

超高分辨显微镜及其在生物医学领域的应用

刘皎¹, 吴晶¹

(北京大学医药卫生分析中心, 北京 100191)

摘要: 超高分辨显微镜 (Super-Resolution Microscopy) 作为一类强大的科学工具, 可以突破传统光学显微镜的分辨极限, 实现对微小结构的高分辨率成像, 已经在生物医学领域引起了广泛的关注和应用。本文将探讨超高分辨显微镜的不同类型和原理, 介绍其在生物医学领域的应用及展望其未来发展。

关键词: 超高分辨显微镜, 成像技术, 应用

Abstract: Super Resolution Microscopy, as a powerful scientific tool, can break through the resolution limit of traditional optical microscopes and achieve high-resolution imaging of small structures. It has attracted widespread attention and application in the biomedical field. This article will explore the different types and principles of Super Resolution Microscopy, introduce their applications in the biomedical field, and look forward to their future development.

1 引言

显微镜的产生和发展对于生命科学研究的进步有至关重要的作用, 它将微观世界呈现在大家面前, 包括微生物的存在、组织细胞结构及生理病理活动等。显微镜技术的不断革新将成像分辨率不断提高, 但相当长一段时间内光学成像无法突破一个极限值, 即 xy 轴横向分辨率约 200nm, z 轴纵向分辨率约 500nm, 因此小于这个尺寸的生命活动和结构, 如病毒、亚细胞结构等, 是无法清楚地观察到的。

聚焦点的光强会根据点扩散函数 (point spread function, PSF) 而展开, 对于圆形孔径, PSF 呈现为艾里斑 (Airy disk) 的模式。激光扫描共聚焦显微镜 (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) 的分辨率取决于 PSF 的大小, 如果焦点很小, 则每个像素点获取到的信息也很小, 从而得到清晰锐利的图像; 反之, 则结果图像变得模糊。因此, CLSM 成像的主要挑战在于实现越来越小的 PSF 以获得更好的分辨率。德国物理学家恩斯特·阿贝 (Ernst Abbe, 1840-1905 年) 在 19 世纪 70 年代首次提出阿贝衍射极限, 即由于衍射效应, PSF 大小与 λ/NA 成正比 ($d=0.61\lambda/NA$), 其中 λ 是光的波长, NA 是物镜最重要的参数——数值

孔径。由于可见光波长范围在 400-760nm 之间，NA 值最大在 1.7 左右，所以分辨率极限在 200nm 左右。随着物理学和测量技术的进步，突破衍射极限的显微镜不断涌现，目前公认的超高分辨显微镜主要有三类，包括结构照明显微镜 (Structured Illumination Microscopy, SIM)，受激发射减耗显微镜 (Stimulated Emission Depletion Microscopy, STED)，和单分子定位显微镜。单分子定位显微镜包括光敏定位显微镜 (Photoactivation Localization Microscopy, PALM) 和随机光学重建显微镜 (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM)。2014 年三位科学家史蒂芬·霍尔 (Stefan W. Hell)、埃里克·贝兹 (Eric Betzig) 和威廉·莫纳 (William E. Moerner) 因他们在超高分辨显微镜技术领域的贡献而获得了诺贝尔化学奖。

2 不同类型的超高分辨显微镜

2.1 结构照明显微镜 (Structured Illumination Microscopy, SIM)

SIM 本质是利用两束激发光在样品上进行干涉，产生明暗交替的莫尔条纹，高空间频率的莫尔条纹会放大激发条纹与样品空间频率不一致的结构，从而将样品中的高频信息整合入收集到的图像中。通过投射特殊的光照明模式如格点或条纹光栅，以一定的模式照射样品，引入空间频率信息，采集多个图像并经过复杂的数据处理之后，重建高分辨率图像。由于每个图像都采用不同的结构照明模式，包含了不同的信息，合并后的图像能够展示出比传统显微镜更多的细节。相比于其他超高分辨成像技术，SIM 最大的优势就是宽场成像，速度快，基本可以达到实时观察。

SIM 技术的前身可以追溯到 20 世纪 70 年代初。当时，光学学家特奥多尔·赫普恩 (Theodor Häupl) 首次提出了使用周期性光栅照明来提高显微镜分辨率的想法。这奠定了 SIM 技术的基础，尽管当时还没有实际的 SIM 显微镜。21 世纪初期，史蒂芬·霍尔 (Stefan W. Hell) 和埃里克·贝兹 (Eric Betzig) 等科学家分别独立开发了 SIM 的现代版本。SIM 技术开始广泛传播，吸引了生物学家和显微镜专家的关注。它被认为是一种相对低成本的超高分辨率成像方法，因为它不需要昂贵的激光设备或复杂的样品准备。

2.2 受激发射减耗显微镜 (Stimulated Emission Depletion Microscopy, STED)

STED 技术的概念最早由斯德哥尔摩大学的史蒂芬·霍尔 (Stefan W. Hell) 提出。他的想法是通过将激发光束与一个特殊的抑制光束结合，从而实现了对荧光标记物的光抑制，通过受激辐射淬灭光斑外围的荧光分子，使其在空间上变得更加紧凑，减少 PSF 从而提高分辨率。我们也叫“甜甜圈”技术。STED 显微镜背后基本思想就是利用非线性光学设计一个低于阿贝衍射极限的更小 PSF。分辨率与 STED 光强有关，提高 STED 光的强度可以使荧光光斑焦点