制项目(YJKYYQ20190056)、北京市自然科学基金(4192063,4182073)、广州市科技计划项目(201604020005)、广东省科技计划项目(2016A040403086)、清华大学环境模拟与污染控制国家重点联合实验室开放课题(18K07ESPCT)

通信作者: *luxinchao@ime.ac.cn; **huangchengjun@ime.ac.cn

1 引言

光学显微成像技术是现代生物医学领域的重要研究手段之一。基于荧光标记的显微成像方法由于具有较高的化学选择性和灵敏度,是目前应用最广泛的光学显微成像技术^[1]。超分辨率荧光显微镜可以突破光学衍射极限,以几十纳米的分辨率揭示生物分子前所未有的细节信息^[2],其中受激辐射损耗显微成像技术和单分子定位显微术的分辨率没有限制^[3]。然而,随着生物科学的不断发展,荧光标记的瓶颈越来越凸显出来。荧光显微镜通常需要有效传递荧光信号,由于非特异性结合,荧光标记物会与干扰分子结合,产生错误结果^[4]。而且荧光分子通常是外源性的,会干扰活样本的生物学功能,并妨碍一些生物过程的准确测量^[5]。在小分子成像方面,尤其是代谢物,在不显著改变其生物功能的情况下,很难用荧光方法进行特异性标记^[6-7]。此外,荧光分子在长时间高能量曝光下会产生光漂白与光毒害,不仅难以实现长时间成像,还会使活样品受到损伤^[8-9]。对于生物研究来说,上述限制都有可能造成实验结果的误差,影响研究的准确性。因此,许多研究者正致力于无标记生物成像研究,并实现了在单分子水平生物样品的分析。

本文将介绍几种无标记生物成像技术,包括相干拉曼散射显微成像技术、光热显微成像技术、表面等离子激元成像技术以及干涉散射显微成像技术,对其原理进行简单阐述,并简要介绍近年来几种技术在生物医学领域的应用。

2 相干拉曼散射显微成像技术

2.1 相干拉曼散射显微成像原理

相干拉曼散射 (Coherent Raman scattering, CRS) 信号来源于分子内部振动能级的跃迁,基于分子的拉曼有源振动模式,相干拉曼散射可用于振动光谱成像,表征样品内部特定分子的分布。作为一种新兴的成像技术,相干拉曼散射显微成像的优势在于无标记和高特异性。CRS 有两种类型:相干反斯托克斯拉曼散射 (Coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS) 和受激拉曼散射 (Stimulated Raman scattering, SRS)。

如图 1(a) 所示, CARS 是一种相干的非线性光学过程^[10]。CARS 的实现需要两束激光,一束频率为 f_p 的激光用于泵浦和探测,另一束为频率 f_s 的斯托克斯激光。使用泵浦激光和斯托克斯激光激发样品中的分子键共振,当泵浦激光和斯托克斯激光的频率差满足分子的拉曼主动振动频率 $f_{\text{vib}} = f_p - f_s$ 时,在探测激光作用下,产生 CARS 信号,频率为 $f_{\text{cars}} = 2f_p - f_s$ 。具体来说,分子吸收一个泵浦光子到一个较低的虚态,并释放一个斯托克斯光子返回到一个较高的能量基态;然后立即吸收一个探测光子到更高的虚态,发射一个频率为 $f_p + f_{\text{vib}}$ 的光子后返回基态。CARS 显微镜的装置示意图如图 1(b) 所示^[11]。两束入射激光准直并经物镜聚焦在样品上,采用时滞控制两激发端的时间延迟,实现对 CARS 的有效激发。激发的 CARS 反射信号经聚焦物镜采集,透射的 CARS 前向传播信号由传输光路上的另一个物镜采集。对反射与透射信号进行滤波后,用光电倍增管 (Photomultiplier tubes,

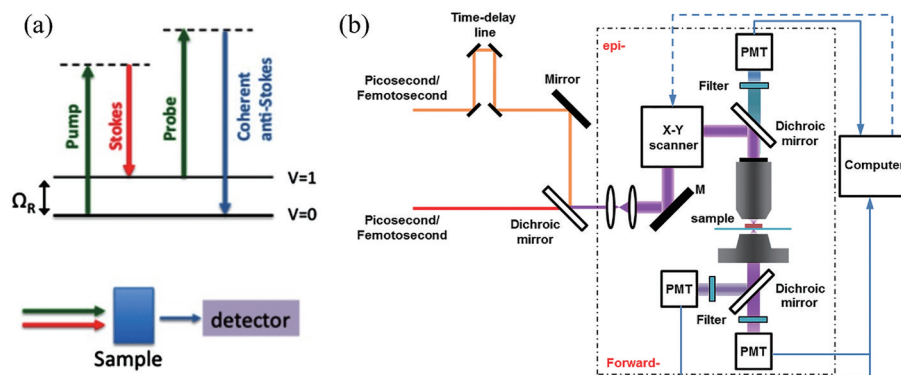


图 1 相干反斯托克斯拉曼散射。(a)相干反斯托克斯拉曼散射原理^[10](根据 CC-BY 许可条款转载,版权所有 2014, Potcoava M C 等);(b)相干反斯托克斯拉曼散射显微装置示意图^[11](经许可转载,版权所有 2018, 国际光学工程学会)

Fig. 1 CARS. (a) Principle of CARS^[10](Reproduced under the terms of the CC-BY license, Copyright 2014, Potcoava M C et al.); (b) schematic of CARS microscopy^[11](Reproduced with permission, Copyright 2018, Society of Photo-Optical

Instrumentation Engineers)

PMT)探测器检测CARS信号。

SRS的激发过程如图2(a)所示^[12],与CARS相似,当泵浦光与斯托克斯光的频率差与分子的拉曼主动振动频率一致时,利用受激激发实现拉曼信号的放大。因此,斯托克斯光强发生受激拉曼增益 ΔI_s (受激拉曼增益, Stimulated Raman gain, SRG), 泵浦光强发生受激拉曼损耗 ΔI_p (受激拉曼损耗, Stimulated Raman loss, SRL), 与CARS不同的是, SRG和SRL并不包括非共振背景, 当泵浦和探测光

束之间的能量差与分子振动频率不匹配时, CRAS在反斯托克斯频率仍会产生一个微弱的信号, 即非共振背景, 而SRL和SRG不会产生对应的信号, 如图2(b)所示。SRS斯托克斯光束被调制在高频, 并且泵浦光的振幅调制可以通过SRL检测(图2(c))。如图2(d)所示, 用电光调制器对SRS显微镜的斯托克斯光束进行调制, 使用光电二极管探测滤波后的透射光和反射光。SRL信号则由锁定放大器测量, 以提供图像信息^[13]。

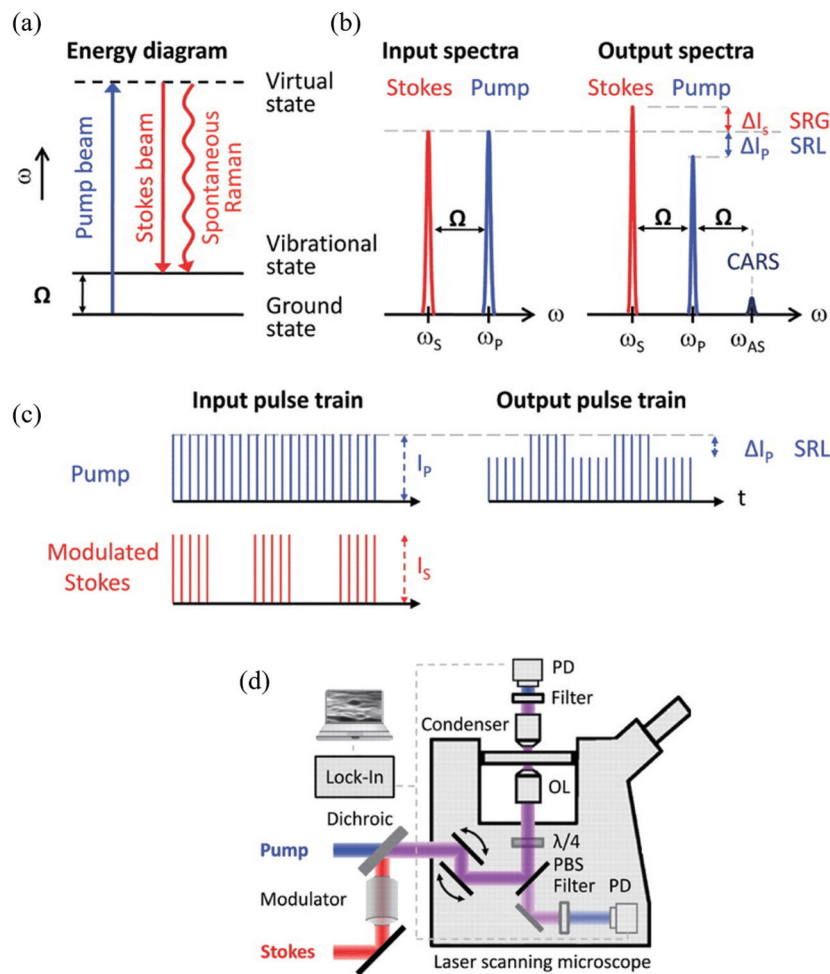


图2 受激拉曼散射的原理。(a)受激拉曼散射能量图;(b)受激拉曼散射的输入和输出光谱;(c)受激拉曼损耗检测方案;(d)受激拉曼散射显微装置示意图^[12](经许可转载, 版权所有 2008, 美国科学促进会)

Fig. 2 Principle of SRS. (a) Energy diagram of SRS; (b) input and output spectra of SRS; (c) detection scheme of SRL; (d) setup of SRS microscopy^[12] (Reproduced with permission, Copyright 2008, American Association for the Advancement of Science)

2.2 相干拉曼散射显微成像技术的生物学应用

包括氨基酸、核酸、脂类和碳水化合物在内的小生物分子在细胞增殖和功能中发挥着重要作用。使用荧光标记显微镜时, 由于小生物分子尺寸很小, 其在细胞内的活动将被大量的荧光标记物改变。CRS显微镜提供亚微米级的分辨率, 可以分辨

细胞内的细胞器, 还可以识别小生物分子的拉曼信号, 因此, 无标记CARS和SRS显微镜的应用有助于对脂滴生物学、细胞代谢、药物传递和组织成像提供新的理解^[14]。

在无标记的情况下, 由于 CH_2 分子密集堆积可以产生比较强的拉曼散射信号, CARS和SRS显微

镜已经被广泛用于脂质研究。3T3-L1 成纤维细胞在特殊的诱导培养基中培养 2 d 后,细胞开始积累脂质,最终诱导分化成脂肪细胞。2003 年, Nan 等^[15]利用这一特性,通过 CARS 显微镜观察脂质的变化,研究了 3T3-L1 细胞分化过程,图 3(a)所示为预分化的 3T3-L1 细胞,添加诱导培养基 24 h 后,观察到脂质减少(图 3(b)),在 48 h 后,大多数细胞含有少量或没有脂质(图 3(c)),脂质的消失可能是由于激素敏感性脂肪酶活性增加,这也是 3T3-L1 脂肪细胞分化的标志之一。如图 3(d)~(f)所示,随着时间继续增加,细胞再次产生脂质,且伴随着脂质的累积,观察到明显的形态变化^[15]。2007 年, Hellerer 等^[16]用 CARS 成像研究了活体秀丽隐杆线

虫脂质储存。此后有多项研究,分别对脂质运输^[17]、脂质分解^[18]与脂肪合成^[19]进行了深入探究。2014 年, Napoli 等^[20]利用高光谱 CARS 显微技术量化了在不同条件下培养的人类脂肪干细胞对饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸的摄取。2020 年, Zhang 等^[21]利用 CARS 对脂质代谢动力学进行了实时定量研究,根据细胞内脂质代谢过程(脂质合成和分解)区分不同的脂质群体。在没有非共振背景干扰的情况下, SRS 显微镜为研究模型生物的脂质代谢提供了一种新的方法。2017 年, Zhang 等^[22]利用 SRS 研究脂质动力学与细胞代谢之间的相关性,脂质动态分析不仅可以区分脂质的不同生物学功能,还可以检测传统方法无法检测到的脂质代谢变化。

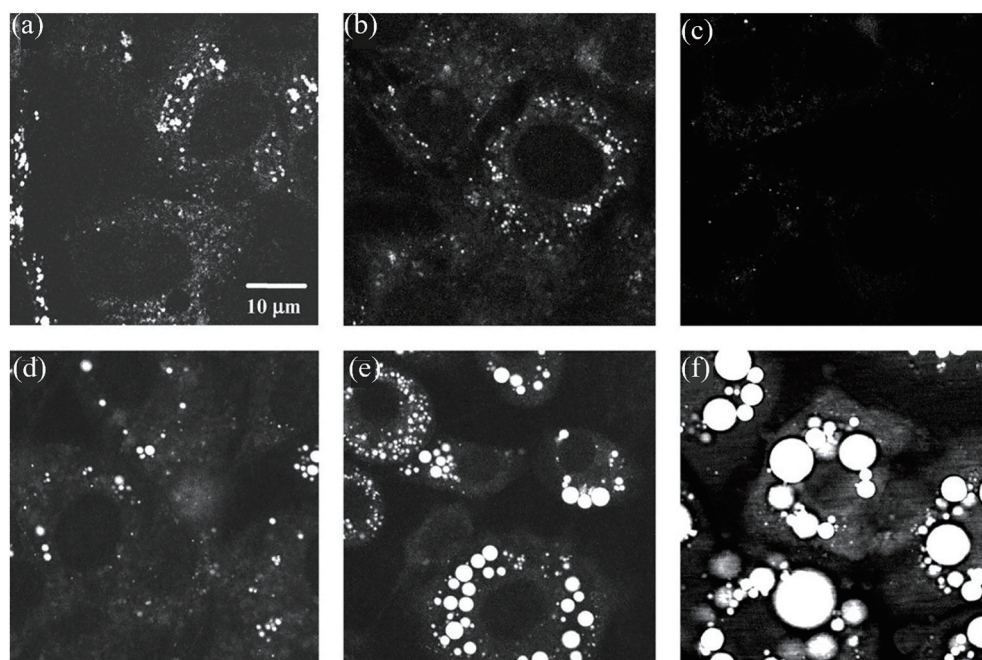


图 3 3T3-L1 细胞在诱导液中不同时间的 CARS 图像^[15]。(a) 0 h; (b) 24 h; (c) 48 h; (d) 60 h; (e) 96 h; (f) 192 h

(根据 CC-BY 许可条款转载,版权所有 2003,美国生物化学和分子生物学学会)

Fig. 3 CARS images of 3T3-L1 cell culture at different time after adding induction media^[15]. (a) 0 h; (b) 24 h; (c) 48 h; (d) 60 h; (e) 96 h; (f) 192 h (Reproduced under the terms of the CC-BY license, Copyright 2003, American Society for Biochemistry and Molecular Biology)

除了在脂质方面的广泛应用, CRS 还可以分析药物分子动力学过程。2014 年, Fu 等^[23]利用 SRS 第一次在亚微米级分辨率下对细胞内酪氨酸激酶抑制药物进行可视化 and 量化分析,利用 20 $\mu\text{mol/L}$ 的伊马替尼和尼洛替尼处理 4 h 后的两种小鼠原 B 细胞株,与仅用二甲亚砷处理的对照组小鼠原 B 细胞株对比,发现伊马替尼和尼洛替尼处理的细胞中存在明显的亮点,这些亮点是酪氨酸激酶抑制剂在细胞溶酶体内积累的结果,通过进一步研究发现药

物的水溶性与药物的积累有关,此外文章还对伊马替尼与氯喹的相互作用进行了研究。2015 年, Chiu 等^[24]通过 SRS 显微镜跟踪并可视化三种药物相关溶剂(水、丙二醇和二甲亚砷)在人体指甲中的扩散。

此外, CRS 可用于微生物检测、代谢成像、组织成像等方面, 2017 年, Karanja 等^[25]利用 SRS 显微技术对白色念珠菌代谢成像,研究表明氟康唑敏感白色念珠菌和耐药白色念珠菌在脂肪生成方面存在

显著差异,且可以在 5 h 内区分敏感菌株和耐药菌株,比传统方法的 48 h 快 5 倍多。2018 年, Hong 等^[26]提出一种通过 SRS 显微技术监测单一活细菌的葡萄糖代谢活性成像方法,可以在 0.5 h 内测定活细菌的敏感性和抗生素的最低抑菌浓度。Ji 等^[27]利用阿尔茨海默病患者的淀粉样蛋白 β 含量增加导致振动光谱显著变化这一特点,将 SRS 显微镜应用于阿尔茨海默病小鼠模型脑组织中的淀粉样蛋白斑块成像。2019 年, Sarri 等^[28]将 SRS 显微镜与二次

谐波相结合,用于无标记可视化组织切片,通过分配虚拟颜色来模拟苏木精、伊红和藏红花 (Haematoxylin, eosin and saffron, HES) 染色,提供了正常组织和癌变组织的图像诊断。图 4(a) 是一个健康胰腺的 SRS 图像,其结构与同一患者在不同区域获得的 HES 图像(图 4(b))具有良好的相关性,图 4(c)、(d) 分别是病变组织的 SRS 图像以及 HES 图像,图 4(e)、(f) 为胰腺组织肿瘤区域的 SRS 以及 HES 图像。

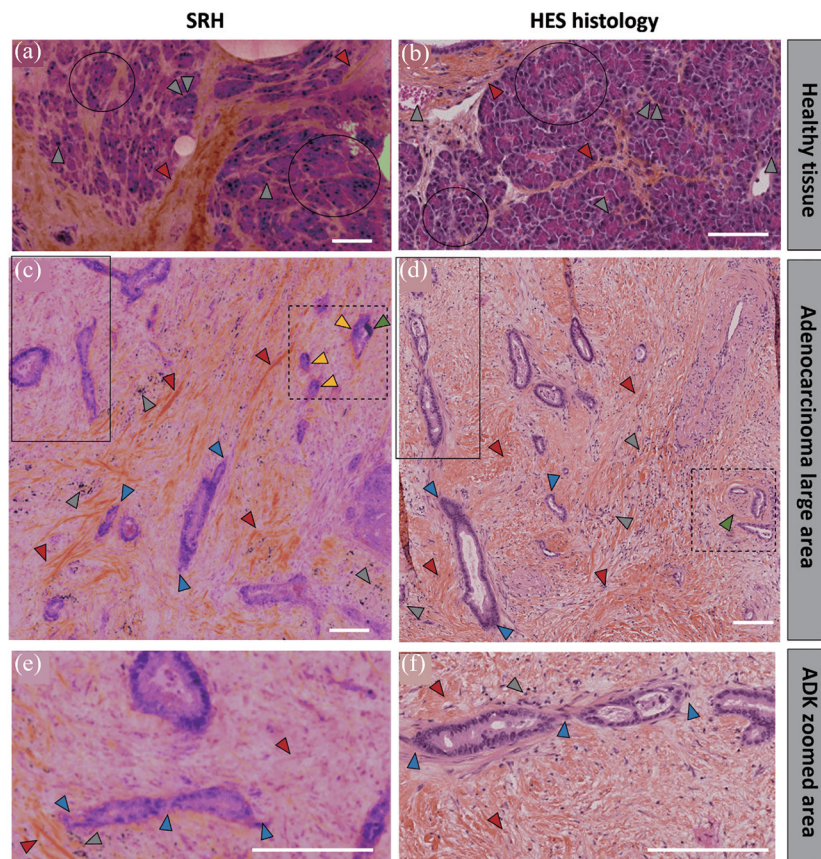


图 4 胰腺组织的 SRS 图像与 HES 图像对比^[28]。(a) 正常胰腺组织的 SRS 图;(b) 正常胰腺组织的 HES 图;(c) 癌变胰腺组织的 SRS 图;(d) 癌变胰腺组织的 HES 图;(e) 胰腺组织肿瘤区域的 SRS 图;(f) 胰腺组织肿瘤区域的 HES 图(根据 CC-BY 许可条款转载,版权所有 2019, Sarri B 等)

Fig. 4 Comparison between SRS images and HES images of pancreatic tissue^[28]. (a) SRS image of healthy pancreatic tissue; (b) HES image of healthy pancreatic tissue; (c) SRS image of cancerous pancreatic tissue; (d) HES image of cancerous pancreatic tissue; (e) SRS image of the tumor area of pancreatic tissue; (f) HES image of the tumor area of pancreatic tissue (Reproduced under the terms of the CC-BY license, Copyright 2019, Sarri B et al.)

3 光热显微成像技术

3.1 光热显微成像技术原理

当处于激发态的粒子返回基态时,可通过非辐射热弛豫(热量散失)或辐射弛豫(光子发射)释放吸收的能量,光热显微技术(Photothermal microscopy, PTM)利用这一特性对物体进行成像。光热检测

中,待测物体用频率为 Ω 的调制激光加热,该物体充当点状热源,在其周围产生调制的折射率分布。假设有一个嵌入在均匀介质中的球形颗粒,尺寸远小于光波长。用调制的加热激光照射物体,纳米颗粒吸收的功率被调制为 $P_{\text{abs}}(1 + \cos(\Omega t))$ 。其中 $P_{\text{abs}} = \sigma_{\text{abs}} \times I_{\text{heat}}$ (σ_{abs} 为吸收截面, I_{heat} 为加热激光的平均强度), t 为时间。加热而引起的温度变化可以

用热扩散理论推导,其表达式^[29]为

$$\Delta T(r, t) = \frac{P_{\text{abs}}}{4\pi\kappa r} \left[1 + \exp\left(-\frac{r}{r_{\text{th}}}\right) \cos\left(\Omega t - \frac{r}{r_{\text{th}}}\right) \right], \quad (1)$$

式中: $\Delta T(r, t)$ 是距离颗粒中心 r 处在时间 t 的温度变化量; r_{th} 是热扩散长度,定义为 $r_{\text{th}} = (2D/\Omega)^{1/2}$, $D = \kappa/C$,其中 κ 是热导率, C 是介质的体积比热容。在纳米颗粒周围产生随时间变化的折射率,其时空分布^[30]表示为

$$\Delta n = \frac{\partial n}{\partial T} \Delta T = \frac{\partial n}{\partial T} \cdot \frac{P_{\text{abs}}}{4\pi\kappa r} \left[1 + \exp\left(-\frac{r}{r_{\text{th}}}\right) \cos\left(\Omega t - \frac{r}{r_{\text{th}}}\right) \right], \quad (2)$$

式中: $\partial n/\partial T$ 是介质的热折射系数。探测光束与折射率的空间变化相互作用,产生频移散射场。频移散射场与参考场(样品和载玻片界面的反射光束或透射光束)发生干涉。在调制频率 Ω 下产生的拍频信号,可通过锁相放大器提取出对应的光热信号。

光热显微成像技术原理如图 5 所示^[31]。使用两束光,一束为探测激光,另一束为通过声光调制器得到的频率为 Ω 的加热激光。使用大数值孔径物镜($\times 100$, $NA=1.4$)将两束光束聚焦在样品同一点上。可使用前向与后向两种方式提取光热图像信号,利用第二个物镜($\times 80$, $NA=0.8$)收集探测激光的发射场和前向散射的干涉信号为前向信号,利用偏振分光镜和 $1/4$ 波片的组合收集反射场(参考场)和后向散射的干涉信号为后向信号。前向或后向信号被快速光电二极管收集并馈入锁相放大器

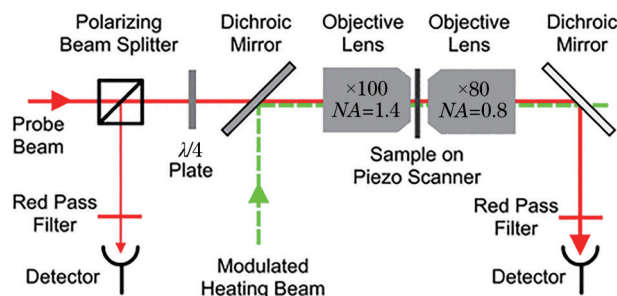


图 5 光热显微成像装置示意图^[31](经许可转载,版权所有 2004,美国物理学会)

Fig. 5 Schematic diagram of photothermal microscopy^[31]
(Reproduced with permission, Copyright 2004, American Physical Society)

用以检测频率 Ω 下的差频信号,提取光热信号,形成显微图像。

3.2 光热显微成像技术的生物学应用

由于光热显微镜不依赖于荧光,且对吸收能量敏感,因此它能够可视化吸收光的物体,如金属纳米颗粒、活细胞中的内源性生物成分等。2007年, Lasne 等^[32]利用光热显微镜对线粒体成像,研究了不同生理环境下 COS-7 细胞中线粒体的形态(图 6(a)~(c))。2010年, Brusnichkin 等^[33]研究了将高分辨率光热显微镜和光谱法结合的无标记检测方法,实现对线粒体成像(图 6(d)),发现成像的光热信号除了来自于细胞色素 c 外还与线粒体细胞膜附近的蛋白质集合有关。2019年, Miyazaki 等^[34]利用高灵敏度光热显微镜观察了线粒体和溶酶体,如图 6(e)所示(其中丝状结构为线粒体,点状结构为溶酶体),并研究了溶酶体和线粒体相互作用的动力学,研究表明在线粒体自噬途径中,溶酶体在线粒体降解受损中起着重要作用。除对线粒体相关研究外,光热显微镜还用于疾病检测。2015年, He 等^[35]利用光热显微镜对黑色素瘤细胞进行无标记成像(图 6(f))。2019年, Lim 等^[36]使用中红外光热显微镜监测少突胶质细胞在整个生命周期内的细胞质蛋白分布,无标记监测到通过细胞骨架丝的轴突运输(图 6(g))。2021年, Zhang 等^[37]利用中红外光热显微镜对水泡性口炎病毒(图 6(h))和痘病毒(图 6(i))实现无标记检测。

光热显微镜不只用于二维成像,还可以用来对生物样品进行无标记三维成像。2010年, Lu 等^[38]利用双光子激发光热显微镜对血红蛋白成像,并对斑马鱼鳃幼虫血管进行三维重建(图 7(a)),与单光子激发相比,双光子激发的加热梯度更集中于 z 轴方向,增强了 z 轴灵敏度,能够在活细胞、组织和生物体中进行无标记高分辨率三维成像。2016年, He 等^[39]开发了一种共聚焦光热显微镜用于非侵入性、无标记的黑色素瘤三维成像(图 7(b)),通过经典形态学方法对三维成像进行分析,发现黑色素在癌变过程中分布更加混乱。同年, Zhang 等^[40]利用中红外激光作为加热激光,并用可见光波段激光探测折射率梯度,在红外成像中实现了亚微米级空间分辨率,对 PC-3 前列腺癌细胞内脂质实现三维成像(图 7(c)),还对活癌细胞内药物分子的扩散进行监控。

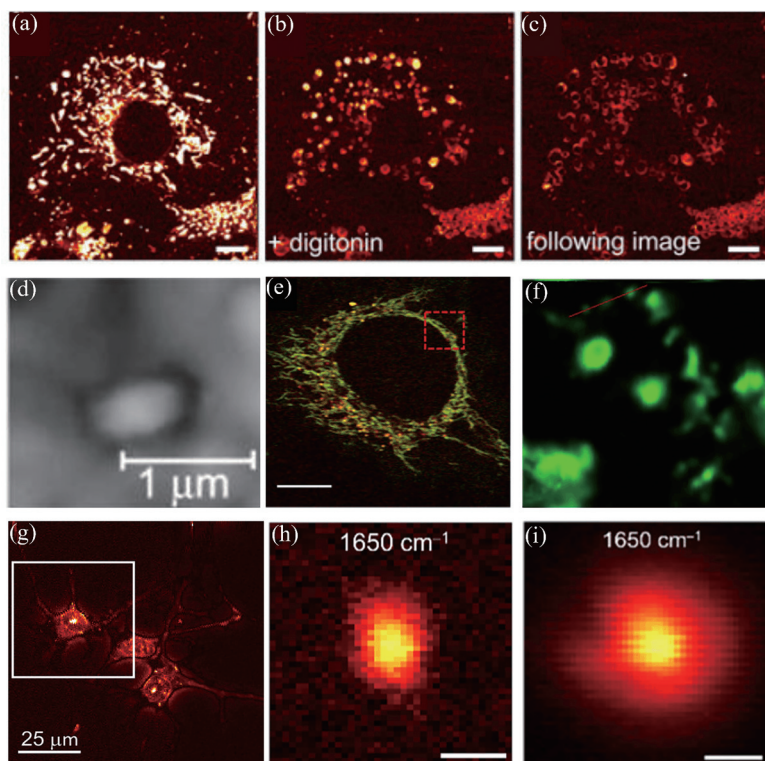


图 6 光热显微成像图。(a)加洋地黄皂苷前的 COS-7 细胞^[32]; (b)(c)加洋地黄皂苷后 COS-7 细胞^[32](根据 OSA Open Access Publishing Agreement 许可条款转载, 版权所有 2007, 美国光学学会); (d)单个线粒体^[33](经许可转载, 版权所有 2010, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim); (e) HeLa 细胞^[34](根据 OSA Open Access Publishing Agreement 许可条款转载, 版权所有 2019, 美国光学学会); (f)黑色素瘤细胞^[35](根据 OSA Open Access Publishing Agreement 许可条款转载, 版权所有 2015, 美国光学学会); (g)少突胶质细胞^[36](经许可转载, 版权所有 2019, 美国化学学会); (h)水泡性口炎病毒^[37]; (i)痘病毒^[37](经许可转载, 版权所有 2021, 美国化学学会)

Fig. 6 Photothermal microscopy images. (a) COS-7 cells before digitonin addition^[32]; (b)(c) COS-7 cells after digitonin addition^[32] (Reproduced under the terms of OSA Open Access Publishing Agreement, Copyright 2007, Optical Society of America); (d) single mitochondria^[33] (Reproduced with permission, Copyright 2010, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim); (e) HeLa cells^[34] (Reproduced under the terms of OSA Open Access Publishing Agreement, Copyright 2019, Optical Society of America); (f) melanoma cells^[35] (Reproduced under the terms of OSA Open Access Publishing Agreement, Copyright 2015, Optical Society of America); (g) oligodendrocytes^[36] (Reproduced with permission, Copyright 2019, American Chemical Society); (h) vesicular stomatitis virus^[37]; (i) poxvirus^[37] (Reproduced with permission, Copyright 2021, American Chemical Society)

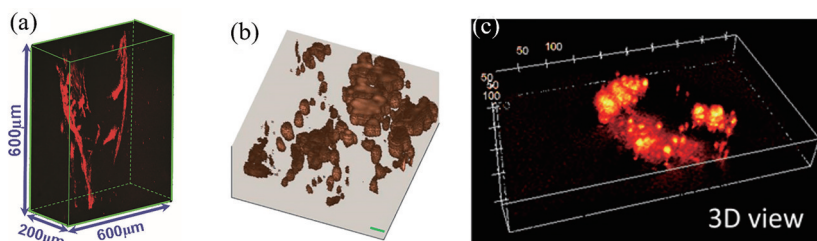


图 7 3D 光热显微成像图。(a)斑马鱼鳃幼虫血管^[38](经许可转载, 版权所有 2010, 美国物理学会); (b)黑色素瘤^[39](根据 CC-BY 许可条款转载, 版权所有 2016, He J P 等); (c) PC-3 前列腺癌细胞内脂质^[40](根据 CC-BY-NC 许可条款转载, 版权所有 2016, Zhang Delong 等)

Fig. 7 3D images of photothermal microscopy. (a) Zebrafish gill larvae blood vessels^[38] (Reproduced with permission, Copyright 2010, American Institute of Physics); (b) melanoma^[39] (Reproduced under the terms of the CC-BY license, Copyright 2016, He J P et al.); (c) lipid droplets stored in PC-3 prostate cancer cells^[40] (Reproduced under the terms of the CC-BY license, Copyright 2016, Zhang Delong et al.)

4 表面等离子激元显微成像技术

4.1 表面等离子激元显微成像技术原理

表面等离子激元 (Surface plasmon polaritons, SPPs) 是入射电磁波与金属表面振荡自由电子的耦合, 产生沿界面传播且强度呈指数衰减的倏逝波^[41]。当入射光波矢与表面等离子激元波矢相匹配时, 会在金属-介质界面发生表面等离子激元共振。通常使用 Kretschmann 结构耦合激发表面等离子激元, 该结构分别为基底、金属与介质。当光束入射到金属-基底界面时, 在特定角度下, 激发表面等离子激元共振, 此时反射率最小, 该角度称为表面等离子激元共振 (SPR) 角 θ_R ^[42], 可表示为

$$\sin \theta_R = \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_m}{(\epsilon_1 + \epsilon_m) \epsilon_2}}, \quad (3)$$

式中: ϵ_1 为介质的介电常数; ϵ_2 为基底的介电常数; ϵ_m 为金属膜介电常数的实部。

在表面等离子激元显微成像 (Surface plasmon resonance microscopy, SPRM) 光学系统中, 一般基

于高数值孔径油浸物镜耦合激发 SPPs。SPRM 根据照明模式可以分为宽场表面等离子激元显微镜以及扫描表面等离子激元显微镜。宽场 SPRM 实验装置如图 8(a) 所示^[43], 激发光通过 L1 和 L2 透镜组进行扩束和准直, 通过透镜 L3 聚焦到油浸物镜后焦平面上, 通过物镜以宽场平面波的方式照射至金属-基底界面, 在入射角为 θ_R 时激发 SPPs。SPPs 与金属-介质界面上物体相互作用, 产生局域场增强与 SPP 散射场, 散射场与入射场发生干涉后, 引起 SPP 场分布改变, 经泄漏辐射效应与界面反射光通过物镜和透镜 L4, 一起传输至 CCD1 上, 得到金属-介质界面上物体引起的 SPPs 场分布图像^[44]。扫描 SPRM 的实验装置如图 8(b) 所示^[43], 光通过扩束和准直后, 利用 Z-Pol 将准直光偏振态从线性转换为垂直向, 通过远心成像系统 (L5 和 L6) 传输到油浸物镜, 通过物镜聚焦在金属-基底界面, 在聚焦点处激发 SPPs 与金属-介质界面上物体相互作用, 反射光通过物镜和透镜 L7 成像到 CCD2 上, 经后焦平面的傅里叶成像得到与界面折射率对应的共振角度信息, 通过二维扫描获得样品折射率分布图像^[45]。

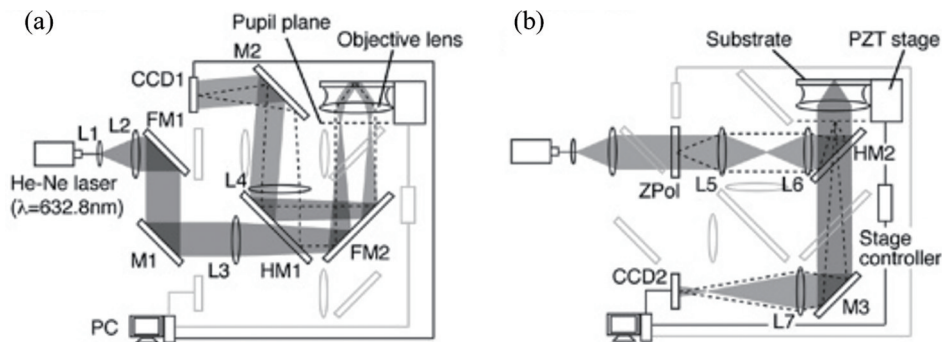


图 8 表面等离子激元显微装置示意图。(a) 宽场表面等离子激元显微成像装置; (b) 扫描表面等离子激元显微成像装置^[43] (根据 OSA Open Access Publishing Agreement 许可条款转载, 版权所有 2012, 美国光学学会)

Fig. 8 Schematic diagrams of SPRM. (a) Schematic diagram of wide-field SPRM; (b) schematic diagram of scanning SPRM^[43] (Reproduced under the terms of OSA Open Access Publishing Agreement, Copyright 2012, Optical Society of America)

4.2 表面等离子激元显微成像技术的生物学应用

SPRM 已经发展成为病毒、生物分子无标记检测^[46-49]以及动力学研究^[50-53]不可缺少的工具。检测和识别病毒、DNA 等对疾病预防、诊断和控制至关重要。2010 年, Wang 等^[46]利用宽场 SPRM 对单个 H1N1 病毒成像, 并计算出 H1N1 的尺寸和质量分别为 $(109 \pm 13) \text{ nm}$ 和 $(0.80 \pm 0.35) \text{ fg}$, 图 9(a) 为单个 H1N1 病毒图像, 由中心亮点和长拖尾构成典型的单颗粒 SPRM 图像。如图 9(b) 所示, 2017 年, Sun 等^[47]利用宽场 SPRM 检测到头部尺寸为 50 nm 的 T4 噬菌体病毒。此外, 单个 DNA 分子的可视化

能力对于研究 DNA 的生物物理和生化特性极其重要。2014 年, Yu 等^[48]使用宽场 SPRM 对单个 DNA 分子进行研究, 成功对单个 DNA 分子实现无标记成像并精确测量了 DNA 分子长度, 得到长度为 $14.6 \mu\text{m}$ 的 DNA 分子链图像 (图 9(c))。除病毒、DNA 分子检测外, 蛋白质的检测和鉴定也是一项具有深刻意义的生物研究。2020 年, Zhang 等^[49]改进了传统的宽场 SPRM, 并称之为等离子激元散射成像显微镜 (Plasmonic scattering microscopy, PSM), 利用该技术实现了对单个免疫球蛋白 M (IgM) 分子和免疫球蛋白 A (IgA) 分子的表面等离子激元成像, 与

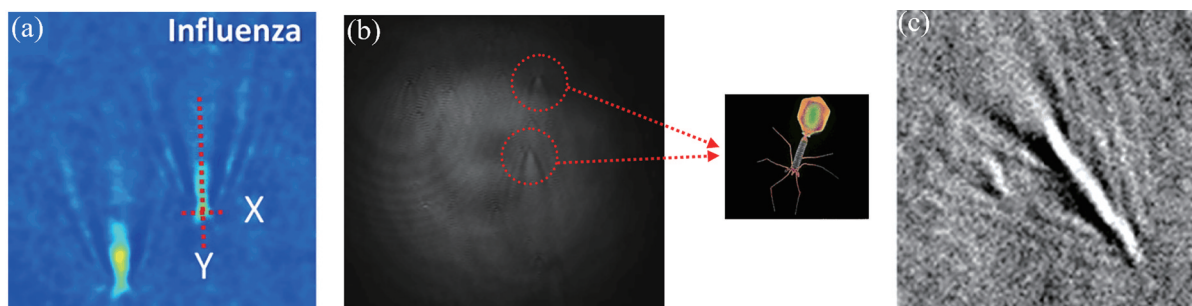


图9 SPRM 成像。(a)单个 H1N1 流感病毒^[46]；(b)单个 T4 噬菌体^[47]（经许可转载，版权所有 2017，国际光学工程学会）；
(c)单个 DNA 分子链^[48]（经许可转载，版权所有 2014，美国化学学会）

Fig.9 SPRM imaging. (a) Single H1N1 influenza virus^[46]; (b) single T4 bacteriophage^[47] (Reproduced with permission, Copyright 2017, Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers); (c) single DNA molecular chain^[48] (Reproduced with permission, Copyright 2014, American Chemical Society)

传统的 SPRM 对表面等离子激元界面散射成像不同，PSM 对表面等离子激元空间散射成像，因此，PSM 成像没有长拖尾。

对细胞及细胞内动态过程进行纳米精度成像和跟踪，对于理解许多生物现象的潜在分子过程至关重要，包括细胞运动、细胞生长、物质运输、信号转导和细胞粘连等。膜蛋白是细胞动态过程很重要的一个环节，负责许多基本动态过程，如细胞信号传递、细胞内外物质交换等。2012 年，Wang 等^[50]用 SPRM，研究了糖蛋白和凝集素之间的特定相互作用，以及单个细胞膜表面烟碱乙酰胆碱受体 (nAChRs) 的结合活性和空间分布。此外，人们也利用 SPRM 对细胞示踪进行研究。2015 年，Yang

等^[51]利用宽场 SPRM 追踪细胞在自然状态下的亚细胞结构，在神经元轴突中观察细胞器（如线粒体）沿微管的纳米级运输，并从细胞器的位置信息中提取微管的结构信息，实现了微管的三维结构重建（图 10(a)）。2016 年，Syal 等^[52]利用宽场 SPRM 在抗菌药物敏感性试验中实现细菌的成像及跟踪，通过表面等离子激元成像强度的变化表征单个细菌沿 z 轴的运动（图 10(b)），并将运动与细菌代谢和抗生素作用联系起来，上述研究表明宽场 SPRM 有很好的单细胞分析能力。2018 年，Yang 等^[53]对尺寸为 30 nm 的单个外泌体进行成像，并对外泌体进行示踪（图 10(c)），并定量研究了外泌体和脂质体之间的膜融合，以及外泌体与抗体的相互作用。

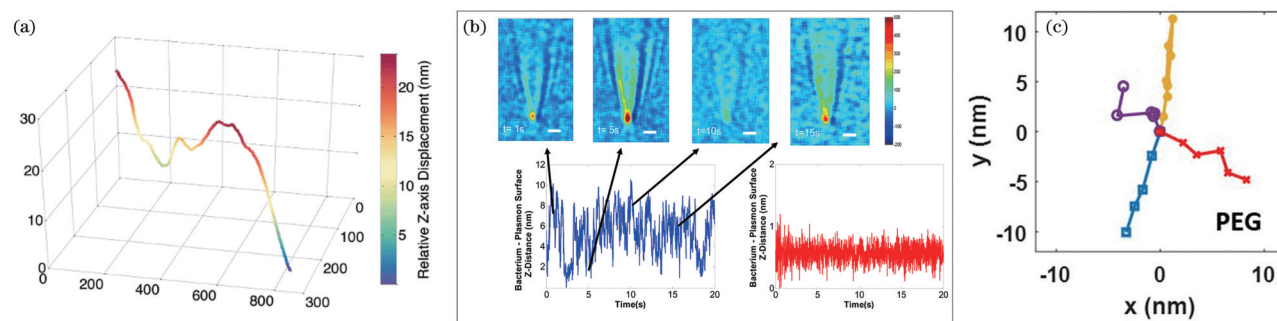


图 10 使用 SPRM 研究分子动力学。(a)微管 3D 结构^[51]（经许可转载，版权所有 2015，WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim）；(b)单细菌沿 z 轴运动轨迹^[52]（经许可转载，版权所有 2016，美国化学学会）；(c)单个外泌体 2D 示踪^[53]
Fig.10 Study on molecular dynamic using SPRM. (a) 3D structure of microtubule^[51] (Reproduced with permission, Copyright WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim); (b) z -axis motility profile of single bacteria^[52] (Reproduced with permission, Copyright 2016, American Chemical Society); (c) 2D tracking of single exosome^[53]

研究细胞膜与基底的相互作用对于理解细胞行为有极大的意义，包括细胞粘附、生长和随后的分离、细胞迁移以及细胞对细胞外基底的反应。1999 年，Giebel 等^[54]研究结果表明，SPRM 可以作

为一种新方法对活细胞与基底的相互作用进行可视化 and 量化分析。2012 年，Wang 等^[55]通过监测单个细胞在改变细胞外渗透压时的垂直位移，研究细胞膜与基底的粘附强度，并得到了细胞膜-基底

相互作用的局部信息(图 11(a))。利用宽场 SPRM 虽然可以得到细胞膜与基底之间的粘连强度,但是难以精确测量细胞膜与基底间距,利用扫描 SPRM 可以解决这一问题。2014 年, Toma 等^[56]结合宽场与扫描两种方法对细胞行为进行研究,利用宽场 SPRM 对人类胚胎肾(HEK-293)细胞进行大视场观察,可定性评估细胞粘附,并利用扫描 SPRM 选择感兴趣的区域进行局部研究,定量绘

制细胞膜与基底间隙距离图(图 11(b)),阐明了多种粘附蛋白和多肽在细胞粘附上的差异。扫描 SPRM 除了可以测量细胞膜与基底间距,还可以实现细胞三维成像,2018 年, Kreysing 等^[57]利用扫描 SPRM 测量细胞膜与基底间距,根据折射率与细胞膜-基底距离变化的时间和空间映射关系,以 2.3 nm 的精度重建了基底-细胞膜动力学的三维轮廓(图 11(c))。

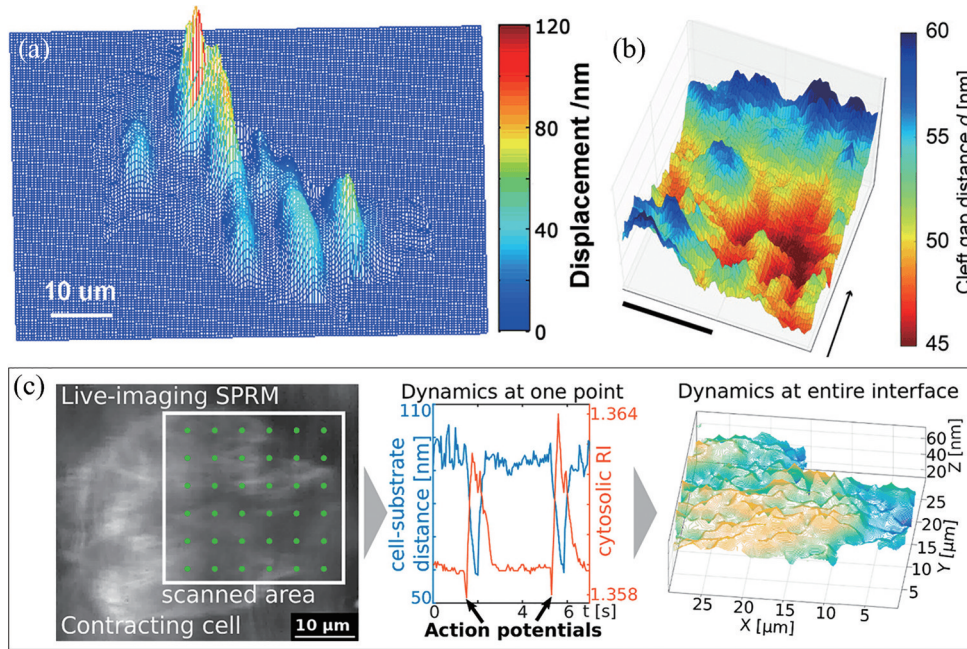


图 11 使用 SPRM 研究细胞与基底相互作用。(a) 细胞膜与基底的粘附强度分布^[55]; (b) 细胞-基底间距分布^[56]; (c) 细胞-基底三维重建过程^[57](经许可转载, 版权所有 2012, 2014, 2018, 美国化学学会)

Fig. 11 Study on cell-substrate interaction using SPRM. (a) Distribution of adhesion intensity of cell-substrate^[55]; (b) distribution of cell-substrate distance^[56]; (c) 3D reconstruction process of cell-substrate^[57] (Reproduced with permission, Copyright 2012, 2014, 2018, American Chemical Society)

5 干涉散射显微成像技术

5.1 干涉散射显微成像技术原理

干涉散射显微成像技术(Interferometric scattering microscopy, iSCAT)利用光学显微镜探测来自样品的散射干涉光。iSACT 的图像信息由探测器上的信号强度组成,该强度是反射场(E_r)和散射场(E_s)叠加的总和,探测器接收的光强度 I_{det} 的表达式^[58]为

$$I_{det} = |E_r + E_s|^2 = |E_i|^2 [r^2 + |s|^2 - 2r|s|\sin\phi], \quad (4)$$

式中: E_r 、 E_s 、 E_i 分别为反射、散射以及入射场; r 是界面反射率; s 为样品散射振幅; ϕ 为散射场和反射场之间的相位差;且有 $E_s = sE_i = E_i|s|\exp(-i\phi)$, $E_r = rE_i \exp(-i\pi/2)$ 。对于弱散射物体, $|s|^2$ 趋近于零,因此,对于纳米尺度物体,该项可以忽略。

iSCAT 具有灵活的照明方案。最初 iSCAT 采用扫描共聚焦方式实现成像^[58],但是很快就扩展到宽场照明^[59]和快速光束扫描^[60]。目前,宽场照明和快速光束扫描是 iSCAT 广泛采用的照明方式^[61]。宽场照明通过透镜 L1 将照明光聚焦到物镜的后焦平面,产生平行光束照明样品,如图 12(a)所示,这种照明方案可以获得高时间分辨率与大视场^[62]。快速光束扫描方式利用声光偏转器形成扫描光束,通过透镜 L1 和物镜将光束聚焦照射到样品,在相机曝光周期内产生均匀的照明轮廓^[60-61],其是一种等效宽场照明方法,同时消除环伪影并减少在宽场 iSCAT 中观察到的散斑,如图 12(b)所示^[62],这种照明方法通常使用 1/4 波片和偏振分光器将信号从照明路径中分离出来,以提高采集效率。

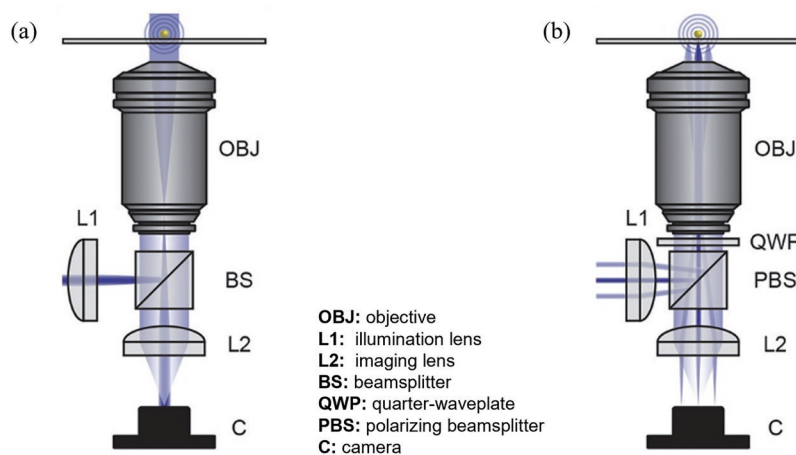


图 12 iSCAT 装置示意图^[62]。(a)宽场 iSCAT; (b)快速光束扫描 iSCAT(根据 CC-BY-NC-ND 许可条款转载, 版权所有 2021, Priest L 等)

Fig. 12 Schematic diagram of iSCAT^[62]. (a) Wide-field iSCAT; (b) fast beam-scanning iSCAT (Reproduced under the terms of the CC-BY-NC-ND license, Copyright 2021, Priest L et al.)

5.2 干涉散射显微成像技术的生物学应用

iSCAT 是一种可高效探测纳米物体散射光且灵敏度极高的成像方法, 在生物分子无标记检测成像方面有巨大潜力。目前 iSCAT 已经在生物分子检测^[63-66]、生物分子动力学^[67-72]等方面取得较好的应用。

iSCAT 在生物分子检测方面有广泛应用。2007 年, Ewers 等^[63]采用 iSCAT 对单个猴病毒 40 (SV40)(病毒尺寸为 45 nm)成像(图 13(a))。由于典型的蛋白质较小, 分子量从几到几百 u(u 为分子质量单位)不等, 单个蛋白质分子的 iSCAT 信号是普通病毒的 1/1000, 因此很难检测单个蛋白质分子。

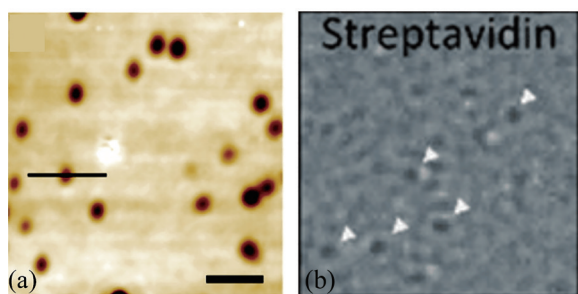


图 13 单个病毒与生物分子的 iSCAT 成像。(a)单个 SV40 病毒^[63]; (b)单个链霉亲和素^[66](经许可转载, 版权所有 2007, 2017, 美国化学学会)

Fig. 13 iSCAT imaging of single virus and biomolecule. (a) Single SV40^[63]; (b) single streptavidin^[66] (Reproduced with permission, Copyright 2007, 2017, American Chemical Society)

2014 年, Piliarik 等^[64]克服这一困难, 使用 iSCAT 检测到多种单个蛋白质分子, 检测极限为 65 ku。同年, Arroyo 等^[65]的研究结果表明可检测到分子质量小于

60 ku 的单个蛋白质分子。2017 年, Liebel 等^[66]在 iSCAT 基础上提出放大干涉散射显微镜(A-iSCAT), 检测到分子质量大小为 15 ku 的单个蛋白颗粒, 其尺寸相当于半个绿色荧光蛋白, 进一步提高了 iSCAT 的检测极限, 图 13(b)为单个链霉亲和素的 iSCAT 图像。

iSCAT 在生物分子动力学方面也有广泛应用。2013 年, Andrecka 等^[67]使用 iSCAT 第一次对磷脂双分子层形成过程中单个囊泡的变化实现可视化研究(图 14(a)), 包括囊泡破裂、囊泡吸附和囊泡扩散等, 图 14(a)中亮球对应囊泡吸附, 暗球对应囊泡破裂。2015 年, Wit 等^[68]利用脂质双分子层相的光散射差异实现了脂质纳米结构域的动态成像, 并研究纳米域的形成(图 14(b))。2016 年, Andrecka 等^[69]使用 iSCAT 对微管实现纳米级精度的无标记高速跟踪, 并在 30 min 内可视化微管的收缩过程。2020 年, Mosby 等^[70]对肌球蛋白网络中扩散的单个肌球蛋白丝成像, 动态跟踪了单个肌球蛋白丝, 发现肌球蛋白细丝动力学的变化可能与肌球蛋白网络从重塑到收缩的变化过程有关, 图 14(c)描述肌球蛋白丝在肌球蛋白簇内的动力学过程, 肌球蛋白丝一旦到达集群的核心, 就会脱落, 阻止肌球蛋白丝集群的整体生长。

除了对脂质、蛋白等动力学研究外, 对活细胞的形貌及其动力学研究也至关重要, 2018 年, Park 等^[71]利用 iSCAT 对哺乳动物细胞进行无标记成像, 展现了各种细胞质与细胞器的基本结构, 通过附着在玻璃基板上的细胞接触区域, 可对粘着斑和丝状

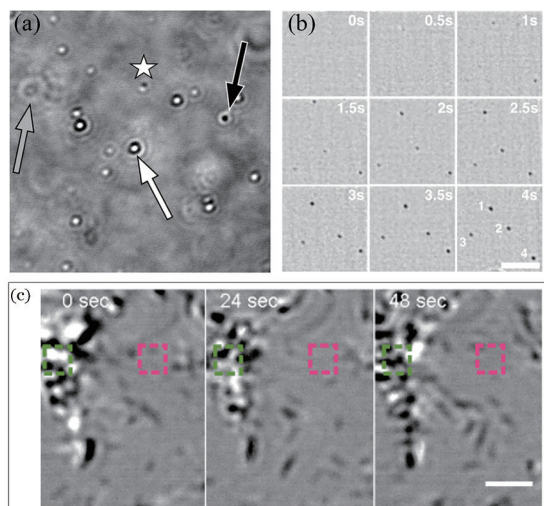


图 14 使用 iSCAT 研究生物分子动力学。(a)囊泡变化^[67](经许可转载,版权所有 2013,美国化学学会);(b)脂质纳米域的形成^[68]; (c)肌球蛋白丝动力学^[70](根据 CC-BY 许可条款转载,版权所有 2020,生物物理学会)

Fig. 14 Study on biomolecular dynamics using iSCAT. (a) Vesicle changes^[67](Reproduced with permission, Copyright 2013, American Chemical Society); (b) nanodomain formation^[68]; (c) myosin filament dynamics^[70](Reproduced under the terms of the CC-BY license, Copyright 2020, Biophysical Society)

伪足清晰成像(图 15(a)),在细胞质区还发现了多种边缘状特征(图 15(b)),其可能与细胞质的折叠结构有关。2019 年, Tala 等^[72]通过 iSCAT 显微镜对病原体铜绿假单胞菌 IV 型菌毛的延伸、附着、收缩和分离实现可视化研究,发现铜绿假单胞菌使用高效传感方式来部署和协调 IV 型菌毛,实现高效的表面运动。

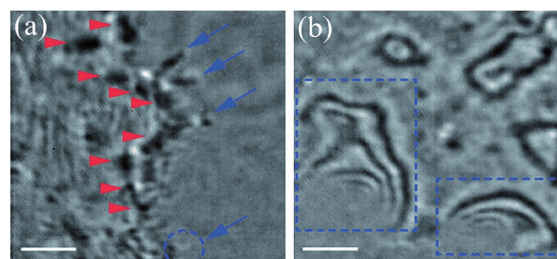


图 15 使用 iSCAT 研究活细胞结构^[71]。(a)粘着斑和丝状伪足结构;(b)细胞边缘结构(根据 CC-BY-NC 许可条款转载,版权所有 2018,英国皇家化学学会)

Fig. 15 Study on structure of living cells using iSCAT^[71]. (a) Cell focal adhesions and filopodium structure; (b) cell edge structure (Reproduced under the terms of the CC-BY-NC license, Copyright 2018, The Royal Society of Chemistry)

6 讨论与总结

综述了四种无标记显微成像技术,分别为 CRS、PTM、SPRM 与 iSCAT。其中,CRS 利用分子的拉曼主动振动模式,实现振动光谱成像,包括 CARS 和 SRS 两种类型。PTM 是一种光热成像技术,对处于激发态的物质返回基态时的非辐射热弛豫或辐射弛豫释放能量进行成像。SPRM 依赖于表面等离子激元局域场增强与泄漏辐射效应实现成像,根据照明光的模式不同可分为宽场与扫描等离子激元显微成像两种方法。iSCAT 通过检测来自样品的散射光与入射光干涉场进行成像。其中 CRS 利用分子振动进行成像,具有较高的分子特异性,但仍难以区分具有相同分子键的分子,因此相比 PTM、SPRM 以及 iSCAT 其分子特异性还是较弱。表 1 对四种显微成像方法的性能指标进行了对比。

表 1 四种无标记光学显微成像技术性能对比

Table 1 Performance comparison of four label-free optical microscopic imaging techniques

Technique	Lateral resolution	Axial resolution	Laser power	Sensitivity	Temporal resolution	Imaging time	Ref
CRS	CARS	600 nm	1.1 μm	14 mW (pump) 7 mW (Stokes)	—	10 μs	~1.6 s [20]
	SRS	400 nm	2 μm	60 mW (pump) 100 mW (Stokes)	—	2 μs	~1 s [27]
PTM	290 nm	860 nm	0.9 mW (pump) 7 mW (probe)	5 nm	5 μs	several seconds [34]	
SPRM	Wide-field	260 nm	—	5 mW	15 nm	2 ms	2 ms [49, 51]
	Scanning	186 nm	2.3 nm	—	—	100 ms	73 min [57]
iSCAT	Wide-field	~190 nm	—	10 mW	65 ku	~0.33 ms	~0.33 ms [64]
	Fast beam-scanning	1 μm	—	2.5 kW/cm ²	60 ku	—	~100 μs [65]

从表 1 中可以看出 PTM、SPRM 以及 iSCAT 都达到了单分子灵敏度,因此在单生物分子的无标记检测上都具有不错的表现。由于 CRS、PTM、扫描 SPRM 基于扫描共聚焦显微镜,其成像需要进行大量像素位点扫描,成像时间一般在秒级以上,成像时间较长,限制了其在生物领域具有快速响应需求的宽场实时成像应用。因此在对成像时间要求不高的可视化研究中,如生物组织成像、药物传递和细胞形态成像等,扫描共聚焦显微镜展示出卓越的成像能力。对比而言,宽场照明的 SPRM 及 iSCAT 可实现快速实时宽场成像,可以在纳米级精度上实时检测单个生物分子。Toma 的研究提到^[55],可在利用宽场 SPRM 实时观测细胞的同时,利用扫描 SPRM 对感兴趣的细胞部位进行分辨率更高的成像研究,这种多技术联用的显微成像方式将成为未来生物成像手段的主要发展方向。在以往文献报道中,我们也发现,扫描共聚焦对比宽场照明成像方式,在 z 轴上具有更高的分辨率,使扫描模式在组织或细胞的三维成像中具有优势。此外,从表 1 中可以发现 CARS、PTM、SPRM 以及 iSCAT 对于所需激光功率相差不大,对比而言 SRS 所需激光功率几倍于这几种方法,因此 SRS 在生物样品的激光功率需求方面存在一定的限制。

以更高的分辨率、更高的灵敏度和更快的成像速度对细胞、病毒及生物分子的形态和动力学过程进行详细准确研究,仍然是无标记显微成像的更高追求。每种无标记成像方法都有自身的优点和缺点,在生物医学研究的具体应用场景中,可以根据研究对象的需求选取对应的光学显微成像技术,并将多种技术联用以取得更好的研究结果。

参 考 文 献

- [1] Lichtman J W, Conchello J A. Fluorescence microscopy[J]. *Nature Methods*, 2005, 2(12): 910-919.
- [2] Huang B, Bates M, Zhuang X W. Super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, 78: 993-1016.
- [3] Wang X, Tu S J, Liu X, et al. Advance and prospect for three-dimensional super-resolution microscopy[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(22): 2200001.
王潇, 涂世杰, 刘鑫, 等. 三维超分辨显微成像技术的研究进展及展望[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(22): 2200001.
- [4] Zhang C, Aldana-Mendoza J A. Coherent Raman scattering microscopy for chemical imaging of biological systems[J]. *Journal of Physics: Photonics*, 2021, 3(3): 032002.
- [5] Liu K, Li J S, Raghunathan R, et al. The progress of label-free optical imaging in Alzheimer's disease screening and diagnosis[J]. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2021, 13: 699024.
- [6] Min W. Label-free optical imaging of nonfluorescent molecules by stimulated radiation[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2011, 15(6): 831-837.
- [7] Zhang D P, Bian Q, Zhou Y, et al. The application of label-free imaging technologies in transdermal research for deeper mechanism revealing[J]. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2021, 16(3): 265-279.
- [8] Hoebe R A, van Oven C H, Gadella T W J, et al. Controlled light-exposure microscopy reduces photobleaching and phototoxicity in fluorescence live-cell imaging[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(2): 249-253.
- [9] Zhang J, Hong L, Ren S, et al. Research progress on label-free microscopic imaging technology[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2019, 56(7): 070005.
张佳, 洪亮, 任升, 等. 无标记显微成像技术的研究进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2019, 56(7): 070005.
- [10] Potcoava M C, Futia G L, Aughenbaugh J, et al. Raman and coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy studies of changes in lipid content and composition in hormone-treated breast and prostate cancer cells[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19: 111605.
- [11] Li R, Wang X X, Zhou Y, et al. Advances in nonlinear optical microscopy for biophotonics[J]. *Journal of Nanophotonics*, 2018, 12(3): 033007.
- [12] Freudiger C W, Min W, Saar B G, et al. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Science*, 2008, 322(5909): 1857-1861.
- [13] Wang X, Lu X C, Huang C J. Advanced label-free laser scanning microscopy and its biological imaging application[J]. *Applied Sciences*, 2021, 11(3): 1002.
- [14] Cheng J X, Xie X S. Vibrational spectroscopic imaging of living systems: an emerging platform for biology and medicine[J]. *Science*, 2015, 350(6264): aaa8870.
- [15] Nan X L, Cheng J X, Xie X S. Vibrational imaging of lipid droplets in live fibroblast cells with coherent

- anti-Stokes Raman scattering microscopy[J]. *Journal of Lipid Research*, 2003, 44(11): 2202-2208.
- [16] Hellerer T, Axäng C, Brackmann C, et al. Monitoring of lipid storage in *Caenorhabditis elegans* using coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(37): 14658-14663.
- [17] Lyn R K, Kennedy D C, Stolow A, et al. Dynamics of lipid droplets induced by the hepatitis C virus core protein[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 399(4): 518-524.
- [18] Day J P R, Rago G, Domke K F, et al. Label-free imaging of lipophilic bioactive molecules during lipid digestion by multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(24): 8433-8439.
- [19] Paar M, Jüngst C, Steiner N A, et al. Remodeling of lipid droplets during lipolysis and growth in adipocytes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(14): 11164-11173.
- [20] di Napoli C, Pope I, Masia F, et al. Hyperspectral and differential CARS microscopy for quantitative chemical imaging in human adipocytes[J]. *Biomedical Optics Express*, 2014, 5(5): 1378-1390.
- [21] Zhang C, Boppart S A. Dynamic signatures of lipid droplets as new markers to quantify cellular metabolic changes[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(24): 15943-15952.
- [22] Zhang C, Li J J, Lan L, et al. Quantification of lipid metabolism in living cells through the dynamics of lipid droplets measured by stimulated Raman scattering imaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(8): 4502-4507.
- [23] Fu D, Zhou J, Zhu W S, et al. Imaging the intracellular distribution of tyrosine kinase inhibitors in living cells with quantitative hyperspectral stimulated Raman scattering[J]. *Nature Chemistry*, 2014, 6(7): 614-622.
- [24] Chiu W S, Belsey N A, Garrett N L, et al. Molecular diffusion in the human nail measured by stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(25): 7725-7730.
- [25] Karanja C W, Hong W L, Younis W, et al. Stimulated Raman imaging reveals aberrant lipogenesis as a metabolic marker for azole-resistant *Candida albicans*[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(18): 9822-9829.
- [26] Hong W L, Karanja C W, Abutaleb N S, et al. Antibiotic susceptibility determination within one cell cycle at single-bacterium level by stimulated Raman metabolic imaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(6): 3737-3743.
- [27] Ji M B, Arbel M, Zhang L L, et al. Label-free imaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease with stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Science Advances*, 2018, 4(11): eaat7715.
- [28] Sarri B, Canonge R, Audier X, et al. Fast stimulated Raman and second harmonic generation imaging for intraoperative gastro-intestinal cancer detection[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 10052.
- [29] Boyer D, Tamarat P, Maali A, et al. Photothermal imaging of nanometer-sized metal particles among scatterers[J]. *Science*, 2002, 297(5584): 1160-1163.
- [30] Berciaud S, Lasne D, Blab G A, et al. Photothermal heterodyne imaging of individual metallic nanoparticles: theory versus experiment[J]. *Physical Review B*, 2006, 73(4): 045424.
- [31] Berciaud S, Cognet L, Blab G A, et al. Photothermal heterodyne imaging of individual nonfluorescent nanoclusters and nanocrystals[J]. *Physical Review Letters*, 2004, 93(25): 257402.
- [32] Lasne D, Blab G A, de Giorgi F, et al. Label-free optical imaging of mitochondria in live cells[J]. *Optics Express*, 2007, 15(21): 14184-14193.
- [33] Brusnichkin A V, Nedosekin D A, Galanzha E I, et al. Ultrasensitive label-free photothermal imaging, spectral identification, and quantification of cytochrome c in mitochondria, live cells, and solutions[J]. *Journal of Biophotonics*, 2010, 3(12): 791-806.
- [34] Miyazaki J, Toumon Y. Label-free dynamic imaging of mitochondria and lysosomes within living cells via simultaneous dual-pump photothermal microscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2019, 10(11): 5852-5861.
- [35] He J P, Miyazaki J, Wang N, et al. Label-free imaging of melanoma with nonlinear photothermal microscopy[J]. *Optics Letters*, 2015, 40(7): 1141-1144.
- [36] Lim J M, Park C, Park J S, et al. Cytoplasmic protein imaging with mid-infrared photothermal microscopy: cellular dynamics of live neurons and oligodendrocytes[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2019, 10(11): 2857-2861.
- [37] Zhang Y, Yurdakul C, Devaux A J, et al.

- Vibrational spectroscopic detection of a single virus by mid-infrared photothermal microscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(8): 4100-4107.
- [38] Lu S J, Min W, Chong S S, et al. Label-free imaging of heme proteins with two-photon excited photothermal lens microscopy[J]. *Applied Physics Letters*, 2010, 96(11): 113701.
- [39] He J P, Wang N, Tsurui H, et al. Noninvasive, label-free, three-dimensional imaging of melanoma with confocal photothermal microscopy: differentiate malignant melanoma from benign tumor tissue[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30209.
- [40] Zhang D L, Li C, Zhang C, et al. Depth-resolved mid-infrared photothermal imaging of living cells and organisms with submicrometer spatial resolution[J]. *Science Advances*, 2016, 2(9): e1600521.
- [41] Homola J, Yee S S, Gauglitz G. Surface plasmon resonance sensors: review[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1999, 54(1/2): 3-15.
- [42] Orlovski R, Raether H. The total reflection of light at smooth and rough silver films and surface plasmons [J]. *Surface Science*, 1976, 54(2): 303-308.
- [43] Watanabe K, Matsuura K, Kawata F, et al. Scanning and non-scanning surface plasmon microscopy to observe cell adhesion sites[J]. *Biomedical Optics Express*, 2012, 3(2): 354-359.
- [44] Wang X, Wang C, Sun X J, et al. Locally excited surface plasmon resonance for refractive index sensing with high sensitivity and high resolution[J]. *Optics Letters*, 2021, 46(15): 3625-3628.
- [45] Sun X Q, Liu H Y, Jiang L W, et al. Detecting a single nanoparticle by imaging the localized enhancement and interference of surface plasmon polaritons[J]. *Optics Letters*, 2019, 44(23): 5707-5710.
- [46] Wang S P, Shan X N, Patel U, et al. Label-free imaging, detection, and mass measurement of single viruses by surface plasmon resonance[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(37): 16028-16032.
- [47] Sun X Q, Liu H Y, Yang Y, et al. Imaging to single virus by using surface plasmon polariton scattering [J]. *Proceedings of SPIE*, 2017, 10244: 1024425.
- [48] Yu H, Shan X N, Wang S P, et al. Plasmonic imaging and detection of single DNA molecules[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(4): 3427-3433.
- [49] Zhang P F, Ma G Z, Dong W, et al. Plasmonic scattering imaging of single proteins and binding kinetics[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(10): 1010-1017.
- [50] Wang W, Yang Y Z, Wang S P, et al. Label-free measuring and mapping of binding kinetics of membrane proteins in single living cells[J]. *Nature Chemistry*, 2012, 4(10): 846-853.
- [51] Yang Y Z, Yu H, Shan X N, et al. Label-free tracking of single organelle transportation in cells with nanometer precision using a plasmonic imaging technique[J]. *Small*, 2015, 11(24): 2878-2884.
- [52] Syal K, Iriya R, Yang Y Z, et al. Antimicrobial susceptibility test with plasmonic imaging and tracking of single bacterial motions on nanometer scale[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(1): 845-852.
- [53] Yang Y T, Shen G X, Wang H, et al. Interferometric plasmonic imaging and detection of single exosomes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(41): 10275-10280.
- [54] Giebel K F, Bechinger C, Herminghaus S, et al. Imaging of cell/substrate contacts of living cells with surface plasmon resonance microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 1999, 76(1): 509-516.
- [55] Wang W, Wang S P, Liu Q, et al. Mapping single-cell-substrate interactions by surface plasmon resonance microscopy[J]. *Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 2012, 28(37): 13373-13379.
- [56] Toma K, Kano H, Offenhäusser A. Label-free measurement of cell-electrode cleft gap distance with high spatial resolution surface plasmon microscopy [J]. *ACS Nano*, 2014, 8(12): 12612-12619.
- [57] Kreysing E, Hassani H, Hampe N, et al. Nanometer-resolved mapping of cell-substrate distances of contracting cardiomyocytes using surface plasmon resonance microscopy[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(9): 8934-8942.
- [58] Lindfors K, Kalkbrenner T, Stoller P, et al. Detection and spectroscopy of gold nanoparticles using supercontinuum white light confocal microscopy [J]. *Physical Review Letters*, 2004, 93(3): 037401.
- [59] Jacobsen V, Stoller P, Brunner C, et al. Interferometric optical detection and tracking of very small gold nanoparticles at a water-glass interface[J]. *Optics Express*, 2006, 14(1): 405-414.
- [60] Kukura P, Ewers H, Müller C, et al. High-speed nanoscopic tracking of the position and orientation of a single virus[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(12): 923-927.

- [61] Ortega-Arroyo J, Kukura P. Interferometric scattering microscopy (iSCAT): new frontiers in ultrafast and ultrasensitive optical microscopy[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, 2012, 14(45): 15625-15636.
- [62] Priest L, Peters J S, Kukura P. Scattering-based light microscopy: from metal nanoparticles to single proteins[J]. *Chemical Reviews*, 2021, 121(19): 11937-11970.
- [63] Ewers H, Jacobsen V, Klotzsch E, et al. Label-free optical detection and tracking of single virions bound to their receptors in supported membrane bilayers[J]. *Nano Letters*, 2007, 7(8): 2263-2266.
- [64] Piliarik M, Sandoghdar V. Direct optical sensing of single unlabelled proteins and super-resolution imaging of their binding sites[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4495.
- [65] Ortega-Arroyo J, Andrecka J, Spillane K M, et al. Label-free, all-optical detection, imaging, and tracking of a single protein[J]. *Nano Letters*, 2014, 14(4): 2065-2070.
- [66] Liebel M, Hugall J T, van Hulst N F. Ultrasensitive label-free nanosensing and high-speed tracking of single proteins[J]. *Nano Letters*, 2017, 17(2): 1277-1281.
- [67] Andrecka J, Spillane K M, Ortega-Arroyo J, et al. Direct observation and control of supported lipid bilayer formation with interferometric scattering microscopy[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(12): 10662-10670.
- [68] de Wit G, Danial J S H, Kukura P, et al. Dynamic label-free imaging of lipid nanodomains[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(40): 12299-12303.
- [69] Andrecka J, Ortega-Arroyo J, Lewis K, et al. Label-free imaging of microtubules with sub-nm precision using interferometric scattering microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2016, 110(1): 214-217.
- [70] Mosby L S, Hundt N, Young G, et al. Myosin II filament dynamics in actin networks revealed with interferometric scattering microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2020, 118(8): 1946-1957.
- [71] Park J S, Lee I B, Moon H M, et al. Label-free and live cell imaging by interferometric scattering microscopy [J]. *Chemical Science*, 2018, 9(10): 2690-2697.
- [72] Talà L, Fineberg A, Kukura P, et al. *Pseudomonas aeruginosa* orchestrates twitching motility by sequential control of type IV pili movements[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(5): 774-780.