1. **光学显微成像的固有缺陷**

**1.1光学显微成像的发展历史**

生物医学成像技术是基础生物学研究和临床医学最重要的工具之一。回顾历史，已有多位科学家凭借在成像技术方面的突破获得诺贝尔奖。其中，罗腾因发现 X 射线获得 1901 年诺贝尔物理学奖; 泽尔尼克因发明相衬显微镜获得 1953 年诺贝尔物理学奖;路斯卡的电子显微镜以及比宁和罗勒的扫描隧道显微镜获得 1986 年诺贝尔物理学奖; 劳特布尔和 曼斯菲尔德因发明核磁共振成像技术共同获得 2003 年诺贝尔生理医学奖。在刚刚过去的 2014 年，诺贝尔奖评审委员会再一次肯定成像技术的重要性，将诺贝尔化学奖授予发展超分辨率荧光显微成像技术的 3 位科学家。他们分别是来自美国霍华德·休斯医学研究所的艾力克·贝齐格、德国马普生物物理化学所的 斯特凡·海尔和美国斯坦福大学的威廉姆·莫尔纳( 图 1) 。



图 1 获得 2014 年诺贝尔化学奖的 3 位科学家

光学显微成像的起源大约可以追溯到 16 世纪末荷兰眼镜商杨森和他的儿子发明的原始光学显微镜。他们把两个凸透镜安装在一个筒中，发现这种组合可以放大物体。在之后的几十年中，英国人虎克在成像原理和实践中不断改进，实现了现代光学显微镜的雏形。在接下来的 300 多年里，各种基于光学显微的生物成像技术不断涌现，生物学家也因此取得了一个接一个重大发现。

**1.1光学显微成像的衍射极限理论**

虽然光学显微镜如此有用，但生物学家一直不满意其分辨率。特别是细胞生物学家在观察细胞内部结构时图像模糊，无法看清楚细节。在实际操作中，有多种因素会影响光学成像的清晰度，包括样品自身的背景光以及对光的吸收、散射和折射等光与物质的相互作用过程，也包括物镜的色差、球差、透光度和成像元件的灵敏度等硬件因素。早在 1835 年，英国科学家爱里就提出了“爱里斑”的概念( 图 2) : 由于光的衍射，即使一个无限小的发光点在通过透镜成像时都会形成一个弥散的图案，即爱里斑，而其在像平面处的光强分布函数称为这个光学系统的点扩散函数。

1873 年，德国著名科学家 Ernst Abbe 揭示了由于光学成像有限孔径下光的衍射效应产生的 Airy disk 与成像分辨率之间的关系，即著名的阿贝光学衍射极限理论( Abbe's diffraction limit)［1］。

 (1)

式中 d 是分辨率，λ 是光的波长，n 是介质的折射率，θ 是聚焦光锥的半角。nsinθ 又称为数值孔径。基于这个公式可以看出，对于可见光波段( 波长 400 ～ 700nm) 以水为介质的成像，由于水的折射率为 1.33，而 sinθ 最大值是 1，则其分辨率极限约为 150nm。当然，θ 角无法达到 90度，而实际上水镜的数值孔径一般在 1 左右。所以通常可以定义成像分辨率约为光的波长的一半，即当两个点光源相距 200nm 以内时，它们的爱里斑会有很大的重叠而无法区分; 同时这个公式也限定了光束聚焦形成光斑的最小尺寸约为光波长的一半。阿贝光学衍射极限理论给了我们基本的物理极限，意义重大，因此阿贝的这个经典公式也成为了他墓碑上的全部内容(图3) 。

**二.“突破”光学显微成像的衍射极限**

实际上，衍射极限是一种远场效应，在近场条件下无效。因此早期的一些尝试突破光学衍射极限的努力都是基于近场光学成像的。像这次诺贝尔奖得主 Eric Betzig 就早在 1993年发展了扫描近场光学显微镜，首次实现了室温下的单分子超分辨率成像［2］。然而，近场光学显微镜无法用于细胞内部的成像，因此在生物领域的应用一直没有发展起来。后期的各种“突破”光学衍射极限的努力都是在远场条件下发展起来的。

超高分辨率显微成像一般指在远场条件下基于荧光的、“突破”衍射极限的光学显微成像技术。荧光是物质吸收光照后发出的一类光。物质分子中的电子分布在不同的能级上。当一束光打到分子，分子具有一定的概率吸收光子，同时其处在基态的电子会跃迁到更高能量的激发态能级。处在激发态的电子有多种途径回到基态，其中一条途径就是发出一个光子( 荧光) ，释放能量回到基态。发射光子的能量小于被吸收的光子，因此荧光的波长比激发光的波长要长。荧光显微镜利用了荧光发射光波长比吸收光波长较长这一重要原理，通过光路设计，分开激发光和发射光，大幅降低了成像的背景。结合灵敏的检测器件，在优化条件下，荧光显微镜还可以检测单个荧光分子发出的极其微弱的荧光，成为单分子成像的最佳选择，其发展也奠定了这次诺贝尔化学奖的半壁江山。除了低背景和高灵敏度，荧光显微镜还通过对特定分子进行标记，具备很高的特异性。这一系列特点使得荧光显微镜成为生物学研究中最常用的一种光学显微镜。

超高分辨率荧光显微技术通过应用一系列物理原理、化学机制和算法“突破”了光学衍射极限，把光学显微镜的分辨率提高了几十倍，使我们能以前所未有的视角观察生物微观世界。目前的超高分辨率荧光显微技术大体可分为两类，一类通过调制照明光斑缩小系统的点扩散函数来实现超分辨成像，主要贡献者包括这次诺贝尔奖得主 Stefan Hell 以及 Mats Gustafsson; 另一类则是基于单分子定位的超分辨技术，主要贡献者包括这次诺贝尔奖得主 Eric Betzig、W． E． Moerner 以及哈佛大学庄小威教授和 Samuel Hess。

**2.1基于点扩散函数调制的超分辨技术**

此次获奖的德国科学家海尔现为德国哥廷根大学教授和德国马克斯·普朗克生物物理化学研究所所长。他在 1994 年还在做博士后的时候就最先提出了受激发射损耗的方法(简称 STED) 来打破光学衍射极限［3］。其原理非常朴素但却十分巧妙。前面提到由于衍射极限的存在，光束聚焦的光斑尺寸不能无穷小，而是限定为光的波长的一半，这对应了荧光显微镜中聚焦激光光斑的点扩散函数。理论上，如果能缩小激光光斑就可以实现超分辨成像。Hell 的基本想法是在激发光斑点扩散函数周围套上一个环形点扩散函数，以“擦除”激发光斑的外围，从而使得激发光斑“变小”(图4) 。在这里，海尔利用了产生激光的受激辐射原理，用位相板产生环状的激光光斑并套在激发光斑外。这个环状光的波长匹配激发态到基态的能量差，同时功率够高，使得其区域内处在激发态的荧光分子在环状光照射下会发生整齐划一的饱和受激辐射。因为受激辐射波长与自发辐射( 荧光) 不同，所以环状光覆盖的受激辐射可以被挡住，而环内的自发辐射则是我们需要的荧光。由于环状光的孔径理论上可以通过增加激光强度无限缩小，这样就可以获得一个小于衍射极限的荧光激发点。这样，海尔的方法就更改了阿贝的衍射极限公式:

 (2)

式中 I是饱和受激辐射的激光强度，I 是环状光的强度。可见，随着 I 的增加，STED 技术的分辨率可以无穷小。

这个巧妙的思想在技术实现上当时是非常困难的。海尔经过多年坚韧的努力，终于在 2000 年实现了他在 1994 年提出的这个想法。他用一束激光激发荧光分子发光，再用另一束环状激光消除激发光周边的荧光，通过二维点扫描实现了超高分辨率成像，将光学显微镜分辨率提高了近 10 倍。然而由于荧光分子一般饱和光强较高，可达 100MW/cm2，因此环状光需要极高的功率，大大加重了样品的光损伤和光漂白，制约了 STED 技术在生物中的应用。从 2000 年开始，Hell 的团队不断改进 STED 技术，包括通过相似原理发明了基态损耗(GSD)等一系列超高分辨率显微技术，使其更加适用于生物研究。后期，海尔团队将 STED 的思想进一步延展，将这种利用饱和激发压缩激发光点扩散函数并驱动荧光分子荧光态(亮态) 和非荧光态(暗态) 之间的转化的方法统称为可逆饱和线性荧光跃迁(简称RESOLFT)，其分辨率统一由式(2)描述。值得一提的是，海尔早期发明的 STED 和 GSD 等技术是基于荧光分子电子能级的跃迁，这些状态的跃迁及弛豫速率都非常快，因此需要很高的饱和光强来实现饱和受激辐射。为了进一步提高RESOLFT 技术的生物兼容性，海尔团队利用荧光分子的可逆构像变化等化学过程对应的可逆光开关来实现超高分辨率成像。基于分子化学过程的亮态和暗态间的转化所需的饱和光强很小，大大降低了光损伤和光漂白。这类方法的不足之处在于其每个点的成像时间较长，所以通过点扫描成像将耗费太多时间。为此，海尔团队在 2013 年发明了一种平行 RESOLFT 方法，将十万个 STED 光斑排成一个矩阵来成像，用 rs EGFP 荧光蛋白在活细胞内实现了约 1s 时间分辨率的超高分辨率成像。海尔20 年来的一系列工作为超分辨率荧光显微成像技术的发展做出了巨大贡献。

在这个方面值得一书的还有美国科学家古斯塔夫松，他是光学成像领域公认的天才。他在 2000 年发明了基于结构照明原理的超高分辨率技术。这个技术基于两个高空间频率的图案重叠可以形成低频率莫尔条纹的原理，通过解析低频莫尔条纹实现超高分辨率成像。这个技术使用起来非常简单，对样品制备也没有任何特殊要求，因此非常适于细胞研究，但可惜分辨率只能提高一倍。在此基础上，古斯塔夫松在 2005 年发明了饱和 SIM，与 RESOLFT 原理相似，利用荧光饱和实现更高的分辨率，其本质也是点扩散函数的缩小。可惜古斯塔夫松于 2011 年 51 岁时因癌症英年早逝，无缘分享这次的诺贝尔奖。

**2.2基于单分子定位的超分辨技术**

一大类超分辨荧光显微成像技术的发明是基于单个荧光分子的定位。虽然 Abbe 衍射极限指出无法区分相距约 200nm 的两个荧光分子，但是通过提取单个荧光分子的爱里斑信息却可以实现对这个荧光分子的精确定位。对单个荧光分子的成像尝试最早可以追溯到 1976 年，T． Hirschfeld 使用基于全内反射式的近场照明方式实现了对单个蛋白抗体分子的荧光观察。但他当时在抗体上标记了数十个荧光基团，因此并非对单个荧光分子的成像。

这次获奖的美国斯坦福大学教授 W． E． Moerner 是单分子荧光技术的先驱人物。他于 1989 年在超低温下首次实现了单个分子的吸收光谱测量这一开创性研究直接激发了后续的一系列单分子荧光方面的突破性工作。1990 年，M． Orrit 在低温下实现了对单个荧光分子的荧光测量同年，Ｒ． A． Keller 等人则利用共聚焦显微镜和脉冲激发等方法在室温下实现了对溶液中单个荧光分子的检测。此次诺贝尔奖得主 Eric Betzig 则在 1993 年利用近场显微镜首次实现了常温下单个荧光分子在表面的成像。1994 年，Ｒ．A． Kelle S．Xie以及 S．Nie，D．Chiu和 Ｒ．Zare 等人在单分子检测方面接连取得突破; 而在 1995 年，日本 Yanagida 团队使用全内反射显微镜观察到了荧光标记的 ATP 分子和单个肌球马达蛋白分子的相互作用，开创了单分子技术在生物系统中的应用利用单分子定位研究生物学问题最有影响力的一个工作是 2003 年 Yildiz 等人使用全内反射单分子荧光显微镜追踪 Cy3 荧光标记的单个肌球马达蛋白分子沿着肌动蛋白微丝的行走。在这个工作中，单个肌球蛋白分子的位置被精确定位，精度达几纳米，因此可以观察到肌球马达蛋白分子约 37 纳米的步长，并推断出其行走方式是像人一样两个腿交替迈进这一高精度单分子荧光定位方法被称为 fluorescence imaging with 1-nm accuracy，简称 FIONA。其原理是基于 2002 年 Webb等人的工作他们指出，单个荧光分子的爱里斑虽然有几百纳米宽，但其光强度的分布却像山峰一样，峰尖对应荧光分子的位置。这个类似于山峰的光子分布可以用一个二维高斯函数来拟合，其中心即为荧光分子的物理位置。

展望

展望未来，超高分辨率显微技术的发展趋势应该是更高、更快、更深( 即更高的空间分辨率、更快的时间分辨率以及更深的成像深度) ，这与生物医学成像越来越多地应用于活体研究的趋势需求是一致的。与这些趋势相对应并值得关注的几个方面可以大致归纳如下。

首先是通过进一步的物理成像、化学修饰原理创新，发展新型的超分辨技术和标记技术。目前的各种超分辨技术时间分辨率都不够，成像深度更是不能满足在体成像的需求。其中，提高超分辨技术时间分辨率，需要结合新型成像器件，例如更快的扫描元件，更灵敏的检测元件等; 实现更深的成像深度和解决在体成像需求，还需考虑到组织对光子的散射作用，结合自适应光学和组织透明化( CLAＲITY) 技术是解决这一问题的关键之一。

第二是进一步发展和优化荧光探针，比如提高探针的亮度、光稳定性、转换速率以及发射波长等。为解决现有探针的信噪比差、光漂白严重等缺陷，开发新型高亮度、高稳定的荧光探针成为推动超分辨技术的保证。例如上转换纳米材料，荧光钻石，石墨烯量子点等无机染料。此外，结合现有探针和超分辨技术，发展新型超分辨标记技术，如联合标记、特异性活细胞标记染料、量子点等。

第三是注重模态融合。生命体组成跨越了很大的空间尺度，而不同尺度下的生命功能、结构和过程都紧密联系和互相影响。没有哪种技术能兼顾时间分辨率、空间分辨率、空间尺度和功能成像，因此多模态融合是一个必然趋势。对于超分辨技术而言，至少有 3 种值得融合的技术，并且都已经出现了一些研究成果。一种是与双光子荧光显微镜结合，双光子荧光显微镜基于非线性效应，具有成像深度深、荧光背景低的优点; 一种是与电子显微镜结合，即光电融合显微技术 CLEM( correlative light ＆ electron mi-croscope) 。CLEM 结合了电镜的高分辨率和光学显微镜的分子特异性，是研究结构和功能关系的利器，因此成为目前国际上显微成像技术的研究热点和重要发展方向。中科院生物物理所徐涛研究员在基金委重大仪器专项的支持下，从 2011 年已展开光电融合显微技术的研发并且取得了世界领先的成果。再一种是与片层光结合。片层光显微成像技术是一个古老却又重新焕发生机的成像技术，其片层光照明方式一方面大大降低背景荧光信号，一方面比常规双光子、共聚焦显微镜有更高的时间分辨率，具有光毒性小、信噪比高、成像速度快等一系列优点，是研究小模式生物的利器，也因此被评为 Nature Methods的 2014 年年度方法。在基金委重大仪器专项支持下，北京大学陈良怡和孙育杰研究组合作，于近期发明了目前世界上性能最卓越的双光子层状光显微镜并已展开相关应用，而与超分辨技术的结合将会成为在体超分辨成像的重要工具。

第四则是注重发展数据处理和图像分析算法，迎接大数据时代的到来。随着信息技术的发展，大数据时代翩然而至，生物医学成像也不例外。一方面，对活体动态观察的需求导致了大数据影像资料; 另一方面，对于样品三维高分辨率成像的需求也导致大数据。面对海量数据，我们需要发展更加高效的图像处理软件和算法，这将是未来超高分辨率动态成像的一个重要挑战。

**三.超高分辨率荧光显微展望及应用前景：**

超高分辨率荧光显微成像作为一类很新的技术，突破了光学成像中的衍射极限，把传统成像分辨率提高了 10 ～ 20 倍，达到了几十纳米，把我们从显“微”镜时代带入到显“纳”镜时代。对生物学家而言，好比一个近视眼的人突然戴上了合适的眼镜，从而可以用前所未有的视角观察奇妙的生物微观世界，揭示前所未见的生物微观结构和现象。这些超分辨技术在过去的七八年间不断进步，同时也已经在生物学研究中广泛应用，包括细胞膜蛋白分布、细胞骨架、线粒体、染色质、神经元突触以及原核生物的研究等。超高分辨率技术一出现就引起广泛关注，先是在 2006 年被世界著名期刊 Science 评为年度 10 大技术突破，接着被生物医学方法学最好的期刊 Nature Methods 评为 2008 年年度方法。在 2014 年 10 月的

Nature Methods10 周年特刊评出的 10 年 10 大技术中，超高分辨率荧光显微成像和单分子技术都出现在榜中，并几乎在同时获得 2014 年诺贝尔化学奖。

**应用前景**

到目前为止，人们还很难得知，SR荧光显微镜会对生物学界的哪一个领域带来重大变革，但已经有几个领域出现了明显的改变。这些研究领域是动态及静态的细胞组织结构研究领域、非均质分子组织研究领域、蛋白动态组装研究领域等。这几个领域都有一个共同的特点，那就是它们研究的重点都是分子间如何相互作用、组装形成复合物。因此，能在纳米水平观察这些分子对它们来说具有重大的意义。

1.通过观察蛋白质之间的组合关系来了解它们的作用，并能为后续的细胞功能试验打下基础

2.SR成像有助于人们更好地了解分子间的差异

3.SR成像技术还能用于在单分子水平研究蛋白动态组装过程

图像自动识别系统

借助图像自动识别系统(Automated imaging)，人们能对显微镜下的图像进行定量分析，并拓展显微镜的用途。

自从显微镜诞生以来，它就一直是科学家进行科学研究的得力助手。不过，显微镜图像一直只能算是一个描述性的结果，不能进行定量分析，而且进行显微镜观察是一项非常费时、费力的工作，这些缺陷一直阻碍着显微镜的广泛应用。

当Antonie van Leeuwenhoek在15世纪60年代第一次使用他自制的显微镜观察到微生物的时候，当Santiago Ramón y Cajal在200多年前第一次观察到神经系统结构的时候，他们都已经花费了很长的时间来进行观察工作，同时还需要花费很长时间将镜下的一切描绘到纸上。今天，科学家使用比当年先进得多的显微镜以及电荷耦合照相机(CCD camera)就能马上获得比当年清晰得多的图像，但是对于大多数的生物学家来说，他们使用显微镜还是只能通过大量的镜下观察来得到一个描述性的图像结果而已。

不过现在，借助计算机技术以及各种复杂的算法，显微镜可以有更多、更大的作为了。如今，已经发展到使用计算机来控制显微镜进行大部分的图像采集工作，显微镜下的图像结果不仅仅是描述性的，还可以通过计算机的运算对图像结果进行定量分析。这一切进步都是以往单单使用肉眼进行观察所无法比拟的。

即使对于那些目前还不能进行自动化分析的项目，例如在体内或体外试验中分析大量细胞中的基因表达水平，如果能够进行自动化分析，也将大大提高检测的效率和定量分析的准确度。

自动图像采集技术需要一系列相关技术协同作用才能成功。例如，需要使用合适的算法、需要选择合适的结果分析方式等等。虽然这些技术正在逐渐被大家所了解和使用，但目前还只是刚刚开始，还不成熟，还需要进一步的改进，才能满足更多科研人员的实际需要。对于自动图像采集技术的新老用户来说，在使用的时候都要小心仔细地进行操作和分析，不过相比该技术所可能带来的令人激动的成果而言，这样的谨慎还是相当值得的。