

利用受激发射损耗(STED)显微术突破远场衍射极限

陈文霞 肖繁荣 刘力 王桂英

(中国科学院上海光学精密机械研究所,上海 201800)

摘要 远场光学显微镜受衍射极限分辨率的限制,而近场光学显微镜由于缺乏层析能力,则无法实现超分辨的三维成像。研究了既可突破远场光学显微术的衍射极限分辨率又可实现三维成像的成像技术——受激发射损耗(STED),综述了STED的分辨率与STED光的光强,延迟时间、光斑空间分布等主要参数的关系,以及该技术的最新进展和应用前景。

关键词 分辨率 衍射极限 受激发射损耗 时间特性 空间特性

Breaking Through the diffraction limit of far-field Optical microscopy by stimulated emission depletion (STED)

CHEN Wenxia XIAO Fanrong LIU Li WANG Guiying

(Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

Abstract The resolution of far-field microscopy is limited by the diffraction limit, while near-field microscopy lacks the sectional function to image 3D pictures. The imaging technology called stimulated-emission-depletion (STED) which breaks through the diffraction limit of far-field optical microscopy and implements 3D imaging is studied. The relationships between the STED resolution and the intensity, delay time and the spatial distribution of the STED pulses are summarized and the new advances and the application prospect of STED microscopy are introduced.

Key words resolution diffraction limit stimulated emission depletion temporal characteristic spatial characteristic

1 引言

远场光学显微术的空间分辨率受限是一个非常突出的物理问题,它极大地影响了其他学科的发展,特别是在生物学领域,因为迄今为止远场光学显微术仍是显示细胞内部三维结构的唯一方法。光学显微成像系统的分辨率受光学衍射的限制这种现象是 Ernst Abbe 于 1873 年发现的,即当物体之间的距离小于光波长的三分之一时将无法分辨,因为这已经达到了衍射理论的最小聚焦光斑尺寸^[1]。根据衍射理论,显微镜的聚焦光斑尺寸 $\Delta x = [\lambda / (2n \sin \alpha)]$,因此减小

波长和增大孔径角都能减小聚焦光斑尺寸。但是这种方法存在缺陷,因为当波长 $\lambda < 350 \text{nm}$ 时,光无法在活细胞内成像;而且在技术上,透镜的半孔径角只能达到 70° ,有限的孔径角导致分辨率降低。尽管共焦和多光子荧光显微镜的出现可以实现三维成像,但这两种方法也没有真正大幅度地提高分辨率。共焦显微镜两次用到物镜聚焦,一次是将样品激发光在样品中聚焦,一次是将发射的荧光聚焦到点探测器,聚焦处两个光阑小孔相对于物镜焦平面是共轭的,分别起到了点光源和空间“门”的作用。探

测器前的小孔可以有效地抑制旁瓣与噪声,提高信噪比,所得的分辨率略高于衍射极限^[2]。而多光子吸收虽然主要发生在聚焦光斑的中心,由于多光子激发需要较长的波长,损害了激发区变窄的效果。此外,多光子荧光还需要很高的激发光强。在最佳情况下,上述的聚焦显微镜在焦平面上只能分辨 180nm ,沿光轴仅能分辨 $500 \sim 800 \text{nm}$ ^[3]。

因此,近场光学显微镜放弃利用聚焦点扫描成像的概念,为了将光与样品的作用限制在亚衍射尺寸,近场显微镜使用超小探针或大

收稿日期:2005-03-11;收到修改稿日期:2005-04-21

基金项目:国家重大基础研究 973(2002BC713808)和国家自然科学基金(60408007)资助课题。

作者简介:陈文霞,上海光学精密机械研究所强场激光物理国家重点实验室在读硕士研究生,主要从事超高分辨率光学成像研究。

孔径角物镜加小孔, 通过探测样品表面的隐失场而获得样品表面信息。因此, 该方法只能对表面成像而无法获得活细胞内的目标成像。

直到 20 世纪 90 年代中期, 人们发现当粒子在两个分子态之间达到饱和的跃迁时, 如果在空间上加以调制, 则可使聚焦光强度分布在空间上存在中心零点。利用这种分子态的饱和损耗, 可以实现空间各个方向上的纳米级分辨率, 该方法被称为受激发射损耗 (STED) 荧光显微术。如图 1^[4]所示它具体是利用激发光使基态粒子跃迁到激发态, 随后 STED 光照射样品, 引起受激辐射, 消耗了发射荧光的能级 (荧光态) 上的粒子数。受激发射的作用是迫使粒子在它们被激发之后立刻回到基态, 即是焦斑上那些受 STED 光损耗的荧光分子失去发射荧光光子的能力, 而剩下的可发射荧光区被限制在小于衍射极限区域内, 于是获得了一个小于衍射极限的发光点。这种作用相当于缩小显微镜的有效点扩散函数 (E-PSF)^[6]。突破衍射极限意味着有可能得到无限小的焦斑或者无限大的光学传递函数 (OTF) 带宽, 即较小的有效点扩散函数。这样获得的分辨率由实际的条件如时间延迟量、STED 光的零点尺寸、光强、光脉冲寿命、光致漂白等因素决定。Hell 小组^[6,7]已获得了 28nm 的横向分辨率和 33nm 的轴向分辨率, 并且完全分开了相距 62nm 的两个同类的分子。

2 受激发射损耗 (STED) 的基本原理及相关参数

如图 1 所示, 设粒子的激发态为 A, 基态为 B, 由特定波长的激光诱导粒子从基态跃迁到 A, 即发生了 B→A 的跃迁。但是 A→B 的跃迁没有限制, 可以是自发辐射跃

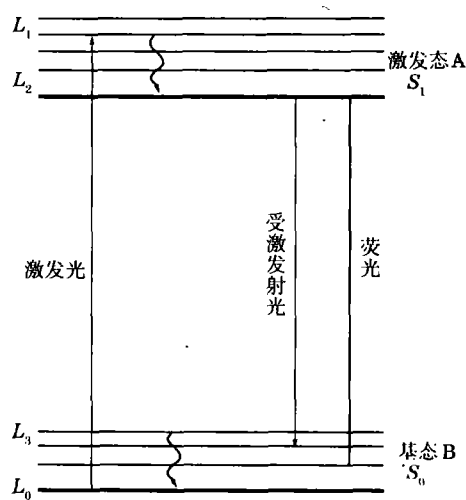


图 1 有机荧光团的能级图^[7]

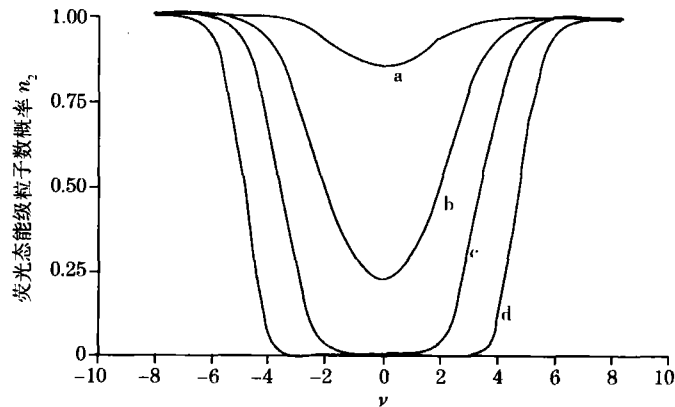


图 2 不同光强下 n_2 (荧光态的粒子数概率) 的损耗

迁、光诱导或者是热辐射跃迁等过程。记 A→B 和 B→A 的跃迁几率分别为 K_{AB} 和 K_{BA} , 归一化布居数分别为 N_A 和 N_B , 它们服从如下的变化关系: $\frac{dN_A}{dt} = -K_{AB}N_A + K_{BA}N_B = -$

$\frac{dN_B}{dt}$ 。如果初始时刻, 粒子数分布在 A 态 (或其它态), 当 A、B 态间的跃迁达到动态平衡时, 即 $\frac{dN_A}{dt} = 0$, A 上的稳态居布数为 $N_A^* = \frac{K_{BA}}{K_{AB} + K_{BA}}$ 。

激发光将 B 态粒子激发到 A 态后, 我们感兴趣的是受激发射损耗光将 A 态上的分子激发到 B 态上。跃迁几率 $K_{AB} = \sigma I$, σ 是分子的吸收截面, I 是 STED 光的光强。因此, 如果 $I \gg I^{sat} = K_{AB} / \sigma$, 则 $N_A^* \rightarrow 0$, 这时所有的粒子将终止在 B 态。

若在 r_0 处光强为零, 而其它空

间光强分布 $I(r) \gg I^{sat}$, 即除了 r_0 处, 所有的粒子都终止在 B 态, 因此能得到 A 态上非常尖锐的光强分布区域。更规范的表达为 $I(r) \gg I^{sat} f(r)$, 这里 $f(r)$ 是衍射极限空间函数, 在理想情况下 $f(r=0) = 0$ 。当 $I^{max} \rightarrow \infty$ 时可以发现 A 态上的光子被压缩到一点。若 I^{max} 和 I^{sat} 是有限的, 则 $f(r)$ 的细节不可忽视。例如, 平面波的衍射极限空间函数为 $f(r) = \sin^2(2\pi x/\lambda)$, A 态上能产生的焦斑的最小半高全宽是 $\Delta x = \frac{\lambda}{\pi n} \arcsin(\sqrt{\frac{K_{BA}}{\sigma I^{max}}}) \approx \frac{\lambda}{n\pi\sqrt{\zeta}}$, 式中的 $\zeta = I^{max} / I^{sat}$ 被称为饱和因子。若 $\zeta = 1000$, 则 $\Delta x = \lambda/100n$ 。

原则上增加光强可以连续压缩 A 态上的粒子数。即增大光强, 相应地增加了 ζ , 压缩了焦斑的

最小半高全宽度,从而提高了分辨率。下面论述光强与分辨率的关系。

图2显示了初始时刻分子均匀分布的激发态 $[n_2(\nu, t=0)=1]$,经一束(时间和空间的)高斯型的STED光作用后,留下的损耗区域 Ω 。 n_2 是图1中的 L_2 (荧光态)能级上的粒子数概率, $\nu=2\pi N.A./\lambda_{exc}$ 是焦平面的光学量。 $n_2(\nu)$ 是在峰值光强分别为 $I_{STED}^{max}=3.4, 34, 170, 1300 \text{ MW/cm}^2$ 时收集的,分别对应于图2中的曲线a、b、c、d。假设波长 $\lambda_{STED}=600\text{nm}$,吸收面积 σ_{23} 为 10^{-16} cm^2 。图2显示出随着STED光强的增加,损耗区域在直径上增加,损耗效率增大并且具有更陡峭的边缘特征。曲线c、d的陡峭边缘允许对激发的点扩散函数PSF有强烈的限制。因而增大STED光强可以有效压缩中心斑的尺寸,提高分辨率。

由于STED依赖光学的饱和跃迁,它的空间分辨率是由可获得的饱和程度决定的。由饱和带来的非线性的强度依赖关系与 m -光子激发、第 m 次谐波、相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)等几种非线性关系是完全不同的。在后几种情况下,非线性信号来源于多个光子在同一样品同一时刻的相互作用,这就需要高的聚焦强度。相比之下,由饱和与损耗带来的非线性起源于相关态布居数的变化,这是有可能在低强度实现的。据报道,随着 I_{STED} 增加到 100 MW/cm^2 ,饱和因子可增大到 $\zeta \approx 120$ 。尽管有初步的证据证明:随着光强的增加,某些采用荧光标记的样品会产生非线性递增的光致漂白。但是因为它的人射光强要比多光子显微术的小2~3个数量级,目前应用的STED光强不会损坏活细胞的成像。

由STED的原理可知,要达到高效的损耗效率,不仅与光强密切

相关,还必须在激发光脉冲和受激发射光脉冲间选择合适的延迟时间 Δt 。通常 τ_{fluor} 达到几纳秒, τ_{vibr} 为1~5ps。在激发后的几个皮秒内,分子弛豫到激发态,这是真正的荧光态 S_1 ,要选择STED光使得通过受激辐射,能有效地猝灭荧光态的分子。第一,为了允许分子振动弛豫到荧光态,我们利用光学延迟确保STED脉冲迟于激发脉冲几个皮秒到达焦点。第二,由于受激发的分子被猝灭到基态 S_0^0 , τ_{vibr} 决定了 S_1 能被损耗的几率,所以STED光可以直接利用皮秒脉冲光或者利用光栅将飞秒脉冲光展宽到几十至上百个皮秒,并将其波长选择在荧光发射谱的红边,这样可避免STED光的重激发。这个展宽允许快的振动弛豫耗尽,将分子倒空到基态 S_0^0 ,使得荧光态的损耗过程非常有效。

当STED光消失时, $N(t=\tau, h_{STED})=N_0 \exp(-k_{fl}\tau - \sigma h_{STED})$, N_0 是被激发后 S_1 上的粒子数, k_{fl} 为辐射弛豫几率, σ 是受激发射的吸收截面。 $h_{STED}(\mathbf{r})$ 是STED的单脉冲单位面积的光子的点扩散函数。所以荧光被限制的倍数为

$$\eta = \frac{h_{max}^{eff}}{h_{max}^{conf}} = \frac{\int dt \times N[t, h_{STED}(\mathbf{r})]}{\int dt \times N(t, 0)} = \exp[-\sigma h_{STED}(\mathbf{r})]$$

由上式可见,STED不仅有其时间特性,还有其空间特性。最好的压缩光斑, $h_{STED}(\mathbf{r})$ 需要在 $\mathbf{r}=0$ 处为零,而其他地方有很高的值,即是有中心零点。数学表达式为

$$h_{STED}(\mathbf{r}) = \begin{cases} 0 & \mathbf{r}=0 \\ \gg 0 & \text{其他} \end{cases}$$

这保证通过损耗后,外围的荧光被强烈地损耗而留下中心的荧光 Ω 。譬如通过利用平面波,得到最小的半高全宽约为 $\lambda/(4n)$,但在一些极小值处仍残留有荧光。为了只得到一个极小值,即中心零点的 $h_{STED}(\mathbf{r})$,可以采用大数值孔径角的物镜或对称的4Pi显微镜。并且在STED光路中引入位相板,改变入射平面波的波前分布,以此来模糊两旁的极小值,而留下 $h_{STED}(0)=0$ 。满足空间分布的可以是环形光斑 Ω 或者只有一个局部光强最小的平面波 Ω ,从而将焦斑尺寸有效压缩。

3 实验装置及结果

Hell S W小组已经能够根据要求利用STED实现对单分子成像。例如采用波长635nm和781nm的半导体激光器作为激发光和STED光,在单分子的实验中可以实现 $28\text{nm}(\sim\lambda/25)$ 的横向分辨率以及分辨焦平面上相距62nm的两个同类的粒子。

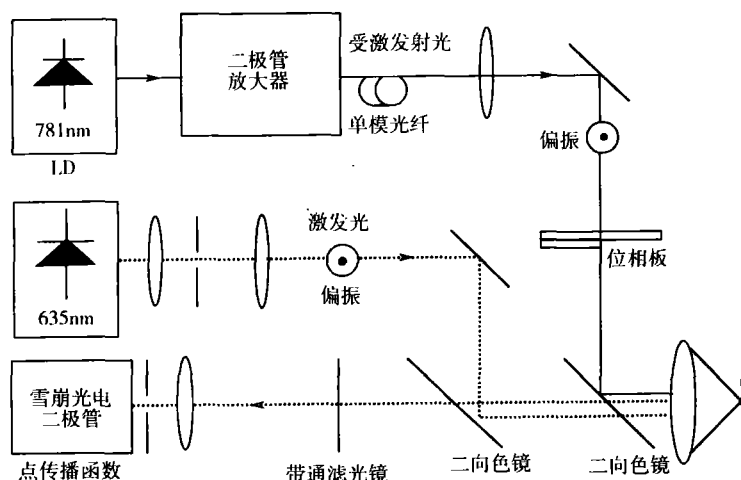


图3 二极管放大的STED显微镜^[9]

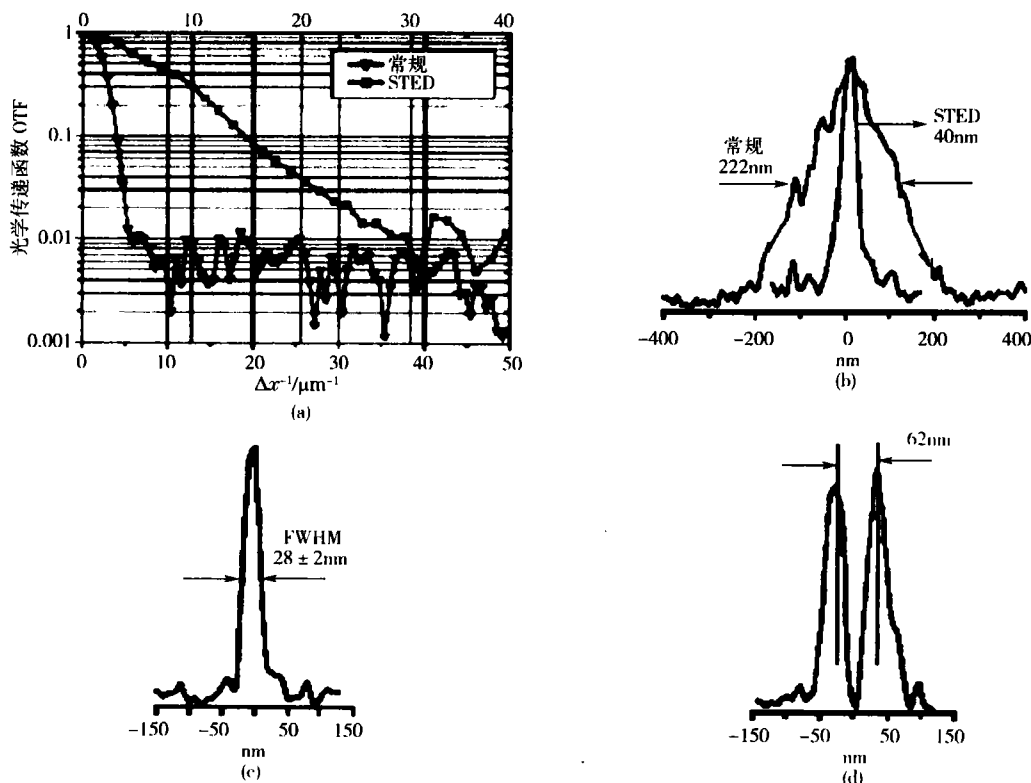


图 4 (a)传统的与 STED 显微镜的 x 轴的光学传递函数 OTF; (b) 传统的和 STED 的单个分子的轮廓图; (c) 经过线性去卷积后的 STED 的单个分子的轮廓图; (d) 经过 Wiener 滤波后的两个相邻分子的轮廓图^[6]

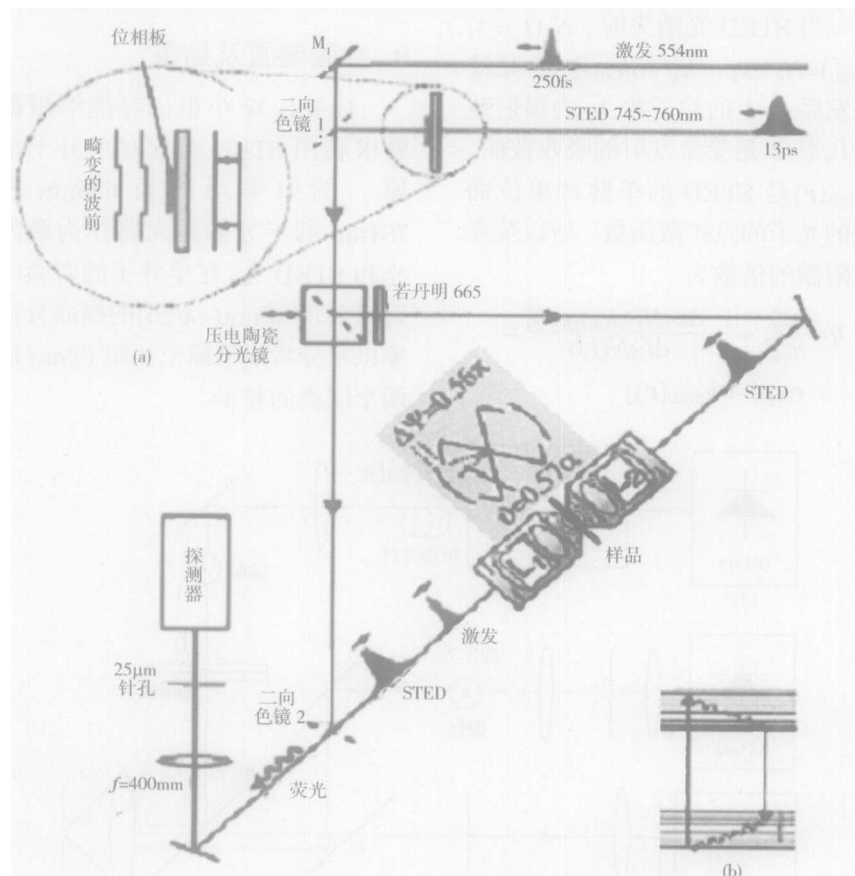


图 5 STED-4Pi 显微镜实验装置图。(a) 被测样品放置在 4Pi 显微镜的两个物镜的焦平面上; (b) 荧光能级图^[7]

图 3 中, 由半导体激光器发出的 637nm 的光作为激发光, 通过空间滤波和扩束后充满物镜, 在焦平面留下大的聚焦圆斑。由另一台半导体激光器发出的 781nm 的受激发射光通过二极管放大和单模光纤的空间滤波后入射到相位板, 在焦平面干涉相消, 形成横向上中心极小两边极大的 STED 光斑。发射的荧光经过 2 个二向色镜和带通滤光镜, 再由雪崩光电二极管收集。

数据表明用 781nm 波长的 STED 光, 得到的 STED 显微镜的带宽是传统显微镜的 6 倍, 即分辨率提高 6 倍, 并且能够在焦平面获得 28~40nm 的横向分辨率, 约为 $\lambda/25$, 突破了衍射极限^[6], 达到分子量级分辨率。

起初的 STED 主要用于突破横向衍射极限, 而轴向分辨率还较低, 因为有限的孔径角导致轴向分辨率降低。近来将 STED 和 4Pi 显

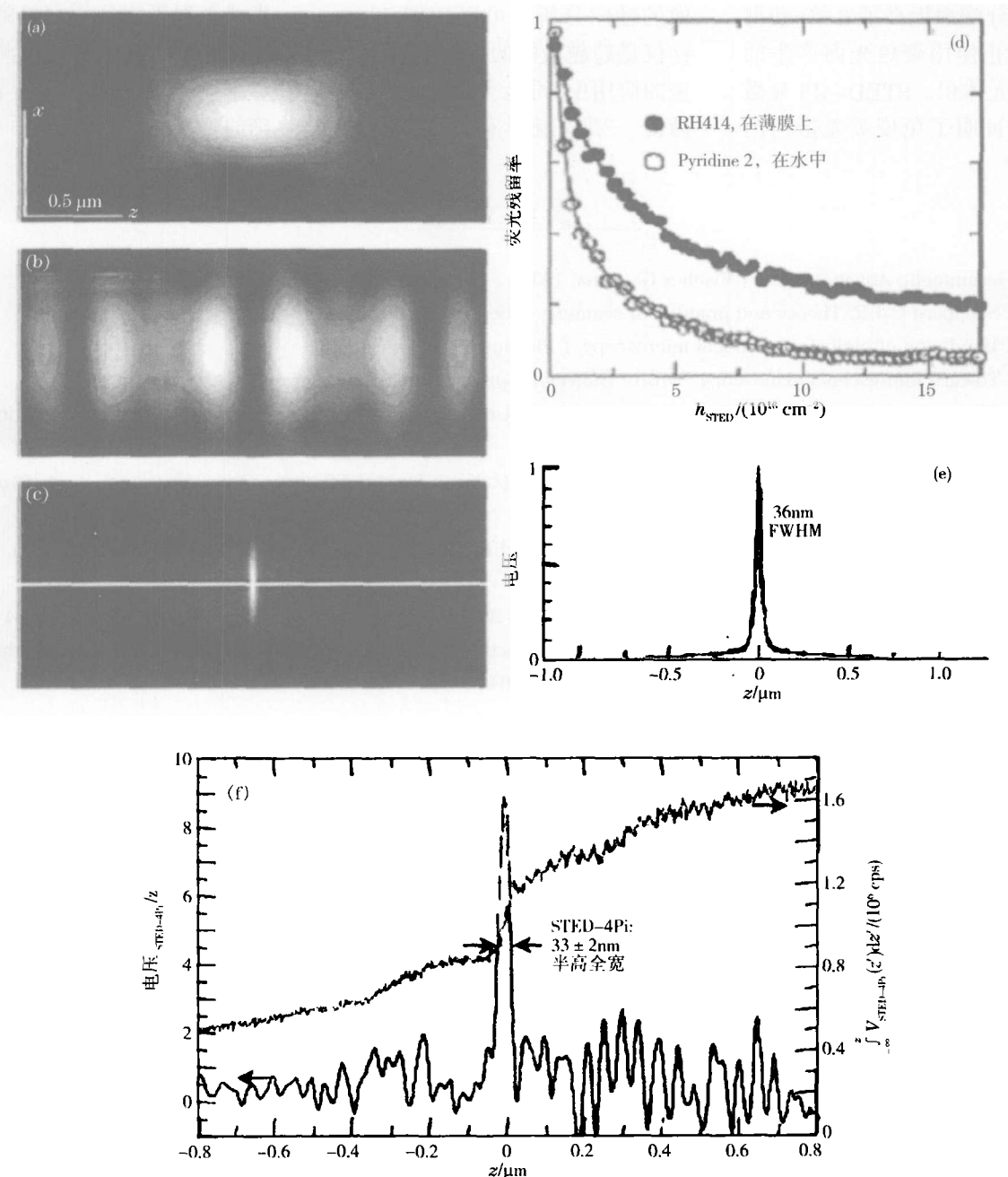


图 6 各种点扩散函数(SPF)的分布:(a) 激发光的 PSF;(b) STED 光的 PSF;(c) STED-4Pi 的 PSF。(d) 收集的荧光与 STED 光强的函数关系;(e) 无限薄的荧光平面产生的 z 轴的电势分布;(f) 油浸透镜下, z 轴的电势分布

微术互补性地结合,在 STED 技术上扩大了有效孔径角。据报道,已经在聚焦光显微术中获得 28~40nm 的轴向分辨率。

图 5 中,光经由物镜 L_1 激发样品并被探测,而两束受激发射光相对传播,通过两个反向的物镜 L_1 和 L_2 聚焦到样品上。图 5 中的插图是用位相板来改变 STED 光的波前。而样品的成像通过两个物镜的亚

衍射尺寸的光斑来扫描样品而实现^[7]。

Hell 小组利用以上装置,在 $h_{STED}^{max} = 7.3 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$, $\lambda = 760 \text{ nm}$ 油浸透镜的实验条件下得到了 $33 \pm 2 \text{ nm}$ 的轴向分辨率,这个测量结果与预期结果是相吻合的。

图 6 中的(c)、(f)以 z 轴的电势分布反映的纵向分辨率,它表明系统的焦斑半高全宽 (FWHM) 达到

33nm($\sim \lambda/23$),突破衍射极限。

4 结论

总而言之,在上述 STED 突破衍射极限概念的指导下,已经在单荧光分子实验(简单固定标本实验及活生物标本实验)中成功地突破了衍射极限,并且是非接触成像,光强适度,不会对样品产生光损伤。目前,STED 显微术的分辨率比

衍射极限分辨率提高了6倍,获得了目前为止使用聚焦光而产生的最小的荧光体积。STED-4Pi显微镜第一次证明了免疫荧光蛋白图

像的轴向分辨率可以达到50nm,这仅是超越极限的一个起点,在未来的应用中,可能会在抽运探针显微镜、三维光化学和数据存储中引

进亚衍射极限分辨率显微术,而且还可望对单分子进行探测、定位,对细胞间和蛋白质进行详细而精确的观察。

参考文献

- 1 Abbe E. *Gesammelte Abhandlungen.* (Fischer G., Jena, 1904)
- 2 Wilson T, Sheppard C J R. *Theory and practice of scanning optical microscopy.* (Academic Press, New York, 1984)
- 3 Pawley J. *Handbook of biological confocal microscopy.* (Plenum, New York, 1995)
- 4 Hell S W. *Toward fluorescence nanoscopy.* *Nature Biotechnology*, 2003, **21**:1347~1355
- 5 Hell S W, Wichmann J. *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission:stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy.* *Opt. Lett.*, 1994, **19**(11):780~782
- 6 Westphal V, Kastrop L, Hell S W. *Lateral resolution of 28nm ($\lambda/25$) in far-field fluorescence microscopy.* *Appl. Phys. B*, 2003, **77**:377~380
- 7 Dyba M, Hell S W. *Focal Spots of Size $1/23$ Open Up Far-Field Florescence Microscopy at 33 nm Axial Resolution.* *Phys. Rev. Lett.*, 2003, **88**(16):163901(1~4)
- 8 Klar Thomas A, Hell S W. *Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy.* *Opt. Lett.*, 1999, **24**(14):954~956
- 9 Klar Thomas A, Engel Egbert, Hell S W. *Breaking Abbe's diffraction resolution limit in fluorescence microscopy with stimulated emission depletion beams of various shapes.* *Phys. Rev. E*, 2001, **64**:066613(1~9)

(上接第59页)

- 6 Stokowski S E. *Laser Glass: An Engineered Material.* LLNL Report, UCRL-96331, 1987
- 7 Ehrmann P R, Campbell J H. *Nonradiative energy losses and radiation trapping in neodymium-doped phosphate laser glasses.* *J. Am. Ceram. Soc.*, 2002, **85**:1061~1069
- 8 Campbell J H, Suratwala T I, Thorsness C B *et al.* *Continuous melting of phosphate laser glasses.* *J. Non-Cryst. Solids*, 2000, **263-264**:342~357
- 9 Ehrmann P R, Carlson K, Campbell J H. *Neodymium fluorescence quenching by hydroxyl groups in phosphate laser glasses.* *J. Non-Cryst. Solids*, 2004, **349**:105~114

(上接第35页)

- 3 White R L. *Image restoration using the damped Richardson-Lucy method.* *Proc. SPIE*, 1994, **2198**: 1342~1348
- 4 Cafer Charlene E. *Temporal filtering for point target detection in staring IR imagery: I. Damped sinusoid filters.* *Proc. SPIE*, 1998, **3373**: 111~122
- 5 Chalmond B. *PSF estimation for image deblurring.* *CVGIP*, 1991, **53**(4): 364~372
- 6 Tan K. Chye, Lim H, Tan B T G. *Restoration of real-world motion-blurred images.* *CVGIP*, 1991, **53**(3): 291~299
- 7 Azriel R, Avinash C K. *Digital Picture Processing.* New York: Academic Press, 1982. 225~240
- 8 Mesarovic V Z, Galatsanos NP. *Regularized constrained total least squares image restoration.* *Image Processing, IEEE Transactions on*, 1995, **4**(8): 1096~1108