

文章编号:1004-4213(2011)11-1607-12

# 高分辨和超分辨光学成像技术在空间和生物中的应用

姚保利<sup>a</sup>, 雷铭<sup>a</sup>, 薛彬<sup>a, b</sup>, 郜鹏<sup>a</sup>, 严绍辉<sup>a</sup>, 赵惠<sup>a, b</sup>, 赵卫<sup>a</sup>, 杨建峰<sup>a, b</sup>,  
樊学武<sup>a, b</sup>, 邱跃洪<sup>a, b</sup>, 高伟<sup>a, b</sup>, 赵葆常<sup>a, b</sup>, 李英才<sup>a, b</sup>

(中国科学院西安光学精密机械研究所 a. 瞬态光学与光子技术国家重点实验室 高分辨光学成像技术联合研究室;  
b. 空间光学技术研究室, 西安 710119)

**摘要:**大到天文光学望远镜观察浩瀚的宇宙, 小到光学显微镜探索细微的纳米世界, 光学成像技术在人类探索和发现未知世界奥秘的活动中扮演着至关重要的角色. 看得更远、看得更细、看得更清楚是人们不断追求的目标. 传统光学理论已证明所有经典光学系统都是一个衍射受限系统, 即光学系统空间分辨率的物理极限是由光的波长和系统的相对孔径(或数值孔径)决定的. 能否突破这个极限? 能否不断提高光学系统的成像分辨率? 围绕着这个问题, 本文综述了近年来开展的各种光学高分辨和超分辨成像技术, 及其在空间探测和生物领域中的应用.

**关键词:**高分辨; 超分辨; 光学成像; 空间光学遥感; 显微成像

**中图分类号:** O439

**文献标识码:** A

**doi:** 10.3788/gzxb20114011.1607

## 0 引言

自从 17 世纪初意大利科学家伽利略(Galileo, 1564-1642)发明天文光学望远镜, 17 世纪中荷兰商人列文虎克(Leeuwenhoek, 1632-1723)发明光学显微镜以来, 光学成像技术极大地推动了人类文明的进程, 使人类的观察视野一下延伸到了两个极端的世界: 浩瀚的宇宙和神秘的微观世界. 在这四百年里, 人们不断地发展新的技术以提高光学成像系统的分辨率. 直到 19 世纪末 20 世纪初, 德国科学家阿贝(Abbe, 1840-1905)和英国科学家瑞利(Rayleigh, 1842-1919)从光的波动理论证明, 在成像光学系统中, 由于光的衍射效应, 理想物点经过系统所成的像不再是理想的几何点像, 而是有一定大小的光斑(即艾里斑), 当两个物点过于靠近以至于其像斑重叠在一起时, 就不能分辨出是两个物点的像, 即光学系统中存在着一个分辨极限. 这个分辨极限通常采用瑞利提出的判据: 当一个艾里斑的中心与另一个艾里斑的第一级暗环重合时, 刚好能分辨出是两个点, 即著名的瑞利判据(Rayleigh Criterion), 用公式表示为<sup>[1]</sup>

$$\delta = 1.22(\lambda/D)f \quad (1)$$

式中  $\lambda$  表示在像方介质中光的波长,  $f$  表示系统焦距,  $D$  表示孔径,  $D/f$  为相对孔径. 在显微光学系

统中通常使用数值孔径( $NA = n \sin \alpha$ )表征, 式(1)可以改写为

$$\delta = 0.61(\lambda_0/NA) \quad (2)$$

式中  $\lambda_0$  表示光的真空波长. 由式(1)、(2)可知, 要达到高分辨本领, 可以缩短波长或提高相对(数值)孔径, 在可见光范围内其分辨率极限约为 200 nm.

阿贝-瑞利衍射极限是在光的标量衍射理论框架下得到的, 实际上光是一种矢量波, 描述它不仅具有频率、振幅和相位参量, 还具有偏振特征. 因此, 完整描述光波应该用矢量方程. 20 世纪中, 美国科学家理查德(Richards)和沃尔夫(Wolf)给出了精确计算焦场分布的 Richards-Wolf 衍射积分公式<sup>[2]</sup>

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}) = \frac{-ikf}{2\pi} \int_0^{\theta_{\max}} \int_0^{2\pi} \sqrt{\cos(\theta)} l_0(\theta, \varphi) \mathbf{u}(\theta, \varphi) \cdot \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}) \sin \theta d\varphi d\theta \quad (3)$$

式中  $l_0(\theta, \varphi)$  表示物镜入瞳面内场的复振幅分布,  $\mathbf{u}(\theta, \varphi)$  表示入瞳面内各个光线的偏振矢量经过转迹后在像空间内的偏振矢量. 可以证明, 当入射光为线偏振均匀照射时, 即  $l_0(\theta, \varphi) \mathbf{u}(\theta, \varphi) = 1$ , 由式(3)可以得到式(1)和(2). 因此, Richards-Wolf 积分公式是更一般的计算公式, 它同时考虑了入射场的振幅、相位和偏振分布. 那么在特定的偏振、相位和振幅分布情况下, 所得到的光斑尺寸有可能小于阿贝-瑞利衍射极限决定的值. 例如, 在径向偏振光照射的情况下, 光斑的面积约为线偏振光照明下光

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 10874240, No. 61077005)和国家重大科学研究计划项目(No. 2012CB921900)资助

第一作者: 姚保利(1968-), 研究员, 博士, 主要研究方向为信息光子学和生物光子学. Email: yaobli@opt.ac.cn

收稿日期: 2011-10-22; 修回日期: 2011-11-18

斑面积的 61.5%<sup>[3]</sup>, 可显著缩小光斑尺寸. 通过设计特殊的波前振幅或相位“滤波器”, 也可以达到缩小光斑尺寸的目的<sup>[1]</sup>, 例如: 用一个不透明的圆形物体来阻挡入瞳处入射场的中心区域, 即采用环形光入射, 当被阻挡的中心区域增大时, 聚焦亮斑逐渐缩小.

由上述分析可见, 对于聚焦扫描成像光学系统, 采用特殊调制的入射光束可以获得更小的聚焦光斑尺寸, 突破常规的阿贝-瑞利衍射极限, 但是其改善程度并不是很大. 而对凝视或宽场成像光学系统, 则不能使用这种照明方式, 需要其它特殊的结构光照明方式来提高分辨率. 以上是从纯光学方法的角度考虑来提高成像的分辨率, 如果利用光与物质相互作用的一些非线性光学效应, 则可以获得更加丰富多彩的超分辨光学成像方法. 另外, 光学系统的成像分辨率除了与光学镜头有关外, 还与探测器的分辨率、信噪比、灵敏度, 以及图像处理技术等要素有关, 需要综合考虑. 本文将从应用的角度出发, 分别讨论高分辨光学成像技术在空间探测领域的发展和應用, 以及超分辨光学成像技术在生物领域的发展和應用.

## 1 空间高分辨光学成像技术的发展

空间高分辨率光学成像技术在光学遥感、军事侦查、天文观测以及深空探测等领域具有广泛而迫切的需求. 目标图像的高分辨一直是人们所追求的重要指标之一, 它是军事目标发现与识别, 以及人类认识太空、研究宇宙的最主要手段.

空间成像技术主要包括凝视成像技术和推扫成像技术. 空间分辨率通常以像元分辨率(又称为地元分辨率)表示, 在理想光学系统及噪声忽略的情况下, 与空间物体到光学镜头的距离  $H$  和 CCD 像元尺寸  $d$  的乘积成正比, 与光学系统焦距  $f$  成反比, 表示为

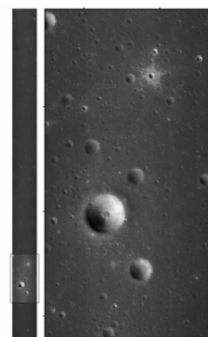
$$Ds = d \cdot H / f \quad (4)$$

然而由于经典光学系统都是一个衍射受限系统, 意味着并不能单纯依靠减小 CCD 像元尺寸或增大光学系统的焦距来无限制提高空间分辨率, 最多可以达到的理论极限为式(1)表示的衍射极限分辨率. 另外, 对于图像而言, 信噪比是一个重要的性能指标, 成像系统的信号收集能力也是一个重要设计约束, 它正比于系统的相对孔径的平方. 因此, 要获得更高分辨率的图像, 需要增大光学系统的口径, 但口径的增大必然导致仪器体积和重量非常大, 使得研制、发射和运行等费用也相应变得非常昂贵. 因此, 提高空间分辨率必须在考虑系统重量和体积

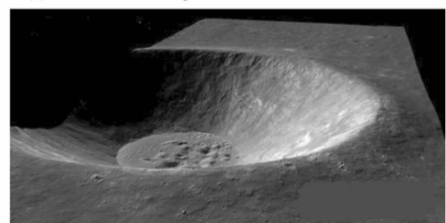
的基础上, 考虑相应的手段措施, 主要包括以下几个方面:

### 1.1 提高探测器单元灵敏度

足够的信号强度是保证图像质量的前提, 由于信号强度正比于光学系统相对孔径的平方, 要在较小的相对孔径下实现高分辨率, 必须提高探测器的灵敏度. 时间延迟积分 CCD(TDI-CCD)是在 CCD 技术基础上发展起来的一种新的探测器件, 它基于对同一目标多次曝光, 通过延迟积分的方法大大增加了光能的收集, 与一般线阵 CCD 相比, 它大大提高了灵敏度, 并拓宽了动态范围. 在米级及亚米级高分辨率卫星相机上(如 QuickBird、OrbView-3、嫦娥二号和火星快车等)得到了很大的发展和应用. 图 1 是由中国科学院西安光学精密机械研究所研制的我国探月工程嫦娥二号 CCD 立体相机拍摄的月球虹湾区形貌照片<sup>[4]</sup>, 图像清晰层次丰富, 其 1 m 分辨率的局域立体影像使我国成为继美国(2009 年)之后第二个在对月探测中具备 1m 量级分辨率成像能力的国家, 为嫦娥三号“落”提供了高分辨的着落点及周边地区的地形地貌数据. 该相机既能在 100 km 圆轨上获取地元分辨率为 7 m 的全面立体图像, 又能在 100 km × 15 km 椭圆轨道的近月弧段上获取地元分辨率为 1 m 的虹湾区局域立体图像, 这一方面要求相机具有超高的探测灵敏度, 同时又要求具有大的动态范围. 这是国际上首次使用



(a) Part of the image of lunar Sinus Iridum area



(b) Stereo-scene image of the Laplace-A pit sited in the sinus iridium area

图 1 嫦娥二号 CCD 立体相机在 18.7 km 轨道高度拍摄的月球虹湾区局域形貌照片和拉普拉斯 A 坑三维形貌, 地元分辨率为 1.3 m<sup>[4]</sup>

Fig. 1 Part of the image of lunar Sinus Iridum area obtained by the Chang'E-2 lunar satellite CCD stereo camera at the orbital altitude of 18.7 km<sup>[4]</sup>

双线阵 TDI-CCD 自推扫成像技术拍摄的高分辨月球照片, 还拍摄到了月球两极永久阴影区的立体图像。但由于 TDI-CCD 工作原理的限制, 其要求行扫速率与目标运动速率严格同步, 否则会造成图像信息的混叠, 所以该技术对平台姿态以及速高比匹配提出了较高的需求。在嫦娥二号 CCD 立体相机中, 采用了速高比精密补偿技术<sup>[5]</sup>, 成功地解决了该问题, 获得国际领先的研究成果。

此外, 为了进一步提高探测灵敏度, 通过角补偿镜增加凝视时间也是一种途径, 如 EROS-A 和印度的 TES 以及部分星载高光谱成像仪中有所应用。不过, 由于其对补偿镜的稳定度要求较高, 同时不能连续场景工作, 使其受到限制。

### 1.2 增加传感器的空间采样频率

在系统空间分辨率未受到衍射极限限制的情况下, 应尽量提高 CCD 传感器的空间采样频率。减小传感器像素, 可以更加细致地描述理想像面处离散化的光学点扩散函数。离散化的光学点扩散函数与理想的连续点扩散函数越接近, 成像系统的空间分辨率就越高。但由于 CCD 像元尺寸不可能太小, 亚像元成像技术成为解决空间采样问题的重要手段之一, 它是一种非常经济有效的实现遥感卫星高分辨率和小型化的技术途径。早在 1984 年, Tsni 和 Huang 首次提出用多幅欠采样图像来提高图像空间分辨率的设想; 随后, 国外许多研究所、大学和公司相继开展了这方面的研究。Kodak 公司利用增频采样获取的多幅图像进行超分辨率融合得到更高分辨率的图像。美国 Dayton 大学和 Wright 实验室在美国空军的支持下, 对红外 CCD 相机进行了机载试验, 利用重复拍照的 20 幅低分辨率的红外图像, 取得了分辨率提高近 5 倍的结果。中国科学院西安光学精密机械研究所也曾对两幅相同空间分辨率的图像进行图像重建后, 获得空间分辨率提高 1.6 倍左右的结果<sup>[6]</sup>。在空间对地观测中, 法国 SPOT、美国 EarthSat、德国 BIRD 卫星都尝试采用该项技术, 利用增频采样、卫星重访和多个卫星获取图像, 从而获得重构高分辨率图像。其中 SPOT-5 卫星更是在其超级模式下, 利用两幅同时获取的 5 m 分辨率的全色图像重采样得到 2.5 m 分辨率的全色图像<sup>[7]</sup>。

另一种技术方案是采用波前编码成像技术。该技术首先由美国科罗拉多大学的 Cathey 和 Dowski 于 1995 年提出<sup>[8]</sup>。通过在系统的孔径平面、入瞳或者出瞳面上添加一块特殊设计的三次方型相位掩模板, 系统的光学传递函数就能够对离焦不敏感。但是, 相位板会引起调制传递函数的下降, 因此波前

编码系统所获得的图像将呈现出一种均匀一致的模糊, 必须依靠图像复原算法去除模糊之后, 才能获得大景深清晰图像。波前编码成像技术的优势在于, 它能够使成像系统对离焦参量本身及引起离焦的因素(如振动、温度变化等导致的光机结构的改变)不敏感。利用此原理, 韩国 Lee 等人<sup>[9]</sup>提出了一种将图像放大技术、升采样技术和复原技术相结合的成像及处理模式, 可以在 CCD 像元尺寸不变的情况下实现更高分辨率的成像。他们首先使用波前编码技术将系统所对应的光学点扩散函数有意地扩展; 其次, 通过数字的方式构建更小像素所对应的点扩散函数; 再次, 将原始大像素所对应的图像通过插值放大到与小像素所匹配的像素分辨率水平, 而此时经过放大的图像将出现模糊现象; 最后, 把构建好的小像素所对应的点扩散函数作为卷积核, 采用经典复原算法, 如维纳滤波等作用于经过数字放大的图像, 实现像素数目与分辨率的同步提升。他们将  $1.4 \mu\text{m}$  的 500 万像素图像提升放大了  $0.7 \mu\text{m}$  的 2000 万像素图像, 效果很明显。不过需要注意的是, 这种分辨率的提升是因为波前编码技术的特殊性。传统成像系统在设计阶段就要求系统的点扩散函数尽可能地尖锐, 以实现高分辨率成像。在这种情况下, 采用韩国研究人员的方案就很难实现像元物理尺寸时分辨率的提升。因此, 必须采用特殊设计的波前编码系统才能提升系统的分辨率。

### 1.3 增大系统有效口径

传统光学成像系统角分辨率受波长和系统孔径的限制, 对特定的工作波段提高系统的角分辨率, 只能增大系统口径, 而在实际应用中系统加工成本和飞行器有效载荷体积等很多因素限制了系统口径的增大。20 世纪 70 年代提出的合成孔径干涉成像技术为提高成像系统分辨率提供了新的方法, 它利用几个分离的小孔径光学系统组合来实现大口径的分辨极限。

光学合成孔径技术从结构形式上可分两类: 共用子镜形式和多望远镜系统形式。前者取整块主镜上的若干部位组成子镜, 以主镜排列方式组成主镜; 后者将多个孔径压缩在一个小孔径成像系统中成像来获得接近大孔径成像的分辨率效果, 该结构形式获得的离散孔径多为非连续, 又称为稀疏孔径技术<sup>[10]</sup>。

NASA 准备接替 Hubble 的下一代天文望远镜 (NGST) 的方案之一——James Webb 空间望远镜是共用次镜形式的典型代表, 其主镜是一个分块可展开镜, 它由 36 个对边距离为 1 m 的六边形分块

子镜分 3 圈组成, 外接圆的直径大于 8 m<sup>[11]</sup>.

1978 年美国亚里桑那建造的 MMT (Multiple Mirror Telescope) 是多望远镜形式的典型代表, 它由六块 1.8 m 的子望远镜组成等效孔径相当于直径 4.45 m 的望远镜. 另外一个用于天文观测的地基稀疏孔径成像是 LBT (Large Binocular Telescope), 它由两个 8.4 m 的主镜组成, 在一个方向上具有相当于口径 22.8 m 的口径所限制的光学分辨率.

法国 Alcatel Space 公司在高轨高分辨率光学相机的概念设计中提出九孔径干涉光学相机方案, 它利用空间编队飞行的多个望远镜系统组成大口径系统, 是多望远镜结构光学合成孔径技术的一种变形形式, 从原理上这种结构系统可以做到非常大, 直径可达 100 m.

#### 1.4 主动成像技术

上面讨论的成像技术都是利用目标自身发光或反射光进行成像, 称为被动成像技术. 主动成像技术是由仪器自身发出光照明目标, 然后接收目标反射回来的信号进行成像的技术, 如激光雷达是一种典型的主动成像技术. 傅里叶望远镜技术是一种借助于激光主动照明, 对暗弱目标成像的方法, 角分辨率能够达到几纳弧度<sup>[12]</sup>. 它通过几束激光照射目标, 在目标表面形成干涉条纹, 在几个激光束之间引入相移, 使干涉条纹在目标表面移动. 产生的时间调制激光回波包含目标反射的傅里叶分量信息 (该傅里叶分量由光束发射器的间距和方向确定), 再用大型太阳能汇聚镜阵列收集回波信号, 通过逆傅里叶变换给出目标图像<sup>[13]</sup>. 基于该技术美国空军实验室建立了地球同步轨道卫星激光成像国家实验基地 (GLINT), 用于实施和验证傅里叶望远镜技术, GLINT 的等效口径约 100 m, 系统角分辨率可达到 0.002".

## 2 生物超分辨光学成像技术的发展

现代生物学和材料科学的发展对微观结构的研究提出了越来越高的分辨率需求, 希望从分子水平揭示生命过程和材料性能的物理本质. 受光学衍射极限的限制, 普通光学显微镜的横向分辨率一般只能达到 200 nm, 纵向分辨率约 500 nm, 这对于研究亚细胞结构和分子结构已无能为力. 虽然电子显微镜和原子力显微镜可以达到亚纳米的分辨率, 但是其只能对非活性离体细胞样品进行观测的缺点限制了其在生物领域的广泛应用. 因此, 如何利用光学方法突破传统光学显微镜的分辨率极限进入纳米观测领域成为光学显微成像技术的一个重要挑战和

机遇.

光学显微成像技术在生物学中的普遍应用很大程度得益于各种荧光探针分子的出现, 使用不同的荧光分子可以标记样品的不同部位和细胞器, 通过探测特定波长激发荧光分子发出的荧光 (主动成像技术), 可以对活细胞内的单分子进行实时成像<sup>[14-16]</sup>. 借助荧光探针分子, 利用激发光与荧光分子相互作用产生的非线性光学效应, 发展了各种各样的超分辨光学成像方法. 光学显微成像技术根据探测模式可以分为两大类: 即点扫描成像技术和宽场成像技术.

以激光共聚焦荧光显微 (Confocal Microscopy) 为代表的点扫描成像技术, 用高度聚焦的激光束对样品逐点扫描成像, 荧光信号经过探测针孔滤波后被光电倍增管探测收集, 由于只有激光焦点处激发的荧光可以通过探测针孔, 所以激光共聚焦显微具有极低的背景噪声, 而且通过逐层扫描样品, 可以实现三维成像<sup>[17]</sup>, 但是激光共聚焦荧光显微的横向分辨率并没有超过衍射极限. 多光子荧光显微与共聚焦显微很类似, 不同的是它使用超短脉冲激光作为激发光源. 由于多光子吸收是非线性效应, 只发生在焦点处, 所以探测器前不需要针孔滤光, 并且由于激发光使用长波段的近红外光, 故具有探测样品更深层结构的能力.

宽场成像技术采用面阵图像传感器 (如 CCD), 可以在一个时间点获得一幅完整的二维图像, 具有速度快、图像灰度级高等优点. 但是由于受样品离焦部分的干扰, 普通的宽场成像技术不具有三维层析成像能力. 全内反射荧光显微镜 (Total Internal Reflection Fluorescent Microscope, TIRFM) 是一种宽场成像技术, 它利用光线全反射后在界面产生消逝波激发样品, 因为消逝波强度垂直于界面呈指数衰减, 使激发区域限定在样品表面的一薄层范围内 (小于 200 nm), 从而大大降低了背景光噪声, 近年来已被广泛应用于单分子荧光成像中<sup>[18]</sup>, 但其分辨率也受到衍射极限的制约.

近场扫描光学显微镜 (Scanning Near-Field Optical Microscope, SNOM) 不受衍射极限的制约. 1928 年, Syngge 提出用亚波长的小孔在样品表面扫描获取样品消逝场信息, 从而可以获得亚波长的分辨率<sup>[19]</sup>. 但是受制于工作距离以及样品, SNOM 基本属于接触测量, 不适用于活体生物样品的观察. 另外, 近场图像是样品与探测针尖信息的混合物, 如果针尖大于被分析物体的细微结构, 所得到的像则更多地与针尖特性有关, 而不是与样品的结构相关<sup>[20]</sup>.

近年来, 随着各种新型荧光探针分子的出现和成像方法的改进, 远场光学成像的分辨率已经突破了衍射极限的限制. 远场光学超分辨荧光显微成像技术主要分为两大类: 一类是基于单分子定位技术的超分辨显微成像方法, 包括光激活定位显微技术 (Photoactivated Localization Microscopy, PALM) 和随机光学重构显微技术 (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM); 另一类是基于特殊强度分布照明光场的超分辨显微成像方法, 包括受激发射损耗显微技术 (Stimulated Emission Depletion, STED) 和结构照明显微技术 (Structured Illumination Microscopy, SIM). 除此之外, 对于非荧光显微成像方法, 本文将介绍具有三维成像能力的数字全息显微成像技术.

## 2.1 基于单分子定位技术的超分辨显微成像方法——PALM 和 STORM

使用高灵敏度的探测器和高信噪比的显微成像技术可以得到单个荧光分子的光学图像, 但是这个单个荧光分子的显微图像是一个接近衍射极限的艾里斑, 其强度半高宽取决于光学系统的点扩散函数 (Point Spread Function, PSF). 单分子荧光成像本身不能突破衍射极限, 但是当显微镜视场中只有一

个或多个荧光分子的时候, 该荧光分子的位置通过特定的算法拟合, 可以达到亚纳米级的精确测量. 单分子的二维定位精度  $a$  可近似地表示为  $a = \Delta x / \sqrt{N}$ , 其中  $\Delta x$  为光学系统 PSF 的半高宽,  $N$  为单个荧光分子发出的光子数, 对于量子效率较高的荧光染料, 单个荧光分子图像可以贡献一百万个光子, 因此单分子定位精度可以达到 1 nm 以下<sup>[21-24]</sup>.

2006 年, Betzig 等人<sup>[25]</sup> 首次提出了基于单分子定位技术的 PALM 技术. PALM 的基本原理是用 PA-GFP 绿荧光蛋白来标记蛋白质, 通过调节 405 nm 激光器的能量, 低能量照射细胞表面, 一次仅激活视野下稀疏分布的几个荧光分子, 然后再用 488 nm 激光照射激发荧光, 通过高斯拟合来精确定位这些荧光单分子的位置. 随后再使用 488 nm 激光照射来漂白这些已经定位正确的荧光分子, 使它们不被下一轮的激光再激活出来. 之后, 再分别用 405 nm 和 488 nm 激光来激活和漂白其它的荧光分子, 进入下一次循环. 经过持续多次循环后, 细胞内大多数荧光分子被精确定位. 将这些分子的图像合成到一张图上, 最后可以得到比传统光学显微镜高 10 倍分辨率的显微图像, 如图 2. 图 2 显示, 每次只激发少数离散的荧光分子发光, 并且不

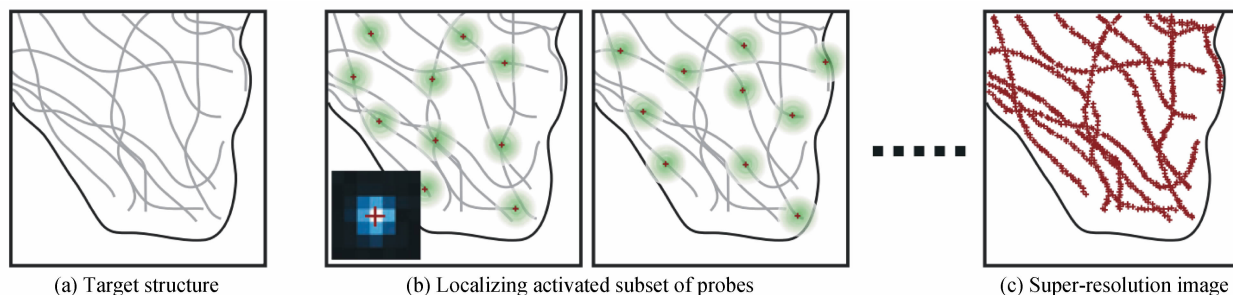


图 2 基于单分子定位技术的超分辨显微成像方法 (PALM & STORM) 原理. 图 (b) 左下角显示的实验图像中, 蓝色部分表示单个荧光分子显微图像, 红色十字是该荧光分子的精确位置<sup>[28]</sup>

Fig. 2 The schematic of single-molecule localization super-resolution microscopy (PALM & STORM). The lower left inset of the Fig. 2(b) shows an experimental image of a single fluorescent dye (blue) and the high-precision localization of the molecule (red cross)<sup>[28]</sup>

会产生空间上的重叠. 不断重复激发和探测, 最终可以精确地定位出足够多的荧光分子, 利用这些多幅子图像重建出超分辨的图像. PALM 技术只能用来观察外源表达的蛋白质, 对于分辨细胞内源蛋白质的定位无能为力. 2006 年底, 美国霍华德-休斯研究所的华裔科学家庄晓薇等人<sup>[26]</sup> 开发出一种类似于 PALM 的方法, 可以用来研究细胞内源蛋白的超分辨定位. 他们发现, 不同的波长可以控制化学荧光分子 Cy5 在荧光激发态和基态之间切换, 例如橙色 561 nm 的激光可以激活 Cy5 发射荧光, 但长时间照射可以将 Cy5 分子转换成基态不发光. 之后, 用蓝色的 488 nm 激光照射 Cy5 分子时, 又可

以将其从基态转换成荧光态, 而此过程的长短依赖于第二个荧光分子 Cy3 与 Cy5 之间的距离. 因此, 当 Cy3 和 Cy5 交联成分子对时, 具备了特定的激发光转换荧光分子发射波长的特性. 将 Cy3 和 Cy5 分子对胶联到特异的蛋白质抗体上, 就可以用抗体来标记细胞的内源蛋白<sup>[27]</sup>. 用特定波长的激光来激活探针, 然后用另一个波长激光来观察、精确定位以及漂白荧光分子, 此过程多次循环后就可以得到内源蛋白的高分辨率影像. 他们命名该技术为 STORM<sup>[26]</sup>.

PALM 与 STORM 的分辨率仅仅受限于单分子的定位精度, 理论上可以达到亚纳米量级, 能与



电子显微镜相媲美。但是根据奈奎斯特采样定律,若频带宽度有限,要从抽样信号中无失真地恢复原信号,采样频率应大于2倍信号最高频率。因此,PALM与STORM所采样荧光分子的空间间隔应该要小于其分辨率的二分之一。由于每一幅子图像只能定位一定数量的离散荧光分子,因此得到一幅高分辨率的样品显微图像,需要对数万甚至上千万幅原始图片进行合成,导致得到一帧图像往往需要

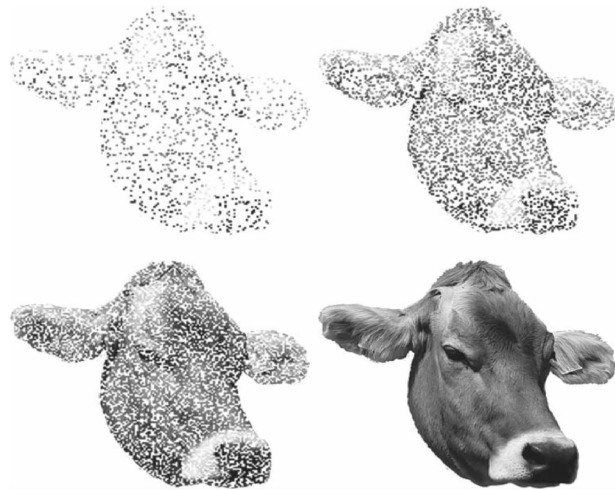


图3 单分子定位成像技术中图像重构过程示意图。随着采样点的增加,重构图像的清晰度也在逐步提高<sup>[30]</sup>  
Fig. 3 Principle diagram of image reconstruction in single-molecule localization techniques. This series of images demonstrates how the super-resolution image is built by plotting localized molecules, depicted here as points. As more points are placed in the images, the image becomes more recognizable<sup>[30]</sup>

几小时的时间。如图3,如果取样精度不够,就不能重构出高分辨率的样品图像。最新的PALM显微虽然已经可以实现几十秒一帧图像的处理速度,但还是不能适用于那些要求实时观察的活体细胞<sup>[29]</sup>。

## 2.2 基于特殊强度分布照明光场的超分辨显微成像方法——STED和SIM

1994年德国科学家Stefan Hell等人<sup>[31-32]</sup>提出一种受激发射损耗(STED)荧光显微技术。如图4所示,其基本原理是用一束脉冲激发荧光分子发光的同时,用另外一束空心的脉冲激光(STED激光)将第一束光斑周边大部分的荧光分子通过受激发射损耗过程将其荧光猝灭,因此可发射荧光的区域被限制在小于衍射极限的空心区域内,从而获得一个小于衍射极限的荧光发光点。其强度半高宽从传统的 $\lambda/[2n\sin\alpha]$ 变成 $\lambda/[2n\sin\alpha\sqrt{1+I/I_{\text{sat}}}]$ ,其中 $I$ 是STED激光的聚焦强度, $I_{\text{sat}}$ 是荧光分子的饱和和吸收强度。由此可看出,当 $I/I_{\text{sat}}$ 的值很大时,STED成像的点光源可以趋于无穷小。使用特殊的不漂白的量子点荧光材料,目前报道的STED最高分辨率可达到6 nm<sup>[33]</sup>。但是在生物成像中,可以加载到生物样品的激光功率是有限的,过高的激光功率会对样品造成损伤,这是制约STED空间分辨率的主要因素。STED成像技术的最大优点是可以快速地观察活细胞内实时变化的过程,目前可以实现空间分辨率62 nm,每秒28帧的速度采集图像<sup>[34]</sup>。

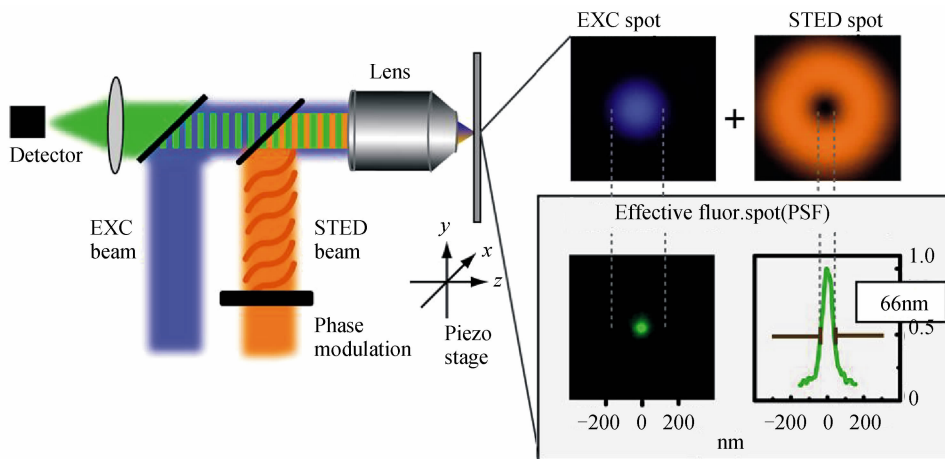


图4 STED荧光显微成像原理示意图。蓝色代表的是激发激光,橙色代表的是空心受激发射损耗激光(STED激光),两束激光经过时间和空间调制后同时照射在样品上。由右图中可以看出,激发光斑(蓝色)经STED激光(橙色)调制后极大地减少了荧光分子发光的光斑大小(绿色),其半高宽可以达到66 nm<sup>[35]</sup>

Fig. 4 Schematic diagram of STED fluorescence microscopy. The blue excitation (EXC) beam is focused to a diffraction-limited excitation spot, while the orange STED beam is able to de-excite molecules. Superimposition of the two focal spots confines the area in which fluorescence is possible to the doughnut centre, yielding the effective fluorescent spot of subdiffraction size shown in green in the lower panel. The profile of the green effective fluorescent spot has an FWHM of 66 nm as well as a sharp peak<sup>[35]</sup>

需要指出的是,STED是一种点扫描成像技术,高的图像采集速率是以牺牲光束扫描范围来实

现的。与宽场成像技术相比,点扫描成像一般具有较强的荧光漂白效应,有可能对活体生物组织带来

损伤。另外, STED 系统光路复杂, 价格非常昂贵。

突破光学衍射极限远场光学显微的另一种方法是利用结构照明的 SIM 技术。SIM 是一种宽场光学显微技术, 使用面阵 CCD 并行采集图像, 具有比 STED 更高的时间分辨率, 与普通宽场显微不同的是它还具有三维层析成像的能力<sup>[36-37]</sup>。SIM 的原理如图 5, 显微物镜的空间分辨率取决于它能采集到的最大空间频率  $f_0$ ,  $f_0$  取决于显微物镜的光学传递函数 (Optical Transfer Function, OTF),  $f_0 = 2NA/\lambda$ 。当样品包含的高频信息  $f > f_0$  时, 样品的细节将难以被分辨。如果使用空间频率为  $f_1$  的正弦条纹结构光照明样品, 则会产生空间频率为  $f_m =$

$|f - f_1|$  的低频莫尔条纹 (Moiré fringes)。莫尔条纹实际上是样品与结构光的拍频 (Beat Frequency) 信号, 它包含有样品超衍射分辨的高频信息  $f$ 。当  $f_m < f_0$  时, 莫尔条纹可以在显微物镜下观察到, 通过软件解码, 可以提取出样品的超分辨信息, 重组出样品的高分辨率图像。从频域来看, SIM 将物镜能收集到的最大空间频率从  $f_0$  提高到了  $f_0 + f_1$ 。因此  $f_1$  越大, SIM 显微的空间分辨率就越高。但是结构照明光场的空间频率  $f_1$  是受衍射极限限制的, 当  $f_1 > f_0$  时, 它将不能被分辨。因此, SIM 显微最大可以将光学显微系统的空间分辨率提高一倍。

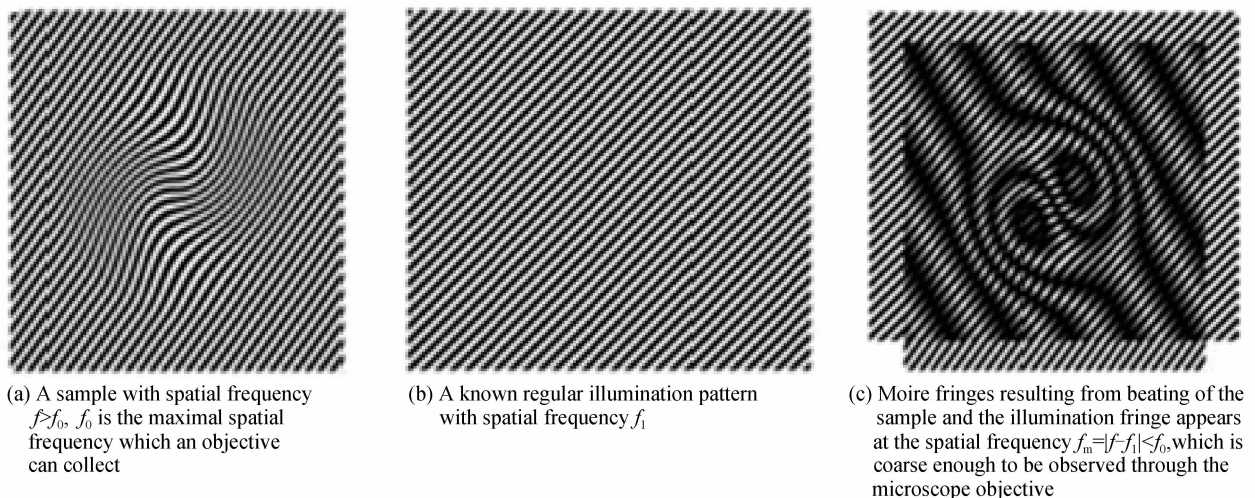


图 5 结构光照明显微 (SIM) 的基本原理<sup>[37]</sup>

Fig. 5 The principle of Structured Illumination Microscopy (SIM)<sup>[37]</sup>

纵向分辨率远低于横向分辨率一直是困扰远场光学显微的问题, 结构光照明显微还可以提高纵向分辨率。多光束干涉可以产生具有三维周期分布的结构照明光场, 从而可实现三维空间的超分辨成像<sup>[38]</sup>。2008 年, 美国 Gustafsson 小组<sup>[39]</sup>使用三光束干涉 SIM, 成功地观察到细胞核膜上核孔复合体的精细三维结构, 其横向分辨率达到 100nm, 纵向分辨率 200 nm。同年, 他们使用六光束干涉并结合非相干光干涉照明干涉成像显微技术 (Incoherent Interference Illumination Image Interference Microscopy, I<sup>5</sup>M), 实现了纵向及横向空间分辨率均为 100 nm 的三维结构光照明显微, 使得从微观上精确定位细胞内部各种细胞器及观测活体细胞内的活动及反应成为可能<sup>[40]</sup>。

综上所述, PALM 和 STORM 是基于单分子定位的超分辨显微成像技术, 需要使用特殊的荧光探针分子进行激活/淬灭, 反复迭代, 最后定位, 具有极高的空间分辨率, 但是时间分辨率很低。STED 与 SIM 都是基于结构化照明的超分辨显微成像技术, 是从物理上超越衍射极限。STED 的

时间分辨率取决于每一个扫描点的停留时间, 扫描步长, 以及扫描范围。SIM 不需要扫描, 每次曝光可以得到一幅完整的样品二维光强分布图像, 其时间分辨率取决于结构照明光场的加载速度和 CCD 的图像采集速度, 与其它三种超分辨显微技术相比, SIM 的空间分辨率较低, 但更适用于那些需要较高时间分辨率的活体生物成像研究。

### 2.3 高分辨三维数字全息显微成像方法

上面介绍的荧光显微成像方法利用光与物质相互作用的非线性特性, 可以达到很高的横向分辨率, 但是纵向分辨率仍然受到限制。对于一些不能用荧光探针分子标记的生物样品或材料, 上述超分辨荧光显微成像技术不能使用。数字全息显微 (Digital Holographic Microscopy, DHM) 成像技术可以解决这个问题, 成为一个重要的发展方向。数字全息显微将光学显微与光学全息相结合, 与传统的明场显微技术相比, 其优势是能三维成像, 纵向分辨率可以达到 1 nm 量级, 且具有自动调焦能力, 特别适合于不能用荧光探针分子标记的透明生物样品。

数字全息显微的特点是干涉记录, 数字再现。它

是传统干涉显微引入数字化技术后的发展和延伸. 传统的干涉显微采用干涉的方法来记录物光波的相位信息, 并利用肉眼直接判读干涉图样, 是一种像面全息成像技术, 干涉图样直接反应了被测物体的厚度或折射率分布, 没有三维成像能力. 数字图像传感器 CCD 的出现使得全息图的数字记录和数字再现成为可能. 当采用 CCD 来记录全息图并进行数字再现时, 干涉显微便过渡为数字全息显微.

### 2.3.1 数字全息显微

数字全息显微的原理如图 6(a)所示: 分光棱镜  $BS_1$  将激光束分成沿正交方向传播的两束光. 其中

一束光经过扩束器 BE 扩束准直后作为参考光; 另一束光用来照明样品, 被用作物光. 物光被显微物镜 MO 和透镜  $L_1$  组成的望远镜系统放大, 并在分光棱镜  $BS_2$  的作用下与参考光进行干涉, 两者的干涉图样被 CCD 记录. 从一幅载频干涉图样或多幅相移干涉图样中可以数字再现出被测样品的振幅和相位分布, 其中相位分布反应了被测物体的三维形貌或折射率分布. 图 6(b)是瑞士 Lunceotec 公司开发的 DHM-1000 投射式数字全息显微镜; 图 6(c)是该 DHM 拍摄的血红细胞的三维图像.

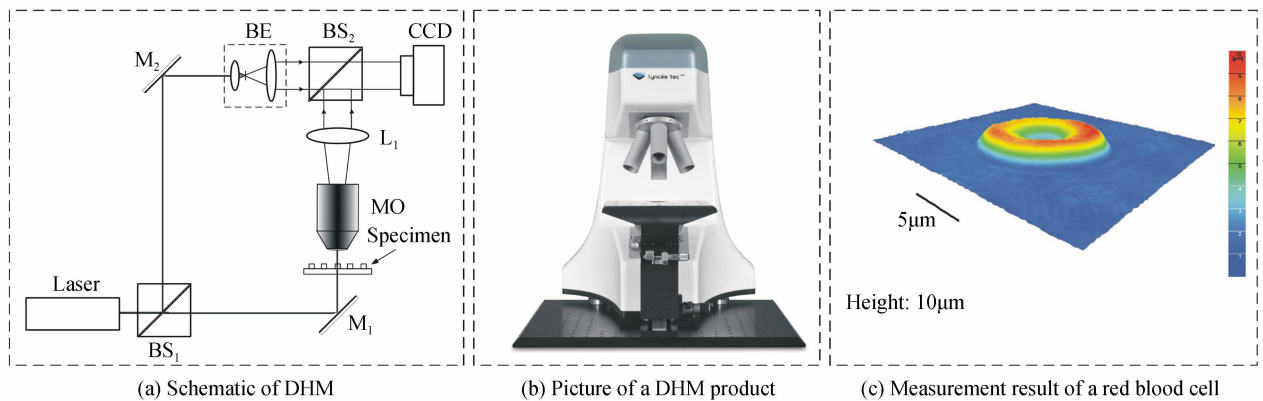


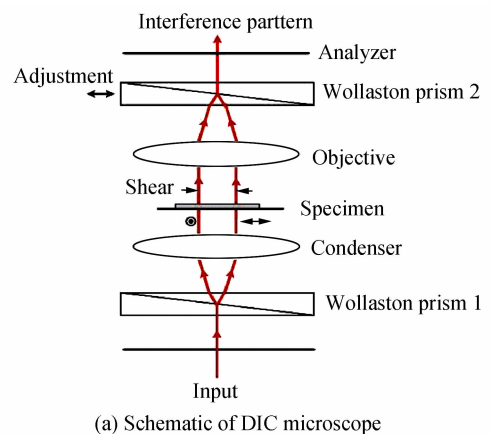
图 6 数字全息显微镜<sup>[41]</sup>

Fig. 6 Digital holographic microscope<sup>[41]</sup>

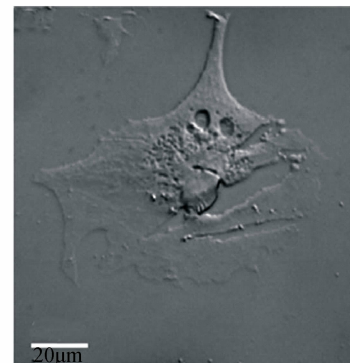
数字全息显微的纵向分辨率可达纳米量级, 但横向分辨率还主要依赖于物镜的数值孔径. 为了突破物镜数值孔径对全息显微成像横向分辨率的限制, Mico<sup>[42]</sup> 和 Schwarz<sup>[43]</sup> 等人采用不同方向的照明光依次照明样品来记录多幅干涉图样, 最后将这些全息图对应的再现像进行合成. 该方法通过“合成数值孔径”突破了显微镜数值孔径对成像分辨率的限制, 从而实现了 DHM 的超分辨成像.

### 2.3.2 微分干涉对比显微

微分干涉对比显微 (Differential Interference Contrast Microscopy, DICM) 的基本原理如图 7(a): 入射光被第一个渥拉斯顿棱镜分成强度相等且偏振方向正交的两束线偏振光, 这两束光经过透镜准直后变成平行光并同时照明样品. 穿过样品后的光波经物镜放大, 然后在第二个渥拉斯顿棱镜的作用下重新合在一起沿相同的方向传播. 通过检偏器后, 两光束发生干涉. 干涉图样反映了被测样品在剪切方向上的相位导数的分布, 如图 7(b). 物平面上两束平行光之间的距离对应于微分干涉中的剪切量. 通过对两个正交方向上的相位梯度进行积分, 最终可以求出样品的相位分布.



(a) Schematic of DIC microscope



(b) Image of a biological cell under DIC microscope

图 7 微分干涉对比显微 (DIC) 原理及观察效果图<sup>[44]</sup>

Fig. 7 Differential interference contrast microscopy (DIC)<sup>[44]</sup>



DIC 具有物参共路的光学结构, 因此具有抗振动能力强的优点. 同时, DIC 还具有较高的空间分辨率、高的图像对比度和光学层析能力. 近年来还有许多学者对其进行研究, 如 Fu 等人<sup>[45]</sup>利用光栅衍射原理, 将物光的 0 级和 +1 级衍射光进行干涉, 实现对海拉细胞的 DIC 定量测量. McIntyre 等人<sup>[46-47]</sup>利用空间光调制器调节 DIC 图像的剪切方向、剪切量和相位延迟, 使之达到最佳效果, 并实现了实时定量 DIC 观测. Heise 和 Stifter<sup>[48]</sup>利用 DIC 的层析能力, 观测了油层中的粒子分布.

### 2.3.3 相衬干涉显微

相衬干涉显微 (Phase Contrast Interference Microscopy, PCIM), 通过改变物光零频分量的相位, 使零频分量与高频分量干涉, 将物光的相位信息变为强度信息<sup>[49]</sup>. 如图 8(a) 所示, 经过透镜  $L_1$  的傅里叶变换, 含有样品信息的物光的频谱出现在透镜  $L_1$  的焦平面上. 一个相位掩模板被放置在该频谱面上, 用于延迟物光零频分量的相位. 通过第二个透镜  $L_2$  的逆傅里叶变换后, 物光的相位信息变成了干涉图的强度信息. 图 8(b) 和 (c) 显示的是一个相位圆环在传统光学显微镜和相衬显微镜下所成的像. 美国麻省理工学院 Popescu<sup>[50]</sup>通过改变物光零频分量的相位延迟量, 得到了多幅相移干涉图样, 实现了对被测样品相位分布的定量测量.

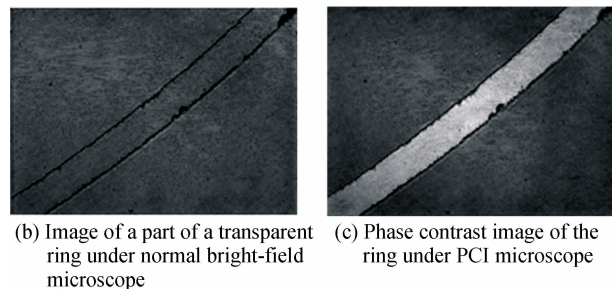
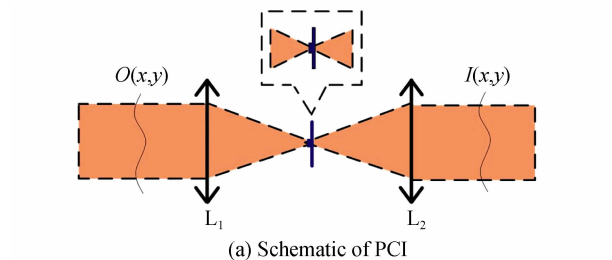
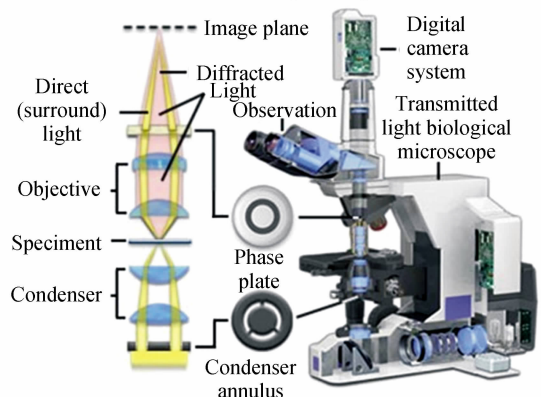


图 8 相衬干涉显微  
Fig. 8 Phase contrast interference (PCI) microscopy

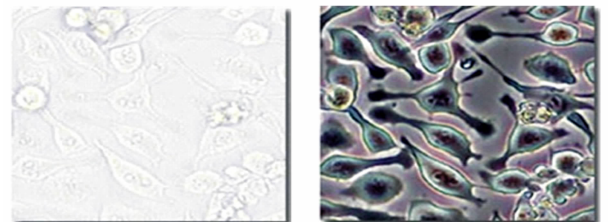
平行光照明具有横向分辨率低、相干噪声大的缺点. 泽尼克相衬干涉显微镜采用了环形照明光, 如图 9(a)<sup>[51]</sup>. 在显微镜聚光镜的前焦面上放置一个环形光阑 (Condenser Annulus), 该环形光阑上每一点发出的光以不同方向照明样品. 经物镜的傅里叶变换, 物光的频谱出现在物镜的后焦平面上. 环形照明光的频谱分布仍然为一圆环. 照明光的零

频分量分布在圆环上, 高频分量分布在零频分量周围. 将一相位掩模板 (Phase plate) 置于此频谱面上, 用来延迟物光零频分量的相位. 该方法具有相干噪声低、横向分辨率高的优点. 然而, 用环状相位掩模板来延迟圆环上零频分量相位的同时, 也延迟了分布在环上的高频分量的相位. 因此, 产生了相位畸变—“光晕”效应. 文献<sup>[52]</sup>采用离散的点状照明代替环状照明克服了上述“光晕”现象, 同时采用相移技术实现了对相位的定量测量.

Phase contrast microscope configuration



(a) Apparatus of a Zernike phase contrast microscope



(b) Comparison of biological cells observed under normal bright-field microscope and the Zernike phase contrast microscope

图 9 泽尼克相衬干涉显微镜<sup>[51]</sup>

Fig. 9 Zernike phase contrast microscope<sup>[51]</sup>

### 2.3.4 低相干干涉显微

普通的全息干涉显微使用相干性好的激光照明, 只能测量物体的轮廓信息或被测物体内部折射率的平均值, 而对于被测物体内部结构或多层折射率的检测无能为力. 低相干干涉显微 (Low Coherence Interference Microscopy, LCIM), 通过采用低相干的照明光源可以进行层析成像, 克服了普通全息干涉显微的这一缺点.

低相干干涉显微的原理如图 10(a) 所示<sup>[53-54]</sup>, 低相干光源 (如 LED、卤素灯) 发出的光经过分光棱镜后被分成两束——物光和参考光. 物光和参考光分别经样品表面和参考面反射后, 沿原路返回并同时被 CCD 所接受. 当物光和参考光之间的光程差在相干长度范围内时, 两光束发生干涉. 通过移动参考光路中的反射镜得到相移量分别为  $0$ 、 $\pi/2$ 、 $\pi$  和  $3\pi/2$  的相移干涉图样, 如图 10(b). 从这些相移干涉图样中可以得到该深度内样品信息, 如图

10(c). 由于来自样品其它平面的反射光和参考光不相干, 在干涉图样处理过程中可以被滤除掉. 通过纵向移动样品或反射镜可以得到不同深度的样品信息(即实现层析), 最后可以得到被测物体结构或折射率的三维分布. 该方法的纵向测量精度取决光源的光谱宽度, 光源的光谱宽度越宽, 纵向测量精度越高. 低相干干涉显微能对高散射介质, 如生物组织进行非介入快速成像, 因而在活体生物组织的微结构分析和疾病诊断方面有重要的应用价值.

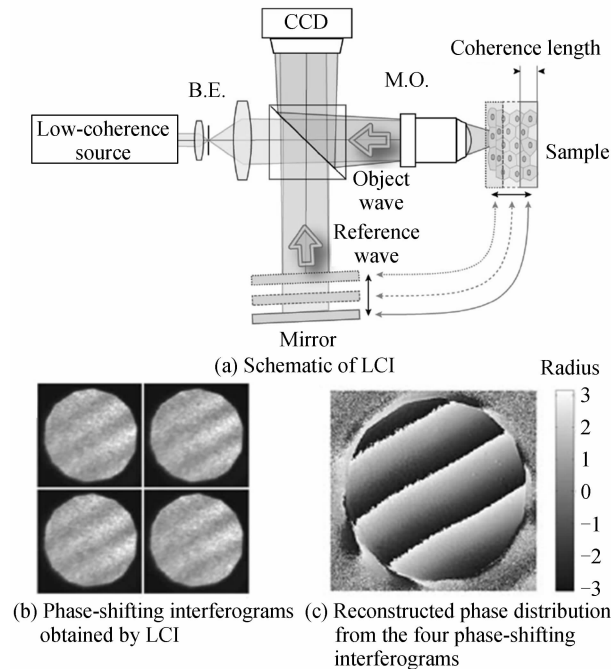


图 10 低相干干涉显微成像<sup>[53-54]</sup>  
Fig. 10 Low coherence interference (LCI) microscopy<sup>[53-54]</sup>

### 3 结论

综上所述, 高分辨光学成像技术在空间探测领域, 以及超分辨光学成像技术在生物领域的发展和运用取得了长足的进步. 新原理和新方法不断涌现, 部分技术已经突破了阿贝-瑞利衍射极限, 分辨率记录在不断地刷新. 但是每种技术都有自身的优缺点, 人们还在不断地探索新的超分辨光学成像原理和技术, 如量子成像原理. 美国已将突破衍射极限列为 21 世纪光学的五大研究计划之首. 我国在这方面的研究具有较好的基础, 但还没有这方面系统的规划, 需要加强. 全文小结如下:

1) 亚像元技术和波前编码成像技术通过增加探测器空间采样频率, 对非衍射受限系统, 通过后续图像处理可实现在同等焦距和探测器尺寸系统下的空间分辨率提高.

2) 光学合成孔径技术通过若干分离的小孔径光学系统组合来实现大孔径的分辨极限, 为衍射受限系统的高分辨率观测提供了一种途径.

3) 傅里叶望远镜技术把增大接收口径转变为加大发射间隔, 用大面积回波能量探测加上傅里叶分量重构, 取代常规的目标图像直接探测, 有可能突破远程高分辨力观测的瓶颈.

4) 基于单分子定位的远场超分辨荧光显微成像技术——PALM 和 STORM 具有亚纳米量级的空间分辨率, 但是时间分辨率很低, 并且需要使用特殊的荧光探针标记样品, 因此在应用中有着很大的局限性.

5) 基于特殊强度分布照明光场的远场超分辨荧光显微成像技术——STED 和 SIM 具有 10 ~ 100 nm 的空间分辨率, 时间分辨率高, 都具有三维成像能力, 更适用于活体生物组织的荧光成像.

6) 数字全息显微成像技术的特点是干涉记录, 数字再现. 其优势是具有三维成像能力, 纵向分辨率可以达到 1 nm 量级, 具有自动调焦能力. 因此, 特别适合于不能用荧光探针分子标记的透明生物样品.

#### 参考文献

- [1] BORN M, WOLF E. 杨葭荪, 译. Optics principle[M]. 7 版. 北京: 电子工业出版社, 2006.
- [2] RICHARDS B, WOLF E. Electromagnetic diffraction in optical systems II. Structure of the image field in an aplanatic system[C]. Proceedings of the Royal Society A, 1959, **253**: 358-379.
- [3] DORN R, QUABIS S, LEUCHS G. Sharper focus for a radially polarized light beam[J]. *Physical Review Letters*, 2003, **91**(23): 3901.
- [4] ZHAO Bao-chang, YANG Jian-feng, WEN De-sheng, et al. Overall scheme and on-orbit images of Chang'e-2 lunar satellite CCD stereo camera [J]. *Science China: Technological Sciences*, 2011, **54**(9): 2237-2242.
- [5] XUE Bin, ZHAO Bao-chang, YANG Jian-Feng, et al. Auto-compensation of velocity-height ratio for Chang'e-2 satellite CCD stereo camera [J]. *Science China: Technological Sciences*, 2011, **54**(9): 2243-2246.
- [6] 刘新平, 高瞻, 邓年茂, 等. 面阵 CCD 作探测器的亚像元成像方法及实验[J]. 科学通报, 1999, **44**(15): 1603-1605.
- [7] LATRY C, ROUGE B. Optimized sampling for CCD instruments: the supermode scheme[C]. IEEE Proceedings IGARSS, 2000, **4**: 2322-2324.
- [8] DOWSKI E R Jr, CATHEY W T. Extended depth of field through wave-front coding [J]. *Applied Optics*, 1995, **34**(11): 1859-1866.
- [9] LEE S H, PARK N C, PARK K S, et al. Upscaling image resolution of compact imaging systems using wavefront coding and a property of the point-spread function[J]. *JOSA A*, 2010, **27**(10): 2304-2312.
- [10] QIAO Yan-feng, LIU Kun, DUAN Xiang-yong. Optical synthetic aperture imaging techniques and development[J]. *Chinese Journal of Optics and Applied Optics*, 2009, **2**(3): 175-182.
- [11] 乔彦峰, 刘坤, 段相永. 光学合成孔径成像技术及发展现状 [J]. 中国光学与应用光学, 2009, **2**(3): 175-182.
- [12] LIANG Shi-tong, YANG Jian-feng, LI Xiang-juan, et al. Study of a new sparse-aperture system[J]. *Acta Photonica*

- Sinica, 2010, **39**(1): 148-152.
- 梁士通, 杨建峰, 李湘眷, 等. 一种新型稀疏孔径结构的研究[J]. 光子学报, 2010, **39**(1): 148-152.
- [12] YU Qian-yang, QU Hong-song. Realization of high-resolution visible earth observation on geostationary earth orbit[J]. *Chinese Optics and Applied Optics*, 2009, **2**(1): 129.
- 于前洋, 曲宏松. 实现同步轨道(GEO)高分辨力对地观测的技术途径(下) [J]. 中国光学与应用光学, 2009, **2**(1): 129.
- [13] LU Chang-ming, WANG Jian-jun, GAO Xin, *et al.* A study on the theory of Fourier telescope and its improvement[J]. *Journal of Spacecraft TT & C Technology*, 2010, **29**(2): 17-20.
- 陆长明, 王建军, 高昕, 等. 傅里叶望远镜原理及改进研究[J]. 飞行器测控学报, 2010, **29**(2): 17-20.
- [14] GIEPMANS B N, ADAMS S R, ELLISMAN M H, *et al.* The fluorescent toolbox for assessing protein location and function[J]. *Science*, 2006, **312**(5771): 217-224.
- [15] LORD S J, LEE H L, MOERNER W E. Single-molecule spectroscopy and imaging of biomolecules in living cells[J]. *Analytical Chemistry*, **82**(6): 2192-2203.
- [16] XIE X S, CHOI P J, LI G W, *et al.* Single-molecule approach to molecular biology in living bacterial cells[J]. *Annual Review of Biophysics*, 2008, **37**: 417-444.
- [17] PAWLEY J B. Handbook of biological confocal microscopy [M]. 3rd ed. USA; Springer, 2006.
- [18] FORKEY J N, QUINLAN M E, GOLDMAN Y E. Measurement of single macromolecule orientation by total internal reflection fluorescence polarization microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2005, **89**(2): 1261-1271.
- [19] SYNGE E H. A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region [ J ]. *Philosophical Magazine*, 1928, **6**: 356-362.
- [20] BETZIG E, LEWIS A, HAROOTUNIAN A, *et al.* Near-field scanning optical microscopy (NSOM)-development and biophysical applications[J]. *Biophysical Journal*, 1986, **49**(1): 269-279.
- [21] MOERNER W E. New directions in single-molecule imaging and analysis[C]. Proc Natl Acad Sci, USA, 104, 2007: 12596-12602.
- [22] THOMPSON R E, LARSON D R, WEBB W W. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes[J]. *Biophysical Journal*, 2002, **82**(5): 2775-2783.
- [23] 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.
- [24] PERTSINIDIS A, ZHANG Y, CHU S. Subnanometre single-molecule localization, registration and distance measurements[J]. *Nature*, 2010, **466**(7306): 647-651.
- [25] BETZIG E, PATTERSON G H, SOUGRAT R, *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution[J]. *Science*, 2006, **313**(5793): 1642-1645.
- [26] RUST M J, BATES M, ZHUANG X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, **3**(10): 793-795.
- [27] LÜ Zhi-jian, LU Jing-ze, WU Ya-qiong, *et al.* Introduction to theories of several super-resolution fluorescence microscopy methods and recent advance in the field [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2009, **36**(12): 1626-1634.
- 吕志坚, 陆敬泽, 吴雅琼, 等. 几种超分辨率荧光显微技术的原理和近期进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, **36**(12): 1626-1634.
- [28] HUANG B, BATES M, ZHUANG X. Super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, **78**: 993-1016.
- [29] 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.
- [30] PATTERSON G, DAVIDSON M, MANLEY S, *et al.* Superresolution imaging using single-molecule localization [J]. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2010, **61**: 345-367.
- [31] 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.
- [32] KLAR T A, JAKOBS S, DYBA M, *et al.* Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission [ J ]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, **97**(15): 8206-8210.
- [33] RITTWEGER E, HAN K Y, IRVINE S E, *et al.* STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution[J]. *Nature Photonics*, 2009, **3**: 144-147.
- [34] 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.
- [35] WILLIG K I, RIZZOLI S O, WESTPHAL V, *et al.* STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis[J]. *Nature*, 2006, **440**(7086): 935-939.
- [36] 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.
- [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] GUSTAFSSON M G L, SHAO L, CARITON P M, *et al.* Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination [ J ]. *Biophysical Journal*, 2008, **94**(12): 4957-4970.
- [39] SCHERMELLEH L, CARLTON P M, HAASE S, *et al.* Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy [J]. *Science*, 2008, **320**(5881): 1332-1336.
- [40] SHAO L, ISAAC B, UZAWA S, *et al.* Gustafsson. I5M: wide-field light microscopy with 100-nm-scale resolution in three dimensions[J]. *Biophysical Journal*, 2008, **94**(12): 4971-4983.
- [41] <http://www.lynceetec.com/content/view/481/192/>.
- [42] MICO V, ZALEVSKY Z, FERREIRA C, *et al.* Superresolution digital holographic microscopy for three-dimensional samples[J]. *Optics Express*, 2008, **16**(23): 19260-19270.
- [43] SCHWARZ C J, KUZNETSOVA Y, BRUECK S R J. Imaging interferometric microscopy [J]. *Optics Letters*, 2003, **28**(16): 1424-1426.
- [44] ALLEN R D, DAVID G B, NOMARSKI G. The Zeiss-Nomarski differential equipment for transmitted light microscopy[J]. *Z Wiss Mikrosk*, 1969, **69**(4): 193-221.
- [45] FU D, OH S, CHOI W, *et al.* Quantitative DIC microscopy

- using an off-axis self-interference approach [J]. *Optics Letters*, 2010, **35**(14): 2370-2372.
- [46] McINTYRE T J, MAURER C, BERNET S, *et al.* Differential interference contrast imaging using a spatial light modulator[J]. *Optics Letters*, 1999, **34**(19): 2988-2990.
- [47] McINTYRE T J, MAURER C, FASSL S, *et al.* Quantitative SLM-based differential interference contrast imaging[J]. *Optics Express*, 2010, **18**(13): 14063-14078.
- [48] HEISE B, STIFTER D. Quantitative phase reconstruction for orthogonal-scanning differential phase-contrast optical coherence tomography [J]. *Optics Letters*, 2009, **34**(9): 1306-1308.
- [49] ZERNIKE F. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects[J]. *Physica*, 1942, 9: Part I, 686-698, Part II, 974-986.
- [50] POPESCU G, DEFLORES L P, VAUGHAN J C, *et al.* Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics[J]. *Optics Letters*, 2004, **29**(21): 2503-2505.
- [51] [http://www. microscopyu. com/articles/phasecontrast/ phasemicroscopy. html](http://www.microscopyu.com/articles/phasecontrast/phasemicroscopy.html).
- [52] GAO P, YAO B, HARDER I, *et al.* Phase-shifting Zernike phase contrast microscopy for quantitative phase measurement[J]. *Optics Letters*, 2011, **36**(21): 4305-4307.
- [53] LI X, YAMAUCHI T, IWAI H, *et al.* Full-field quantitative phase imaging by white-light interferometry with active phase stabilization and its application to biological samples[J]. *Optics Letters*, 2006, **31**(12): 1830-1832.
- [54] MASSATSCH P, CHARRIÈRE F, CUCHE E, *et al.* Time-domain optical coherence tomography with digital holographic microscopy[J]. *Applied Optics*, 2005, **44**(10): 1806-1812.

## Progress and Applications of High-resolution and Super-resolution Optical Imaging in Space and Biology

YAO Bao-li<sup>a</sup>, LEI Ming<sup>a</sup>, XUE Bin<sup>a, b</sup>, GAO Peng<sup>a</sup>, YAN Shao-hui<sup>a</sup>, ZHAO Hui<sup>a, b</sup>, ZHAO Wei<sup>a</sup>, YANG Jian-feng<sup>a, b</sup>, FAN Xue-wu<sup>a, b</sup>, QIU Yue-hong<sup>a, b</sup>, GAO Wei<sup>a, b</sup>, ZHAO Bao-chang<sup>a, b</sup>, LI Ying-cai<sup>a, b</sup>

(a. *Joint Research Laboratory of High-resolution Optical Imaging, State Key Laboratory of Transient Optics and Photonics*; b. *Laboratory of Space Optical Technology, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Xi'an 710119, China*)

**Abstract:** Large to observe the boundless expanse of universe with astronomical optical telescopes, small to detect the infinitesimal nano-world with optical microscopes, optical imaging technology plays a very important role for human beings in the exploration and discovery of the mysteries of the unknown world. To see farther, to see more details and to see more clearly are people's constantly pursuing goal. The traditional optics theory has proved that all classical optical systems are diffraction-limited, i. e., the physical limit of the spatial resolution of optical systems is determined by the light wavelength and the relative aperture (or numerical aperture) of the system. Can this diffraction-limited barrier be broken through? Is it possible to continue to improve the imaging resolution of optical systems? Around this issue, this paper reviews the recent progress of a variety of high-resolution and super-resolution optical imaging techniques, and their developments in the fields of space exploration and biological applications.

**Key words:** High-resolution; Super-resolution; Optical imaging; Space optical remote sensing; Microscopy