

受激发射损耗显微术及扩展技术

杨 鹏^{1,2} 艾 华¹

(¹ 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 吉林 长春 130033; ² 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 受激发射损耗(STED)显微术利用荧光饱和与激发态荧光受激损耗的非线性关系,并通过限制受激辐射衰减的区域,减少荧光光斑大小,获得小于衍射极限的发光点来提高系统分辨率,从而突破远场光学显微术的衍射极限分辨率限制来实现无接触三维成像。基于受激辐射损耗抑制的物理过程,论述了发生损耗抑制的工作机理和工作条件,介绍了STED系统的分辨率及系统组成,并详尽综述了双光束、双光子、双色、4Pi及松散三重态等STED最新拓展应用技术。最后说明了最新激光技术的进展为开发实用STED技术提供保证,展望了该技术未来发展的重点及应用前景。

关键词 生物光学;受激发射损耗;分辨率;超连续激光

中图分类号 O437 文献标识码 A doi: 10.3788/LOP48.051801

Stimulated Emission Depletion Microscopy and Its Extendible Development

Yang Peng^{1,2} Ai Hua¹

¹Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun, Jilin 130033, China
²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract Technology of stimulated emission depletion (STED) fluorescence microscopy utilizes the nonlinear relationship between the fluorescence saturation and the excited state stimulated depletion with nano-scale resolution. It implements the 3D imaging and breaks the diffraction barrier of the far-field light microscopy by restricting depletion zone at a sub-diffraction spot. Based on the physical process of STED, inhibition mechanism of stimulated emission and working conditions of depletion are reasonably elaborated. The resolution of STED system and components are described. The STED microscopy has developed with many extendible technologies, such as two-beam, two-photon, dual-color, 4Pi and triplet-state relaxation. Finally, the latest laser technology related to STED, and the application prospect of STED microscopy are introduced.

Key words bio-optics; stimulated emission depletion; resolution; supercontinuum laser

OCIS codes 180.2520; 180.4315; 180.1790

1 引 言

远场光学显微术的空间分辨率受到衍射极限的限制是一个非常突出的物理难题,它极大地影响了其他学科的发展,特别是在生物学领域。根据阿贝(Abbe)原则可知,显微镜的聚焦光斑尺寸为 $\Delta r = \lambda / (2 n \sin \alpha)$ (即最小分辨率, λ 为光源波长, $n \sin \alpha$ 为数值孔径),这已经达到了衍射理论的最小聚焦光斑尺寸^[1]。虽然减小波长和增大孔径角都能减小聚焦光斑尺寸,但受光源波长和孔径角实际条件的限制,不可能有效地提高显微镜的分辨率。而现代生物医学研究中为了更好地理解生物生命的作用过程和疾病的产生机理,需要观察细胞器在三维细胞空间的精确定位和分布,反映这些体系性质的特征尺度都在纳米量级,远远超出了常规的光学显微镜(激光共聚焦显微镜)的分辨极限(横向分辨率 200 nm,轴向分辨率 500 nm)^[2]。

1994年,Stefan W. Hell等^[3]提出受激发射损耗(STED)荧光显微术,该技术可突破远场光学显微术衍

收稿日期: 2010-08-09; 收到修改稿日期: 2010-12-15

作者简介: 杨 鹏(1981—),男,博士研究生,主要从事光电位移测量方面的研究。E-mail: rocyangpeng@163.com

导师简介: 艾 华(1961—),男,研究员,博士生导师,主要从事光电位移、激光信息载波技术及激光共聚焦技术等方面的研究。E-mail: aih@ciomp.ac.cn(通信联系人)

射极限制来实现三维成像。其基本原理是利用荧光饱和与激发态荧光受激损耗的非线性关系,通过分子态的饱和损耗物理过程来减少激发光的光斑大小,从而获得很小的有效点扩散函数半峰全宽(FWHM)来提高分辨率,可以实现空间各个方向上的纳米级分辨率。Hell小组利用该技术对生物样品成像,极大地突破了衍射极限的限制,获得了33 nm的轴向分辨力^[4]和5.8 nm的横向分辨力^[5]。最近,随着对STED技术研究不断深入,科研人员对STED显微术功能不断完善,并同其他显微技术相结合,推出了双损耗光束、4Pi、双光子、双色及松散三重态等STED扩展技术,为该技术走向实际开发应用铺平道路。

2 STED 系统

2.1 STED 原理

受激发射损耗原理是根据爱因斯坦的受激辐射放大理论^[6]得出的,如图1(a)所示。初始时刻荧光分子基本上分布在基态 S_0 的低振动能级 L_0 上,首先采用一束超短脉冲激光将艾里斑区域内的荧光分子激发至激发态 S_1 的上能级 L_1 ,电子很快通过振动弛豫至第一激发态的最低振动能级 L_2 。此时用一束具有特定波长和圆环形焦斑形状的STED激光诱导荧光态粒子,使荧光态上粒子受激发射损耗跃迁至 L_3 ,同时产生两个和STED光波长、行进方向、偏振方向和相位一致的光子。环形焦斑中心处STED光强度为0,其中的荧光态粒子发射荧光后分布于基态的各个荧光下能级,最后弛豫到 L_0 。其中损耗区域由STED光焦斑形状决定,可把发射荧光区限制在小于衍射极限区域内,获得了1个小于衍射极限的荧光发光点,突破了远场显微镜衍射极限的限制^[7]。文献[3]基本的实现过程如图1(b)所示,是用一束激发光使荧光物质发光的同时,用另外的高能量脉冲激光器发射一束相邻的环型波长较长的激光,将第一束光斑中大部分的荧光物质通过受激发射损耗过程淬灭至基态,并通过限制受激发射抑制的区域,获得小于衍射极限的发光点,显著地提高了显微镜的分辨率。

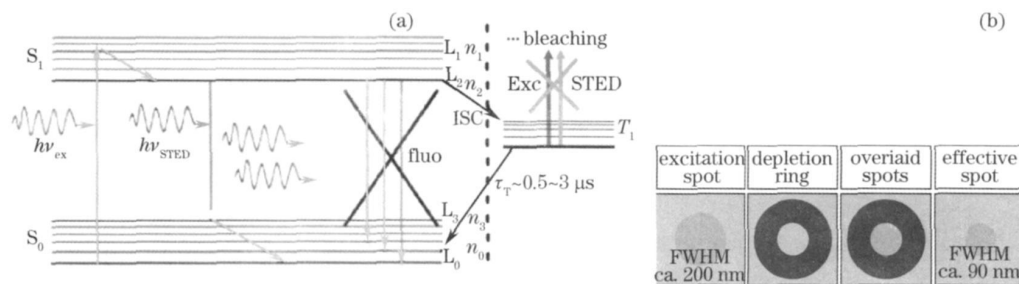


图1 (a) 受激辐射损耗能级图;(b) 受激发射损耗荧光显微术的原理图

Fig. 1 (a) Energy levels of stimulated emission depletion; (b) principle of STED fluorescence microscopy

由图1(a)可知,要抑制荧光的产生,就要抽空处于激发态能级 L_2 的荧光态粒子,并使其回到基态 L_0 。但 L_2 上粒子受激发射损耗与激励、自发辐射等三项存在竞争机制,第一项来自能级 L_1 的弛豫,第二项是来自能级 L_2 的自发衰减(荧光自发辐射和荧光猝灭),第三项是 L_3 能级粒子的重新激励。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^[6],STED光对荧光分子产生的 $L_3 \rightarrow L_2$ 受激吸收过程和 $L_2 \rightarrow L_3$ 受激发射过程是等概率的,所以要保证 L_3 上的粒子不能再被重新激励至能级 L_2 上。从上述关系可知,发挥损耗抑制荧光的作用,又要保证 L_3 上的粒子不被重新激发,对激光脉冲的选择是非常苛刻的,要满足以下3个条件:1)光谱的匹配性,激发光、STED光及荧光物质的谱线相吻合;2)要采用超高连续的激光脉冲,一般荧光寿命大约是2 ns,必须要在荧光自发辐射之前,将 L_2 上粒子受激发射至 L_3 能级上,所以损耗激光脉冲宽度要到亚皮秒级,同时要保证损耗激光脉冲宽度要大于 $L_3 \rightarrow L_0$ 振动弛豫时间 τ_{vb} (1~2 ps),使处于 L_3 能级的电子迅速耗尽,将分子倒空到基态 L_0 ,避免被激发回到 L_2 能级的电子的进行二次激发,从而使 $L_2 \rightarrow L_3$ 的受激发射过程占绝对的优势。所以一般情况下选择激发光脉宽约为50 ps,STED光脉宽约为200 ps;3)激发光和STED光要保持严格的时间同步性,必须确保两者之间要有合适的延迟时间 Δt 。荧光物质在激发后的几个皮秒内,分子弛豫到激发态 L_2 ,立即选通STED光进行受激发射,允许快的振动弛豫耗尽,将分子倒空到基态,使得荧光态的损耗过程非常有效^[8,9]。另外如图1(a)所示,由于电子在激励跃迁的

过程中,可能伴随一定的自旋解禁,有一定系间跨越(ISC),由单重态变为三重态,处于三重态上的粒子如果受到激发(STED光或激发光),会发生荧光漂白,这个过程是不可逆的,影响到荧光的发光效果,会削弱系统的分辨率^[10]。三重态是一个暂稳态,它会发射出磷光并回到基态,时间在微秒级。为了提高分辨率,降低或消除光漂白现象,其中重点是避免产生三重态,也就是确保2个连续脉冲波的间隔大于荧光体所激化的超稳定黑暗态的平均存在时间(即磷光寿命和弛豫回到基态所需时间和)。由于这种黑暗态存在的平均时间在微秒量级,只要脉冲对的重复频率小于1 MHz,就可以确保这种黑暗态在随后的2个连续脉冲到达前松散^[11]。

2.2 STED系统分辨率

在采用方波STED光近似下,设荧光受激发射截面系数为 σ ,STED光在物镜焦平面上光场分布函数为 h_{STED} ,其不仅有时间特性,还有空间特性。最好的压缩STED光斑,使 $h_{\text{STED}}(r, t)$ 在 $r=0$ 处为0,而其他地方有很高的值,即有中心零点^[7]。其数学表达式为

$$h_{\text{STED}}(r, t) = \begin{cases} 0, & r = 0 \\ \geq 0, & \text{other} \end{cases} \quad (1)$$

第一激发态最低能级电子分布数 n_2 正比于 $\exp(-\sigma h_{\text{STED}})$,可知荧光态粒子被激发的效率与STED光强为非线性关系,具有饱和的特征,这正是STED显微术突破Abbe分辨率极限的关键所在^[12]。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,横向分辨率表达式为

$$\Delta r = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + I_{\text{max}}/I_{\text{sat}}}} \quad (2)$$

式中 $n \sin \alpha$ 为物镜数值孔径, I_{max} 为系统所能允许的STED光强度极大值, I_{sat} 为荧光分子饱和激发光强,二者之比定义为饱和因子 ζ , λ 是STED光的波长,因为环形损耗抑制光圈形状和大小是由STED光干涉图样决定的。饱和激发光强 $I_{\text{sat}} = 1/(\sigma\tau)$ 是一个特征值,与荧光物质粒子的定向分布和分子转动,以及与STED光的波长、瞬时结构及偏振态有关。假设荧光寿命 τ 约为 10^{-9} s,截面系数 σ 约为 10^{-6} cm²,初步估算 I_{sat} (按光子数计算)约为 3×10^{25} cm⁻²·s⁻¹,约为3 MW/cm²。从上式可知,虽然激发光和STED光都受衍射极限的限制,但分辨率却不受衍射极限限制,只与STED光强有关,如果能允许无限增大光强,荧光发光点可以无限接近于0,这样系统分辨率就没有任何极限。但是增加STED光强会引起光漂白和光损伤,一般情况下系统允许STED光的最大光强约是 I_{sat} 的100倍,即饱和因子 ζ 为100,系统的分辨率可比衍射极限提高1个数量级,达到几十纳米级的水平^[13,14]。

2.3 STED系统组成

一个典型的STED显微成像系统主要由以下几个部分组成:超连续激光器、共聚焦显微镜、纳米平移台、APD探测器、时间相关的单光子计数器(TCSPC)及分析软件。如图2所示,激发光经过光学系统后,在物镜焦平面上形成一个艾里斑。STED光经过一个螺旋线状相位板的调制后,具有 $\exp(i\varphi)$ 相位延迟($0 \leq \varphi \leq 2\pi$),在焦平面干涉形成一个环状光圈。这个光圈和激发光的艾里斑相叠加后,限定了只有位于光圈中心的荧光物质可以激发出荧光,这个荧光发光斑点远远低于衍射极限,其峰值半峰全宽可以达到16 nm^[15]。

STED显微镜的分辨率主要是由有效荧光光斑的大小及损耗效果决定的。可以通过各种措施改善STED光在焦平面相干形成的抑制光圈的干涉对比度及中心强度分布,通过改善影响相干的条件,压缩荧光光斑的大

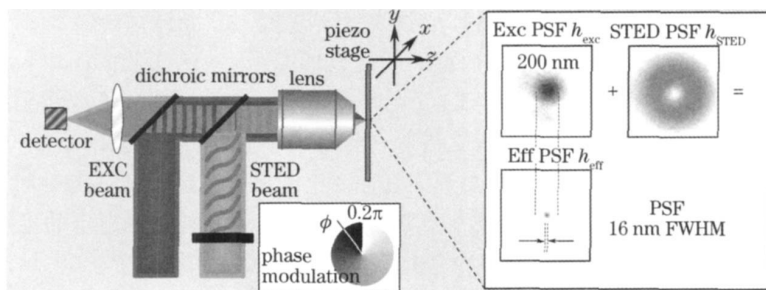


图2 STED显微镜原理示意图

Fig. 2 Setup of the STED microscope

小,尽可能提高横向和轴向抑制比。影响相干抑制的因素有 STED 光的光强、偏振态和脉宽,激发光的强度和脉宽、相位板以及系统像差和脉冲延迟,可通过相关的措施改善抑制效果,提高系统的分辨率^[16]。

3 STED 扩展技术

STED 技术通过抑制荧光发光光斑的大小来提高系统的分辨率,从而打破了衍射极限的限制,成为生命科学领域里重要的观测手段。随着对 STED 显微术科研深入,STED 技术不断完善,并同其他显微镜技术相结合,使 STED 显微术得到更深层次的拓展。

3.1 双损耗光束 STED

STED 光并非完全的线偏振光,其偏振态影响抑制光圈的分布,进而影响到系统的分辨率。为了提高系统的分辨率,同时消除 STED 光偏振态对干涉的影响,Hell 小组采用了双损耗光 STED 技术。如图 3 所示,该系统结构与 Mach-Zehnder 干涉仪相似。STED 光经过偏振分光棱镜(PBS)分为振幅相等偏振态互相垂直的 p 光和 s 光,通过各自对应的不同相位板调制后,再经过 PBS 合束进入系统,在物镜焦平面上干涉形成抑制光圈。损耗光经过不同的相位板调制后,在焦平面干涉形成的抑制图样也不相同。双光束 STED 系统采用 2 种相位板:一是在 $0\sim 2\pi$ 范围内变化的呈螺旋线状的相位板(VP),用以调制 p 光,可提高横向分辨率;二是中心相移为 π 阶梯型相位板(CP),用来调制 s 光,可提高轴向分辨率。图 4(b)和(c)分别表示模拟一束光分别经过 2 种不同相位板调制后,在焦平面上形成的干涉图样。从图中可以看出,采用 VP,光在 X-Y 平面上形成的干涉光圈中心零强度范围比 CP 形成得小,而且周围强度变化更锐利;而采用 CP 在 X-Z 平面上形成的中心零强度范围比 VP 形成得小,可有效地压缩轴向激发光斑,明显地提高轴向分辨率。采用双损耗光束 STED 技术既消除了偏振态对分辨率的影响,又通过分光束通过不同的相位板调制后,有效地提高横向及轴向分辨率,分别达到 25 nm 和 100 nm 的水平^[12,17]。

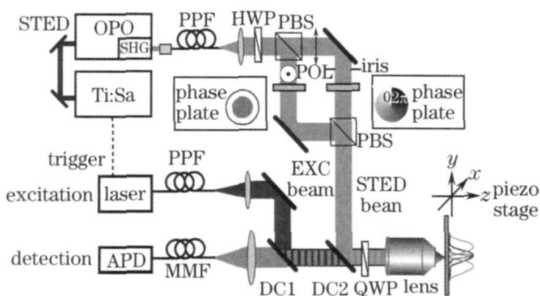


图 3 双 STED 光束原理图

Fig. 3 Two STED beam setup

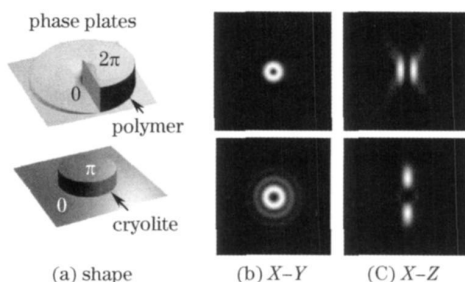


图 4 2 种不同相位板干涉图样分布图

Fig. 4 Different depletion pattern of two phase plates

3.2 双光子 STED

通常双光子激发(TPE),荧光分子需要同时吸收 2 个较低能量(即更长的波长)的光子,发射出一个波长较短的光子。同单光子激发(SPE)相比,采用受散射影响较小的长波光长,对细胞产生的毒性小,易穿透厚的标本。TPE 需要很高的光子密度,并且只有在焦平面上才有光漂白和光毒性,同时它不需要共聚焦针孔,提高了荧光检测效率。所以双光子显微镜比普通显微镜更适合用来观察厚标本、活细胞,或用来进行定点光漂白实验。

鉴于 TPE 的明显优势,2009 年 Hell 小组成功地将双光子荧光显微术与 STED 显微术结合,推出了 TPE-STED 显微术。同 SPE-STED 相比,TPE-STED 这种组合在激光光源的选择上严格得多,要同时满足 TPE 及 STED 的要求。从光物理学的角度来看,TPE-STED 显微术最为理想的光源应包括高峰值可见脉冲 STED 光以及与其同步的亚皮秒级的激发光。系统为实现 2 种波长灵活独立的调节,需要 2 个锁模系统分别调节 TPE 及 STED 光源的波长,使二者同步,但这样复杂的激光光源组合是十分昂贵的。虽然高峰值的脉冲激光有很多的优势,但在技术实现上有困难,连续波(CW)激光由于它不需激发光,且 STED 光束同步,可用作 STED 光。如图 5 所示,Hell 小组在这里采用的是一种简易的 TPE-STED 组合,使用短脉冲激光(波长 $\lambda = 1060$ nm)作为 TPE 光源,CW 激光(波长 $\lambda = 676$ nm)作为 STED 光源,减小了双光子显微术中

激发荧光点的大小, 可以使焦平面上的分辨率达到 50 nm 以下, 相当于在 TPE 显微术分辨率的基础上提高 5.4 倍, 或者说使聚焦点的大小缩小了 3.4%^[18, 19]。

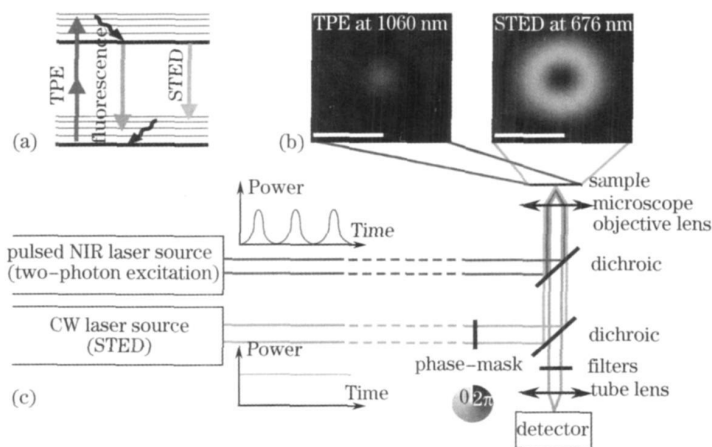


图 5 双光子 STED 显微术原理图

Fig. 5 Principles of the reported implementation of TPE-STED microscopy

实验中, STED 光束分布是影响 TPE-STED 分辨率的主要因素, STED 光束中心的分散状况将会直接影响荧光光斑的大小。通过技术优化、波长及样品选择可减小随样品厚度增加而荧光强度降低的影响, 进而能最大程度观察厚样品。通过提高激发光的频率, 使用能量更低及波长更短的 STED 光也可以提高分辨率。结合了 TPE 及 STED 的优点, Hell 小组证明了 TPE 显微术分辨率的限制可以通过与 STED 的结合来突破, TPE-STED 比 SPE-STED 显微术能够穿透更深的部位, 且 TPE-STED 中焦平面外的漂白要比 SPE-STED 低。目前, 激光技术以及高能固态 CW 激光光源的发展将会为 TPE-STED 显微术带来更多合适的荧光物质与激光波长组合^[20]。

3.3 4Pi-STED

Stefan Hell 于 20 世纪 90 年代初, 提出 4Pi 结构显微术。由瑞利判据可知, 增加物镜的接收角[即数值孔径 (NA)], 可以减小点扩散函数的尺度而提高分辨率。Hell 利用这一概念, 在样品两侧各放置 1 个物镜, 使总的接收空间立体角接近 4π , 故称 4Pi 技术。4Pi 显微技术采用激光聚焦干涉照明样品, 信号光干涉成像, 将轴向分辨率提高 5~7 倍。从频域分析而言, 总立体角接近 4π 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得高频空间信息^[21]。

Hell 小组又利用 4Pi 技术提高轴向分辨率的优点, 同 STED 技术相结合, 推出了 4Pi-STED 显微术。如图 6 所示, 4Pi-STED 采用单向激发光激励, 双向 STED 光损耗抑制。激发光采用波长为 554 nm, 脉宽为 250 fs 的激光。STED 光由飞秒激光器产生, 经过脉冲扩展后至 13 ps, 波长为 745 nm 的激光。STED 光经过中心相移为 π 阶梯型相位板调制后, 经由二色镜 (DC1) 与激发光合束。合束后的光通过等振幅偏振分光棱镜 (PBS), 把激发光和 STED 光都分为振动方向互相垂直的两路线偏振光。一路线偏振光 (包括激发光和 STED 光) 经过二色镜 (DC2) 和物镜 (L1) 聚焦在样品上, 分别用于激发荧光和产生干涉抑制图样; 另一路线偏振光经过一个长波滤波片 (RG665) 后, 滤掉激发光, 只有 STED 光经物镜 L2 在样品上产生干涉抑制图样。利用 4Pi 技术, 采用双向 STED 光干涉形成的抑制图样, 不仅有效地

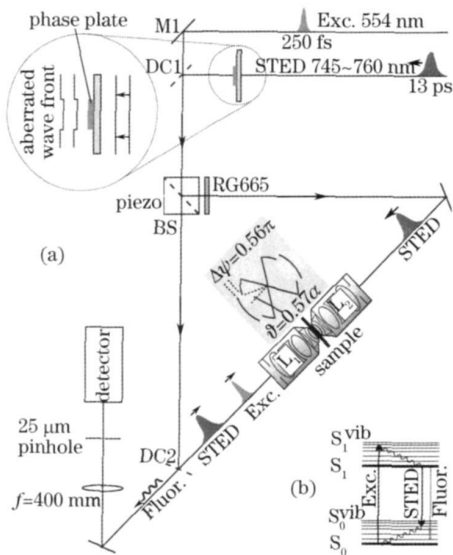


图 6 4Pi-STED 显微镜结构图

Fig. 6 4Pi-STED setup

压缩了横向荧光光斑,特别显著地压缩了轴向荧光发光光斑,使轴向分辨率达到 33 nm,这是远场光学显微镜所能分辨出来的最小轴向距离^[4]。根据光物理学原理可知,当采用偏振态相同的激发光和 STED 光,对激化分布相同的荧光粒子有显著地去激发抑制效果,所以可通过引入相位调制技术及偏振态控制技术,保证两路 STED 光有相同的偏振态,这样既可以提高 4Pi 干涉对比度,又能提高抑制效果,减小中心极小值的剩余强度,进而提高了横向分辨率^[22-24]。

3.4 双色 STED

目前荧光显微镜已经具备同时观察 2 种乃至 4 种荧光物质分布的功能,能同时观察不同生理机制及不同物质之间的相互作用,成为现代生命科学领域的重要检测工具。为同时观察 2 种荧光物质的分布, Hell 研究小组结合双通道荧光显示技术,推出了双色 STED 技术,能在超分辨率的情况下同时观察 2 种荧光物质分布。由于需要双光路激发,双 STED 光抑制,系统对激发光、STED 光和荧光物质的匹配,激光的脉冲宽度及同步延迟有着苛刻的要求。如图 7 所示, Hell 小组采用波长分别为 488 nm 和 630 nm 的半导体激光器作激发光源,首先用一双频 Nd:YVO₄ 激光器去抽运锁模钛蓝宝石激光器(DPSS)产生波长 800 nm 的激光,经过一个再生放大器(RegA)后,再注入到光学参量放大器(OPA)中,生成波长为 600 nm、脉宽为 200 fs 的可见光,然后经过一个光栅系统进行脉冲扩展,使其达到系统所要求的 STED 光脉宽在亚皮秒级,最后经过空间调制器(SLM)进行相位调制后进入系统对波长为 488 nm 的激发光进行损耗抑制。其次,另一路 STED 光也是由双频 Nd:YVO₄ 激光器去抽运锁模钛蓝宝石激光器产生波长为 750 nm、脉宽为 120 fs 的激光,经过长距离单模光纤(SMF)后,将脉宽扩展至 200 ps,最后经过相位板相位调制后进入系统对波长为 630 nm 的激发光抑制损耗。两路 STED 光要和对应的激发光保持严格的时间同步,分时有序进行激发及抑制,从而两路同时获得很好的损耗抑制效果。Hell 小组采用双色 STED 技术,同时对两路激发光进行抑制,获得分辨率分别是 33 nm 和 31 nm 的双通道图像。但双色 STED 系统复杂、激光系统造价昂贵,还要涉及到经常性维护,严重制约了其技术推广和应用^[25-27]。

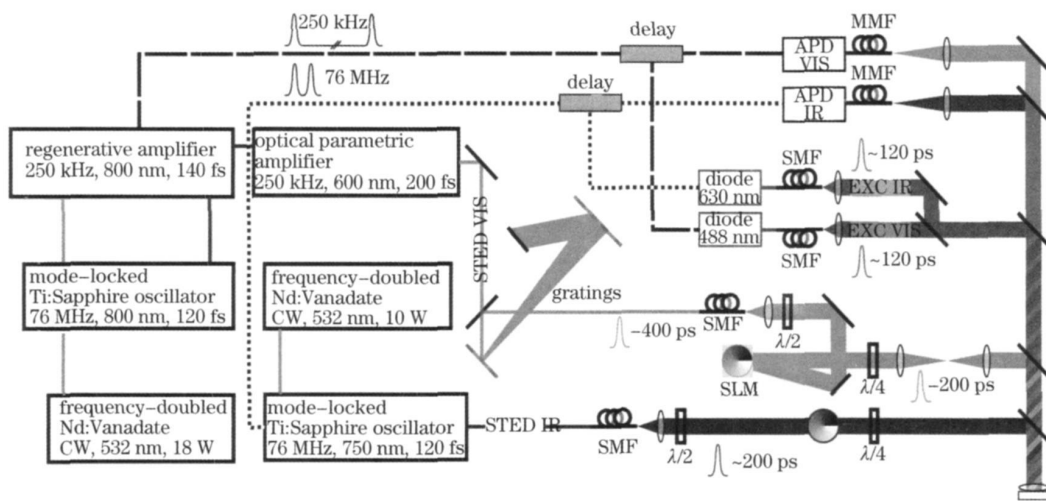


图 7 双色 STED 结构装置图

Fig. 7 Optical setup of the dual-color STED microscope

3.5 松散三重态 STED

如图 8(b) 所示,在能级跃迁的过程中,可能伴随重态的改变,电子由单重态变为三重态,处于三重态上的粒子容易发生荧光漂白,从而削弱了系统分辨率。为了提高分辨率,降低或消除光漂白现象,避免产生三重态, Hell 小组推出了松散三重态技术(T-R_{ex})技术。光漂白是产生黑暗态的主要因素,松散的三重态能减低荧光染料光漂白的形成。T-R_{ex} 要求确保 2 个连续脉冲对的间隔大于荧光体所激化的超稳定黑暗态的平均存在时间,一般平均时间在微量量级,只要脉冲的重复频率小于 1 MHz[如图 8(c) 所示],就可以确保这种黑暗态在随后的 2 个连续脉冲到达前松散^[27]。如图 8(d) 所示, T-R_{ex} STED 系统的激发光采用波长为 470 nm、脉宽为 80 ps 的半导体激光, STED 光与上述双色 STED 系统相似,唯一不同之处在于,通过严格的

时序触发关系, 保证 2 个脉冲对之间的间隔 $\Delta t = 4 \mu\text{s} > \tau$ (超稳定黑暗态的平均存在时间), 从而确保黑暗态在随后的脉冲对到达前消散。T-Rex STED 显微技术是高效的改良型 STED 显微技术, 通过优化不仅提高了系统所能允许的 STED 光的强度, 也削弱了荧光漂白影响, 使焦平面上分辨率达到 20 nm 水平。另外, Hell 小组在双色 STED 技术的基础上推出了双色 T-Rex STED 技术, 能同时获得分辨率达到 24 nm 左右的双通道图像^[26, 28, 29]。

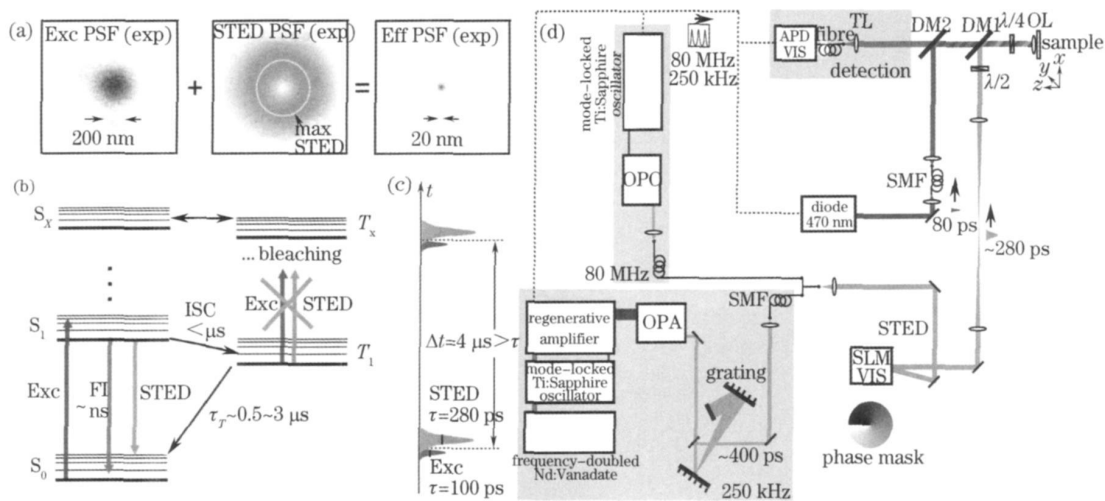


图 8 T-Rex STED 结构装置图

Fig. 8 Setup of T-Rex STED-microscope

4 关键技术

由受激发射损耗的机理可知, STED 显微术对激发光、荧光物质和 STED 光条件要求非常苛刻, 三者的相关能级一定要吻合, 严重限制了其使用范围和发展空间。未来需要在荧光物质、STED 光选取和生物医学相结合的方面上进行大量的研究工作, 发现更多的适用该机理的荧光物质和 STED 光。特别是系统的分辨率主要由 STED 光强决定, 研究光强与荧光漂白及光毒之间的关系, 有效地提高系统及生物所能允许的最大光强, 进而提高分辨率^[14]。

STED 显微术系统需要采用超连续、高能量的激发激光和 STED 光, 激发脉冲宽度一般在几十皮秒, STED 光一般在 200 ps 左右, 脉冲重复间隔要小于 1 MHz。通常是通过锁模的钛宝石激光光源振荡器抽运到可再生的放大器, 再输入 1 个光纤参量放大器来提供所需的可见光波长。但这样的设备在实用中要受到很大限制: 1) 整套激光器设备成本通常超过几十万美元, 不是一般单位所能承受的。2) 这套设备所提供的脉冲在 200~300 fs 之间, 而 STED 显微技术需要宽度在 0.1~2.0 ns 之间的脉冲。要缩小脉冲频宽差距, 需要安装光栅和其他光学元件, 随之会增加系统复杂性, 并要涉及到经常性的检查和系统维护, 这使得 STED 显微术难以普及应用^[20]。最近英国一家公司推出一款超连续光纤激光器, 可同时提供 STED 光和激发光, 为开发高效、经济实用的 STED 显微技术打开了大门。新型超连续光源拥有极大的光谱带宽, 能够在大范围的调谐 STED 光和激发光束来实现激发和损耗的最优化, 使 STED 技术拓宽覆盖更多种类的荧光染料。该超连续激光光源, 对能量谱密度和脉冲重复频率的标度能够分别提高成像分辨率和扫描速度, 在大约 20 nm 的带宽范围内, 提供大于 20 nJ 的能量强度, 可满足 STED 光所需的 10 nJ 高能量(1 MHz 重复频率)和 10 nm 带宽要求, 使 STED 光束中心焦点的能量强度达到吉瓦每平方米, 将图像分辨率有效提高到 30~50 nm 的水平。新型超连续激光器可以直接实现 T-Rex STED 技术, 而价格只有传统的 DPSS-RegA-OPA 系统的 1/10, 体积则更小^[30]。

5 结论

STED 远场显微术, 不仅具有共聚焦非接触三维成像的功能, 而且成功突破了衍射极限的限制, 将获得

广泛的应用。随着对 STED 显微术技术的研究不断深入,功能不断完善,以及目前激光器新技术的发展,为开发高效实用的 STED 技术提供了保证。特别在 2007 年,Leica 推出了一款成熟的 STED 技术产品(TCS STED),之后于 2009 年末又推出了采用连续光源的产品(TCS STED CW),这是世界上第一台分辨率达到 70 nm 的商品化光学显微镜。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该技术,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,在未来生物医学及生命科学领域发挥重要的作用。

参 考 文 献

- 1 E. Abbe. Contributions to the theory of the microscope and that microscopic perception[J]. *Arch. Microsc. Anat.*, 1873, **9**: 413~ 468
- 2 L Zhijian, Lu Jingze, Wu Yaqiong *et al.*. Introduction to theories of several super-resolution fluorescence microscopy methods and recent advance in the field[J]. *Prog. Biochem. Biophys.*, 2009, **36**(12): 1626~ 1634
吕志坚, 陆敬泽, 吴雅琼 等. 几种超分辨率荧光显微技术的原理和近期进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(12): 1626~ 1634
- 3 Stefan W. Hell, Jan Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy[J]. *Opt. Lett.*, 1994, **19**(11): 780~ 782
- 4 Marcus Dyba, Stefan W. Hell. Focal spots of size $\lambda/23$ open up far-field fluorescence microscopy at 33 nm axial resolution [J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2002, **88**(16): 1~ 4
- 5 Eva Rittweger, Kyu Young Han, Scott E. Irvine *et al.*. STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution[J]. *Nature Photonics*, 2009, **3**(3): 144~ 147
- 6 A. Einstein. On the quantum theory of radiation[J]. *Phys. J.*, 1917, **18**: 121~ 128
- 7 Chen Wenxia, Xiao Fanrong, Liu Li *et al.*. Breaking through the diffraction resolution of far-field optical microscopy by stimulated emission depletion[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2005, **42**(10): 51~ 56
陈文霞, 肖繁荣, 刘力 等. 利用受激发射损耗(STED)显微术突破远场衍射极限[J]. *激光与光电子学进展*, 2005, **42**(10): 51~ 56
- 8 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): 853~ 856
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): 853~ 856
- 9 E. Rittweger, B. R. Rankin, V. Westphal *et al.*. Fluorescence depletion mechanisms in super-resolving STED microscopy [J]. *Chem. Phys. Lett.*, 2007, **442**: 483~ 487
- 10 M. Kasha. Paths of molecular excitation[J]. *Rad. Res.*, 1960, suppl. **2**: 243~ 275
- 11 Gerald Donnert, Jan Keller, Rebecca Medda *et al.*. Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy [J]. *PNAS*, 2006, **103**(31): 11440~ 11445
- 12 Thomas A. Klar, Egbert Engel, Stefan W. Hell. Breaking Abbé's diffraction resolution limit in fluorescence microscopy with stimulated emission depletion beams of various shapes[J]. *Phys. Rev. E*, 2001, **64**: 066613
- 13 Stefan W. Hell. *Single Molecule Spectroscopy in Chemistry, Physics and Biology* [M]. Berlin: Springer Press, 2009. 298~ 365
- 14 Benjamin Harke, Jan Keller, Chaitanya K. Ullal *et al.*. Resolution scaling in STED microscopy[J]. *Opt. Express*, 2008, **16**(6): 4154~ 4162
- 15 Katrin Willig, Silvio Rizzoli, Volker Westphal *et al.*. STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis[J]. *Nature*, 2006, **440**(13): 935~ 939
- 16 Jan Keller, Andreas Schmal, Stefan W. Hell. Efficient fluorescence inhibition patterns for RESOLFT microscopy[J]. *Opt. Express*, 2007, **15**(6): 3361~ 3371
- 17 D. Wildanger, R. Medda, L. Kastrop *et al.*. A compact STED microscope providing 3D nanoscale resolution[J]. *J. Microsc.*, 2009, **236**(1): 35~ 43
- 18 Gael Moneron, Stefan W. Hell. Two-photon excitation STED microscopy[J]. *Opt. Express*, 2009, **17**(17): 14567~ 14573
- 19 Jun Ding, Kevin T. Takasaki, Bernardo L. Sabatini. Supraresolution imaging in brain slices using stimulated emission depletion 2-photon laser scanning microscopy[J]. *Neuron*, 2009, **63**(4): 429~ 437
- 20 Dominik Wildanger, Eva Rittweger, Lars Kastrop *et al.*. STED microscopy with a supercontinuum laser source[J]. *Opt. Express*, 2008, **16**(13): 9614~ 9621

- 21 Stefan Hell, Ernst H. K. Stelzer. Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope[J]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1992, **9**(12): 2159~ 2166
- 22 Marcus Dyba. STED-4Pi microscopy[D]. Ruperto-Carola University of Heidelberg, 2004
- 23 M. Dyba, J. Keller, S. W. Hell. Phase filter enhanced STED-4Pi fluorescence microscopy: theory and experiment[J]. *New J. Physics*, 2005, **7**(134): 1~ 21
- 24 Giuseppe Vicidomini, Roman Schmidt, Alexander Egner *et al.*. Automatic deconvolution in 4Pi microscopy with variable phase[J]. *Opt. Express*, 2010, **18**(8): 10154~ 10167
- 25 Lars Meyer, Dominik Wildanger, Rebecca Medda *et al.*. Dual-Color STED microscopy at 30-nm focal-plane resolution[J]. *Small*, 2008, **4**(8): 1095~ 1100
- 26 Gerald Donnert. Dual-colour STED-microscopy on the Nanoscale[D]. Ruperto-Carola University of Heidelberg, 2007
- 27 Daniel Neumann, Johanna Beckers, Lars Kastrop *et al.*. Two-color STED microscopy reveals different degrees of colocalization between hexokinase-I and the three human VDAC isoforms[J]. *PMC Biophysics* 2010, **3**(4): 1~ 15
- 28 Gerald Donnert, Christian Eggeling, Stefan W Hell. Major signal increase in fluorescence microscopy through dark state relaxation[J]. *Nature Meth.* 2007, **4**(1): 81~ 86
- 29 Lars Meyer. Expanding the STED Principle to Multicolor Imaging and Far-Field Optical Writing[D]. Ruperto-Carola University of Heidelberg, 2009
- 30 Gael Moneron, Rebecca Medda, Birka Hein *et al.*. Fast STED microscopy with continuous wave fiber lasers[J]. *Opt. Express*, 2010, **18**(2): 1302~ 1309