

受激辐射损耗超分辨成像技术研究

魏通达, 张运海, 杨皓旻

(中国科学院苏州生物医学工程技术研究所 江苏省医用光学重点实验室, 江苏 苏州 215163)

摘要: 受激辐射损耗显微成像(STED)是一种超分辨荧光显微成像技术,它能够突破传统光学衍射极限的限制,把远场光学分辨率提高到百纳米以内,被广泛应用于生物医学等领域,是目前光学显微成像领域研究的热点之一。采用了一种基于超连续谱皮秒脉冲白激光光源的 STED 显微系统,实现超分辨成像。并从精密合束、脉冲延迟和损耗光残留光强几个方面探讨系统优化,从而获得最佳的成像效果。对直径约 25 nm 荧光微球成像实验的数据表明:该系统成像分辨率可达约 60 nm,分辨能力远远高于衍射极限。另外,系统成功实现了对核孔复合物、微管和微丝等一系列生物样品的超分辨成像,共聚焦成像中某些模糊不清的结构在 STED 成像中清晰可辨。

关键词: 荧光显微成像; 超分辨; 受激辐射损耗

中图分类号: O439 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3788/IRLA201645.0624001

Super resolution imaging technology of stimulated emission depletion

Wei Tongda, Zhang Yunhai, Yang Haomin

(Jiangsu Provincial Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China)

Abstract: Stimulated emission depletion (STED) is a kind of super resolution fluorescence microscopy imaging technology. It can break through the traditional optical diffraction limit, and make the far field optical resolution improved to less than 100 nm, which is widely used in biomedical field, and becomes one of the hotspots in optical imaging research. A STED microscope system based on ultra-continuous spectrum picoseconds pulsed white laser source was introduced, and super-resolution imaging was realized. The optimized results were discussed from the aspects of precise collimation, pulse delay and residual intensity of the STED light, therefore the best imaging effect was obtained. The experiments data of the about 25 nm diameter fluorescent microspheres imaging shows that the resolution of the system is about 60 nm, which is much higher than the diffraction limit. In addition, the system succeeds in realizing super resolution imaging of nuclear pore complexes, microtubules and microfilaments and a series of biological samples. Some obscure structures imaged in confocal microscopy can be legible in STED imaging.

Key words: fluorescence microscopy imaging; super resolution; stimulated emission depletion

收稿日期:2015-10-20; 修订日期:2015-11-11

基金项目:国家重大科研装备研制项目(ZDYZ2013-1)

作者简介:魏通达(1986-),男,助理研究员,博士,主要从事超分辨显微成像方面的研究。Email:weid@tibet.ac.cn

0 引言

生物医学领域研究往往需要在活体条件下对细胞内的组织进行观测。远场光学成像技术因其具有样品制备简单、对生物样品无损伤、成像速度快等优势,成为观察微小结构的重要技术手段,它伴随着整个学科领域的发展,一直促进着人类对细胞微观世界的认知^[1]。但是传统光学显微镜受衍射极限限制,其分辨率仅能达到约 200~300 nm,因此,许多尺度更微小的重要组织结构,如病毒和细胞,以及生物体内的蛋白质等都无法进行观测。为了揭示细胞内蛋白质活动和细胞微结构特征,提高光学显微镜分辨率成为生物医学发展的迫切需要。

为克服远场光学衍射极限,实现更高分辨率,各种超分辨技术不断发展,主要分为两类:第一类是结合光学非线性效应对成像的照明光路进行整形,获得小于衍射极限的荧光发光点。这类技术的典型代表是 Hell 等提出的受激辐射损耗显微镜 (Stimulated Emission of Depletion Microscopy, STED)^[2-4],第二类超分辨技术是基于单分子定位的成像方法,利用光开关荧光蛋白,光敏化或光漂白现象将衍射极限范围内的单个分子在不同的时间随机地激活,并将各个荧光分子精确定位再重组,叠加获得超分辨图像,典型代表有光敏定位显微镜 (Photoactivation Localization Microscopy, PALM)^[5-7]和随机光重建显微镜 (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM)^[8-10]等。

超分辨技术主要应用于细胞生物学、神经生物学、微生物学等生物医学领域的前沿探索方面。相比其他的方法,STED 方法是一种更为直接的方法,它以激光扫描共聚焦显微光学技术为基础,使用两路激光,一路用于激发荧光、一路用于受激损耗,通过把被激发的荧光物质限制在小于衍射极限的范围内,从而实现超高分辨率。其成像方式不依赖于特殊的荧光染料,也无需复杂的后期图像处理,因此 STED 技术被认为是下一代显微光学发展的核心技术之一^[11-13]。

STED 显微技术中的两路激光可以使用连续光或者是脉冲光,但是目前效果更好的是脉冲光。典型的成像系统中,一系列脉冲激发光经大数值孔径的显微物镜聚焦,在样品内形成衍射极限大小的荧光激发

区域,同时脉冲损耗光也在样品内聚焦,形成中央光强接近为零的圆环形焦斑。为了获得较高的成像分辨率和信噪比,两脉冲在样品内部空间上要高度重合,而且抵达样品的时间上也需要精确控制,此外,损耗光调制形成中央的光强越低,成像效果也越佳。

文中介绍一种基于超连续谱皮秒脉冲白激光光源的 STED 显微系统,实现超分辨成像。并从精密合束、脉冲延迟和损耗光残留光强几个方面探讨系统优化,从而获得最佳的成像效果。

1 成像系统

实验中 STED 显微系统的结构如图 1 所示。这里使用了超连续谱皮秒脉冲白激光光源 (SC450-PP-HE, Fianium, 图中 SC 所示),使用该激光器的好处是:首先,该激光器光谱范围从 450~1 700 nm 覆盖,通过简单的分光机构,一台激光器可替代多个波长激光器,使系统结构简单、紧凑,并能够方便地实现多色功能;

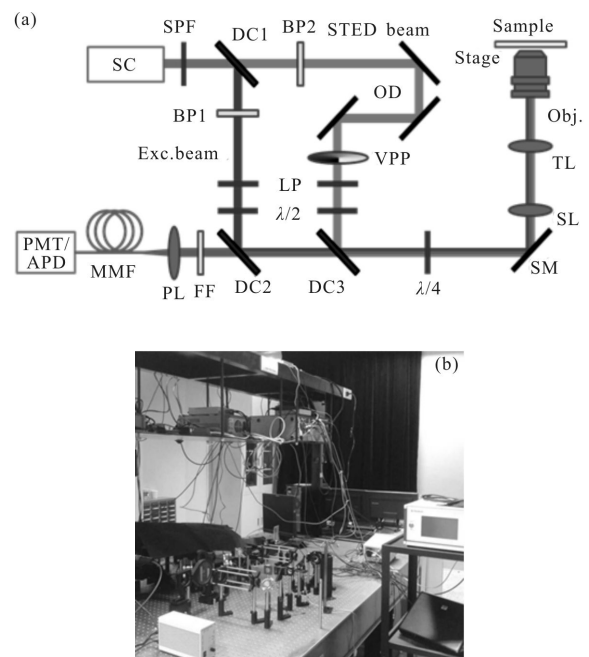


图 1 STED 显微系统

Fig.1 STED system

第二,成像系统中的激发光和损耗光来源于同一光源,避免了复杂的脉冲同步等问题,而且脉冲宽度约为 100 ps,特别适合 STED 成像,不需要脉冲展宽;此外,该激光器的光谱范围内总功率可达 2 W 以上,脉冲峰值大于 1 nJ/nm,满足损耗所需较强脉冲峰值的

要求,脉冲重复频率约为 1 MHz,减少了荧光漂白的几率,特别适合生物成像。

考虑到生物医学领域的应用,系统中使用了 488 nm 波长作为激发光,592 nm 波长作为损耗光,应用可覆盖 GFP/YFP, Abberior STAR 440SX, ATTO 488, Alexa Fluor488, FITC 等常用荧光染料。据此,成像系统中配备了对应的二色镜分光方案。

首先,激光器发出的白光首先经过一个短波通滤光片 SPF,用以滤除激光红外波段部分的干扰,透过可见光。经二色镜 DC1,长波透过短波反射,把激光按波长分为激发光路 Exc. beam 和损耗光路 STED beam。其中激发光路中使用以 488 nm 为中心带宽为 10 nm 的带通滤光片 BP1,损耗光路使用以 592 nm 为中心带宽为 20 nm 的带通滤光片 BP2。

损耗光路中通过精密的光学延迟装置 OD,精密调节损耗光相对于激发光的延迟。通过 $0\sim 2\pi$ 的涡旋相位板 VPP 调制,用于损耗光生产中空的焦斑。同时,激发光和损耗光均需要经过线起偏器 LP,半波片 $\lambda/2$ 和 $1/4$ 波片 $\lambda/4$,用于调制激光的偏振态,使得在物镜入瞳处为旋向相同的圆偏振光。

两路激光通过二色镜 DC2 和 DC3 进行合束,其中 DC2 反射 488 nm 透过荧光,DC3 反射 592 nm 透过荧光。合束后的激光经过振镜 SM,扫描透镜 SL 进入显微镜中,显微镜体中包括筒镜 TL 和数值孔径 1.4 的显微物镜 Obj。样品置于纳米位移台上 stage,振镜和纳米位移台两种扫描机构的结合使用,可对样品进行快速或高精度的扫描,满足不同的成像需求。

激发的样品有效荧光按原路返回到系统中,先后透过二色镜 DC3 和 DC2 后,经荧光滤光片滤波后,由针孔透镜 PL 汇聚于多模光纤 MMF 内,光纤端面同时还起到共聚焦针孔的作用,最终荧光信号被探测器 PMT 或 APD 接收。

激光功率也是系统重要参数,STED 理论上焦平面内有效点扩散函数(PSF)的半峰全宽(FWHM)可表示为^[14-15]:

$$\Delta r \approx \lambda / (2NA \sqrt{1 + I/I_s}) \quad (1)$$

式中:损耗光强 I 越大则分辨率越高。系统中通过渐变滤光片对光强进行调节。由于相位板 VPP 对激光带宽的限制不能超过 20 nm^[3],而带宽影响损耗光功率,实测物镜入瞳处的 20 nm 带宽损耗光功率约为 1.5 mW,激发光功率约为 10 μ W。

2 系统优化

2.1 精密合束

STED 成像理想情况下,损耗光的最小光强处应与激发光的最大光强处重合。这样,周边的荧光可被损耗而不发出荧光,而中央较强荧光可以保留,从而得到较高的信噪比。

为此,需要对激发光与损耗光光斑中心的重合度进行优化,保证 20 nm 以内的重合精度。系统中采用点扩散函数测量的方法,以直径 60 nm 金纳米粒子作为观察对象,用两束光同时对金粒子扫描成像,分析两路激光光斑的形态,依据两光斑的相对位置进行精确合束。对金粒子扫描成像以及合束效果如图 2 所示,配合电控可调俯仰的二色镜机构 DC2,调节时以损耗光环形光斑为基准,调节激发光的角度,实现激发光圆形光斑成像的位移,直至与损耗光中心重合,该精密合束过程可实时监测和调整。

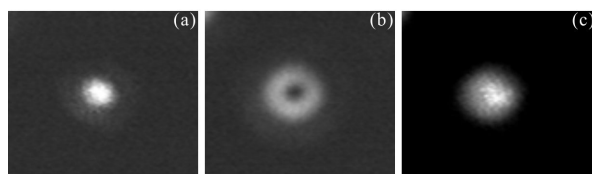


图 2 金粒子激发光、损耗光以及合束成像

Fig.2 Exciting STED and collimation imaging of nanogold

经过金粒子成像的检验,激发光与损耗光在物镜焦平面内实现了精确重叠,重合精度取决于扫描精度,实验系统中该精度可达 20 nm,满足成像需要。

2.2 脉冲延迟

理论上,为了得到良好的 STED 超分辨效果,激发光与损耗光脉冲的时间延迟约为 100 ps 左右^[16-17],它应该小于分子的振动弛豫时间,从而有效地损耗荧光态分子。由于损耗光脉冲为高斯形,且强度很高,其脉冲前沿已经能够有效地对荧光态分子进行耗尽,适当的同步延迟反而会提高空间分辨率,而且延迟时间跟脉冲宽度也有关。因此,最佳延迟时间需要进行试验而获得优化结果。

图 3 为光程延迟 OD,将两面正交的反射镜放置在导轨上,通过移动反射镜底座改变光程,精度可达飞秒量级。将该时间延迟器用于损耗光路,通过调整光程调节激发光与损耗光脉冲的时间间隔,测量损

耗效率，得到损耗效率最高时确定为最佳的延迟时间。

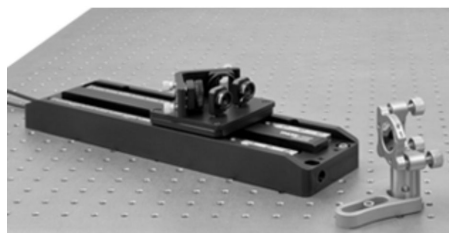


图 3 光程延迟

Fig.3 Optical delay

试验样品采用直径 48 nm 荧光小球，激发光 488 nm，平均功率 1 μ W，损耗光 592 nm，平均功率 100 μ W。优化过程中暂不使用相位板，让激发光与损耗光光斑均为实心光斑并三维精确重合。对荧光小球进行 3 次成像，分别为：(1) 激发——获得荧光强度的初始值；(2) 损耗——获得损耗后的荧光强度值，计算损耗效率；(3) 再激发——获得再次激发的荧光强度值，排除荧光漂白的影响。

第 2 次图像强度与第 1 次图像强度之比表示损耗效果(剩余光强百分比)，第 3 次图像强度与第 1 次图像强度之比表示经过两次成像后荧光漂白效果。在不发生漂白的情况下，剩余光强最小时对应最佳延迟时间。测量结果如表 1 和图 4 所示。

表 1 不同时间延迟实验结果

Tab.1 Results of different delay time

Time delay/ps	Residual intensity	Bleaching effect
66.7	67.47%	102.15%
73.36	62.09%	100.52%
80.02	58.73%	101.19%
86.68	55.29%	100.95%
93.34	52.34%	100.97%
100	50.20%	99.26%
106.66	52.40%	101.2%
113.32	54.62%	100.51%
119.98	55.02%	101.43%

从表 1 可以看出，实验中第 1 次和第 3 次成像的光强比均基本接近 100%，说明实验采用的激发和损耗光强度并未对荧光造成太大的漂白影响，损耗成像时荧光光强降低基本源于受激辐射损耗过程。从图 4 可以看出：对比不同时间延迟情况下的剩余光

强比变化，损耗光脉冲相对于激发光延迟 100 ps 时，可获得最佳的损耗效果，与理论值一致。

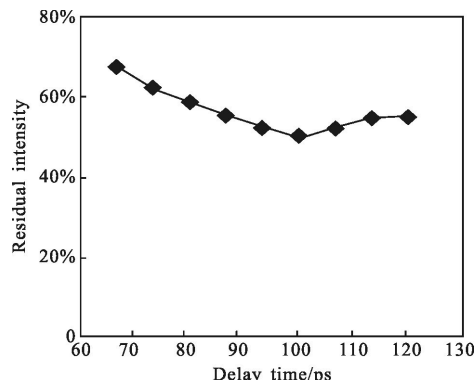


图 4 延迟时间对应剩余光强

Fig.4 Delay time vs residual intensity

2.3 损耗光残留光强

对于 STED 超分辨成像而言，为了得到较高分辨率和信噪比，损耗光斑中央的残留光强是很重要因素之一。根据理论计算表明，损耗光中央光强相对于最大光强每提高 1%，则最终系统 SNR 和峰值荧光强度会降低约 10%。一般认为，若要得到较好的 STED 超分辨图像，损耗光中央残留光强不应超过最大光强的 5%^[18]。因此，需要对损耗光进行优化保证残留光强最小。

系统中采用圆偏光经过 $0\sim 2\pi$ 螺旋相位调制的方式获得面包圈形点扩散函数，除了激光与相位板的精确对准之外，入射光的圆偏振度(短轴与长轴的比值)对残留光强的影响作用也极大，此处主要是通过优化偏振态来降低残留光强。在物镜入瞳处采用偏振态测量仪测量入射光偏振态，应保证圆偏振度在 95% 以上。

理论上，线偏光经过快轴方向夹角为 45° 的 $1/4$ 波片就可形成圆偏光，但是实际情况中，由于二色镜、透镜和反射面等会引入椭圆偏性。因此，除了在激发光与损耗光共光路中使用 $1/4$ 波片外，还在两路光中分别增加了 $1/2$ 波片，微调偏振方向，优化偏振态，使激光在进入物镜前是较完美的圆偏光。

为了得到残留光强的实验数据，采用直径 60 nm 金粒子作为样品，探测其背向散射光进行扫描成像，得到点扩散函数分布如图 5 所示，并等到横截面的光强分布曲线。实验测量结果可见，通过优化偏振态可以得到较好的损耗光残留光强，比例小于 1%。

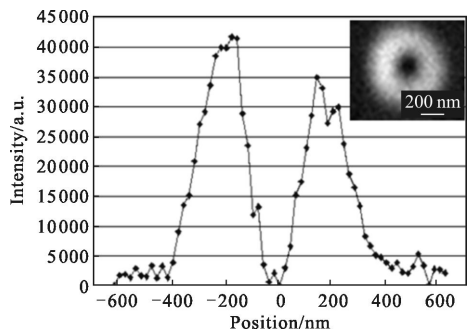


图 5 损耗光斑与残留光强

Fig.5 STED spot and residual intensity

3 结果与讨论

3.1 荧光小球超分辨成像

为了证明 STED 成像系统的超分辨能力,对直径为 25 nm 的荧光小球同一区域分别进行共聚焦成像和 STED 成像,成像结果如图 6 所示。如方框区域,空间上距离很近的小球在共聚焦成像中区分不明显,而相同的小球在 STED 成像下则清晰可辨。

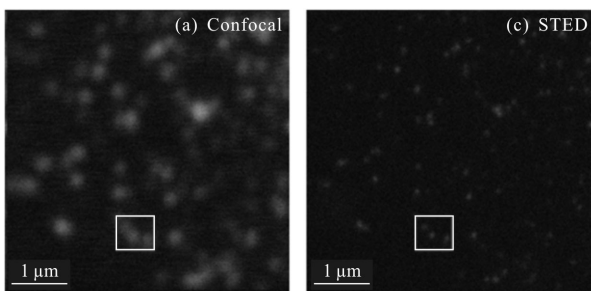


图 6 直径 25 nm 荧光小球图像

Fig.6 Diameter 25 nm fluorescent microsphere images

系统对荧光小球成像的点扩散函数测量结果如图 7 所示,直接测量得到 65 nm 的半峰全宽值,考虑

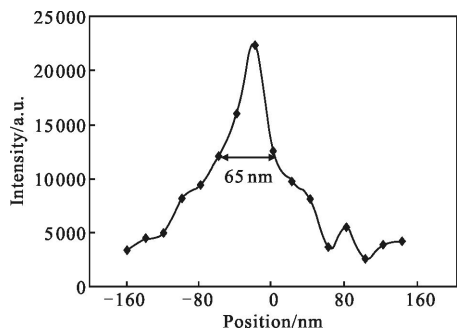


图 7 分辨率测量

Fig.7 Resolution measurement

到小球实际尺寸的影响,根据公式^[19]

$$d_{\text{resolution}} = \sqrt{d_{\text{FWHM}}^2 - d_{\text{size}}^2} \quad (2)$$

推算小球直径为 25 nm,可得到系统的成像分辨率约为 60 nm 左右。

3.2 生物样品超分辨成像

STED 显微技术是为了满足生命科学对更高分辨率的要求,为使 STED 成像系统能够真正服务于生命科学研究,在该实验系统上对多种生物样品的玻片进行了成像实验,如图 8 所示。分别对生物样品如核孔复合物、微丝和微管进行超分辨成像,并与共聚焦成像效果进行对比,可见超分辨效果明显,许多组织结构细节在共聚焦中模糊不清,而 STED 成像则清晰可见。

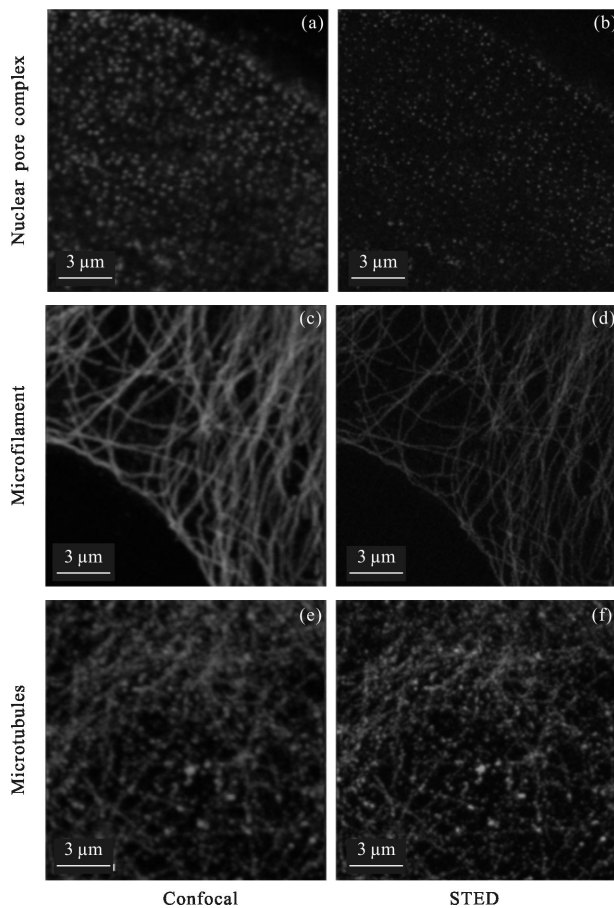


图 8 生物样品成像

Fig.8 Biological samples imaging

4 结论

搭建了一种基于超连续谱皮秒脉冲白激光光源的 STED 显微系统,实现了超分辨成像。该激光光源

用于 STED 系统具有集成难度低、结构简单、功率高、漂白效果小等许多优点,特别适合生物成像。文中详细介绍了系统构成,并为了提高成像分辨率和信噪比,从精密合束、脉冲延迟和损耗光残留光强 3 个方面,讨论对该系统进行优化的方法。

对直径约 25 nm 荧光微球成像实验的原始图像数据表明:该系统成像分辨率可达约 60 nm,分辨能力远远高于衍射极限,并且通过一系列图像处理技术(如反卷积等),得到的结果将进一步优化。另外,系统成功实现了对核孔复合物、微管和微丝等一系列生物样品的超分辨成像,共聚焦成像中某些模糊不清的结构在 STED 成像中清晰可辨。在该系统的基础上,工程样机的设计工作也已开展。

参考文献:

- [1] Hell S W. Far-field optical nanoscopy[J]. *Science*, 2007, 316(5828): 1153–1158.
- [2] Liu Y, Ding Y, Alonas E, et al. Achieving $\lambda/10$ resolution CW STED nanoscopy with a Ti: sapphire oscillator[J]. *PloS One*, 2012, 7(6): e40003.
- [3] Eggeling C, Hell S W. STED Fluorescence Nanoscopy [M]. Berlin: Springer, 2014.
- [4] Kuang C, Zhao W, Wang G. Far-field optical nanoscopy based on continuous wave laser stimulated emission depletion [J]. *Review of Scientific Instruments*, 2010, 81(5): 053709.
- [5] Nelson A J, Gunewardene M S, Hess S T. High speed fluorescence photoactivation localization microscopy imaging [C]//SPIE NanoScience + Engineering. International Society for Optics and Photonics, 2014: 91690P–91690P–7.
- [6] Achurra P, Holden S, Pengo T, et al. Super-Resolution Microscopy Techniques in the Neurosciences [M]. USA: Humana Press, 2014: 87–111.
- [7] Klein T, Proppert S, Sauer M. Eight years of single-molecule localization microscopy[J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2014, 141(6): 561–575.
- [8] Kim D, Bujny M, Zhuang X. Structural studies by correlative stochastic optical reconstruction microscopy and electron microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2014, 106(2): 606a.
- [9] Endesfelder U, Heilemann M. Advanced Fluorescence Microscopy: Method and Protocols[M]. New York: Springer, 2015: 263–276.
- [10] Tehrani K F, Xu J, Kner P A. Multi-color quantum dot stochastic optical reconstruction microscopy (qSTORM)[C]//SPIE, 2015, 9331: 93310C.
- [11] D'Este E, Kamin D, Göttfert F, et al. STED nanoscopy reveals the ubiquity of subcortical cytoskeleton periodicity in living neurons[J]. *Cell Reports*, 2015, 10(8): 1246–1251.
- [12] Honigsmann A, Mueller V, Ta H, et al. Scanning STED-FCS reveals spatiotemporal heterogeneity of lipid interaction in the plasma membrane of living cells [J]. *Nature Communications*, 2013, 5: 5412.
- [13] Yu J Q, Yuan J H, Zhang X J, et al. Nanoscale imaging with an integrated system combining stimulated emission depletion microscope and atomic force microscope [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2013, 58(33): 4045–4050.
- [14] Westphal V, Hell S W. Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope[J]. *Phys Rev Lett*, 2005, 94: 143903.
- [15] Harke B, Keller J, Ullal C K, et al. Resolution scaling in STED microscopy[J]. *Opt Express*, 2008, 16: 4154–4162.
- [16] Yu Jianqiang, Yuan Jinghe, Fang Xiaohong, et al. Effects of excitation and depletion process on resolution of stimulated emission depletion microscope[J]. *Acta Optica Sinica*, 2010, 30(S1): 100405. (in Chinese)
于建强, 袁景和, 方晓红, 等. 受激辐射耗尽荧光显微镜的激发耗尽过程与空间分辨率计算 [J]. *光学学报*, 2010, 30(S1): 100405.
- [17] Galiani S, Harke B, Vicidomini G, et al. Strategies to maximize the performance of a STED microscope [J]. *Optics Express*, 2012, 20(7): 7362–7374.
- [18] Xi P, Xie H, Liu Y, et al. Optical nanoscopy with stimulated emission depletion [J]. *Optical Nanoscopy and Novel Microscopy Techniques*, 2014: 1–22.
- [19] Yang X, Tzeng Y K, Zhu Z, et al. Sub-diffraction imaging of nitrogen-vacancy centers in diamond by stimulated emission depletion and structured illumination [J]. *Rsc Advances*, 2014, 4(22): 11305–11310.