

超分辨荧光显微技术

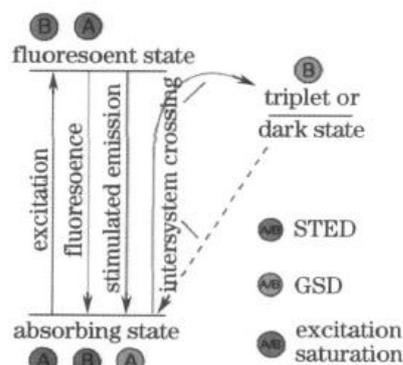
进入 21 世纪后，光电技术的发展可谓是突飞猛进，应用范围也是十分宽广，我想就从最近科研参与时所接触的荧光超分辨技术阐述。

首先，该技术从原理上打破了原有的光学远场衍射极限对光学系统极限分辨率的限制，在生物、化学、医学等多个学科拥有广泛的应用前景。

衍射极限于 18 世纪由德国科学家 Abbe 首次提出。进一步研究表明，对于一般透镜，其聚焦光斑的大小用半峰全宽 (FWHM) 可以近似表述为：径向约为 $\lambda / 2$ 、轴向约为 λ ，其中 λ 为工作波长，另外还与透镜自身的数值孔径 (NA) 高度相关。透镜的极限分辨率往往可以由其聚焦光斑的点扩散函数 (PSF) 决定，较小的聚焦光斑大小也意味着较强的极限分辨率。因此，为了使光学显微镜获取亚波长分辨率，早期的尝试往往集中在对于衍射极限公式的讨论上，即通过减小工作波长、增大数值孔径压缩聚焦光斑的大小。对于前者的研究直接导致了各种电子束显微镜的诞生，而后者则将光学显微镜推向了新的发展阶段。共焦显微镜是最早提出的通过小孔直接限制聚焦光斑的大小来达到消除杂散光、提高系统分辨率的方法。当然共焦显微镜存在的问题依然很多，而荧光的激发和淬灭过程为科学家提供了灵感，荧光显微镜技术也由此诞生。

然后讲一下该技术的发展。一开始比较原始的远场荧光显微技术是双光子荧光显微技术，但是存在很大缺陷：由于双光子荧光过程中的入射光往往使用波长较长的红外光，工作波长的延长在一定程度上抵消了通过双光子荧光过程获得的超分辨率；在双光子激发过程中使用的入射光能量较大，容易在焦平面附近造成荧光染料的光漂白；由于荧光染料自身造成的光毒作用等。然后是随机开关与读取显微技术，该技术包括光敏定位显微镜 (PALM)、随机光学重构显微镜 (STORM)、基态损耗-单分子返回显微镜 (GSDIM) 以及它们的众多改型在内的一系列荧光超分辨显微技术的总称。但是它存在一个缺陷：由于在一个观察过程中，需要反复拍摄观察区域，因此整个观察过程速度较慢，不适用于观察活体样品，大大降低了实用性。最后就是最为实用的目标开关与读取显微技术，也被称为可逆饱和光转移过程 (RESOLFT)，主要包括受激发射损耗显微镜 (STED)、基态损耗显微镜 (GSD)、饱和图案激发显微镜 (SPEM) 和饱和结构光照明显微镜 (SSIM) 等几种。现在研究比较多的是 STED，下面主要介绍 STED。

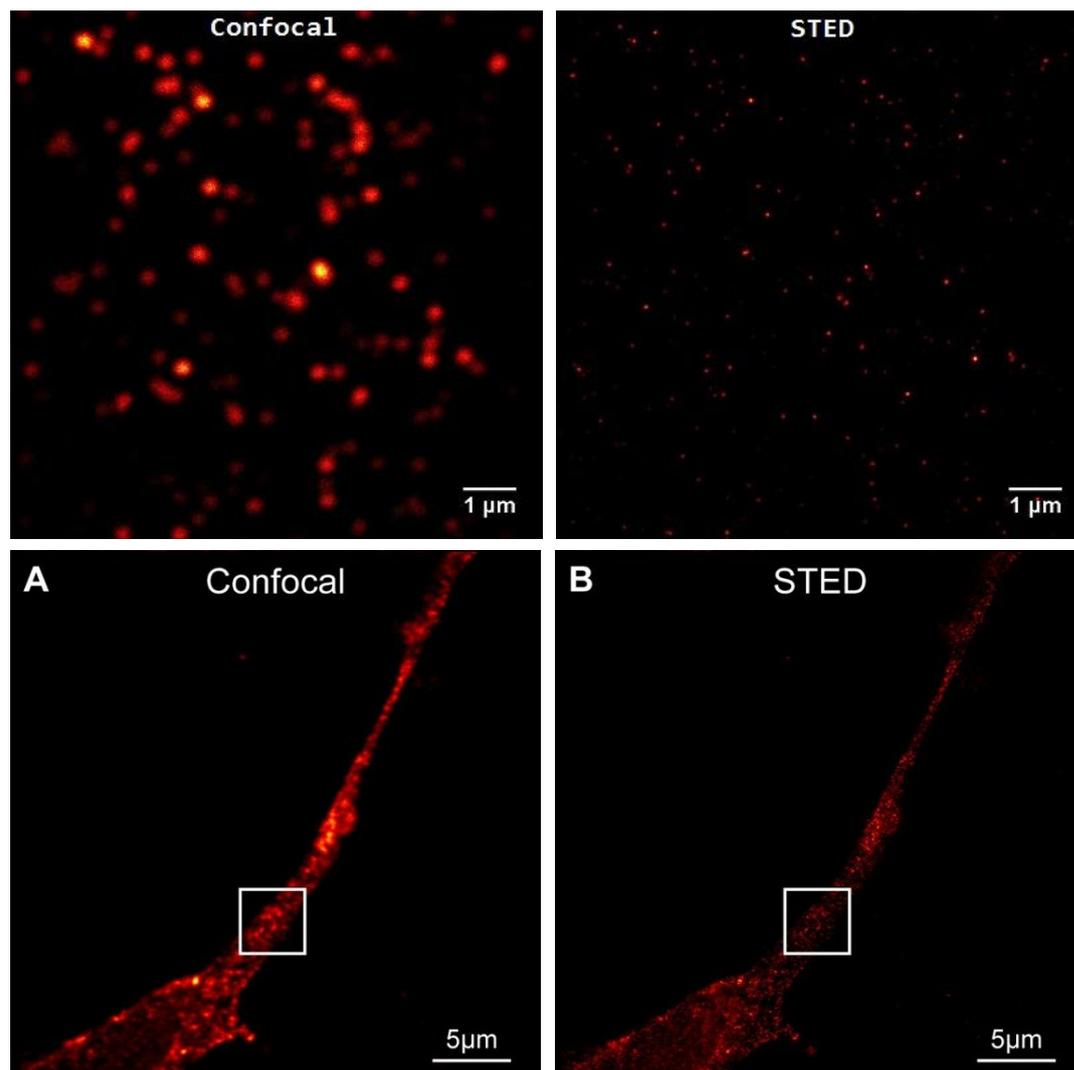
STED 显微镜是最早提出并被实验证实的基于 RESOLFT 概念的远场超分辨荧光显微技术。它于 1994 年被 Hell 首次提出并在 20 世纪末成功实现了 100nm 左右的径向分辨率。经过多年的发展，STED 目前公开报道的最大分辨率已小于 10nm。STED 显微镜的基本原理如左图所示：它将荧光染料分子的基态作为状态 B，而将激发态作为状态 A，使用两束光作为激发光和 STED 光。激发光用于驱动荧光染料分子完成 B → A 的转移过程，该过程的速率很快，将在数飞秒内完成。相对而言，荧光的自发辐射速率则慢得多，往往需要数十纳秒的时间。因此，可以在荧光自发辐射之前，通过使用 STED 光诱发染料分子完成 A → B 的转移过程而不发射荧光。将激发光聚焦成实心聚焦光斑，STED 聚焦成多纳圈状的空心聚焦光斑，两者重合即构成了 RESOLFT 系统，达到了减小有效 PSF 的目的。



关于 STED 国内外的研究发展普遍较快。国外的话首先是德国 Hell 研究小组：STED 理论的提出者，代表世界最高水平，目前实现横向分辨率 2.4nm (2012)，轴向分辨率 2nm (2012)，视频扫描速度 (28 帧/秒) (2008)；意大利 Diaspro 研究小组：提出了单波长双光子 STED 系统，并在实验上实现了 85nm 的横向分辨率 (2011)；Yale 大学 Bewersdorf 研究组，UCLA 的 Stefani 研究组以及欧美的另外几个研究组均具有独立搭建 STED 系统实现超分辨显微的

能力。国内的话，北大席鹏研究组搭建了一套纳米平台扫描的 STED 系统，实现了 71nm 的横向分辨率(2012)；我们浙大搭建了一套纳米平台扫描的 STED 系统，实现超分辨荧光寿命成像，横向分辨率 50nm，时间分辨率 20ps (2012)。而为了提高扫描速度、光斑质量，各个研究组也是不断对 STED 做改进，目前我们浙大关于 STED 的研究水平应该还是比较领先的，我们已经成功加入了扫描振镜来扫描成像，大大提高了扫描速度，并利用螺旋相位板形成了较为完好的 STED 圈形光斑提高了成像质量。

下面几张图片为目前 UCLA 的 STED 研究成果图，反映了共焦显微镜和 STED 显微镜获得的成像对比，很明显地我们可以看到 STED 的图像清晰了很多。



【参考文献】

1. Stefan W. Hell , Jan Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission:stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy.
2. Silvia Galiani,Benjamin Harke,Giuseppe Vicidomini. Strategies to maximize the performance of a STED microscope.
3. Giuseppe Vicidomini,Gael Moneron,Christian Eggeling. STED with wavelengths closer to the emission maximum.
4. 郝翔, 匡翠方, 李旻晖, 刘旭. 可逆饱和光转移过程的荧光超分辨显微术.
5. <http://www.anes.ucla.edu/sted/sted.html>