

## 光热显微成像：一种免标记、高分辨的成像技术

丁佳渝<sup>1,3</sup>, 彭斯颖<sup>2,3\*</sup><sup>1</sup>复旦大学材料科学系, 上海 200433;<sup>2</sup>西湖大学未来产业研究中心, 浙江 杭州 310030;<sup>3</sup>西湖大学工学院, 浙江 杭州 310030

**摘要** 高分辨光学成像技术对生物学、生命科学以及材料科学的发展都有重要意义。主流的高分辨光学成像技术依赖荧光成像, 但是荧光高分辨成像不能揭示分子特异性信息且极易导致细胞毒性。而光热显微成像技术是一种兼具成分分辨和非侵入性的新兴技术, 能够填补高分辨荧光成像的缺陷, 具有极大的应用前景。对光热显微成像技术的实现原理、技术发展进行简要介绍, 并总结提高中红外光热显微成像的探测极限和分辨率的措施, 旨在为进一步推动高灵敏度和超分辨光热成像技术的发展提供借鉴思路。

**关键词** 光热成像; 红外成像; 高灵敏度; 高空间分辨率

中图分类号 O439 文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP231026

## Photothermal Microimaging: A Non-Invasive and High-Resolution Imaging Technique

Ding Jiayu<sup>1,3</sup>, Peng Siying<sup>2,3\*</sup><sup>1</sup>Department of Materials Science, Fudan University, Shanghai 200433, China;<sup>2</sup>Research Center for Industries of the Future, Westlake University, Hangzhou 310030, Zhejiang, China;<sup>3</sup>School of Engineering, Westlake University, Hangzhou 310030, Zhejiang, China

**Abstract** Super-resolution optical imaging technology has significant implications for biology, life science, and materials science. The mainstream technology to achieve super-resolution optical imaging relies on fluorescence imaging, but fluorescence-based super-resolution imaging cannot reveal molecular-specific information and causes cytotoxicity to living cells. In contrast, photothermal microscopy is a promising analytical technique that allows noninvasive imaging of molecular bonds. Therefore, photothermal microscopy can overcome the inherent limitations of super-resolution fluorescence imaging, making it an attractive option with excellent application prospects. This review discusses the theoretical basis of photothermal microscopy, development of the imaging technique, and the methodological developments that improve the detection limit and spatial resolution. We further provide future perspectives for promoting the development of high-sensitivity and super-resolution photothermal imaging technology.

**Key words** photothermal imaging; infrared imaging; high-sensitivity; high spatial resolution

## 1 引言

光学显微镜具有成本低、操作简单且对样品无损伤的特点, 为生物学、医学、材料科学、环境科学等领域的研究提供了基础工具和支持。但光学显微镜受光学衍射极限限制, 空间分辨率仅能够达到半波长尺度 (200~300 nm), 这远远不能满足人们对亚细胞、纳米材料等微观结构的探索需求。高分辨光学显微技术的

发展打破了光学衍射限制, 使得研究者们能在较简单的光学系统基础上分辨超过衍射极限的细节。目前实现高分辨光学成像的主流技术是荧光标记成像, 主要可以分为两大类: 一类是通过调制照明光斑缩小点扩散函数 (PSF) 实现高分辨成像, 如受激辐射耗尽 (STED) 显微成像技术<sup>[1]</sup>利用环形耗尽光直接减小 PSF 的有效尺寸, 结构光照明显微镜 (SIM)<sup>[2-3]</sup>通过构建莫尔条纹获取高频信息再重构出高分辨图像; 第二

收稿日期: 2023-04-03; 修回日期: 2023-05-05; 录用日期: 2023-05-15; 网络首发日期: 2023-05-26

通信作者: pengsiying@westlake.edu.cn

类是基于单个荧光分子进行精确定位实现高分辨显微成像,如光激活显微镜(PALM)<sup>[4]</sup>和随机光学重建显微镜(STORM)<sup>[5]</sup>通过随机激活衍射极限空间内单个荧光分子,得到PSF的中心位置,以实现单个荧光分子的高精度定位,最后将一系列图片叠加,重构生成高分辨图像。这些基于荧光的高分辨成像技术将光学显微镜的分辨率拓展至几十纳米<sup>[6]</sup>,极大提高了光学显微镜在揭示细胞亚结构及生物分子相互作用等方面的能力,大大推动了生命科学和医学的发展。但是荧光成像不能揭示分子及其结构的特异性信息,而且高分辨荧光成像过度依赖标记,可能造成细胞毒性、光漂白等潜在的问题,从而影响实验结果的准确性和可重复性。

为避免上述高分辨荧光成像技术带来的固有局限性,很多研究致力于免标记高分辨成像技术的发展。其中,拉曼成像技术<sup>[7]</sup>作为典型的非侵入性分析手段,能够深入揭示样品的化学键信息,在生物医学领域有重要应用。拉曼显微成像可以利用类似STED机制增加空间分辨率,如饱和受激拉曼散射(saturation-stimulated Raman scattering)显微镜<sup>[8]</sup>和饱和相干反斯托克斯拉曼散射(saturated coherent anti-stokes Raman scattering)显微镜<sup>[9]</sup>,通过在饱和激发下提取高次谐波信号减小点扩散函数;也有研究采用结构光照明实现高分辨拉曼成像<sup>[10]</sup>。以上方法能够将拉曼成像技术的空间分辨率提升到70 nm以上<sup>[11]</sup>,为研究生物体内部的微观结构和生物分子的分布及功能状态提供了丰富的信息。但是拉曼显微成像技术也存在局限性,其作用截面非常小( $\sim 10^{-30} \text{ cm}^2 \cdot \text{sr}^{-1}$ ),限制了最终的检测灵敏度<sup>[12]</sup>。相比之下,中红外波段光热(MIP)显微成像技术同样提供了一种能实现成分分辨的非侵入式分析手段,但其红外吸收截面( $\sim 10^{-22} \text{ cm}^2 \cdot \text{sr}^{-1}$ )比拉曼截面高8个数量级<sup>[13]</sup>。此外,MIP显微成像技术能够生成与傅里叶变换红外光谱(FTIR)类似的具有高光谱保真度的吸收光谱,提供和拉曼散射互补的信息,对深入探究生物信息具有重要价值。MIP显微成像技术利用探测光束的强度间接反映样品的红外吸收响应,其成像分辨率由探测光的波长决定。目前通过优化光路,MIP成像已取得接近光学衍射极限的空间分辨率( $\sim 300 \text{ nm}$ )<sup>[14]</sup>,远优于传统红外成像技术。进一步地,通过利用深度学习<sup>[15]</sup>和提取高次谐波信号的方法<sup>[16]</sup>,MIP成像技术也能获得突破衍射极限的空间分辨率,达到120~150 nm的水平。

MIP显微成像技术是基于泵浦-探测技术的新型分析工具,通过测量光热效应导致的局部折射率的变化得到样品信息。光声成像(PAI)<sup>[17]</sup>同样是基于样品的光热效应成像,但不同于MIP成像,PAI是通过探测光热产生的超声波信号获取样品信息的。因声波的穿透特性,PAI能够探测厘米量级的成像深度,并广泛用于血管、组织结构等三维成像。但是光声成像的空间

分辨率有限,一般为几十微米到几百微米,非线性光声成像方法也仅能达到 $\sim 2 \mu\text{m}$ 的空间分辨率<sup>[18]</sup>。MIP显微成像技术也具有深度分辨的能力,该技术不仅能够获得亚微米级空间分辨率,也能探测近50  $\mu\text{m}$ 的成像深度<sup>[19-21]</sup>。因此,MIP成像技术兼具高灵敏度、非侵入性、可实现亚微米级空间分辨率和成分分辨的特点,如图1所示,其在生命科学<sup>[22-23]</sup>、化学测绘<sup>[24-25]</sup>和材料表征<sup>[26-27]</sup>等领域都具有极大的应用前景。MIP成像技术已迅速实现商业化,其性能也在不断完善,应用方向包括宽场成像<sup>[28-29]</sup>、与拉曼光谱协同集成实现多功能成像<sup>[30]</sup>等。除MIP显微成像技术外,光热显微成像技术可用可见光作为激发光,实现可见光波段光热成像。在可见光波段,光热成像信号源于电子或等离子体吸收,具有极高的灵敏度。可见光波段光热成像能够实现单纳米颗粒成像<sup>[31]</sup>和单分子成像<sup>[32]</sup>,并且也可用于内源性细胞器如线粒体<sup>[33]</sup>、溶酶体<sup>[34]</sup>等成像。

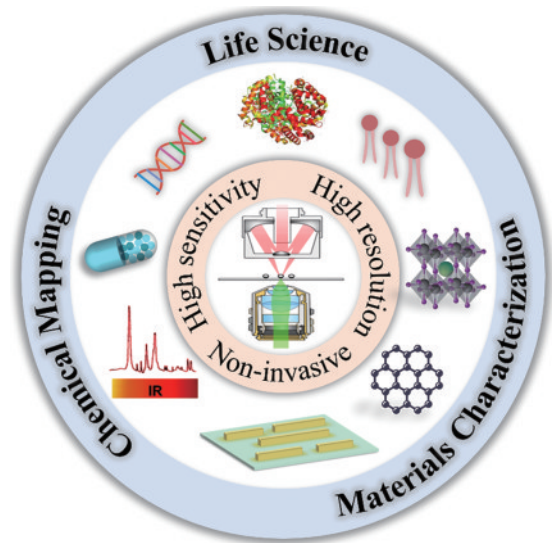


图1 光热成像的优势和应用

Fig. 1 Advantages and applications of photothermal imaging

已有相关综述文章<sup>[35-37]</sup>重点讨论了光热成像衬度机制、光路仪器配置及应用。本文对光热显微镜技术的实现原理、可见光光热成像和MIP成像的发展进行简要介绍,并针对性地分析改善光热显微镜的探测极限和分辨率的技术发展。最后对光热技术的发展进行展望,期望能提供启发和参考,推进光热成像在各个研究领域的深入应用。

## 2 光热效应

光热效应指材料被光激发产生热能的现象。在光热成像技术中,样品受到脉冲泵浦光激发后产生光热效应,导致样品局部温度发生变化( $\Delta T$ )并热膨胀,进而引起局部折射率的周期性变化( $\Delta n$ )。此时通过探测样品在脉冲加热前后的折射率变化即可得到光热信号。因此,理解样品在脉冲激光加热下的瞬态温度变

化特性对光热成像信号的分析十分关键。另一方面,样品及介质的温度在时域和空间域的分布特性 (spatiotemporal distributions) 对光热成像的衬度有很大影响。在进行光热显微成像之前,有必要先分析样品及

周围环境介质受光激发后的瞬态升温特性及温度在空间上分布的情况。以处在空气介质中,并放置于硅基底上的聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 微珠为讨论对象,如图 2(a) 所示,分析其受单个光脉冲后的光热特性。

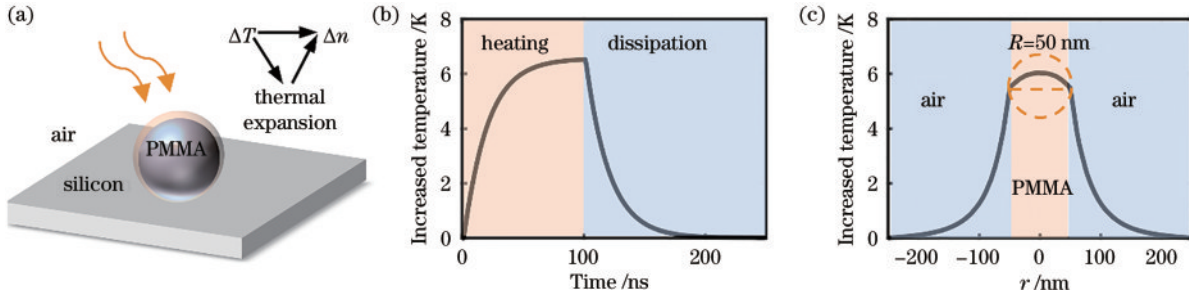


图 2 PMMA 珠的瞬态光热特性。(a) PMMA 在光照下产生光热效应的示意图,其中实心圆代表初始样品,外围部分代表受光激发后光热转换导致的样品热膨胀现象;(b) 单脉冲下 PMMA 的球心温度随时间的变化,脉冲宽度  $\tau=100$  ns;(c) 当  $t=100$  ns 时,过球心的沿  $x$  轴的 PMMA 和介质的温度分布,虚线圆为样品  $xz$  截面, $r$  表示与球心的距离

Fig. 2 Transient photothermal properties of a PMMA bead. (a) Illustration of the transient photothermal process of a PMMA bead, the solid circle indicates the sample, and the peripheral part of sphere represents the phenomenon of sample thermal expansion caused by photothermal conversion after being excited by light; (b) center temperature of a PMMA bead varying with time under a single pulse, with pulse width  $\tau=100$  ns; (c) temperature profile of a PMMA bead and the medium at  $t=100$  ns along the  $x$ -axis passing through the center of PMMA bead, the dotted circle indicates the boundary of the sample at  $xz$  cross-section,  $r$  represents the distance from the center of the PMMA bead

PMMA 微珠在泵浦光激发下,会相继发生光吸收和热扩散两个过程。前者是样品吸收光能后晶格振动加剧的光热转换过程,主要由样品材料的介电常数( $\epsilon$ )的虚部和激发光的强度( $I$ )决定,该过程样品吸收的总热量可通过式(1)求解<sup>[38]</sup>。热扩散包括热量在样品内扩散及在样品与环境介质间扩散两个过程,当泵浦光的脉冲时间在纳秒尺度及以上时<sup>[39]</sup>,该过程可以由传热基本方程计算。一般情况下,光热成像是在微纳尺度下传热的,传热过程由热传导主导,可以忽略热对流和热辐射的影响<sup>[40]</sup>,样品及介质中的热扩散过程可分别用式(2)和式(3)表示。

光吸收的表达式为

$$\begin{cases} Q_{\text{abs}} = \sigma_{\text{abs}} I = \int q(\mathbf{r}, t) d\mathbf{r} \\ q(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{2} \epsilon_0 \omega \text{Im}(\epsilon) |E(\mathbf{r}, t)|^2 \end{cases} \quad (1)$$

样品中的热扩散表达式为

$$\rho_{\text{obj}} C_{\text{obj}} \partial_t T(\mathbf{r}, t) = \kappa_{\text{obj}} \nabla^2 T(\mathbf{r}, t) + q(\mathbf{r}, t). \quad (2)$$

介质中的热扩散表达式为

$$\rho_{\text{med}} C_{\text{med}} \partial_t T(\mathbf{r}, t) = \kappa_{\text{med}} \nabla^2 T(\mathbf{r}, t), \quad (3)$$

式中: $Q_{\text{abs}}$ 为吸收的热量; $\sigma_{\text{abs}}$ 为样品吸收截面; $q(\mathbf{r}, t)$ 为内热源,当样品未受到泵浦光束激发时, $q(\mathbf{r}, t)=0$ ; $\epsilon_0$ 为真空介电常数; $\omega$ 为角频率; $E$ 为电场强度; $\mathbf{r}$ 为坐标位置; $t$ 为时间;下标“obj”和“med”分别代表样品和介质。边界条件:在  $r=R$  处,  $\kappa_{\text{med}} \partial_r T(R^+, t) = \kappa_{\text{obj}} \partial_r T(R^-, t)$ ,  $T(R^+, t) = T(R^-, t)$ 。由式(2)和式(3)可知,热扩散过程主要受样品和介质的密度  $\rho$ 、等压比热容  $C$ 、导热系数  $\kappa$  等因素影响。

借助时域有限差分 (FDTD) 模拟计算单个 PMMA 微珠在  $1729 \text{ cm}^{-1}$  处的热吸收分布,其中 PMMA 半径为  $50 \text{ nm}$ ,复折射率为  $1.4176 + i0.361$ ,设置入射光强为  $0.2 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$ ,网格尺寸在  $x, y, z$  方向均为  $8 \text{ nm}$ 。然后将 FDTD 得到的 PMMA 微珠的热密度分布数据作为样品在脉冲光激发下的吸收响应,再利用热平衡法进行热扩散模拟计算,设置脉宽  $\tau=100 \text{ ns}$ ,时间步长为  $1 \sim 2 \text{ ns}$ ,  $\rho_{\text{PMMA}} = 1190 \text{ kg}/\text{m}^3$ ,  $C_{\text{PMMA}} = 1466 \text{ J}/(\text{kg} \cdot \text{K})$ ,  $\kappa_{\text{PMMA}} = 0.2 \text{ W}/(\text{m} \cdot \text{K})$ ,介质空气及硅基底的物理参数取自 Lumerical 材料库。PMMA 微珠球心温度在单个脉冲下的瞬态变化结果如图 2(b) 所示,在泵浦光加热下,温度以指数增长,在加热结束时达到最高温度 ( $T_{\text{max}}$ ),之后温度又以指数趋势迅速衰减。其温度随时间的变化<sup>[41-42]</sup>可用解析公式近似表示,

$$\Delta T(t) = \frac{\sigma_{\text{abs}} I}{4R\pi\kappa_{\text{med}}} \left( 1 - e^{-\frac{4R\pi\kappa_{\text{med}} t}{mC_{\text{obj}}}} \right), t < \tau, \quad (4)$$

$$\Delta T(t) = T_{\text{max}} - T_0 \left( 1 - e^{-\frac{4R\pi\kappa_{\text{med}}}{mC_{\text{obj}}}(t-\tau)} \right), t > \tau. \quad (5)$$

由温度的瞬态变化特性可知,增强泵浦光强和增加照射时间都会提高样品能达到的最高温度。对于光热成像,应该合理选择泵浦光强和照射时间以保证在不损害样品的前提下得到明显的信号,另一方面,也要求两次泵浦光间隔时间足够长,以避免样品集热造成损伤。脉冲间隔时长最终影响光热成像速率,而脉冲间隔受样品的热衰减常数 ( $\tau = \frac{mC_{\text{obj}}}{4R\pi\kappa_{\text{med}}}$ ) 限制。在本

例中,PMMA 在空气中的热衰减常数为 80 ns 左右,对于导热性质好的金属颗粒,如金纳米颗粒,在相同条件下热衰减常数仅为十几纳秒。而针对活体生物样品,如单个大肠杆菌和单个脂质液滴的热衰减常数有几百纳秒,细胞核和细胞质的热衰减常数则达到微秒级<sup>[22]</sup>。热衰减常数除了和样品本身质量、尺寸和比热容有关外,还受介质的导热率影响。对散热较差的生物样品,可采用导热系数大的材料如硅作为基底增强散热。

温度在样品及介质中的分布受两者导热性能差异的影响。金属纳米球的导热系数远大于空气 [0.025 W/(m·K)] 和水 [0.59 W/(m·K)] 等常用介质,因此金属纳米球内部的热扩散速度远快于在介质中的热扩散速度,热量在经介质扩散之前在边界积累,可认为金属纳米球内部的温度已均匀<sup>[43]</sup>。但当样品与介质的导热系数相当时,界面处的热量向样品及介质中传递的难度接近,导致样品中心热量会集,样品内部的温度分布不均匀<sup>[44]</sup>。如本例中,PMMA 的导热系数为 0.25 W/(m·K),与空气热扩散能力相当,从图 2(c) 可以看出 PMMA 微珠球心处的温度最高,且温度从中心到边缘存在微小差异。介质中的温度分布则与光源激发模式有关。如用连续波(CW)光源激发,即稳态传热过程中,纳米球外部介质的温度衰减曲线变化为  $1/r$ <sup>[38]</sup>,而在瞬态传热过程中如飞秒脉冲激发下,介质的温度衰减可达  $1/r^3$ 。有工作证实,在光热成像系统中,如果加热激光调制频率小于 1 MHz,纳米颗粒外部的瞬态温度仍以近似  $1/r$  的趋势衰减<sup>[45]</sup>。则在光热成像过程中,温度在空间上的分布可用稳态传热的温度分布近似表达<sup>[44]</sup>,当  $r < R$ ,在 PMMA 内,有

$$\Delta T(r) \approx \Delta T_{\text{surf}} + \frac{Q_{\text{abs}}(R^2 - r^2)}{6V\kappa_{\text{PMMA}}}, \quad (6)$$

当  $r > R$ ,在介质中,有

$$\Delta T(r) \approx \Delta T_{\text{surf}} \frac{R}{r}. \quad (7)$$

由温度在样品内及介质中的分布可以推断局部折射率的变化特性,而两者折射率相对变化影响光热成

像的衬度。同样以 PMMA 为例,采用空气为介质,其热光常数为  $-9.8 \times 10^{-7} \text{ K}^{-1}$ <sup>[46]</sup>,而 PMMA 的热光常数为  $-1.3 \times 10^{-4} \text{ K}^{-1}$ <sup>[47]</sup>,与图 2(c) 中 PMMA 和空气的温度差异相比,热光常数差异明显,而且最终得到的折射率变化也相差 2 个数量级。这表明以空气为介质,PMMA 的光热图像有相当高的衬度。因此在光热显微成像中,应针对不同样品的光热特性和热光常数选择合适的介质。

### 3 可见光波段光热成像

金属在可见光波段具有高吸收系数,因此金属纳米颗粒吸收的光能可以被迅速转换成热能,形成光热效应。成分为金属、半导体和非荧光分子(non-fluorescent molecules)并且尺寸在纳米到微米之间的颗粒具有较强的光热效应,因此光热成像技术对这类非荧光纳米颗粒的研究具有极高的灵敏度,并且能够将检测极限提升到单个纳米颗粒/单分子尺度<sup>[48-49]</sup>。

光热成像光路由泵浦光路和探测光路组成,如图 3 所示,其中图 3(a)和图 3(b)分别是扫描成像和宽场成像。可见光波段光热成像利用可见光的脉冲作为泵浦源诱导样品产生周期性的热效应。Nd:YAG 激光器、氩激光器等商用激光器可以实现强度可高达  $20 \text{ MW/cm}^2$  的热泵浦,使得纳米颗粒的温升达  $\sim 15 \text{ K}$ 。接下来,被探测样品的折射率随升温而发生周期性变化。探测光路中可观测量为被样品所散射的光束的强度变化 $(\Delta I_{\text{scatt}})$ <sup>[50-51]</sup>,通过  $\Delta I_{\text{scatt}} \propto I_{\text{scatt}} \Delta n$  的关系得到  $\Delta n$ ,其中  $I_{\text{scatt}}$  是入射的探测光强度。为进一步提高检测灵敏度,可构造散射光束和参考光束间基于干涉法的探测光路,从而从干涉图案中提取相位差 $(\Delta\phi)$ ,通过  $\Delta\phi = 2\pi\Delta n l/\lambda$  得到折射率变化  $\Delta n$ ,其中  $l$  是样品厚度, $\lambda$  是探测光束波长。在光热成像中,液体样品的  $\Delta n$  通常为  $10^{-3} \sim 10^{-4}$ ,而金属和半导体的  $\Delta n$  约为  $10^{-5} \sim 10^{-6}$ 。

光热成像实验最先于 20 世纪 80 年代初报道,用于

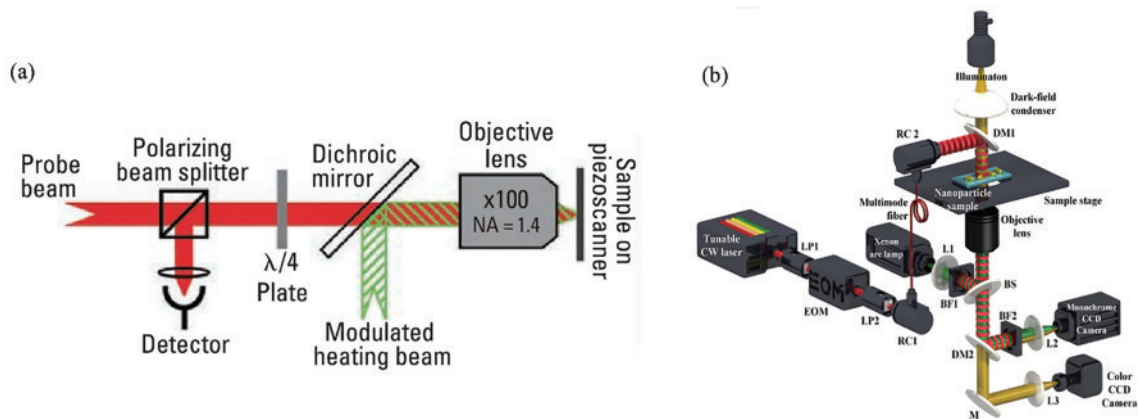


图 3 可见光波段光热成像光路系统。(a)扫描成像<sup>[52]</sup>; (b)宽场成像<sup>[53]</sup>

Fig. 3 Illustration of the optical path for visible wavelength photothermal imaging. (a) Scanning imaging<sup>[52]</sup>; (b) wide-field imaging<sup>[53]</sup>

对微裂纹 (microcrack) 和亚表面 (subsurface) 特征进行成像<sup>[54-55]</sup>。直到 20 世纪初, Boyer 等<sup>[56]</sup>通过光热干涉成像技术 (PIC), 首次实现了对直径为 2.4 nm 的 Au 纳米颗粒的光热成像。光热成像的高灵敏度受益于光热成像无背景吸收的高信噪比 (SNR) 和探测光束的低光子噪声。随后在 2004 年, 他们<sup>[31]</sup>提出了一种更灵敏、更简单的光热外差成像 (PHI) 技术, 用于检测非荧光纳米样品, 该技术已经成为对单个纳米颗粒进行光热成像的最常见方法。光热外差成像技术利用探测光束及其反射光束作为参考光束, 以代替 PIC 中的两个探测光路, 从而使得探测灵敏度提高了 2 个数量级。对于探测尺寸远小于探测光波长的样品如纳米颗粒或分子, 样品可以视为点热源, 此时光热信号主要源于周围介质的温度梯度, 在这种情况下, 需要热光常数较大的材料作为介质以提高检测极限。如 Gaiduk 等<sup>[32]</sup>利用甘油介质代替水介质, 提高

了成像灵敏度, 实现了对单个 BHQ 分子的成像, 如图 4(a) 所示。他们所提出的方法能够成功获取单个 BHQ 分子的图像依赖 BHQ 分子自身的热稳定性, 可以在衍射极限范围内以 5.1 mW 的高泵浦功率和超过 70 mW 的探测功率, 获得高达 ~10 的信噪比。并且 BHQ 分子具有高非辐射弛豫速率 (high nonradiative relaxation rate), 产生了强光热信号。

在可见光波段的光热成像技术中, 金属纳米颗粒还被用作成像的标记物。Cognet 等<sup>[57]</sup>用直径为 10 nm 的金纳米颗粒作为标记物, 成功得到 COS7 细胞中质量浓度为 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 anti-IgG 的光热图像, 展示了光热吸收成像的优势, 如图 4(b) 所示。相比基于荧光的单分子检测方法, 光热成像方法的信号不饱和, 不存在环境或细胞自身自发荧光或散射造成的信号干扰。另一方面, 光热信号的稳定性也提供了一种实现单个粒子三维定位的条件。

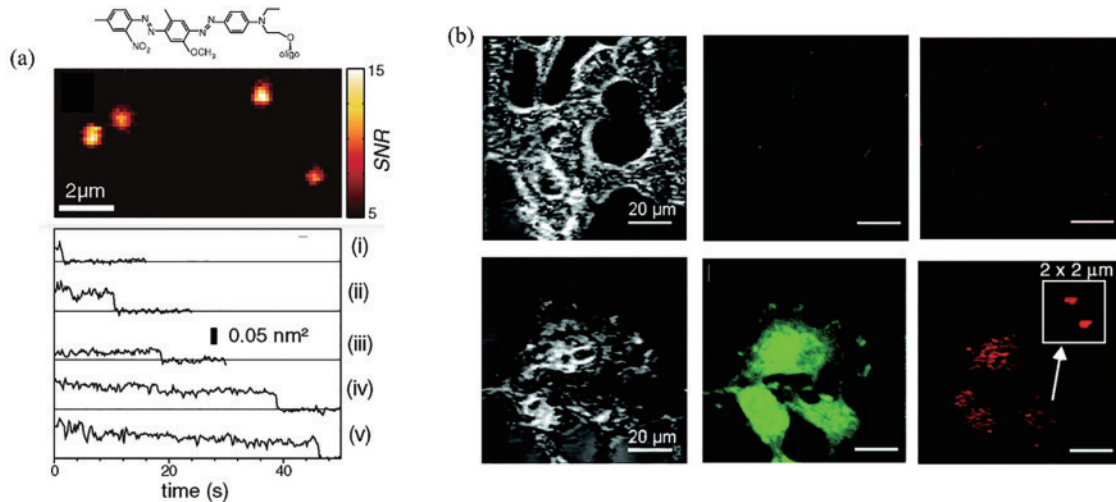


图 4 可见光波段光热成像的应用。(a) 浸没在甘油中的单个 BHQ 分子的光热图像<sup>[32]</sup>; (b) COS7 细胞的散射图 (左)、荧光图 (中) 和光热图 (右), 第一行图像对应未转染的细胞, 第二行图像对应表达膜蛋白的细胞, 其中膜蛋白含有 myc 标签, 用 anti-myc-Alexa568 免疫标记, 用 anti-IgG 10-nm 金颗粒作为二抗, 光热图像 (插图) 的细节显示了单个 anti-IgG 10-nm 金颗粒成像<sup>[57]</sup>

Fig. 4 Applications of photothermal imaging at visible wavelengths. (a) Photothermal image of a single BHQ molecule submerged in glycerol<sup>[32]</sup>; (b) scattering image (left), fluorescence image (middle), and photothermal image (right) recorded on COS7 cells, images of the first line correspond to untransfected cells and the other correspond to cells expressing a membrane protein containing a myc tag immunolabeled with anti-myc-Alexa568 and with anti-IgG 10-nm gold as the secondary antibody, details of the photothermal image (inset) revealing individual anti-IgG 10-nm gold imaging<sup>[57]</sup>

尽管光热成像对成分分辨和低量子效率材料的成像具有潜在优势, 但与高分辨荧光成像技术相比, 可见光波段的光热成像技术尚未广泛应用于生物成像。光热成像在可见光波段上有以下限制: 高分辨荧光成像可以实现几十纳米的高空间分辨率, 而光热成像技术目前极难突破衍射分辨极限; 光热成像的衬度主要源于细胞中的纳米颗粒标记物升温导致的折射率变化, 提高衬度则会面临细胞损伤的风险。而与成分可分辨的成像技术如受激拉曼成像 (SRI) 相比, 可见光光热成像技术无法提供样品分子键的特异性信息且空间分辨率处于劣势。

## 4 中红外波段光热成像

中红外波段是识别样品化学键特异性信息的关键波段, 由化学键的拉伸、振动和旋转组成的化学键指纹信息的特征吸收主要位于此波段。因此, 中红外光热成像技术可根据样品的特征吸收得到相应化学键的组成分布图谱。生物样品的基本成分包括蛋白质 (酰胺 I, C=O, 酰胺 II, C—N)、脂质 (C=O 和 CH 基团) 和核酸 (磷酸基团和 CH 基) 等, 均可根据其中红外波段的指纹吸收波长得到鉴定, 如图 5 所示。

在所有中红外成像技术中, MIP 成像技术极具潜

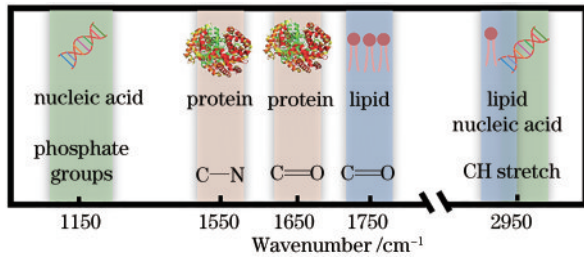


图 5 核酸、蛋白质和脂质在指纹区的特征吸收

Fig. 5 Absorption fingerprint region for nucleic acid, protein, and lipid

力,原因如下:与中红外波段直接成像技术相比,中红外光热成像利用可见光探测可将空间分辨率提高几个数量级;MIP 成像为活体成像提供了理想的条件,中红外波段直接成像技术受到水吸收背景噪声的制约,而 MIP 成像技术因为水的高比热容使其对样品信号的影响较小,因此与活体样品高度兼容;中红外光热成像兼具成像视场大、帧率高及深度分辨的特点。相比之下,红外扫描近场光学显微镜(IR-SNOM)<sup>[58-60]</sup>和红外激发原子力显微镜(AFM-IR)<sup>[61-62]</sup>等近场设备虽然可以实现 10~20 nm 的超高空间分辨率和较高的灵敏度,但它们受制于小视场(10  $\mu\text{m}^2$ )、有限的探测深度(1~

10 nm)及每帧约几十分钟的帧率,更关键的是近场成像方法更适用于观察干态样品,在生物活体样品原位成像方面仍面临着很大的技术挑战。

2009 年, Lee 等<sup>[63]</sup>首次实现了中红外波段的光热成像。他们搭建泵浦-探测同向传播的光路构型,通过激发香脂油滴中  $\text{CH}_2$  键的特征吸收成功地捕获浸没在水中的单个香脂油滴的光热图像,展示了光热成像技术在高分辨成分成像中的应用前景。自此,中红外光热成像技术性能在各方面都有较大提高:首先是空间分辨率的提升,通过构建反向传播光路,如图 6(a)所示,利用短波长作为探测光束并提取高次谐波信号, MIP 成像空间分辨率可提升到 120 nm<sup>[16]</sup>;另一方面通过使用短脉冲和高强度中红外激发光,可降低热扩散的影响,从而提高空间分辨率;其次,结合共聚焦显微镜可以获得样品光热信号的深度信息<sup>[64]</sup>,这一发展进一步促进了体内中红外光热成像的信息丰富化;最后,光热成像技术的灵敏度和时间分辨率可实现共同提升,利用高 Q 因数谐振放大器结合锁相放大器选择性地放大中红外成像信号,可以实现微秒级像素停留时间(pixel dwell time)并保持高灵敏度<sup>[65]</sup>。在光热系统中设计虚拟锁相机探测系统可以实现宽场成像,如图 6(b)所示,在不牺牲 SNR 的同时成像速度可提高 100 倍<sup>[66-67]</sup>。

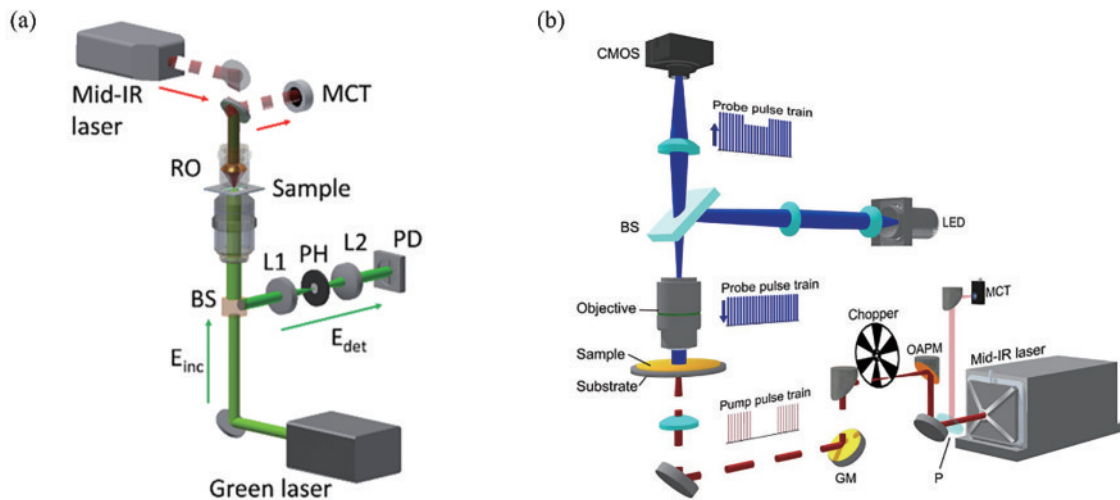


图 6 中红外光热成像光路系统。(a)反向传播扫描成像光路<sup>[65]</sup>; (b)反向传播宽场成像光路<sup>[66]</sup>

Fig. 6 Illustration of the optical path for mid-infrared photothermal imaging system. (a) Backpropagation scanning imaging optical path<sup>[16]</sup>; (b) backpropagation wide field imaging optical path<sup>[66]</sup>

基于亚微米空间分辨率及与活体样品高度兼容的特点, MIP 显微镜在生物医学领域有重要应用优势。通过对脂质、蛋白质及核酸的选择性激发,光热成像已经实现对单个生命体<sup>[21]</sup>、组织<sup>[68-69]</sup>、细胞<sup>[70]</sup>乃至单个细菌<sup>[71-72]</sup>、病毒<sup>[73]</sup>的原位成像分析。 Zhang 等<sup>[21]</sup>首次利用 MIP 显微镜实现对未标记的活细胞的二维定量化学键成像,得到单个 PC-3 (prostate cancer cells) 活细胞中脂质的深度分辨图像,以及活体秀丽隐杆线虫 (*caenorhabditis elegans*) 中脂质的原位分布情况,如图 7(a)所示。同时,他们还进行了多光谱 MIP 成像来

定位活癌细胞中的药物分子,为了解癌细胞内脂质抑制的时空动态提供了直接证据。为进一步提高体内成像的灵敏度, Zhang 等<sup>[74]</sup>将干涉测量技术引入 MIP 显微成像技术,开发了键选瞬态相位成像技术。通过提取探测光透过样品的相移信息,键选瞬态相位成像技术提升了光热成像对低散射样品的探测极限,进而揭示了活体 3T3 细胞中脂质和核酸的分布,如图 7(c)所示。在这项工作中, MIP 显微成像同时揭示了样品的相位信息、化学信息和热力学信息,这些综合信息的获取及同步关联分析对全面认识生物样品特性具有重要

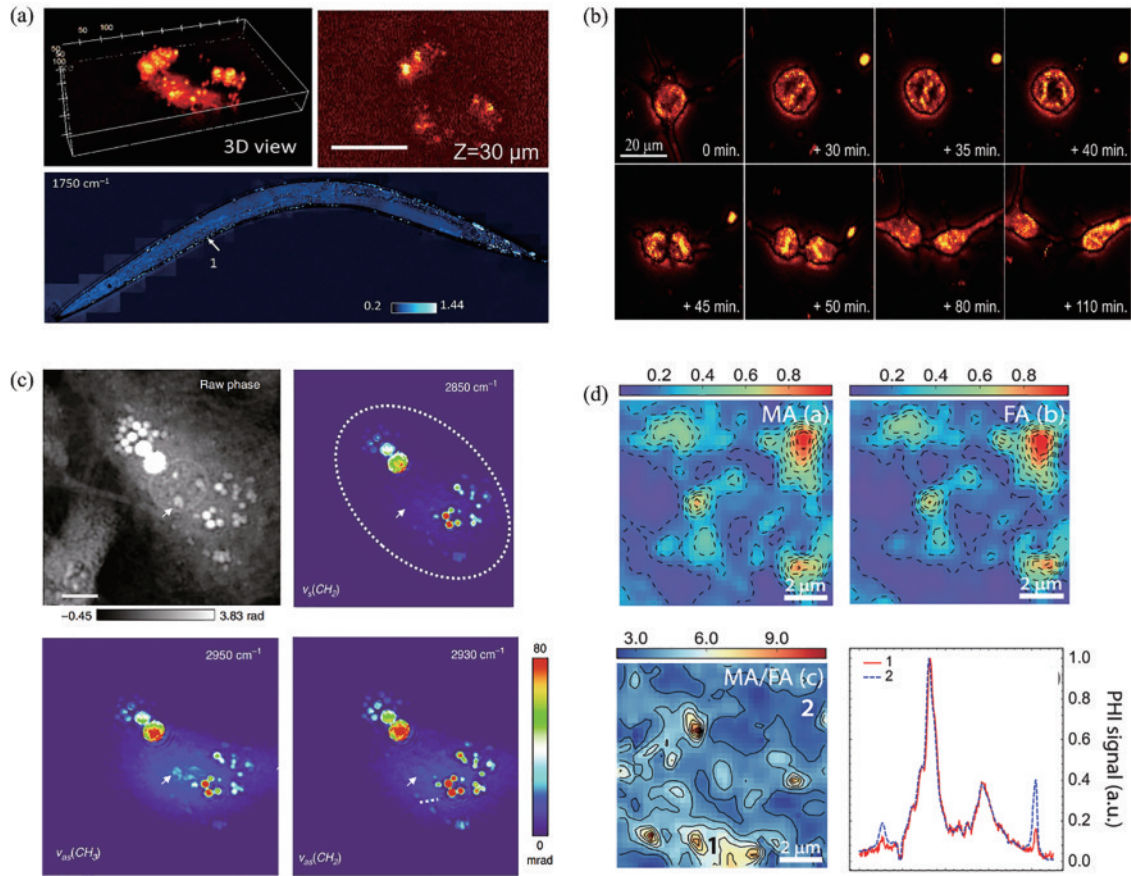


图7 中红外光热成像应用。(a)活细胞中脂质的三维光热成像和线虫中脂质的体内成像<sup>[21]</sup>；(b)通过选择性激发蛋白酰胺I得到的少突胶质细胞分裂中红外光热图像<sup>[23]</sup>；(c)活3T3细胞的原始相位图和光热相图，箭头位置表示核酸，虚线圈为红外照明区域<sup>[74]</sup>；(d)FA<sub>0.1</sub>MA<sub>0.9</sub>PbI<sub>3</sub>混合阳离子钙钛矿薄膜的阳离子分布的局部异质性<sup>[26]</sup>

Fig. 7 Applications of mid-infrared photothermal (MIP) imaging. (a) 3D MIP imaging of lipids in living cells and *in vivo* imaging of lipid in *C. elegans*<sup>[21]</sup>; (b) MIP imaging for recording cell division of oligodendrocytes by selective excitation of the protein amide I band<sup>[23]</sup>; (c) raw phase image and MIP images of living 3T3 cells, the arrow position indicates nucleic acids and the dashed circle is the IR illumination area<sup>[74]</sup>; (d) local heterogeneities in cation distributions of mixed cation FA<sub>0.1</sub>MA<sub>0.9</sub>PbI<sub>3</sub> perovskite films<sup>[26]</sup>

意义。Lim等<sup>[23]</sup>通过选择性激发蛋白酰胺I获取了光热信号，并在实时监测下揭示了少突胶质细胞的分裂过程，如图7(b)所示。该研究展示了中红外光热成像对细胞动力学长期无损伤监测的能力，证实了MIP技术在研究实时活细胞动力学与结构方面的潜力。此外，通过探测酰胺I和酰胺II在不同偏振光激发下的吸收差异，Mankar等<sup>[69]</sup>得到了胶原纤维取向分布光热图像，以此便利地识别了受损胶原纤维的分子尺度变化。另外，MIP显微镜不仅对蛋白质组分的探测非常灵敏，还在揭示蛋白质二级结构方面有独特的优势。Klementieva等<sup>[75]</sup>利用光热显微镜对神经元细胞中β-淀粉样蛋白的聚集进行研究，发现β-淀粉样蛋白多态性可能解释阿尔茨海默病中的异质现象，该工作或将为阿尔茨海默病的治疗提供新思路。总之，MIP显微镜能对生物体、组织、活细胞及细胞内的生物分子、药物分子进行化学定位研究，为组织疾病、细胞生长及代谢等生命活动提供新见解。

除生物样品外，MIP成像技术在无机和有机材料的原位测试方面也有较大潜力。例如，Chatterjee等<sup>[26]</sup>

通过光热成像揭示了FA<sub>0.1</sub>MA<sub>0.9</sub>PbI<sub>3</sub>混合阳离子钙钛矿膜的阳离子分布局部特异性的动力学特性，如图7(d)所示。对于卤化物钙钛矿材料，光热成像技术为进一步探究材料相分离和降解机理提供一种新的实验思路和可能性。此外，原位观察有机材料的化学键分布对合成过程的机理研究及器件的原位表征具有重要意义。

综上所述，MIP成像技术可以实现化学键分辨并且具有较高的空间分辨率，进而满足生物成像和材料分析的独特需求。其他广泛用于研究样品成分和形貌的技术包括PALM/STED、SRI、核磁共振(NMR)、质谱(MS)和光声成像(PAI)。接下来，将详细介绍MIP成像的探测极限和空间分辨率，并从这两方面比较技术的优缺点。

## 5 光热成像的检测极限

检测极限(limit of detection)，即在波动的背景噪声中可识别的信号，是衡量成像技术和光谱技术性能最重要的指标之一。比较了MIP成像技术、

PALM/STED、SRI、NMR、MS 和 PAI 几种技术的检测极限,如表 1 所示。其中,PALM/STED 成像技术的灵敏度最高,检测极限可达单分子水平;其次是 PAI,其检测极限为 pmol/L 数量级;SRI 的检测极限为 sub- $\mu\text{mol/L}$ ,SRI 技术的检测极限受限于光与样品

在中红外波段中的小作用截面( $\sim 10^{-30} \text{ cm}^2 \cdot \text{sr}^{-1}$ );目前已知的 MIP 成像的检测极限为  $10 \mu\text{mol/L}$ ,MIP 成像在中红外波段的吸收截面远大于拉曼截面( $\sim 10^{-22} \text{ cm}^2 \cdot \text{sr}^{-1}$ ),因此 MIP 的检测极限有很大的提升空间。

表 1 检测极限、空间分辨率及成分特异性的比较

Table 1 Comparison of limit of detection, spatial resolution, and specificity

Technology	Limit of detection	Spatial resolution	Specificity (Y/N)
MIP <sup>[21]</sup>	$10 \mu\text{mol/L}$	120–600 nm	Y
PALM <sup>[76]</sup> /STED <sup>[77]</sup>	single-molecule	15–40 nm	N
SRI <sup>[78]</sup>	sub- $\mu\text{mol/L}$	80–300 nm	Y
PAI <sup>[79–80]</sup>	pmol/L	$>1 \mu\text{m}$	Y
NMR <sup>[81]</sup>	$\sim \text{mmol/L}$	$10 \mu\text{m}–1 \text{ mm}$	Y
MS <sup>[82]</sup>	1 microgram of analyte per gram of tissue	$>1 \mu\text{m}$	Y

在接下来的讨论中将检测极限简化分析为信噪比(SNR)。光热成像的衬度来自于被成像样品的折射率的变化,在光路系统中的接收端可被观察的量为探测光束被散射后强度的变化。对于光热成像技术,信噪比可以通过如下几种路径得到改善。首先,增加折射率的变化可以增大信噪比,该路径可以通过增加样品与中红外激发光或探测光束的作用截面来实现。如图 8 所示,Pavlovetc 等<sup>[83]</sup>建立了理论模型来分析光热成像衬度机理,并通过实验证明了聚苯乙烯(PS)和

PMMA 微珠的检测极限与尺寸密切相关。该现象主要归因为背散射截面受样品尺寸的影响。此外,增加泵浦光束的峰值强度能够增加折射率的变化,在实验上用纳秒到飞秒级的泵浦激光器可实现<sup>[84–85]</sup>。其次,提高信噪比的另外一种路径是增加探测光束的功率。理论上,信噪比与探测光功率的平方根成正比<sup>[86]</sup>。Paiva 等<sup>[28]</sup>探究了氧化物微粒的 MIP 图像的信噪比与探测功率的关系,当功率为 0.07, 0.14, 0.22, 0.29, 0.37, 0.44, 0.51, 0.59, 0.66 nW 时,获得的 SNR 值分

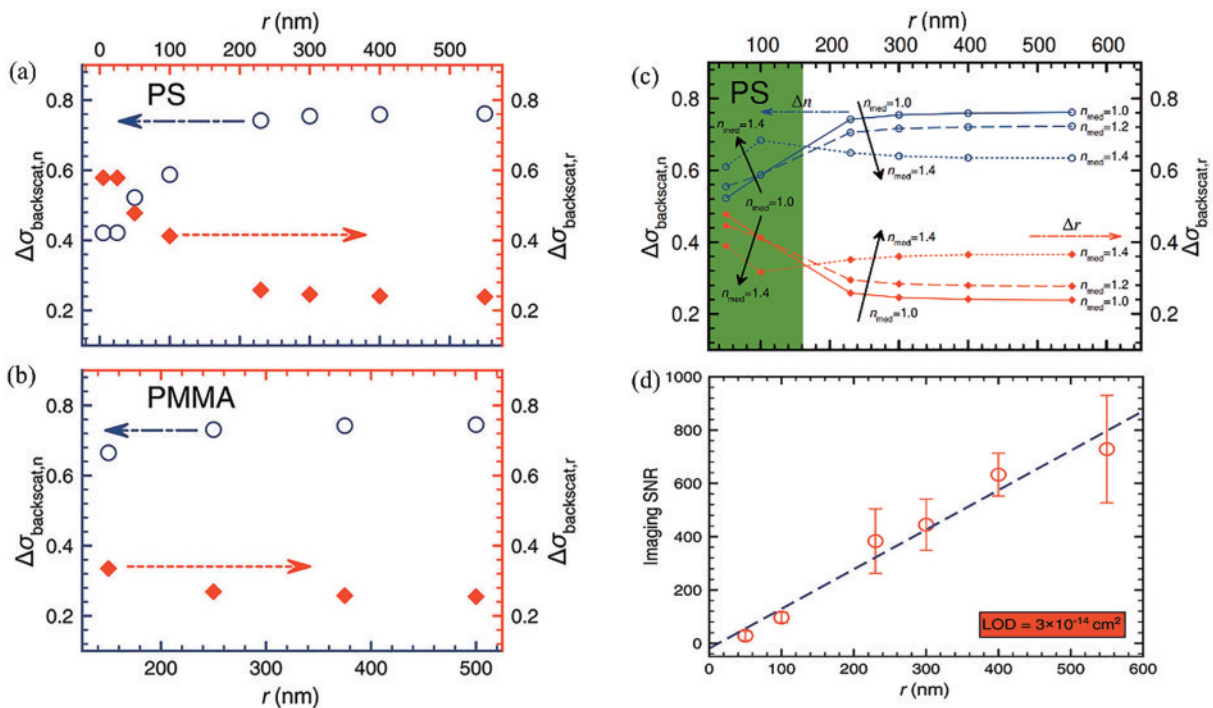


图 8 光热成像的衬度机理和检测极限<sup>[83]</sup>。(a)(b)  $\Delta\sigma_{\text{backscat},n}$  和  $\Delta\sigma_{\text{backscat},r}$  对 PS 和 PMMA 的总光热信号的贡献;(c) PS 微珠的  $\Delta\sigma_{\text{backscat},n}$  和  $\Delta\sigma_{\text{backscat},r}$  对信号的相对贡献随介质折射率变化而变化的情况;(d) 单个 PS 微珠的光热成像信噪比与微珠半径的关系

Fig. 8 Contrast mechanism and detection limits of photothermal imaging<sup>[83]</sup>. (a)(b)  $\Delta\sigma_{\text{backscat},n}$  and  $\Delta\sigma_{\text{backscat},r}$  contributions to the overall photothermal signal for PS and PMMA; (c) relative contributions of  $\Delta\sigma_{\text{backscat},n}$  and  $\Delta\sigma_{\text{backscat},r}$  to signal as a function of the refractive index of medium ( $n_{\text{med}}$ ) for PS; (d) SNR vs. radius ( $r$ ) from photothermal imaging measurements conducted on individual PS bead



别为 10.5, 17.1, 17.0, 19.9, 24.1, 24.8, 27.9, 32.0, 33.8, SNR 随探测功率的 $\sim 0.5$ 次方线性增长。再次, 采用更灵敏的探测方法, 如干涉法可使信噪比明显改善, 改进系统的检测极限。Zhang 等<sup>[65]</sup>利用干涉散射原理探测蛋白质的酰胺 I 和酰胺 II 带在中红外波段吸收引起的极弱的光热信号, 从而成功得到了单个痘病毒(poxviruses)的干涉光热图像, 信噪比高达 35, 并通过酰胺 I 和酰胺 II 峰的强度比, 成功区分痘病毒和水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis viruses)。最后, 成像介质的折射率会间接影响光热成像信噪比, 因为样品的吸收截面和背散射截面与周围环境的折射率密切相关。Pavlovetc 等<sup>[83]</sup>的工作表明了光热成像信噪比的决定因素之一是样品折射率改变导致的背散射截面变化  $\Delta\sigma_{\text{backscat},n}$  和样品尺寸变化导致的背散射截面变化  $\Delta\sigma_{\text{backscat},r}$  之间的竞争贡献。而  $\Delta\sigma_{\text{backscat},n}$  和  $\Delta\sigma_{\text{backscat},r}$  的相对差值受介质的折射率的影响, 如图 8(c) 所示, 当 PS 微珠的尺寸小于 160 nm 时, 光热成像的信噪比随着介质的折射率变大而增加, 相反, 对于大尺寸样品, 高折射率的介质会降低信噪比。

## 6 光热成像的空间分辨率

在表 1 中, 同时也比较了 MIP 成像技术、PALM/STED、SRI、NMR、MS 和 PAI 等常用成像和光谱技术的空间分辨率。在这些技术中, PALM/STED、SRI 和 MIP 成像都是使用可见光作为探测光的, 因而在使用类似的探测光路和光源的情况下可以有效比较不同技术的空间分辨率。通常来说, 光学成像的空间分辨率受探测光的阿贝衍射极限制约。如表 1 所示, MIP 成像和 SRI 的空间分辨率都接近可见光的阿贝衍射极限, 并

且利用高分辨成像技术, 能得到突破衍射极限的空间分辨率。

对于 MIP 成像, 空间分辨率受探测光的阿贝衍射极限和样品热扩散两个因素制约。现有研究常用如下几种方法提高阿贝衍射极限内的空间分辨率。首先, 可以使用较短波长的探测光以达到更低的衍射极限<sup>[87]</sup>。其次, 通过使用大数值孔径的物镜, 可以得到更小的探测光斑, 从而提高空间分辨率。在 MIP 成像系统中, 通过构建反向传播光束路径, 可以实现该方法。早期 MIP 成像光路系统中可见光探测光和中红外激发光沿相同路径和方向传播至物镜, 因此只能用反射式物镜, 因为红外光在折射式物镜中会发生严重的色差和损耗。但是, 反射式物镜的数值孔径最大只能达到 0.8, 严重限制了空间分辨率。而在反向传播光路中, 可独立在探测光路中采用数值孔径更大的折射式物镜(最高  $NA=1.45$ )来聚焦可见光, 从而提高分辨率。如图 9(a) 所示, Li 等<sup>[14]</sup>通过搭建反向传播光路并使用波长为 532 nm 的探测光和油浸式折射物镜( $NA=1.2$ ), 将 MIP 成像空间分辨率提升至 300 nm。同时, 可以利用图像处理算法来进一步提高空间分辨率。如图 9(b) 所示, Kuno 团队<sup>[15]</sup>使用深度学习卷积神经网络来实现对图像反卷积、去模糊和去噪的迭代后处理, 解决了阿贝衍射极限以及实验光栅扫描引入的背景伪影, 成功将 MIP 的分辨率提高到 150 nm。最近, Fu 等<sup>[16]</sup>通过捕捉样品中心与边缘间不同热弛豫过程的高频差异, 将分子热弛豫特性与空间位置信息相联系, 对特定的分子进行定位, 获得了 120 nm 的超分辨光热成像。表 2 总结了影响光热成像技术空间分辨率的关键参数, 包括可见光/红外光物镜、探测光波长、中红外光源及基底。

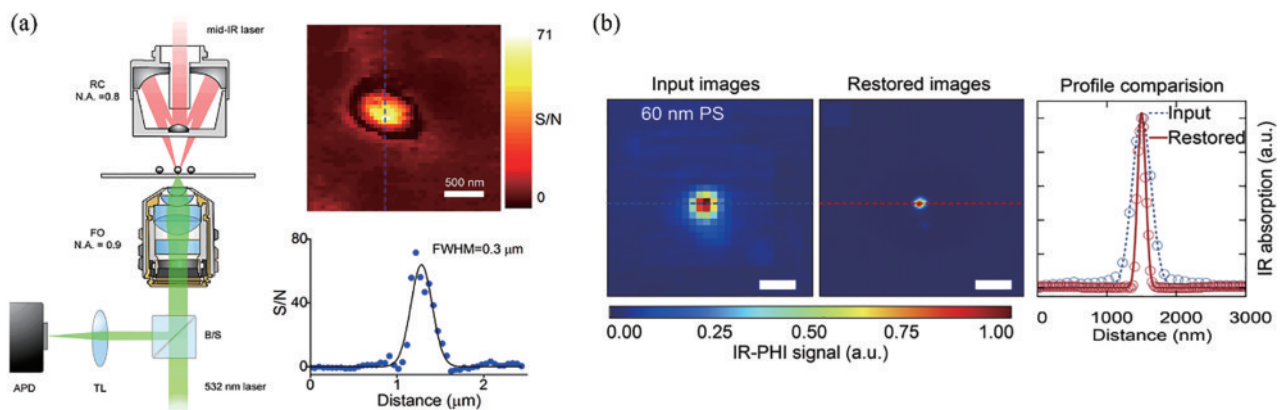


图 9 提高光热成像分辨率的典型方法。(a) 利用反向传播构型提高分辨率, 右上是单个直径为 0.1  $\mu\text{m}$  的 PS 小球的中红外光热图像, 右下是相应截面强度的半峰全宽, 为 0.3  $\mu\text{m}$ <sup>[14]</sup>; (b) 利用深度学习卷积神经网络提高分辨率<sup>[15]</sup>, 单个直径为 0.3  $\mu\text{m}$  的 PS 小球经过图像处理(左)前、(中)后的光热图像及(右)相应高斯拟合的截面强度, 标尺为 500 nm

Fig. 9 Typical approaches to improve the spatial resolution of MIP imaging. (a) Resolution improved by counter-propagating configuration<sup>[14]</sup>, upper right is the MIP image of a 0.1- $\mu\text{m}$  diameter PS bead and lower right is the corresponding line profile showing a full width at half-maximum (FWHM) of 0.3  $\mu\text{m}$ <sup>[14]</sup>; (b) resolution improved by deep learning convolutional neural network<sup>[15]</sup>, images of individual 0.3- $\mu\text{m}$  diameter PS (left) before and (middle) after processing, and (right) corresponding cross section strength of Gaussian fitting, scale bar is 500 nm

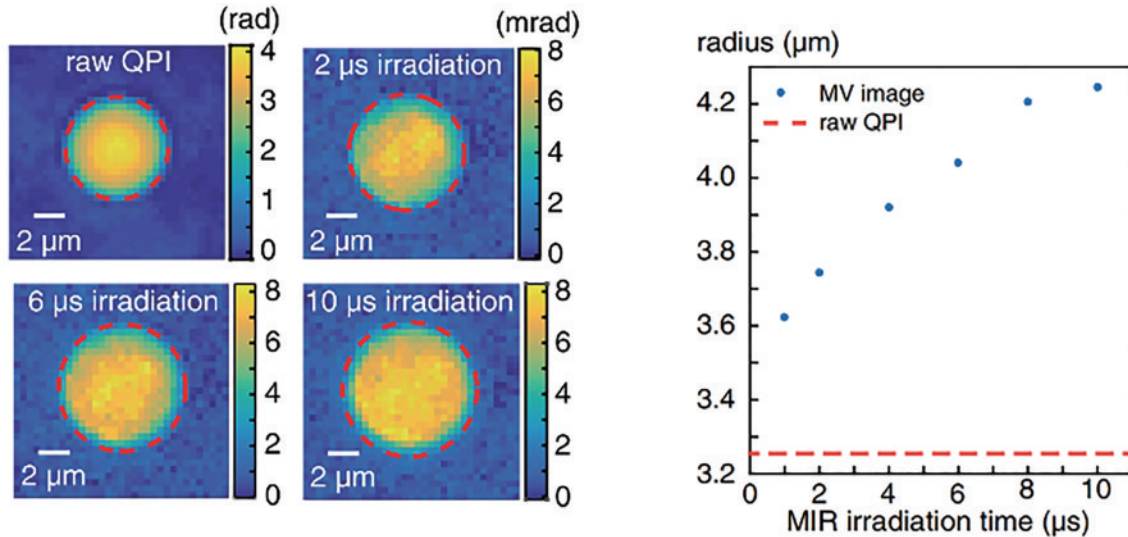
表 2 光热成像系统影响空间分辨率的关键参数

Table 2 Key parameters influencing the spatial resolution of the MIP imaging system

Year	Spatial resolution / $\mu\text{m}$	Visible/IR objective	Probe wavelength /nm	IR source	Medium / Substrate
2009 <sup>[63]</sup>	1.1	0.5 NA reflective	780	Nd:vanadate laser	Water/CaF <sub>2</sub>
2016 <sup>[21]</sup>	0.6	0.65 NA reflective	785	QCL	-/CaF <sub>2</sub>
2017 <sup>[14]</sup>	0.3	1.2 NA refractive/0.65 NA reflective	530	OPO	air/glass
2021 <sup>[15]</sup>	0.15	0.95 NA refractive/0.65 NA reflective	532	OPO	air/CaF <sub>2</sub>
2023 <sup>[16]</sup>	0.12	1.2 NA refractive/0.5 NA reflective	405	QCL	air/CaF <sub>2</sub>

除了阿贝衍射极限外,控制热扩散也能显著提高空间分辨率。热扩散的性能可以用热扩散长度( $L$ )表示, $L=2\sqrt{\alpha t}$ ,其中 $\alpha=\frac{\kappa}{\rho C_p}$ 为热扩散系数, $\kappa$ 为导热系数, $\rho$ 为密度, $C_p$ 为比热容, $t$ 为加热时间。如图 10 所示,中红外激发光照射时间过长会导致严重热扩散,介质的热扩散会产生热背景,进而使空间分辨率明显下降<sup>[67]</sup>。为避免过热降低成像质量,选择的脉冲宽度应

该满足介质的热扩散长度小于成像系统分辨极限的要求,一般为几百纳秒。同时通过使用高功率和短脉冲时间的激发光可以改善介质热扩散影响。在讨论光热效应部分提到,用飞秒脉冲激发的样品的瞬时温度衰减曲线更加局域化( $\sim 1/r^3$ ),因此在能获得光热信号的前提下,减少单次脉冲时间,可以避免集热效应<sup>[88]</sup>从而进一步增加成像的分辨率。

图 10 热扩散导致分辨率下降的分析<sup>[67]</sup>Fig. 10 Degradation of spatial resolution due to the heat diffusion effect<sup>[67]</sup>

以上对 MIP 成像的空间分辨率分析主要是基于横向分辨率讨论的,而 MIP 成像技术也具有深度分辨的能力,阿贝衍射极限和热扩散同时也会影响光热成像的轴向分辨率。提升轴向分辨率也是提高 MIP 成像空间分辨率的重要环节。Zhang 等<sup>[21]</sup>以共聚焦扫描的方式首次实现了以红外光谱作为成像衬度来演示活细胞三维成像的过程,并实现 3.5  $\mu\text{m}$  的轴向分辨率和近 50  $\mu\text{m}$  的成像深度。通过在定量相位显微镜下测量中红外光热效应,Cheng 团队<sup>[64]</sup>使用强度断层衍射(IDT)实现对秀丽隐杆线虫的三维成像,得到 1.1  $\mu\text{m}$  的轴向分辨率和 0.35  $\mu\text{m}$  的横向分辨率,在此宽场成像模式下,MIP 三维成像也可以实现微米级成像深度。

此外,光热成像可以借鉴高分辨荧光成像的思路可能进一步提高其空间分辨率。例如表 1 中的 PALM

技术,通过结合统计分析方法随机激活观察对象<sup>[89-90]</sup>,精确定位单分子的离散位置信息实现高分辨;STED 显微成像技术,利用结构性的光调制实现高分辨成像<sup>[91-92]</sup>。

## 7 总结与展望

对于生物成像技术,原位的化学键特异性成像具有革命性意义,是业界普遍追求的目标。由于中红外波段具有化学键的指纹信息,中红外光谱及显微成像技术是实现该目标可行的途径。目前,由于中红外光源、探测器、光学元件和样品作用截面等诸多因素的限制,中红外测量的灵敏度往往较低,成像效果远不如可见光。实现生物体内化学键特异性成像必需改善上述因素。在光热成像的发展中,对光路的优化、对光学元

件的改善、对使用光源的改进已经大大地提升了光热成像技术的性能。由于衍射极限和热扩散,进一步利用先进的图像处理算法可以更大程度上提高空间分辨率。此外,微纳光子学技术可以增大红外激发光束、可见光探测光束与样品的作用截面<sup>[93-94]</sup>。微纳光子学技术中的超表面也能进一步提升传统光学元件的透射率<sup>[95]</sup>、数值孔径<sup>[96]</sup>及工作频谱范围<sup>[97]</sup>等光学性能。现有的远场光学成像技术中,高分辨荧光技术具有最高的空间分辨率,突破了衍射极限。而高分辨荧光技术提高分辨率的核心是通过成像技术与统计学方法相结合精确定位单分子或结构光调制减小点扩散函数。对于 MIP 显微成像,动态可调控的超表面衬底或许可以为光热成像突破衍射极限开辟新的思路。

### 参 考 文 献

- [1] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy[J]. *Optics Letters*, 1994, 19(11): 780-782.
- [2] Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 198(2): 82-87.
- [3] 高露, 高贝贝, 王富. 超分辨显微成像技术在活体大脑成像中的应用[J]. *中国激光*, 2022, 49(20): 2007301.  
Gao L, Gao B B, Wang F. Applications of super-resolution microscopy techniques in living brain imaging [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(20): 2007301.
- [4] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [5] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-796.
- [6] Sigal Y M, Zhou R B, Zhuang X W. Visualizing and discovering cellular structures with super-resolution microscopy[J]. *Science*, 2018, 361(6405): 880-887.
- [7] Cialla-May D, Krafft C, Rösch P, et al. Raman spectroscopy and imaging in bioanalytics[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(1): 86-119.
- [8] Gong L, Wang H F. Breaking the diffraction limit by saturation in stimulated-Raman-scattering microscopy: a theoretical study[J]. *Physical Review A*, 2014, 90(1): 013818.
- [9] Yonemaru Y, Palonpon A F, Kawano S, et al. Super-spatial- and-spectral-resolution in vibrational imaging via saturated coherent anti-stokes Raman scattering[J]. *Physical Review Applied*, 2015, 4(1): 014010.
- [10] Watanabe K, Palonpon A F, Smith N I, et al. Structured line illumination Raman microscopy[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 10095.
- [11] Qian C X, Miao K, Lin L E, et al. Super-resolution label-free volumetric vibrational imaging[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 3648.
- [12] Cançado L G, Jorio A, Pimenta M A. Measuring the absolute Raman cross section of nanographites as a function of laser energy and crystallite size[J]. *Physical Review B*, 2007, 76(6): 064304.
- [13] Bohren C F, Huffman D R. Absorption and scattering of light by small particles[M]. New York: Wiley, 1998.
- [14] Li Z M, Aleshire K, Kuno M, et al. Super-resolution far-field infrared imaging by photothermal heterodyne imaging[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2017, 121(37): 8838-8846.
- [15] Zhang S A, Kniazev K, Pavlovets I M, et al. Deep image restoration for infrared photothermal heterodyne imaging[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 2021, 155(21): 214202.
- [16] Fu P C, Cao W L, Chen T R, et al. Super-resolution imaging of non-fluorescent molecules by photothermal relaxation localization microscopy[J]. *Nature Photonics*, 2023, 17(4): 330-337.
- [17] Hosseinae Z, Le M, Bell K, et al. Towards non-contact photoacoustic imaging[J]. *Photoacoustics*, 2020, 20: 100207.
- [18] Goy A S, Fleischer J W. Resolution enhancement in nonlinear photoacoustic imaging[J]. *Applied Physics Letters*, 2015, 107(21): 211102.
- [19] Tamamitsu M, Toda K, Shimada H, et al. Label-free biochemical quantitative phase imaging with mid-infrared photothermal effect[J]. *Optica*, 2020, 7(4): 359-366.
- [20] Jia D C, Zhang Y, Yang Q W, et al. 3D chemical imaging by fluorescence-detected mid-infrared photothermal Fourier light field microscopy[J]. *Chemical & Biomedical Imaging*, 2023: 3c00022.
- [21] 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.
- [22] Yin J Z, Lan L, Zhang Y, et al. Nanosecond-resolution photothermal dynamic imaging via MHz digitization and match filtering[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 7097.
- [23] 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.
- [24] Li C, Zhang D L, Slipchenko M N, et al. Mid-infrared photothermal imaging of active pharmaceutical ingredients at submicrometer spatial resolution[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(9): 4863-4867.
- [25] Banas A, Banas K, Lo M K F, et al. Detection of high-explosive materials within fingerprints by means of optical-photothermal infrared spectromicroscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(14): 9649-9657.
- [26] Chatterjee R, Pavlovets I M, Aleshire K, et al. Subdiffraction infrared imaging of mixed cation perovskites: probing local cation heterogeneities[J]. *ACS Energy Letters*, 2018, 3(2): 469-475.
- [27] Su Y, Hu X, Tang H J, et al. Steam disinfection

- releases micro (nano) plastics from silicone-rubber baby teats as examined by optical photothermal infrared microspectroscopy[J]. *Nature Nanotechnology*, 2022, 17(1): 76-85.
- [28] Paiva E M, Schmidt F M. Ultrafast widefield mid-infrared photothermal heterodyne imaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(41): 14242-14250.
- [29] Toda K, Tamamitsu M, Nagashima Y, et al. Molecular contrast on phase-contrast microscope[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 9957.
- [30] Li X J, Zhang D L, Bai Y R, et al. Fingerprinting a living cell by Raman integrated mid-infrared photothermal microscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(16): 10750-10756.
- [31] Berciaud S, Cagnet L, Blab G A, et al. Photothermal heterodyne imaging of individual nonfluorescent nanoclusters and nanocrystals[J]. *Physical Review Letters*, 2004, 93(25): 257402.
- [32] Gaiduk A, Yorulmaz M, Ruijgrok P V, et al. Room-temperature detection of a single molecule's absorption by photothermal contrast[J]. *Science*, 2010, 330(6002): 353-356.
- [33] Tomimatsu T, Miyazaki J, Kano Y, et al. Photothermal imaging of skeletal muscle mitochondria[J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 8(6): 2965-2975.
- [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] Xia Q, Yin J Z, Guo Z Y, et al. Mid-infrared photothermal microscopy: principle, instrumentation, and applications[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2022, 126(43): 8597-8613.
- [36] Bai Y R, Yin J Z, Cheng J X. Bond-selective imaging by optically sensing the mid-infrared photothermal effect[J]. *Science Advances*, 2021, 7(20): eabg1559.
- [37] Pavlovets I M, Aleshire K, Hartland G V, et al. Approaches to mid-infrared, super-resolution imaging and spectroscopy[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2020, 22(8): 4313-4325.
- [38] Govorov A O, Zhang W, Skeini T, et al. Gold nanoparticle ensembles as heaters and actuators: melting and collective plasmon resonances[J]. *Nanoscale Research Letters*, 2006, 1(1): 84.
- [39] Chen X, Chen Y T, Yan M, et al. Nanosecond photothermal effects in plasmonic nanostructures[J]. *ACS Nano*, 2012, 6(3): 2550-2557.
- [40] Kim K J, King W P. Thermal conduction between a heated microcantilever and a surrounding air environment[J]. *Applied Thermal Engineering*, 2009, 29(8/9): 1631-1641.
- [41] Richardson H H, Carlson M T, Tandler P J, et al. Experimental and theoretical studies of light-to-heat conversion and collective heating effects in metal nanoparticle solutions[J]. *Nano Letters*, 2009, 9(3): 1139-1146.
- [42] Govorov A O, Richardson H H. Generating heat with metal nanoparticles[J]. *Nano Today*, 2007, 2(1): 30-38.
- [43] Baffou G, Quidant R, Girard C. Thermoplasmonics modeling: a Green's function approach[J]. *Physical Review B*, 2010, 82(16): 165424.
- [44] Baffou G, Quidant R, Garcia de Abajo F J. Nanoscale control of optical heating in complex plasmonic systems[J]. *ACS Nano*, 2010, 4(2): 709-716.
- [45] Selmke M, Braun M, Cichos F. Photothermal single-particle microscopy: detection of a nanolens[J]. *ACS Nano*, 2012, 6(3): 2741-2749.
- [46] Bauld R, Choi D Y W, Bazylewski P, et al. Thermo-optical characterization and thermal properties of graphene-polymer composites: a review[J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2018, 6(12): 2901-2914.
- [47] Zhang Z Y, Zhao P, Lin P, et al. Thermo-optic coefficients of polymers for optical waveguide applications[J]. *Polymer*, 2006, 47(14): 4893-4896.
- [48] Tokeshi M, Uchida M, Hibara A, et al. Determination of suboctomole amounts of nonfluorescent molecules using a thermal lens microscope: subsingle-molecule determination[J]. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(9): 2112-2116.
- [49] Zharov V P, Lapotko D O. Photothermal imaging of nanoparticles and cells[J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2005, 11(4): 733-751.
- [50] Sullenberger R M, Redmond S M, Crompton D, et al. Spatially-resolved individual particle spectroscopy using photothermal modulation of Mie scattering[J]. *Optics Letters*, 2017, 42(2): 203-206.
- [51] 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.
- [52] Cagnet L, Berciaud S, Lasne D, et al. Photothermal methods for single nonluminescent nano-objects[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(7): 2288-2294.
- [53] Kim J D, Kim D U, Jeong C B, et al. Wide-field photothermal reflectance spectroscopy for single nanoparticle absorption spectrum analysis[J]. *Nanophotonics*, 2021, 10(13): 3433-3440.
- [54] Boccara A C, Fournier D, Badoz J. Thermo-optical spectroscopy: detection by the "mirage effect" [J]. *Applied Physics Letters*, 1980, 36(2): 130-132.
- [55] Fournier D, Lepoutre F, Boccara A C. Tomographic approach for photothermal imaging using the mirage effect [J]. *Le Journal De Physique Colloques*, 1983, 44(C6): C6-479.
- [56] Boyer D, Tamarat P, Maali A, et al. Photothermal imaging of nanometer-sized metal particles among scatterers[J]. *Science*, 2002, 297(5584): 1160-1163.
- [57] Cagnet L, Tardin C, Boyer D, et al. Single metallic nanoparticle imaging for protein detection in cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(20): 11350-11355.
- [58] Vobornik D, Margaritondo G, Sanghera J S, et al. Spectroscopic infrared scanning near-field optical microscopy (IR-SNOM) [J]. *Journal of Alloys and Compounds*, 2005, 401(1/2): 80-85.

- [59] Huth F, Govyadinov A, Amarie S, et al. Nano-FTIR absorption spectroscopy of molecular fingerprints at 20 nm spatial resolution[J]. *Nano Letters*, 2012, 12(8): 3973-3978.
- [60] Smith A D, Siggel-King M R F, Holder G M, et al. Near-field optical microscopy with an infra-red free electron laser applied to cancer diagnosis[J]. *Applied Physics Letters*, 2013, 102(5): 053701.
- [61] Lu F, Jin M Z, Belkin M A. Tip-enhanced infrared nanospectroscopy via molecular expansion force detection [J]. *Nature Photonics*, 2014, 8(4): 307-312.
- [62] Dazzi A, Prater C B. AFM-IR: technology and applications in nanoscale infrared spectroscopy and chemical imaging[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(7): 5146-5173.
- [63] Lee E S, Lee J Y. Nonlinear optical infrared microscopy with chemical specificity[J]. *Applied Physics Letters*, 2009, 94(26): 261101.
- [64] Zhao J A, Matlock A, Zhu H B, et al. Bond-selective intensity diffraction tomography[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 7767.
- [65] 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.
- [66] Bai Y R, Zhang D L, Lan L, et al. Ultrafast chemical imaging by widefield photothermal sensing of infrared absorption[J]. *Science Advances*, 2019, 5(7): eaav7127.
- [67] Tamamitsu M, Toda K, Horisaki R, et al. Quantitative phase imaging with molecular vibrational sensitivity[J]. *Optics Letters*, 2019, 44(15): 3729-3732.
- [68] Schnell M, Mittal S, Falahkheirhah K, et al. All-digital histopathology by infrared-optical hybrid microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(7): 3388-3396.
- [69] Mankar R, Gajjela C C, Bueso-Ramos C E, et al. Polarization sensitive photothermal mid-infrared spectroscopic imaging of human bone marrow tissue[J]. *Applied Spectroscopy*, 2022, 76(4): 508-518.
- [70] Bai Y R, Guo Z Y, Pereira F C, et al. Mid-infrared photothermal-fluorescence *in situ* hybridization for functional analysis and genetic identification of single cells [J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(4): 2398-2405.
- [71] Zhang Y, Zong H N, Zong C, et al. Fluorescence-detected mid-infrared photothermal microscopy[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(30): 11490-11499.
- [72] Guo Z Y, Bai Y R, Zhang M, et al. High-throughput antimicrobial susceptibility testing of *Escherichia coli* by wide-field mid-infrared photothermal imaging of protein synthesis[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(4): 2238-2244.
- [73] Xia Q, Guo Z Y, Zong H N, et al. Single virus fingerprinting by widefield interferometric defocus-enhanced mid-infrared photothermal microscopy[EB/OL]. (2022-12-20)[2023-02-05]. <https://arxiv.org/abs/2212.10521>.
- [74] Zhang D L, Lan L, Bai Y R, et al. Bond-selective transient phase imaging via sensing of the infrared photothermal effect[J]. *Light: Science & Applications*, 2019, 8: 116.
- [75] Klementieva O, Sandt C, Martinsson I, et al. Super-resolution infrared imaging of polymorphic amyloid aggregates directly in neurons[J]. *Advanced Science*, 2020, 7(6): 1903004.
- [76] Sengupta P, van Engelenburg S B, Lippincott-Schwartz J. Superresolution imaging of biological systems using photoactivated localization microscopy[J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(6): 3189-3202.
- [77] Blom H, Widengren J. Stimulated emission depletion microscopy[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(11): 7377-7427.
- [78] Hu F H, Shi L X, Min W. Biological imaging of chemical bonds by stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(9): 830-842.
- [79] Yao J J, Wang L V. Sensitivity of photoacoustic microscopy[J]. *Photoacoustics*, 2014, 2(2): 87-101.
- [80] 穆书奇, 董大山, 施可彬. 无标记光学成像技术[J]. *激光与光电子学进展*, 2022, 59(12): 1200001.
- Mu S Q, Dong D S, Shi K B. Label-free optical imaging technology[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(12): 1200001.
- [81] Kaneko G, Ushio H, Ji H. Application of magnetic resonance technologies in aquatic biology and seafood science[J]. *Fisheries Science*, 2019, 85(1): 1-17.
- [82] Buchberger A R, DeLaney K, Johnson J, et al. Mass spectrometry imaging: a review of emerging advancements and future insights[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(1): 240-265.
- [83] Pavlovets I M, Podshivaylov E A, Chatterjee R, et al. Infrared photothermal heterodyne imaging: contrast mechanism and detection limits[J]. *Journal of Applied Physics*, 2020, 127(16): 165101.
- [84] Lee E S, Lee J Y. High resolution cellular imaging with nonlinear optical infrared microscopy[J]. *Optics Express*, 2011, 19(2): 1378-1384.
- [85] Kansiz M, Dowling L M, Yousef I, et al. Optical photothermal infrared microspectroscopy discriminates for the first time different types of lung cells on histopathology glass slides[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(32): 11081-11088.
- [86] Gaiduk A, Ruijgrok P V, Yorulmaz M, et al. Detection limits in photothermal microscopy[J]. *Chemical Science*, 2010, 1(3): 343-350.
- [87] Born M A X, Wolf E. Preface to the first edition[M]// Born M A X, Wolf E. *Principles of Optics*. 6th ed. Oxford: Pergamon, 1980: v-viii.
- [88] Baffou G, Berto P, Bermúdez Ureña E, et al. Photoinduced heating of nanoparticle arrays[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(8): 6478-6488.
- [89] Bates M, Dempsey G T, Chen K H, et al. Multicolor super-resolution fluorescence imaging via multi-parameter fluorophore detection[J]. *ChemPhysChem*, 2012, 13(1): 99-107.
- [90] Dai S Y, Yang D. A visible and near-infrared light

- activatable diazocoumarin probe for fluorogenic protein labeling in living cells[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(40): 17156-17166.
- [91] Zhao Y F, Du J, Zhang J R, et al. Generating structured light with phase helix and intensity helix using reflection-enhanced plasmonic metasurface at 2  $\mu\text{m}$ [J]. *Applied Physics Letters*, 2018, 112(17): 171103.
- [92] Yang Y M, Wang W Y, Moitra P, et al. Dielectric meta-reflectarray for broadband linear polarization conversion and optical vortex generation[J]. *Nano Letters*, 2014, 14(3): 1394-1399.
- [93] Li M L, Bai P, Yan C, et al. Mid-infrared silicon metasurfaces for near-field enhancement of molecular fingerprints[J]. *Optics Letters*, 2023, 48(6): 1502-1505.
- [94] Yavas O, Svedendahl M, Dobosz P, et al. On-a-chip biosensing based on all-dielectric nanoresonators[J]. *Nano Letters*, 2017, 17(7): 4421-4426.
- [95] Yu Y F, Zhu A Y, Paniagua-Domínguez R, et al. High-transmission dielectric metasurface with  $2\pi$  phase control at visible wavelengths[J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2015, 9(4): 412-418.
- [96] Arbabi A, Horie Y, Ball A J, et al. Subwavelength-thick lenses with high numerical apertures and large efficiency based on high-contrast transmitarrays[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7069.
- [97] Colburn S, Zhan A L, Majumdar A. Metasurface optics for full-color computational imaging[J]. *Science Advances*, 2018, 4(2): eaar2114.