

几种超分辨率荧光显微技术的原理和近期进展*

吕志坚¹⁾ 陆敬泽²⁾ 吴雅琼¹⁾ 陈良怡^{2)**}

(¹⁾北京市科学技术情报研究所, 北京 100044; (²⁾中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 在生命科学领域, 人们常常需要在细胞内精确定位特定的蛋白质以研究其位置与功能的关系。多年来, 宽场 / 共聚焦荧光显微镜的分辨率受限于光的阿贝 / 瑞利极限, 不能分辨出 200 nm 以下的结构。近年来, 随着新的荧光探针和成像理论的出现, 研究者开发了多种实现超出普通共聚焦显微镜分辨率的三维超分辨率成像方法。主要介绍这些方法的原理、近期进展和发展趋势。介绍了光源的点扩散函数(point spread function, PSF)的概念和传统分辨率的定义, 阐述了提高 xy 平面分辨率的方法。通过介绍单分子荧光成像技术, 引入了单分子成像定位精度的概念, 介绍了基于单分子成像的超分辨率显微成像方法, 包括光激活定位显微技术(photoactivated localization microscopy, PALM)和随机光学重构显微技术(stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)。介绍了两大类通过改造光源的点扩散函数来提高成像分辨率的方法, 分别是受激发射损耗显微技术(stimulated emission depletion, STED)和饱和结构照明显微技术(saturated structure illumination microscopy, SSIM)。比较了不同的 z 轴提取信息的方法, 并阐述了这些方法与 xy 平面上的超分辨率显微成像技术相结合所得到的各种三维超分辨率显微成像技术的优劣。探讨了目前超分辨率显微成像的发展极限和方向。

关键词 超分辨率荧光显微技术, 点扩散函数, PALM, STORM, STED, SSIM

学科分类号 Q27, Q63

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00242

现代生物医学研究中为了更好地理解人体生命的作用过程和疾病的产生机理, 需要观察细胞内细胞器、病毒、寄生虫等在三维细胞空间的精确定位和分布。另一方面, 后基因组时代蛋白质科学的研究也要求阐明: 蛋白质结构、定位与功能的关系以及蛋白质 - 蛋白质之间发生相互作用的时空顺序; 生物大分子, 主要是结构蛋白与 RNA 及其复合物, 如何组成细胞的基本结构体系; 重要的活性因子如何调节细胞的主要生命活动, 如细胞增殖、细胞分化、细胞凋亡与细胞信号传递等。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(激光扫描共聚焦显微镜等)的分辨极限(xy 向分辨率: 200 nm, z 向分辨率: 500 nm)^[1]。应用传统的电子显微镜(EM)可以达到纳米量级的分辨率, 能够观察到细胞内部囊泡、线粒体等细胞器的定位, 但是由于缺乏特异性的探针标记, 不适合定位单个蛋白质分子, 也不适合观察活细胞和细胞膜的动态变化过程。因此, 生物学家迫切希望有一种实验显微方法, 它既具有亚微米甚至纳米尺度的光学分辨本领, 又可以连续监测生物大分子和细

胞器微小结构的演化, 而并不影响生物体系的生物活性。

近年来, 随着新型荧光分子探针的出现和成像方法的改进, 光学成像的分辨率得到极大的改进, 达到可以与电子显微镜相媲美的精度, 并可以在活细胞上看到纳米尺度的蛋白质^[2~5]。这些技术上的进步势必极大地推动生命科学的发展, 为了增强生物学家对于超分辨率荧光显微成像(super-resolution fluorescent microscopy)机理的理解, 以下我们将介绍传统的荧光显微成像的极限, 突破此极限超分辨率成像的原理以及目前国际上的最新进展。

1 荧光显微成像的极限

根据瑞利 / 阿贝准则, 光学显微镜的分辨率定

* 北京市财政专项(PXM2009_178214_077580), 北京市科学技术研究院改革与发展专项和国家重点基础研究发展计划(2006CB705706)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64888524, E-mail: chen_liangyi@yahoo.com

收稿日期: 2009-04-16, 接受日期: 2009-08-25

义为用显微镜可以分辨出来的两个同等亮度的点光源之间的最小距离, 而此分辨率的极限是由光的衍射特性所决定的. 无论是宽场显微镜还是共聚焦显微镜, 单个点光源经过透镜组和物镜汇聚后都会在焦平面上产生一个模糊的光斑(airy disc), 光斑的大小可以用其半高宽(full-width at half-maximum, FWHM)来表示, 遵循公式 $\Delta x, \Delta y = \frac{\lambda}{2n\sin\alpha} = \frac{\lambda}{2NA}$,

其中 λ 是入射光的波长, n 是介质的折射系数, α 是物镜的半孔径角度, 而 NA 则是物镜的数值孔径. 在光传播的方向上(z 轴), 其半高宽大约为 $\Delta z = \frac{2\lambda}{n\sin^2\alpha}$ [1].

另一方面, 分辨率不仅与光斑的半高宽相关, 还与成像的对比度有关. 以 xy 平面为例, 对比度的概念是: 在两个同样亮度的点光源光斑中间存在亮度的最小值, 而点光源光斑的中心为亮度的最大值, 此两值之间的差与亮度最大值的比值即为对比度. 当两个点光源光斑距离靠近时, 对比度下降, 而距离分开时, 对比度上升, 其分布范围在 $0 \sim 1$ 之间. 瑞利分辨率(r)的概念是: 在理想的光学成像环境下, 当两个点光源光斑的对比度为 26.4% 时, 两个光斑中心点之间的距离即为瑞利分辨率. 将显微镜的光斑在 xy 平面上的分布用二维的贝塞尔函数或是高斯函数来拟合(点扩散函数 point spread function, PSF) [6], 计算对比度为 26.4% 时光斑的距离, 就可以得到瑞利分辨率. 宽场荧光成像时 xy 平面的分辨率为 $r_{x,y} = \frac{0.6\lambda}{NA}$. 用共聚焦显微成像时, 由于在同样的荧光发射波长上, 其光斑大小约是宽场荧光成像时光斑大小的平方根, 所以 xy 平面的分辨率可以提高约 30%, $r_{x,y} = \frac{0.4\lambda}{NA}$ [7].

由这些公式来看, 不管所用的显微成像方式有什么差别, 传统理论认为 xy 平面的分辨率只取决于所发射荧光的波长和数值孔径的大小(z 轴分辨率的大小更远远低于 xy 轴向的分辨率). 然而, 在实际系统中由于存在光发射的泊松噪声、检测元件(电荷耦合器件 CCD 以及光电倍增管 PMT 等)的背景噪声和采样信号像素化引起的噪声等影响, 实际显微镜的分辨率往往还远低于其理论值.

2 xy 平面上的超分辨率显微技术

2.1 单分子荧光成像

需要指出的是, 当显微镜需要分辨两个或者更

多点光源的时候, 很难突破光学分辨率的极限来进行精确定位. 而当显微镜的物镜视野下仅有单个荧光分子的时候, 通过特定的算法拟合, 此荧光分子位置的精度可以很容易超过光学分辨率的极限, 达到纳米级. 1981 年, Barak 和 Webb [8] 首先将单分子跟踪技术引入到生命科学中, 在成纤维细胞上跟踪了一个荧光标记的低密度脂蛋白受体的动力学过程. 2000 年初, 人们开始讨论优化算法, 改进成像器械, 来进一步提高单个荧光分子的定位精度. Cheezum 等 [9] 比较了四种定位算法, 确认在同样的信噪比图像上, 用高斯函数拟合单分子荧光的点扩散函数可以达到最佳的定位精度. Thompson 等 [10] 结合了理论推导和计算机模拟, 综合考虑了各种因素的影响, 如离散时间段检测到的发出光子数的泊松噪声、CCD 相机的背景读出噪声以及 CCD 像素点的大小等, 得到了单分子在二维定位精度上的近似公式:

$$(\Delta x) = \sqrt{\frac{s^2 + a^2/12}{N} + \frac{8\sqrt{\pi} s^4 b^2}{a^2 N^2}}$$

其中 x 为定位的误差, s 为点扩散函数的标准方差, a 为 CCD 像素的大小, N 为收集到的光子数, b 为背景噪声.

在建立了上述单分子定位精度公式的基础上, 人们开始测量一些荧光标记生物分子的纳米级定位和运动. 例如, Paul Selvin 研究小组将肌凝蛋白 myosin 标记上 Cy3 分子, 应用单分子成像技术在体外优化的条件下研究 myosin 步进的长短, 其分辨率达到了 1.5 nm [11]. 尽管活细胞上单分子荧光成像的精度(20 nm)通常还不能达到体外的水平(1.5 nm), 通过提取单分子成像的信息人们仍然可以解决一些超出其分辨率范围的问题. 例如, 细胞质膜上的离子通道, 通常大小在 2~3 nm 之间, 其结构一般只能够通过 X 射线晶体衍射得到. 我们发展了单分子成像技术, 成功确定细胞膜上钙库释放诱发的钙通道(CRAC)是由 4 个 Orai1 蛋白和 2 个 STIM1 蛋白组成的 [12]. 此结果被随后发表在 Nature 上的文章所验证 [13], 并进一步证明了单分子成像作为一种新的确定通道成分方法的可靠性.

2.2 PALM 和 STORM

如上所述, 尽管单分子的定位精度可以达到纳米级, 但它并不能提高光学显微镜在分辨两个或者多个点光源时的分辨率. 2002 年, Patterson 和 Lippincott-Schwartz [14] 首次利用一种绿色荧光蛋白(GFP)的变种(PA-GFP)来观察特定蛋白质在细胞内

的运动轨迹. 这种荧光蛋白 PA-GFP 在未激活之前不发光, 用 405 nm 的激光激活一段时间后才可观察到 488 nm 激光激发出来的绿色荧光. 德国科学家 Eric Betzig 敏锐地认识到, 应用单分子荧光成像的定位精度, 结合这种荧光蛋白的发光特性, 可以来突破光学分辨率的极限. 2006 年 9 月, Betzig 和 Lippincott-Schwartz 等^[2]首次在 Science 上提出了光激活定位显微技术(photoactivated localization microscopy, PALM)的概念. 其基本原理是用 PA-GFP 来标记蛋白质, 通过调节 405 nm 激光器的能量, 低能量照射细胞表面, 一次仅激活出视野下稀疏分布的几个荧光分子, 然后用 488 nm 激光照射, 通过高斯拟合来精确定位这些荧光单分子. 在确定这些分子的位置后, 再长时间使用 488 nm 激光照射来漂白这些已经定位正确的荧光分子, 使它们不能够被下一轮的激光再激活出来. 之后, 分别用 405 nm 和 488 nm 激光来激活和漂白其他的荧光分子, 进入下一次循环. 这个循环持续上百次后, 我们将得到细胞内所有荧光分子的精确定位. 将这些分子的图像合成到一张图上, 最后得到了一种比传统光学显微镜至少高 10 倍以上分辨率的显微技术, 如图 1 所示. PALM 显微镜的分辨率仅仅受限于单分子成像的定位精度, 理论上来说可以达到 1 nm 的数量级. 2007 年, Betzig 的研究小组更进一步将 PALM 技术应用在记录两种蛋白质的相对位置^[15], 并于次年开发出可应用于活细胞上的 PALM 成像技术来记录细胞黏附蛋白的动力学过程^[16].

PALM 的成像方法只能用来观察外源表达的蛋白质, 而对于分辨细胞内源蛋白质的定位无能为力. 2006 年底, 美国霍华德 - 休斯研究所的华裔科学家庄晓薇实验组开发出来一种类似于 PALM 的方法, 可以用来研究细胞内源蛋白质的超分辨率定位. 他们发现, 不同的波长可以控制化学荧光分子 Cy5 在荧光激发态和暗态之间切换, 例如红色 561 nm 的激光可以激活 Cy5 发射荧光, 同时长时间照射可以将 Cy5 分子转换成暗态不发光. 之后, 用绿色的 488 nm 激光照射 Cy5 分子时, 可以将其从暗态转换成荧光态, 而此过程的长短依赖于第二个荧光分子 Cy3 与 Cy5 之间的距离. 因此, 当 Cy3 和 Cy5 交联成分子对时, 具备了特定的激发光转换荧光分子发射波长的特性. 将 Cy3 和 Cy5 分子对胶联到特异的蛋白质抗体上, 就可以用抗体来标记细胞的内源蛋白. 应用特定波长

的激光来激活探针, 然后应用另一个波长激光来观察、精确定位以及漂白荧光分子, 此过程循环上百次后就可以得到最后的内源蛋白的高分辨率影像, 被他们命名为随机光学重构显微技术(stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)^[3]. 2007 年, 他们进一步改进 STORM 技术, 发展了不同颜色的变色荧光分子对, 可以同时记录两种甚至多种蛋白质的空间相对定位, 从而阐明笼形蛋白 clathrin 形成的内吞小泡与细胞骨架蛋白之间的精确空间位置关系, 两种颜色的分辨率都可以达到 20~30 nm^[17]. 但是, STORM 方法也存在缺陷, 由于用抗体来标记内源蛋白并非一对一的关系, 所以 STORM 不能量化胞内蛋白质分子的数量, 同时也不能用于活细胞测量.

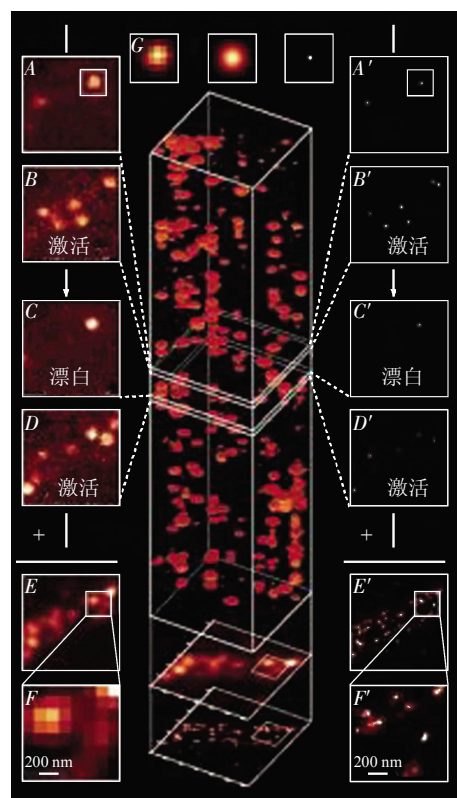


Fig. 1 A schemes of using PALM technique to achieve super-resolution imaging^[2]

图 1 应用 PALM 技术定位单个荧光分子最后实现超分辨率成像的示意图^[2]

A, B, C, D, E, F 展示了实际实验过程及得到的原始数据; A', B', C', D', E', F' 展示了用高斯拟合确定荧光分子的中心, 叠加产生了超分辨率图像; (A, A') 未激活任何荧光分子时; (B, B') 用 405 nm 的激光激活了 4 个荧光分子; (C, C') 用 488 nm 的激光观察一段时间后漂白了第一轮激活的 4 个荧光分子; (D, D') 第二轮重新激活的另外的几个荧光分子; (E, E') 两轮激活的荧光分子总和组成的图像; (F, F') E 图的局部放大.

2.3 STED

不管是 PALM 还是 STORM 的超分辨率成像方法, 其点扩散函数成像仍然与传统显微成像一致. 由于需要反复激活 - 猝灭荧光分子, 所以使得实验大多数在固定的细胞上完成. 即使是在活细胞上进行的实验, 其时间分辨率也较低^[19]. 2000 年, 德国科学家 Stefan Hell 开发了另一种超高分辨率显微技术, 其基本原理是通过物理过程来减少激发光的光斑大小, 从而直接减少点扩散函数的半高宽来提高分辨率. 当特定的荧光分子被比激发波长长的

激光照射时, 可以被强行猝灭回到基准态. 利用这个特性, Hell 等开发出了受激发射损耗显微技术 (stimulated emission depletion, STED)^[4]. 其基本的实现过程如图 2 所示, 就是用一束激发光使荧光物质(既可以是化学合成的染料也可以是荧光蛋白)发光的同时, 用另外的高能量脉冲激光器发射一束紧挨着的、环型的、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猝灭, 从而减少荧光光点的衍射面积, 显著地提高了显微镜的分辨率.

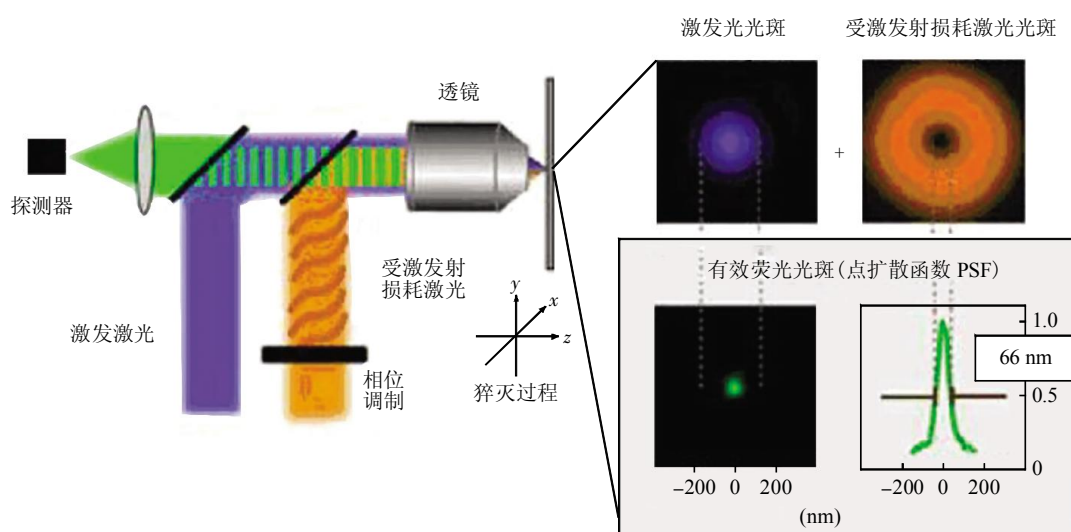


Fig. 2 A schematic plot of the basic theory of STED excitation^[18]

图 2 STED 激发原理示意图^[18]

紫色代表的是激发激光, 黄色代表的是用来受激发射损耗的激光, 两束激光经过时间空间调制后同时照射在样本上. 由右图中可以看出, 激发光光斑(紫色)经 STED 激光(黄色)的调制后极大地减少了激发的荧光分子的光斑大小(绿色), 其半高宽可以达到 66 nm.

应用 STED 成像, 点光源的光斑大小直接发生改变, 其半高宽大小从传统的 $\frac{\lambda}{2n\sin\alpha}$ 变成 $\frac{\lambda}{2n\sin\alpha\sqrt{1+I/I_{\text{sat}}}}$, 其中 I 是 STED 激光器的最大聚焦强度, 而 I_{sat} 则是当受激荧光强度被减少到 $1/e$ 时的 STED 激光的强度特征值. 由此公式可看出, 当 I/I_{sat} 的值趋近无穷大时, STED 成像的点光源的半高宽趋近于 0, 亦即分辨率不再受光的衍射过程所限制^[18].

STED 成像技术的最大优点是可以快速地观察活细胞内实时变化的过程, 因此在生命科学中应用更加广泛. 例如, 应用成熟的 STED 显微成像技术

发现, 海马神经元上囊泡蛋白 synatotagmin I 在各种刺激后都以一种“簇”的形式存在于神经突触前端膜上, 这首次揭示了这种膜蛋白以集合的形式存在于细胞质膜上然后被统一回收的方式. 之后 Hell 等又进一步发展了这种方法, 使之可以用于 EGFP 标记的信号^[19]和多种颜色的超分辨率检测^[20]. 目前, STED 作为一种成熟的方法, 已经可以高速地监测活细胞内高分辨率图像. 例如在 2008 年 Science 上发表的文章表明, 应用 STED 技术已经可以以视频的速度(每秒 28 帧)来采集记录神经细胞内突触小泡的高分辨率图像(50 nm)^[21]. 目前, STED 成像的主要缺陷在于光路复杂, 设备昂贵, 对系统的稳定性要求很高.

2.4 SSIM

改变光学的点扩散函数来突破光学极限的另一个方法是利用饱和结构照明显微技术 (saturated structure illumination microscopy, SSIM). 早在 1963 年, Lukosz 和 Marchand^[22]就提出了特定模式侧向入射的光线可以用来增强显微镜分辨率的理论.

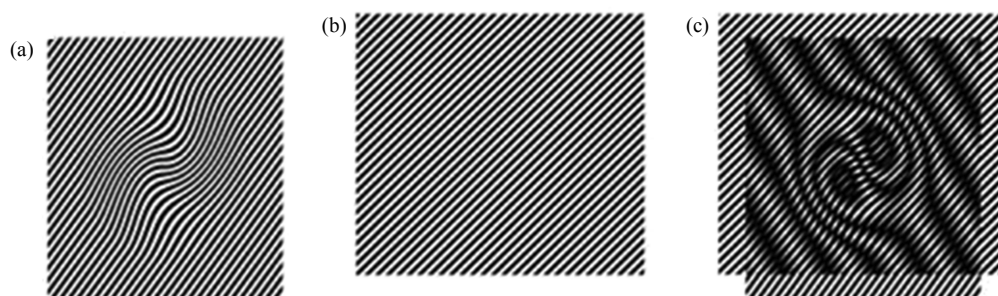


Fig. 3 Using moiré effects of light diffraction to increase the optical resolution

图 3 通过衍射的莫阿干涉效应(moiré effect)来提高分辨率

当一个未知结构的物体(a)被一个结构规则的照射模式(b)的光所照射时,会产生云纹条纹(moiré fringes)(c). 云纹条纹发生在采样物体的空间频率与照射光线的空间频率有差异的地方. 显而易见,在显微镜下直接观察,就可以看到它放大了原先不能够分辨出来的样本结构. 通过计算机进一步分析所有条纹中包含的信息,可以重组出样本的高分辨率图像^[9].

3 z 平面轴向的超分辨率显微技术

以上所讨论的几种超分辨率成像方法,其分辨率的改进都在 xy 平面. 而事实上,由于传统显微镜在光传播方向上(z 轴)的点扩散函数的半高宽大约为 $\frac{2\lambda}{n\sin^2\alpha}$, 小于 xy 平面的半高宽 $\frac{\lambda}{2n\sin\alpha}$, 因此其理论 z 轴分辨率本来就低于其 xy 平面的分辨率. 另外,对厚的生物样本进行显微三维成像时,由于样本本身的折射系数与物镜的折射系数不同,在 z 轴方向上产生显著的球面象差(spherical aberration),从而使图像在 z 轴上的分辨率降低.

如果要充分观察细胞内的三维精细图像,就必须大幅度提高成像的 z 轴分辨率. 因此,近年来,国际上各个研究超分辨率显微成像的小组也不断地探索提升 z 轴分辨率的手段.

3.1 三维的 PALM/STORM

3.1.1 散光原理成像.

基于单荧光分子显微成像的 PALM 和 STORM 技术可以通过多种方法来改进其在 z 轴上的分辨率. 一种方法是利用散光的原理来提取 z 轴方向上的精细信息. 具体的方法是在成像物镜和图像透镜之间加上一个散光的柱面镜,从而产生 xy 轴向上的光程差. 当点光源位置正在聚焦平面时,其投射

到 CCD 上的光斑与正常的显微镜一样,都是一个四面对称的圆形. 而当点光源位置不在聚焦平面时,其投射到 CCD 上的点扩散光斑会呈现椭圆形状,其椭圆长轴的指向和长度分别决定了点光源位置在聚焦平面的上下以及离聚焦平面的距离(图 4a)^[23]. 用柱面镜来增强显微镜 z 轴分辨率的好处是比较简单,分辨率最高可以达到 50 nm 左右. 其缺陷是成像的穿透深度较浅,只能成像大约 600 nm 深度的生物样本. 另一方面,生物样本与显微镜物镜之间折射系数的差别会引入球差效应,在成像深度越深时 z 轴估计的偏差越大.

针对上述柱面镜在 z 轴上穿透深度的限制, Piestun 和 Moerner 小组又开发出来另一种方法^[24],即通过制造特殊的液晶空间光调制器(spatial light modulator, SLM),将点光源传统的点扩散光斑改造成有两个侧页的光斑(双螺旋的点扩散函数),其侧页之间连线与水平的夹角直接反映了光源在 z 轴上的位置(图 4b). 应用这种新型的成像系统,他们成像的深度可以达到 2 μm ,可以用于厚生物样本成像,而且在成像深度范围内 z 轴方向的精度也提高到 10~20 nm 左右^[24]. 但是,此成像方法的缺点在于制造特殊的液晶空间光调制器比较困难,且其光子收集的效率较低,目前仅适用于发出光子数高的特定荧光染料或者是荧光蛋白.

到 CCD 上的光斑与正常的显微镜一样,都是一个四面对称的圆形. 而当点光源位置不在聚焦平面时,其投射到 CCD 上的点扩散光斑会呈现椭圆形状,其椭圆长轴的指向和长度分别决定了点光源位置在聚焦平面的上下以及离聚焦平面的距离(图 4a)^[23]. 用柱面镜来增强显微镜 z 轴分辨率的好处是比较简单,分辨率最高可以达到 50 nm 左右. 其缺陷是成像的穿透深度较浅,只能成像大约 600 nm 深度的生物样本. 另一方面,生物样本与显微镜物镜之间折射系数的差别会引入球差效应,在成像深度越深时 z 轴估计的偏差越大.

针对上述柱面镜在 z 轴上穿透深度的限制, Piestun 和 Moerner 小组又开发出来另一种方法^[24],即通过制造特殊的液晶空间光调制器(spatial light modulator, SLM),将点光源传统的点扩散光斑改造成有两个侧页的光斑(双螺旋的点扩散函数),其侧页之间连线与水平的夹角直接反映了光源在 z 轴上的位置(图 4b). 应用这种新型的成像系统,他们成像的深度可以达到 2 μm ,可以用于厚生物样本成像,而且在成像深度范围内 z 轴方向的精度也提高到 10~20 nm 左右^[24]. 但是,此成像方法的缺点在于制造特殊的液晶空间光调制器比较困难,且其光子收集的效率较低,目前仅适用于发出光子数高的特定荧光染料或者是荧光蛋白.

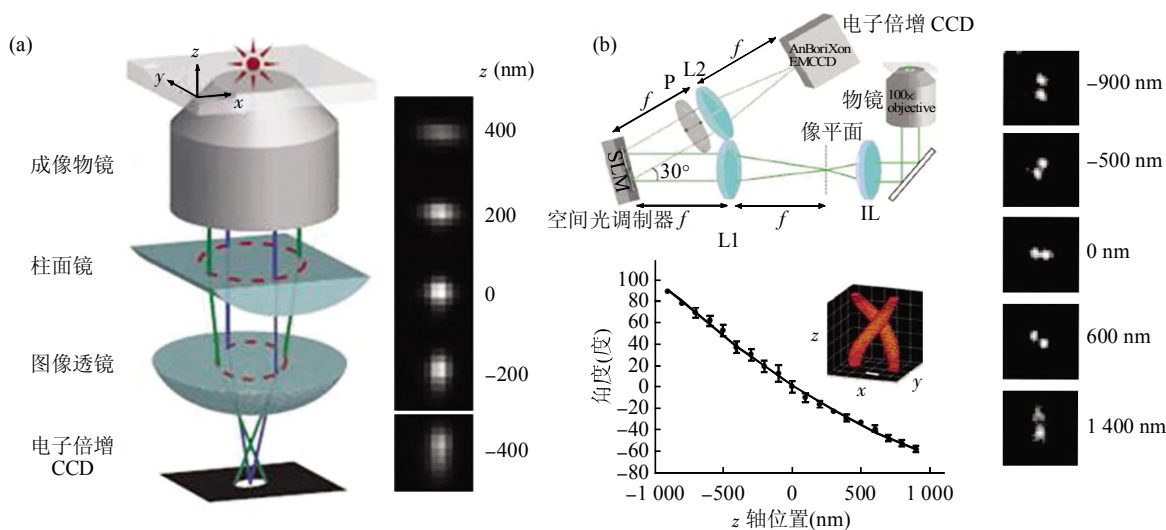


Fig. 4 Using astigmatic method to extract information of light source in z axis

图 4 用散光的方法来提取光源在 z 轴上的位置

(a)柱面镜来增强 PALM/STORM 技术 z 轴分辨率的原理图^[23]. (b)用特殊的液晶空间光调制器来改造点光源扩散函数来提高 z 轴的分辨率^[24].

3.1.2 多重平面成像. 三维成像的另一种办法是将两个或者多个不同聚焦层面的图像同时送入 CCD 中, 提取三维信息. 利用这个原理, Hess 和 Bewersdorf 小组开发出来双层 PALM 技术^[25]. 如图 5 所示, 其实现的关键技术是加入了一个 50 : 50 的分光镜, 将 CCD 相机前的汇聚光分为两股, 分

别经过近光路(透过分光镜)和远光路(被反光镜反射)后同时在 CCD 上成像. 由于所成的像分别在原来成像平面的上下各 350 nm 处, 根据此信息可以重组出图像的 z 轴位置^[25]. 多重平面成像实现相对简单, 但是成像的深度也有限(1 μm), 目前的 z 轴分辨率也仅有 75 nm 左右.

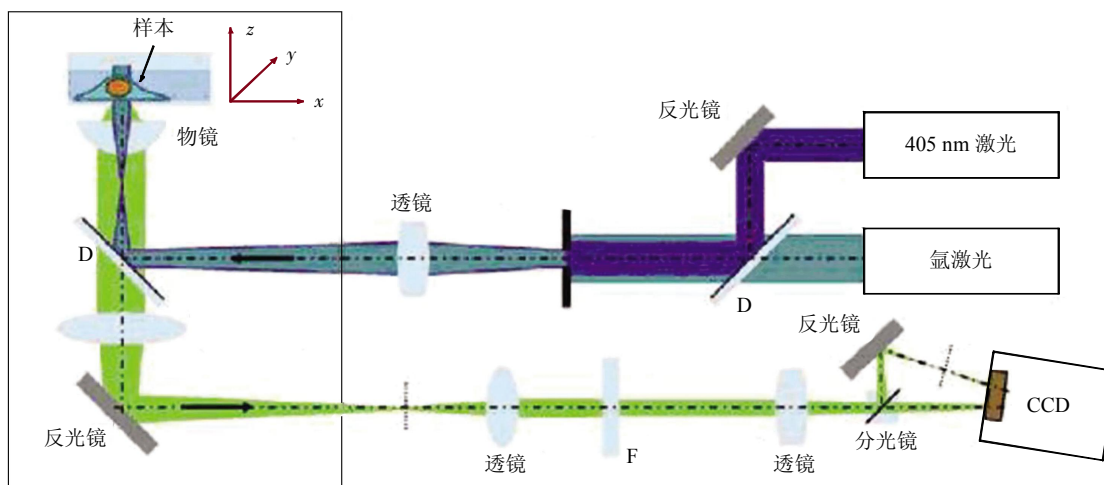


Fig. 5 A scheme for the two-plane PALM microscope^[25]

图 5 双层平面-PALM 实现的示意图^[25]

3.2 STED-4π 三维成像

与 PALM/STORM 技术不同, STED 技术是用一种类似于激光扫描的方法运作, 因此上述改善 z

轴分辨率的方法都不适用. 针对这个问题, Hell 小组开发了另一种方法, 利用光的干涉原理, 直接减少点光源在光传播方向上(z 轴)的半高宽^[26].

点光源在 z 轴上的半高宽大约为 $\Delta z = \frac{2\lambda}{n\sin^2\alpha}$ (图 6a), 因此, 物镜的半孔径 α 越大, z 轴的半高宽就越短. 理想状态下, 当物镜的孔径达到最大的 360 度 (4π) 时, z 轴的半高宽最小. 实际情况中, 单个物镜的孔径一定有大小限制. 但是为了模拟理想状态下的 4π 球形的光波阵面 (wavefront), Hell

小组开发出来在同一个显微镜上用两个相对的具有相同光学参数的物镜来激发和采集荧光信号的系系统, 这样由于光的干涉作用, z 轴方向的点扩散函数变成长度大大减少的一个主波和两个侧叶信号 (图 6b). 将侧叶信号滤出后, 就可以得到一个 z 轴半高宽大大减少的点扩散函数 (图 6c).

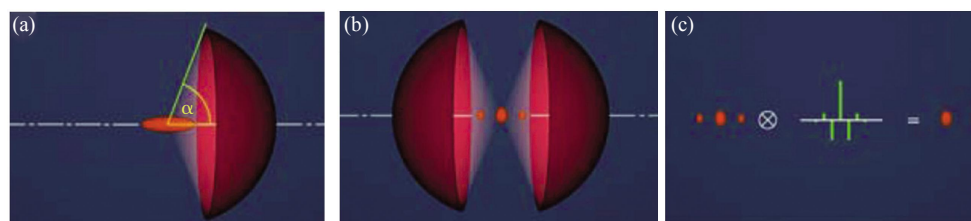


Fig. 6 Basic theory of the 4π microscope

图 6 4π 显微镜的原理

(a) 通常的显微镜在 z 轴上的点扩散函数. (b) 光经过两个相对的物镜后相互干涉得到的在 z 轴方向上的点扩散函数. (c) 进一步滤波除去侧叶信号后得到的 4π 显微镜在 z 轴上的点扩散函数^[27].

将 4π 显微镜与 STED 显微成像技术结合, Hell 小组得到了 xyz 三个轴向分辨率都达到 50 nm 的细胞内微管结构的图像, 实现了三维超分辨率成像^[26].

3.3 三维 SSIM 成像

三维结构性照明成像的原理与二维结构性照明成像的原理是一致的, 其区别是在原来的两束干涉光的基础上又加了一束干涉光束, 来产生 z 轴方向的干涉模式, 提取 z 轴的信息. 加州大学旧金山分校的 Gustafsson、Sedat 和 Agard 博士将自己开发出来的三维干涉光激发模块加到普通的显微镜系统上, 成功地记录到细胞核膜上核孔复合体的精细三维结构, 其分辨率达到 xy 平面 100 nm 左右, z 轴方向上 200 nm 左右^[28], 充分反映了这种成像方法对厚样本深度成像的能力. 此方法应用起来相对简单, 不需要特殊的荧光标记. 但是, 其最大的缺陷是三维分辨率远低于其他的超分辨率成像技术.

4 三维超分辨率显微技术的发展趋势

与 21 世纪初相比, 三维超分辨率显微成像已有很大的发展, 有多种不同成像技术实际应用于生物系统的范例, 甚至已经出现了商业化的超分辨率显微成像系统. 但是, 目前的成像模式仍然远远没有达到完美状态, 对于固定样本成像其三维分辨率还没有达到可以和电子显微镜相媲美的几个纳米的

范围. 当前的发展趋势是结合不同成像模式的优点, 进一步提高成像的精度和准确度. 例如, 2009 年霍华德 - 休斯研究院的研究人员将 PALM/STORM 技术和光的干涉原理结合起来 (类似于 4π 和 SSIM 成像的原理), 将三维的分辨率提高到 20 nm 以内, 并极大地提高了收集同样光子后的定位精度^[29]. 为了进一步提高图像的分辨率、对比度和成像的灵活性, 人们努力的另一个方面是继续开发出量子效率更高、荧光更稳定、颜色不同的荧光蛋白或者是荧光染料. 例如, Jennifer Lippincott-Schwarz 实验室于 2009 年开发出稳定的红色光激活荧光蛋白 PA-mCherry, 使对两种不同蛋白质同时进行超分辨率 PALM 成像成为可能^[30]. 由于生命现象是非静止的不停歇活动的本质, 超分辨率成像应用的一个重要领域是活细胞成像, 如近来已有报道的可应用于活细胞上的超分辨率成像技术包括 SSIM 技术^[31]、PALM 技术^[16]和 STED 技术^[21]等. 但是, 活细胞上快速成像的分辨率远低于固定样本成像, 其时间分辨率也较低. 因此, 当前的研究热点集中在通过改进荧光探针和成像模式来进一步提高活细胞上超分辨率成像的时空分辨率.

应用和进一步完善超分辨率显微镜成像技术, 将使得科学家实时动态观察生物有机体内的生化反应过程成为现实, 为深刻认识复杂生命现象的本质打开了黑箱之窗, 使得人们可以直观地从基因表

达、蛋白质相互作用、信号网络、细胞功能等多层面、多视角观察研究有机体个体发育、遗传进化、重大疾病发生、环境对生命个体影响等生命现象发生、发展的过程,对阐释生命活动的基本规律、揭示疾病发生机理、建立疾病预警系统、提高医疗诊治水平、探寻发现新药物具有重大作用。

参 考 文 献

- Pawley J B. Handbook of Biological Confocal Microscopy, 3rd. USA: Springer, 2006. 20~42
- Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 2006, **313**(5793): 1642~1645
- Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods*, 2006, **3**(10): 793~795
- Klar T A, Jakobs S, Dyba M, *et al.* Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(15): 8206~8210
- Gustafsson M G. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(37): 13081~13086
- Santos A, Young I T. Model-based resolution: applying the theory in quantitative microscopy. *Appl Opt*, 2000, **39**(17): 2948~2958
- Spring K R, Fellers T J, Davidson M W. Resolution and contrast in confocal microscopy. <http://www.olympusfluoview.com/theory/resolutionintro.html>
- Barak L S, Webb W W. Fluorescent low density lipoprotein for observation of dynamics of individual receptor complexes on cultured human fibroblasts. *J Cell Biol*, 1981, **90**(3): 595~604
- Cheezum M K, Walker W F, Guilford W H. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophys J*, 2001, **81**(4): 2378~2388
- Thompson R E, Larson D R, Webb W W. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys J*, 2002, **82**(5): 2775~2783
- Yildiz A, Forkey J N, McKinney S A, *et al.* Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science*, 2003, **300**(5628): 2061~2065
- Ji W, Xu P, Li Z, *et al.* Functional stoichiometry of the unitary calcium-release-activated calcium channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(36): 13668~13673
- Penna A, Demuro A, Yeromin A V, *et al.* The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature*, 2008, **456**(7218): 116~120
- Patterson G H, Lippincott-Schwartz J. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science*, 2002, **297**(5588): 1873~1877
- Shroff H, Galbraith C G, Galbraith J A, *et al.* Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(51): 20308~20313
- Shroff H, Galbraith C G, Galbraith J A, *et al.* Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. *Nat Methods*, 2008, **5**(5): 417~423
- Bates M, Huang B, Dempsey G T, *et al.* Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science*, 2007, **317**(5845): 1749~1753
- Willig K I, Rizzoli S O, Westphal V, *et al.* STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature*, 2006, **440**(7086): 935~939
- Willig K I, Kellner R R, Medda R, *et al.* Nanoscale resolution in GFP-based microscopy. *Nat Methods*, 2006, **3**(9): 721~723
- Meyer L, Wildanger D, Medda R, *et al.* Dual-color STED microscopy at 30-nm focal-plane resolution. *Small*, 2008, **4**(8): 1095~1100
- Westphal V, Rizzoli S O, Lauterbach M A, *et al.* Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. *Science*, 2008, **320**(5873): 246~249
- von W Lukosz, Marchand M. Optischen Abbildung unter Überschreitung der beugungsbedingten Auflösungsgränze. *Opt Acta*, 1963, **10**(3): 241~255
- Huang B, Wang W, Bates M, *et al.* Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, 2008, **319**(5864): 810~813
- Pavani S R, Thompson M A, Biteen J S, *et al.* Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(9): 2995~2999
- Juette M F, Gould T J, Lessard M D, *et al.* Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples. *Nat Methods*, 2008, **5**(6): 527~529
- Dyba M, Jakobs S, Hell S W. Immunofluorescence stimulated emission depletion microscopy. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(11): 1303~1304
- Hell S W, Stelzer E H. Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation. *Opt Commun*, 1992, **93**(5~6): 277~282
- Schermelleh L, Carlton P M, Haase S, *et al.* Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy. *Science*, 2008, **320**(5881): 1332~1336
- Shtengel G, Galbraith J A, Galbraith C G, *et al.* Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(9): 3125~3130
- Subach F V, Patterson G H, Manley S, *et al.* Photoactivatable mCherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy. *Nat Methods*, 2009, **6**(2): 153~159
- Kner P, Chhun B B, Griffis E R, *et al.* Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination. *Nat Methods*, 2009, **6**(5): 339~342

Introduction to Theories of Several Super-resolution Fluorescence Microscopy Methods and Recent Advance in The Field*

LÜ Zhi-Jian¹⁾, LU Jing-Ze²⁾, WU Ya-Qiong¹⁾, CHEN Liang-Yi^{2)**}

¹⁾ Beijing Institute of Science and Technology Information, Beijing 100044, China;

²⁾ Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract In life science research, it is often required to localize proteins in a live cell to a certain accuracy to study their localization-related function. However, due to the Abbe/Rayleigh criteria of light, the widely used wide-field/confocal microscopy can never resolve structures less than 200 nm in diameter. In recent year, different super-resolution microscopy techniques emerge as a result of new fluorescent probes and imaging theories. A full frame to the theories and recent advancements in this field is summarized. The concept of point-spread function of light source in the focal plane and the classical definition of resolution is explained in the first part. The fluorescence single-molecular imaging technique and the equation that defines the localization accuracy of a single molecule is introduced in the second part. Based on these knowledge, super-resolution microscopy methods based on single-molecular imaging technique, such as photoactivated localization microscopy (PALM) and stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) is discussed further. On the other hand, by engineering the point spread function of the light source, super-resolution can also be achieved. Two typical methods, stimulated emission depletion (STED) and saturated structure illumination microscopy (SSIM) are explored thereafter. In the end, different methods to extract super-resolitional information along the z axis, and their combinations with the methods to increase xy plane resolution mentioned above are explained. In the end, the limitation to the current super-resolution methods and their future direction are also discussed.

Key words super-resolution fluorescence microscopy, point spread function (PSF), photoactivated localization microscopy (PALM), stochastic optical reconstruction microscopy (STORM), stimulated emission depletion (STED), saturated structure illumination microscopy (SSIM)

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00242

*This work was supported by grants from a special fund from Beijing City (PXM2009_178214_077580) and a fund from Beijing Academy of Sciences and Technology and The Major State Basic Research Program of China (2006CB705706).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64888524, E-mail: chen_liangyi@yahoo.com

Received: April 16, 2009 Accepted: September 3, 2009