



“十二五”国家重点出版规划项目

现代激光技术及应用丛书

超高时空分辨多维信息 获取技术及其应用

赵卫 等编著

Information Acquisition Technology with Super-high Spatial
and Temporal Resolution and its Applications



国防工业出版社
National Defense Industry Press



“十二五”国家重点出版规划项目

/现代激光技术及应用丛书/

超高时空分辨多维信息 获取技术及其应用

赵卫 等编著

国防工业出版社

· 北京 ·

内 容 简 介

本书介绍了多种超高时空分辨多维信息获取技术原理、研究进展和应用实例,包括超分辨光学显微成像技术及应用、空间高分辨光学技术在空间遥感中的应用、超快科学中的高时空多维分辨技术及应用、超高速大容量光子信息传输与处理以及强激光驱动器中的精密控制与诊断技术。

本书不拘泥于具体的公式推导环节,重点在于介绍每种技术的物理过程、技术特点与应用实例,可为信息领域从事光学与光电子技术应用研究的科研人员提供重要的参考依据,也为有志于从事信息领域科研工作的研究生和本科生提供一条快速入门的途径。

图书在版编目(CIP)数据

超高时空分辨多维信息获取技术及其应用/赵卫等编著.
—北京:国防工业出版社,2016.11
(现代激光技术及应用)
ISBN 978-7-118-11156-9

I. ①超… II. ①赵… III. ①光学—研究 IV. ①O43

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 305322 号

※

国防工业出版社出版发行

(北京市海淀区紫竹院南路 23 号 邮政编码 100048)

北京嘉恒彩色印刷有限责任公司印刷

新华书店经售

*

开本 710×1000 1/16 印张 23 字数 430 千字

2016 年 11 月第 1 版第 1 次印刷 印数 1—2500 册 定价 106.00 元

(本书如有印装错误,我社负责调换)

国防书店:(010)88540777

发行邮购:(010)88540776

发行传真:(010)88540755

发行业务:(010)88540717

丛书学术委员会 (按姓氏拼音排序)

主 任	金国藩	周炳琨		
副主任	范滇元	龚知本	姜文汉	吕跃广
	桑凤亭	王立军	徐滨士	许祖彦
	赵伊君	周寿桓		
委 员	何文忠	李儒新	刘泽金	唐 淳
	王清月	王英俭	张雨东	赵 卫

丛书编辑委员会 (按姓氏拼音排序)

主 任	周寿桓			
副主任	何文忠	李儒新	刘泽金	王清月
	王英俭	虞 钢	张雨东	赵 卫
委 员	陈卫标	冯国英	高春清	郭 弘
	陆启生	马 晶	沈德元	谭峭峰
	邢海鹰	阎吉祥	曾志男	张 凯
	赵长明			

世界上第一台激光器于1960年诞生在美国,紧接着我国也于1961年研制出第一台国产激光器。激光的重要特性(亮度高、方向性强、单色性好、相干性好)决定了它五十多年来在技术与应用方面迅猛发展,并与多个学科相结合形成多个应用技术领域,比如光电技术、激光医疗与光子生物学、激光制造技术、激光检测与计量技术、激光全息技术、激光光谱分析技术、非线性光学、超快激光学、激光化学、量子光学、激光雷达、激光制导、激光同位素分离、激光可控核聚变、激光武器等。这些交叉技术与新的学科的出现,大大推动了传统产业和新兴产业的发展。可以说,激光技术是20世纪最具革命性的科技成果之一。我国也非常重视激光技术的发展,在《国家中长期科学与技术发展规划纲要(2006—2020年)》中,激光技术被列为八大前沿技术之一。

近些年来,我国在激光技术理论创新和学科发展方面取得了很多进展,在激光技术相关前沿领域取得了丰硕的科研成果,在激光技术应用方面取得了长足的进步。为了更好地推动激光技术的进一步发展,促进激光技术的应用,国防工业出版社策划并组织编写了这套丛书。策划伊始,定位即非常明确,要“凝聚原创成果,体现国家水平”。为此,专门组织成立了丛书的编辑委员会。为确保丛书的学术质量,又成立了丛书的学术委员会。这两个委员会的成员有所交叉,一部分人是几十年在激光技术领域从事研究与教学的老专家,一部分人是长期在一线从事激光技术与应用研究的中年专家。编辑委员会成员以丛书各分册的第一作者为主。周寿桓院士为编辑委员会主任,我们两位被聘为学术委员会主任。为达到丛书的出版目的,2012年2月23日两个委员会一起在成都召开了工作会议,绝大部分委员都参加了会议。会上大家进行了充分讨论,确定丛书书目、丛书特色、丛书架构、内容选取、作者选定、写作与出版计划等等,丛书的编写工作从那时就正式地开展起来了。

历时四年至今日,丛书已大部分编写完成。其间两个委员会做了大量的工作,又召开了多次会议,对部分书目及作者进行了调整,组织两个委员会的委员对编写大纲和书稿进行了多次审查,聘请专家对每一本书稿进行了审稿。

总体来说,丛书达到了预期的目的。丛书先后被评为“十二五”国家重点出

版规划项目和国家出版基金项目。丛书本身具有鲜明特色:①丛书在内容上分三个部分,激光器、激光传输与控制、激光技术的应用,整体内容的选取侧重高功率高能激光技术及其应用;②丛书的写法注重了系统性,为方便读者阅读,采用了理论—技术—应用的编写体系;③丛书的成书基础好,是相关专家研究成果的总结和提炼,包括国家的各类基金项目,如973项目、863项目、国家自然科学基金项目、国防重点工程和预研项目等,书中介绍的很多理论成果、仪器设备、技术应用获得了国家发明奖和国家科技进步奖等众多奖项;④丛书作者均来自国内具有代表性的从事激光技术研究的科研院所和高等院校,包括国家、中科院、教育部的重点实验室以及创新团队等,这些单位承担了我国激光技术研究领域的绝大部分重大的科研项目,取得了丰硕的成果,有的成果创造了多项国际纪录,有的属国际首创,发表了大量高水平的具有国际影响力的学术论文,代表了国内激光技术研究的最高水平,特别是这些作者本身大都从事研究工作几十年,积累了丰富的研究经验,丛书中不仅有科研成果的凝练升华,还有着大量作者科研工作的方法、思路和心得体会。

综上所述,相信丛书的出版会对今后激光技术的研究和应用产生积极的重要作用。

感谢丛书两个委员会的各位委员、各位作者对丛书出版所做的奉献,同时也感谢多位院士在丛书策划、立项、审稿过程中给予的支持和帮助!

丛书起点高、内容新、覆盖面广、写作要求严,编写及组织工作难度大,作为丛书的学术委员会主任,很高兴看到丛书的出版,欣然写下这段文字,是为序,亦为总的前言。

金国藩 周灿瑞

2015年3月

前言

在信息化时代,对信息的获取、传输和处理越来越向精细化和超高速方向发展。精细化主要是指宏观和微观两个方面越来越高的空间分辨力。宏观是指空间科学探测和光学遥感的高分辨光学信息获取,它已被我国和世界主要科技大国列为未来五十年认知宇宙空间、改变人类生存环境和人类未来命运的重大科技问题。微观领域的高分辨与超分辨能够达到纳米分辨能力,可以探索和认知人类疾病的缘由及演变,从而改变人类健康状况和生存状况。超高速是指如何高效地利用现代技术的发展所产生的海量信息,海量信息的传输、交换与应用已成为目前的重大科学技术问题。可以看出,针对当今信息获取和利用的超高分辨及超高速发展潮流与需求,激光与光电子学技术将发挥越来越重要的作用。本书介绍了多种超高时空分辨多维信息获取技术的最新研究进展、设计原理与应用实例,包括超分辨光学显微成像技术及应用、空间高分辨光学技术在空间遥感中的应用、超快科学中的高时空多维分辨技术及应用、超高速大容量光子信息传输与处理以及强激光驱动器中的精密控制与诊断技术。本书面向从事光学与光电子学专业研究的科研工作者,既突出技术方法的先进性和基础性,又通过实例介绍强调技术的工程应用可行性和实用性,以便于科研工作者快速理解和熟悉最新技术原理与技术方法,也为快速推动技术发展和相关领域应用奠定基础。

本书第1章由姚保利编写,第2章由薛彬和朱少岚编写,第3章由赵卫、程昭、刘红军、王屹山、曾健华、胡晓鸿、田进寿、白永林等共同编写,第4章由刘雪明、谢小平、刘元山、张文富编写,第5章由达争尚编写。解培月、赵意意、惠丹丹、李昊、刘蓉、王强强、汪伟、胡辉、黄新宁、段骏、李红光、王虎山等参加了部分章节的编写和整理,全书由赵卫研究员设计框架并统稿。

本书学科覆盖面广,内容丰富,由于时间紧迫,难免存在疏漏,欢迎读者批评指正。

作者
2016年8月

第1章 超分辨光学显微成像技术及应用

1.1 光学显微成像技术概述	001
1.1.1 光学显微成像的分辨力极限	001
1.1.2 远场超分辨光学显微成像方法	002
1.2 单分子定位超分辨显微成像方法	004
1.2.1 光激活定位显微成像技术	004
1.2.2 随机光学重构显微成像技术	005
1.3 特殊强度分布照明光场超分辨显微成像方法	006
1.3.1 受激发射损耗显微成像技术	006
1.3.2 结构照明显微成像技术	007
1.4 高分辨三维数字全息显微成像方法	008
1.4.1 数字全息显微成像技术	008
1.4.2 微分干涉对比显微成像技术	009
1.4.3 相衬干涉显微成像技术	010
1.4.4 低相干干涉显微成像技术	011
1.5 总结与展望	012
参考文献	013

第2章 空间高分辨光学技术在空间遥感中的应用

2.1 高分辨空间立体成像技术及应用	016
2.1.1 空间成像原理与基础理论	016
2.1.2 高分辨空间成像关键因素分析	019
2.1.3 新型高分辨空间成像方法	019
2.1.4 高分辨空间成像系统应用	021
2.2 高分辨光谱成像与探测技术及应用	023
2.2.1 空间光谱成像原理及基础理论	023
2.2.2 高空间分辨光谱成像探测技术	027
2.2.3 超高光谱分辨探测技术	029

2.2.4 高分辨光谱成像应用实例	035
2.3 高分辨激光雷达成像技术及应用领域	037
2.3.1 激光雷达的成像原理与组成	037
2.3.2 高分辨激光雷达成像方法	041
2.3.3 应用实例	044
参考文献	047

第3章 超快科学中的高时空多维分辨技术及应用

3.1 超短超强激光新理论与新型光源技术	050
3.1.1 飞秒钛宝石多通放大技术	050
3.1.2 周期量级超短超强激光技术及 CEP 控制	071
3.1.3 阿秒脉冲的产生、测量与应用	096
3.1.4 OPCPA 理论与设计	107
3.1.5 新型光纤超快激光产生与放大技术	116
3.2 一维空间/时间高分辨诊断技术	137
3.2.1 一维空间/时间高分辨诊断技术概述	137
3.2.2 条纹成像诊断技术	140
3.2.3 条纹成像诊断技术应用	168
3.3 二维空间/时间高分辨诊断技术	169
3.3.1 二维空间/时间高分辨诊断技术概述	169
3.3.2 MCP 行波选通软 X 射线分幅成像诊断技术	174
参考文献	224

第4章 超高速大容量光子信息传输与处理

4.1 概述	233
4.1.1 光子信息传输系统组成	234
4.1.2 光子信息传输技术发展现状	234
4.1.3 耗散孤子理论	236
4.2 超高速大容量光子信息传输技术	245
4.2.1 传统超高速大容量光复用技术	245
4.2.2 新型超高速大容量光复用技术	250
4.2.3 新型高阶调制与解调技术	252
4.3 超高速光信息采样获取技术	258
4.3.1 引言	258

4.3.2	超高速光学采样技术的国内外研究进展	258
4.4	超高速光子信号处理技术	271
4.4.1	超高速全光波长变换技术	271
4.4.2	超高速光信号低噪放大技术	276
4.5	高速光子集成技术	279
4.5.1	光子集成芯片关键材料与器件	281
4.5.2	面向计算的超高速光互连	290
4.5.3	高速光通信集成芯片技术	293
4.5.4	MEMS 微显示芯片技术	296
	参考文献	299

第5章 强激光驱动器中的精密控制与诊断技术

5.1	强激光参数概述	307
5.2	强激光参数诊断技术	308
5.2.1	激光时间特性诊断	308
5.2.2	激光能量参数诊断	312
5.2.3	激光近场参数诊断	315
5.2.4	激光波前参数诊断	318
5.2.5	激光远场参数诊断	322
5.2.6	激光光谱诊断	325
5.3	强激光驱动器中的光路控制技术	325
5.3.1	光路控制原理	326
5.3.2	光路控制模型	327
	参考文献	330

第 1 章

超分辨光学显微成像技术及应用

1.1 光学显微成像技术概述

1.1.1 光学显微成像的分辨力极限

自从 17 世纪初意大利科学家伽利略 (Galileo, 1564—1642) 发明天文光学望远镜, 17 世纪中荷兰商人列文胡克 (Leeuwenhoek, 1632—1723) 发明光学显微镜以来, 光学成像技术极大地推动了人类文明的进程, 使人类的观察视野一下延伸到了两个极端的世界: 浩瀚的宇宙和神秘的微观世界。在这 400 年里, 人们不断地发展新的技术以提高光学成像系统的分辨力。直到 19 世纪末 20 世纪初, 德国科学家阿贝 (Abbe, 1840—1905) 和英国科学家瑞利 (Rayleigh, 1842—1919) 从光的波动理论证明, 在成像光学系统中, 由于光的衍射效应, 理想物点经过系统所成的像不再是理想的几何点像, 而是有一定大小的光斑 (即艾里斑), 当两个物点过于靠近以至于其像斑重叠在一起时, 就不能分辨出是两个物点的像, 即光学系统中存在着一个分辨极限。这个分辨极限通常采用瑞利提出的判据: 当一个艾里斑的中心与另一个艾里斑的第一级暗环重合时, 刚好能分辨出是两个点, 即著名的瑞利判据 (Rayleigh Criterion), 用公式表示为^[1]

$$\delta = 1.22 \frac{\lambda}{D} f \quad (1-1)$$

式中: λ 为在像方介质中光的波长; f 为系统焦距; D 为孔径; D/f 为相对孔径。在显微光学系统中通常使用数值孔径 ($NA = n \sin \alpha$) 表征, 式 (1-1) 可以改写为

$$\delta = 0.61 \frac{\lambda_0}{NA} \quad (1-2)$$

式中: λ_0 为光的真空波长。由式 (1-1)、式 (1-2) 可知, 要达到高分辨本领, 可以缩短波长或提高相对 (数值) 孔径, 在可见光范围内其分辨力极限约为 200nm。

阿贝-瑞利衍射极限是在光的标量衍射理论框架下得到的, 实际上光是一

种矢量波,描述它不仅具有频率、振幅和相位参量,还具有偏振特征。因此,完整描述光波应该用矢量方程。20 世纪中,美国科学家理查德(Richards)和沃尔夫(Wolf)给出了精确计算焦场分布的理查德-沃尔夫衍射积分公式^[2]:

$$E(\mathbf{r}) = \frac{-ikf}{2\pi} \int_0^{\theta_{\max} 2\pi} \int_0^{\theta_{\max}} \sqrt{\cos(\theta)} l_0(\theta, \phi) \mathbf{u}(\theta, \phi) \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}) \sin\theta d\phi d\theta \quad (1-3)$$

式中: $l_0(\theta, \phi)$ 为物镜入瞳面内场的复振幅分布; $\mathbf{u}(\theta, \phi)$ 为入瞳面内各个光线的偏振矢量经过转迹后在像空间内的偏振矢量。可以证明,当入射光为线偏振均匀照射时,即 $l_0(\theta, \phi) \mathbf{u}(\theta, \phi) = 1$, 由积分式(1-3)可以得到分辨力式(1-1)和式(1-2)。因此,理查德-沃尔夫积分公式是更一般的计算公式,它同时考虑了入射场的振幅、相位和偏振分布。那么,在特定的偏振、相位和振幅分布情况下,所得到的光斑尺寸有可能小于阿贝-瑞利衍射极限决定的值。例如,在径向偏振光照明的情况下,光斑的面积约为线偏振光照明下光斑面积的 61.5%^[3], 可显著缩小光斑尺寸。通过设计特殊的波前振幅或相位“滤波器”,也可以达到缩小光斑尺寸的目的^[1], 例如用一个不透明的圆形物体来阻挡入瞳处入射场的中心区域,即采用环形光入射,当被阻挡的中心区域增大时,聚焦亮斑逐渐缩小。

由上述分析可见,对于聚焦扫描成像光学系统,采用特殊调制的人射光束可以获得更小的聚焦光斑尺寸,突破常规的阿贝-瑞利衍射极限,但是其改善程度并不是很大。而对宽场成像光学系统,则不能使用这种照明方式,需要其他特殊的结构照明方式来提高分辨力。以上是从纯光学方法的角度考虑来提高成像的分辨力,如果利用光与物质相互作用的一些非线性光学效应,则可以获得更加丰富多彩的超分辨光学成像方法。另外,光学系统的成像分辨力除了与光学镜头有关以外,还与探测器的分辨力、信噪比、灵敏度,以及图像处理技术等因素有关,需要综合考虑。

1.1.2 远场超分辨光学显微成像方法

现代生物学和材料科学的发展对微观结构的研究提出了越来越高的分辨力需求,希望从分子水平揭示生命过程和材料性能的物理本质。受光学衍射极限的限制,普通光学显微镜的横向分辨力一般只能达到 200nm,纵向分辨力约为 500nm。这对于研究亚细胞结构和分子结构已无能为力。虽然电子显微镜和原子力显微镜可以达到亚纳米的分辨力,但是其只能对非活性离体细胞样品进行观测的缺点限制了其在生物领域的广泛应用。因此,如何利用光学方法突破传统光学显微镜的分辨力极限进入纳米观测领域,成为光学显微成像技术的一个重要挑战和机遇。

光学显微成像技术在生物学中的普遍应用,很大程度得益于各种荧光探针分

子的出现,使用不同的荧光分子可以标记样品的不同部位和细胞器,通过探测特定波长激发荧光分子发出的荧光(主动成像技术),可以对活细胞内的单分子进行实时成像^[4-6]。也正是因为荧光探针分子的使用,利用激发光与荧光分子相互作用的一些非线性光学效应,发展了各种各样的超分辨光学成像方法。光学显微成像技术根据探测模式可以分为两大类:点扫描成像技术和宽场成像技术。

以激光共聚焦荧光显微(Confocal Microscopy)为代表的点扫描成像技术,用高度聚焦的激光束对样品逐点扫描成像,荧光信号经过探测针孔滤波后被光电倍增管探测收集,由于只有激光焦点处激发的荧光可以通过探测针孔,所以激光共聚焦显微具有极低的背景噪声,而且通过逐层扫描样品,可以实现三维成像^[7]。但是激光共聚焦荧光显微的横向分辨力并没有超过衍射极限。多光子荧光显微与共聚焦显微很类似,不同的是它使用超短脉冲激光作为激发光源,由于多光子吸收是非线性效应,只发生在焦点处,所以探测器前不需要针孔滤光,并且由于激发光使用长波段的近红外光,具有探测样品更深层结构的能力。

宽场成像技术采用面阵图像传感器(如CCD),可以在一个时间点获得一幅完整的二维图像,具有速度快、图像灰度级高等优点。但是由于受样品离焦部分的干扰,普通的宽场成像技术不具有三维层析成像能力。全内反射荧光显微(Total Internal Reflection Fluorescent Microscope, TIRFM)是一种宽场成像技术,它利用光线全反射后在界面产生消逝波激发样品,因为消逝波强度垂直于界面呈指数衰减,使激发区域限定在样品表面的一薄层范围内(小于200nm),从而大大降低了背景光噪声,近年来已广泛应用于单分子的荧光成像中^[8],但其分辨力也受到衍射极限的制约。

近场扫描光学显微(Scanning Near-field Optical Microscope, SNOM)不受衍射极限的制约。1928年, Synge^[9]提出用亚波长的小孔在样品表面扫描获取样品消逝场信息,从而可以获得亚波长的分辨力。但是受制于工作距离以及样品, SNOM基本属于接触测量,不适用于活体生物样品的观察。另外,近场图像是样品与探测针尖信息的混合物,如果针尖大于被分析物体的细微结构,所得到的像则更多地与针尖特性有关,而不是与样品的结构相关^[10]。

近年来,随着各种新型荧光探针分子的出现和成像方法的改进,远场光学成像的分辨力已经突破了衍射极限的限制。这里重点介绍远场光学超分辨荧光显微成像技术,主要分为两大类:一类是基于单分子定位技术的超分辨显微成像方法,包括光激活定位显微(Photoactivated Localization Microscopy, PALM)技术和随机光学重构显微(Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM)技术;另一类是基于特殊强度分布照明光场的超分辨显微成像方法,包括受激发射损耗显微(Stimulated Emission Depletion, STED)技术和结构照明显微(Structured Illumination Microscopy, SIM)技术。除此之外,对于非荧光显微成像方法,将介绍

具有三维成像能力的数字全息显微成像技术。

1.2 单分子定位超分辨显微成像方法

使用高灵敏度的探测器和高信噪比的显微成像技术可以得到单个荧光分子的光学图像,但是这个单个荧光分子的显微图像是一个接近衍射极限的艾里斑,其强度半高宽取决于光学系统的点扩散函数(Point Spread Function, PSF)。单分子荧光成像本身不能突破衍射极限,但是当显微镜视场中只有一个或几个荧光分子时,该荧光分子的位置通过特定的算法拟合,可以达到亚纳米级的精确测量。单分子的二维定位精度 a 可近似地表示为 $a = \Delta x / \sqrt{N}$, 其中 Δx 为光学系统 PSF 的半高宽, N 为单个荧光分子发出的光子数。对于量子效率较高的荧光染料,单个荧光分子图像可以贡献 106 个光子,因此单分子定位精度可以达到 1nm 以下^[11-14]。

1.2.1 光激活定位显微成像技术

2006 年, Betzig 等^[15]首次提出了基于单分子定位技术的光激活定位显微(PALM)技术。PALM 的基本原理是用光活化绿色荧光蛋白(PA-GFP)来标记蛋白质,通过调节 405nm 激光器的能量,低能量照射细胞表面,一次仅激活视野下稀疏分布的几个荧光分子,然后再用 488nm 激光照射激发荧光,通过高斯拟合来精确定位这些荧光单分子的位置。随后再使用 488nm 激光照射来漂白这些已经定位精确的荧光分子,使它们不被下一轮的激光再激活出来。之后,再分别用 405nm 和 488nm 激光来激活和漂白其他的荧光分子,进入下一次循环。经过持续多次循环后,细胞内大多数荧光分子被精确定位。将这些分子的图像合成到一张图上,最后可以得到比传统光学显微镜高 10 倍分辨力的显微图像,如图 1-1 所示。PALM 技术只能用来观察外源表达的蛋白质,对于分辨细胞内源蛋白质的定位无能为力。

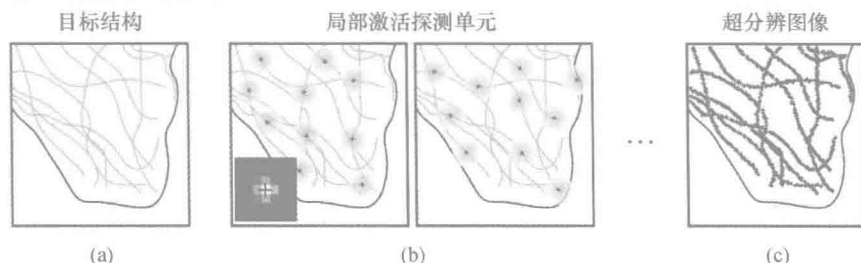


图 1-1 基于单分子定位技术的超分辨显微成像方法(PALM & STORM)原理示意图

每次只激发少数离散的荧光分子发光,并且不会产生空间上的重叠。不断重复激发和探测,最终可以精确地定位出足够多的荧光分子,利用这些多幅子图像重建出超分辨的图像。在图(b)左下角显示的实验图像中,蓝色部分表示单个荧光分子显微图像,红色十字是该荧光分子的精确位置^[18]。

1.2.2 随机光学重构显微成像技术

2006 年底,美国霍华德-休斯研究所的华裔科学家庄晓薇等^[16]开发出一种类似于 PALM 的方法,可以用来研究细胞内源蛋白的超分辨力定位。他们发现,不同的波长可以控制化学荧光分子 Cy5 在荧光激发态和基态之间切换,例如橙色 561nm 的激光可以激活 Cy5 发射荧光,但长时间照射可以将 Cy5 分子转换成基态不发光。之后,用蓝色的 488nm 激光照射 Cy5 分子时,又可以将其从基态转换成荧光态,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 分子对交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^[17]。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,此过程多次循环后就可以得到最后的内源蛋白的高分辨力影像。他们命名该技术为随机光学重构显微技术 (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM)^[16]。

PALM 与 STORM 的分辨力仅仅受限于单分子的定位精度,理论上可以达到亚纳米量级,能与电子显微镜相媲美。但是根据奈奎斯特采样定律,若频带宽度有限,要从抽样信号中无失真地恢复原信号,采样频率应大于 2 倍信号最高频率。因此, PALM 与 STORM 所采样荧光分子的空间间隔应该小于其分辨力的 1/2。由于每一幅子图像只能定位一定数量的离散荧光分子,因此得到一幅高分辨力的样品显微图像,需要对数万甚至上千万幅原始图片进行合成,导致得到 1 帧图像往往需要几小时。如图 1-2 所示,如果取样精度不够,就不能重构出高分辨力的样品图像。最新的 PALM 技术虽然已经可以实现几十秒 1 帧图像的处理速度,但还是不能适用于那些要求实时观察的活体细胞^[19]。

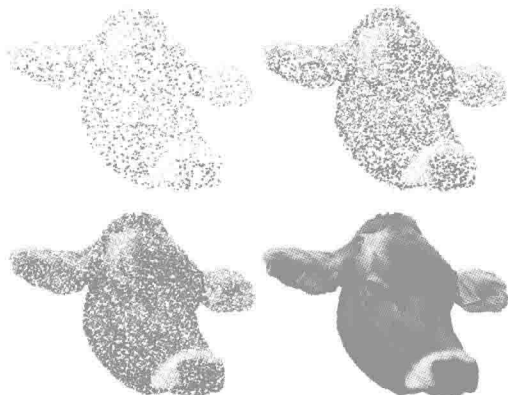


图 1-2 单分子定位成像技术中图像重构过程示意图

随着采样点的增加,重构图像的清晰度也在逐步提高^[20]。

1.3 特殊强度分布照明光场超分辨显微成像方法

1.3.1 受激发射损耗显微成像技术

1994年,德国科学家 Stefan Walter Hell 等^[21,22]提出一种受激发射损耗显微成像技术。如图 1-3 所示,其基本原理是用一束脉冲激发荧光分子发光的同时,用另外一束空心的脉冲激光(STED 激光)将第一束光斑周边大部分的荧光分子通过受激发射损耗过程将其荧光猝灭,因此可发射荧光的区域被限制在小于衍射极限的空心区域内,从而获得一个小于衍射极限的荧光发光点。其强度半高宽从传统的 $\frac{\lambda}{2n\sin\alpha}$ 变成 $\frac{\lambda}{2n\sin\alpha \sqrt{1 + I/I_{\text{sat}}}}$, 其中 I 为 STED 激光的聚焦强度, I_{sat} 为荧光分子的饱和吸收强度。由此公式可看出,当 I/I_{sat} 的值很大时,STED 成像的点光源可以趋于无穷小。使用特殊的不漂白的量子点荧光材料,目前报道的 STED 显微成像技术最高分辨力可达到 6nm^[23]。但是在生物成像中,可以加载到生物样品的激光功率是有限的,过高的激光功率会对样品造成损伤,这是制约 STED 空间分辨力的主要因素。STED 显微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,目前可以实现空间分辨力 62nm、每秒 28 帧的速度采集图像^[24]。

需要指出的是,STED 显微成像技术是一种点扫描成像技术,高的图像采集速率是以牺牲光束扫描范围来实现的。与宽场成像技术相比,点扫描成像一般具有较强的荧光漂白效应,有可能对活体生物组织带来损伤。另外,STED 系统光路复杂,价格非常昂贵。

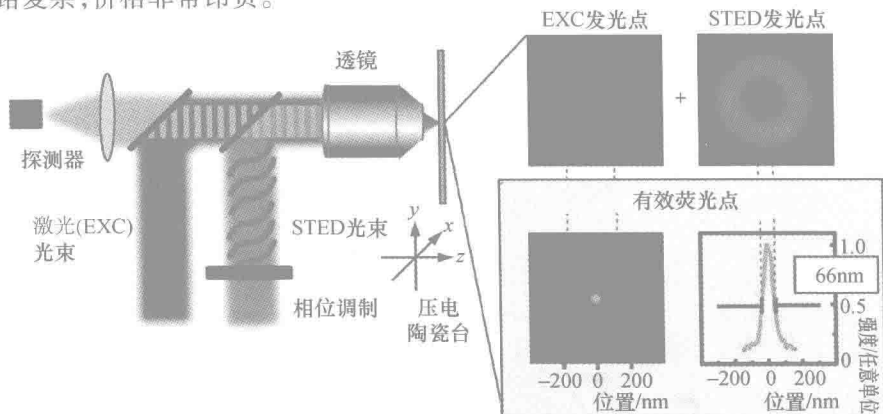


图 1-3 STED 荧光显微成像原理示意图

紫色代表的是激发激光,黄色代表的是空心受激发射损耗激光(STED 激光),两束激光经过时间和空间调制后同时照射在样品上。由右图中可以看出,激发光斑(紫色)经 STED 激光(黄色)调制后,极大地减少了荧光分子发光的光斑大小(绿色),其半高宽可以达到 66nm^[25]。

1.3.2 结构照明显微成像技术

突破光学衍射极限远场光学显微的另一种方法是结构照明显微成像技术。SIM 是一种宽场光学显微成像技术,使用面阵 CCD 并行采集图像,具有比 STED 更高的时间分辨力,与普通宽场显微不同的是它还具有三维层析成像的能力^[26,27]。SIM 的原理如图 1-4 所示,显微物镜的空间分辨力取决于它能采集到的最大空间频率 f_0 , f_0 取决于显微物镜的光学传递函数(OTF), $f_0 = 2NA/\lambda$ 。当样品包含的高频信息 $f > f_0$ 时,样品的细节将难以分辨。如果使用空间频率为 f_1 的正弦条纹结构光照明样品,则会产生空间频率为 $f_m = |f - f_1|$ 的低频莫尔条纹(Moiré Fringes)。莫尔条纹实际上是样品与结构光的拍频(Beat Frequency)信号,它包含样品超衍射分辨的高频信息 f 。当 $f_m < f_0$ 时,莫尔条纹可以在显微物镜下观察到,通过软件解码,可以提取出样品的超分辨力信息,重组出样品的高分辨力图像。从频域来看,SIM 将物镜能收集到的最大空间频率从 f_0 提高到了 $f_0 + f_1$ 。因此 f_1 越大,SIM 显微的空间分辨力就越高。但是结构照明光场的空间频率 f_1 是受衍射极限限制的,当 $f_1 > f_0$ 时,它将不能分辨。因此,SIM 显微最大可以将光学显微系统的空间分辨力提高 1 倍。

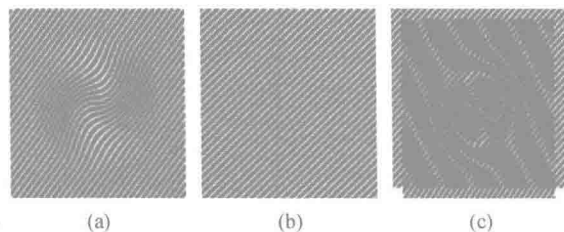


图 1-4 SIM 的原理

(a) 当样品高频信息 f 超出物镜能接受的最大空间频率 f_0 时,物镜将丢失这部分信息;(b) 使用空间频率为 f_1 的结构光场照明样品;(c) 结构照明光场与样品高频分量拍频产生的低频摩尔条纹 $f_m = |f - f_1| < f_0$ 可以被物镜分辨^[27]。

纵向分辨力远低于横向分辨力一直是困扰远场光学显微的问题,结构照明显微还可以提高纵向分辨力。多光束干涉可以产生具有三维周期分布的结构照明光场,从而可实现三维空间的超分辨成像^[28]。2008 年,美国 Gustafsson 小组^[29]使用三光束干涉 SIM,成功地观察到细胞核膜上核孔复合体的精细三维结构,其横向分辨力达到 100nm,纵向分辨力达到 200nm。同年,他们使用六光束干涉并结合非相干光干涉照明干涉成像显微技术(Incoherent Interference Illumination Image Interference Microscopy, I⁵M),实现了纵向及横向空间分辨力均为 100nm 的三维结构照明显微,使得从微观上精确定位细胞内部各种细胞器及观测活体细胞内的活动和反应成为可能^[30]。