

超分辨光学显微成像的新武器 ——镧系离子掺杂上转换纳米荧光探针(特邀)

李子琦¹, 钟晓岚^{1*}, 陈朝浩², 王帆^{1**}

¹北京航空航天大学物理学院, 北京 100191;

²澳大利亚国立大学物理学院电子材料工程研究室, 澳大利亚 堪培拉 2601

摘要 超分辨荧光成像技术因其能够突破光学衍射极限的限制,为生命科学研究带来全新的观察尺度而获得了诺贝尔化学奖。但是,传统的超分辨荧光显微镜需要极为复杂的光学系统来突破衍射极限,通常伴随着明显的光毒性和低时间分辨率,昂贵的造价以及日益复杂的操作限制了其在生物医学领域中的推广应用。因此,全球各大研究团队都在积极寻求具有近红外、高亮度和抗光漂白的替代荧光探针,并通过改善成像装置与算法,进一步拓展超分辨显微技术的应用范围。稀土元素纳米材料由于其独特而优异的物理化学特性,如显著的反斯托克斯光谱位移、无背景噪声、抗光漂白、光稳定性、低毒性和高成像穿透能力等,持续受到化学、物理学和材料学领域的广泛关注,是近期兴起的一种稳定性优异的无机荧光探针。本文首先简要介绍了上转换纳米颗粒的发光机制,然后讨论了纳米结构材料中实现光子上转换的主要限制。此外还介绍了镧系元素掺杂上转换纳米粒子在超分辨生物成像、分子检测等领域的应用,以及介绍了包括降低激光功率要求和耦合技术难度、提高激光直扫成像分辨率与速度、提高多路复用成像效率等应用技术优势。最后重点介绍了颗粒合成方面的主要挑战、可行的改进措施以及对未来发展的展望,为稀土纳米材料在生命科学成像领域的推广应用提供有力的理论基础与技术支持。

关键词 荧光显微; 超分辨成像; 上转换纳米颗粒; 镧系离子掺杂

中图分类号 TH742

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP240659

A New Weapon For Super-Resolution Imaging: Lanthanide Ion Doped Upconversion Nanoparticles (Invited)

Li Ziqi¹, Zhong Xiaolan^{1*}, Chen Chaohao², Wang Fan^{1**}

¹School of Physics, Beihang University, Beijing 100191, China;

²Department of Electronic Materials Engineering Research, School of Physics, The Australian National University, Canberra 2601, Australian

Abstract Optical super-resolution imaging technology, acknowledged by the Nobel Prize in Chemistry for transcending optical diffraction limits, has revolutionised life science research with its groundbreaking observation scale. However, conventional super-resolution fluorescence microscopes face challenges, requiring intricate optical systems that often result in significant phototoxicity and low temporal resolution, limiting their widespread use in biomedical research. Therefore, research teams actively seek alternative fluorescent probes with near-infrared capabilities, high brightness, and resistance to photobleaching, aiming to extend the application of super-resolution microscopy in biomedical research. Rare-earth nanomaterials, renowned for their exceptional physicochemical properties such as anti-Stokes spectral shift, lack of background noise, resistance to photobleaching, photostability, low toxicity, and high imaging penetration, have emerged as stable and superior inorganic fluorescent probes. This review paper provides a brief overview of the luminescent mechanism of upconversion nanoparticles, exploring the primary constraints in achieving photon upconversion in nanostructured materials. Additionally, it highlights the applications and advantages of lanthanide-doped upconversion nanoparticles in super-resolution biological imaging, molecular detection, and other domains. These advantages encompass reducing laser power requirements, addressing technical challenges in coupling, improving laser scanning

收稿日期: 2024-01-04; 修回日期: 2024-02-13; 录用日期: 2024-02-19; 网络首发日期: 2024-02-20

基金项目: 国家自然科学基金(62275010,U23A20481,62075004)、北京市自然科学基金(1232027)

通信作者: *zhongxl@buaa.edu.cn; **fanwang@buaa.edu.cn

imaging resolution and speed, and enhancing multiplexing imaging efficiency. This paper concludes by emphasizing significant challenges in particle synthesis, proposing feasible improvement measures, and outlining prospects for future development. It establishes a robust theoretical foundation and provides technical support for the widespread integration of rare-earth nanomaterials in the field of life imaging sciences.

Key words fluorescence microscopy; super-resolution imaging; upconversion nanoparticles; lanthanide ion doping

1 引言

荧光超分辨显微成像让观察纳米尺度的荧光体结构变化与动态追踪成为了可能。这些荧光体不仅包括生物样品更包括了纳米颗粒,甚至玻色子例如激子。在过去的 20 年间,多种超分辨技术已被开发和实现,其中包含受激发射损耗荧光显微镜(stimulated emission depletion)、随机光学重建显微镜(stochastic optical reconstruction microscopy)、结构光照明显微镜(structured illumination microscopy)、光学波动成像显微镜(super-resolution optical fluctuation imaging)等技术。这些技术基本以“更清晰、更快、成像深度更深、观察更久、通量更大”为目标。但是每一种技术都有其局限性,并不能达到所有需要的目标,这在一定程度上制约了超分辨成像技术的发展和在诸多领域的应用。在开发成像技术的同时,开发超分辨成像的探针也是一个非常重要的方向,因为一种超分辨技术的开发往往是围绕纳米探针的独特性质实现的。特殊的超分辨荧光探针不仅可以利用光开关和光调制来增强成像分辨率、利用工作波长来实现更深的穿透深度,同时它还可以提供更强大的新能力。这种新能力不仅可以提供复用成像的新维度,实现不需要激发光源的化学结合成像,还可以实现温度成像、应力成像与空间成像相结合的多模态成像,这为生物研究提供了独一无二的工具。如果说不同的超分辨成像技术就是不同的“武功心法”的话,那么荧光探针就是“神兵利刃”,能够辅助其到达成像的巅峰。本文将介绍一柄超分辨成像的“绝世好剑”——上转换纳米颗粒。

2 上转换纳米颗粒

作为一种反斯托克斯发射的非线性光学现象,光子上转换是指吸收两个或多个低能光子继而发射出一个高能光子的现象。这一概念最初是由荷兰裔美国物理学家尼古拉斯·布隆伯格于 1959 年提出的一种理论可能性^[1]。

随着激光器及其相关光纤技术的出现,从 20 世纪 60 年代中期开始,几个研究小组开始探索利用无机固体得到上转换光学信号。Auzel^[2]于 1966 年最先描述了“上转换”的概念,总结了其机理并报道了利用 Yb³⁺敏化 Er³⁺和 Tm³⁺离子的基于能量上转换的可见光发射机制。Ovsyankin 和 Feofilov^[3]在同一年也独立观察到了这种 Yb³⁺敏化的上转换。不久之后,人们利用 Yb³⁺-Ho³⁺耦合实现了上转换原理发射绿光^[4-5]。自那

以后,光子上转换领域不断优化设计,产生了适用于许多领域的不同波长的可见光^[6]。

光子上转换过程为非线性光学技术提供了一种可以将低能量光子吸收转换为高能持久的可见光发射的简便方法,但需要一些必要条件,如较长的激发态寿命和能级的相似间距阶梯状排列。因为光学跃迁是局域化的,上转换发射很少受到环境的影响,通常不受量子限制的干扰,有利于镧系离子激发态的顺序激发和离子-离子相互作用。上转换发光的强度一般与激发光的密度呈非线性关系^[7]

$$I = kP^m, \quad (1)$$

式中: I 为发光强度; P 为泵浦激光功率; k 为材料相关系数; m 为上转换发光所需的激发光子数。当 I 相对于 P 以双对数形式绘制时,在低功率状态下,光子发射过程的斜率为 m 。但在高功率下,由于衰减率和上转换率之间竞争,斜率会小于 m ,出现饱和现象。

据报道,掺杂适当过渡金属离子的载体可以进行上转换发射。在量子点和有机染料的双光子吸收、二次谐波产生和反斯托克斯拉曼散射中也实现了上转换过程^[8-9]。然而,这些系统需要具有挑战性的条件,如极低温、高功率密度或昂贵的超短脉冲激光器。

相比之下,使用镧系元素掺杂固体材料可以实现更高的上转换效率。镧系离子是适用于光子上转换过程的元素,因为它们 $4f$ 价电子的能级间隔表现出阶梯状的结构,恰好对应于近红外和可见光光子能量发射状态,两个或多个近红外泵浦光子被镧系离子的中间能级吸收再发射的非线性过程就会使得光的发射波长短于入射波长。这正是在 20 世纪 60 年代中期由 Auzel、Ovsyankin 和 Feofilov 在块状晶体中构想研制的^[10]。此后,人们对镧系掺杂上转换发光进行了大量的研究,发现并应用了其优异光学性能,包括显著的反斯托克斯位移、优异的光稳定性、清晰可调的多峰线发射、长而可调的发射寿命以及高抗光学闪烁和光漂白的性能^[11]。这些特性使得镧系掺杂上转换材料成为从生物测定和光催化到超分辨成像和三维成像等各种应用的理想候选者,

直到 20 世纪 90 年代末,纳米科学技术在材料科学领域取得了长足的进步,上转换纳米材料得以推广。研究者们通过不同的化学工艺,设计并合成了具有可控成分、晶相、尺寸和形状的高质量上转换纳米颗粒(UCNPs)^[12]。纳米材料中的上转换能量转移过程与块状材料相似,不过由于纳米颗粒中存在的尺寸限制,

离子-离子和离子-晶格之间的相互作用在不同程度上被改变,可以精确地调谐从紫外到近红外区域的特定波长。这些 UCNP 的出现极大地发掘了非线性光学在先进纳米光子学和生物研究中的应用潜力。由于体积小、毒性低、生物相容性好、光稳定性高等突出特点,UCNPs 作为生物成像领域的发光探针尤其具有吸引力。经过几十年的发展,涉及镧系离子的光子上转换

过程目前主要分为五类:激发态吸收上转换(ESA)、能量传递上转换(ETU)、光子雪崩(PA)、协同能量转移(CET)和能量迁移介导的上转换(EMU)^[13-14]。所有这些过程都涉及两个或多个光子的连续吸收和高能光子发射^[15],如图 1 所示,图中红色箭头表示直接激发过程,蓝色箭头表示辐射发射过程,虚线箭头表示能量传递过程。

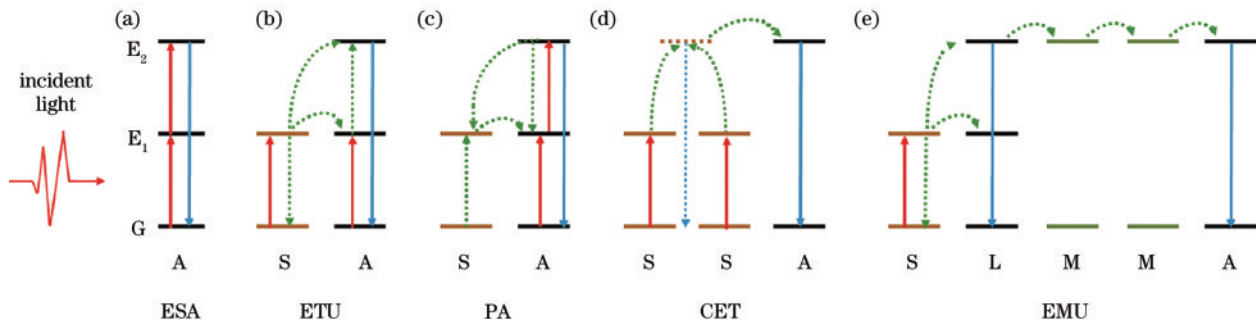


图 1 镧系元素掺杂纳米材料的主要上转换机制。(a) 激发态吸收上转换; (b) 能量传递上转换; (c) 光子雪崩; (d) 协同能量转移上转换; (e) 能量迁移介导的上转换(图中红色箭头表示直接激发过程,蓝色箭头表示辐射发射过程,虚线箭头表示能量传递过程, A 是活化剂离子, S 是敏化剂离子, M 是能量迁移离子, L 是阶梯能级离子)

Fig. 1 Principal upconversion mechanisms of lanthanide-doped nanomaterials. (a) Excited-state absorption; (b) energy-transfer upconversion; (c) photon avalanche; (d) cooperative energy transfer; (e) energy migration-mediated upconversion (red arrows stand for direct excitation processes, blue arrows represent radiative emission processes, dashed arrows represent energy transfer processes, A means activator ion, S means sensitizer ion, M means migratory ion, and L means ladder ion)

在激发态吸收上转换(excited-state absorption)过程中,稀土离子可以吸收连续的低能量泵浦光子,从基态能级跃迁至中间亚稳态能级,然后到达更高的激发态能级,最终释放出一个高能光子。这个过程有严格的限制,包括激发态离子必须具有足够大的吸收截面以吸收第二个泵浦光子,并且通常仅在单一稀土离子(如 $\text{Er}^{3+}/\text{Nd}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ 等)掺杂的体系中发生。然而,连续吸收第二个光子时的效率较低,体系中可能存在其他上转换过程,如能量传递上转换、光子雪崩、交叉弛豫等。

能量传递上转换(energy transfer upconversion)通过涉及两种稀土离子:敏化剂和活化剂,实现了目前使用较为广泛、发光效率较高的一种上转换机制^[16]。在泵浦光源下,敏化剂离子吸收光子跃迁到激发态,然后将能量传递给附近的活化剂离子,活化剂离子获得多个光子的能量后发射高能光子。通常,敏化剂离子的能级需与活化剂离子匹配且吸收截面大于活化剂离子的吸收截面。通常使用吸收截面较大的 Yb^{3+} 离子作为敏化剂与活化剂离子共掺杂,如 NaYF_4 材料中的 $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 、 $\text{Yb}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$ 、 $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ 等体系^[17-18]。能量传递上转换还需敏化剂离子与活化剂离子距离较近,例如: Er^{3+} 离子单掺杂体系中,掺杂浓度较低时主要通过激发态吸收上转换发光,增加掺杂浓度后能量传递上转换占据主导,发光效率有所提高。

光子雪崩(photon avalanche)是一种特殊形式的上转换过程,2017年才在上转换纳米颗粒体系中被发

现。其亚稳态能级和基态能级之间的能量差和泵浦光源不匹配,但当得到超过特定阈值的激励功率时,可以利用特殊的能量循环路径在几乎不进行基态吸收的情况下发射出强上转换荧光。具体过程如下:通过非谐振弱激发态吸收将电子填充到中间亚稳态能级上,而后电子通过谐振激发态吸收跃迁至高能级上,接着重复通过高能激发态离子与邻近的基态离子之间有效的交叉弛豫能量转移过程,使中间亚稳态能级上的粒子布居数呈指数式增加。当中间态离子的消耗小于基态离子的消耗时就产生了强上转换发射,形成雪崩过程。因此光子雪崩的明显特征就是:发射强度和泵浦激光功率具有强依赖关系。继首次在 Pr^{3+} 掺杂的红外量子计数器中发现了 PA 过程之后^[19],研究者在 $\text{Pr}^{3+}/\text{Tm}^{3+}/\text{Nd}^{3+}$ 等掺杂体系中都观察到了这种光子雪崩现象^[20]。近年来,除用于小型激光器外,PA 机制还用于实现超分辨率成像^[21]。

协同能量转移(CET)过程中,离子的相互作用至关重要,敏化剂和活化剂不可或缺。两个能量供体通过吸收光子协同激发到虚激发态,同时将能量传递给相邻受体,从而发射一个高能光子。上转换包括协同敏化(如 $\text{Yb}^{3+}-\text{Tb}^{3+}$ 、 $\text{Yb}^{3+}-\text{Eu}^{3+}$ 和 $\text{Yb}^{3+}-\text{Pr}^{3+}$ 离子对)^[22-23]和协同发光(如 $\text{Yb}^{3+}-\text{Yb}^{3+}$ 离子对^[24])。然而,由于激活剂缺乏长寿命的中间态能级,纳米材料中的上转换效率相对较低。尽管大多数研究集中在块状材料上,但仍有研究表明,纳米材料中协同能量转移上转换是可行的^[25]。

能量迁移上转换 (energy migration-mediated upconversion) 是 Wang 等^[26]于 2011 年提出的一种利用纳米核壳结构实现的上转换发光过程。该过程涉及四种离子分布在不同的壳层中:敏化剂离子、能量累积离子(或称阶梯能级离子)、能量迁移离子和活化剂离子。在受到低能量光子激发时,ETU 过程首先发生,将能量累积离子不断激发至较高能级。然后,能量迁移离子从邻近的能量累积离子中提取激发态能量,并将其传递到相邻的壳层区域。最终,活化剂离子捕获能量并再次回到基态,释放较强的上转换发光。这个过程同时也会导致部分能量累积离子发生上转换发射。这种新型的能量传递机制可以用于多色发光调控和寿命调节等。在 Auzel 等的研究中发现,ETU 过程的量子效率比 ESA 和 CET 过程高出两三个数量级,ETU 是多掺杂上转换系统中的一个常见过程。随着核壳合成技术的发展,EMU 作为 ETU 的延伸出现,拥有特殊能级的镧系离子被引入单独的层中。核壳纳米颗粒中的光子上转换为调节掺杂剂之间的相互作用开启了新的研究方向。此外,核壳纳米颗粒中不相容的掺杂剂离子可以被限制在单独的层中以消除短程交叉弛豫带来的猝灭效应,也能进一步利用长程能量迁移过程来控制光子动力学路线^[27]。

3 超分辨荧光显微镜

基于实验证据和物理学原理,阿贝提出了一个著名的重要结论,即显微系统的分辨率不能绕过衍射极限。具体来说,就是由于光学衍射,光学分辨率一般不能小于半波长(使用空气显微镜的时候),所以小于 200 nm 的结构特征一般无法用传统光学显微镜分辨。

$$\Delta r \approx \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} = \frac{\lambda}{2NA}, \quad (2)$$

式中: λ 为入射波长; n 为样品与物镜之间介质的折射率; α 为半物镜孔径角; NA 为数值孔径。折射率 n 和孔径半角 α 的大小受客观技术条件的限制。式(2)表示点扩散函数(PSF)的半峰全宽(FWHM),通常用作远场光学显微镜分辨率的定量定义。

面对式(2)中衍射所带来的分辨率限制,科学家们首先尝试增大光学显微镜的数值孔径或减小激发激光波长但成效甚微。随后,他们采用电子束代替可见光,使用扫描电子显微镜(SEM)和透射电子显微镜(TEM)揭示了亚细胞结构和原子组织。但电子显微镜受真空操作、特定标记和成本限制,所以光学(荧光)显微镜在细胞成像中更加至关重要。利用倏逝波,全内反射荧光显微镜(TIRF)和扫描近场光学显微镜(SNOM)使得长时间的微创光学观察成为可能,不过轴向上仍受分辨率和光通量限制,

自 20 世纪 90 年代以来,现代研究技术方法不断进步,跨学科交叉研究蓬勃发展,给成像领域带来了长足的进步,如更安全的标记,更深入地观察,以及更高的

空间和时间分辨率。2014 年,超分辨荧光显微镜的发展获得了诺贝尔化学奖,成像模式被认为是必不可少的突破性发明。不同的超分辨显微技术的潜在能力尚未被完全探索,应用的最佳途径仍然不确定。这促使我们探索设计更好的光学远场方法,以便呈现亚显微细胞结构和蛋白质在活细胞内的分布。随着纳米级别的高分辨率成像为各种生物系统的研究提供了新的切入点,超分辨成像领域方兴未艾^[28]。

超分辨荧光显微技术的发展始于 20 世纪 90 年代初,从成像基本原理出发可大致分为两类。第一类超分辨技术主要基于激发光的点扩散函数或者光学传递函数调制,有受激辐射淬灭(STED)显微镜、基态损耗(GSD)显微镜和结构光照明显微镜(SIM)等。第二类是依赖于单分子的随机闪烁性,利用算法进行空间定位,包括光致激光定位显微镜(PALM)和随机光学重建显微镜(STORM)。在这些方案的基础上产生了许多发展组合以及先进的成像处理算法^[29],结合起来提高了现有成像方式的性能。基于 UCNPs 较好的发光稳定性、非线性响应以及多能级调控能力,UCNP 与点扩散函数调制和结构光照明等方法结合得比较多,这些成像方法的原理如图 2 所示。

受激辐射淬灭显微镜(STED)[图 2(a)]是由德国马克斯-普朗克研究所的 Hell 教授^[30]于 1994 年提出的超分辨率成像技术,引入了可逆饱和或可切换光学荧光跃迁(RESOLFT)的概念。如图 2(a)所示,STED 方法将(绿色)激发光和中心光强为 0 的环形损耗光或称 STED 光束(红色)同时聚焦在样品上利用点扫描方式成像。由于荧光分子受激发射产生的信号波长与损耗光相同,可以被滤光片过滤,因此探测器接收到的被激发的荧光信号(黄色)就是损耗光中心光强为零区域的信号。使用这种方法,可以将等效的成像区域尺寸缩小到衍射极限以下(几十纳米),实现超分辨成像。

STED 光束激发荧光状态的非线性耗竭是实现超分辨率的基础,特点是强度在焦点中心接近零,向外围呈指数增长。^[19]一旦 STED 光束的功率超过设定的阈值,大多数自发荧光就会被耗尽。随着功率的进一步增强,非荧光区域不断扩大,但对中心区域的荧光影响不大。当两个激光脉冲叠加时,只有位于 STED 光束中心的探针才能产生荧光发射,这极大地缩小了有效 PSF 的尺寸。剩余有效 PSF 的 FWHM 可以近似表示为

$$\Delta r_{\text{STED}} \approx \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + \frac{I_{\text{max}}}{I_{\text{sat}}}}}, \quad (3)$$

式中: I_{sat} 定义为激发最大荧光信号一半的特征阈值强度; I_{max} 为最大 STED 光束功率; $h\nu$ 为光子能量; σ 为激发截面; τ_{n} 为激发态的荧光寿命。根据式(3),理论上分辨率不再受到衍射极限的限制,而是受到实际

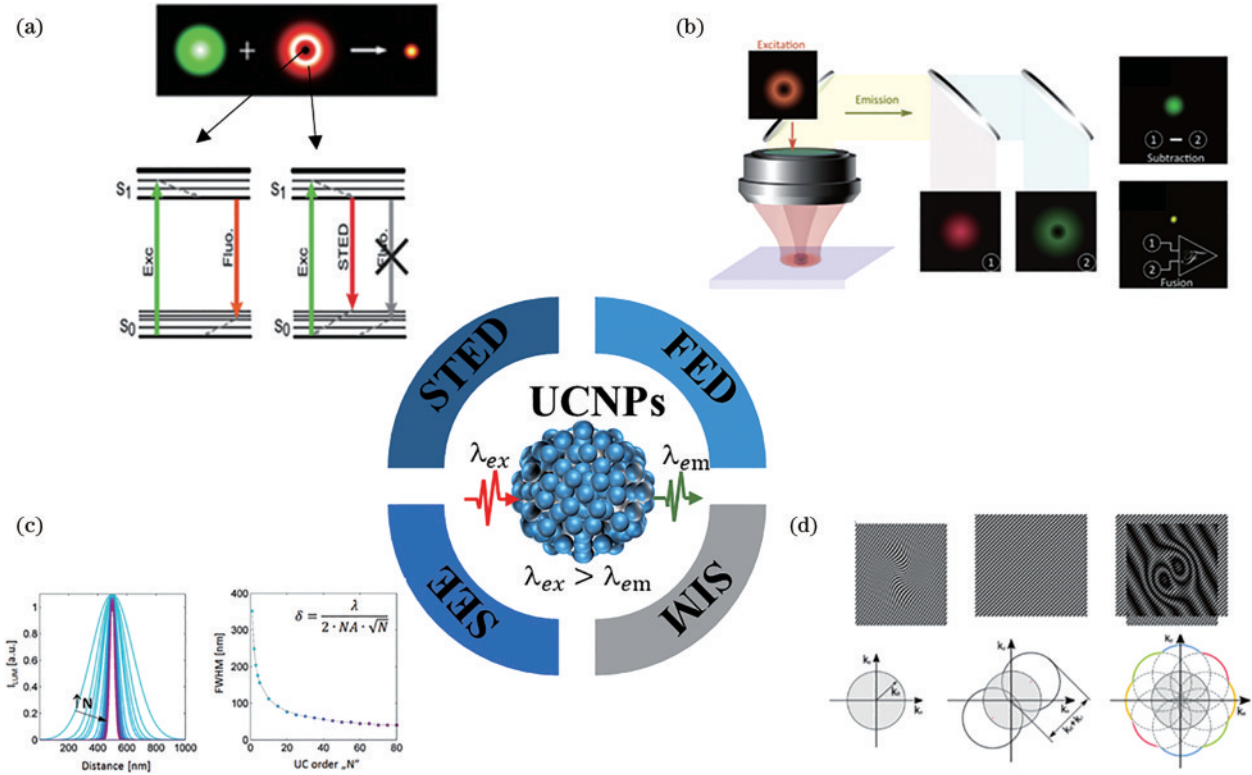


图 2 超分辨显微镜的原理。(a) 受激辐射淬灭显微镜^[50]；(b) 荧光发射差显微镜^[50]；(c) 超线性激发发射显微镜^[54]；(d) 结构光照明显微镜^[54]

Fig. 2 Principle of super-resolution microscopes. (a) Stimulated emission depletion microscope^[50]; (b) fluorescence emission difference microscope^[50]; (c) super-linear excitation-emission microscope^[54]; (d) structure illumination microscopy^[54]

实验中甜甜圈光斑最小残余强度和材料性能的限制。此外由于图像是扫描时直接获得的,STED的成像速度很快,可达 200 frame/s^[31]。

荧光发射差(FED)显微镜^[32][图 2(b)]是STED方法的衍生物。通过高斯和甜甜圈光斑图像相减实现分辨率提升,FED既解决了商业化激光扫描显微镜系统中诸多技术难题,又无需特定的染料和发射光谱。它基于两次连续扫描,分别获得高斯光斑和甜甜圈光斑下的两幅图像,通过对应图像相减获得超分辨率图像,解决了STED光束耦合难度大的技术瓶颈。研究者们定义了一个通常在 0.7~1.0 之间的归一化系数 r 来调整成像质量。减法过程如下

$$F_{\text{PSF FED}} = F_{\text{PSF Gau}} - r \cdot F_{\text{PSF Dou}}, \quad (4)$$

$$F_{\text{FED}} = F_{\text{Gau}} - r \cdot F_{\text{Dou}}, \quad (5)$$

式中: $F_{\text{PSF FED}}$ 为处理后的有效 PSF; $F_{\text{PSF Gau}}$ 是高斯 PSF; $F_{\text{PSF Dou}}$ 是甜甜圈 PSF; r 为归一化系数; F_{FED} 为处理后的减法图像; F_{Gau} 是用高斯光斑得到的图像; F_{Dou} 是用甜甜圈光斑拍摄的图像。

简单地说,发射光由高数值孔径的物镜收集,并由透镜聚焦到单光子探测器上,因此有效 PSF ($h_{\text{eff}}(x, y)$) 可表示为

$$h_{\text{eff}}(x, y) = h_{\text{em}}(x, y) \times h_{\text{c}}(x, y), \quad (6)$$

$$h_{\text{em}}(x, y) = \eta(i) \times h_{\text{exc}}(x, y), \quad (7)$$

式中: $h_{\text{em}}(x, y)$ 是发射的 PSF; $h_{\text{c}}(x, y)$ 为共聚焦采集

系统的 PSF; $h_{\text{exc}}(x, y)$ 为激励束(甜甜圈束)的 PSF; $\eta(i)$ 为随激发功率变化的发射强度曲线;在 $h_{\text{eff}}(x, y)$ 中,半峰全宽表示分辨率。实验测量的系统图像平面上的强度分布 PSF ($h_{\text{exp}}(x, y)$) 是荧光信号的 $h_{\text{eff}}(x, y)$ 与空间分布轮廓 $h_{\text{fluo}}(x, y)$ 的卷积,表示为

$$h_{\text{exp}}(x, y) = h_{\text{eff}}(x, y) * h_{\text{fluo}}(x, y). \quad (8)$$

虽然 FED 显微镜提高了分辨率,但基于常数归一化系数 r 的减法模式可能导致伪影和关键信息丢失,研究人员进一步采用像素分配^[33]的方法来调整每个像素的对比度因子,但这以牺牲整体分辨率为代价。

超线性激发发射显微镜(SEE)[图 2(c)]是近几年刚刚被开发出的一种激光直扫超分辨技术。非线性光学与显微镜相结合可以提供更强的对比度、更深的组织观察、更小的侵入性等成像优势^[34]。特殊的非线性如开关和饱和,可以使空间分辨率突破衍射极限。然而,在大多数情况下,非线性光学相互作用的实现需要强照明,由此引出了 SEE 技术。近年来,UCNP 中的光子雪崩技术利用单束高斯光束绕过了衍射极限。这种成像方法不需要复杂的仪器、激励光束整形或图像后处理等校准程序^[35],仅取决于发射强度对激励功率的高度非线性依赖[图 2(c)]。由于发射 PSF 的尺寸与非线性程度的平方根成反比,因此在扫描共聚焦显微镜中就可以自动实现深度亚衍射

分辨率。根据式(9),分辨率与参与发射过程的光子数成反比^[36]

$$\Delta r = \frac{\Delta r_0}{\sqrt{N}} = \frac{\lambda}{2(NA)\sqrt{N}}, \quad (9)$$

式中: Δr 为分辨率; Δr_0 为单光子衍射极限分辨率; N 为参与发射过程的光子数或非线性价数; λ 为激发波长。因此,当 $N > 1$ 时,激发光束光斑中心附近的多光子发光强度相对于其边缘附近的强度增强为 $I_{lum} = P_{in}^N$ (式中 P_{in} 为入射功率密度),从而有可能实现亚衍射成像。

结构光照明显微镜(SIM)[图 2(d)]是一种绕过衍射势垒的宽视场技术^[37],这与上述几种点扫描超分辨率模式不同,理论上 SIM 成像速度更快。它利用莫尔条纹将位于物镜收集能力范围之外的高频信息“搬运”到低频区域,从而让显微镜能够捕获到这些原本无法获取的信息,从而通过专门的图像处理算法将受传统衍射极限限制的显微分辨率提高一倍。非线性结构光照明方案,例如饱和结构光照明显微镜(SSIM),可以进一步利用发射饱和在系统中获得更高分辨率信息。通过提高激发功率,非线性饱和和光响应可以进一步提高 SIM 在 50 nm 范围内分辨亚细胞结构的能力。

有机荧光染料和蛋白质是 SIM 最常用的成像探针,因为它们具有特异性染色靶向细胞器的出色能力^[38]。然而,这些吸收截面较小的探针需要高功率脉冲激光来激活多光子吸收过程,限制了活细胞中亚细胞结构的长时间可视化^[39]。

4 基于上转换纳米颗粒的超分辨荧光显微镜

在超分辨率成像中,发光探针是以纳米精度标记和揭示目标分子结构和活性的关键工具。理想的探针应该具有足够的亮度、优异的光稳定性、良好的生物相容性等^[40]。有机染料和荧光蛋白标记法具有体积小、生物相容性好等优点,是目前上述远场超分辨显微镜中广泛应用的成像探针。但是传统的发光探针在高能紫外线或高能可见光的激发下只能发射能量较低的光子,造成生物分子的光损伤和自荧光,导致采集到的成像数据信噪比较低。因此,超分辨揭示细胞内图景的目标要求寻找新的具有高亮度和抗光漂白的替代探针来推进显微领域发展。

纳米颗粒虽然比染料分子和蛋白质大,但是由于其卓越的光物理性质,已成为生物标记和生物传感、药物递送、癌症治疗、长期分子跟踪、太阳能电池应用和触发化学反应等多个领域研究的优秀候选项^[41-43]。近年来,许多超分辨率模式都采用纳米颗粒作为荧光纳米探针,包括量子点(QDots)、碳点(CDots)、聚合物点(PDots)、聚集诱导发射(AIE)点等。各种纳米颗粒在生物研究的超分辨率成像中显示出巨大的优势,但在

深层生物组织中进行长期跟踪和超分辨率成像的分析却很少。主要原因是这些纳米粒子的激发和发射光位于可见光和紫外波长范围内,在深层组织中的穿透能力较低,且其中一些含有对生物样品有害的重金属^[44]。此外,与染料和蛋白质相比,这些荧光纳米颗粒具有相对的光稳定性,但在长时间观察中,如何抵抗光漂白仍然是一个重大挑战。

为了解决上述问题,可将UCNPs作为一种具有小体积高密度发射的新型多光子探针。每个UCNP包含数千个共掺杂镧系离子,形成光子敏化剂和激活剂网络,具有将近红外(NIR)转换为短波长的近红外、可见光和紫外线发射的独特非线性光学特性。此外,通过适当的表面修饰。UCNPs可以通过内吞作用被细胞很好地内化,且对细胞增殖和生存能力没有明显的毒性作用。UCNPs由于具有显著的抗 Stokes 光谱偏移、无背景、光稳定、低毒性和高成像穿透能力等优越的物理化学特性而在超分辨领域引起了人们的广泛关注。下面我们列举了几类典型的上转换超分辨成像技术。

1) UCNP-STED 显微镜。最近的研究表明,每个纳米粒子具有数千个发射点的 UCNPs 可以作为合适的单分子探针,从而在生物等超分辨率成像中实现明亮的发射。研究者提出了 UCNP 辅助 STED 纳米显微镜(UCNP-STED)的概念,并证明了在 1 mW 功率的 980 nm 激光和 40 mW 固定的 808 nm 激光的激励下,在解析单个 13 nm UCNP 簇时实现了低于 30 nm 的光学分辨率[图 3(a)]^[21]。具体来说,当高铽离子(Tm^{3+})掺杂的 UCNPs 在 980 nm 激光束下激发时,由于交叉弛豫引起的光子雪崩效应,对应能隙($^3H_4 \rightarrow ^3H_6$)的耗尽 808 nm 激光器触发受激发射抑制蓝色发射。此外,这里还展示了使用上转换纳米颗粒对固定细胞的免疫染色细胞骨架结构的超分辨率成像(分辨率为 82 nm)^[45][图 3(b)]。

STED 超分辨的实现受限于高功率,而 UCNP-STED 正具有降低所需功率的优点,能产生甜甜圈光束从而实现快速并行化纳米显微镜^[46]。在较低功率下用耗尽光束传导 UCNP-STED,几乎不产生任何自身荧光,从而可以获得优越的信本比,目前对单个 UCNP 进行成像能达到分辨率为 28 nm,即波长的 1/36。镧系元素纳米探针有望扩展 STED 显微镜的应用领域,为在空间和时间维度上对细胞过程进行高分辨率延时研究铺平道路^[47]。

虽然 UCNP 辅助 STED 比传统染料 STED 降低了两个数量级的功率,但仍然存在一些限制。首先,耗尽光束依然需要比激发激光高得多的功率。其次,该 STED 方案要求熟练的双激光束对准技术,这限制了该技术的非专业实验室和应用。最后,耗尽光束匹配 UCNPs 中能级的目标带隙的特定要求限制了其在各种发射波长中的优势。因此,在超分辨显微镜中利用 UCNPs 代替受激发射是一种便捷有效、潜力巨大的方法。

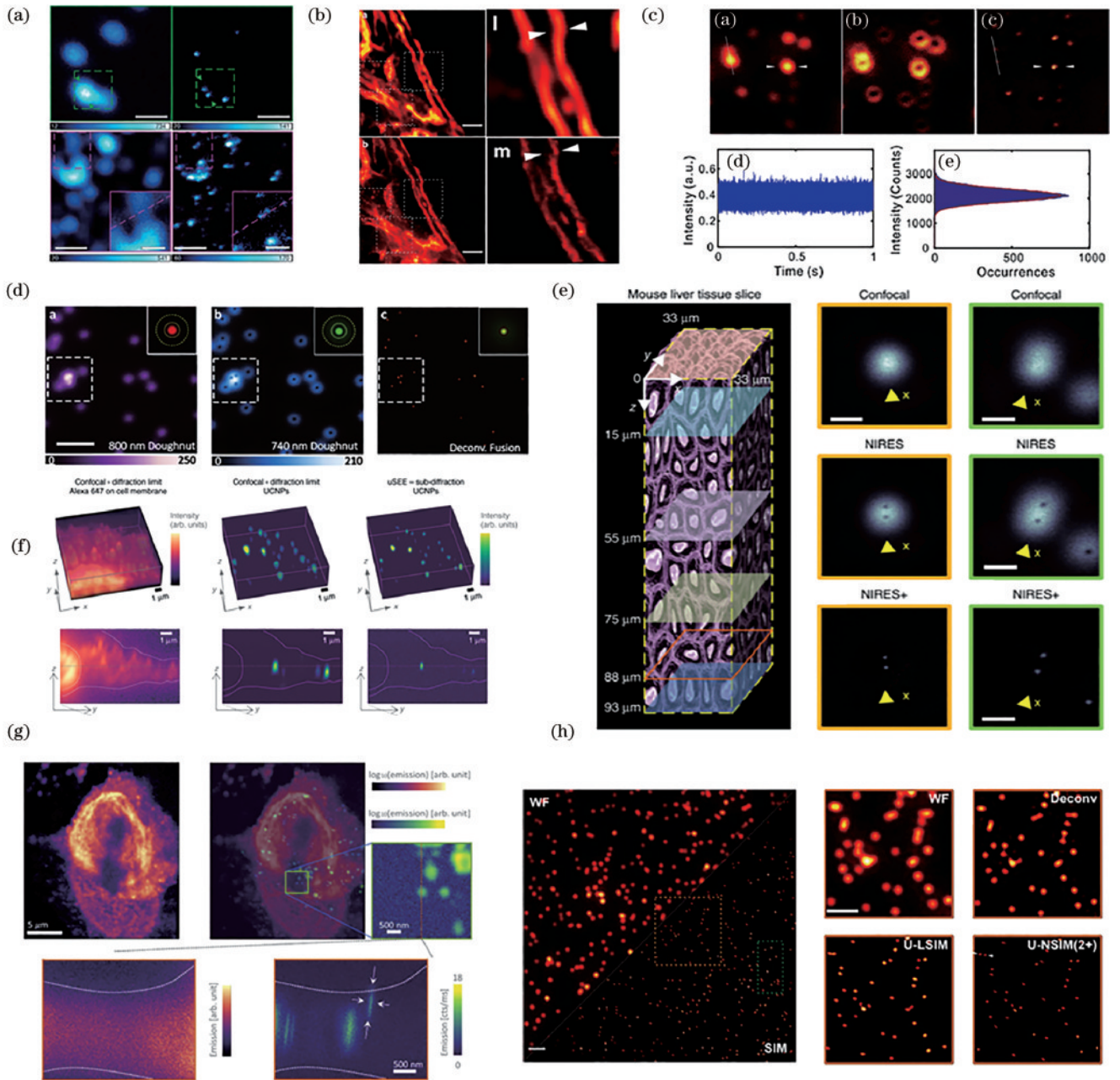


图3 UCNP在各种超分辨技术中的应用。(a) 低功率STED显微镜超分辨^[21];(b)用抗体偶联的UCNP对细胞骨架蛋白结蛋白进行免疫荧光标记的STED超分辨率成像^[45];(c)非漂白FED显微镜^[48];(d)傅里叶异色融合FED^[50];(e)近红外发射饱和和显微镜深层组织成像^[49];(f)用于三维亚衍射成像的超线性激发发射常规共聚焦成像^[52];(g)神经元表型细胞内吞的UCNP超分辨率uSEE-STED成像^[53];(h)非线性SIM显微超分辨^[56]

Fig. 3 Applications of UCNP in various super-resolution microscopy. (a) Super-resolution of low-power STED microscopy^[21]; (b) immunofluorescence labeling of cellular cytoskeleton protein desmin with antibody-conjugated UCNP and super-resolution imaging^[45]; (c) non-bleached FED microscopy^[48]; (d) Fourier-domain heterochromatic fusion^[50]; (e) deep tissue imaging by near-infrared emission saturation microscopy^[49]; (f) super-linear excitation-emission conventional confocal for three-dimensional subdiffraction imaging^[52]; (g) super-resolution uSEE-STED imaging of UCNP endocytosed by a neuron phenotype cell^[53]; (h) nonlinear SIM microscopy super-resolution^[56]

2) UCNP-FED显微镜。传统FED显微镜使用荧光染料和蛋白,容易受光漂白影响,不适合长时间成像。抗漂白的UCNP-FED显微镜引入Nd³⁺/Yb³⁺/Er³⁺共掺杂UCNPs,以800 nm 10 MW·cm⁻²激发,实现了172 nm的分辨率。图3(c)展示了在相应激发强度下单个UCNP的成像结果,说明FED的分辨能力优

于常规共聚焦图像。单分散UCNPs经过半小时激光扫描后强度未下降,说明没有发生光漂白^[48]。类似于抗漂白FED,研究者使用UCNPs开发了新的近红外发射饱和(NRES)显微镜模式,实现深层组织的超分辨率成像,相比于STED实现了更深的穿透深度且激发强度远低于传统染料。如图3(e)所示,在没有任何

像差校正的情况下,在深度达 93 μm 的组织中保持了低于 50 nm 的相对一致的分辨率^[49]。

出于简化耦合系统难度、降低系统复杂度的考虑,研究者进行了探索多色非线性响应和傅里叶域融合以提高空间分辨率的研究^[50]。与需要使用双激励程序切换照明模式相比,单扫描方法简单、快速且稳定,可以避免在校正多个样本漂移时使用额外的光学组件和程序,而且使用简化的光学设置与标准商用或实验室激光扫描显微镜兼容。

这些工作进一步表明,UCNPs 的材料设计可以改善其光学特性以提高分辨率,这为材料科学界研究提供了一个新的主题,特别是通过深层组织进行更有效的超分辨率探针。此外结合自愈贝塞尔光束,研究人员探索了用这种衍射成像方式绘制强散射肿瘤细胞球体内的单个纳米颗粒的可行性^[51]。

3) UCNP-SEE 显微镜。一种名为超线性激发发射显微镜的方法为在传统共聚焦配置上实现生物样品的三维衍射成像提供了实验证据[图 3(f)]^[52]。研究人员采用了 Tm^{3+} 离子掺杂浓度相对较高(8%)的 NaYF_4 纳米晶体。该设计使得超线性斜率达到 6.2 成为可能,这几乎是当前文献中报道的两倍陡度。在方便的实验条件下,与衍射极限相比,轴向和横向的分辨率都得到了双倍的提高。实验验证了 UCNPs 在固定的神经元细胞中可以在三维衍射成像条件下连续可视化超过 5 h。此外,超线性激发发射与 STED 成像方式相结合,uSEE STED 模式可以在 1/4 原激光功率下提高约 80 nm 的横向分辨率,同时发挥了两种模式的优势,使其更适用于生物环境^[53]。实际上,UCNPs 的超线性特性使得仅用简单的扫描共聚焦显微镜即可实现低于 70 nm 的空间分辨率^[35],研究人员在 2 光子、3 光子或 4 光子上转换成像中实现了数倍以上的分辨率提高^[36],但高阶上转换发射仍具挑战性。不过根据理论仿真建模,当非线性超过 80 时,存在解析 20 nm 特征的可行性^[54]。实际使用中 SEE 显微镜的概念不仅可以与 UCNP 结合,也可与其他涉及强度梯度照明的显微镜技术结合使用,例如 SIM、STED、Airy 扫描显微镜、内窥镜等。

4) UCNP-SIM 显微镜。普通 SIM 的分辨率只能提升一倍^[55],想要提升更多分辨率就需要引入非线性过程增加图像中的高阶空间频率的部分。通常这一过程需要利用高激发功率的饱和现象来实现。基于 UCNP 的高非线性效应与近红外激发与荧光,非线性上转换 SIM 应运而生,它提出了一种利用 UCNPs 通过厚生物组织创建视频速率超分辨率成像的策略。UCNPs 独特的非线性光响应使得 SIM 上的有效非线性模式可以在成像平面的傅里叶域中获得高频谐波,实验表明微调 UCNPs 中的掺杂浓度可以改变光子响应的非线性,进一步将分辨率提高到激发波长的 1/7^[56][图 3(h)]。基于时波长空间转换的多光子上转换时编码 SIM 在保

持低激发功率的情况下,以 50 MHz 的调制和扫描速率突破了图像采集速度限制。最近,基于特定的 UCNPs 寿命谱,研究者提出了用于高通量复用超分辨率成像的时间分辨结构照明显微镜(TR-SIM)^[57],具有更高的解码精度和高通量光复用成像效率。

值得一提的是,基于 UCNP 的超分辨显微镜除了有上述提到的优势以外,还可以实现跨维度的多路复用超分辨成像。“多路复用”是指沿单个通信通道同时传输多个消息。多路复用技术在生物、医学、防伪和显微成像等复杂领域具有重要意义。传统超分辨显微镜的多路复用受限于荧光探针的能力,其维度仅限于荧光颜色和发光极化种类,并且通道数目有限。而 UCNP 基于不同掺杂离子与对其复杂的非线性能量传输进行的调控,可以进一步添加更多的超分辨复用维度^[58]。例如:利用高掺杂浓度颗粒与低掺杂浓度颗粒在同样照射光强的区别,可以进行单颜色通道光强维度的复用成像^[59];利用能量传输调制的寿命谱线的不同,可以进行荧光寿命复用超分辨成像[图 4(a)];利用不同掺杂 UCNP 的不同非线性响应在 LG01 光束照射激光直扫下的不同 PSF,实现了新的非线性复用维度^[50][图 4(b)]。结合深度学习等优化算法,这些复用技术不仅可以被用于实现多分复用超分辨,还可以被用于防伪技术[图 4(c)]以及多种生物结构的区分染色[图 4(d)]。

5 结束语

本文总结了 UCNPs 在提高超分辨率显微镜性能方面的应用。UCNPs 的非线性光子响应在降低激光功率、提高探针光学稳定性、增加成像深度、加快成像速度、提升整体质量等方面带来了一些具体进展。

通过诱导光子雪崩效应,UCNP 辅助的 STED 显微镜提供的饱和强度比目前在常规受激发射耗尽显微镜中使用的荧光探针低两个数量级,这提供了一种缓解平方根定律的新思路。UCNP 在连续激光照射 30 min 后仍保持稳定,使得抗漂白 FED 显微镜克服了强耗尽激光的需求且不受试剂种类的限制;uSEE-STED 模式结合验证了 UCNPs 在固定的神经元细胞中可以在三维衍射成像条件下连续可视化超过 5 h。在没有任何像差校正的情况下,结合 UCNP 的近红外发射饱和显微镜在深度达 93 μm 的组织中保持了低于 50 nm 的相对一致的分辨率。基于时间-波长-空间转换,多光子上转换时间编码结构光照明显微镜在利用 UCNP 保持低激发功率的同时,以 50 MHz 的调制和扫描速率跨越了图像采集的速度限制。对单个 UCNP 进行成像时最小分辨率达到 28 nm,即波长的 1/36;采用 UCNP 的超分辨结果在较理想条件下轴向和横向的分辨率较先前得到了双倍的提高;通过如傅里叶域异色融合等 PSF 工程技术,利用单个 UCNPs 的异色光学非线性响应曲线,显著提高图像质量。

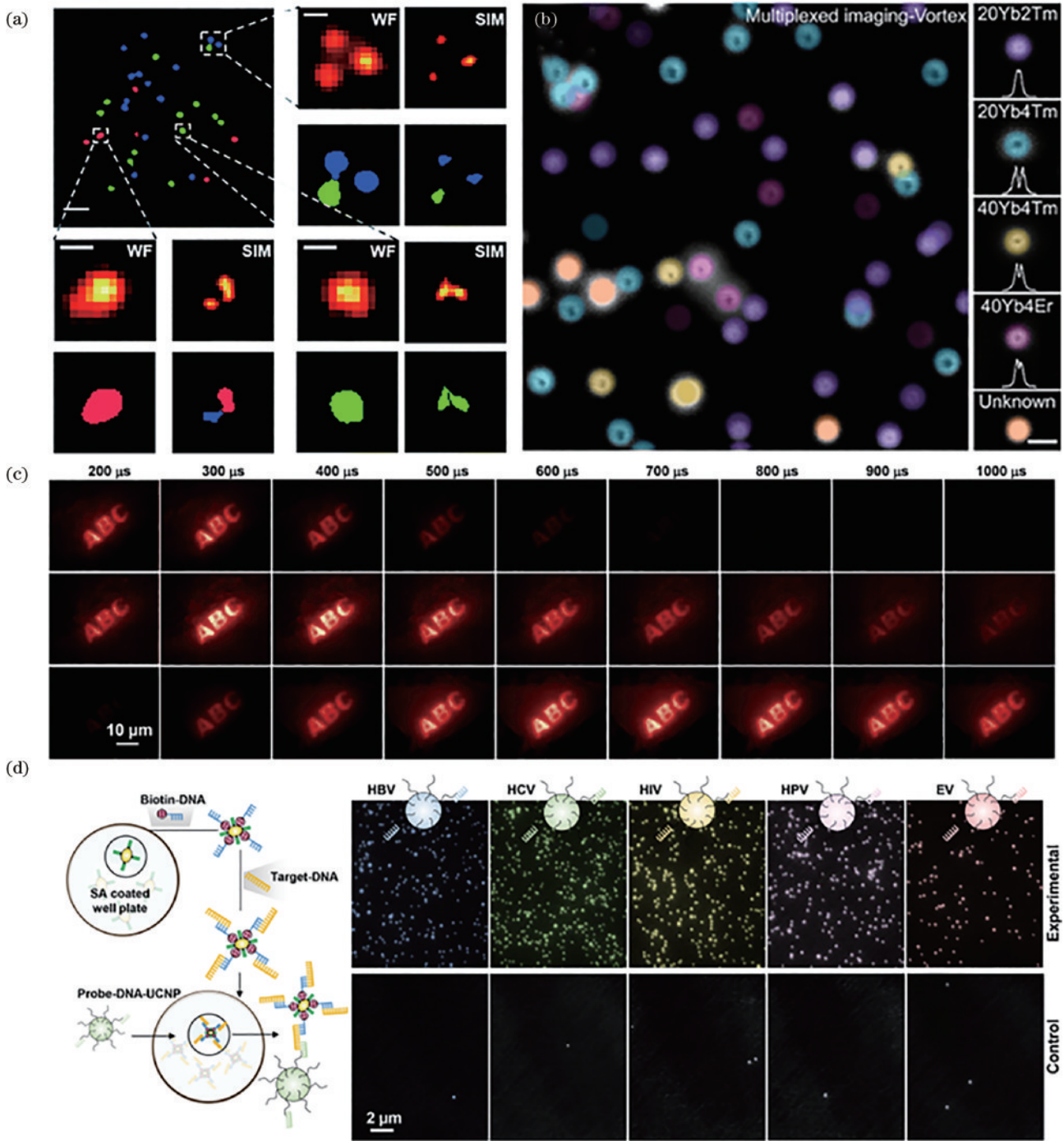


图4 UCNP在多路复用超分辨技术中的应用。(a)超分辨率模式下多通道单 τ^2 点的深度学习辅助解码^[57];(b)混合UCNP的超分辨率复用^[58];(c)使用三种不同上升-衰减指纹的Nd-Yb-Tm系列 τ^2 点安全油墨进行时域防伪;(d)使用五种类型的Nd-Yb-Er系列 τ^2 点探针进行多重单分子数字测定,以量化五种靶病原体单链DNA^[13]

Fig. 4 Applications of UCNP in Multiplexed super-resolution microscopy. (a) Deep learning assisted decoding of multi-channel single τ^2 -dots in super-resolution mode^[57]; (b) super-resolved multiplexing of mixed UCNP^[58]; (c) time-domain anticounterfeiting by using three types of Nd-Yb-Tm series τ^2 -dots security inks with different rising-decay fingerprints; (d) multiplexed single molecule digital assays using five types of Nd-Yb-Er series τ^2 -dots probes to quantify the five kinds of target pathogen single-stranded DNAs^[13]

尽管UCNP在超分辨成像方面的应用潜力是巨大的,但是它的发展局限也同样显著,使用UCNP进行超分辨率成像正面临巨大挑战。一方面,由于镧系元素的4f构型内跃迁被5s²5p⁶壳层屏蔽,UCNP的能级位置和激发、发射波长几乎是不变的^[45],所以UCNP

相较于有机染料和量子点不够灵活,如何拓展UCNP的吸收和发射能力,是该方法发展的关键之一。例如使用染料的三线态与UCNP的能级进行互动来扩大吸收光谱范围与效率就是热门发展方向之一^[60]。另一方面,受相对较大的颗粒尺寸和复杂的表面化学的限

制,UCNP通常需要抗原/抗体作为媒介进行内吞作用来实现摄取和细胞内递送,导致与荧光蛋白相比标记的特异性较低^[15]。

为了克服基于UCNP的超分辨率显微镜方法的局限性,进一步开发其在生物成像领域的潜力,对纳米颗粒进行深入研究迫在眉睫。首要目标是设计更小、更亮的UCNPs。理想的荧光纳米颗粒应当在生物应用中干扰最小,尺寸更小的UCNPs对标记靶标的空间功能影响更小,不仅可以穿越细胞器膜,而且具有更好的靶向特异性。然而,亮度和尺寸之间存在不可避免的权衡^[61]。UCNPs的亮度与所含掺杂离子的数量成比例地减少并且较小的尺寸会导致表面淬火增强和亮度降低^[62]。为了解决这些问题,迭代动力学建模、优化晶体主体和掺杂剂浓度,以及薄壳包裹纳米晶体等方法被相继提出^[63],成功地生成了亚10 nm范围内的UCNPs,并保持了其光学稳定性、高均匀性、亮度和单分散性。

其次是优化UCNP的表面修饰。UCNPs的表面改性对其在生理环境中的稳定性和标记亚细胞结构的特异性至关重要^[64-65]。目前,采用硅烷化、配体相互作用和配体交换反应等方法对UCNPs进行二氧化硅包覆,是制备稳定分散体并可进一步功能化的常见手段。表面修饰阶段需要将疏水表面配体替换为亲水性配体,以实现亲水性表面组合物。表面功能化的UCNPs通常需要与更多负电荷的配体分子结合,以增强其在生理环境中的稳定性。尽管在将UCNPs特异性标记到亚细胞结构上仍存在一些挑战,但近年来已取得了一些进展,包括生物偶联、细胞光遗传学和细胞内长期跟踪等应用,为更好性能的新策略和方法的研究铺平了道路。

除此以外,进一步开发UCNP的光响应能力也是发展的关键之一。例如,在2022年Schuck教授课题组^[66]发现了使用高功率1064 nm激光可以调制UCNP的光子效果,进而实现发光暗态,首次用UCNP实现了单分子定位成像(SMLM),分辨率高达亚埃米等级。

综上所述,镧系上转换纳米颗粒在超分辨率成像领域展现出巨大潜力。本文系统地探讨了UCNP结合超分辨成像的原理、应用和最新进展,强调了其在光学和生物学等领域的重要性。尽管取得了显著的成果,但仍然存在一些挑战,如颗粒形态、细胞标记、功率依赖等方面的瓶颈^[67]。未来的研究方向包括操纵上转换发射以实现更广泛的生物应用、合成具有明亮发射的较小UCNP以及集成多种成像模式等。克服这些挑战将促进更好地利用镧系上转换纳米颗粒在超分辨率成像中的优势,为生命科学研究以及微纳结构成像提供更为精准和深入的视角。

参 考 文 献

[1] Bloembergen N. Solid state infrared quantum counters[J].

- Physical Review Letters, 1959, 2(3): 84-85.
- [2] Auzel F. Upconversion and anti-Stokes processes with f and d ions in solids[J]. Chemical Reviews, 2004, 104(1): 139-173.
- [3] Ovsyakin V V, Feofilov P P. Cooperative sensitization of luminescence in crystals activated with rare earth ions [J]. Soviet Journal of Experimental and Theoretical Physics Letters, 1966, 4: 317-318.
- [4] Muhr V, Wilhelm S, Hirsch T, et al. Upconversion nanoparticles: from hydrophobic to hydrophilic surfaces [J]. Accounts of Chemical Research, 2014, 47(12): 3481-3493.
- [5] Esterowitz L, Noonan J, Bahler J. Enhancement in a Ho³⁺-Yb³⁺ quantum counter by energy transfer[J]. Applied Physics Letters, 1967, 10(4): 126-127.
- [6] Gnach A, Lipinski T, Bednarkiewicz A, et al. Upconverting nanoparticles: assessing the toxicity[J]. Chemical Society Reviews, 2015, 44(6): 1561-1584.
- [7] Suyver J F, Aebischer A, García-Revilla S, et al. Anomalous power dependence of sensitized upconversion luminescence[J]. Physical Review B, 2005, 71(12): 125123.
- [8] Xu L, Zhang J Z, Yin L F, et al. Recent progress in efficient organic two-photon dyes for fluorescence imaging and photodynamic therapy[J]. Journal of Materials Chemistry C, 2020, 8(19): 6342-6349.
- [9] Venkatakrisnharao D, Narayana Y S L V, Mohaiddon M A, et al. Two-photon luminescence and second-harmonic generation in organic nonlinear surface comprised of self-assembled frustum shaped organic microlasers[J]. Advanced Materials, 2017, 29(15): 1605260.
- [10] Auzel F. Multiphonon-assisted anti-Stokes and Stokes fluorescence of triply ionized rare-earth ions[J]. Physical Review B, 1976, 13(7): 2809-2817.
- [11] Zhou B, Shi B Y, Jin D Y, et al. Controlling upconversion nanocrystals for emerging applications[J]. Nature Nanotechnology, 2015, 10(11): 924-936.
- [12] Liu D M, Xu X X, Du Y, et al. Three-dimensional controlled growth of monodisperse sub-50 nm heterogeneous nanocrystals[J]. Nature Communications, 2016, 7: 10254.
- [13] Liao J Y, Zhou J J, Song Y L, et al. Preselectable optical fingerprints of heterogeneous upconversion nanoparticles[J]. Nano Letters, 2021, 21(18): 7659-7668.
- [14] Dong H, Sun L D, Yan C H. Energy transfer in lanthanide upconversion studies for extended optical applications[J]. Chemical Society Reviews, 2015, 44(6): 1608-1634.
- [15] Zheng W, Huang P, Tu D T, et al. Lanthanide-doped upconversion nano-bioprobes: electronic structures, optical properties, and biodetection[J]. Chemical Society Reviews, 2015, 44(6): 1379-1415.
- [16] Krämer K W, Biner D, Frei G, et al. Hexagonal sodium yttrium fluoride based green and blue emitting upconversion phosphors[J]. Chemistry of Materials, 2004, 16(7): 1244-1251.

- [17] Zhou J, Liu Q, Feng W, et al. Upconversion luminescent materials: advances and applications[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(1): 395-465.
- [18] Wang F, Liu X G. Upconversion multicolor fine-tuning: visible to near-infrared emission from lanthanide-doped NaYF₄ nanoparticles[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(17): 5642-5643.
- [19] Chivian J S, Case W E, Eden D D. The photon avalanche: a new phenomenon in Pr³⁺-based infrared quantum counters[J]. *Applied Physics Letters*, 1979, 35(2): 124-125. [LinkOut]
- [20] Liang Y S, Zhu Z M, Qiao S Q, et al. Migrating photon avalanche in different emitters at the nanoscale enables 46th-order optical nonlinearity[J]. *Nature Nanotechnology*, 2022, 17(5): 524-530.
- [21] Liu Y J, Lu Y Q, Yang X S, et al. Amplified stimulated emission in upconversion nanoparticles for super-resolution nanoscopy[J]. *Nature*, 2017, 543(7644): 229-233.
- [22] Hao S W, Shao W, Qiu H L, et al. Tuning the size and upconversion emission of NaYF₄:Yb³⁺/Pr³⁺ nanoparticles through Yb³⁺ doping[J]. *RSC Advances*, 2014, 4(99): 56302-56306.
- [23] Dong H, Sun L D, Wang Y F, et al. Photon upconversion in Yb³⁺-Tb³⁺ and Yb³⁺-Eu³⁺ activated core/shell nanoparticles with dual-band excitation[J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2016, 4(19): 4186-4192.
- [24] Qin W P, Liu Z Y, Sin C N, et al. Multi-ion cooperative processes in Yb³⁺ clusters[J]. *Light: Science & Applications*, 2014, 3(8): e193.
- [25] Zhou B, Yang W F, Han S Y, et al. Photon upconversion through Tb³⁺-mediated interfacial energy transfer[J]. *Advanced Materials*, 2015, 27(40): 6208-6212.
- [26] Wang F, Deng R R, Wang J, et al. Tuning upconversion through energy migration in core-shell nanoparticles[J]. *Nature Materials*, 2011, 10(12): 968-973.
- [27] Zuo J, Sun D P, Tu L P, et al. Cover picture: precisely tailoring upconversion dynamics via energy migration in core-shell nanostructures (angew. chem. int. Ed. 12/2018) [J]. *Angewandte Chemie: International Edition*, 2018, 57(12): 2979.
- [28] Hell S W, Sahl S J, Bates M, et al. The 2015 super-resolution microscopy roadmap[J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2015, 48(44): 443001.
- [29] 石神, 尹增山, 王龙. 暗通道与交叉通道多先验联合多光谱超分辨率算法 [J]. *光学学报*, 2022, 42(10): 1010001.
Shi S, Yin Z S, Wang L. Dark channel and cross channel based multi-prior combined multi-spectral super-resolution algorithm[J]. *Acta Optica Sinica*, 2022, 42(10): 1010001.
- [30] 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.
- [31] Willig K I, Harke B, Medda R, et al. STED microscopy with continuous wave beams[J]. *Nature Methods*, 2007, 4(11): 915-918.
- [32] Kuang C F, Li S, Liu W, et al. Breaking the diffraction barrier using fluorescence emission difference microscopy [J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 1441.
- [33] Han K Y, Kim S K, Eggeling C, et al. Metastable dark states enable ground state depletion microscopy of nitrogen vacancy centers in diamond with diffraction-unlimited resolution[J]. *Nano Letters*, 2010, 10(8): 3199-3203.
- [34] Deka G, Sun C K, Fujita K, et al. Nonlinear plasmonic imaging techniques and their biological applications[J]. *Nanophotonics*, 2017, 6(1): 149.
- [35] Lee C, Xu E Z, Liu Y W, et al. Giant nonlinear optical responses from photon-avalanching nanoparticles[J]. *Nature*, 2021, 589(7841): 230-235.
- [36] Wang B J, Zhan Q Q, Zhao Y X, et al. Visible-to-visible four-photon ultrahigh resolution microscopic imaging with 730-nm diode laser excited nanocrystals[J]. *Optics Express*, 2016, 24(2): A302-A311.
- [37] Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(37): 13081-13086.
- [38] 王冠晨, 陈同生. 活细胞中亚细胞器的超分辨结构特征 [J]. *中国激光*, 2022, 49(20): 2007203.
Wang G C, Chen T S. Super-resolution structural characteristics of subcellular organelles in living cells[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(20): 2007203.
- [39] 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.
- [40] Sahl S J, Hell S W, Jakobs S. Fluorescence nanoscopy in cell biology[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, 18(11): 685-701.
- [41] Drees C, Raj A N, Kurre R, et al. Engineered upconversion nanoparticles for resolving protein interactions inside living cells[J]. *Angewandte Chemie: International Edition*, 2016, 55(38): 11668-11672.
- [42] Yao C, Wang P Y, Li X M, et al. Near-infrared-triggered azobenzene-liposome/upconversion nanoparticle hybrid vesicles for remotely controlled drug delivery to overcome cancer multidrug resistance[J]. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 2016, 28(42): 9341-9348.
- [43] He M, Pang X C, Liu X Q, et al. Monodisperse dual-functional upconversion nanoparticles enabled near-infrared organolead halide perovskite solar cells[J]. *Angewandte Chemie: International Ed. in English*, 2016, 55(13): 4280-4284.
- [44] Wang F, Banerjee D, Liu Y S, et al. Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy [J]. *The Analyst*, 2010, 135(8): 1839-1854.
- [45] Zhan Q Q, Liu H C, Wang B J, et al. Achieving high-efficiency emission depletion nanoscopy by employing cross relaxation in upconversion nanoparticles[J]. *Nature*

- Communications, 2017, 8: 1058.
- [46] Chmyrov A, Keller J, Grotjohann T, et al. Nanoscopy with more than 100000 'doughnuts' [J]. *Nature Methods*, 2013, 10: 737-740.
- [47] Liang L L, Feng Z W, Zhang Q M, et al. Continuous-wave near-infrared stimulated-emission depletion microscopy using downshifting lanthanide nanoparticles[J]. *Nature Nanotechnology*, 2021, 16(9): 975-980.
- [48] Wu Q S, Huang B R, Peng X Y, et al. Non-bleaching fluorescence emission difference microscopy using single 808-nm laser excited red upconversion emission[J]. *Optics Express*, 2017, 25(25): 30885-30894.
- [49] Chen C H, Wang F, Wen S H, et al. Multi-photon near-infrared emission saturation nanoscopy using upconversion nanoparticles[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3290.
- [50] Chen C H, Liu B L, Liu Y T, et al. Heterochromatic nonlinear optical responses in upconversion nanoparticles for super-resolution nanoscopy[J]. *Advanced Materials*, 2021, 33(23): e2008847.
- [51] Liu Y T, Wang F, Lu H X, et al. Super-resolution mapping of single nanoparticles inside tumor spheroids[J]. *Small*, 2020, 16(6): e1905572.
- [52] Denkova D, Ploschner M, Das M, et al. 3D sub-diffraction imaging in a conventional confocal configuration by exploiting super-linear emitters[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3695.
- [53] Plöschner M, Denkova D, de Camillis S, et al. Simultaneous super-linear excitation-emission and emission depletion allows imaging of upconversion nanoparticles with higher sub-diffraction resolution[J]. *Optics Express*, 2020, 28(16): 24308-24326.
- [54] Bednarkiewicz A, Chan E M, Kotulska A, et al. Photon avalanche in lanthanide doped nanoparticles for biomedical applications: super-resolution imaging[J]. *Nanoscale Horizons*, 2019, 4(4): 881-889.
- [55] Shen S H, Du E, Zhang M, et al. Confocal rescanned structured illumination microscopy for real-time deep tissue imaging with superresolution[J]. *Advanced Photonics Nexus*, 2023, 2(1): 016009.
- [56] Liu B L, Chen C H, Di X J, et al. Upconversion nonlinear structured illumination microscopy[J]. *Nano Letters*, 2020, 20(7): 4775-4781.
- [57] Liu B L, Liao J Y, Song Y L, et al. Multiplexed structured illumination super-resolution imaging with lifetime-engineered upconversion nanoparticles[J]. *Nanoscale Advances*, 2022, 4(1): 30-38.
- [58] Ding L, Chen C H, Shan X C, et al. Optical nonlinearity enabled super-resolved multiplexing microscopy[J]. *Advanced Materials*, 2024, 36(2): e2308844.
- [59] Wang F, Wen S H, He H, et al. Microscopic inspection and tracking of single upconversion nanoparticles in living cells[J]. *Light, Science & Applications*, 2018, 7: 18007.
- [60] Garfield D J, Borys N J, Hamed S M, et al. Enrichment of molecular antenna triplets amplifies upconverting nanoparticle emission[J]. *Nature Photonics*, 2018, 12(7): 402-407.
- [61] Gargas D J, Chan E M, Ostrowski A D, et al. Engineering bright sub-10-nm upconverting nanocrystals for single-molecule imaging[J]. *Nature Nanotechnology*, 2014, 9(4): 300-305.
- [62] Kraft M, Würth C, Muhr V, et al. Particle-size-dependent upconversion luminescence of NaYF₄:Yb, Er nanoparticles in organic solvents and water at different excitation power densities[J]. *Nano Research*, 2018, 11(12): 6360-6374.
- [63] Ma C S, Xu X X, Wang F, et al. Optimal sensitizer concentration in single upconversion nanocrystals[J]. *Nano Letters*, 2017, 17(5): 2858-2864.
- [64] Sedlmeier A, Gorris H H. Surface modification and characterization of photon-upconverting nanoparticles for bioanalytical applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(6): 1526-1560.
- [65] Sun T Y, Li Y H, Ho W L, et al. Integrating temporal and spatial control of electronic transitions for bright multiphoton upconversion[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1811.
- [66] Lee C, Xu E Z, Kwock K W C, et al. Indefinite and bidirectional near-infrared nanocrystal photoswitching[J]. *Nature*, 2023, 618(7967): 951-958.
- [67] Zhou J J, Chizhik A I, Chu S, et al. Single-particle spectroscopy for functional nanomaterials[J]. *Nature*, 2020, 579(7797): 41-50.