

·特邀综述·

基于光场调控的高时空分辨率光学成像

李润丰¹, 施可彬^{1,2*}

¹北京大学物理学院人工微结构和介观物理国家重点实验室, 北京 100871;

²山西大学极端光学协同创新中心, 山西 太原 030006

摘要 光学成像以其非侵入性的特点被广泛应用于生物医学、物理和化学等领域。通过对光场时域和空域参数的调控,可以有效调制光的时序、波前、振幅、相位、色散等特性,从而获得具有高时空分辨率的光学图像。以光场调控原理为主线,综述近年来高时空分辨成像技术的研究进展。

关键词 物理光学; 成像系统; 光学成像; 超分辨; 光场调控

中图分类号 O439

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201939.0126010

High Spatiotemporal Imaging Based on Optical Field Engineering

Li Runfeng¹, Shi Kebin^{1,2*}

¹State Key Laboratory for Artificial Microstructure and Mesoscopic Physics, School of Physics, Peking University, Beijing 100871, China;

²Collaborative Innovation Center of Extreme Optics, Shanxi University, Taiyuan, Shanxi 030006, China

Abstract Optical imaging has been widely used in bio-medical, physical and chemical research fields due to its non-invasive characteristic. By adjusting the temporal and spatial parameters of the optical fields, we can effectively modulate the time sequence, wavefront, amplitude, phase, dispersion and other characteristics of the light, and obtain the optical image with high temporal and spatial resolution. On the basis of the principle of optical fields engineering, the recent progresses in the research of high temporal-spatial resolution imaging technology are reviewed.

Key words physical optics; imaging systems; optical imaging; super-resolution; optical field engineering

OCIS codes 260.5430; 110.0180; 110.1085; 110.1080

1 引 言

光学成像的发明源于人们对微观世界的好奇与探索。得益于光学探测的非侵入性特点,光学成像一直是生物医学、物理和化学等领域中的重要技术平台,对成像技术前沿的探索也是重要的光科学领域之一。

传统远场光学成像系统的空间分辨率受限于衍射极限。1873年,德国物理学家恩斯特·阿贝^[1]基于实验结果与物理原理对衍射极限分辨率进行了定义。在光学显微镜成像过程中,点光源发出的光经成像系统后会在探测处形成特定的光场分布,其强度分布可用点扩展函数(PSF)表示,该函数体现了显微镜的空间分辨特性。在衍射极限系统中,点扩

展函数横向的半峰全宽(FWHM)可表示为 $d_{xy} = 0.61\lambda/NA$ 。其中: λ 为光的波长; NA 为物镜数值孔径($NA = n \sin \alpha$, n 为物镜与观察物间介质的折射率, α 为光学系统孔径角的 $1/2$)。轴向点扩展函数的值通常是横向的 $2\sim 3$ 倍。因此,在传统的光学成像系统中,空间分辨率极限通常在 $\lambda/2 \sim \lambda/3$ 之间。

近年来,在生物医学、纳米材料等领域的推动下,不断提高时间、空间分辨率是远场光学成像的发展趋势。其中:空间分辨率突破了衍射极限,向亚波长及深亚波长方向推进;在时间分辨率上,对于不同的成像信号产生机制和研究对象,例如针对生物医学活体微观成像以及高动态物理化学过程表征,成像速度可以达到 $10^2 \sim 10^{11}$ frame/s。随着激光和

收稿日期: 2018-09-03; 修回日期: 2018-10-21; 录用日期: 2018-10-30

基金项目: 国家自然科学基金(91750203)

* E-mail: kebinshi@pku.edu.cn

光电技术的发展,越来越多的研究表明,基于先进的光场调控技术,对光的时序、波前、振幅、相位以及色散等进行调制,可以打破原有的光学远场衍射极限对光学系统极限分辨率的限制。同时,基于新型光场调控的成像系统,也可以极大地提高信号的探测效率,从而进一步提高成像速度。本文从光学技术角度,总结了近期报道的基于光场调控的远场高时空分辨成像技术。这些研究包括:基于激发光束开关时序调制,对单个荧光分子进行定位的随机光学重建显微技术(STORM)^[2]、光激活定位显微技术(PALM)^[3]、荧光光激活定位显微技术(FPALM)^[4];基于超快激光技术,对色散、时间-光谱进行编码调控的超高速成像^[5];基于照明光波前调制,实现快速成像的光片显微技术^[6]和受激发射耗尽(STED)原理的超分辨显微技术^[7-8];基于振幅、相位调制的结构光照明显微技术(SIM)^[9]和衍射断层成像^[10];与偏振调控相关,基于偶极子辐射方位角的超分辨率成像技术^[11-12]。这些成像研究领域的分支众多,成像信号产生包括荧光和非标记等多种机制,本文主要以光场调控原理为主线,对近年来出现的高时空分辨成像方法进行总结和讨论。

2 基于光场时域参数调控的高时空分辨率成像

光场特征参数从广义上可分为时域和空域。随着光电调制、探测技术的日益成熟,对光场进行时域调制的速度和精度越来越高。同时,随着超快脉冲激光技术的发展,尤其是飞秒、皮秒激光技术的成熟,对激光光场调控的维度增加。例如,对超快脉冲中啁啾(时域色散)、光谱以及色差(空域色散)的操控和利用,进一步推进了高时空分辨成像的研究。本小节主要讨论基于光场时域调控衍生出的新型成像技术。

2.1 基于激发光束开关时序调制的高空间分辨率成像

生物体结构由位置各异的生物分子组成,同样地,荧光图像也是由不同的高亮度荧光团分子构成的。通过对样品中的荧光团分子进行精确定位,可以获得高质量的荧光图像。单个荧光分子的高精度定位通常用于生物物理实验中^[13-14],其精度可表示为

$$\Delta_{\text{loc}} \approx \frac{\Delta}{\sqrt{N}}, \quad (1)$$

式中: Δ 为点扩展函数的标准差; N 为收集到的光子数量。单分子定位精度远高于衍射极限,可以达到纳米量级^[15],甚至可达埃米量级^[16]。然而,荧光标记的生物样品中常常含有大量的荧光团分子,它们之间的距离非常近,产生的荧光图像相互重叠,无法对单个荧光分子准确定位,因而不能获得整个生物样品的超分辨率图像。解决这一问题的关键是在衍射极限区域内提高可分辨荧光分子的数量。

2006年,基于时间调制和单分子定位的光激活定位超分辨率成像技术的概念由三个研究小组独立构思和实现,并分别命名为STORM^[2]、PALM^[3]和FPALM^[4]。类似于绘画中的“点画法”,研究人员利用时间调控荧光分子的发光状态,使衍射受限区域内的荧光分子在不同的时间点被激活,单独成像,精确定位,并随后失活。由于在给定的时间内激活发光的荧光分子数量可以精确控制,只有一部分荧光分子处于荧光态,所以彼此之间不产生重叠信号,分辨率不会受到影响。通过反复迭代激活和成像过程,更多荧光团的位置得以确定,将这些时间点不同的几千个图像序列叠加,可以获得高分辨率图像,原理如图1所示。图1中,蓝色图像为单个荧光分子,红色图像为整个分子的位置信息。

上述单分子定位显微术(SMLM)能够获得超

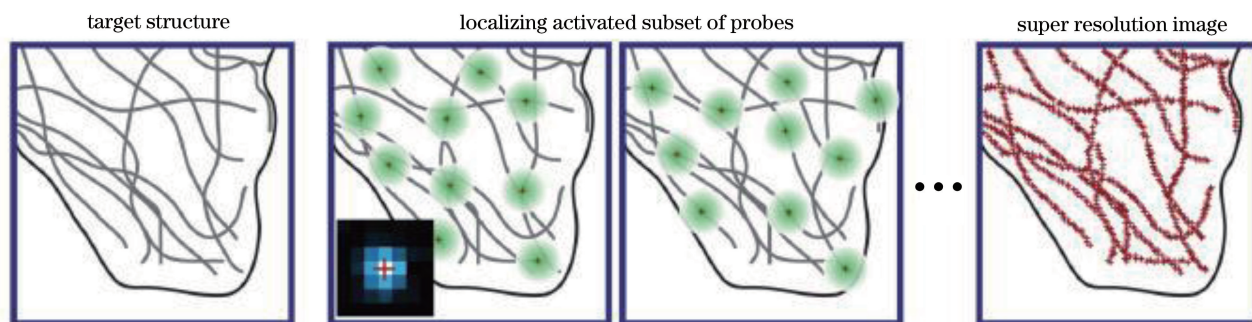


图1 STORM、PALM、FPALM的基本原理^[17]

Fig. 1 Principle of STORM, PALM, and FPALM^[17]

分辨率成像的关键在于选择了合适的荧光物质,例如 STORM 技术采用光开关花青素染料,该染料可在荧光态和暗态之间发生可逆循环,发光状态由照射的光波长控制。Bates 等^[18]进一步利用荧光开关中染料分子的组合(例如 Cy3-Cy5),实现了超分辨的多色成像。这是因为 Cy3 作为激发物质(activator)对绿光(532 nm)敏感,Cy5 作为报告物

质(reporter)对红光(657 nm)敏感。采用红光照射染色后的待观察样品,Cy5 会在最初发射荧光后迅速转化为暗态,改用绿光照明激发 Cy3 后可使 Cy5 处于荧光态。在观察时用红光照明,可使 Cy5 分子发射荧光。通过控制绿光光强,可以线性调控 Cy5 激发的数量。荧光态和暗态间的循环可以重复上百次,直至荧光染料发生光漂白。

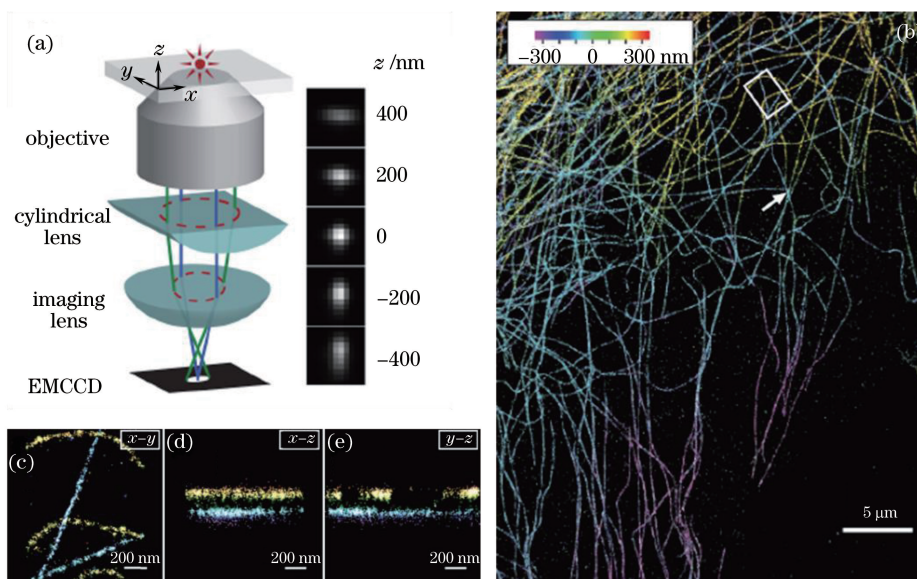


图 2 3D-STORM 结构及成像^[19]。(a)结构示意图;(b)成像效果(z 方向深度用颜色表示);(c)~(e)成像效果图中方框区域不同截面的成像

Fig. 2 Schematic and images of 3D-STORM^[19]. (a) Scheme of 3D-STORM structure; (b) 3D-STORM image(z -direction depth is represented by color); (c)-(e) x - y , (d) x - z , (e) y - z cross-sections of the cell outlined in 3D-STORM image

这类基于时域调控的超分辨率荧光显微技术具有很多发展与应用。在光激活定位主要原理的基础上,将其进一步与空间光场调控相结合可以实现三维超分辨率成像。2008年,Huang 等^[19]设计了一种 3D-STORM 结构,如图 2 所示,他们在光学系统的物镜和成像透镜中间插入柱面透镜,使平均焦平面上的点成像为圆形,高于或低于平均焦平面的点呈现的图像变为椭圆形,这使得研究人员可以从椭圆度和图像质心的横向位置上同时测量其轴向坐标。该方法在 z 方向几百纳米深度上实现了约 25 nm 的横向分辨率和约 50 nm 的轴向分辨率。结合 z 方向扫描技术(z -scanning)可以对整个哺乳动物细胞(几微米厚)成像^[20]。同年,Juette 等^[21]使用双焦平面成像,使发射光被分离并分别成像,根据荧光分子图像的离焦形状确定 z 坐标,实现了 30 nm \times 30 nm \times 75 nm 的三维分辨率。2009年,Pavani 等^[22]通过设计双螺旋形点扩展函数,实现了三维超分辨率成像。在多色成像方面,利用光开关荧光染料对不同波长光的感光性,可以实现在生物

样品上的多色成像^[18,23]。在活细胞成像方面,Shroff 等^[24]实现了活细胞中黏着斑蛋白的亚衍射极限成像,时间分辨率可达 25~60 frame/s。Hess 等^[25]以 40 nm 的分辨率观察到了血凝素在质膜上的扩散和聚集,Manley 等^[26]则利用该技术监测膜蛋白扩散特性的空间图。然而,受限于繁杂的迭代过程,这类技术用于活细胞成像时的时间分辨率不高。

近年来,这项技术又有了很大进展。首先,在成像速度上,2011年,Zhuang 研究组利用特殊的荧光开关获得了二维 0.5 s、三维 1~2 s 的时间分辨率^[27];2012年,Zhu 等^[28]利用稀疏信号复原技术,使用压缩感知分析荧光点高度重叠的图像,增强了处理高密度荧光团的能力,可以以 3 s 的时间分辨率成像。在成像质量方面,2012年,Xu 等^[29]设计了双物镜结构的 STORM 显微镜(如图 3 所示),通过双物镜增强光子的探测能力,使分辨率进一步提高到横向小于 10 nm、轴向小于 20 nm;2015年,Tehrani 等^[30]通过遗传算法与自适应光学相结合,对光学组件缺陷、玻片与样品间折射率不匹配等造

3 基于光场空域参数调控的高时空分辨率成像

光场空域参数指的是光场随空间变化的物理量,常见参数有光场形状、振幅、相位波前、偏振等。对这些空域参数的调控可以直接影响成像系统的响应函数,实现对成像时空分辨率的提高。在远场光学成像系统中,提高成像速度的普适性原理一般是采用宽场照明成像,替代激光点扫描架构。由此,多种基于宽场照明架构的调控技术不断涌现。提高空间分辨率在本质上就是要扩大光学成像系统的空间频率采样带宽,此目标可以通过修改系统的点扩展函数实现,例如 STED 点扫描显微。或者,类似于近场光学系统中对倏逝波(即高空间频率信息)的放大,在光学成像中用高频外差采样的方法扩大系统的探测带宽,例如结构光显微技术。下面,将对这些成像系统展开描述。

3.1 基于空间频率采样调控的 SIM 技术

SIM 技术是目前最主流的光学超分辨率成像技术之一,其主要优点在于其能在宽场照明架构下同时实现超衍射极限分辨成像。此外,可以通过多种技术方案实现超分辨率三维光学成像^[38-39],这些技术包括二维 SIM(2D-SIM)、三维 SIM(3D-SIM)、线性 SIM 和非线性 SIM 技术等。在实际成像中,SIM 技术对照明光的利用率很高,可以高效率地收集和检测荧光光子,同时还可以最大限度地减小激发荧光所需的激发功率。高成像质量与高成像速度的结合,使 SIM 技术成为目前最适合活体细胞成像的技术之一。SIM 显微镜与普通宽场显微镜的成像效果对比如图 5 所示。

1998 年,Heintzmann 等^[41]首次提出结构光照明的概念,并将其应用于荧光成像,他设计的横向调制激发显微镜(LMEM)可使横向分辨率提升至约 100 nm。Gustafsson^[38]在 2000 年提出了包含矩阵描述和加权平均方法的图像重建算法,首次通过实验验证了 SIM 的分辨率是普通宽场显微镜的 3 倍。2005 年,Gustafsson^[9]将饱和过程的概念引入 SIM 中,提出了饱和 SIM,该显微镜基于荧光非线性响应特性,增加了更高阶的空间频率,获得了横向 50 nm 的分辨率。在三维空间成像方面,Stemmer 小组首先发表了关于三维 SIM 的概念性论文,提出了采用 SIM 在三维空间获得分辨率增强的理论方案^[42]。这一方案由 Gustafsson 等^[39]在 2008 年通过实验论证,他所提出的三维 SIM 横向和轴向分辨

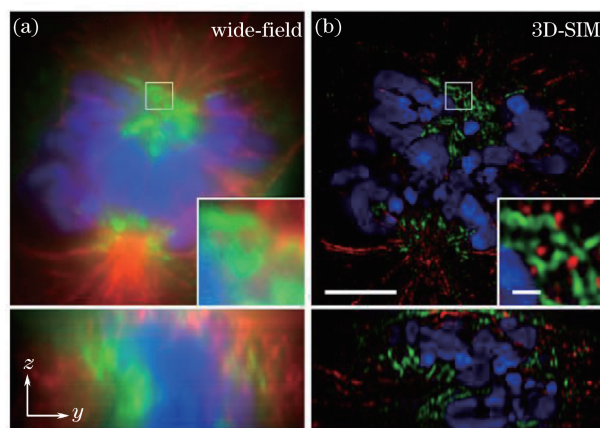


图 5 对老鼠 C2C12 细胞的成像效果^[40]。(a)传统宽场显微镜成像;(b) 3D-SIM 成像

Fig. 5 Images of mouse C2C12 cells^[40].

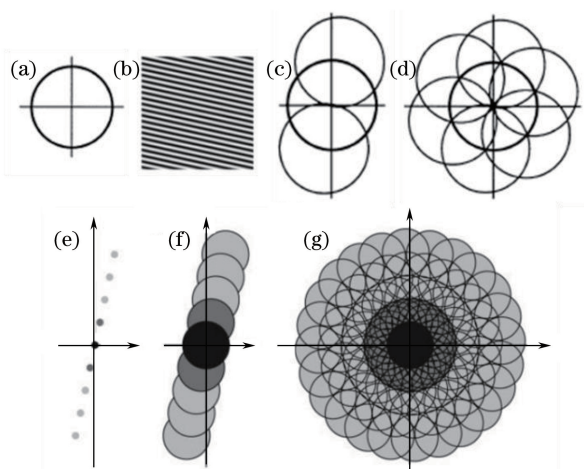
(a) Conventional wide-field image; (b) 3D-SIM image
率都是原荧光显微镜的两倍。

基于阿贝衍射极限理论,通过光学系统成像的最高空间频率可表示为

$$k_0 = 2NA/\lambda_{em}, \quad (2)$$

式中: λ_{em} 为观测光波长。样品所包含的信息在频域上的可探测范围如图 6(a)所示(以原点为圆心, k_0 为半径),传统显微镜无法分辨可探测范围以外的信息。SIM 的原理是用强度正弦(或余弦)调制如图 6(b)所示的结构光来激发荧光样品,则结构光照明下的空间频谱可扩展至 $k_0 + k_1$ (k_1 为结构光频率)。这样一来,图像的空间频谱包含了衍射极限外的高频信息,因为 k_1 的最大值不超过 $2NA/\lambda_{ex} \approx k_0$ (λ_{ex} 为激发光波长),所以在线性 SIM 中,新的分辨率带宽极限最大约为 $2k_0$,如图 6(c)所示。通过改变结构光照明图案的取向和相位,可以实现多方向角的线性 SIM 频谱拓展。当照明图案中包含多个频率分量时,如图 6(d)所示,原点、 $\pm k_1$ 、饱和或非线性效应产生的低次谐波会分别产生对应的可观察区域,如图 6(e)所示,分辨率就会超过 $2k_0$ 。通过改变照明图案的取向可以获得如图 6(f)所示的多方位角的非线性 SIM 频谱拓展。

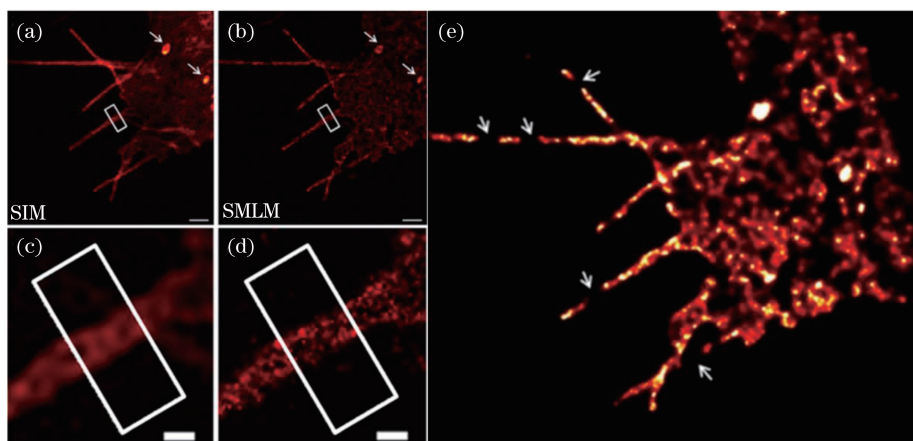
SIM 技术在三维成像方面也有着广泛的应用,这得益于其良好的层析特性。自 2008 年 Gustafsson 等通过实验论证了三维结构光照明的可行性以来,研究人员做了很多尝试。2012 年, Sonnen 等^[43]采用 3D-SIM 系统分析了人类中心体在不同细胞周期阶段的空间结构,他们采用的 3D-SIM 系统的每个平面包含 15 个像(5 个相位、3 个角度),实现了对细胞器的亚微米至微米深度的三维

图 6 SIM 技术原理示意图^[38-39]Fig. 6 Diagram of the principle of SIM^[38-39]

超分辨率成像。2015 年, Li 等^[44]利用非线性 SIM 系统实现了对活细胞的三维快速成像, 其空间分辨率接近 60 nm, 但受限于其成像过程中原图像较少、信噪比较低等因素, 重建图像的质量受到了一定影响^[45-46]。

重建算法作为 SIM 技术的关键, 一直以来受到了研究人员的广泛关注。2013 年, Wicker 等^[47]提出了利用互相关迭代精确获取图像相位信息的重建算法, 精度小于 $\lambda/100$ 。同年, Wicker^[48]提出了无需迭代的优化算法, 该算法不仅重建速度更快, 而且精度提升至小于 $\lambda/500$ 。近年来, 涌现出了大量的 SIM 重构软件, 但这些软件中的大部分目前只能完成二维 SIM 的重建, 不适合用于三维 SIM 的复杂重建^[49-50]。

由于 SIM 技术是一种宽场成像技术, 因而易与其他一些超分辨率成像技术相结合, 并且这种结合有助于提高 SIM 的分辨率。2013 年, Rossberger 等^[51]将 SIM 与 SMLM 相结合, 设计了如图 7 所示的高分辨率荧光显微镜, 它可以识别在单分子定位以及 SIM 图像重建过程中产生的伪像, 还可以用于观察 HEK293 细胞的结构细节。2015 年, Mönkemöller 等^[52]通过将 3D-SIM 的快速成像与 SMLM 的高分辨率相结合, 研究了肝窦内皮细胞的超微结构。

图 7 HEK293 细胞的 (a)SIM 像和 (b)SMLM 像; (c)图 (a) 所对应的细节; (d)图 (b) 所对应的细节; (e)SIM 与 SMLM 相结合的成像效果^[51]Fig. 7 SIM image and (b) SMLM image of HEK293 cells; (c) details corresponding to Fig. 7(a); (d) details corresponding to Fig. 7(b); (e) imaging effect of combination of SIM and SMLM^[51]

结构光显微不仅可以用于荧光成像, 对于非标记显微成像, 例如记录线性散射光场的全息三维成像、非线性拉曼成像等体系, 近年来也逐渐开始结合结构光照明的思路。在传统全息成像的基础上, 将宽场照明光进行大角度倾斜并采样环绕扫描形成的光学衍射断层成像 (ODT)^[10], 本质上就是利用光学系统的最大数值孔径, 即最高空间频率实现样品散射信号的采样, 可以对样品的三维折射率分布进行精准恢复。成像分辨率极限和结构光成像类似, 优于衍射极限分辨率的两倍。并且, 与荧光成像相比,

ODT 系统探测激光线性散射光时, 对探测 CCD 灵敏度的要求低, 对样品的光毒性小, 成像速度快, 可用于活体细胞成像。在具有特异性成像功能的拉曼/相干拉曼成像中, 也逐渐有研究人员提出与结构光照明激发相结合的研究方案^[53], 相信结构光实现超分辨的科学思路还将在更多的成像模式中得到应用。

3.2 基于照明光场形状调控的光片显微技术

超分辨率显微技术可以在空间和时间上对微生物进行准确成像, 但当待测微生物发生位移时, 例如

成像对象为胚胎生长^[6]或微生物运动^[54]时,往往需要实时高速成像,因此光片显微技术应运而生。

光片显微技术以宽场显微镜为基础,对光的波前进行调控,用层状光从侧面照射样品,确保信号仅来自聚焦区域,避免焦平面外的样品发出荧光,影响成像对比度。高速照相机在样品的上部或下部收集产生的荧光信号,按顺序将三维样品逐层成像为二维图像,每个平面内的成像过程相互独立,从而显著提高了成像速度。由于光片显微镜不需要照射待观察物体的整个样本,每次只激发一个层面上的荧光分子,因而大大降低了激光照射引起的光毒性。光片显微技术是目前荧光信号收集效率最高的一种成像方式。这种温和、快速的成像技术,能够实时捕捉细胞或亚细胞尺度上的动态变化,适合活体生物医学样本的低光毒、长时程观测。

第一台现代意义上的光片显微镜诞生于2004年,Huisken等^[55]将其命名为“选择平面照明显微镜”(SPIM)。SPIM的结构示意图如图8所示,SPIM利用柱面镜聚焦产生的光片照亮样品,高速照相机与光片垂直,收集样品上产生的荧光。通过旋转样品,可以获得3D图像。Huisken等证明了SPIM可以对整个发育中的胚胎进行高速荧光成像,同时对胚胎造成的光损伤非常小。然而,早期的光片显微镜有着明显的不足,产生的数据中存在条纹状伪影。这些条纹伪影源自于组织对光的折射、散射和吸收。在相对透明的样本(如斑马鱼胚胎)中,这些伪影的影响较小,但在光学密度高的样本(如果蝇)中,影响就会非常严重。后来,Huisken等^[56]对SPIM进行改进,设计出了多向SPIM(mSPIM)。mSPIM通过使光片在焦平面内旋转,可以均匀照亮样品,从而减少了条纹伪影。

2008年,Keller等^[6]设计了数字扫描光片显微镜(DSLM),其原理如图9所示。通过激光扫描器、 f -theta透镜和聚焦透镜的组合,可以将激发光聚焦为激光束照射到样品上,激发光线进一步在成像面上扫描,以获得虚拟光片。其中, f -theta透镜可以将激光扫描装置发出激光的角度转化为光线的竖直位移,代替了传统光片显微镜中光片的竖直移动。Keller等^[6]记录下了24 h内斑马鱼胚胎中细胞核的运动。在成像过程中,研究人员采集了数百万个细胞核的位置信息,并对每个胚胎中发生分裂的细胞进行追踪,构建了庞大的数据库。与SPIM相比,DSLIM的照明更均匀,减少了条纹伪影,具有更高的对比度。并且,DSLIM可以通过增加光的强度来

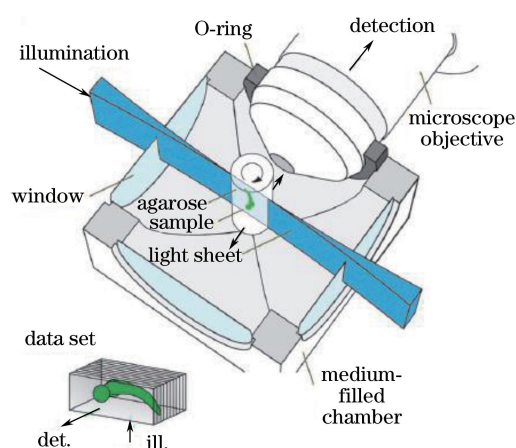


图8 SPIM结构示意图^[55]

Fig. 8 Scheme of SPIM^[55]

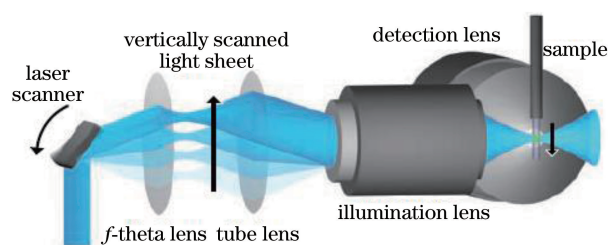


图9 DSLM结构示意图^[6]

Fig. 9 Schematic diagram of DSLM^[6]

提升图像的对比度,但这会对荧光团带来一定的光毒性。

为了实现光片显微镜的高分辨率成像,研究人员进行了各种尝试。首先,高数值孔径的光学器件有利于提高光的收集效率和横向分辨率,并且,高数值孔径照射可以降低光片厚度($d = \lambda/2NA$),获得优异的轴向分辨率。但是受空间限制,这类庞大的高数值孔径镜片不适宜用来成像。为克服这一局限,Gebhardt等^[57]设计了一种反射光片显微镜(RLSM)(如图10所示),从顶部竖直向下入射的椭圆形激光束经原子力悬臂镜反射后,产生平行于成像平面并靠近样品表面的层状光片(厚度为 $1 \mu\text{m}$)。该装置提高了显微镜的分辨率与对比度,并且能够以高达100 Hz的时间分辨率对单个荧光蛋白(FP)进行成像。但这种反射光片显微镜在细胞更换时需要重新聚焦,不利于实际操作。Li等^[58]提出了另一种单物镜SPIM,称为轴向平面光学显微镜(APOM),该显微镜可对大型生物组织表面下数百微米的结构进行快速、高对比度的三维成像。

另一点值得注意的是,成像分辨率往往与视场(FOV)大小相矛盾,光片的大小限制了视场。为了解决这一问题,Planchon等^[59]使用贝塞尔光束代替高斯光束产生光片,使视场半径扩大到 $40 \mu\text{m}$ 。为

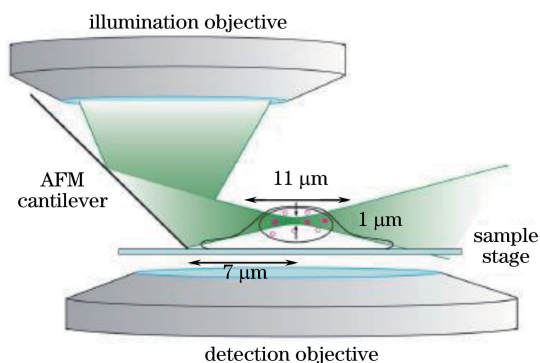


图 10 RLSM 结构示意图^[57]

Fig. 10 Schematic diagram of RLSM^[57]

了追求更理想的光片, 研究人员进一步将结构光照明技术路线与光片显微镜相结合, 例如使用栅格光片显微镜^[60-61], 获得了更大的视场, 同时以秒或亚秒的间隔实现三维动态成像。

在成像速度方面, Theer 等^[62]提出 π -SPIM, 其装置比较简单, 倾斜的光片使得成像能够在盖玻片表面进行, 无需安装特定的样品。Theer 等利用该系统以亚秒级时间分辨率展示了酵母细胞的内吞作用。Mickoleit 等^[63]开发了一种高速光片显微镜, 它可以以 400 frame/s 的速度同步捕获斑马鱼心脏的三维动态图像。

在成像质量方面, 2010 年, Keller 等^[64]将数字扫描光片显微镜与结构光照明显微镜相 (DSLMSI) 相结合, 其特点在于结构光图案频率可连续调控, 该方法将样品的背景噪声与荧光信号区分开, 去除了离焦光, 并对成像的对比度进行了优化, 实现了高质量高速度成像。2015 年, Masson 等^[65]利用自

适应 SPIM, 解决了光片显微技术在研究复杂样品时的折射率失配问题, 达到了补偿像差和提高成像质量的目的, 并成功地将此技术应用于厚样品 (如细胞肿瘤球体) 的高分辨率深度成像。

3.3 基于相位波前调控的 STED 显微镜

STED 显微镜的概念最初由德国科学家 Stefan 于 1994 年提出^[7], Stefan 随后在实验中对其进行了证明^[8]。STED 显微术结合了光场波前调控和 STED 的物理原理, 如图 11 所示。简单来说, STED 显微术使用两束照明光, 一束是激发光, 光斑分布如图 11(b) 所示, 使得衍射斑范围内的荧光团的电子从基态 S_0 跃迁到激发态 S_1 。另一束光为损耗光, 用于抑制位于激发态的外围荧光团的荧光发射。这种抑制是通过受激发射实现的: 当处于激发态 S_1 的荧光团遇到与激发态、基态之间的能量差相匹配的光子时, 可以在发生自发荧光发射之前通过受激发射恢复到基态, 而位于衍射斑中心的激发态电子则不受损耗光的影响, 最终被探测器接收。这一过程实际上是通过使荧光团的空间选择性失活来减小有效发光面积, 从而获得超越衍射极限的高分辨率。由于 STED 光是环形的, 其中心光强趋于零, 周围光强非零, 通过提高受 STED 激光的功率, 使能够发出荧光信号的区域被限制在中心区域的极小范围内, 因而点扩展函数的有效宽度可以足够小。通过扫描不同的区域, 即可获得样品的超分辨率图像。

在 STED 显微镜的光路中, 通常通过插入相位掩模来调制其相位的空间分布, 这样的相位掩模

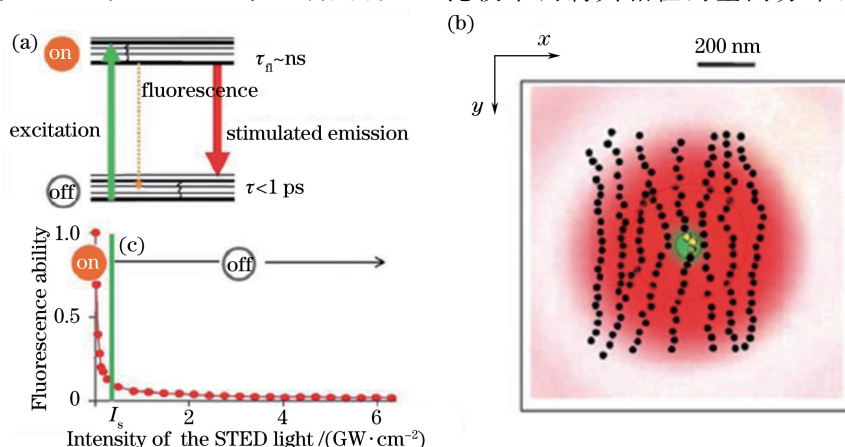


图 11 STED 显微术的超分辨原理^[66]。(a) 荧光分子状态转换; (b) 衍射光斑中心 (绿), 损耗光照射区域 (红); (c) STED 光强 $I \geq I_s$ 时, 荧光分子从激发态回到基态

Fig. 11 Super resolution principle of STED^[66]. (a) Molecules transition; (b) position of the donut center (green), under STED illumination (red); (c) for intensities of the STED light (red) equaling or in excess of the threshold intensity I_s , molecules are effectively switched “off”

可以在 xy 平面中产生环形 STED 图案,并可获得约 30 nm 的横向分辨率^[67]。STED 也可与 4Pi 显微镜结合(STED-4Pi),实现 30~40 nm 的轴向分辨率^[68]。实际上,STED 显微镜的分辨率由衍射光斑中心区域的大小决定,其直径 d 可表示为

$$d \approx \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + I/I_s}}, \quad (3)$$

式中: I 为损耗区域光强; I_s 为中心激发区域光强。 I/I_s 的值越大, d 就越小,分辨率将随之提高。在特定情况下,STED 显微镜的横向分辨率可以低至 6 nm^[69]。

STED 显微术作为一项成熟的超分辨率成像技术,已广泛应用于生物样品的成像研究中,例如研究荧光标记的抗体^[70]或利用荧光蛋白进行基因标记成像^[71]。2008 年,Westphal 等^[72]利用 STED 显微镜对海马神经元突触的囊泡运动进行了高分辨率成像,其成像速度也达到了人眼频率(28 frame/s)。Berning 等^[73]和 Willig 等^[74]采用竖直照明的 STED 显微镜实现了对小鼠的活体成像,如图 12 所示,以小于 70 nm 的分辨率,可以实时捕捉到麻醉小鼠大脑视皮层中神经元的动态变化。

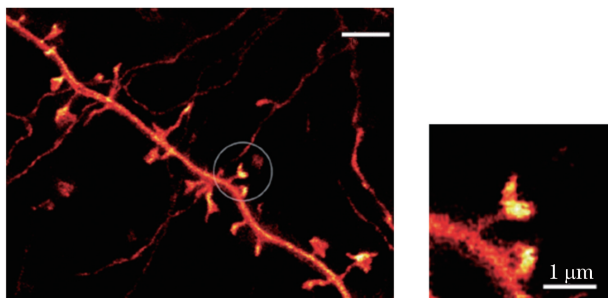


图 12 活鼠大脑的 STED 成像及其局部放大^[70]
Fig. 12 STED nanoscopy in living mouse brain and local enlarged image^[70]

在三维空间成像方面,将轴向分辨率和横向分辨率结合,可以使 STED 显微镜实现三维超分辨率成像。例如,在 xy 和 z 模式下同时应用 STED^[75]或将 xy -STED 与 STED-4Pi^[76]组合,可以在所有三个维度上同时获得超分辨率。组合两个 STED 图案的主要障碍是两个 STED 激光器之间的干扰,这可以通过在两个 STED 脉冲之间引入时间延迟^[75]或通过使用两个独立的激光器作为光源^[76]来消除。2008 年,Schmidt 等^[77]证明 STED 显微镜可以实现 40~45 nm 的各向同性空间分辨率,并可观察到线粒体外膜的中空形状^[45]。随后,他们将 3D-STED 显微镜的分辨率进一步提高至 30 nm。2016 年,

Danzl 等^[78]对海马体大脑切片进行了三维 STED 成像,展示了神经元的树突肌动蛋白结构,其效果如图 13 所示。

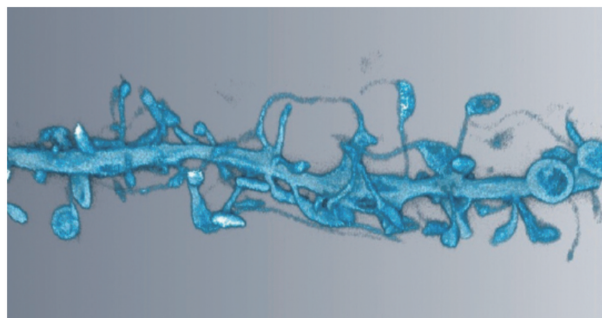


图 13 活鼠海马体大脑切片的 3D-STED 成像^[78]
Fig. 13 3D-STED nanoscopy of a living hippocampal brain slice (mouse)^[78]

在多色成像方面,可以使用具有不同激发波长和发射波长的荧光团实现多色 STED。双色 STED 可以用两对激发和损耗激光器实现,激发和损耗的波长可以跨越蓝色到近红外范围^[79]。另一种方法是使用特殊的染料,使两个荧光团可以共享相同的 STED 激光,但可以根据它们的不同激发波长来区分^[76]。

自 2003 年以来,Hell 研究组总结了 STED 的原理,提出并发展了基于可逆饱和光转移(RESOLFT)过程^[80-82]的超分辨率成像技术。不同于 STED,RESOLFT 不需要使用强损耗光,而是利用光开关荧光探针的荧光态、暗态的可逆转化特性,代替了 STED 中的激发态和基态。Stefan 认为这类技术的成像过程其实就是“开”与“关”的状态转换^[66],通过对状态不同的分子进行区分来实现超分辨率成像。与 RESOLFT 类似的还有基态耗尽显微术(GSD)^[83-85]等,相比于 STED,GSD 的优点在于只需要较低的激光能量即可实现超分辨,这一优点为大视场、低功率的成像提供了便利。Chmyrov 等^[86]采用 RESOLFT 技术对肾脏表皮细胞的角蛋白纤维进行了宽视场超分辨率成像,在 2 s 内同时记录下了超过 100000 个信息点(如图 14 所示)。

STED 成像可以实现超分辨的重要原因就是存在一种信号饱和/淬灭机制,并与光场调控相结合。因此,类似思路可以进行扩展,即在任何成像系统中,只要找到探测信号形成饱和或淬灭的光学机制,即可以采用与 STED 相同的技术路线突破衍射极限。利用碳基低维材料的饱和吸收特性,Cheng 研究组基于非标记饱和吸收信号实现了超分辨率成像^[87],在一些特殊的材料体系中,也可以利用拉曼

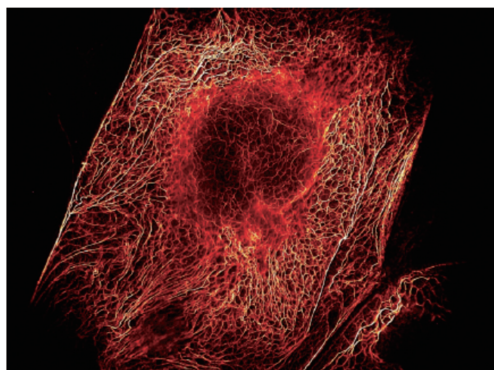


图 14 RESOLFT 技术在 2 s 内记录下的 114000 个信息点^[86]

Fig. 14 114000 “donuts” recorded by RESOLFT nanoscopy within two seconds^[86]

信号的基态耗尽效应^[88]实现自发拉曼超分辨率成像。不仅在成像这一信息获取技术中,在激光微纳直写信息记录研究领域,采用类似 STED 的光湮灭效应^[89],也可以实现超越光学系统衍射极限的空间加工精度。基于 STED 成像原理,相信还会衍生出多种新型成像技术及其重要应用。

3.4 基于偏振调控偶极子辐射方位角的超分辨率成像

不同于以上讨论中对光场波前和相位的调控,光场的偏振在信号激发和接收中占有重要地位。例如,偏振是荧光的基本物理特性,荧光偏振与发光基团的偶极子取向有关,这一特性最早由 Jean 等于 1926 年发现。但是,不同于荧光分子的其他特性(如寿命、光强等),偏振特性极少被运用于光学显微或超分辨率成像中,甚至关于偏振能否实现超分辨率成像也曾为研究人员所质疑。

传统的荧光偏振显微镜(FPM)在过去几十年中不断发展。首先,在偏振的产生和探测方式上,由最初的手动或机械切换,发展到目前可以通过光电器件实现快速偏振调制和同步探测。其次,FPM 也具备了更快的成像速度和更高的成像质量,并可以与多种成像模式相结合,如宽场^[90-91]、共焦^[92-93]、双光子共焦^[94]、全内反射荧光^[95]、光漂白后荧光恢复^[96]等。但当多个分子位于衍射极限内时,FPM 需要开发适用于超分辨率成像的新思路。

事实上,超分辨率成像的根本思想在于通过一定的标准将荧光分子进行分离。基于这一点,越来越多的研究人员开始在荧光偏振超分辨率成像方面进行尝试。基于荧光偏振或偶极子取向实现光学超分辨的步骤可以概括为:首先对入射的激光进行偏振调制,然后对观察到的数据进行解调,解调出强度

和偏振信息,最后获得超分辨率图像。偶极子可以用于模拟发光基团的激发吸收和荧光发射,当被偏振光激发时,与偏振光电矢量平行排列的偶极子将具有最高的吸收概率,该吸收概率与 $\cos^2\theta$ 成正比(θ 为吸收偶极子取向和偏振方向之间的交角)。偶极子发射的荧光也是偏振的,沿发射方向具有最大的偏振分量,其强度分布与 $\cos^2\theta'$ 成比例(θ' 为发射偶极子取向与偏振方向之间的交角)。根据荧光吸收或发射的各向异性,可以测量发光基团的偶极子取向。通过偶极子的取向可以更进一步揭示发光基团的位置信息。

2014 年,Hafi^[11]等利用线性偏振光激发荧光染料,使荧光偶极子获得了不同的取向,再将不同取向的偶极子所产生的周期信号进行解调,就可以实现光学超分辨率成像。Hafi 等将这一技术命名为“偏振解调超分辨技术”(SPoD),SPoD 的结构示意图如图 15 所示。将 SPoD 应用于神经元棘的成像中,可以获得约 40 nm 的分辨率。此外,他们还将该技术应用于标准宽视场显微镜和双光子扫描显微镜。为了缩小极化角的范围,Hafi 等提出了极化角缩小技术(ExPAN)。通过增加与激发光束垂直的第二束去激发光束,可以缩小极化角的范围,从而可以有效激发不同取向的分子获得更高的空间分辨率。虽然采用 ExPAN 的 SPoD 通过极化解调实现了超分辨率,但在反卷积过程中偶极子的方向信息会丢失。因此,SPoD 不是一种严格的基于偶极子方位角的超分辨率成像技术。

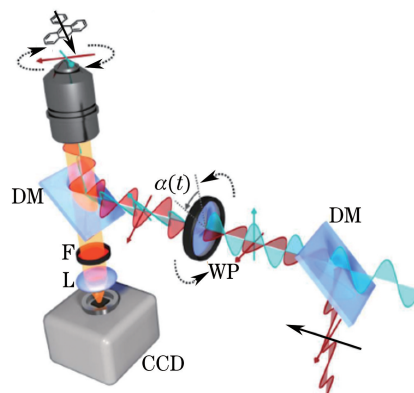


图 15 SPoD 结构示意图^[11]

Fig. 15 Schematic of SPoD^[11]

2016 年,Xi 等提出了一种称为超分辨率偶极方位映射(SDOM)的技术,扩展 SPoD 与偶极子方向的测量^[97](SDOM 结构示意图如图 16 所示),通过建立偏振变量模型,从调制数据中解调出强度信息和偏振信息,不仅获得了较高的成像分辨率,而且实

现了对偶极子方向的精确定位。SDOM 的实际成像速度为 5 frame/s,且激发功率低,可以实现酵母的活细胞成像。SPoD 和 SDOM 都利用偏振来调制荧光强度。然而,当荧光基团密度过高且取向随机变化时,就很难检测到荧光偏振调制,成像效果易受到限制。

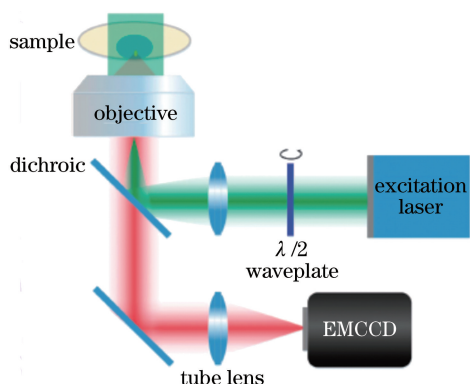


图 16 SDOM 结构示意图^[97]
Fig. 16 Schematic of SDOM^[97]

实现偏振调控超分辨率成像的另一途径是结合荧光偶极子与单分子定位技术。对于单偶极子,可以调制两个或四个偏振激发^[95]。四偏振可以实现三维方向的检测^[98]。然而,将荧光信号分成多个检测通道会降低信噪比,所以在大多数情况下,使用两个检测通道。以上仅适用于低密度的荧光团标记,很难揭示复杂的生物结构,但可以通过直接随机光学重建显微镜(polar-dSTORM)来解决^[12]。Polar-dSTORM 由 Valades 等于 2016 年提出,原理如图 17 所示,用圆偏振激光进行落射式照明。垂直和平行(⊥、// 相对于样品平面)的偏振态由 Wollaston 棱镜分开,并由 EMCCD 相机记录。该显微镜可以测量一帧中的单个荧光偶极子,并可在其他帧中随机切换到其他荧光偶极子,通过足够的单帧累积就可获得样本的全貌。Polar-dSTORM 可应用于对生物细丝的成像,包括 dsDNA、肌动蛋白和微管等,定位精度可达几十纳米。由于 Polar-dSTORM 的成像时间为 2~40 min,过长的成像时间使得它更适合用于对静止的样品成像。再者,其样品制备过程也不利于活细胞的成像应用。

4 结束语

近期涌现的高时空分辨成像技术可以按对光场时域和空域参数的调控来总结,并且,前沿成像技术的发展越来越趋向于综合采用多种光场调控的方法。例如,光片成像和结构光相结合^[60]、光激活定

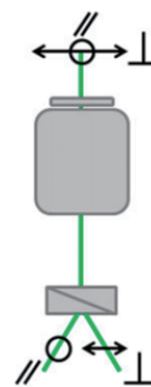


图 17 Polar-dSTORM 装置示意图^[12]
Fig. 17 Setup of polar-dSTORM^[12]

位和 STED 成像相结合^[82]、偏振调控和光激活定位成像相结合^[12]以及对光场畸变进行主动调控补偿的自适应光学(AO)与多种成像模态相结合^[99]等。光学成像研究的发展,在生物医学、材料科学以及其他基础前沿科学的驱动下,一直在向高时空分辨率、大视场、低光损伤、高穿透深度和高灵敏度方向推进。除了大量采用的荧光成像外,采用非标记信号对比机制的多种新型成像模态也在不断涌现。这些系统往往具有更深的样品穿透深度、内秉光学层析能力、高灵敏度、高时间分辨率以及携带相位敏感信息等优势。系统中自由度的增加,可以对波前、相位、频谱和空间模式进行调控,也给发展新的光学成像技术带来更多契机。随着成像系统视场增大、分辨率及成像速度提高,图像信息的处理也日益趋近大数据科学领域,近期已有将大数据、人工智能科学与先进成像技术融合的研究报道^[100-101]。因此,在前沿探索的驱动下,光场调控技术将进一步推动先进成像科学的研究,将其与数据信息前沿技术相结合,可应对各应用需求对超快时间解析度、高空间分辨率和表征能力等提出的挑战。

参 考 文 献

- [1] Abbe E. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung[J]. Archiv Für Mikroskopische Anatomie, 1873, 9(1): 413-418.
- [2] 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.
- [3] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. Science, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [4] Hess S T, Girirajan T P K, Mason M D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation

- localization microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2006, 91(11): 4258-4272.
- [5] Goda K, Tsia K K, Jalali B. Serial time-encoded amplified imaging for real-time observation of fast dynamic phenomena[J]. *Nature*, 2009, 458(7242): 1145-1149.
- [6] Keller P J, Schmidt A D, Wittbrodt J, *et al.* Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy[J]. *Science*, 2008, 322(5904): 1065-1069.
- [7] 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.
- [8] Klar T A, Hell S W. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy[J]. *Optics Letters*, 1999, 24(14): 954-956.
- [9] Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution[C]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(37): 13081-13086.
- [10] Cotte Y, Toy F, Jourdain P, *et al.* Marker-free phase nanoscopy[J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(2): 113-117.
- [11] Hafi N, Grunwald M, van den Heuvel L S, *et al.* Fluorescence nanoscopy by polarization modulation and polarization angle narrowing[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(5): 579-584.
- [12] Valades Cruz C A, Shaban H A, Kress A, *et al.* Quantitative nanoscale imaging of orientational order in biological filaments by polarized superresolution microscopy[C]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(7): E820-E828.
- [13] Gelles J, Schnapp B J, Sheetz M P. Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision[J]. *Nature*, 1988, 331(6155): 450-453.
- [14] Ghosh R N, Webb W W. Automated detection and tracking of individual and clustered cell surface low density lipoprotein receptor molecules[J]. *Biophysical Journal*, 1994, 66(5): 1301-1318.
- [15] Yildiz A, Forkey J N, Mckinney S A, *et al.* Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization[J]. *Science*, 2003, 300(5628): 2061-2065.
- [16] Abbondanzieri E A, Greenleaf W J, Shaevitz J W, *et al.* Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase[J]. *Nature*, 2005, 438(7067): 460-465.
- [17] Huang B, Bates M, Zhuang X W. Super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, 78(1): 993-1016.
- [18] Bates M, Huang B, Dempsey G T, *et al.* Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes[J]. *Science*, 2007, 317(5845): 1749-1753.
- [19] Huang B, Wang W, Bates M, *et al.* Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy[J]. *Science*, 2008, 319(5864): 810-813.
- [20] Huang B, Jones S A, Brandenburg B, *et al.* Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(12): 1047-1052.
- [21] Juetten M F, Gould T J, Lessard M D, *et al.* Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(6): 527-529.
- [22] Pavani S R P, Thompson M A, Biteen J S, *et al.* Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function[C]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(9): 2995-2999.
- [23] Bates M, Blosser T R, Zhuang X W. Short-range spectroscopic ruler based on a single-molecule optical switch[J]. *Physical Review Letters*, 2005, 94(10): 108101.
- [24] Shroff H, Galbraith C G, Galbraith J A, *et al.* Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(5): 417-423.
- [25] Hess S T, Gould T J, Gudheti M V, *et al.* Dynamic clustered distribution of hemagglutinin resolved at 40 nm in living cell membranes discriminates between raft theories[C]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(44): 17370-17375.
- [26] Manley S, Gillette J M, Patterson G H, *et al.* High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(2): 155-157.
- [27] Jones S A, Shim S H, He J, *et al.* Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(6): 499-505.
- [28] Zhu L, Zhang W, Elnatan D, *et al.* Faster STORM using compressed sensing[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 721-723.
- [29] Xu K, Babcock H P, Zhuang X W. Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(2): 185-188.

- [30] Tehrani K F, Xu J Q, Zhang Y W, *et al.* Adaptive optics stochastic optical reconstruction microscopy (AO-STORM) using a genetic algorithm[J]. *Optics Express*, 2015, 23(10): 13677-13692.
- [31] Agrawal G P. Nonlinear fiber optics, in nonlinear science at the dawn of the 21st century[M]. Berlin: Springer, 2000: 195-211.
- [32] Lau A K S, Wong T T W, Ho K K Y, *et al.* Interferometric time-stretch microscopy for ultrafast quantitative cellular and tissue imaging at 1 μm [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(7): 076001.
- [33] Guo Q, Chen H W, Weng Z L, *et al.* Compressive sensing based high-speed time-stretch optical microscopy for two-dimensional image acquisition [J]. *Optics Express*, 2015, 23(23): 29639-29646.
- [34] Lei C, Kobayashi H, Wu Y, *et al.* High-throughput imaging flow cytometry by optofluidic time-stretch microscopy [J]. *Nature Protocols*, 2018, 13 (7): 1603-1631.
- [35] Nitta N, Sugimura T, Isozaki A, *et al.* Intelligent cell search engine[J/OL]. SSRN Electronic Journal, 2018. https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3204560.
- [36] Bradley D J, Liddy B, Sleat W E. Direct linear measurement of ultrashort light pulses with a picosecond streak camera[J]. *Optics Communications*, 1971, 2(8): 391-395.
- [37] Gao L, Liang J Y, Li C Y, *et al.* Single-shot compressed ultrafast photography at one hundred billion frames per second [J]. *Nature*, 2014, 516 (7529): 74-77.
- [38] 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.
- [39] Gustafsson M G L, Shao L, Carlton P M, *et al.* Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination [J]. *Biophysical Journal*, 2008, 94(12): 4957-4970.
- [40] Schermelleh L, Heintzmann R, Leonhardt H. A guide to super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Journal of Cell Biology*, 2010, 190(2): 165-175.
- [41] Heintzmann R, Cremer C G. Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating[C]. *Proceedings of SPIE*, 1999, 3568(8442): 1399-1400.
- [42] Fedosseev R, Belyaev Y, Frohn J, *et al.* Structured light illumination for extended resolution in fluorescence microscopy [J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2005, 43(3/4/5): 403-414.
- [43] Sonnen K F, Schermelleh L, Leonhardt H, *et al.* 3D-structured illumination microscopy provides novel insight into architecture of human centrosomes [J]. *Biology Open*, 2012, 1(10): 965-976.
- [44] Li D, Shao L, Chen B C, *et al.* Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics[J]. *Science*, 2015, 349 (6251): 3500.
- [45] Li D, Betzig E. Response to comment on “extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics” [J]. *Science*, 2016, 352(6285): 527.
- [46] Sahl S J, Balzarotti F, Keller-Findeisen J, *et al.* Comment on “extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics”[J]. *Science*, 2016, 352(6285): 527.
- [47] Wicker K, Mandula O, Best G, *et al.* Phase optimisation for structured illumination microscopy [J]. *Optics Express*, 2013, 21(2): 2032-2049.
- [48] Wicker K. Non-iterative determination of pattern phase in structured illumination microscopy using auto-correlations in Fourier space[J]. *Optics Express*, 2013, 21(21): 24692-24701.
- [49] Krizek P, Lukes T, Ovesny M, *et al.* SIMToolbox: a MATLAB toolbox for structured illumination fluorescence microscopy [J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(2): 318-320.
- [50] Müller M, Mönkemöller V, Hennig S, *et al.* Open-source image reconstruction of super-resolution structured illumination microscopy data in imageJ [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10980.
- [51] Rossberger S, Best G, Baddeley D, *et al.* Combination of structured illumination and single molecule localization microscopy in one setup [J]. *Journal of Optics*, 2013, 15(9): 094003.
- [52] Mönkemöller V, Öie C, Hübner W, *et al.* Multimodal super-resolution optical microscopy visualizes the close connection between membrane and the cytoskeleton in liver sinusoidal endothelial cell fenestrations [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 16279.
- [53] Park J H, Lee S W, Lee E S, *et al.* A method for super-resolved CARS microscopy with structured illumination in two dimensions[J]. *Optics Express*, 2014, 22(8): 9854-9870.
- [54] Fuchs E, Jaffe J S, Long R A, *et al.* Thin laser light sheet microscope for microbial oceanography[J]. *Optics Express*, 2002, 10(2): 145-154.
- [55] Huisken J, Swoger J, Del B F, *et al.* Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy[J]. *Science*, 2004, 305 (5686): 1007-1009.

- [56] Huisken J, Stainier D Y R. Even fluorescence excitation by multidirectional selective plane illumination microscopy (mSPIM)[J]. *Optics Letters*, 2007, 32(17): 2608-2610.
- [57] Gebhardt J C M, Suter D M, Roy R, *et al.* Single-molecule imaging of transcription factor binding to DNA in live mammalian cells[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(5): 421-426.
- [58] Li T C, Ota S, Kim J, *et al.* Axial plane optical microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2015, 4: 7253.
- [59] Planchon T A, Gao L, Milkie D E, *et al.* Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(5): 417-423.
- [60] Chen B C, Legant W R, Wang K, *et al.* Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution[J]. *Science*, 2014, 346(6208): 1257998.
- [61] Gao L. Extend the field of view of selective plan illumination microscopy by tiling the excitation light sheet[J]. *Optics Express*, 2015, 23(5): 6102-6111.
- [62] Theer P, Dragneva D, Knop M. π SPIM: high NA high resolution isotropic light-sheet imaging in cell culture dishes[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32880.
- [63] Mickoleit M, Schmid B, Weber M, *et al.* High-resolution reconstruction of the beating zebrafish heart[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(9): 919-922.
- [64] Keller P J, Schmidt A D, Santella A, *et al.* Fast, high-contrast imaging of animal development with scanned light sheet-based structured-illumination microscopy[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(8): 637-642.
- [65] Masson A, Escande P, Frongia C, *et al.* High-resolution in-depth imaging of optically cleared thick samples using an adaptive SPIM[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 16898.
- [66] Hell S W. Nanoscopy with focused light (Nobel lecture)[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(28): 8054-8066.
- [67] Westphal V, Hell S W. Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope [J]. *Physical Review Letters*, 2005, 94(14): 143903.
- [68] Dyba M, Hell S W. Focal spots of size $\lambda/23$ open up far-field fluorescence microscopy at 33 nm axial resolution [J]. *Physical Review Letters*, 2002, 88(16): 163901.
- [69] Rittweger E, Han K Y, Irvine S E, *et al.* STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution[J]. *Nature Photonics*, 2009, 3(3): 144-147.
- [70] Donnert G, Keller J, Medda R, *et al.* Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy[C]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(31): 11440-11445.
- [71] Willig K I, Kellner R R, Medda R, *et al.* Nanoscale resolution in GFP-based microscopy[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(9): 721-723.
- [72] Westphal V, Rizzoli S O, Lauterbach M A, *et al.* Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement [J]. *Science*, 2008, 320(5873): 246-249.
- [73] Berning S, Willig K I, Steffens H, *et al.* Nanoscopy in a living mouse brain [J]. *Science*, 2012, 335(6068): 551-551.
- [74] Willig K I, Steffens H, Gregor C, *et al.* Nanoscopy of filamentous actin in cortical dendrites of a living mouse[J]. *Biophysical Journal*, 2014, 106(1): L01-L03.
- [75] Harke B, Ullal C K, Keller J, *et al.* Three-dimensional nanoscopy of colloidal crystals[J]. *Nano Letters*, 2008, 8(5): 1309-1313.
- [76] Schmidt R, Wurm C A, Jakobs S, *et al.* Spherical nanosized focal spot unravels the interior of cells[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(6): 539-544.
- [77] Schmidt R, Wurm C A, Punge A, *et al.* Mitochondrial cristae revealed with focused light[J]. *Nano Letters*, 2009, 9(6): 2508-2510.
- [78] Danzl J G, Sidenstein S C, Gregor C, *et al.* Coordinate-targeted fluorescence nanoscopy with multiple off states [J]. *Nature Photonics*, 2016, 10(2): 122-128.
- [79] Donnert G, Keller J, Wurm C A, *et al.* Two-color far-field fluorescence nanoscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2007, 92(8): L67-L69.
- [80] Hell S W. Toward fluorescence nanoscopy[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(11): 1347-1355.
- [81] Hell S W, Dyba M, Jakobs S. Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy [J]. *Current Opinion in Neurobiology*, 2004, 14(5): 599-609.
- [82] Hofmann M, Eggeling C, Jakobs S, *et al.* Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(49): 17565-17569.
- [83] Hell S W, Krug M. Ground-state-depletion fluorescence microscopy : a concept for breaking the diffraction resolution limit [J]. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, 1995, 60(5): 495-497.

- [84] Bretschneider S, Eggeling C, Hell S W. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy by optical shelving[J]. *Physical Review Letters*, 2007, 98(21): 218103.
- [85] Foelling J, Bossi M, Bock H, *et al.* Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(11): 943-945.
- [86] Chmyrov A, Keller J, Grotjohann T, *et al.* Nanoscopy with more than 100, 000 'doughnuts' [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(8): 737-740.
- [87] Wang P, Slipchenko M N, Mitchell J, *et al.* Far-field imaging of non-fluorescent species with subdiffraction resolution[J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(6): 450-454.
- [88] Rieger S, Fishedick M, Boller K J, *et al.* Suppression of resonance Raman scattering via ground state depletion towards sub-diffraction-limited label-free microscopy[J]. *Optics Express*, 2016, 24(18): 20745-20754.
- [89] Fischer J, Wegener M. Three-dimensional optical laser lithography beyond the diffraction limit [J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2013, 7(1): 22-44.
- [90] Vrabioiu A M, Mitchison T J. Structural insights into yeast septin organization from polarized fluorescence microscopy[J]. *Nature*, 2006, 443(7110): 466-469.
- [91] Demay B S, Noda N, Gladfelter A S, *et al.* Rapid and quantitative imaging of excitation polarized fluorescence reveals ordered septin dynamics in live yeast[J]. *Biophysical Journal*, 2011, 101(4): 985-994.
- [92] Kress A, Wang X, Ranchon H, *et al.* Mapping the local organization of cell membranes using excitation-polarization-resolved confocal fluorescence microscopy [J]. *Biophysical Journal*, 2013, 105(1): 127-136.
- [93] Wang X, Kress A, Brasselet S, *et al.* High frame-rate fluorescence confocal angle-resolved linear dichroism microscopy[J]. *Review of Scientific Instruments*, 2013, 84(5): 053708.
- [94] Lazar J, Bondar A, Timr S, *et al.* Two-photon polarization microscopy reveals protein structure and function[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(8): 684-690.
- [95] Forkey J N, Quinlan M E, Shaw M A, *et al.* Three-dimensional structural dynamics of myosin V by single-molecule fluorescence polarization[J]. *Nature*, 2003, 422(6930): 399-404.
- [96] Fooksman D R, Edidin M, Barisas B G. Measuring rotational diffusion of MHC class I on live cells by polarized FPR[J]. *Biophysical Chemistry*, 2007, 130(1-2): 10-16.
- [97] Zhanghao K, Chen L, Yang X S, *et al.* Super-resolution dipole orientation mapping via polarization demodulation [J]. *Light: Science & Applications*, 2016, 5(10): e16166.
- [98] Ohmachi M, Komori Y, Iwane A H, *et al.* Fluorescence microscopy for simultaneous observation of 3D orientation and movement and its application to quantum rod-tagged myosin V[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(14): 5294-5298.
- [99] Liu T L, Upadhyayula S, Milkie D E, *et al.* Observing the cell in its native state: imaging subcellular dynamics in multicellular organisms [J]. *Science*, 2018, 360(6386): 1392.
- [100] Ounkomol C, Seshamani S, Maleckar M M, *et al.* Label-free prediction of three-dimensional fluorescence images from transmitted-light microscopy [J]. *Nature Methods*, 2018, 15(11): 917-920.
- [101] Januszewski M, Kornfeld J, Li P H, *et al.* High-precision automated reconstruction of neurons with flood-filling networks[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(8): 605-610.