

文章编号: 1005-5630(2020)04-0067-08

DOI: 10.3969/j.issn.1005-5630.2020.04.011

# 双光子受激发射损耗复合显微成像技术研究

魏通达<sup>1</sup>, 张运海<sup>1</sup>, 昌 剑<sup>1</sup>, 季 林<sup>1</sup>,  
杨皓旻<sup>1</sup>, 缪 佳<sup>2</sup>

(1. 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所 医用光学重点实验室, 江苏 苏州 215163;  
2. 江苏省医疗器械检验所苏州分所, 江苏 苏州 215163)

**摘要:** 鉴于双光子受激发射损耗(STED)复合显微镜在神经疾病临床诊断及脑科学研究中的重要作用, 对双光子 STED 复合显微成像中多波长选通、多光束合束、关键技术指标等进行了研究, 完成了复合显微镜样机系统集成研制和复合成像。该复合显微镜可以对荧光标记的样本进行扫描成像, 具备红绿双色荧光扫描成像功能、双光子绿色荧光成像功能和 STED 超分辨绿色荧光成像功能。测试结果表明, 该复合显微镜成像深度达到 700  $\mu\text{m}$ , 分辨率优于 60 nm。

**关键词:** 荧光显微; 双光子显微; 超高分辨率; 受激发射损耗; 扫描显微  
**中图分类号:** O 436 **文献标志码:** A

## Two-photon stimulated emission depletion composite microscopy

WEI Tongda<sup>1</sup>, ZHANG Yunhai<sup>1</sup>, CHANG Jian<sup>1</sup>, JI Lin<sup>1</sup>,  
YANG Haomin<sup>1</sup>, MIAO Jia<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of medical optics, Suzhou Institute of biomedical engineering and  
technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China;  
2. Suzhou Branch, Jiangsu Institute of Medical Devices Testing, Suzhou 215163, China)

**Abstract:** Two-photon (2P) stimulated emission depletion (STED) composite microscope has the potential to be widely used in clinical diagnosis of neurological diseases and brain science research. In this paper, based on the research of multi wavelengths selection, multi beams combination, key technical indexes testing research, the integrated development of composite microscopy prototype system and composite imaging are completed. The composite microscope can image the fluorescent labeled samples, which has the functions of red-green two-color fluorescence imaging, 2P green fluorescence imaging and STED super-resolution green fluorescence imaging. In terms of index, the imaging depth is 700  $\mu\text{m}$ , and the resolution of STED imaging is better than 60 nm.

收稿日期: 2020-03-11

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC0110305); 江苏省自然科学基金(BK20170390); 江苏省博士后基金(2018K114C)

作者简介: 魏通达(1986—), 男, 副研究员, 研究方向为 STED 超分辨显微成像。E-mail: weitd@sibet.ac.cn

通信作者: 张运海(1976—), 男, 研究员, 研究方向为光学显微成像。E-mail: zhangyh@sibet.ac.cn

**Keywords:** fluorescence microscopy; two-photon microscopy; super resolution; stimulated emission depletion; scanning microscopy

## 引 言

神经系统疾病的精准诊断对临床诊断工具提出了越来越高的要求,迫切需要一种既可以高分辨成像又可以深层成像的辅助诊断工具。双光子技术是常用的深层成像技术,最深可达 1 mm,但分辨率只有 300~500 nm,对于神经细胞中类似树突棘等亚细胞结构成像仍然存在局限性<sup>[1]</sup>。受激发射损耗(STED)超分辨成像的分辨率可达 50 nm 以下,但只能用于 30 μm 以内浅表层成像<sup>[2]</sup>。因而将双光子成像和 STED 成像结合形成的双光子 STED 复合显微镜则既可以实现超高分辨成像,也可以实现深层成像。

德国的 Moneron 等<sup>[3]</sup>于 2009 年首次把双光子荧光显微技术与 STED 显微技术结合,搭建了第一个双光子 STED 显微系统,将 1060 nm 的飞秒激光器作为双光子激发光源,676 nm 的连续激光器作为 STED 光源,得到了荧光标记的转录调节因子三维分布。2009 年,加拿大的 Li 等<sup>[4]</sup>使用两束脉冲激光实现了双光子 STED 成像,他们使用两台锁相同步钛蓝宝石飞秒激光器分别用于双光子激发和受激发射损耗,获得了分辨率小于 50 nm 的中国仓鼠卵巢细胞图像。2011 年,法国的 Scheul 等<sup>[5]</sup>仅用一台脉冲激光器,通过一块偏振晶体将脉冲光分为双光子光源和 STED 光源。2013 年,法国的 Bethge 等<sup>[6]</sup>用双光子 STED 显微镜实现了对脑切片的双色成像。2016 年,意大利的 Hernandez 等<sup>[7]</sup>采用了门控探测技术,结合多图的反卷积算法,提高了系统成像质量。

国内在双光子 STED 成像方面的研究起步较晚,但进展较快。2014 年,天津大学研究组用一台钛蓝宝石激光器进行了双光子 STED 实验<sup>[8]</sup>。2016 年,苏州医工所采用钛宝石飞秒激光器和 OPO 泵浦,实现了双光子 STED 超分辨成像

双光子 STED 复合显微成像技术对深层生物组织成像具有较大的优势,在神经疾病临床诊断及脑科学研究方面具有广阔的应用前景,但该技

术大都还处于方法研究的实验阶段,系统功能和集成稳定性等都无法满足临床实际要求<sup>[9-13]</sup>。对此本文自主研制了双光子 STED 复合显微镜成像系统,并对其成像特性进行了研究。

## 1 复合显微镜成像系统

双光子 STED 复合显微镜系统如图 1 和 2 所示,主要包括五个部分:入射激光①、光束合束选通模块②、扫描模块③、荧光探测模块④和正置荧光显微镜⑤。

扫描模块③与正置荧光显微镜⑤构成一个整体,该正置显微镜内分三层,包括透射照明光路、荧光入射照明光路、目视观察光路,可以实现普通宽场荧光显微镜的基本功能。图 2 最上层 38 为三目头筒镜,用于目镜目视观察或宽场成像;中间层 35 为宽场荧光照明层,36 为聚光透镜,37 为荧光照明光纤头;下层为扫描模块;34 为显微物镜。

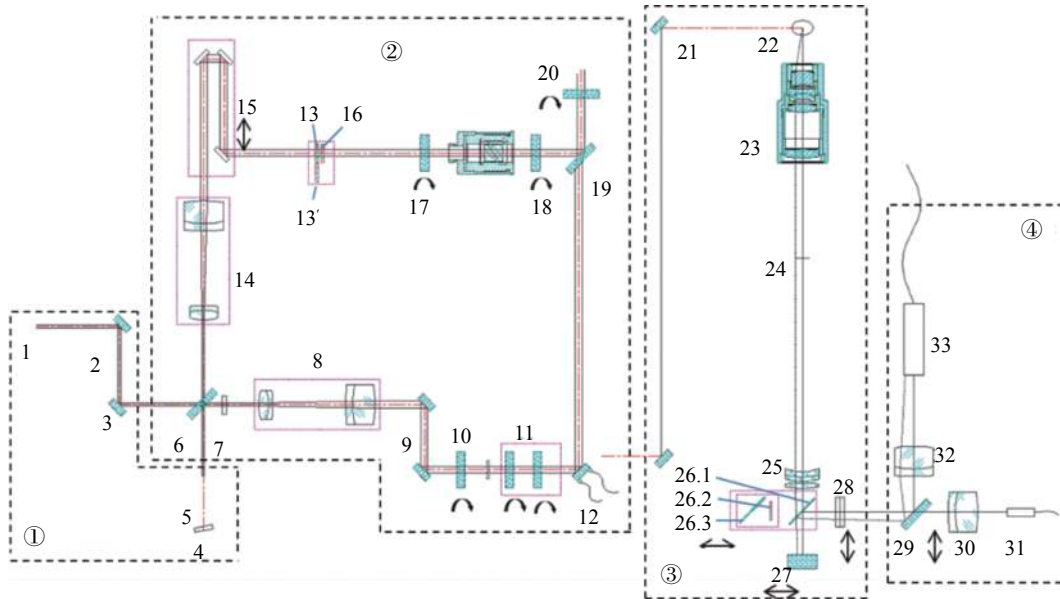
## 2 双光子 STED 复合显微成像技术研究

### 2.1 多波长选通

#### 1) 激发波长选通

入射激光部分主要包括宽波段连续谱激光器和双光子成像激光器。宽波段连续谱激光器为皮秒脉冲激光,脉宽为 100 ps 左右,光谱范围为 450~1700 nm,用于红绿双色荧光成像和 STED 超分辨成像,经光纤传导并准直输出。双光子成像激光器提供用于双光子成像的高能量飞秒脉冲激光,脉宽为 100 fs,波长为 780 nm,光束直径为 1.2 mm 并准直输出。

采用 Chroma 公司的 ZT532RDC-XT 二色镜对入射光进行分光,其中 592 nm 和 780 nm 波长激光的透射率为大于 95%,而 488 nm 波长的



1—双光子成像激光器; 2、3—反射镜; 4—宽波段连续谱激光器; 5—近红外滤光片; 6—分光二色镜; 7—激发光带通滤光片; 8—扩束镜; 9—光程延长; 10—旋转渐变滤光片; 11—圆偏振调节; 12—调节反射镜; 13—损耗光滤光片; 13'—红色荧光成像激发片; 14—扩束镜; 15—延迟机构; 16—涡旋相位板; 17—旋转渐变滤光片; 18—波片1/2; 19—合束二色镜; 20—波片1/4; 21—爬高机构; 22—扫描振镜; 23—扫描透镜; 24—主相面; 25—筒镜; 26.1—探测二色镜; 26.2—红色荧光成像滤光片; 26.3—红色荧光成像二色镜; 27—可切换向下反射镜; 28—滤色片组; 29—可切换反射镜; 30—针孔透镜; 31—光纤端面; 32—非解扫描透镜; 33—非解扫描探测光纤束

图1 双光子 STED 复合显微镜光学系统图

Fig. 1 Optical system for 2P STED composite microscope

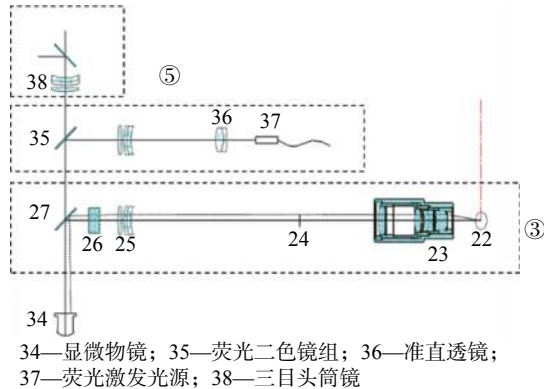


图2 显微镜镜体内光学布局侧视图

Fig. 2 Side view of optical layout in the microscope

激光被反射, 从而入射激光被该二色镜分为激发光和 STED 损耗光两路并被分别调制。对于不同的成像方式, 采用了不同的激光和滤光片组合。

■ 绿色荧光扫描成像: 采用宽波段连续谱激光器作为激发光源, 并用一个中心波长为 488 nm、波长带宽为 10 nm 的带通滤光片滤出所需要的激发光。

■ 红色荧光扫描成像: 采用宽波段连续谱激光器作为激发光源, 并用一个中心波长为 561 nm、

带宽为 24 nm 的带通滤光片滤出所需要的激发光。

■ 双光子成像: 采用双光子成像激光器作为激发光源, 该激光器发出的 780 nm 飞秒激光能够透过二色镜和滤光片进入到后续光路中, 为系统提供双光子成像需要的激发光。

■ STED 超分辨成像: 损耗光采用中心波长为 592 nm、带宽为 50 nm 的激光束, 并用滤光片提供所需要的损耗光束。

2) 红绿荧光探测滤波

本文复合显微镜可以实现红色和绿色双色荧光通道成像, 红绿荧光选择则根据需要在扫描模块中切换相应的二色镜及滤光片来实现。

■ 绿色荧光成像时: 使用绿色荧光成像二色镜 26.1, 其作用是透过 488 nm、592 nm、780 nm 的入射激光, 并使其入射到样品上, 而将 525 nm 荧光信号光反射给探测模块。与其配合使用的绿色荧光成像滤光片 28, 其通光范围中心波长为 525 nm, 带宽为 50 nm, 该绿色荧光滤光片可手动切入或切出光路。

■ 红色荧光成像时：使用红色荧光成像二色镜，其作用是透过 561 nm 的入射激光，使其入射到样品上，而将 620 nm 荧光信号光反射给探测模块。与其配合使用的红色荧光滤光片，其透光范围是 590~650 nm(红色荧光滤光片和红色荧光二色镜作为一个组件集成在一起)。

绿色荧光成像二色镜和红色荧光成像滤光片组件(二色镜、滤光片)设置在一个可手动切换位置的可移动滑轨上。当进行绿色荧光扫描成像时，将绿色荧光滤光片切入到光路中，当进行红色荧光扫描成像时，将该滤光片切出光路。

## 2.2 多光束合束

本系统涉及三路激光光束，两束来自超连续谱激光器分光，一束来自双光子飞秒激光器。双光子 STED 复合成像则需要将三路激光经物镜后聚焦于同一点上，因此，首先要对系统进行多光束合束的精密调节，采用电控可调俯仰的二色镜机构可方便监测和调整光束精密合束。

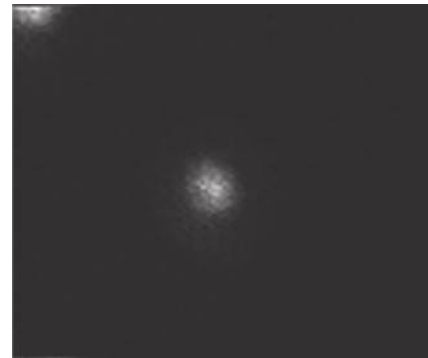
对于 STED 成像，其损耗光的最小光强处应与激发光的最大光强处精确重合。这样，可使外围荧光被较强损耗，而中央较强荧光被保留，以达到较好的超分辨效果。我们采用直径为 60 nm 的金纳米颗粒和精密三维纳米位移台，分别用 488 nm 和 592 nm 两束光对金粒子样本进行成像，利用位移台对其进行扫描，探测金粒子背向散射光并进行成像，以此来测定激光聚焦点扩散函数，评价系统性能，指导系统装调。金粒子成像结果如图 3 所示，激发光与损耗光在物镜焦点附近实现了 XY 平面的精确重叠，重合精度可达 20 nm，满足系统成像要求。

当 488 nm 和 592 nm 激光合束完成以后，关闭 488 nm 激光并打开 780 nm 双光子激光，采用同上的金粒子扫描成像方法，通过调节反射镜，将 780 nm 激光调节至与 592 nm 激光重合，最后达到三路激光均精密重合的目的。

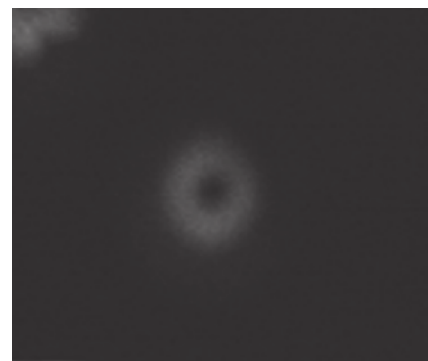
## 2.3 关键性能指标测定

### 1) 双光子成像深度

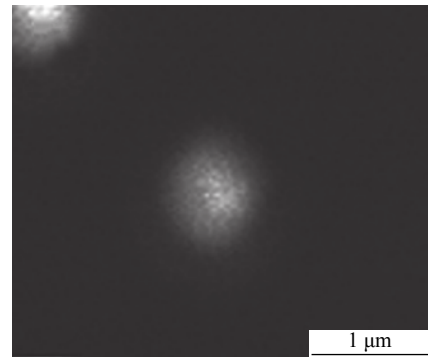
双光子成像深度是指双光子可以清晰成像的



(a) 激发光



(b) 损耗光



(c) 合束

图 3 点扩散函数 XY 平面扫描成像

Fig. 3 Point spread function scanning imaging in XY plane

最大深度。测试过程中使用琼脂糖包裹的荧光微球作为成像标本，用双光子方式对其进行成像，样本成像深度位置是通过在竖直方向移动样本来实现，并采用千分表对移动行程进行测量，继而测量出成像清晰的深度。对两个不同深度位置成像时，千分表对应的读数为 199.5  $\mu\text{m}$  和 908.5  $\mu\text{m}$ ，对应双光子图像均清晰可见，如图 4 所示，因此对应的成像深度为 709.0  $\mu\text{m}$ 。

### 2) STED 成像横向分辨率



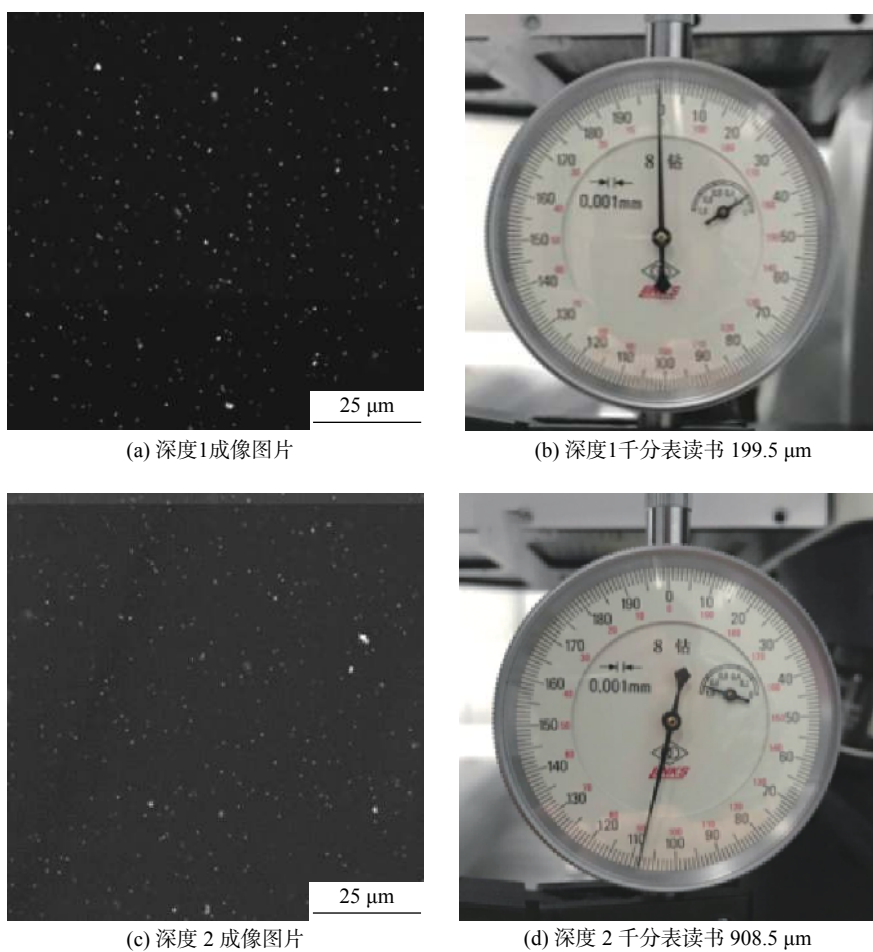


图 4 不同深度荧光微球双光子成像

Fig. 4 2P imaging of fluorescent microspheres with different depth

横向分辨率是指显微镜成像在水平面 (XY 面) 内的分辨能力。业内均采用测量荧光微球成像的半高全宽评价此类显微镜的横向分辨率。测试时使用荧光微球作为样本, 通过移动纳米位移台实现对样品扫描成像, 并设置扫描步距

为 20 nm。由于荧光微球存在尺寸不均一以及团聚的现象, 微球的成像点大小不一, 其中较小的点代表双光子 STED 显微镜的分辨率。测算强度曲线半高全宽在 X 方向上对应的像素数, 得到横向分辨率约为 58 nm, 如图 5 所示。

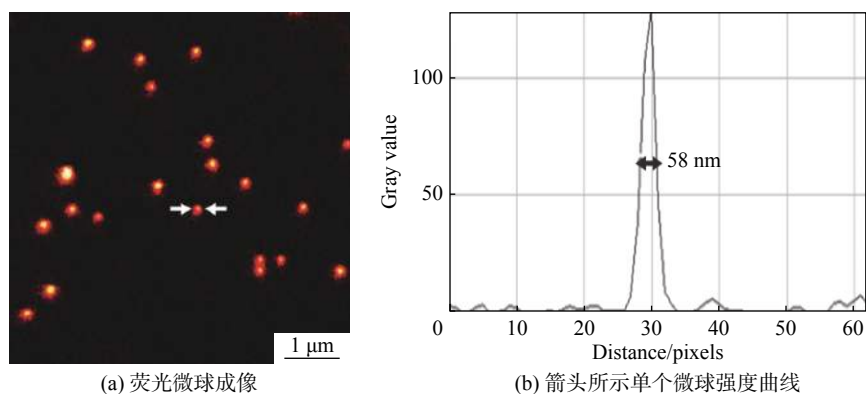


图 5 荧光微球成像测定分辨率

Fig. 5 Resolution measurement by fluorescence microsphere imaging



图 6 双光子-STED 复合显微镜样机

Fig. 6 2P STED composite microscope prototype

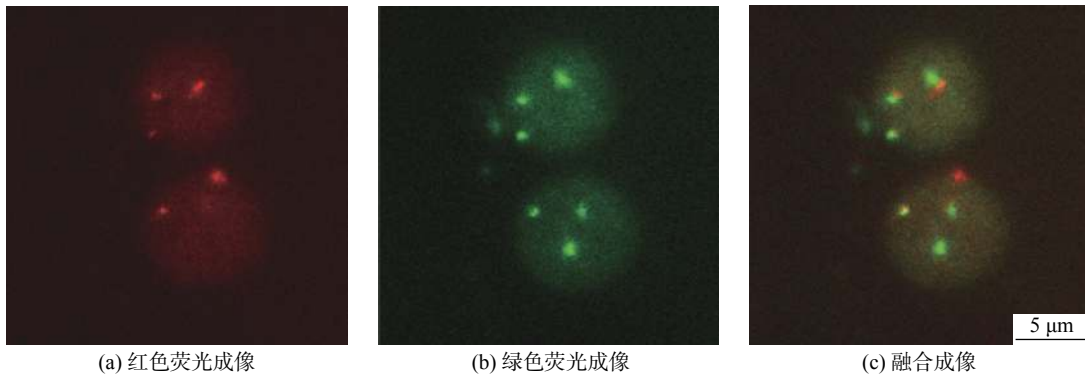
### 2.4 系统成像研究

在各个模块研制完成的基础上，对系统进行集成，组装集成后形成了一个完整的显微镜样机，如图 6 所示。样机可以实现包括共聚焦显微

成像、双光子显微成像、STED 超分辨成像等在内的多种模式成像，并可在成像模式间互相切换。

经实验可知，双光子 STED 复合显微镜样机成功实现了红绿双色荧光扫描成像、荧光原位杂交技术(FISH)成像、对鼠脑神经纤维的双光子成像以及对皮肤组织的无标记二次谐波成像。此外，通过三维平移台改变样品垂直方向上的高度，还实现了深层成像和分层成像，如图 7~10 所示。

对 48 nm 直径荧光微球分别进行荧光扫描成像和 STED 超分辨成像，从成像效果中可以明显看出，荧光扫描图像中很多微球团聚在一起无法分辨，而 STED 成像却可以清晰分辨，说明成像分辨率有明显的提升，如图 11 所示。



(a) 红色荧光成像

(b) 绿色荧光成像

(c) 融合成像

图 7 荧光原位杂交技术(FISH)成像

Fig. 7 Fluorescence in-situ hybridization (FISH) imaging

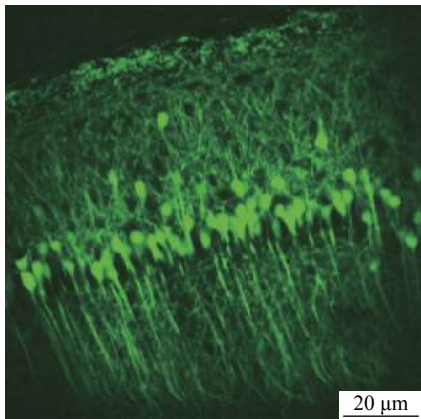


图 8 鼠脑双光子成像

Fig. 8 2P imaging of brain.

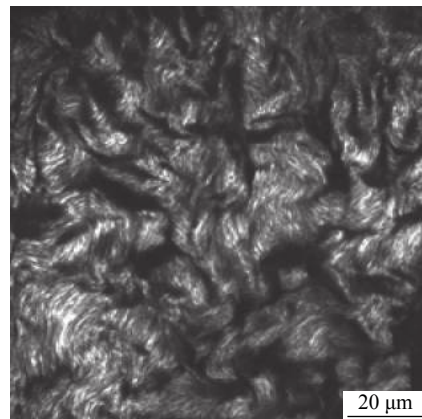


图 9 皮肤二次谐波成像

Fig. 9 Second harmonic imaging of skin.

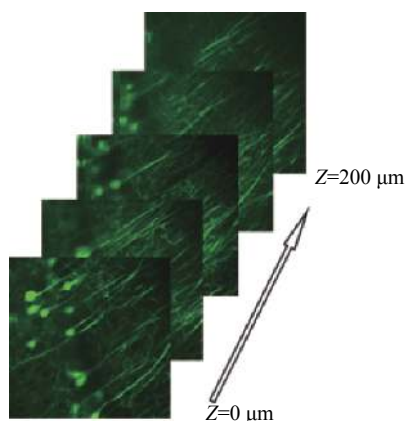
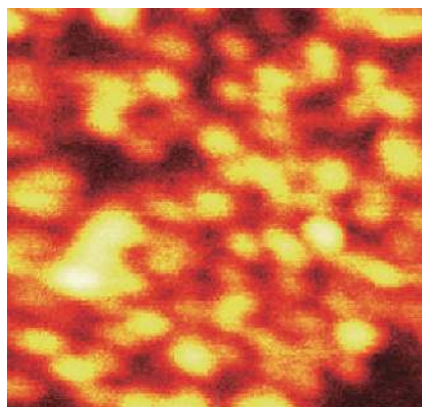
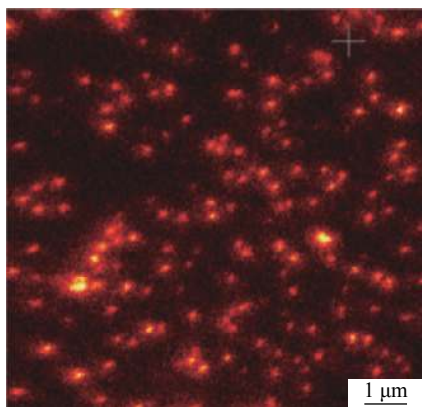


图 10 双光子深度成像

Fig. 10 2P depth imaging



(a) 荧光扫描成像



(b) STED 超分辨成像

图 11 荧光微球超分辨成像对比

Fig. 11 Super resolution imaging comparison of fluorescent microsphere

### 3 结 论

双光子 STED 复合显微镜在深层生物组织成

像方面具有较大的优势, 在神经疾病临床诊断及脑科学研究方面具有广阔的应用前景。本文对双光子 STED 复合显微成像中相关技术进行了研究, 采用多滤光片组合与切换的方式实现了 488 nm、561 nm、592 nm 和 780 nm 多波长激光的选通及红绿双通道荧光探测。采用金粒子扫描成像的方法实现了双光子、激发光、STED 损耗光多光束精密合束, 重合精度约为 20 nm, 探讨了系统成像深度、STED 成像分辨率的定量检测方法。该复合显微镜可以对荧光标记的样本进行扫描成像, 具备红绿双色荧光扫描成像功能、双光子绿色荧光成像功能和 STED 超分辨绿色荧光成像功能。一般采用双色荧光扫描成像即可完成染色体等的荧光成分分析或进行 FISH 成像, 对于较厚的样本可以采用双光子深层成像, 对于要求较高分辨率的情况可以采用 STED 超分辨成像。经测试可得, 系统的成像深度达到 700  $\mu\text{m}$ , STED 成像分辨率优于 60 nm。在完成双光子 STED 复合显微镜系统研制的基础上, 接下来我们将对该系统开展在临床上的应用研究。

#### 参考文献:

- [1] THEER P, HASAN M T, DENK W. Two-photon imaging to a depth of 1 000  $\mu\text{m}$  in living brains by use of a Ti:  $\text{Al}_2\text{O}_3$  regenerative amplifier[J]. *Optics Letters*, 2003, 28(12): 1022 – 1024.
- [2] 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.
- [3] MONERON G, HELL S W. Two-photon excitation STED microscopy[J]. *Optics Express*, 2009, 17(17): 14567 – 14573.
- [4] LI Q F, WU S S H, CHOU K C. Subdiffraction-limit two-photon fluorescence microscopy for GFP-tagged cell imaging[J]. *Biophysical Journal*, 2009, 97(12): 3224 – 3228.
- [5] SCHEUL T, D'AMICO C, WANG I, et al. Two-photon excitation and stimulated emission depletion by a single wavelength[J]. *Optics Express*, 2011, 19(19): 18036 – 18048.
- [6] BETHGE P, CHÉREAU R, AVIGNONE E, et al. Two-photon excitation STED microscopy in two colors in

- acute brain slices[J]. *Biophysical Journal*, 2013, 104(4): 778 – 785.
- [7] HERNÁNDEZ I C, CASTELLO M, LANZANÒ L, et al. Two-photon excitation STED microscopy with time-gated detection[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19419.
- [8] 李奇峰, 沙乾坤, 王洋, 等. 基于非线性光学的 2PE-STED 显微技术的发展与应用 [J]. *纳米技术与精密工程*, 2015, 13(2): 81 – 89.
- [9] TER VEER M J T, PFEIFFER T, NÄGERL U V. Two-photon STED microscopy for Nanoscale Imaging of neural morphology in vivo[M]//ERFLE H. Super-resolution microscopy. New York, NY: Humana Press, 2017.
- [10] BELFIELD K D, BONDAR M V, MORALES A R, et al. Two-photon STED spectral determination for a new V-shaped organic fluorescent probe with efficient two-photon absorption[J]. *Chemphyschem*, 2011, 12(15): 2755 – 2762.
- [11] BETHGE P, NÄGERL U V. Two-photon excitation STED microscopy for imaging synapses and glia in acute brain slices[M]//NÄGERL U V, TRILLER A. Nanoscale imaging of synapses. New York: Humana Press, 2014.
- [12] TAKASAKI K T. Development and application of two-photon excitation stimulated emission depletion microscopy for superresolution fluorescence imaging in thick tissue[D]. Cambridge Harvard University, 2013.
- [13] PELLETT P A, SUN X L, GOULD T J, et al. Two-color STED microscopy in living cells[J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, 2(8): 2364 – 2371.

(编辑: 刘铁英)

## (上接第 60 页)

- [10] HONG J T, PARK D J, MOON J Y, et al. Terahertz wave applications of single-walled carbon nanotube films with high shielding effectiveness[J]. *Applied Physics Express*, 2011, 5(1): 015102.
- [11] NIKOLAENKO A E, PAPASIMAKIS N, CHIPOULINE A, et al. THz bandwidth optical switching with carbon nanotube metamaterial[J]. *Optics Express*, 2012, 20(6): 6068 – 6079.
- [12] KYOUNG J, JANG E Y, LIMA M D, et al. A reel-wound carbon nanotube polarizer for terahertz frequencies[J]. *Nano Letters*, 2011, 11(10): 4227 – 4231.
- [13] XIN X, ALTAN H, SAINT A, et al. Terahertz absorption spectrum of *para* and *ortho* water vapors at different humidities at room temperature[J]. *Journal of Applied Physics*, 2006, 100(9): 094905.
- [14] XIAO M F, LIU J, ZHANG W, et al. Self-supporting polymer pipes for low loss single-mode THz transmission[J]. *Optics Express*, 2013, 21(17): 19808 – 19815.
- [15] UNG B, DUPUIS A, STOEFLER K, et al. High-refractive-index composite materials for terahertz waveguides: trade-off between index contrast and absorption loss[J]. *Journal of the Optical Society of America B*, 2011, 28(4): 917 – 921.
- [16] MAZHOROVA A, MARKOV A, NG A, et al. Label-free bacteria detection using evanescent mode of a suspended core terahertz fiber[J]. *Optics Express*, 2012, 20(5): 5344 – 5355.
- [17] FAN F, ZHANG X Z, Li S S, et al. Terahertz transmission and sensing properties of microstructured PMMA tube waveguide[J]. *Optics Express*, 2015, 23(21): 27204 – 27212.
- [18] LIU Y, FENG J J, LI Z Y, et al. Double-groove terahertz chirped grating waveguide tube for gas pressure detection[J]. *Laser Physics Letters*, 2019, 16(5): 056202.
- [19] BAO H L, NIELSEN K, BANG O, et al. Dielectric tube waveguides with absorptive cladding for broadband, low-dispersion and low loss THz guiding[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 7620.
- [20] ANDO Y, ZHAO X L, HIRAHARA K, et al. Mass production of single-wall carbon nanotubes by the arc plasma jet method[J]. *Chemical Physics Letters*, 2000, 323(5/6): 580 – 585.
- [21] CHEN Y N, ZHAO H B, SHENG L M, et al. Mass-production of highly-crystalline few-layer graphene sheets by arc discharge in various H<sub>2</sub>-inert gas mixtures[J]. *Chemical Physics Letters*, 2012, 538: 72 – 76.
- [22] PAWLYTA M, ROUZAUD J N, DUBER S. Raman microspectroscopy characterization of carbon blacks: Spectral analysis and structural information[J]. *Carbon*, 2015, 84: 479 – 490.

(编辑: 刘铁英)