

文章编号: 0258-7025(2008)09-1283-25

# 超分辨远场生物荧光成像 ——突破光学衍射极限

毛峥乐 王 琛 程 亚

(中国科学院上海光学精密机械研究所强场激光物理国家重点实验室, 上海 201800)

**摘要** 长期以来, 远场光学荧光显微镜凭借其非接触、无损伤、可探测样品内部等优点, 一直是生命科学中最常用的观测工具。但由于衍射极限的存在, 使传统的宽场光学显微镜横向和纵向的分辨率分别仅约为 230 nm 和 1000 nm。为了揭示细胞内分子尺度的动态和结构特征, 提高光学显微镜分辨率成为生命科学发展的迫切要求, 在远场荧光显微镜的基础上, 科学家们已经发展出许多实用的提高分辨率甚至超越分辨率极限的成像技术。例如, 采用横向结构光照明提高横向分辨率到约 100 nm, 利用纵向驻波干涉效应将纵向分辨率提高 5~10 倍。然而, 直到在光学荧光显微镜中引入非线性效应后, 衍射极限才被真正突破, 如受激荧光损耗显微镜利用非线性效应实现了 30~50 nm 的三维分辨率。另外应用荧光分子之间能量转移共振原理以及单荧光分子定位技术也可以突破衍射极限, 甚至可以将分子定位精度提高到几个纳米的量级。

**关键词** 光学; 超分辨; 远场光学荧光显微镜; 生命科学; 非线性效应; 单分子

中图分类号 TH 742.65 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20083509.1283

## Superresolution Far-Field Fluorescence Bio-Imaging: Breaking the Diffraction Barrier

Mao Zhengle Wang Chen Cheng Ya

(State Key Laboratory of High Field Laser Physics, Shanghai Institute of Optics and  
Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

**Abstract** Far-field optical fluorescence microscopy has become an essential tool in life science for a long time largely owing to its unique capability to provide noninvasive, three-dimensional (3D) imaging inside cells. However, resolution of a traditional wide-field optical microscopy is limited to about 230 nm laterally and 1000 nm axially, due to the diffraction limit of light. Resolution improvement is urgently demanded because molecule-scale dynamics and structures are to be revealed inside living cells in today's life science. So far, many scientists have proposed a significant amount of novel methods in order to enhance resolution of far-field optical imaging. For example, lateral resolution of approximately 100 nm has been achieved by use of structured illumination, whereas the axial resolution has been enhanced 5~10-fold using a standing wave produced by two beams propagating in opposite directions. Nevertheless, diffraction barrier was not broken in these cases until nonlinear optical effects were introduced into optical fluorescence microscopy. As an example, the use of a nonlinear optical effect, namely, simulated emission depletion microscopy has resulted in a 3D resolution of 30~50 nm. Furthermore, the barrier of diffraction-limit can also be broken by novel technologies based on fluorescence resonance energy transfer and high-accuracy localization of fluorophores by which molecules can be positioned with a resolution of several nanometers.

**Key words** optics; superresolution; far-field optical fluorescence microscopy; nonlinear optical effects; single molecule

收稿日期: 2008-03-07; 收到修改稿日期: 2008-06-04

作者简介: 毛峥乐(1982—), 男, 上海人, 硕士研究生, 主要从事生物荧光成像方面的研究。

导师简介: 程 亚(1971—), 男, 上海人, 研究员, 博士生导师, 长期从事飞秒激光与物质相互作用、飞秒三维生物成像及飞秒三维微加工研究。E-mail: ycheng-45277@hotmail.com (通信作者)

©1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

# 1 引 言

## 1.1 生命科学与光学显微镜

毫无疑问,纳米技术与生物技术是 21 世纪发展最迅速和热门的科学领域。纳米技术应用广泛,包括 1~100 nm 尺度内的成像、测量、加工、操纵等。

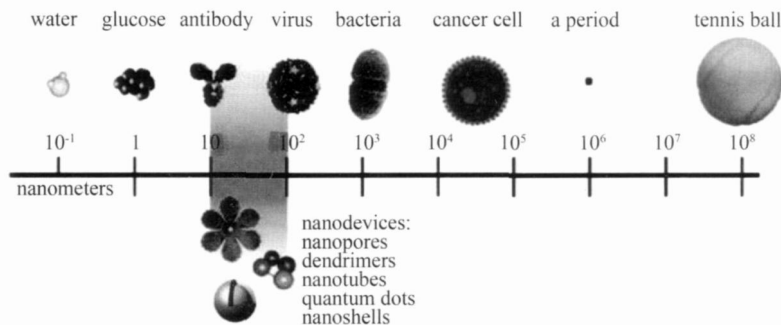


图 1 自然界微生物尺度

Fig. 1 Size of microorganisms in nature

光学显微镜的发展伴随着人类对微观世界探索的历程。早在公元前一世纪,人们就发现透过水滴可以观察到物体放大的像。1590 年前后,荷兰透镜工匠 Z. Janssen 和他的儿子把透镜组安装在管中,发明了原始的光学显微镜。在此之后, Anton van Leeuwenhoek 和 R. Hooke 对成像原理进行深入的研究,改进和发明了显微镜各部分结构,包括调焦结构、照明系统和载物台,得到了现代光学显微镜的雏形<sup>[2]</sup>。他们利用光学显微镜做了一系列生物学观察实验, Anton van Leeuwenhoek 第一次观测到细菌以及一滴水中的微生物,1665 年 R. Hooke 发现细胞,这一里程碑式的发现展示了光学显微镜在生物学领域的巨大潜力。1873 年,德国人 E. Abbe<sup>[3]</sup>揭示了远场光学显微镜由于光的衍射效应和有限孔径分辨率存在极限的原理,此后,提高光学显微镜分辨率工作一度停滞不前。Abbe 分辨率极限的数值约为  $\lambda/2n$ , 其中  $\lambda$  是光波波长,  $n$  是样品介质的折射率。若以波长为 500 nm 的光成像,水折射率为 1.33,分辨率极限约为 200 nm。

## 1.2 几种非远场荧光光学超分辨技术

为了提高分辨率,科学家们发明了许多新颖的超分辨技术。由 Abbe 分辨率极限  $\lambda/2n$  可以知道降低光波波长是提高分辨率最直接有效的方式,采用波长 2 nm 的 X 射线作为激发光源,实现了 30 nm 的分辨率<sup>[4,5]</sup>。但低于 400 nm 的光通常会损伤活细胞<sup>6</sup>,因此通常情况下 X 射线显微镜无法应用于活细胞观测。电子显微镜则利用波粒二相性,以德布罗伊波长为  $10^{-3}$  nm 的电子束照射样品,可以

如图 1 所示<sup>[1]</sup>,许多重要的生物体比如葡萄糖、抗体、病毒等都处于这个尺度范围内,研究这些微生物体的需求推动了高分辨率显微成像技术的发展,反过来,超分辨显微术的发展也推动了整个生命科学的进步。

达到 0.1 nm 的超高分辨率<sup>7</sup>,被广泛应用于细胞生物学,但由于生物样品无法存活于高真空环境,电子显微镜同样无法应用于活细胞。

原子力显微镜使用一个传感器尖端作为探针,利用尖端的原子与物质表面原子之间的范德华力 (Van Der Waals Force) 来呈现样品的表面形貌,分辨率可达原子尺度<sup>[8~10]</sup>。相似地,扫描隧道显微镜利用量子力学中的隧道效应,通过测量探针与样品表面之间的隧穿电流来判断样品表面形貌<sup>[11]</sup>,对粘附于表面的结构可以获得 0.1 nm 横向和 0.01 nm 纵向分辨率。不幸的是它们仅限于样品表面成像,并且图像获取速度缓慢,实验装置复杂昂贵,可能对生物组织造成损坏,同样无法用于活细胞。

为了避免远场衍射带来的 Abbe 分辨率极限,1928 年 E. H. Syng 等<sup>[12,13]</sup>提出近场扫描光学显微镜 (Near-field Optical Scanning Microscopy, NOSM), NOSM 使用一个尺度远小于波长量级的探针(如光纤)照明样品,使照明光场限定在 50~100 nm 范围内,收集距离样品表面几个波长量级附近的透射倏逝波来获取样品信息,因此不受远场衍射限制,可获纳米量级的分辨率<sup>[14~16]</sup>,同时可以结合全内反射 (Total Internal Reflection, TIRF) 技术使用倏逝波照明样品<sup>[17]</sup>。然而它也只能观测样品近表面区域的信息,对样品的制备有极高的要求。

## 1.3 远场荧光光学显微镜在生物成像中的优势

与上述介绍的显微技术相比,可见光波段的远场光学显微镜具有非接触、无损伤、可探测样品内部的特点,这些特点是生物组织活细胞深层三维成像

的先决条件。事实上,远场光学显微镜一直是生命科学科学研究中最主要的工具。

荧光光学显微镜是生物学研究中最常用的一种光学显微镜,利用荧光分子作为探针标记生物组织,通过探测受激荧光分子发射的荧光信号分布获取样品的空间信息。荧光光学显微镜相比普通光学显微镜具有灵敏度高、可选择激发、高荧光对比度、信号光相对于激发光红移(有利于信号光与激发光的分离)等特点,这些独有的性质改善了光学显微镜的成像质量。更重要的是荧光显微镜的成像不仅包含透射、折射、散射等几何光学过程,它还是一个光与物质、物质与物质相互作用的过程,这些丰富的物理过程为提高分辨率提供了一些新的途径。本文将围绕着适用于生物样品观测的远场荧光光学显微镜,就现今常用的一些提高分辨率尤其是具有突破 Abbe 分辨率极限能力的显微技术展开详细讨论。

## 2 远场荧光光学超分辨技术

### 2.1 光学显微镜分辨率

点扩散函数(Point Spread Function, PSF)是一个无限小物点通过光学系统在像平面处的光强分布函数。在一个线性不变的光学系统中,PSF 不随物点位置的变化而改变,且像的光强与物的光强呈线性关系。一般的光学成像系统都可近似为线性不变系统,如果认为物是无限小的点的集合,那么光学系统的成像过程就是物函数与 PSF 的卷积<sup>[18]</sup>。如图 2 所示<sup>[19]</sup>,当两个物点的 PSF 接近到重叠部分的最小值比最大值低 20%~30% 时, L. Rayleigh<sup>[20]</sup>认为此时两个物点刚好可分辨,他以 PSF 的半峰全宽(FWHM)作为成像系统可分辨的最小尺度,据此给出瑞利判据,为

横向分辨率
$$d_{x,y} = \frac{0.61\lambda}{NA}, \tag{1a}$$

纵向分辨率
$$d_z = \frac{2\lambda}{NA^2}, \tag{1b}$$

式中 NA 为物镜的数值孔径,定义为  $n\sin\theta$ ,  $n$  和  $\theta$  分别为物镜的折射率和最大接收半角。

在 PSF 中仅有一个主峰,或旁瓣(PSF 光强次极大)非常小时,使用瑞利判据描述光学系统的分辨率非常准确。随着旁瓣强度的增加,照明 PSF 的旁瓣在像平面产生虚像,不太严重的情况下,可以通过去卷积技术有效去除<sup>[21]</sup>,但是当旁瓣的强度达到主瓣强度的一半时,去卷积技术等图像处理方式失效<sup>[22, 23]</sup>,图像质量严重下降。此时 PSF 的傅里叶变

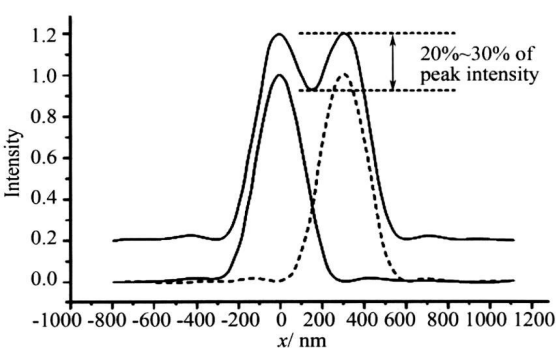


图 2 瑞利判据规定光强叠加处最小值低于最大值处的 20%~30% 时刚好被分辨

Fig. 2 Rayleigh criterion defines that two objects are distinguishable only when the minimum of sum intensity is at least 20%~30% lower than the maximum (NA=1,  $\lambda=500\text{ nm}$ )

换对光学传递函数(Optical Transfer Function, OTF)更加适合用来评价光学系统的分辨能力<sup>[24]</sup>。当荧光分子被激发后,荧光各向同性发射,换言之以各种空间频率传播,光学显微镜中有限光瞳相当于一个低通滤波器,阻挡了高空间频率荧光信号的通过,而高空间频率对应物体的精细结构,由此造成分辨率的限制。考察光学成像系统的 OTF 即可获得该成像系统高频信号获取能力,对应实际空间中的分辨率。在 PSF 旁瓣较大的情形下,OTF 比 PSF 更加准确地反映光学系统的实际分辨本领。

### 2.2 荧光光学超分辨技术简介

原则上说,所有的光学超分辨技术都是围绕着如何得到一个尺度更小的 PSF 或者尺度更宽的 OTF,科学家们提出大量的方法来实现这一目标,可以归纳为 4 点思路:

- 1) 采用调制光照明样品;
- 2) 利用干涉照明和(或)成像;
- 3) 引入非线性效应;
- 4) 利用荧光分子激发过程中的物理机制。

第一个概念利用空间调制光照明样品,将物场高空间频率信息编码,再通过计算提取高频信息,横向分辨率提高 1 倍<sup>[25]</sup>。4Pi 共焦扫描显微镜利用第二个概念,在样品两侧各放置一个物镜,使激发光干涉照明,信号光干涉成像,将轴向分辨率提高 5~7 倍<sup>[26]</sup>。在调制光照明中结合非线性饱和激发,即利用第三个概念,相对线性激发的情形可以获得更高空间频率信息,实现 50 nm 的横向分辨率<sup>[27]</sup>。受激发射损耗显微镜则利用饱和和受激发射的非线性特性突破了 Abbe 分辨率极限,三维分辨率达 30~

50 nm<sup>[28]</sup>, 理论上不受 Abbe 分辨率极限限制。第四个概念利用荧光光学显微镜中荧光分子激发过程的物理机制, 例如: 利用荧光分子对在相距 1 ~ 10 nm 内会发生荧光共振能量转移, 荧光共振能量转移显微镜<sup>[29]</sup> 具有纳米级的分辨本领。

在实际应用中, 各种超分辨思想和技术不是孤立存在的, 为了最大程度地提高分辨率或同时获得横向和纵向的高分辨率, 需要多种超分辨技术的优化组合。例如 4Pi 共焦扫描显微镜具有提高纵向分辨本领的能力, 结合受激发射损耗技术, 横向和纵向分辨率都达到 50 nm 以下<sup>[30]</sup>, 4Pi 共焦扫描显微镜采用双光子激发方式, 则兼具良好的组织穿透能力和轴向超分辨本领<sup>[31]</sup>。还有许多其他组合方案, 本文只选择介绍一些成熟的组合方案, 重点在于说明各种超分辨技术的基本原理。

2.3 共焦扫描荧光显微镜

传统宽场光学显微镜一般使用面探测器如电荷耦合器(CCD)接收信号, 主要的不足是纵向分辨率低, 另外由于背景噪声得不到有效抑制, 图像的信噪比和对比度不高。1960 年前后, M. Minsky<sup>[32]</sup> 提出共焦扫描光学显微镜 (Confocal Scanning Fluorescence Microscopy, CSFM) 的概念, 大大增强了光学显微镜的轴向分辨能力, 但直到 1970 年后随着激光和数字化数据采集技术的应用, CSFM 才得以实现, 并很快成为生物医学研究领域的重要工具<sup>[33~35]</sup>。

2.3.1 单物镜的 CSFM

共焦点探测是 CSFM 最显著的特点, 如图 3 所示<sup>[36]</sup>。点探测装置由一个中心与焦点位置共轭的小孔滤波器和光电倍增管 (Photomultiplier Tube, PMT) 组成, 小孔的尺度一般小于像平面的爱里斑

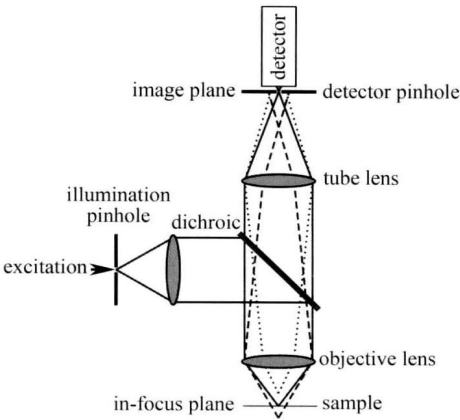


图 3 共焦显微镜结构示意图

Fig. 3 Principle of confocal detection

尺度, 仅使来自物场焦点中心区域发射的荧光光子通过小孔被探测器收集, 而焦点周围以及轴向前后的光(背景噪声)被遮挡<sup>[37, 38]</sup>, 数学上可以通过光强概率函数来描述这一过程

$$h_{\text{conf}} = h_{\text{exc}} \circ h_{\text{det}}, \tag{2}$$

式中  $h_{\text{exc}}$ ,  $h_{\text{det}}$  和  $h_{\text{conf}}$  分别表示照明光、小孔滤波器以及总的光强概率分布。式 (2) 显示了小孔滤波器对离焦背景光的抑制作用。由此横向分辨率提高 1.4 倍<sup>[39]</sup>, 经过数据优化处理甚至可以达到 2 倍<sup>[40]</sup>。更重要的是由于小孔抑制焦点轴向离焦的光信号, 使 CSFM 的轴向分辨能力大大增强。点探测器每次采集单点的信号, 扫描整个样品获取单个焦平面图像, 再改变样品轴向位置逐层扫描成像, 最终将各层图像组合(重构)得到样品三维图像<sup>[41]</sup>。

然而生物组织存在散射, 焦点中心处发射的信号光子到达像平面时可能会偏离小孔滤波器的中心被阻挡, 加之荧光信号本身就比较微弱, 探测器采用量子效率较低的 PMT (低于 CCD), 滤波器的孔径过小会使信号强度和信噪比迅速下降<sup>[42]</sup>。可见 CSFM 的分辨率与信噪比是一对矛盾, 由于信噪比决定了光学系统获取图像的能力<sup>[43]</sup>, 实际应用中, 往往不得不增大孔径使信噪比高于可观测的水平, 这种情况下 CSFM 相对于宽场显微镜分辨率在横向没有太大的提高。尤其对于较厚的样品, 深层激发的荧光信号光子受到的散射更加严重, 小孔滤波器的孔径超过爱里斑, 甚至是爱里斑大小的数倍, 此时 CSFM 对横向分辨率几乎没有任何提高, 主要用来抑制噪声<sup>[42]</sup>。CSFM 横向和纵向分辨率的典型值约为 200 nm 和 500 nm<sup>[39]</sup>。

由此可见, CSFM 相对于宽场光学显微镜的改进主要在于轴向分辨能力的增强, 并能有效抑制背景噪声, 发挥了光学显微镜无损伤、非侵入的优势, 适用于生物活细胞内部的三维成像。凭借简单的物理原理和良好的可操作性, 迄今为止, CSFM 仍然是生物活细胞组织研究中最常用的工具之一<sup>[44, 45]</sup>。

2.3.2 Theta 共焦显微镜

如图 4 所示<sup>[24]</sup>, CSFM 由于采用单物镜照明样品和收集信号, 只能产生和收集球面波的一部分, 造成 PSF 在纵向和横向不对称, 纵向分辨率劣于横向分辨率 3 ~ 4 倍。针对这个问题, Theta 显微镜<sup>[46, 47]</sup> 采用光轴正交的(更一般地, 成  $\theta$  角)两个透镜分别照明样品和采集荧光, 此时探测 PSF 的纵向对应照明 PSF 的横向, 由式 (2) 可知, 照明样品的 PSF 纵向将被压缩, 提高轴向分辨率, 改善总的

PSF 的不对称性<sup>[46]</sup>。

实际应用中,大数值孔径的物镜工作距离很短,光轴正交的两个物镜将会在空间上重合。因此 Theta 显微镜只能选用数值孔径较小的物镜,典型值为 0.75<sup>[46]</sup>,仅为共焦显微镜的一半,可见 Theta 显微镜轴向分辨率的提高是以牺牲横向分辨率为代价的<sup>[47]</sup>。另外,由于照明光和接收信号的方向正交,样品需要在两个方向上具有一定的对称性,样品一般制成棒状,增加了样品制备和实验装置的复杂性。

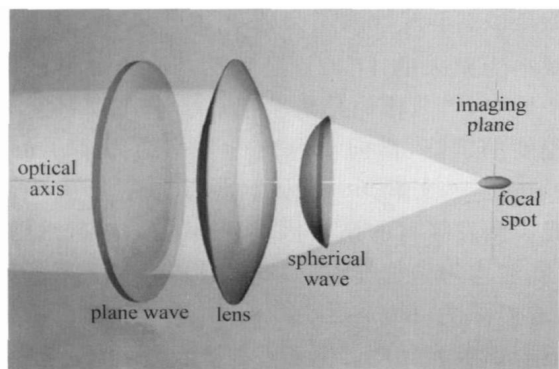


图 4 单物镜聚焦形成的椭球形焦点

Fig. 4 Ellipsoid focal spot produced by single lens

文献[48]报道了利用 B. Richard 和 E. Wolf 的矢量场理论修正激发光和探测光的 PSF, 计算证明利用偏振光激发和偏振光探测可获得各向同性更好的 PSF, 且主瓣与旁瓣彻底分离有利于去卷积处理。在照明光路和探测光路中加入遮挡比例大于 0.5 的环形滤波器可以有效减小 Theta 显微镜的 PSF 体积<sup>[49]</sup>, 但这会产生较大的旁瓣, 在探测光路改用小孔滤波器可以抑制旁瓣, 提高信号光采集效率。

为了从根本上克服两个物镜对数值孔径大小的限制, S. Lindek 等<sup>[50, 51]</sup>在物镜下放置反射镜使激发光反射, 与探测光路形成  $\theta$  角, 实现了单物镜的 Theta 显微镜 (Single-lens Theta Microscopy, SLTM)。这种方法允许使用稍大数值孔径的物镜 (NA=1.0), 相对于共焦显微镜 (NA=1.23), 轴向分辨率提高 1.5 倍。但是物镜 1 mm 的工作距离以及物镜下的反射镜装置都限制了样品的尺寸, 只适合观测较小的样品。

## 2.4 双光子荧光显微镜

### 2.4.1 单色双光子荧光显微镜

M. Göppert-Mayer<sup>[52]</sup>最早为双光子激发显微镜奠定了理论基础, 1931 年她在博士论文中通过量

子力学建立了双光子吸收和发射理论, 指出只要激发光子密度足够高, 材料可以同时吸收两个频率相同的光子, 相当于吸收一个倍频的单光子。早期采用被动锁模的染料激光器产生的皮秒脉冲光激发有机分子实现了双光子吸收<sup>[53]</sup>。接着人们尝试利用染料激光器获取飞秒光<sup>[54]</sup>, 并利用锁模染料激光器产生的 100 fs 激光实现了多光子吸收过程<sup>[55]</sup>。然而染料激光器的不稳定性与较窄的调谐范围阻碍了双光子显微镜的发展, 直到 1990 年后自锁模的 Ti-sapphire 飞秒固体激光器的出现, 40 fs 脉宽和 700 ~ 1100 nm 宽波长调谐范围使其成为双光子激发的理想光源<sup>[56]</sup>。W. Denk 等<sup>[57, 58]</sup>将激光扫描技术与 Ti-sapphire 飞秒固体激光器结合, 首次提出并证明了双光子荧光显微镜 (Two-photon Fluorescence Microscopy, TPFM) 在生物样品观测中的实用性, 指出一个荧光分子的吸收概率除了与激光光强的平方成正比以外, 还与脉冲宽度、重复频率、聚焦物镜数值孔径、光子的吸收截面等有关, 他们在《Science》上发表的文章至今已被引用 1000 多次, 这一开创性的工作使 TPFM 进入一个快速发展的阶段。

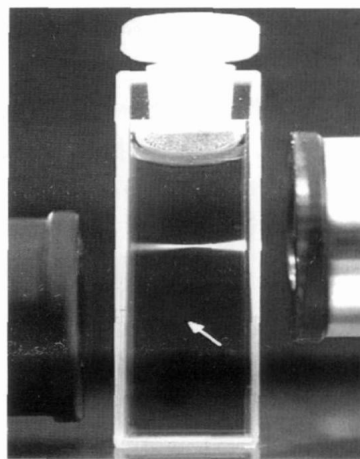


图 5 单光子激发与双光子激发对比

Fig. 5 Comparison of one- and two-photon fluorescence excitations

相对于单光子激发的光学显微镜, TPFM 通常具有两个非常显著的特点, 1) 非线性激发, 即荧光激发概率正比于光强的二次方; 2) 采用长波长近红外光激发。这为 TPFM 带来四方面的优点:

1) 荧光激发概率正比于光强二次方, 因而样品中除了焦点附近高光强区域内的荧光分子可以被激发外, 其他区域内激发概率非常小。如图 5 所示<sup>[39]</sup>, TPFM 有效降低了背景噪声, 改善信噪比。

用于高散射的生物组织时, 双光子显微镜更少受到散射背景光的影响<sup>[59, 60]</sup>。

2) 由于双光子激发仅在焦点附近的高光强区域发生, TPFM 由这种内禀物理特性增强轴向分辨能力。不仅如此, 由物理效应形成的“虚小孔”不会像 CSFM 中实际小孔那样阻挡信号光<sup>[57, 58]</sup>, 从而提高了信号接收效率和信噪比<sup>[61, 62]</sup>。

3) 以近红外光(700~1100 nm)作为激发光源, 相对于可见光在生物组织里散射和吸收更小, 穿透能力更强。以人类皮肤作为观测对象, TPFM 能够比 CSFM 探测更深的区域<sup>[63, 64]</sup>。TPFM 十分适于生物组织的深层透视<sup>[59, 60, 65, 66]</sup>, 利用再生放大器产生的高强度激光可以使探测深度达到近 1000  $\mu\text{m}$ <sup>[67~69]</sup>。

4) 由于双光子荧光激发仅发生在焦点附近, 从而减轻了焦点外区域的荧光分子的光漂白、光裂解。双光子激发所用的近红外激发光相对于单光子时波长较长, 对非焦点区域外的生物细胞的光损伤更小。

TPFM 的四方面优点极大地改善了光学显微镜在生物组织活细胞, 尤其是生物组织深层成像的适用性<sup>[70]</sup>, 已被广泛地应用于肾脏<sup>[71]</sup>、脑细胞<sup>[72, 73]</sup>、皮肤组织<sup>[74, 75]</sup>、淋巴器官<sup>[76]</sup>以及肿瘤<sup>[77]</sup>等的研究。

由于双光子吸收系数极小, TPFM 需要吉瓦每平方厘米级的光强, 对激光器提出较高的要求。虽然非线性激发使非焦点区域的荧光分子光漂白和光

损伤得到缓解, 但是焦点中心处荧光分子的光漂白和光分解仍可能十分严重<sup>[78]</sup>。激发光在生物组织中由于吸收和散射等损耗机制, 光强是近似指数衰减的, 如图 6 所示<sup>[69]</sup>, 随着成像深度的增加, 图像信噪比不断下降, 直至某一深度无法从噪声中分辨信号。随着深度的增加, 为了在焦点处保持一定的光强, 入射光强度需指数增加。但过高的光强一方面导致非焦点区域背景噪声的增加从而降低信噪比, 另一方面也加剧了样品表面和近表面区域的荧光分子的光漂白和生物细胞的光损伤。另外一点值得注意的是虽然非线性激发会减小 PSF 尺度, 使半峰全宽减小为原来的  $1/\sqrt{2}$ , 但激发光波长加倍抵消了这个效应<sup>[61, 79]</sup>, 横向分辨率相对于 CSFM 甚至有一定程度的下降, 横向与纵向分辨率约为 200 nm 和 400 nm<sup>[80]</sup>。文献[68]深入讨论了散射介质中影响双光子激发深度的诸多因素, 证明了增加物镜数值孔径、非均匀染色、减小激发光脉宽和材料的各向异性, 透射深度可增加至 1400  $\mu\text{m}$ , 进一步提高主要受到近表面荧光噪声的限制。

#### 2.4.2 双色双光子激发荧光显微镜

不仅频率相同的两个光子可以被同时吸收, 不同频率的两个光子也可以同时被吸收<sup>[57]</sup>。利用双色双光子(Two-color Two-photon, 2C2P)激发的新特性可能为 TPFM 的性能带来一些改善<sup>[81~84]</sup>: a) 在采用两束聚焦光激发时, 2C2P 由于两束光频率不同不会发生干涉, 因此 PSF 的形状和位置不受干涉的影响, 具有较小的球差<sup>[85]</sup>; b) 一些计算和蒙特卡罗模拟表明在高散射介质中, 随透射深度的增加, 2C2P 相对于单色双光子激发时受到的散射影响更小, PSF 的位置和形状误差更小, 意味着 2C2P 显微镜在高散射介质中可能观测的更深<sup>[86, 87]</sup>; c) 不同频率的两束光成  $\theta$  角激发样品, 只会在共焦重叠处激发, 有利于消除背景噪声, 同时可以灵活地调整两束光来调节焦斑的位置和大小。由于采用非同轴双物镜, 它类似于 Theta 显微镜存在数值孔径大小的限制(NA 不大于 0.5)<sup>[81]</sup>。

CSFM 和 TPFM 相对于传统的宽场光学显微镜分辨率提高不多, 但它们是远场光学显微镜里程碑式的进步, 因为它们的思想方法是诸多生物光学显微镜超分辨技术的基础和起点, 三维成像和深层探测能力赋予了光学显微镜在生命科学研究领域无可取代的地位。

#### 2.5 结构光照明显微镜

结构光照明显微镜利用调制光源照明样品, 将

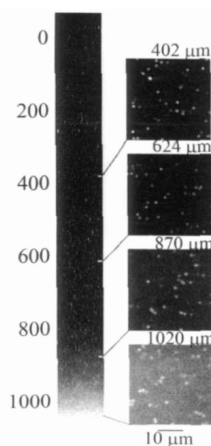


图 6 荧光小球在脑组织  $x$ - $z$  平面投影和四个不同深度  $x$ - $y$  平面扫描成像, 图像信噪比随着深度增大降低, 可见双光子探测深度受到信噪比下降的限制

Fig. 6  $x$ - $z$  projection of the fluorescent bead distribution in brain tissue phantom and single planar  $x$ - $y$  scans at four different depths ( $z$ ), showing that the depth of two photon imaging is limited to  $S/N$

原本不可分辨的高分辨率信息编码入荧光图像中, 结合计算解码获取高分辨率信息, 可将横向分辨率提高至约 100 nm。

2.5.1 横向调制光激发显微镜

横向调制光激发显微镜 (Laterally Modulated Excitation Microscopy, LMEM) 采用宽场照明和成像, 不同之处在于采用横向调制光照明样品, 它并非直接提高系统的分辨本领, 而是利用调制照明光将高空间频率信号编码入低频图像中, 再通过计算分

离获得高频信息, 可将横向分辨率提高 1 倍<sup>[25, 88, 89]</sup>。其编码过程可以直观地通过云纹图像 (moiré fringe) (图 7)<sup>[88, 89]</sup> 来理解。图 7 (a) 中较密的条纹表示样品中染料分子分布 (即样品的精细结构) 和调制照明光场分布, 它们的空间频率都很高, 难以直接分辨, 但二者叠加后得到黑色粗条纹的空间频率很低, 可被分辨获得。由于结构光的分布函数是已知的, 云纹图像是可测量的, 就可以通过计算反演出物场的精细结构。

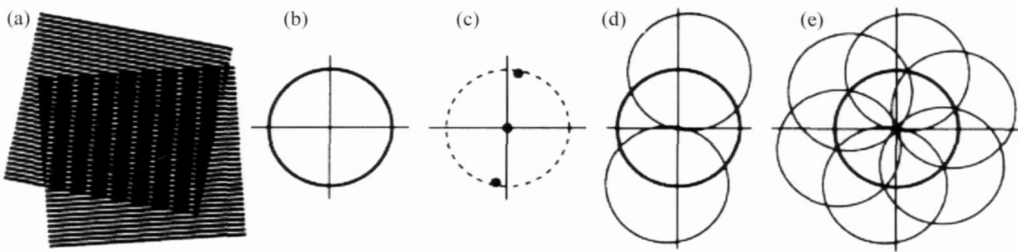


图 7 正弦调制光扩展显微镜的 OTF

Fig. 7 Sine-modulated illumination extends OTF of microscopy

从频域来看, 采用调制光照明拓展了 OTF。图 7(b) 是宽场均匀光照明时的 OTF, 图 7(c), (d) 是调制光照明引入的新的空间频率和相应被拓展的 OTF, 一对正负频率距离原点 (零频) 的距离 (模长) 取决于调制光的空间频率, OTF 被拓展的取向由调制光取向决定。为保证 OTF 的连续性, 结构光的空间频率不大于均匀照明时光学系统 OTF 的半径大小, 为保证 OTF 拓展的各向同性, 需要在多个方向上对称地采用调制光照明。二维 OTF 扩展需要至少两个正交方向上的结构光照明 (对应于正方形网格调制光), 选取更小的角度间隔如  $\pi/3$ , 即如图 7(e) 所示, 可以获得各向同性更好的 OTF。新的 OTF 相对于均匀光照明时半径增加 1 倍, 分辨率相应提高 1 倍。实际应用中, 通过旋转使样品获得各个取向的调制光照明。

由于采用调制光照明时, 所有空间频率的照明光产生的像不可避免地叠加在一起, 为了获得真实的像, 需要将它们彼此分离。方法是在  $2\pi$  范围内移动调制光相位获得多幅图像, 解方程所需图像数量取决于调制光空间频率分量的数目, 以图 7<sup>[89]</sup> 一维正弦调制光为例, 此时照明光包含 3 个空间频率分量, 因此最少需要移动 3 次相位, 类似的二维情况则是 5 次。解码具体过程为: 先将获取的各幅图像进行快速傅里叶变换, 在频域中解出各个频率分量的频谱, 其中包含系统原本无法分辨的物场高分辨空

间信息频谱, 再将所有的频谱傅里叶反变换获得真实空间的光场分布, 按一定权重叠加在一起的图像就包含了均匀光照明时无法获取的精细结构<sup>[88]</sup>。

横向调制光通常采用两种方式获取: 1) 最简单的是在物镜的前焦面放置一个光栅模板, 在样品的焦平面处就会得到对应的调制光分布, 光栅模板空间频率和位置是可控制的, 用来获取多幅图像<sup>[88, 89]</sup>; 2) 利用两束光在样品中干涉形成驻波场来实现光强的周期性分布<sup>[90, 91]</sup>, 可以是单光子的线性激发, 也可以利用双光子非线性激发。改变光束入射角调节调制光的空间频率和位置, 改变其中一束光的光程实现相移。

2.5.2 结构光照明三维宽场显微镜

有些出人意料的是, 横向调制光照明可以增强宽场光学显微镜的纵向分辨能力<sup>[92~93]</sup>, 如图 8 所示<sup>[93]</sup>。调制光照明的宽场显微镜对百合花花粉颗粒成像可以分辨其表面的立体结构。分析 CSFM 的层析能力不难发现: 共焦模式是相干照明, OTF 内各空间频率在焦点位置处强度最大, 随着离焦而迅速衰减, CSFM 由此获得层析的能力。反观一般宽场显微镜是部分相干照明的, 且 OTF 中的零频光占主导地位, 零频光实际上不随离焦衰减, 因此宽场显微镜层析能力较弱<sup>[22]</sup>。如果在宽场显微镜中采用单一空间频率的调制光照明样品, 只对调制光焦平面处的样品有效成像, 离焦后光强衰减, 就可以



增强纵向分辨能力, 分辨率约 400 nm<sup>[94]</sup>。这种方式会引入网格图样, 一般采用两种方式消除: 1) 改变光场相位得到多幅图像进行解码计算去除多余的图

样<sup>[93, 94]</sup>; 2) 放置一个对应的图样模板在探测器前光学解码, 这种方式要求极高的精度, 并会损失一部分光强, 优点在于允许使用图形复杂的模板<sup>[92, 95]</sup>。

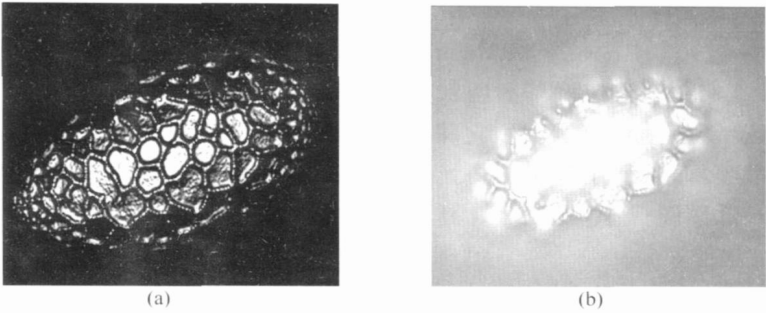


图 8 百合花花粉颗粒成像, (a) 调制光; (b) 均匀光  
Fig. 8 Image of lily pollen grain by (a) modulated and (b) uniform illuminations

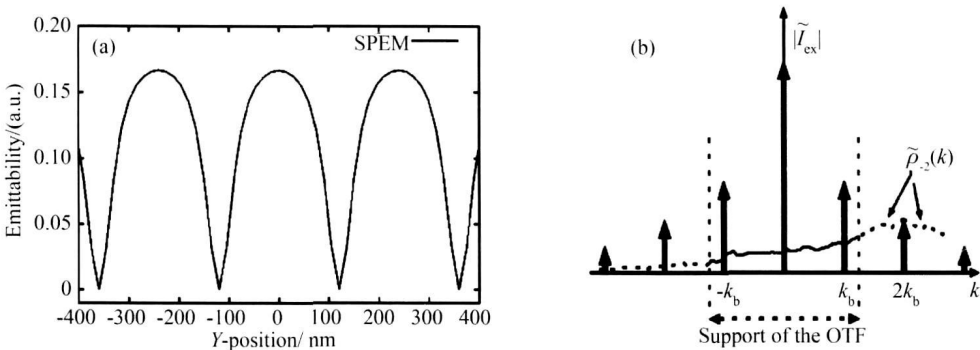


图 9 (a) 正弦光强分布的激发光饱和和激发产生的非正弦荧光光强分布;  
(b) 在频域产生相应新的高阶空间频率分量, 扩展 OTF  
Fig. 9 (a) Fluorescence intensity profile under saturated sine modulated excitation;  
(b) High-frequency components appear and OTF is extended

2.5.3 饱和结构光照明显微镜

非线性结构光照明是线性结构光照明的非线性扩展<sup>[27, 96, 97]</sup>。在荧光分子激发过程中, 激发光强较低时, 荧光发射强度正比于激发光光强, 当激发光强度分布为正弦函数时荧光强度也成正弦函数分布。随着激发光强的增大, 荧光分子第一激发态饱和, 如图 9(a) 所示<sup>[27]</sup>, 荧光强度分布函数不再是正弦函数。饱和的荧光强度分布函数在频域中展开产生一系列非线性项, 如图 9(b) 所示<sup>[27]</sup>。这些非线性项对应的空间频率是线性结构光空间频率的 2 倍频, 3 倍频甚至更高阶的谐频, 取决于激发光的强度 (荧光分子第一激发态饱和程度), 并且这种拓展是连续的, 如图 10 所示<sup>[97]</sup>。这些高阶的非线性空间频率项的出现相对于线性结构光照明进一步拓宽了 OTF 的尺度, 将更高空间频率的信息移入可分辨的区域。只要允许一直增大激发光光强, 就可以无限扩展 OTF 尺度, 因此理论上饱和结构光照明显微

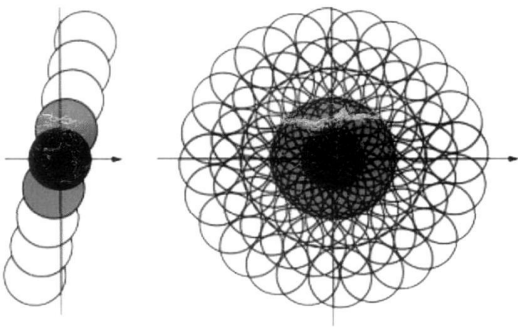


图 10 非线性结构光照明扩展 OTF 尺度  
Fig. 10 Saturated structured illumination extends OTF  
镜 (Saturated Structured Illumination Microscopy, SSIM 或 Saturated Patterned Excitation Microscopy, SPEM) 不存在分辨率极限, 突破了 Abbe 分辨率极限的限制。

实际应用中, 激发光强存在两方面限制: 1) 饱和

激发会加剧荧光分子的光漂白, 另一方面, 虽然激发



光的强度比 TPFM 低 3 个量级,但是短波长光饱和和激发会大大增加生物细胞光损伤的发生; 2) 如图 9 (b) 所示<sup>[27]</sup>, OTF 高阶非线性项随着阶数增加强度下降, 当信噪比低于 1 时, 对应的空间分辨率信息截至。解码所需图像的数目等于调制光空间频率的个数, 高阶结构光的出现增加了计算的复杂性和解码所需的时间, 难以对细胞组织内快速过程成像, 仅限于观测低速活动的生物结构。文献[97]报道的 SSIM 在原来的线性基础上扩展了 2 倍频和 3 倍频的空间频率项, 相对于宽场显微镜横向分辨率提高了 4 倍, 对珠状样品观测横向分辨率达 50 nm。

LMEM 和 SSIM 在宽场成像的基础上提供了一种简单、具有快速获取图像能力的二维超分辨成像技术, 为生物组织纳米结构的活体研究开辟了一条新的途径。若将这一概念拓展至三维, 则有望实现快速三维全场成像。

## 2.6 干涉在光学超分辨技术中的应用

纵向分辨率劣于横向分辨率一直是困扰远场光学显微镜的问题。本节将针对这一问题着重讨论驻波荧光显微镜、非相干光干涉照明干涉成像显微镜和 4Pi 共焦扫描显微镜, 它们的核心思想都是在样品的背面增加另一个物镜通过照明光干涉和(或)信号光干涉成像获取物场纵向高空间频率信息, 在计算和实验中已经证实可将纵向分辨率提高 5 ~ 10 倍。值得注意的是利用干涉在提高了纵向分辨率的同时也程度地引入了纵向旁瓣, 纵向旁瓣的大小直接关系到去卷积、非线性图像处理的效果<sup>[22, 98]</sup>, 也决定了它们的实用价值, 一般以主瓣光强的 50% 作为一个衡量的标准。

### 2.6.1 驻波荧光显微镜

由图 4<sup>[24]</sup> 不难看出, 纵向分辨率劣于横向分辨率的根本原因在于单物镜形成的椭球体焦斑的光强在纵向衰减比横向衰减的慢。驻波荧光显微镜 (Standing Wave Fluorescence Microscopy, SWFM) 利用纵向相对传播的两束光产生光强快速变化的驻波场, 加速了光强在纵向的衰减, 从而提高纵向分辨率<sup>[99~101]</sup>。SWFM 可在普通宽场显微镜的平台上实现, 如图 11 所示<sup>[102]</sup>, 在样品背面放置反射镜, 或者由两个相对的物镜产生激光驻波场 (周期为  $\lambda/2$ ), 光场分布为

$$I_s = 1 + \cos(2kz + \varphi), \quad (3)$$

其中  $I_s$  为驻波场的光强分布,  $k$  为入射波波矢,  $\varphi$  为驻波场的初相位。由此可见驻波场照明是选择性激发, 纵向 PSF 尺度 (分辨率) 不直接受到远场衍射的

限制, 而是由驻波场的光场分布特性决定。驻波场周期为  $\lambda/2n$ ,  $\lambda$  和  $n$  分别是照明光波长和样品的折射率, 若波长为 500 nm, 折射率为 1.33, 驻波场周期约为 190 nm。此时相距 95 nm 的物点分别处于暗平面和亮平面, 可被分辨。实际上, 物点相距 47 nm ( $\lambda/8n$ ) 时对比度已经足以被分辨了, 相对于共焦显微镜 500 nm 的纵向分辨率提高了 10 倍<sup>[103, 104]</sup>。

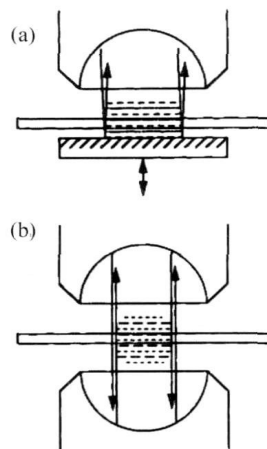


图 11 SWFM 示意图

Fig. 11 Scheme of SWFM

SWFM 的调制光场如式 (3) 所示, 因此直接获得的图像中不仅包含了均匀光照明的分量, 还叠加了正弦和余弦光场调制的像, 类似于 LMEM, 3 个频率调制的光强分布至少需要获得 3 幅图像才能将它们分离。SWFM 全场照明样品全场成像, 速度快、信噪比高, 适用于生物动态实时观测<sup>[103, 104]</sup>。

对于较厚的样品, 样品内存在周期性分布的光场在像平面所成的像叠加在一起无法区分<sup>[22]</sup>。利用全场同步分析技术<sup>[100~102, 104]</sup>, 即通过叠加多个不同周期的驻波场照明样品可以部分解决这一问题, 但仍然存在一些空间频率的损失。另外厚样品加重了样品折射率空间不一致性造成的波面畸变使成像复杂化。但对于厚度小于  $\lambda/2n$  (190 nm) 的薄片样品不存在以上问题, 因为样品中始终只存在一个亮 (焦) 平面, 且样品全部落入物镜的场深 (depth of field) 之中, 无需重新机械对焦, 改变其中一束光的相位移动驻波场依次照明整个样品各层获取多幅图像, 具有极强的层析能力<sup>[102, 103]</sup>。

若通过 OTF 分析 SWFM 分辨本领, 如图 12<sup>[22]</sup> 所示, 在厚样品中周期结构光照明形成的 PSF 纵向旁瓣强度超过主极大的 50%, 造成 OTF 的零频与高频部分完全分离, 形成所谓的频率禁带, 致使物场大量空间频率信息丢失<sup>[102]</sup>。但对于厚度小于  $\lambda/2n$

的样品,旁瓣处于样品之外,样品中仅存在 PSF 的主极大,频域中对应较宽尺度的 OTF,因此可以获得超高纵向分辨率<sup>[103, 104]</sup>。

2.6.2 非相干光干涉照明干涉成像显微镜

普通宽场显微镜仅采用一个物镜前向收集信号光,损失了样品背面的信号。干涉成像显微镜(Image Interference Microscopy,  $I^2M$ )在样品的背面放置另一个相同的物镜<sup>[105]</sup>,如图 13(a)所示<sup>[106]</sup>。双物镜同时收集样品的荧光信号,调节两个光路的光程相等使信号最终在 CCD 上干涉成像,干涉图像包含了样品更高的纵向分辨率信息。在照明光路引入干涉,由于照明使用的弧光灯发射的是空间非相干

光,因此称之为非相干干涉照明显微镜(Incoherent Interference Illumination Microscopy,  $I^3M$ )。 $I^2M$ ,  $I^3M$  两种技术都利用干涉获取更高的纵向分辨率信息,彼此独立,如图 13(b)所示<sup>[106]</sup>。二者也可以同时应用,得到非相干光干涉照明干涉成像显微镜(Incoherent Interference Illumination Image Interference Microscopy,  $I^5M$ )<sup>[107, 108]</sup>。 $I^5M$  移动焦平面在样品中的位置获得纵向各层的图像,干涉带来的纵向旁瓣较大,需要去卷积计算去除离焦处的模糊图像,重构样品的三维图像。其纵向分辨率相对于 CSFM 最高可提高 7 倍,对细胞纤维肌动蛋白三维成像得到优于 100 nm 的纵向分辨率<sup>[108]</sup>。

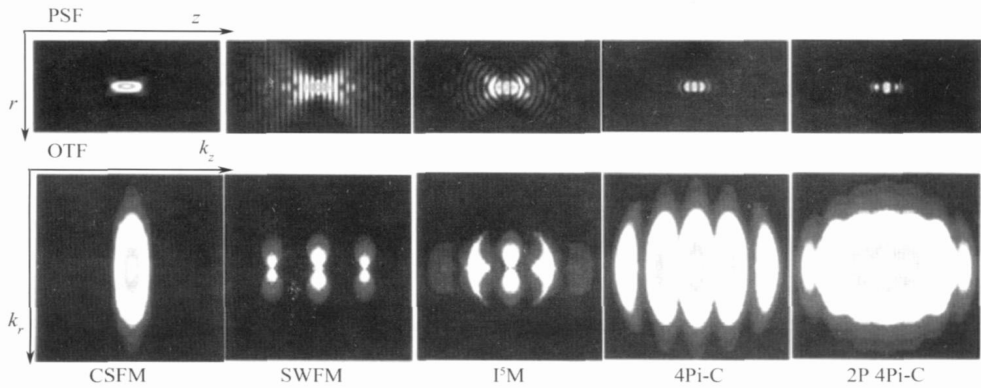


图 12 CSFM, SWFM、 $I^2M$  和 4Pi 显微镜的 PSF 和 OTF 对比

Fig. 12 Comparison of PSFs and OTFs among CSFM, CSFM, SWFM,  $I^2M$  and 4Pi microscopy

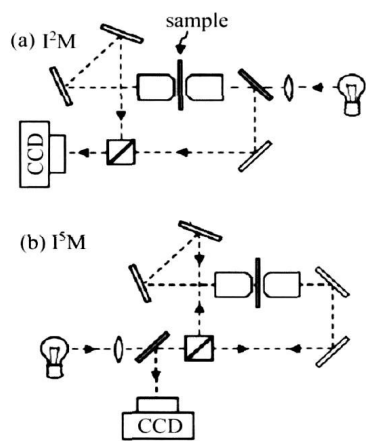


图 13  $I^2M$  与  $I^5M$  示意图

Fig. 13 Scheme of  $I^2M$  and  $I^5M$

$I^5M$  采用全场照明和 CCD 成像,图像获取速度远大于共焦扫描模式的 4Pi 共焦显微镜,如图 12 所示<sup>[22]</sup>。 $I^5M$  利用信号光的干涉成像在频域填补了 SWFM 中存在的 OTF 的频率禁带,但由于同样采用宽场驻波照明,周期出现的亮平面使 PSF 的旁瓣强度超过主瓣的 50%,致使 OTF 的边带强度不足

零频处的 1%<sup>[102]</sup>,高频信息传输能力很弱,高频信号淹没在背景噪声中,去卷积处理困难。 $I^5M$  一般使用油浸物镜,无法应用于活细胞成像,限于观测细胞较粗糙的点线固定结构<sup>[106]</sup>。

2.6.3 4Pi 共焦扫描显微镜

2.6.3.1 单光子 4Pi 共焦扫描显微镜

4Pi 是空间立体角的数值,由瑞利判据可知,增加物镜的接收角(等效增加物镜的 NA),可以减小 PSF 的尺度从而提高分辨率。4Pi 共焦扫描显微镜利用这一概念,通过样品前后的双物镜使总的接收角接近 4Pi<sup>[26, 109~111]</sup>,如图 14<sup>[24]</sup>所示。4Pi 显微镜采用激光聚焦照明样品,共焦扫描采集荧光信号。与普通 CSFM 相比,接收角的增加将纵向分辨率提高了 5~7 倍<sup>[112, 113]</sup>。在频域分析<sup>[114]</sup>,总立体角接近 4Pi 的准球面波可以分解为一组完备的平面波集合,相对传播的各空间频率的平面波互相干涉从而获取高频空间信息。相比之下,SWFM 仅存在零频, $I^5M$  只有一部分空间频率干涉<sup>[108]</sup>,如图 12 所示<sup>[22]</sup>。4Pi 显微镜的 OTF 不存在频率禁带,且边带

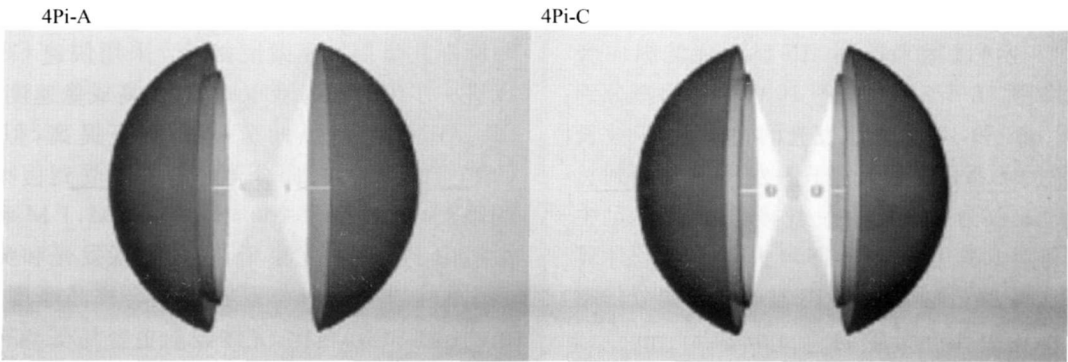


图 14 4Pi-A 与 4Pi-C 示意图  
Fig. 14 Principle of 4Pi-A and 4Pi-C

有较大的数值, 高频传输能力强, 易于去卷积处理<sup>[21, 23]</sup>。按照照明光路和探测光路的不同, 4Pi 显微镜细分为 A, B, C 三种类型<sup>[109]</sup>, A 型为仅激发光干涉照明, B 型仅荧光信号干涉成像, C 型结合了 A 型与 B 型(类似于  $I^3M$ ,  $I^2M$  和  $I^5M$  之间的关系), 在照明和探测光路同时利用干涉, 在三种类型中具有最高的分辨能力。

A 型 4Pi 显微镜的纵向旁瓣约为主瓣的 40%~45%, 实验中甚至达到 70% 以上<sup>[109]</sup>。在探测器前加小孔滤波器<sup>[31]</sup>, 在照明光路中放置 Toraldo 滤波器<sup>[115]</sup>等方法可以抑制旁瓣。如图 15 所示<sup>[21]</sup>, 结合 3 点去卷积(Three-point Deconvolution)修复图像, 纵向分辨率达 150 nm。提高物镜的数值孔径可以非常有效地降低旁瓣强度, 最近在 A 型 4Pi 显微镜中采用超高数值孔径的油浸物镜(接收半角  $74^\circ$ , 普通油浸物镜接收半角为  $68^\circ$ ), 对哺乳动物细胞的微管结构和高尔基氏体的观测中, 纵向分辨率达 95

~110 nm, 经过图像修复, 可以进一步提高到 70~100 nm<sup>[116, 117]</sup>。C 型 4Pi 显微镜在成像光路上也引入干涉, 激发光与信号荧光波长不同(荧光波长红移)造成的纵向光场分布函数次级大错位减小了旁瓣强度<sup>[109, 113]</sup>。C 型要求同时控制激发光和信号光的光路满足干涉条件, 难度大, 因此虽然 A 型分辨率不及 C 型, 由于实验要求较低成为 4Pi 显微镜较常用的一种。

2. 6. 3. 2 双光子 4Pi 共焦扫描显微镜

4Pi 共焦扫描显微镜采用双光子激发可以有效地抑制旁瓣<sup>[31, 98, 111, 118, 119]</sup>。在 A 型 4Pi 显微镜中, 双光子激发波长约为荧光信号波长的两倍, 使激发光 PSF 的旁瓣远离主瓣, 同时双光子激发良好的局域性有助于降低纵向旁瓣的强度<sup>[31, 119]</sup>。采用 760~950 nm 的激发光, A 型 4Pi 显微镜纵向分辨率达 130~160 nm, 相对于 CSFM 提高 3 倍, 经过非线性数学图像修复处理<sup>[120]</sup>, 可进一步提高至 90~100 nm, 横向分辨率约为 120~140 nm。在对老鼠纤维细胞的观测中, 三维分辨率在 100~110nm 之间<sup>[98]</sup>。

在 C 型 4Pi 显微镜中采用双光子激发, 荧光探测 PSF 的纵向旁瓣位于激发光 PSF 的第一零点的范围内, 如图 12 所示<sup>[22]</sup>。双光子激发比单光子激发时纵向旁瓣强度明显减弱, 与前面几种 4Pi 显微镜相比, 双光子激发的 C 型 4Pi 显微镜具有最强的纵向旁瓣抑制效果, 且 OTF 接近各向同性。此时旁瓣强度仅为主瓣的 25%, 可以通过线性去卷积和非线性图像恢复有效去除<sup>[21, 120]</sup>。较小的纵向旁瓣放宽了对物镜数值孔径的要求, 允许采用水浸物镜, 使 4Pi 显微镜具有在水溶液环境中观测活细胞的能力, 在对活酵母细胞中的线粒体网状结构观测中纵向分辨率提高 7 倍, 达 80 nm<sup>[118]</sup>

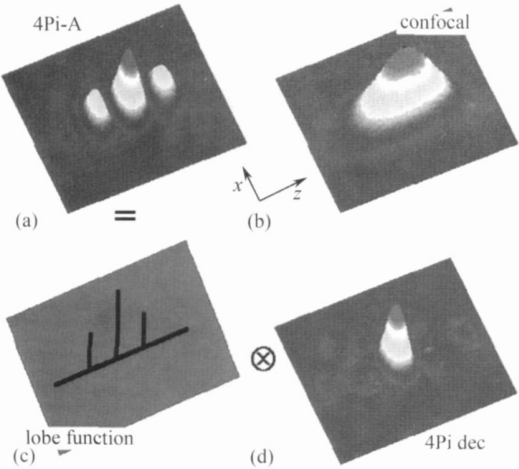


图 15 4Pi 显微镜中三点去卷积示意图  
Fig. 15 Schematic of three-point deconvolution  
in 4Pi microscopy

### 2.6.3.3 双色双光子 4Pi 共焦扫描显微镜

2C2P<sup>[82]</sup> 也可以用来抑制 4Pi 显微镜的纵向旁瓣, 其原理如图 16 所示<sup>[121]</sup>。图 16 中上两幅图分别为波长 800 nm 和 400 nm 激发光的 PSF, 由于波长之间是两倍的关系, 双色双光子激发叠加后得到总的激发光 PSF 仅为中心处的一点, 旁瓣强度不足主瓣的 5%, 利用共焦点探测器即可去除。通过计算 A 型 2C2P-4Pi 和 C 型 2C2P-4Pi 显微镜横向分辨率为 97 nm, 纵向分辨率分别为 77 nm 和 57 nm<sup>[121]</sup>。但由于采用双色光激发样品, 色散现象使折射率失配引起的激发光波前相位移动相对于 1C2P 更加复杂<sup>[122]</sup>, 增加了实验的难度。

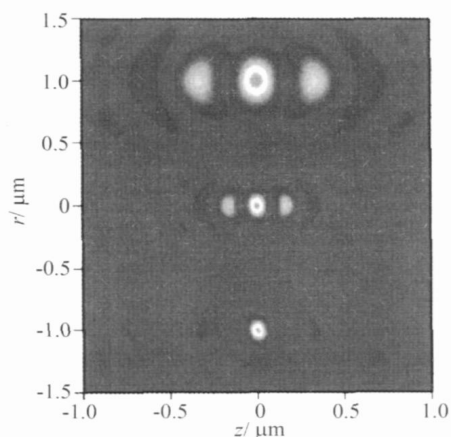


图 16 双色双光子激发抑制激发光 PSF 旁瓣原理

Fig. 16 Principle of suppression of side lobe by 2C2P fluorescence excitation

### 2.6.3.4 多焦点多光子 4Pi 显微镜

在活细胞探测过程中, 除了需要高分辨率, 快速获取图像的能力也是非常重要的。采用共焦扫描模式的显微镜都是逐点扫描样品重构获得整幅图像, 成像速度缓慢, 并且成像速度随分辨率的提高而下降。这是因为分辨率提高导致 PSF 尺度减小, 相同体积 (面积) 下样品需要扫描的单点个数和单点图像获取时间增加。多焦点多光子显微镜 (Multifocal Multiphoton Microscopy, MMM) 最早提出是为了提高多光子扫描显微镜成像速度<sup>[123]</sup>, 也适用于 4Pi 共焦扫描显微镜<sup>[124, 125]</sup>。多焦点多光子 4Pi 显微镜 (Multifocal Multiphoton 4Pi Microscopy, MMM-4Pi) 采用微透镜装置将一束激光分为若干束, 一次获得多点信息, 扫描获得全场图像, 大大缩短了整幅图像获取的时间。文献<sup>[125]</sup>报道了 MMM-4Pi 对哺乳动物活细胞中高尔基体的三维分辨率在非线性图像还原后可达 100 nm。以 16 焦点双光子激

发, 每一幅图像获取时间约 2s 计算, 图像获取速度与标准共焦扫描显微镜相当。采用快速 CCD, 还可以进一步缩短图像获取时间, 提高成像速度。

4Pi 显微镜纵向分辨率显著提高, 但类似于 CSFM 的情形, 横向分辨率的提高受到信噪比下降的限制, 一般仅为 200 nm。SWFM, I<sup>5</sup>M 和 4Pi 显微镜由于采用双光束干涉照明, 激发光和荧光在样品中的总光程等于样品折射率与样品厚度之积, 与单物镜 CSFM 相比, 光波波前更容易受到折射率失配和折射率不均匀分布的影响, 使焦点 (焦平面) 位置产生偏差、形状畸变等。因此这类显微镜要求样品透明度较好, 同时也限制了样品的厚度, 一般在几微米至几十微米之间<sup>[106]</sup>。

## 2.7 利用非线性效应突破 Abbe 分辨率限制

以上介绍的诸多超分辨技术相对于宽场光学显微镜分辨率都有不同程度的提高, 但是它们的分辨率仍然依赖于波长, 受到 Abbe 分辨率极限的限制。从根本上讲这是因为 Abbe 的理论是建立在线性光学的基础上, 线性的超分辨技术不可能真正突破它, 只有利用非线性效应才能真正打破 Abbe 分辨率极限。例如 2.5.3 一节介绍的 SSIM (SPEM) 就是利用第一激发态饱和时荧光发射光强与激发光光强的非线性关系, 不受 Abbe 理论的约束。

### 2.7.1 受激发射损耗显微镜

1994 年, S. W. Hell 等<sup>[126]</sup>提出受激发射损耗 (Stimulated Emission Depletion, STED) 显微术, 其核心思想是利用受激辐射选择性消耗 PSF 边缘区域的激发态荧光分子从而压缩 PSF 尺度。具体过程如下: 如图 17(a) 所示<sup>[30]</sup>, 首先采用一束超短脉冲激光将爱里斑区域内的荧光分子激发至第一激发态的上能级  $S_1^*$ , 电子很快通过振动弛豫至第一激发态的最低振动态  $S_1$ , 接下来一束红移的圆环型 STED 光 (见图 17(b)) 将爱里斑边缘处于激发态的荧光分子消激发至基态的上能级  $S_0^*$ , 振动弛豫回到  $S_0$ 。爱因斯坦的受激发射辐射理论指出受激发射和受激吸收系数是相等的<sup>[127]</sup>, STED 光对荧光分子产生的  $S_0^* \rightarrow S_1$  受激吸收过程和  $S_1 \rightarrow S_0^*$  受激发射过程是等概率的。幸运的是振动弛豫速率为  $10^{11} \sim 10^{13} \text{ s}^{-1}$ , 荧光发射速率约为  $10^9 \text{ s}^{-1}$ , 换言之,  $S_0^*$  能级寿命比在  $S_1$  短得多, 处于  $S_0^*$  能级的电子迅速耗尽, 避免了被消激发回到  $S_0^*$  能级的电子的二次激发, 因此  $S_1 \rightarrow S_0^*$  的受激发射过程占绝对的优势。如图 18 所示<sup>[128]</sup>, 爱里斑区域内仅没有被 STED 光照射的中心处的荧光分子可以正常发射荧

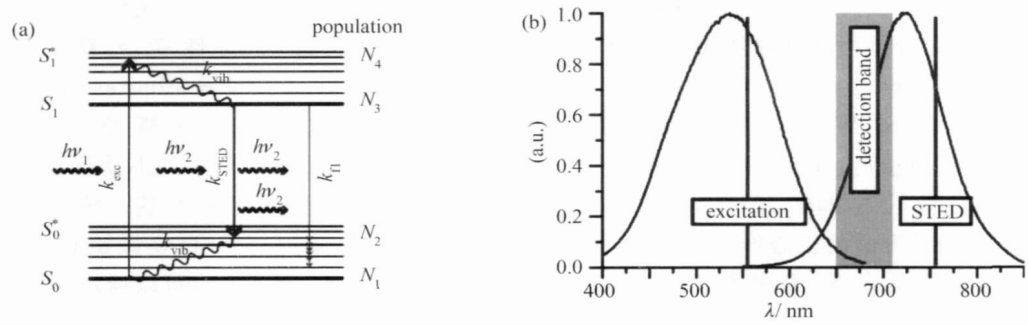


图 17 (a) 受激辐射过程 (b)STED 光谱示意图

Fig. 17 (a) Stimulated emission process; (b) STED spectrum

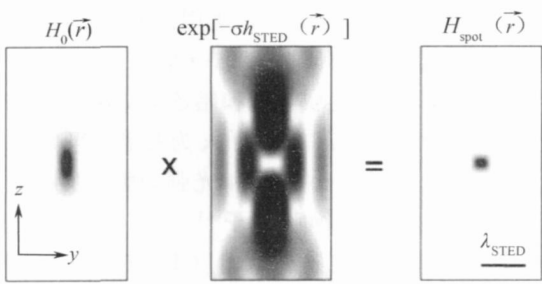


图 18 三维 STED 光压缩 PSF 尺度

Fig. 18 3D STED beam squeezes PSF

光, PSF 的尺度被大大压缩。

在方波 STED 光近似下, 设荧光受激发射截面为  $\sigma$ , STED 脉冲光场分布函数为  $h_{\text{STED}}$ , 第一激发态最低能级电子布居数  $N_3$  正比于  $\exp(-\sigma h_{\text{STED}})^{[30]}$ , 可见荧光态电子被消激发的效率与 STED 光强是非线性关系, 具有饱和的特征, 这正是 STED 显微镜突破 Abbe 分辨率极限的关键所在。在采用正弦光强分布的激发光和余弦光强分布的 STED 光情况下, 一维分辨率表达式为<sup>[129]</sup>:

$$\Delta x = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + I_{\max} / I_{\text{sat}}}}, \tag{4}$$

式中  $n \sin \alpha$  为物镜数值孔径,  $I_{\max}$  为 STED 光光强极大值,  $I_{\text{sat}}$  为荧光分子饱和和激发光强, 二者之比定义为饱和因子  $\zeta$ 。关于 STED 光与荧光分子特性以及分辨率之间的关系的详细数学计算可以参考文献 [130 ~ 132]。非常有趣的是虽然激发光和 STED 光都是衍射受限的, 但分辨率却与波长无关, 只要光强允许无限增加, 分辨率没有极限<sup>[28, 128]</sup>。文献 [133] 中讨论了多种形状的 STED 光对分辨率的影响, 常用的圆环形 STED 光可通过一个中心和边沿相位相差  $\pi$  的同心相位盘实现, 横向分辨率和纵向分辨率分别提高了 2 倍和 6 倍<sup>[134]</sup>。STED 光也可以采用两条平行亮纹, 在一维方向上压缩爱里斑, 焦

平面处一维分辨率可达 16 nm, 仅为  $\lambda/45$ <sup>[129]</sup>。STED 显微镜结合 4Pi 技术可以改善纵向分辨率, 达 33 ~ 60 nm<sup>[30, 135]</sup>。相位滤波器可以提高 STED-4Pi 显微镜 OTF 的高频透过程, 可分辨纵向相距 76 nm 的物体<sup>[136]</sup>。

STED 显微镜凭借其超高分辨能力很快在生物细胞研究方面取得一系列新的重要发现。例如: 在对突触传递 (Synaptic Transmission) 过程的研究中, STED 显微镜分辨出直径仅 40 nm 的突触囊泡, 并发现突触囊泡膜蛋白 I (Synaptotagmin I) 在突触囊泡胞吐 (Endocytosis) 后保持独立团簇状态的现象<sup>[137]</sup>。对果蝇神经肌肉突触激活区的观察发现蛋白 Bruchpilot 环状的超精细结构<sup>[138]</sup>。对哺乳动物细胞核内蛋白 SC35 的斑状结构分辨率达 20 nm, 识别细胞核内直径 25 ~ 40 nm 的突触囊泡膜蛋白 I, 对人类神经母细胞瘤 (neuroblastoma) 的神经丝可以分辨 30 nm 以下的细节<sup>[139]</sup>。利用 STED 显微镜对哺乳动物细胞内细胞膜观察到 SNARE 蛋白 SNAP-25 的纳米排列结构, 第一次揭示了 SNAP-25 以小于 60 nm 团簇排列的现象<sup>[140]</sup>。

在 STED 显微镜成像过程中, 为了获得最佳的损耗效果, 需要依据荧光分子的能级特性, 严格控制激发光和 STED 光的脉宽以及相互之间的时间间隔。2007 年 S. W. Hell 和他的小组实验证明了连续 STED 光的可行性<sup>[141]</sup>, 大大简化了装置, 降低了实验难度, 提高了 STED 显微镜的实用价值。STED 显微镜的饱和光强一般约为 100 MW/cm<sup>2</sup>, 为了得到较高的饱和因子,  $I_{\max}$  往往高达吉瓦每平方厘米以上<sup>[129, 133, 140]</sup>, 这不仅提高了对激光器的要求, 还加重了荧光分子光漂白和光损伤<sup>[142, 143]</sup>。由式(4)可知 STED 显微镜分辨率直接依赖于饱和因子  $\zeta$ , 如果能够减小饱和光强  $I_{\text{sat}}$ , 就可以相应地减小  $I_{\text{STED}}$ 。已知  $I_{\text{sat}}$  与荧光分子的寿命  $\tau_1$  和荧光受

激发射截面  $\sigma$  成反比<sup>[28]</sup>, 采用荧光寿命更长和受激发射截面更大的荧光分子可以有效降低  $I_{\text{STED}}$ 。

### 2.7.2 基态损耗显微镜

差不多同一时期, S. W. Hell 等<sup>[144]</sup> 提出基态损耗 (Ground State Depletion, GSD) 显微镜。GSD 与 STED 的基本思想一致, 如图 19 所示<sup>[145]</sup>。不同之处在于 GSD 利用长寿命的三态作为亚稳态, 相对于第一激发态最低振动态  $S_1$  寿命大大增加, 因此 GSD 显微镜最显著的优点是 GSD 光强相对于 STED 光强下降了 100 倍。

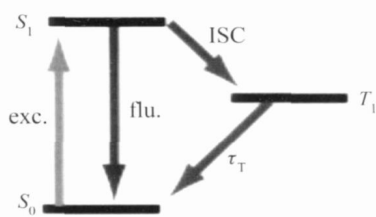


图 19 GSD 显微镜利用三态作为亚稳态

Fig. 19 GSD microscopy takes advantage of triple state as metastable state

GSD 光和激发光 (探针光) 的时间顺序与 STED 相反: 首先采用一束连续环形 GSD 光饱和激发荧光分子, 耗尽基态的电子使它们最终布居于长寿命的三态上, 接下来用一束波长相同的脉冲探针光激发样品, 只有没被 GSD 光耗尽基态电子的中心区域的荧光分子可以被正常激发和发射荧光, 从而压缩 PSF 尺度。GSD 显微镜分辨率只取决于基态损耗饱和程度, 类似于 STED 显微镜, 同样不受衍射限制, 分辨率公式与 STED 显微镜相同。亚稳态寿命长达  $10^3 \sim 10^6$  ns, 高于荧光寿命 3~6 个数量级, GSD 饱和光仅  $10^2$  kW, 有效缓解了光漂白和光损伤的现象。使用  $350 \text{ kW/cm}^2$  的 GSD 光, 饱和因子为 35, 在对 Atto532 染色的人类肾细胞微管的成像中, 分辨率达  $50 \sim 80 \text{ nm}$ <sup>[145]</sup>。

引入亚稳态一方面有效降低了损耗光的饱和光强, 另一方面却增加了单点记录所用的时间。采用结构光照明全场记录的方式<sup>[89, 91]</sup>, 有望缩短记录时间。GSD 显微镜中由于采用先损耗后激发探测的方式, 亚稳态布居的电子有一定的概率跃迁至基态参与激发和发射荧光, 导致饱和度下降, 破坏了 PSF 的形状, 造成边沿的增宽, 是实际应用中分辨率劣于计算值的主要原因<sup>[145]</sup>。

### 2.7.3 可逆饱和线性荧光跃迁显微镜

S. W. Hell 等<sup>[146~148]</sup> 抓住 STED 和 GSD 显微镜的核心原理, 将这种利用荧光分子荧光态 (亮态)

与非荧光态 (暗态) 之间的转化结合饱和和激发的方法归纳为可逆饱和线性荧光跃迁 (Reversible Saturable Optical Linear Fluorescence Transitions RESOLFT), 并将这一概念进一步拓宽。RESOLFT 显微镜分辨率都不受远场衍射的限制, 由饱和因子决定, 具有式 (4) 这一统一的分辨率表达式。STED 显微镜与 GSD 显微镜利用电子态的转化, 是物理过程, 事实上也可以通过化学过程改变荧光分子的结构得到亮态和暗态, 同样可以实现 RESOLTF 两态转化的机制。

化学机制下的 RESOLFT 通过可逆光开关 (Reversible Photoswitch), 即使用波长不同的恢复光 (暗态  $\rightarrow$  亮态) 和关闭光 (亮态  $\rightarrow$  暗态) 照射探针分子获得异构态分别作为亮态和暗态, 实现两态间的转化<sup>[146, 147]</sup>。此时暗态寿命可人为控制, 当暗态寿命无穷大时对应无穷小的饱和光强, 因此在超低光强下就能获得极高的饱和因子<sup>[149, 150]</sup>。光开关机制可以通过光敏荧光蛋白 (Photo-activatable Fluorescent Protein) 实现, 如 asFP595<sup>[151]</sup> 和 DRONPA<sup>[152, 153]</sup>。最初的实验采用 asFP595 作为标记分子, 蓝光作为闭合光, 黄光同时作为激发光和恢复光。饱和光强仅  $10 \text{ W/cm}^2$ , 闭合光和激发光 (恢复光) 光强在  $10^2 \text{ W/cm}^2$  下焦平面处对微管样品的分辨率达  $50 \sim 100 \text{ nm}$ <sup>[154]</sup>。类似的分辨率也可以通过使用具有光诱导 (Photoinduced) 性质的荧光有机分子和染料分子作为探针获得<sup>[155~157]</sup>。

RESOLFT 显微镜借助于长寿命的化学态在超低功率下突破了 Abbe 分辨率极限, 但较长的暗态时间却增加了单点图像获取时间。结合 MMM 同时扫描多点通过照相机或 CCD 读取信号可有效缩短成像时间<sup>[155, 156]</sup>。由于所有的 RESOLFT 显微镜的成像原理都是使被测对象处于亮态, 其他分子处于暗态获取单点信息, 每扫描一个点, 照明区域内所有的荧光分子都需要经历一次两态间的循环。分辨率越高, 扫描点数越多, 要求荧光分子循环的次数就越多。事实上, 荧光分子的循环周期是有限的, 在循环一定次数之后, 荧光分子被漂白, 从而限制了 RESOLFT 显微镜的分辨率<sup>[147, 157]</sup>。

## 2.8 荧光共振能量转移显微镜

在荧光光学显微镜成像过程中, 特别值得注意的一点是构成图像的信号并非直接来自于样品, 而是来自于标记在样品上的荧光分子。因此荧光显微镜成像不仅包括普通光学显微镜的折射、散射等光学现象, 还包含了光与荧光分子, 荧光分子之间的相

互作用, 这些过程伴随着丰富的物理现象<sup>[158]</sup>, 为突破 Abbe 衍射极限提供了一些全新的思路。

荧光共振能量转移 (Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)显微镜就是上述思路的一种体现, FRET 是两个荧光分子相互接近时, 通过长程的偶极-偶极相互作用, 以非辐射的方式转移能量的过程<sup>[159, 160]</sup> (见图 20(a))。FRET 速率与两分子间距的六次方成反比<sup>[161, 162]</sup>, Förster 半径  $R_0$  一般为 1~10 nm, 在此范围内具有极高的效率和灵敏度。图 20 中给出了最一般的 FRET 效率  $E$  的定义式, 除了距离, 也可以通过其他物理量表征, 如

$$E = 1 - \frac{I_{D+A}}{I_{D-A}}, \tag{5a}$$

$$E = 1 - \frac{\tau_{D+A}}{\tau_{D-A}}, \tag{5b}$$

式中  $I_{D+A}$ ,  $I_{D-A}$ ,  $\tau_{D+A}$ ,  $\tau_{D-A}$  分别表示受体存在与不存在时供体的荧光强度和荧光寿命。图 21 描述了 FRET 显微术通过测量 FRET 过程中供体(Donor)和受体(Acceptor)光学特性的变化获取被标记的蛋白质分子之间或者蛋白质分子内部高精度的空间信息的原理示意图<sup>[29, 159, 160]</sup>。影响 FRET 效率的因素可大致归纳为三点<sup>[160, 163, 164]</sup>:

1) 供体的发射光谱和受体的吸收光谱交叠 ( $> 30\%$ ), 供体可受激发射荧光;

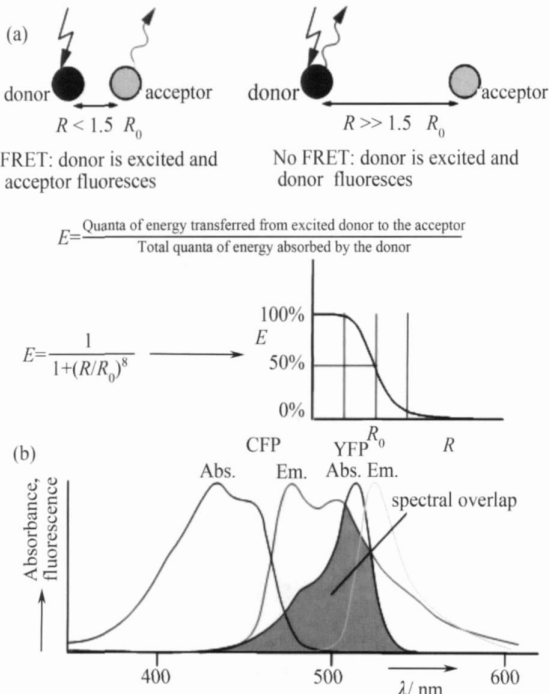


图 20 (a) FRET 原理 ; (b) FRET 光谱示意图

Fig. 20 (a) Principle of FRET and (b) FRET spectrum  
?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

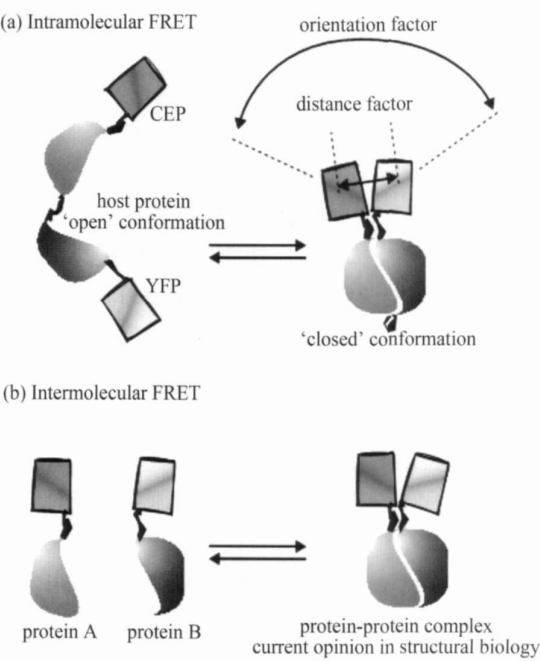


图 21 (a) 分子内和(b) 分子间 FRET

Fig. 21 (a) Intramolecular and (b) intermolecular FRET

- 2) 供体与受体的距离不能太远, 小于  $1.5R_0$  ;
- 3) 供体与受体跃迁矩的取向不正交。

2. 8.1 基于光强测量的 FRET 显微镜

当 FRET 发生时, 最一般的特点是供体的荧光发射强度减小, 受体的荧光发射强度增大<sup>[165]</sup>, 因此 FRET 显微术最常用的是通过测量受体荧光强度变化, 依据式 (5a) 计算获得 FRET 效率的空间分布<sup>[165, 166]</sup>, 从而获取被标记样品的空间信息。FRET 显微镜可采用的激发模式有宽场、共焦以及双光子激发等<sup>[167]</sup>, 优缺点前文已介绍, 这里不再赘述。测量荧光强度变化是最直接反应 FRET 效率的一种方式, 但光强信号容易受到标记分子的浓度和分布、自荧光发射、探测器噪声以及光漂白等诸多因素的影响。另外, 由图 20(b) 所示<sup>[159]</sup>, 供体激发光谱与受体激发光谱的重叠, 供体发射光谱与受体发射光谱重叠, 二者统称为光谱串扰 (Spectral Bleedthrough, SBT), 严重降低了信噪比。较简单的处理方式包括采用窄带宽的滤波器并增加曝光时间; 选择供体荧光激发效率最大同时受体激发效率最低的激发光波长, 但都无法彻底消除 SBT 的影响。采用滤镜组双通道分别获取供体和受体发射光强和光谱, 通过复杂的计算可以更有效地消除 SBT, 对于宽场、共焦以及双光子激发模式, 已经分别发展出对应的数据处理方法消除 SBT 的影响<sup>[165, 167, 168]</sup>, 使测量结果能够更接近真实的 FRET



情况。

### 2.8.2 基于荧光寿命测量的 FRET 显微镜

在 FRET 发生时,除了荧光光强发生变化外,供体的荧光寿命也会改变。利用荧光寿命显微镜 (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM)<sup>[169~171]</sup> 观测 FRET 过程,可以获取极高的空间和时间分辨能力,适合捕捉活细胞中的动态过程<sup>[172~175]</sup>。在基于荧光强度测量 FRET 时,荧光分子浓度增加与 FRET 效率降低所带来的供体荧光光强增强是无法区分的。这一情况在 FRET-FLIM 中得到有效改善,因为荧光寿命是一种荧光分子的内禀属性,在浓度不太大的情况下,荧光寿命不受浓度变化影响<sup>[175]</sup>。测量发生 FRET 前后的供体荧光寿命  $\tau_{D+A}$  和  $\tau_{D-A}$ ,由式(5b)计算得到 FRET 效率。或采用双指数模型拟合荧光衰减曲线,获得发生 FRET 与未发生 FRET 的荧光分子的比例<sup>[171]</sup>。利用荧光寿命的唯一性还可以去除非供体荧光信号从而提高 FRET 效率的精确度。另外 FRET-FLIM 只测量供体的荧光寿命,不涉及受体,较少受到 SBT 影响,无需进行 SBT 修正,简化了实验和数据处理过程<sup>[175, 176]</sup>。

FRET-FLIM 实现方式有时域法和频域法两类<sup>[175, 177]</sup>。时域法采用短于皮秒的脉冲激发供体荧光分子,测量荧光寿命有多种方式,主要有时间相关单光子计数法 (Time Correlated Single Photon Counting, TCSPC)<sup>[178]</sup> 和多时域测量法 (Multiple Time-gating Method)<sup>[179, 180]</sup> 等,前者具有皮秒级的高时间分辨率,后者具有快速获取图像的能力。频域法采用调制光源(一般是正弦光强分布)照明,由于荧光寿命的存在会使发射光相对于激发光产生相位移动以及调制深度变化,通过测量它们就可以计算获得荧光寿命<sup>[177]</sup>。

### 2.8.3 基于其他物理量测量的 FRET 显微镜

事实上除了以上介绍的通过测量荧光光强和荧光寿命获得 FRET 效率外,也可以通过测量荧光分子其他光学特性的变化,如极化率、受体光漂白等。文献<sup>[181]</sup> 列举的 FRET 测量方式达 22 种之多,除了已介绍的两类,常用的还有受体光漂白成像<sup>[182, 183]</sup>,光谱成像<sup>[184, 185]</sup>,荧光极化成像<sup>[186, 187]</sup> 等,它们具有各自的用途和特点,单 FRET 局域化作用决定了它们都可以达到纳米级的分辨率。FRET 在生物活细胞研究领域已经获得广泛的应用,例如测量细胞内钙离子浓度<sup>[129, 188]</sup>,研究蛋白质-蛋白质相互作用<sup>[189~191]</sup>,蛋白质分子内部构造变化<sup>[192~194]</sup> 等。

许多新型荧光分子的出现加速了 FRET 显微术的发展,获取光谱匹配好、高激发效率和高量子产率的荧光分子是 FRET 显微术发展的关键。CFP 和 YFP 因其光谱重叠面积较大, FRET 效率高,是目前最好的 FRET 探针对,但另一方面也带来较严重的串扰。一些高激发系数和量子产率的荧光分子的出现缓解了上述问题,例如优化的 CFP: mCerulean<sup>[195]</sup> 和 SCFP3A<sup>[196]</sup>,优化的 YFP: mCitrine<sup>[197]</sup>, SYFP2<sup>[196]</sup> 和 mVenus<sup>[198]</sup>。

值得注意的一点是 FRET 显微术中获取的图像反映的空间信息是一个相对距离(以 Förster 半径  $R_0$  为标度),往往没有准确的数值。FRET 作用的局域性也将测量范围限定在 1~10 nm 范围内<sup>[181]</sup>。

## 2.9 单分子显微镜

### 2.9.1 单分子显微术的早期发展

Abbe 理论指出在远场无法分辨相距  $\lambda/2n$  的两个荧光分子所成的像,但并没有限制单个荧光分子“位置”可以达到的精度,如果在  $\lambda/2n$  内仅有一个荧光分子发光,光学显微镜可以获得极高的定位精度,如 1.5 nm<sup>[199]</sup>。将单个荧光分子发射的大量光子所形成的 PSF 用高斯函数拟合,以高斯函数的中心作为荧光分子的位置,这一过程被称作 PSF 的数字化。忽略探测器像素有限尺寸和背景噪声的影响,单分子的定位精度与发射光子数的关系为<sup>[200, 201]</sup>:

$$\sigma_{xy} \approx \frac{s}{\sqrt{N}}, \quad (6)$$

式中  $\sigma_{xy}$  为定位误差,  $s$  为模拟 PSF 高斯函数的标准差,  $N$  为收集的光子数。荧光波长 500 nm 对应的  $s$  约为 200 nm, 荧光分子漂白前发射  $10^4$  个光子,精确度达 2 nm。

单分子显微镜以单个分子或几个单分子为研究对象,相对于其他光学显微镜分辨率的概念,单分子定位精确度和可分辨的两个单分子间距更适合用来描述这类显微镜的性能。为了减弱布朗运动的影响,早期的单分子研究都是在低温下进行的<sup>[202, 203]</sup>,随着单分子的捕捉和固定技术的应用<sup>[204, 205]</sup>,室温下的单分子研究蓬勃发展<sup>[206, 207]</sup>,对 DNA, RNA, 酶的研究已被广泛地报道<sup>[208~212]</sup>。利用单分子 Cy3 标记肌球蛋白结合 PSF 数字化,观察到肌球蛋白几十纳米的步进距离,精度达 1.5 nm<sup>[199]</sup>,揭示了肌球蛋白 hand-over-hand 的运动方式(相应的方法被称为 Fluorescence Imaging with 1-nm Accuracy, FIONA)。单分子显微术的精度非常高,但一个爱里斑中只允许标记一个分子,高定位精度并没有转

化为高分辨率,只适用于单个分子行为的研究。

2.9.2 几种区分一个爱里斑中多个荧光分子的方法

为了克服一个爱里斑中只允许标记一个分子的限制,有人提出利用不同发射波长的荧光分子同时标记,利用光谱特性分离各类荧光分子的信息<sup>[213]</sup>。例如同时使用 Cy3 和 Cy5 荧光分子标记肌球蛋白,可获得 10 nm 距离的测量精度,这一方法被称为 Single-molecule High-resolution Colocalization (SHREC) of Fluorescent Probes<sup>[214,215]</sup>。但要保证每个衍射限制区域(Diffraction Limitation Region, DLR)内各种荧光分子有且只有一个是非常困难的,而且在室温下也不可能在一个 DLR 范围内标记过多种类的荧光分子,另外色散的存在也增加了实验的复杂性。

将单分子显微术的高定位精度转化为高分辨率的关键在于如何在一个 DLR 内区分多个荧光分子,荧光分子漂白的现象为增加荧光分子的密度提供了一种途径。它的思想是在一个 DLR 内将多个荧光分子逐个漂白。如图 22 所示<sup>[216]</sup>,通过每次漂白事件发生前后光场统计分布的变化计算出该次漂白分子的准确位置。利用 Cy3 标记可以分辨相距 10 nm 的两个荧光分子,精度达 2.5 nm(相应的方法被称为 Nanometer-located Multiple Single-molecule NALMS)<sup>[216]</sup>,类似地有人提出(Single-molecule High-resolution Imaging with Photobleaching, SHRImp)<sup>[217]</sup>,证明了相似的分辨能力和精度。

这一思想也可以利用荧光半导体量子点的光闪烁现象实现<sup>[218]</sup>,但是随着一个 DLR 内荧光分子密

度增加,计算精度的要求逐步提高,当接近单分子所能达到的极限时,这种方法就失效了。目前这种方法所允许的标记浓度仅为 2~5 个/DLR<sup>[219]</sup>,对分辨率的提高有限,仅适合大分子中简单结构的研究<sup>[217]</sup>。

2.9.3 区分一个爱里斑内高密度标记的荧光分子的方法

2.9.3.1 PALM (Photoactivated Localization Microscopy)

PALM<sup>[219~222]</sup>采用与上述几种方法相反的途径,使一个 DLR 内的荧光分子逐个激活发光,允许  $10^4\sim10^5/\mu\text{m}^2$  高密度的标记。PALM 入选 2006 年《Science》十大进展,其核心思想为“one molecule at a time”。为了实现这一思想,Bietzig 等<sup>[219,220]</sup>采用光敏荧光蛋白作为探针标记样品,以波长 405 nm 的紫外脉冲光为激活光来敏化荧光蛋白,再用波长 561 nm 的连续光激发荧光,此时只有被敏化的荧光分子可以被激发发射荧光,其他荧光分子均处于非荧光态。采用超低光强的激活光( $\text{mW}/\text{cm}^2$ )使每次只有极少数的光敏蛋白质被敏化,因此只有极少数的光敏蛋白被激发发射荧光,从而实现“one molecule at a time”。记录单个荧光分子的光子直至漂白并通过 PSF 数字化计算出中心位置,如图 23 所示<sup>[219]</sup>,反复这一过程逐个获取数微米尺度范围

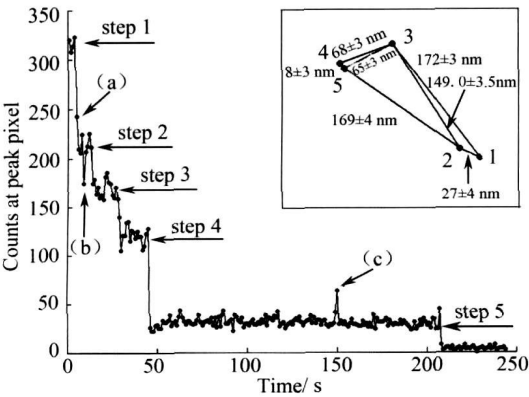


图 22 一个DLR 内 5 个荧光分子逐个漂白, 光强逐步变化, 通过漂白前后光强的变化计算得到上一个漂白分子的位置

Fig. 22 Five fluorescent molecules in a DLR bleached one by one and their positions are determined through variation of light intensity and distribution

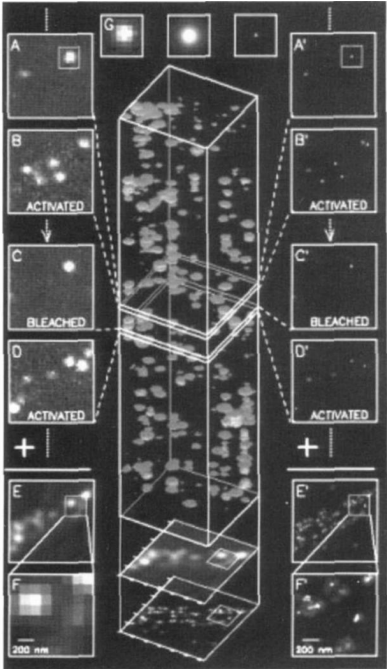


图 23 PALM 计算每个分子的位置叠加得到整幅图像  
Fig. 23 PALM determines one molecule's position at a time to reconstruct an overall image

内所有荧光分子的中心位置,最后叠加重构成一幅完整的图像。PALM 对 100 nm 厚的溶酶体和线粒体薄片样品的二维成像达到 2 ~ 25 nm 的单分子定位精度,其典型的单帧图像获取时间为 0.5 ~ 1 s,这样获取一幅含有  $10^4 \sim 10^5$  个荧光分子的完整图像需要 2 ~ 12 h,而细胞内活体成像需要 100 ~ 1000 frame/s 的速度,因此 PALM 暂时只能用于固定结构<sup>[220, 221]</sup>。

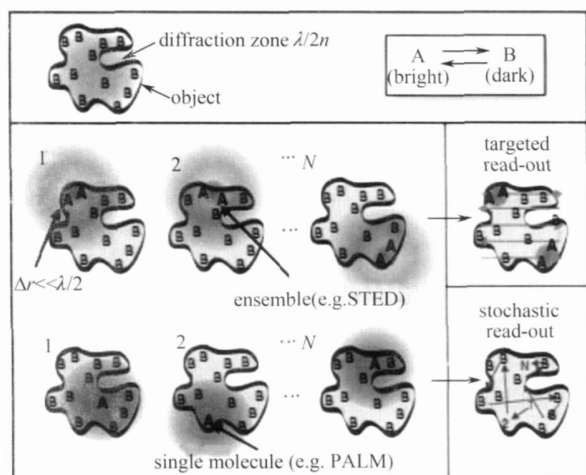


图 24 PALM 与 RESOLFT 显微镜成像过程对比

Fig. 24 Comparison of imaging processes between PALM and RESOLFT microscopies

PALM 与 RESOLFT 显微镜具有一定的相似性,如图 24 所示<sup>[146]</sup>。它们都是选择性激发荧光分子,不同之处在于前者是随机激发,荧光分子每次循环产生的光子都作为信号被收集,因此 PALM 对荧光分子发射光子能力的利用更充分。许多光敏蛋白,如:KAED, FP-GFP, DRONPA 都适用于实现 PALM 机制<sup>[223 ~ 226]</sup>。由式(6)可知采用发射荧光光子能力强的荧光分子(即增大式(6)中的  $N$  值)可以提高定位精度,但发射光子数量的增加可能导致单幅图像获取时间的延长。

为了缩短成像时间,最直接的方法是降低荧光分子标记浓度,这会造成图像细节的丢失。缩短成像时间的另一途径是增加激发光强。光敏化后,对于理想的荧光分子,被抽运光激发时可由基态跃迁至激发态,随后再通过发射荧光跃迁回基态,反复这一过程直至完全被漂白。当抽运光强增加至饱和强度时,基态几乎一次性被耗尽,因此最终的图像获取时间将取决于荧光寿命。通常荧光分子的荧光寿命为纳秒量级,相应的单幅图像获取时间被缩短至毫秒量级。然而对于实际荧光分子,随着激发光光强的增大,光闪烁现象(Photo Blinking)加剧<sup>[218, 227]</sup>。

电子跃迁至寿命长达 1 s 的暗态,这不仅增加了单幅图像的获取时间,还可能成为 DLR 内下一个激活荧光分子信号的噪声。

在 DLR 内仅有一个荧光分子被激活的前提下,适当增大激活光光强使每次有较多的荧光分子被敏化能够减少单幅图像的数目。采用高受激吸收截面和高量子产率(高亮度)的荧光分子能够加速激发和漂白的过程,有效缩短单幅图像的获取时间,同时也提高了荧光信号与自荧光发射的信噪比。在 PALM 成像过程中除了敏化荧光分子发射的荧光外还存在非敏化荧光蛋白的自荧光发射产生的背景噪声,由此信噪比的数值限制了荧光分子的密度<sup>[196]</sup>。PALM 中由于单分子荧光信号十分微弱,需要高灵敏的探测器,如增强 CCD<sup>[215, 228]</sup>,并结合 TIRF 技术收集信号<sup>[219]</sup>。PALM 暂时无法对厚样品内部三维成像。

PALM 作为光学显微镜获得了与电子显微镜相近的纳米级的分辨率,然而相对于后者, PALM 样品制备和试验装置更简单和廉价,采用双色荧光分子标记 PALM 还有望进一步提高分辨率<sup>[219]</sup>。

### 2.9.3.2 STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)

STORM<sup>[229]</sup> 与 PALM 基本原理类似,都是利用荧光分子的随机逐个激发发射荧光光子,通过 PSF 数字化获得其中心位置。STORM 采用 Cy3 和 Cy5 分子组成探针对,通过二者间的相互作用控制明暗两态之间的转化,直至永久性漂白。具体过程如下:首先采用一束较强的红光使观测范围内所有的 Cy5 分子进入暗态,接着采用较弱的绿光( $\sim 1 \text{ W/cm}^2$ )抽运 Cy3 分子到激发态,通过处于激发态的 Cy3 分子与 Cy5 分子的相互作用使一小部分 Cy5 分子从暗态恢复至荧光态。此时,再次利用红光( $\sim 30 \text{ W/cm}^2$ )可以激发这一小部分 Cy5 分子发射荧光。发射荧光后的 Cy5 分子将再次暂时进入一个稳定的暗态,等待下次被激活。通过红绿激光对 Cy3-Cy5 荧光分子进行交替照明,可使 Cy5 荧光分子反复经历“激发-荧光发射-暂时漂白-恢复-再激发”的循环达数百次,直到最终被永久性漂白。由此可见, Cy5 分子单次循环类似于 PALM,将单次循环获得的光子信号利用 PSF 数字化得到中心点。不同的是单次循环后 Cy5 分子只是暂时漂白,在 Cy3 分子的作用下可以恢复进入下一次循环。多次循环得到多个中心点,最后将所有的中心点使用高斯函数拟合,以高斯函数中心点作为 Cy5 分子的位

置。所有探针分子对都经历以上过程确定它们的位置,从而实现整幅图像的重构。STORM 的定位精度依赖于单次循环荧光分子发射光子的个数,文献<sup>[229]</sup>报道了单个探针对经过 20 次循环,样品漂移校正之后, Cy5 分子中心点拟合的高斯函数半峰全宽(FWHM)约 18 nm,理论上相距 20 nm 的两个 Cy5 分子可被分辨。如图 25 所示<sup>[229]</sup>,对 dsDNA 双链标记观测中,相距 40 nm 的两个 Cy5 分子可被分辨,定位精度约 20 nm。

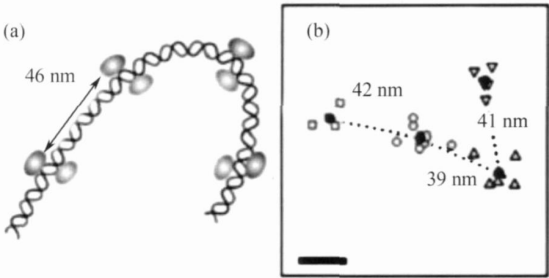


图 25 (a) 利用 Cy3-Cy5 分子对标记 dsDNA; (b) Cy5 分子多次循环后确定 PSF 中心点(标度为 20 nm)  
Fig. 25 (a) dsDNA tagged by Cy3-Cy5 pairs; (b) PSF centers determined with multiple imaging cycles (scale bars 20 nm)

STORM 在超低激发光光强下实现了 Abbe 分辨率极限的突破,利用不同频率的光分别控制荧光激发和荧光态恢复,与 PALM 相比具有更好的可控性。另外值得强调的是:STORM 采用多次测量 PSF 中心(每次测量的荧光光子数目较少),最后将所有 PSF 中心进行高斯拟合重构中心位置;而 PALM 采用的是单次测量(一次性探测所有的荧光光子)计算得到中心位置。从统计学意义上说,在荧光分子静止不动且发射荧光光子总数相同的情况下,STORM 和 PALM 两种成像方式的成像精度相同,但当成像过程中荧光分子发生微小随机漂移时,STORM 短时间常数多次测量的方式受到荧光分子随机运动的影响更小<sup>[230]</sup>。Cy3 分子与 Cy5 分子的光可控性非常适用于 STORM 机制的实现,但它们不能像自荧光蛋白一样通过基因编码入细胞,Cy3-Cy5 分子植入细胞中的方法还需要进一步探索。

3 结 论

本文概览了当前超分辨远场生物荧光成像领域的一系列新发展、新技术。成像——或者更一般地说——观测几乎是一切科学研究的出发点。纵观历史,每一次成像技术的革新都会带来一系列重大发

现,多位科学家凭借在成像领域的工作获得诺贝尔奖。W. C. Roentgen 因发现 X 射线获得 1901 年诺贝尔物理学奖;F. Zernike 发明相衬显微镜获得 1953 年诺贝尔物理学奖;E. Ruska 发明电子显微镜,G. Binning 和 H. Rohrer 发明扫描隧道显微镜共同获得 1986 年诺贝尔物理学奖以及 P. C. Lauterbur 和 P. Mansfield 因发明核磁共振成像技术共同获得 2003 年诺贝尔生理学或医学奖等。在生命科学技术和纳米技术逐步融合的今天,超分辨成像的重要性不言而喻,层出不穷的新型光学成像技术纷纷突破衍射极限,将分辨率提高至几十纳米甚至单分子量级,揭示了许多前所未见的生物微观结构和现象。尽管如此,荧光分子的光漂白、生物样品的光毒性、成像速度慢、分辨率不高、成像装置复杂昂贵等一系列问题仍然存在并阻碍着超分辨远场光学技术的进一步发展,这也为今后的科研工作者提供了广阔的研究空间。我们相信随着现有超分辨光学成像技术的不断完善,以及全新的成像机制和发光性能更优异的荧光分子的出现,超分辨远场生物荧光成像技术将会为人类揭示更加丰富多彩的生物纳米世界。

致谢 作者由衷感谢第二军医大学神经科学研究所陈宜张院士阅读全文并提出宝贵意见。感谢中国科学院上海光学精密机械研究所强场激光物理国家重点实验室周增会博士、孙海轶博士以及何飞和乔玲玲同学给予的热情帮助。

参 考 文 献

1 [http:// nano. cancer. gov/ resource\\_ center/ tech\\_ backgrounder. asp](http://nano.cancer.gov/resource_center/tech_backgrounder.asp)  
2 R. Hooke. Micrographia [ M]. London: Royal Society of London, 1664  
3 E. Abbe. Contributions to the theory of the microscope and that microscopic perception [ J]. Arch. Microsc. Anat., 1873, 9: 413~468 (in German)  
4 D. Attwood. New opportunities at soft-X-ray wavelengths [ J]. Phys. Today, 1992, 45(8): 24~31  
5 M. V. Matz A. F. Fradkov, Y. A. Labas et al., Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species [ J]. Nat. Biotechnol., 1999, 17(10): 969~973  
6 K. König, T. Krasieva, E. Bauer et al., Cell damage by UVA radiation of a mercury microscopy lamp probed by autofluorescence modifications, cloning assay, and comet assay [ J]. J. Biomed. Opt., 1996, 1: 217~222  
7 L. Reimer. Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis [ M]. Berlin: Springer-Verlag, 2000  
8 Jintao Yang, Wendong Xu. Scanned-cantilever atomic force microscope with large scanning range [ J]. Chin. Opt. Lett., 2006, 4(10): 580~582

- 9 Yang Jintao, Xu Wendong. Design of optical tracking for scanned cantilever atomic force microscope [ J ]. *Chinese J. Lasers*, 2006, **33**(1): 26~30  
杨金涛, 徐文东. 针尖扫描原子力显微镜的光点跟踪设计[ J ], 中国激光, 2006, **33**(1): 26~30
- 10 Wu Shifa, Zhang Jian, Pan Shi *et al.*. Photon scanning tunneling microscope combined with atomic force microscope [ J ]. *Acta Optica Sinica*, 2005, **25**(8): 1099~1104  
吴世法, 章 健, 潘 石等. 原子力与光扫描组合显微镜[ J ], 光学学报, 2005, **25**(8): 1099~1104
- 11 G. Binnig, H. Rohrer, Ch. Gerber *et al.*. Surface studies by scanning tunneling microscopy [ J ]. *Phys. Rev. Lett.*, 1982, **49**: 56~60
- 12 E. H. Syngé. A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region [ J ]. *Philos. Mag.*, 1928, **6**: 356
- 13 J. Michaelis, C. Hettich, J. Mlynek *et al.*. Optical microscopy using a single-molecule light source [ J ]. *Nature*, 2000, **405**: 325~327
- 14 Zheng Jianya, Yu Xiaoming, Zhang Tianhao *et al.*. Research of surface plasmon resonance on goldfilm using scanning near-field optical microscopy [ J ]. *Acta Optica Sinica*, 2006, **26**(8): 1236~1239  
郑建亚, 于晓明, 张天浩等. 用扫描近场光学显微镜技术研究金膜表面等离子体共振[ J ], 光学学报, 2006, **26**(8): 1236~1239
- 15 Liu Cheng, Yan Changchun, Gao Shumei. Detection angle and polarization dependences of the interferometric imaging with near-field scanning microscopy [ J ]. *Acta Optica Sinica*, 2006, **26**(3): 425~429  
刘 诚, 闫长春, 高淑梅. 近场显微干涉成像中的探测角度和偏振问题研究[ J ], 光学学报, 2006, **26**(3): 425~429
- 16 Xu Tiejun, Xu Jiyang, Wang Jia *et al.*. Numerical analysis of interaction and perturbation between evanescent field and probe in optical field detection by SNOM [ J ]. *Acta Optica Sinica*, 2005, **25**(4): 465~469  
徐铁军, 许吉英, 王 佳等. 扫描近场光学显微镜探针与光场相互作用的分析[ J ], 光学学报, 2005, **25**(4): 465~469
- 17 D. Toomre, D. J. Manstein. Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy [ J ]. *Trends Cell Biol.*, 2001, **11**(7): 298~303
- 18 J. W. Goodman. Introduction to Fourier Optics [ M ]. Beijing: Science Press, 1976, 18~23  
J. W. 顾德门. 傅里叶光学导论[ M ], 北京: 科学出版社, 1976, 18~23
- 19 Y. Garini, B. J. Vermolenand, I. T. Young. From micro to nano: recent advances in high-resolution microscopy [ J ]. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2005, **16**: 3~12
- 20 L. Rayleigh. On the manufacture and theory of diffraction-gratings [ J ]. *Philos. Mag.*, 1874, **47**: 193
- 21 M. Schrader, S. W. Hell, H. T. M. VanderVoort. Three-dimensional superresolution with a 4Pi-confocal microscope using image restoration [ J ]. *J. Appl. Phys.*, 1998, **84**: 4033~4042
- 22 M. Nagorni, S. W. Hell. Coherent use of opposing lenses for axial resolution increase in fluorescence microscopy I. Comparative study of concepts [ J ]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 2001, **18**(1): 36~48
- 23 M. Nagorni, S. W. Hell. Coherent use of opposing lenses for axial resolution increase. II. Power and limitation of nonlinear image restoration [ J ]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 2001, **18**(1): 49~54
- 24 E. Alexander, S. W. Hell. Fluorescence microscopy with super-resolved optical sections [ J ]. *Trends Cell Biol.*, 2005, **15**(4): 207~215
- 25 M. G. L. Gustafsson. Doubling the lateral resolution of wide-field fluorescence microscopy using structured illumination [ C ]. *SPIE*, 2000, **3919**: 141~150
- 26 S. W. Hell. Double-Scanning Confocal Microscope [ P ]. Europe Patent, 0491289, 1990
- 27 R. Heintzmann, T. M. Jovin, C. Cremer. Saturated patterned excitation microscopy: a concept for optical resolution improvement [ J ]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 2002, **19**(8): 1599~1609
- 28 V. Westphal, L. Kastrup, S. W. Hell. Lateral resolution of 28 nm ( $\lambda/25$ ) in far-field fluorescence microscopy [ J ]. *Appl. Phys. B*, 2003, **77**: 377~380
- 29 R. B. Sekar, A. Periasamy. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations [ J ]. *J. Cell Biol.*, 2003, **160**(5): 629~633
- 30 M. Dyba. STED-4Pi Microscopy [ D ]. Rupertus-Carola University of Heidelberg, 2004, 38~43
- 31 S. W. Hell, E. H. K. Stelzer. Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation [ J ]. *Opt. Commun.*, 1992, **93**: 277~282
- 32 M. Minsky. Microscopy Apparatus [ P ]. US Patent, 3013467, 1961
- 33 T. Ota, H. Fukuyama, Y. Ishihara *et al.*. The keratocyte network of human cornea: A three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy [ J ]. *Cornea*, 2000, **19**(2): 185~193
- 34 N. A. M. Verhaegh, D. Asnaghi, H. N. W. Lekkerkerker. Transient gels in colloid-polymer mixtures studied with fluorescence confocal scanning laser microscopy [ J ]. *Physica A*, 1999, **264**(1-2): 64~74
- 35 J. R. Swedlow, K. Hu, P. D. Andrews *et al.*. Measuring tubulin content in toxoplasma gondii: A comparison of laser-scanning confocal and wide-field fluorescence microscopy [ J ]. *PNAS*, 2002, **99**(4): 2014~2019
- 36 M. Oheim, D. J. Michael, M. Geisbauer *et al.*. Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches [ J ]. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2006, **58**: 788~808
- 37 T. Wilson. The role of the pinhole in confocal imaging system [ C ]. J. Pawley, Handbook of biological confocal microscopy, New York: Plenum Press, 1995, 167~168
- 38 T. R. Corle, G. S. Kino. Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems [ M ]. San Diego: Academic Press, 1996, 74
- 39 J. Pawley. Fundamental limits in confocal microscopy [ C ]. J. Pawley, Handbook of biological confocal microscopy, New York: Plenum Press, 1995, 19~38
- 40 M. Glass, T. Dabbs. The experimental effect of detector size on confocal lateral resolution [ J ]. *J. Microsc.*, 1991, **164**: 153~158
- 41 T. Wilson. Optical sectioning in confocal fluorescent microscopes [ J ]. *J. Microsc.*, 1989, **154**: 143~156
- 42 D. R. Sandison, D. W. Piston, R. M. Williams *et al.*. Quantitative comparison of background rejection, signal-to-noise ratio, and resolution in confocal and full-field laser scanning microscopes [ J ]. *Appl. Opt.*, 1995, **34**: 3576~3588
- 43 I. J. Cox, C. J. R. Sheppard. Information capacity and resolution in an optical system [ J ]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1986, **3**: 1152~1158
- 44 L. E. Meyr, N. Otberg, W. Sterry *et al.*. In vivo confocal scanning laser microscopy: comparison of the reflectance and fluorescence mode by imaging human skin [ J ]. *J. Biomed. Opt.*, 2006, **11**(4): 044012

- 45 D. Vivares, E. W. Kaler, A. M. Lenhoff. Polyhedral instability of glucose isomerase crystals as revealed by confocal scanning fluorescence microscopy [ J ]. *Crys. Growth Des.*, 2007, **7**(8): 1411~1415
- 46 E. H. K. Stelzer, S. Lindek. Fundamental reduction of the observation volume in far-field light microscopy by detection orthogonal to the illumination axis: confocal theta microscopy [ J ]. *Opt. Commun.*, 1994, **111**: 536~547
- 47 S. Lindek, E. H. K. Stelzer. Optical transfer functions for confocal theta fluorescence microscopy [ J ]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1996, **13**(3): 479~482
- 48 O. Haerberl, H. Furukawa, K. Tenjimbayashi. Polarized confocal theta microscopy [ J ]. *C. R. Physique*, 2002, **3**: 1445~1450
- 49 S. Lindek, C. Cremer, E. H. K. Stelzer. Confocal theta fluorescence microscopy with annular apertures [ J ]. *Appl. Opt.*, 1996, **35**(1): 126~130
- 50 S. Lindek, E. K. Stelzer. Single-lens theta microscopy - a new implementation of confocal theta microscopy [ J ]. *J. Microsc.*, 1997, **188**: 280~284
- 51 S. Lindek, J. Swoger, E. H. K. Stelzer. Single-lens theta microscopy: resolution, efficiency and working distance [ J ]. *J. Mod. Opt.*, 1999, **46**: 843~858
- 52 M. Göppert-Mayer. On elementary processes with two quantum steps [ J ]. *Ann. Phys.*, 1931, **9**: 273~294
- 53 D. J. Bradley, M. H. R. Hutchinson, H. Koetser. Interactions of pico-second laser pulses with organic molecules. II. Two-photon absorption cross sections [ J ]. *Proc. R. Soc. Lond. A*, 1972, **329**: 105~119
- 54 F. P. Schafer, H. Mller. Tunable dyeing-laser [ J ]. *Opt. Commun.*, 1971, **2**: 407~409
- 55 J. A. Valdemanis, R. L. Fork. Design considerations for a femtosecond pulse laser: balancing self phase modulation, group velocity dispersion, saturable absorption, and saturable gain [ J ]. *IEEE J. Quantum Electron.*, 1986, **QE-22**(1): 112~118
- 56 D. E. Spence, P. N. Kean, W. Sibbert. 60-fsec pulse generation from a self-mode-locked Ti: sapphire laser [ J ]. *Opt. Lett.*, 1991, **16**: 42~44
- 57 W. Denk, J. Strickler, W. W. Webb. Two-Photon Laser Microscopy [ P ]. US Patent, 5034613, 1991
- 58 W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy [ J ]. *Science*, 1990, **248**: 73~76
- 59 W. R. Zipfel, R. M. Williams, W. W. Webb. Nonlinear magic: Multiphoton microscopy in the biosciences [ J ]. *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**(11): 1369~1377
- 60 M. Rubart. Two-photon microscopy of cells and tissue [ J ]. *Circ. Res.*, 2004, **95**: 1154~1166
- 61 M. Gu, C. J. R. Sheppard. Comparison of three-dimensional imaging properties between two-photon and single-photon fluorescence microscopy [ J ]. *J. Microsc.*, 1995, **177**: 128~137
- 62 C. Xu, W. Zipfel, J. B. Shear *et al.*. Multiphoton fluorescence excitation: New spectral windows for biological nonlinear microscopy [ J ]. *PNAS*, 1996, **93**: 10763~10768
- 63 B. R. Masters, P. T. C. So, E. Gratton. Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin [ J ]. *Biophys. J.*, 1997, **72**: 2405~2412
- 64 B. R. Masters, P. T. C. So. Multi-photon excitation microscopy and confocal microscopy imaging of in vivo human skin: a comparison [ J ]. *Microsc. Microanal.*, 1999, **5**: 28~289
- 65 A. Diaspro, M. Robello. Two-photon excitation of fluorescence for three-dimensional optical imaging of biological structures [ J ]. *J. Photochem. Photobio. B-Biol.*, 2000, **55**(1): 1~8
- 66 K. Svoboda, R. Yasuda. Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience [ J ]. *Neuron*, 2006, **50**: 823~839
- 67 P. Theer, M. T. Hasan, W. Denk. Two-photon imaging to a depth of 1000  $\mu\text{m}$  in living brains by use of a Ti:  $\text{Al}_2\text{O}_3$  regenerative amplifier [ J ]. *Opt. Lett.*, 2003, **28**(12): 1022~1024
- 68 P. Theer, W. Denk. On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy [ J ]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 2006, **23**(12): 3139~3149
- 69 P. Theer. On the Fundamental Imaging-Depth Limit in Two-Photon Microscopy [ D ]. Ruperto-Carola University of Heidelberg, 2004, 30~40
- 70 Liu Xiaohua, Zhan Cheng, Zhang Hongmin *et al.*. Construction of random-access scanning multiphoton fluorescence microscope system [ J ]. *Acta Optica Sinica*, 2006, **26**(12): 1823~1828  
吕晓华, 占成, 张红民等. 随机扫描多光子荧光显微镜成像系统 [ J ]. 光学学报, 2006, **26**(12): 1823~1828
- 71 B. A. Molitoris, R. M. Sandoval. Intravital multiphoton microscopy of dynamic renal process [ J ]. *Am. J. Physiol. - Renal Physiol.*, 2005, **288**: 1084~1089
- 72 M. Oheim, E. Beaurepaire, E. Chaigneau *et al.*. Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth [ J ]. *J. Neurosci. Methods*, 2001, **111**(1): 29~37
- 73 R. Bakalova. Ultra-fast biosensors and multi-photon microscopy in the future of brain studies [ J ]. *Cell. Mol. Neurobio.*, 2007, **27**(3): 359~365
- 74 Jianxin Chen, Shuangmu Zhuo, Tianshu Luo *et al.*. Two-photon excited spectroscopies of ex vivo human skin endogenous species irradiated by femtosecond laser pulses [ J ]. *Chin. Opt. Lett.*, 2006, **4**(10): 598~600
- 75 J. C. Malone, A. F. Hood, T. Conley *et al.*. Three-dimensional imaging of human skin and mucosa by two-photon laser scanning microscopy [ J ]. *J. Cutan. Pathol.*, 2002, **29**(8): 453~458
- 76 P. Bousso, E. A. Robey. Dynamic behavior of T cells and thymocytes in lymphoid organs as revealed by two-photon microscopy [ J ]. *Immunity*, 2004, **21**: 349~355
- 77 R. K. Jain, L. L. Munn, D. Fukumura. Dissecting tumor pathophysiology using intravital microscopy [ J ]. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, **2**: 266~276
- 78 G. H. Patterson, D. W. Piston. Photobleaching in two-photon excitation microscopy [ J ]. *Biophys. J.*, 2000, **78**: 2159~2162
- 79 P. D. Higdon, P. Torok, T. Wilson. Imaging properties of high aperture multiphoton fluorescence scanning optical microscopes [ J ]. *J. Microsc.*, 1999, **193**: 127~141
- 80 G. J. R. Sheppard, M. Gu. Image formation in two-photon fluorescence microscopy [ J ]. *Optik*, 1990, **86**: 104~106
- 81 I. Gryczynski, H. Malak, J. R. Lakowicz. Two-color two-photon excitation of Indole [ J ]. *Biospectroscopy*, 1997, **3**: 97~101
- 82 M. Lim, C. Saloma. Confocality condition in two-color excitation microscopy with two focused excitation beams [ J ]. *Opt. Commun.*, 2002, **207**: 121~130
- 83 C. M. Blanca, C. Saloma. Two-color excitation fluorescence microscopy through highly scattering media [ J ]. *Appl. Opt.*, 2001, **40**(16): 2722~2729
- 84 J. Palero, W. Garcia, C. Saloma. Two-color (two-photon) excitation fluorescence with two confocal beams and a Raman shifter [ J ]. *Opt. Commun.*, 2002, **211**(1-6): 65~71
- 85 M. Lim, C. Saloma. Primary spherical aberration in two-color

- two-photon excitation fluorescence microscopy with two confocal excitation beams [J]. *Appl. Opt.*, 2003, **42**(17): 3398~3406
- 86 M. O. Cambaliza C. Saloma. Advantages of two-color excitation fluorescence microscopy with two confocal excitation beams [J]. *Opt. Commun.*, 2000, **184**: 25~35
- 87 Chen Wang, Lingling Qiao, Zhengle Mao *et al.*. Reduced deep-tissue image degradation in three-dimensional multiphoton microscopy with concentric two-color two-photon fluorescence excitation [J]. *J. Opt. Soc. Am. B*, 2008, **25**(6): 976~982
- 88 M. G. L. Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy [J]. *J. Microsc.*, 2000, **198**: 82~87
- 89 R. Heintzmann, C. Cremer. Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating [C]. *SPIE*, 1998, **3568**: 185~195
- 90 J. T. Frohn, H. F. Knapp, A. Stemmer. True optical resolution beyond the Rayleigh limit achieved by standing wave illumination [J]. *PNAS*, 2000, **97**(13): 7232~7236
- 91 J. T. Frohn. Super-resolution Fluorescence Microscopy by Structured Light Illumination [D]. Swiss Federal Institute of Technology, 2000, 7~12
- 92 R. Juskaitis, T. Wilson, M. A. A. Neil *et al.*. Efficient real-time confocal microscopy with white light sources [J]. *Nature*, 1996, **383**: 804~806
- 93 M. A. A. Neil, T. Wilson, R. Juskaitis. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope [J]. *Opt. Lett.*, 1997, **22**: 1905~1907
- 94 M. A. A. Neil, R. Juskaitis, T. Wilson. Real time 3D fluorescence microscopy by two beam interference illumination [J]. *Opt. Commun.*, 1998, **153**: 1~4
- 95 M. A. A. Neil, T. Wilson, R. Juskaitis. A light efficient optically sectioning microscope [J]. *J. Microsc.*, 1998, **189**: 114~117
- 96 R. Heintzmann. Saturated patterned excitation microscopy with two-dimensional excitation patterns [J]. *Micron*, 2003, **34**: 283~291
- 97 M. G. L. Gustafsson. Nonlinear structured-illumination microscopy wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution [J]. *PNAS*, 2005, **102**(37): 13081~13086
- 98 P. E. Hänninen, S. W. Hell, A. J. Salo *et al.*. Two-photon excitation 4Pi confocal microscope: enhanced axial resolution microscope for biological research [J]. *Appl. Phys. Lett.*, 1995, **66**: 698~700
- 99 F. Lanni, D. L. Taylor, A. S. Waggoner. Standing Wave Luminescence Microscopy [P]. US Patent, 4621911, 1986
- 100 F. Lanni, D. L. Taylor, B. Bailey. Field Synthesis and Optical Subsectioning for Standing Wave Microscopy [P]. US Patent, 5394268, 1995
- 101 F. Lanni, D. L. Taylor, B. Bailey. Field Synthesis and Optical Subsectioning for Standing Wave Microscopy (continuation in part) [P]. US Patent, 5394268, 1995
- 102 B. Bailey, V. Krishnamurthi, D. L. Farkas *et al.*. Three-dimensional imaging of biological specimens with standing wave fluorescence microscopy [C]. *SPIE*, 1994, **2184**: 208~213
- 103 B. Bailey, D. L. Farkas, D. L. Taylor *et al.*. Enhancement of axial resolution in fluorescence microscopy by standing wave excitation [J]. *Nature*, 1993, **366**: 44~48
- 104 V. Krishnamurthi, B. Bailey, F. Lanni. Image processing in 3-D standing wave fluorescence microscopy [C]. *SPIE*, 1994, **2655**: 18~25
- 105 M. G. L. Gustafsson, D. A. Agard, J. W. Sedat. 3D widefield microscopy with two objective lenses: experimental verification of improved axial resolution [C]. *SPIE*, 1996, **2655**: 62~66
- 106 M. G. L. Gustafsson, D. A. Agard, J. W. Sedat. 3D widefield light microscopy with better than 100 nm axial resolution [J]. *J. Microsc.*, 1999, **195**(1): 10~16
- 107 M. G. L. Gustafsson, D. A. Agard, J. W. Sedat. Method and Apparatus for Three-dimensional Microscopy with Enhanced Depth Resolution [P]. US Patent, 5671085, 1997
- 108 M. G. L. Gustafsson, D. A. Agard, J. W. Sedat. Sevenfold improvement of axial resolution in 3D wide-field microscopy using two objective lenses [C]. *SPIE*, 1995, **2412**: 147
- 109 S. W. Hell, E. H. K. Stelzer. Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope [J]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1992, **9**: 2159~2166
- 110 M. Nagorn, S. W. Hell. 4Pi-confocal microscopy provides three dimensional images of the microtubule network with 100- to 150-nm resolution [J]. *J. Struct. Biol.*, 1998, **123**: 236~247
- 111 M. Schrader, K. Bahlmann, G. Giese *et al.*. 4Pi confocal imaging in fixed biological specimens [J]. *Biophys. J.*, 1998, **75**: 1659~1668
- 112 S. W. Hell, S. Lindek, C. Cremer *et al.*. Measurement of the 4Pi-confocal point spread function proves 75 nm axial resolution [J]. *Appl. Phys. Lett.*, 1994, **64**: 1335~1337
- 113 H. Gudel, J. Bewersdorff, S. Jakobs *et al.*. Cooperative 4Pi excitation and detection yields 7-fold sharper optical sections in live cell microscopy [J]. *Biophys. J.*, 2004, **87**: 4146~4152
- 114 M. Schrader, M. Kozubek, S. W. Hell *et al.*. Optical transfer functions of 4Pi confocal microscopes: theory and experiment [J]. *Opt. Lett.*, 1997, **22**: 436~438
- 115 M. Martinez-Corral, M. T. Caballero, A. Pons *et al.*. Sidelobe decline in single-photon 4Pi microscopy by Toraldo rings [J]. *Micron*, 2003, **34**: 319~325
- 116 M. C. Lang, J. Engelhardt, S. W. Hell. 4Pi microscopy with linear fluorescence excitation [J]. *Opt. Lett.*, 2007, **32**(3): 259~261
- 117 M. C. Lang, T. Müller, J. Engelhardt *et al.*. 4Pi microscopy of type A with 1-photon excitation in biological fluorescence imaging [J]. *Opt. Express*, 2007, **15**(5): 2459~2467
- 118 M. Gu, C. J. R. Sheppard. Three-dimensional transfer functions in 4Pi confocal microscopes [J]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1994, **11**: 1619~1627
- 119 S. W. Hell, S. Lindek, E. H. K. Stelzer. Enhancing the axial resolution in far-field light microscopy: two-photon 4Pi confocal fluorescence microscopy [J]. *J. Mod. Opt.*, 1994, **41**(4): 675~681
- 120 W. H. Richardson. Bayesian-based iterative method of image restoration [J]. *J. Opt. Soc. Am.*, 1972, **62**: 55~59
- 121 Jianfang Chen, K. Midorikawa. Two-color two-photon 4Pi fluorescence microscopy [J]. *Opt. Lett.*, 2004, **29**(12): 1354~1356
- 122 A. Egner, M. Schrader, S. W. Hell. Refractive index mismatch induced intensity and phase variations in fluorescence confocal, multiphoton and 4Pi-microscopy [J]. *Opt. Commun.*, 1998, **153**: 211~217
- 123 J. Bewersdorff, R. Pick, S. W. Hell. Multifocal multiphoton microscopy [J]. *Opt. Lett.*, 1998, **23**(9): 655~657
- 124 A. Egner, S. Jakobs, S. W. Hell. Fast 100-nm resolution 3D-microscope reveals structural plasticity of mitochondrial live yeast [J]. *PNAS*, 2002, **99**: 3370~3375
- 125 A. Egner, S. Verrier, A. Goroshkov *et al.*. 4Pi-microscopy of the Golgi apparatus in live mammalian cells [J]. *J. Struct. Biol.*, 2003, **147**: 70~76
- 126 S. W. Hell, J. Wichmann. Breaking the diffraction resolution



- limit by stimulated emission; stimulated emission depletion microscopy [J]. *Opt. Lett.*, 1994, **19**(11): 780~782
- 127 A. Einstein. On the quantum theory of radiation [J]. *Phys. J.* 1917, **18**: 121~128 (in German)
- 128 L. Kastrup, H. Blom, C. Eggeling *et al.*. Fluorescence fluctuation spectroscopy in subdiffraction focal volumes [J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2005, **94**: 178104
- 129 V. Westphal, S. W. Hell. Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope [J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2005, **94**: 143903
- 130 S. W. Hell. Increasing the resolution of far-field fluorescence light microscopy by point-spread-function engineering [C]. J. R. Lakowicz, Fluorescence spectroscopy, New York; Plenum Press, 1997, **5**: 361~422
- 131 T. A. Klar. Progress in Stimulated Emission Depletion Microscopy [D]. Rupertus-Carola University of Heidelberg, 2001, 10~21
- 132 Chen Wenxia, Xiao Fanrong, Liu li *et al.*. Model design and parameter optimization of stimulated emission depletion fluorescence microscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2006, **26** (5): 720~725
- 陈文霞, 肖繁荣, 刘力等. 受激发射损耗荧光显微镜的模型设计及参量优化 [J]. *光学学报*, 2006, **26**(5): 720~725
- 133 T. A. Klar, E. Engel, S. W. Hell. Breaking Abbe's diffraction resolution limit in fluorescence microscopy with stimulated emission depletion beams of various shapes [J]. *Phys. Rev. E*, 2001, **64**: 066613
- 134 T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba *et al.*. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission [J]. *PNAS*, 2000, **97**: 8206~8210
- 135 M. Dyba, S. W. Hell. Focal spots of size of  $\lambda/23$  open up far-field fluorescence microscopy at 33 nm axial resolution [J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2002, **88**: 163901
- 136 M. Dyba, J. Keller, S. W. Hell. Phase filter enhanced STED-4Pi fluorescence microscopy theory and experiment [J]. *New J. Phys.* 2005, **7**: 134
- 137 K. I. Willig, S. O. Rizzoli, V. Westphal *et al.*. STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis [J]. *Nature* 2006, **440** (7086): 935~939
- 138 R. J. Kittel, C. Wichmann, T. M. Rasse *et al.*. Bruchpilot promotes active zone assembly,  $Ca^{2+}$  channel clustering, and vesicle release [J]. *Science* 2006, **312**(5776): 1051~1054
- 139 G. Donnert, J. Keller, R. Medda *et al.*. Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy [J]. *PNAS*, 2006, **103**(31): 11440~11445
- 140 K. I. Willig, J. Keller, M. Bossi *et al.*. STED microscopy resolves nanoparticle assemblies [J]. *New J. Phys.*, 2006, **8**: 106
- 141 K. I. Willig, B. Harke, R. Medda *et al.*. STED microscopy with continuous wave beams [J]. *Nat. Methods*, 2007, **4**(11): 915~918
- 142 M. Dyba, S. W. Hell. Photostability of a fluorescent marker under pulsed excited-state depletion through stimulated emission [J]. *Appl. Opt.*, 2003, **42**(25): 1523~1529
- 143 C. Eggeling, A. Volkmer, C. A. M. Seidel. Molecular photobleaching kinetics of rhodamine 6G by one- and two-photon induced confocal fluorescence microscopy [J]. *Chem. Phys. Chem.*, 2005, **6**: 791~804
- 144 S. W. Hell, M. Kroug. Ground-state-depletion fluorescence microscopy: a concept for breaking the diffraction resolution limit [J]. *Appl. Phys. B*, 1995, **60**: 495~497
- 145 S. Bretschneider, C. Eggeling, S. W. Hell. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy by optical shelving [J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2007, **98**: 218103
- 146 S. W. Hell. Towards the nanoscopy [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**(11): 1347~1355
- 147 S. W. Hell. Far-field optical nanoscopy [J]. *Science* 2007, **316**: 1153~1158
- 148 J. Keller, A. Schönlé, S. W. Hell. Efficient fluorescence inhibition patterns for RESOLFT microscopy [J]. *Opt. Express*, 2007, **15**(6): 3361~3371
- 149 M. Sauer. Reversible molecular photoswitches: A key technology for nanoscience and fluorescence imaging [J]. *PNAS*, 2005, **102**: 9433~9434
- 150 D. M. Chudakov, V. V. Belousov, A. G. Zaraisky *et al.*. Kindling fluorescent proteins for precise in vivo photolabeling [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**: 191~194
- 151 K. A. Lukyanov, A. F. Fradkov, N. G. Gurskaya *et al.*. Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog [J]. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**: 25879~25882
- 152 R. Ando, H. Mizuno, A. Miyawaki. Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting [J]. *Science*, 2004, **306**: 1370~1373
- 153 S. Habuchi, R. Ando, P. Dedeker *et al.*. From the cover: Reversible single-molecule photoswitching in the GFP-like fluorescent protein dropa [J]. *PNAS*, 2005, **102**: 9511~9516
- 154 M. Hofmann, C. Eggeling, S. Jakobs *et al.*. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins [J]. *PNAS*, 2005, **102**(49): 17565~17569
- 155 S. W. Hell. Strategy for far-field optical imaging and writing without diffraction limit [J]. *Phys. Lett. A*, 2004, **326**: 140~145
- 156 M. Bossi, J. Fölling, M. Dyba *et al.*. Breaking the diffraction resolution barrier in far field microscopy by molecular optical bistability [J]. *New J. Phys.*, 2006, **8**: 275
- 157 S. W. Hell, S. Jakobs, L. Kastrup. Imaging and writing at the nanoscale with focused visible light through saturable optical transitions [J]. *Appl. Phys. A*, 2003, **77**: 859~860
- 158 N. S. White, R. J. Errington. Fluorescence techniques for drug delivery research: theory and practice [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, **57**: 17~42
- 159 D. Schachtman, W. H. Liu. GFP-based FRET microscopy in living plant cells [J]. *Trends in Plant Sci.*, 1999, **4**(7): 287~291
- 160 K. Truong, M. Ikura. The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo [J]. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2001, **11**: 573~578
- 161 H. Edelhoch, L. Brand, M. Wilchek. Fluorescence studies with tryptophyl peptides [J]. *Isr. J. Chem.* 1963, **1**: 216~217
- 162 T. Förster. Delocalized excitation and excitation transfer [C]. O. Sinanoglu, Modern Quantum Chemistry, New York: Academic Press, 1965, **3**: 93~137
- 163 R. B. Sekar, A. Periasamy. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations [J]. *J. Cell Biol.*, 2003, **160**(5): 629~633
- 164 M. A. Hink, T. Bisselin, A. J. Visser. Imaging protein-protein interactions in living cells [J]. *Plant Mol. Biol.*, 2002, **50**: 871~883
- 165 G. W. Gordon, G. Berry, X. H. Liang *et al.*. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy [J]. *Biophys. J.*, 1998, **74**: 2702~2713
- 166 A. Hoppe, K. Christensen, J. A. Swanson. Fluorescence resonance energy transfer-based stoichiometry in living cells

- [J]. *Biophys. J.*, 2002, **83**: 3652~3664
- 167 M. Elangovan, H. Wallrabe, Y. Chen *et al.*. Characterization of one- and two-photon excitation fluorescence resonance energy transfer microscopy [J]. *Methods*, 2003, **29**: 58~73
- 168 V. S. Kraynov, C. Chamberlain, G. M. Bokoch *et al.*. Localized Rac activation dynamics visualized in living cells [J]. *Science*, 2000, **290**: 333~337
- 169 Liu Lixin, Qu Junle, Lin Ziyang *et al.*. A high repetition rate picosecond streak camera for two-photon excited fluorescence lifetime microscopic imaging [J]. *Acta Optica Sinica*, 2006, **26** (3): 373~378  
刘立新, 屈军乐, 林子扬等. 用于双光子激发荧光寿命显微成像的高重复频率皮秒扫描相机 [J]. *光学学报*, 2006, **26** (3): 373~378
- 170 K. Suhling, P. M. W. French, D. Phillips. Time resolved fluorescence microscopy [J]. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2005, **4**: 13~22
- 171 F. Festy, S. M. Ameer-Beg, T. Ng *et al.*. Imaging proteins in vivo using fluorescence lifetime microscopy [J]. *Mol. Biosyst.*, 2007, **3**: 381~391
- 172 M. Elangovan, R. N. Day, A. Peñasamy. Nanosecond fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy to localize the protein interactions in a single living cell [J]. *J. Microsc.*, 2002, **205**: 3~14
- 173 M. Peter, S. M. Ameer-Beg. Imaging molecular interactions by multiphoton FLIM [J]. *Biol. Cell*, 2004, **96**: 231~236
- 174 B. J. Baeska, J. Skoch, G. A. Hickey *et al.*. Fluorescence resonance energy transfer determinations using multiphoton fluorescence life time imaging microscopy to characterize amyloid-beta plaques [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2003, **8**: 368~375
- 175 R. Yasuda. Imaging spatiotemporal dynamics of neuronal signaling using fluorescence resonance energy transfer and fluorescence lifetime imaging microscopy [J]. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2006, **16**: 551~561
- 176 R. N. Day, D. W. Piston. Spying on the hidden lives of proteins [J]. *Nat. Biotechnol.*, 1999, **17**: 425~426
- 177 E. Gratton, S. Breusegem, J. Sutin *et al.*. Fluorescence lifetime imaging for the two-photon microscope: time-domain and frequency-domain methods [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2003, **8**: 381~390
- 178 W. Becker. Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Techniques [M]. New York: Springer, 2005, 20~24
- 179 C. J. D. Grauw, H. C. Gerritsen. Multiple time-gate module for fluorescence lifetime imaging [J]. *Appl. Spectrosc.*, 2001, **55**: 670~678
- 180 K. Carlsson, J. Philip. Theoretical investigation of the signal-to-noise ratio for different fluorescence lifetime imaging techniques [C]. *SPIE*, 2002, **4622**: 70~78
- 181 E. A. Jares-Erijman, T. M. Jovin. FRET imaging [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21** (11): 1387~1395
- 182 A. K. Kenworthy, M. Edidin. Distribution of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein at the apical surface of MDCK cells examined at a resolution of  $< 10 \text{ \AA}$  using imaging fluorescence resonance energy transfer [J]. *J. Cell Biol.*, 1998, **142**: 69~84
- 183 F. K. M. Chan, R. M. Siegel, D. Zacharias *et al.*. Fluorescence resonance energy transfer analysis of cell surface receptor interactions and signaling using spectral variants of the green fluorescent protein [J]. *Cytometry*, 2001, **44**: 366~368
- 184 M. E. Dickinson, G. Beaman, S. Tille *et al.*. Multi-spectral imaging and linear unmixing add a whole new dimension to laser scanning fluorescence microscopy [J]. *Biotechniques*, 2001, **31**: 1272, 1274~1276, 1278
- 185 T. Zimmermann, J. Rietdorf, R. Pepperkok. Spectral imaging and its applications in live cell microscopy [J]. *FEBS Lett.*, 2003, **546** (1): 87~92
- 186 A. L. Mattheyses, A. D. Hoppe, D. Axelrod. Polarized fluorescence resonance energy transfer microscopy [J]. *Biophys. J.*, 2004, **87**: 2787~2797
- 187 D. S. Lidke, P. Nagy, B. G. Barisas *et al.*. Imaging molecular interactions in cells by dynamic and static fluorescence anisotropy (rFLIM and emFRET) [J]. *Biochem. Soc. Trans.*, 2003, **31**: 1020~1027
- 188 T. Nagai, S. Yamada, T. Tominaga *et al.*. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for  $\text{Ca}^{2+}$  by circularly permuted yellow fluorescent proteins [J]. *PANS*, 2004, **101**: 10554~10559
- 189 M. V. Overton, K. J. Blumer. G-protein-coupled receptors function as oligomers in vivo [J]. *Curr. Biol.*, 2000, **10**: 341~344
- 190 A. Sorkin, M. McClure, F. Huang *et al.*. Interaction of EGF receptor and G $\alpha$ 2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy [J]. *Curr. Biol.*, 2000, **10** (21): 1395~1398
- 191 R. G. H. Immink, T. W. J. Gadella, S. Ferrario *et al.*. Analysis of MADS box protein-protein interactions in living plant cells [J]. *PNAS*, 2002, **99**: 2416~2421
- 192 Y. Nagai, M. Miyazaki, R. Aoki *et al.*. A fluorescent indicator for visualizing cAMP-induced phosphorylation in vivo [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2000, **18**: 313~316
- 193 P. W. Vanderklish, L. A. Krushel, B. H. Holst *et al.*. Marking synaptic activity in dendritic spines with a calpain substrate exhibiting fluorescence resonance energy transfer [J]. *PNAS*, 2000, **97**: 2253~2258
- 194 B. Ponsioen, J. Zhao, J. Riedl *et al.*. Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator [J]. *EMBO Rep.*, 2004, **5**: 1176~1180
- 195 M. A. Rizzo. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2004, **22**: 445~449
- 196 G. J. Kremers, J. Goedhart, E. B. van Munster *et al.*. Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Förster radius [J]. *Biochemistry*, 2006, **45**: 6570~6580
- 197 N. C. Shaner, R. E. Campbell, P. A. Steinbach *et al.*. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Drosophila* sp. red fluorescent protein [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2004, **22**: 1567~1572
- 198 T. Nagai, K. Iwata, E. S. Park *et al.*. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2002, **20**: 87~90
- 199 A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney *et al.*. Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization [J]. *Science*, 2003, **300**: 2061~2065
- 200 M. K. Cheezum, W. F. Walker, W. H. Guilford. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles [J]. *Biophys. J.*, 2001, **81**: 2378~2388
- 201 R. E. Thompson, D. R. Larson, W. W. Webb. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes [J]. *Biophys. J.*, 2002, **82**: 2775~2783
- 202 W. E. Moerner, L. Kador. Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid [J]. *Phys. Rev. Lett.*, 1989, **62**: 2535~2538
- 203 M. Orrit, J. Bernard. Single pentacene molecules detected by

- fluorescence excitation in a *p*-terphenyl crystal [ J ]. *Phys. Rev. Lett.*, 1990, **65**: 2716~2719
- 204 R. M. Dickson, D. J. Norris, Y. Tzeng *et al.*. Three-dimensional imaging of single molecules solvated in pores of poly (acrylamide) gels [ J ]. *Science*, 1986, **274**: 966~969
- 205 H. Yang, G. Luo, P. Karnehanaphanurach *et al.*. Protein conformational dynamics probed by single-molecule electron transfer [ J ]. *Science*, 2003, **302**: 262~266
- 206 X. S. Xie. Single-molecule spectroscopy and dynamics at room temperature [ J ]. *Acc. Chem. Res.*, 1996, **29**: 598~606
- 207 W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. H. Jett *et al.*. Single molecule fluorescence spectroscopy at ambient temperature [ J ]. *Chem. Rev.*, 1999, **99**: 2929~2956
- 208 E. J. Peterman, H. Sosa, W. E. Moerner. Single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy of biomolecular motors [ J ]. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2004, **55**: 79~96
- 209 E. S. Yeung. Dynamics single biomolecular in free solution [ J ]. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2004, **55**: 97~126
- 210 E. Barkai, Y. J. Jung, R. Silbey. Theory of single-molecule spectroscopy; beyond the ensemble average [ J ]. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2004, **55**: 457~507
- 211 F. Kilzer, M. Orrit. Single-molecule optics [ J ]. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2004, **55**: 585~611
- 212 P. E. Barbara. Single-molecule spectroscopy [ J ]. *Acc. Chem. Res.*, 2005, **38**: 503~610
- 213 E. Betzig. Proposed method for molecular optical imaging [ J ]. *Opt. Lett.*, 1985, **20**(3): 237~239
- 214 L. S. Churchman, Z. Ökten, R. S. Rock *et al.*. Single molecule high-resolution colocalization of Cy3 and Cy5 attached to macromolecules measures intramolecular distances through time [ J ]. *PNAS*, 2005, **102**(5): 1419~1423
- 215 L. S. Churchman, H. Flyvbjerg, J. A. Spudich. A non-Gaussian distribution quantifies distances measured with fluorescence localization techniques [ J ]. *Biophys. J.*, 2006, **90**: 668~671
- 216 X. H. Qu, D. Wu, L. Mets *et al.*. Nanometer-localized multiple single-molecule fluorescence microscopy [ J ]. *PNAS*, 2004, **101**(31): 11298~11303
- 217 M. P. Gordon, T. Ha, P. R. Selvin. Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching [ J ]. *PNAS*, 2004, **101**(17): 6462~6465
- 218 K. A. Lidke, B. Rieger, T. M. Jovin *et al.*. Superresolution by localization of quantum dots using blinking statistics [ J ]. *Opt. Express*, 2005, **13**(18): 7052~7062
- 219 E. Betzig, R. Sougrat, O. W. Lindwasser *et al.*. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [ J ]. *Science*, 2006, **313**: 1642~1645
- 220 G. H. Patterson, E. Betzig, J. Lippincott-Schwartz *et al.*. Developing photoactivated location microscopy (PALM), Biomedical imaging: from nano to macro [ C ]. 4th IEEE International Symposium, 2007, 940~943
- 221 S. Chen, H. E. Hamm. PALM reading: Seeing the future of cell biology at higher resolution [ J ]. *Developmental Cell*, 2006, **11**: 438~439
- 222 S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, M. D. Mason. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy [ J ]. *Biophys. J.*, 2006, **91**: 4258~4272
- 223 R. Ando, H. Hama, M. Yamamoto-Hino *et al.*. An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein [ J ]. *PNAS*, 2002, **99**(20): 12651~12656
- 224 G. H. Patterson, J. Lippincott-Schwartz. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells [ J ]. *Science*, 2002, **297**: 1873~1877
- 225 J. Wiedenmann, S. Ivanchenko, F. Oswald *et al.*. EosFP, a fluorescent marker protein with UV- inducible green-to-red fluorescence conversion [ J ]. *PNAS*, 2004, **101**: 15905~15910
- 226 K. A. Lukyanov, D. M. Chudakov, S. Lukyanov *et al.*. Photoactivatable fluorescent proteins [ J ]. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005, **6**: 885~891
- 227 W. E. Moerner. Single-molecule optical spectroscopy of autofluorescent proteins [ J ]. *J. Chem. Phys.*, 2002, **117**(24): 10925~10937
- 228 R. Rigler, M. Orrit, T. Basché. Single molecule spectroscopy [ C ]. Nobel conference lectures, Berlin; Springer, 2001
- 229 M. J. Rust, M. Bates, X. W. Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [ J ]. *Nat. Methods*, 2006, **3**(10): 793~795
- 230 W. E. Moerner. New directions in single-molecule imaging and analysis [ J ]. *PNAS*, 2007, **104**(311): 12596~12602