



北京大学
PEKING UNIVERSITY

光学成像在生命科学中的应用：从 2014年诺贝尔奖纳米显微技术谈起

龚旗煌

北京大学物理系

人工微结构和介观物理国家重点实验室

报告内容

一、引言

二、显微镜发明

三、突破衍射极限成像

四、看不见光 —— 新波段应用

五、致谢

一、引言



The Nobel Prize in Chemistry 2014

Eric Betzig, Stefan W. Hell, William E. Moerner

Share this:

The Nobel Prize in Chemistry 2014



Photo: Matt Staley/HHMI

Eric Betzig

Prize share: 1/3



© Bernd Schuller, Max-Planck-Institut

Stefan W. Hell

Prize share: 1/3



Photo: K. Lowder via Wikimedia Commons, CC-BY-SA-3.0

William E. Moerner

Prize share: 1/3

The Nobel Prize in Chemistry 2014 was awarded jointly to Eric Betzig, Stefan W. Hell and William E. Moerner "for the development of super-resolved fluorescence microscopy".

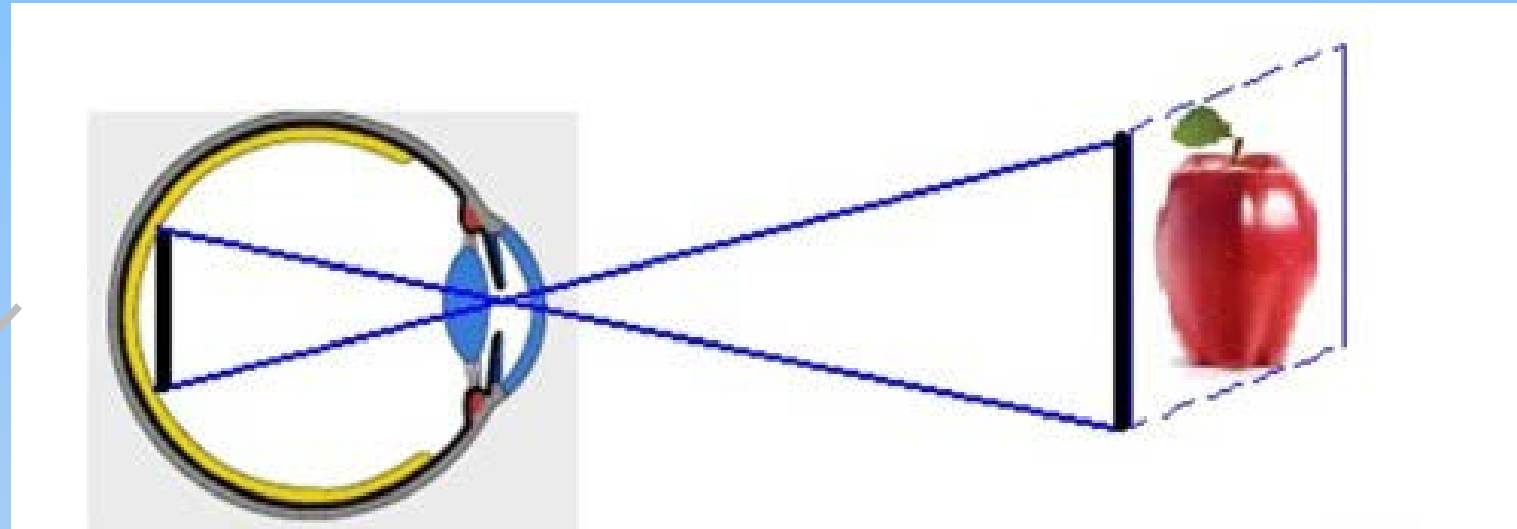
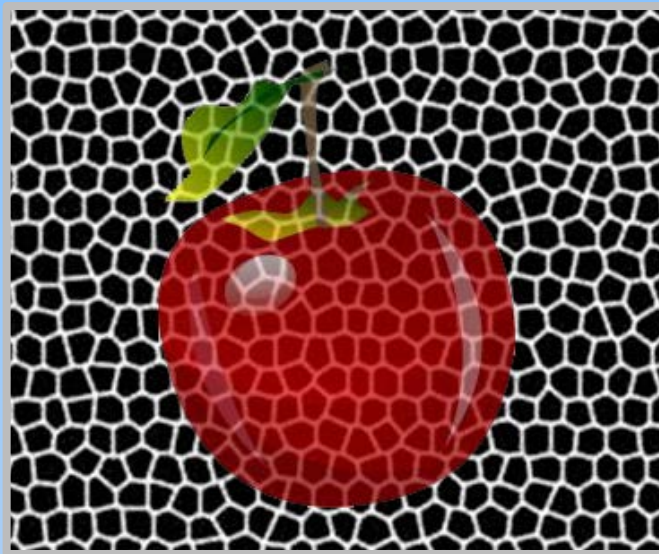
2014年诺贝尔化学奖授予美国科学家埃里克·白兹格、威廉姆·莫尔纳尔和德国科学家斯特凡·赫尔，以表彰他们在超高分辨率荧光显微技术领域的贡献。

显微镜 ——

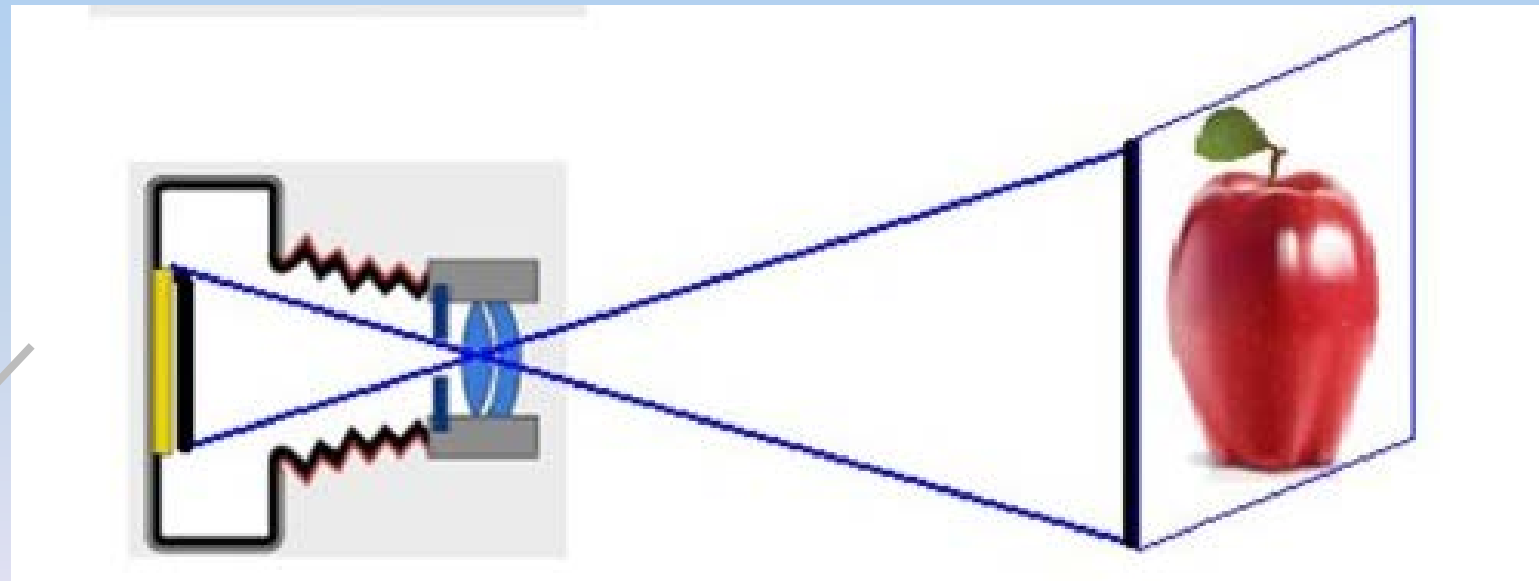
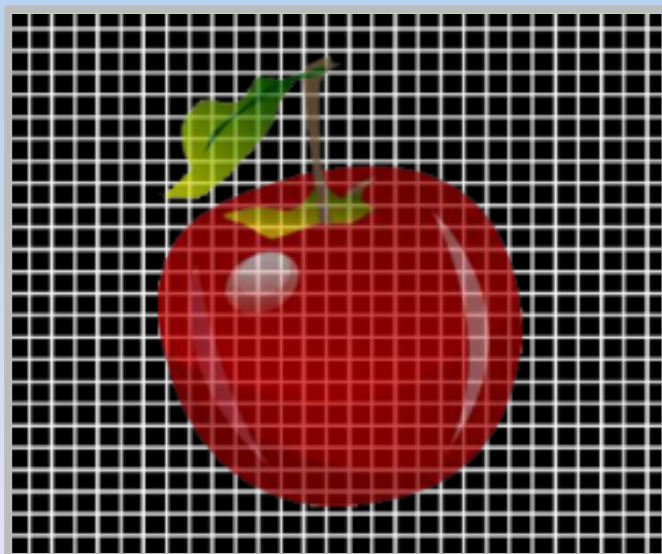
生命科学中光学成像的首要工具



我们怎么“看见”？

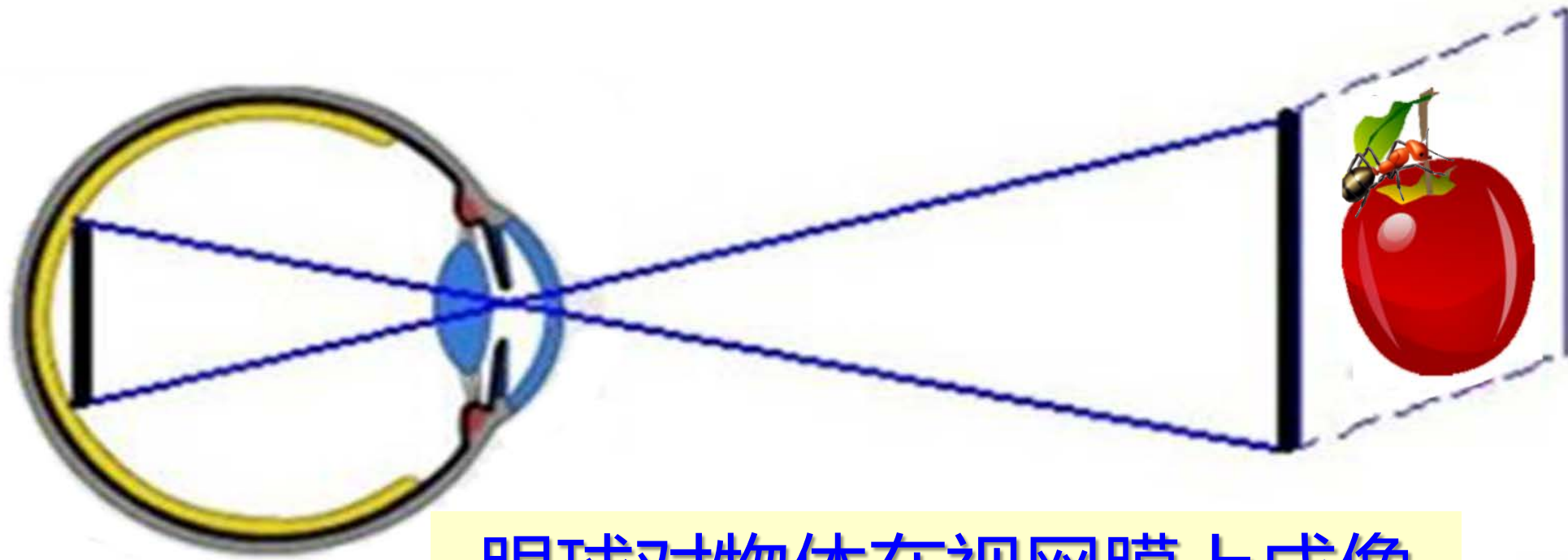


眼球对物体在视网膜上成像

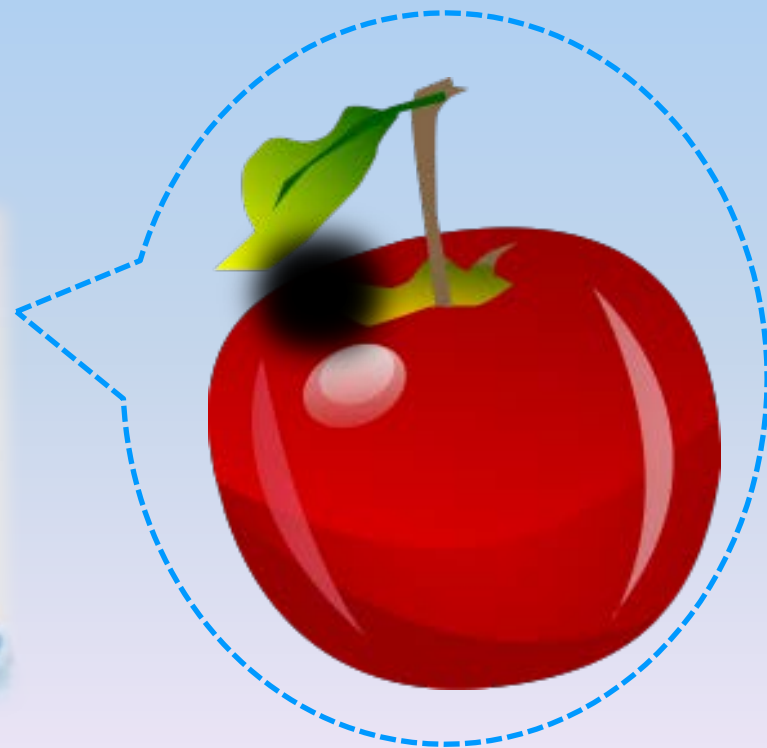


透镜对物体在照相底片上成像

我们能看多小？

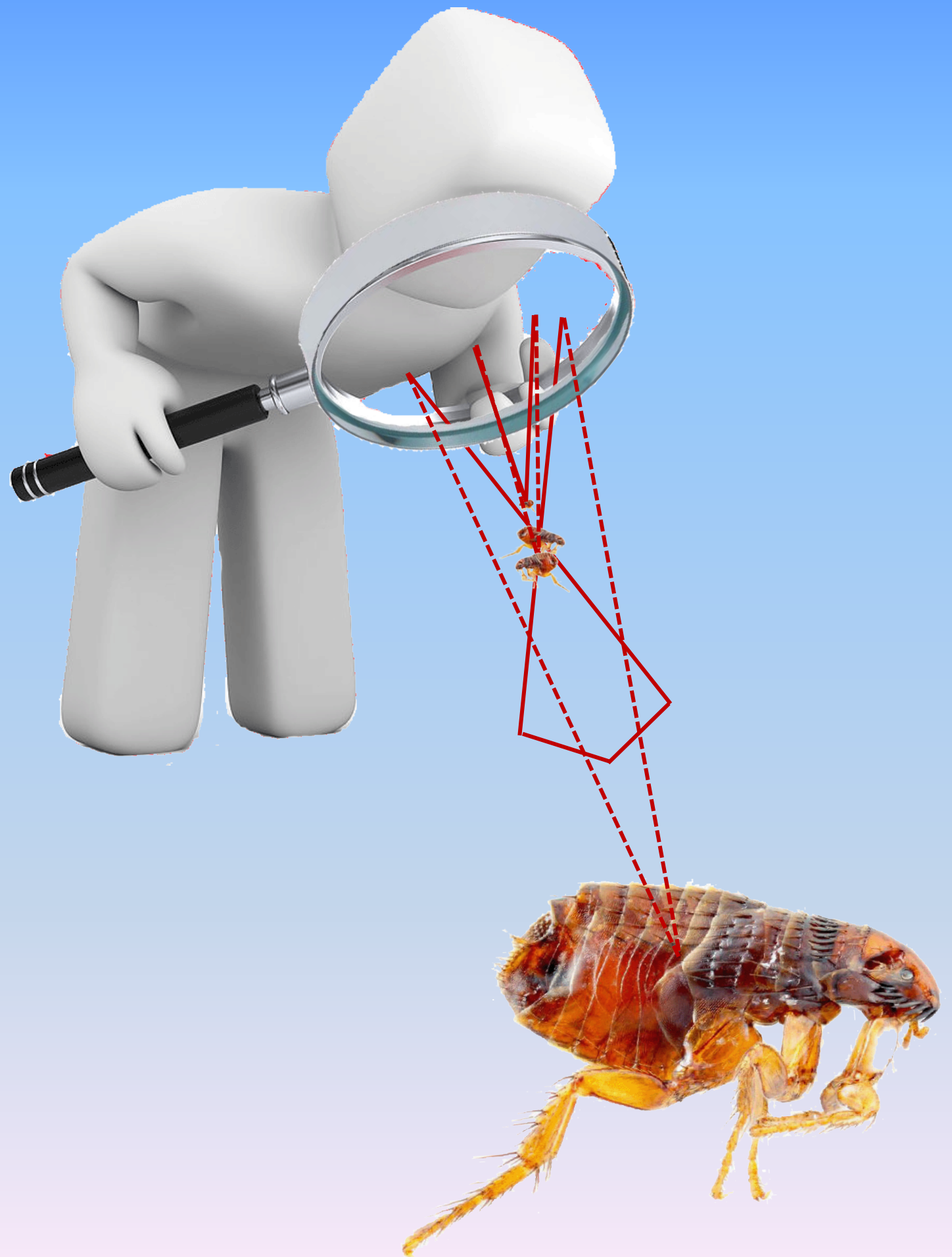


眼球对物体在视网膜上成像



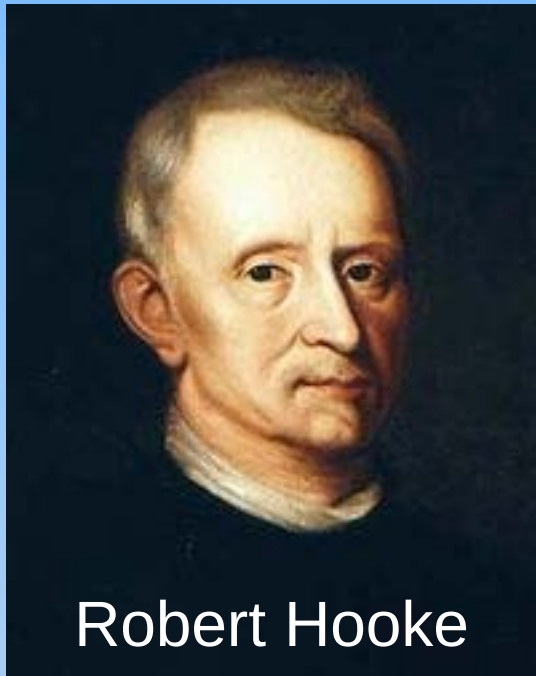
二、显微镜发明

早在公元前一世纪，人们就已发现通过球形透明物体去观察微小物体时，可以使其放大成像。后来逐渐对球形玻璃表面能使物体放大成像的规律有了认识。



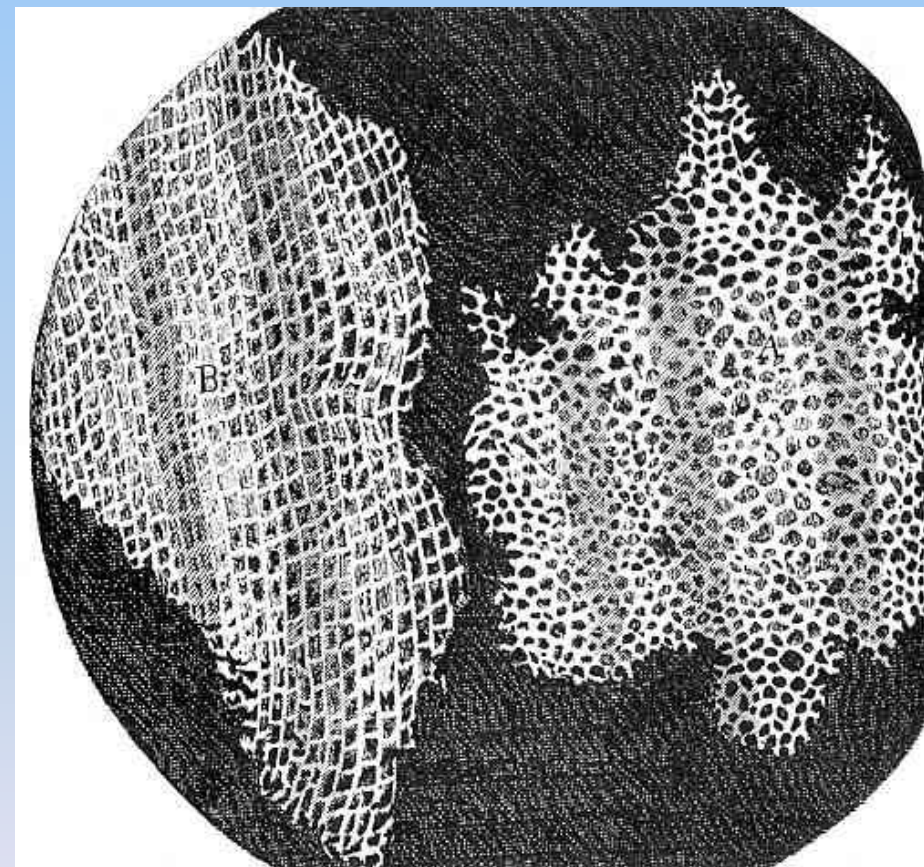
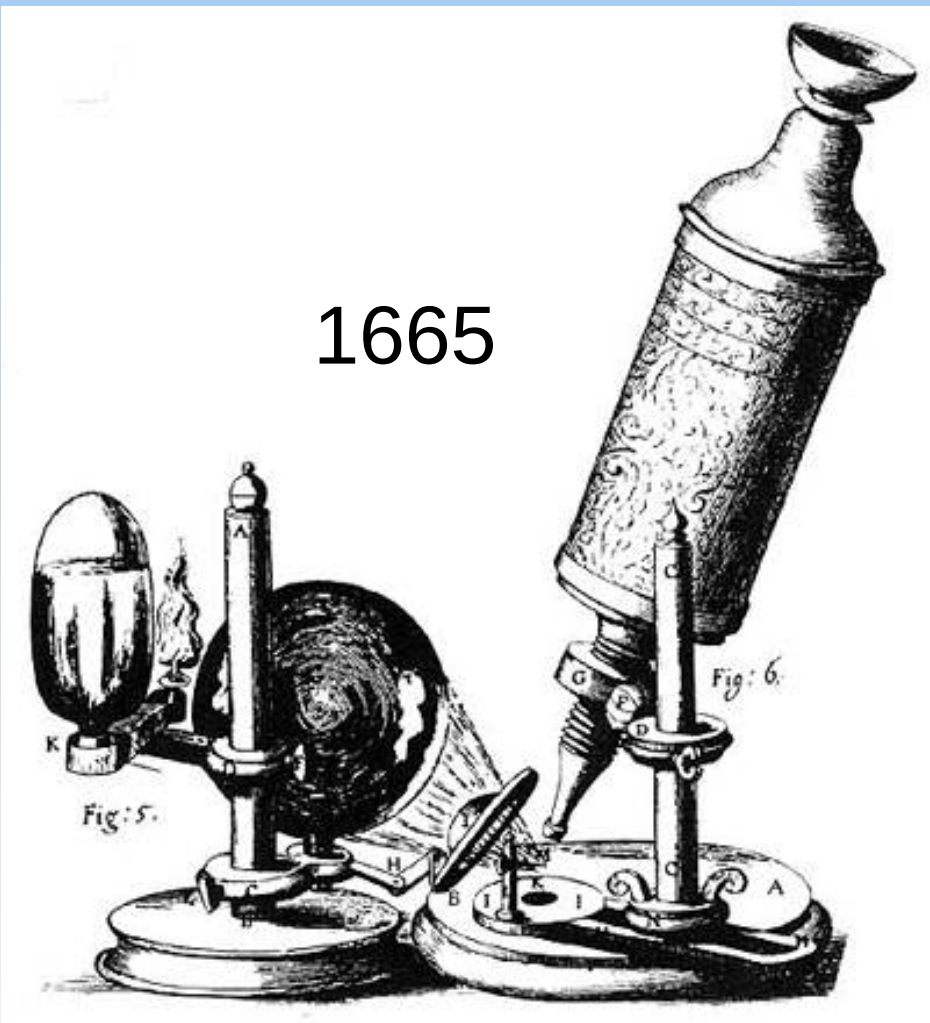
400年前，显微镜发明

第一次打开了人类认识微观世界的大门
开启了人类生命与生活的重要内容



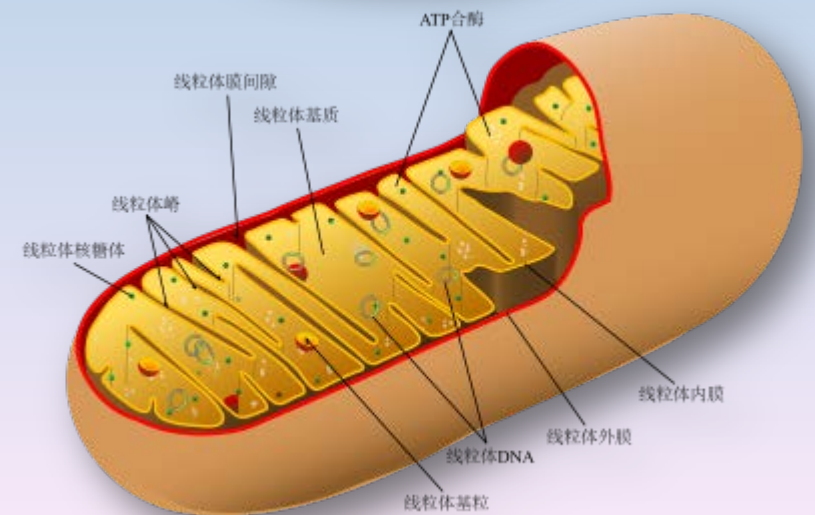
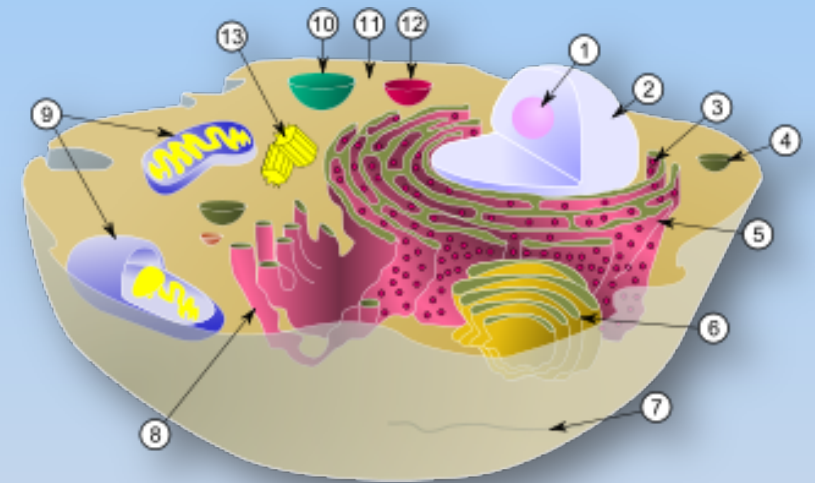
Robert Hooke

1665

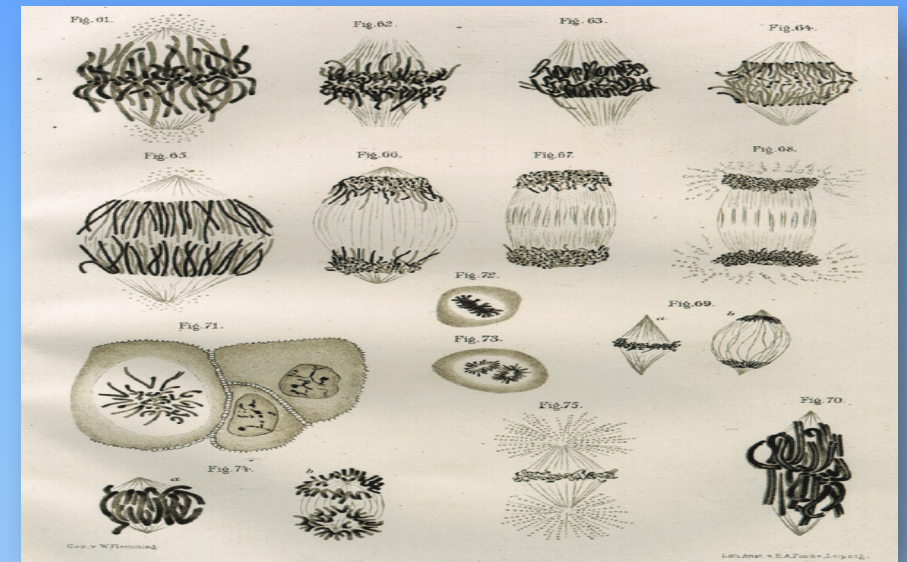


软木的木栓组织
上的微小气孔

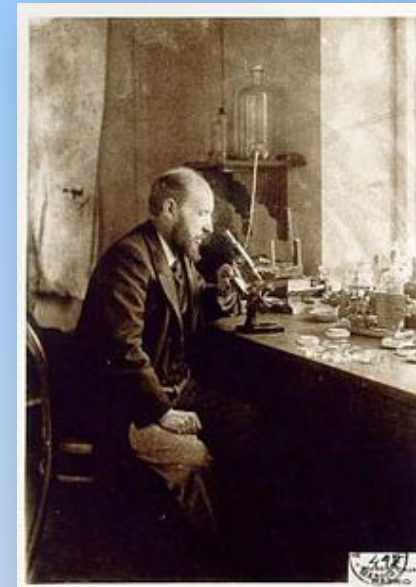
- 1665年，Robert Hooke (胡克)：「**细胞**」名词便是由虎克利用显微镜观察软木的木栓组织上的微小气孔而得来的。
- 1674年，Leeuwenhoek (列文虎克)：发现了原生动物，并随后首次发现「**细菌**」。
- 1833年，Brown (布朗)：在显微镜下观察紫罗兰，随后发表了对「**细胞核**」的详细论述。
- 1857年，Kolliker (寇利克)：发现细胞中之「**线粒体**」。



- 1879年，Flemming (佛莱明)：发现了动物细胞进行**有丝分裂**时，其清晰可见的染色体活动过程。



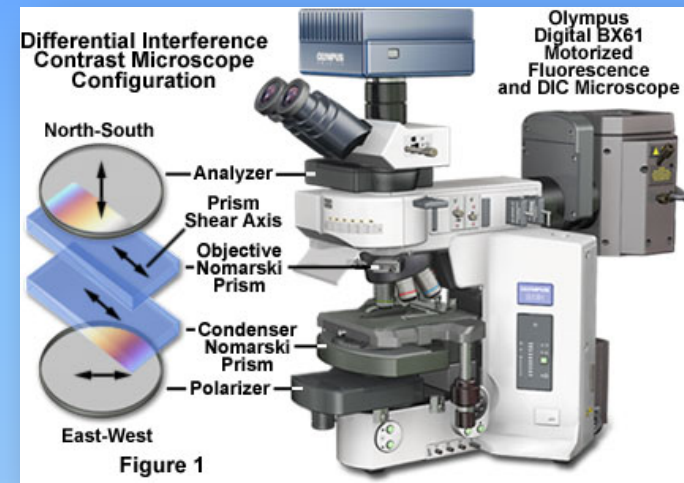
- 1888年，Cajal (卡嘉尔) 为首的组织学家发展出**显微镜染色观察法**，为显微解剖学奠定了基础。



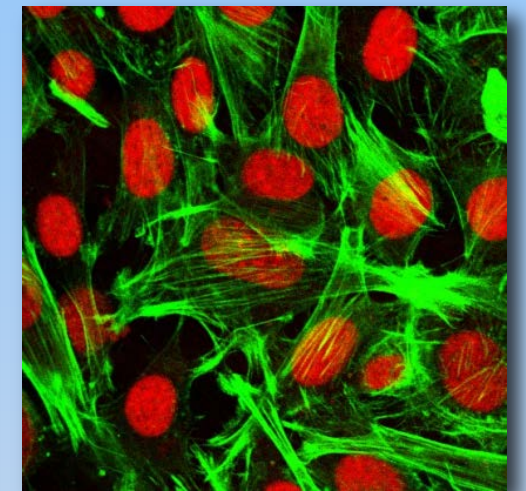
- 1930年，Lebedeff (莱比戴卫)：搭建第一架干涉显微镜，同时Zernike (卓尼克) 在1932年发明出相位差显微镜，适用于观察**活细胞和未染色标本**。



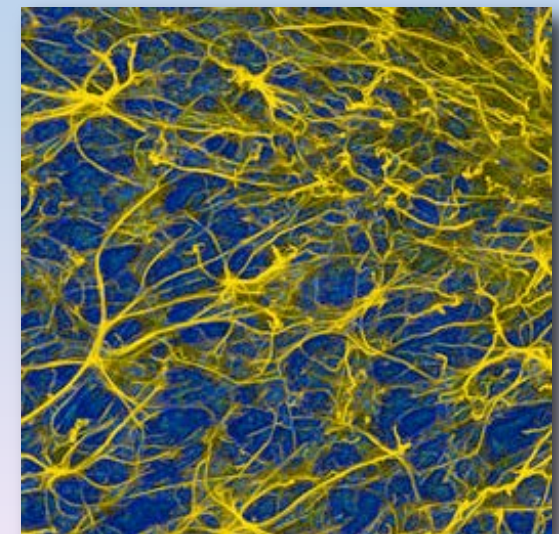
- 1952年，Nomarski (诺马斯基)：发明微分干涉相位差光学系统。适用于观察活细胞的种种细节。



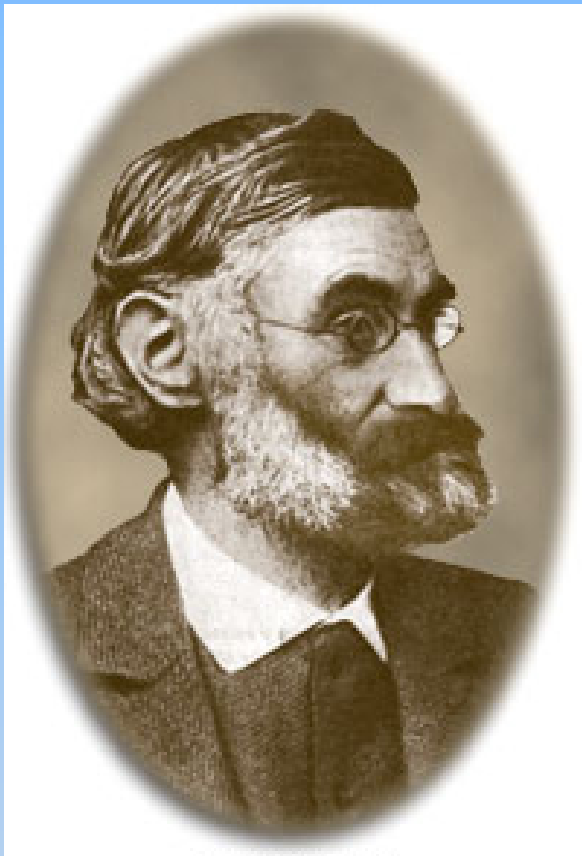
- 1988年，Confocal 扫描显微镜被广为使用。既可以用于观察细胞形态，也可以用于进行细胞内生化成分的定量分析、和实现长时间活细胞动态观察。



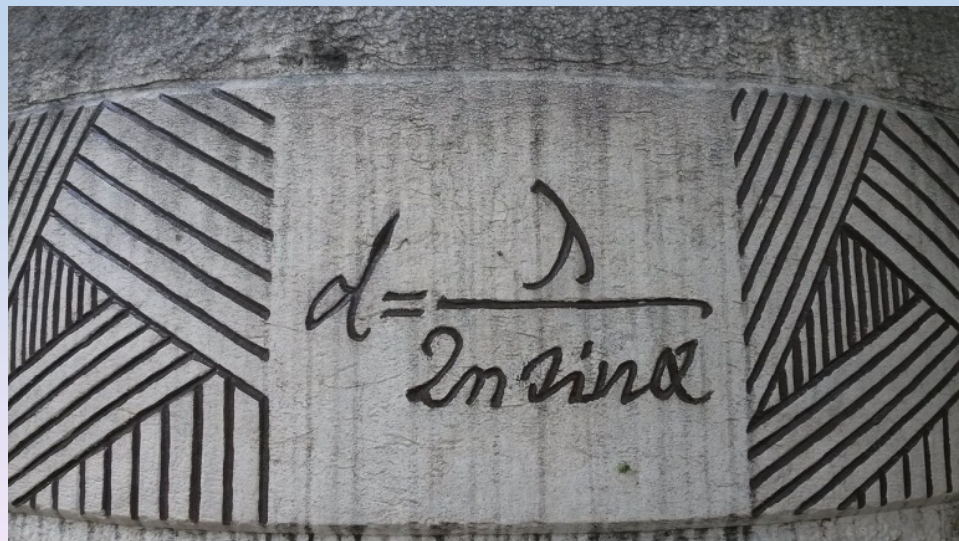
- 1990年，发展了非线性光学多光子显微成像技术。适用于生物细胞、活组织的长时间动态三维成像。



三、突破衍射极限成像



德国科学家阿贝，1873

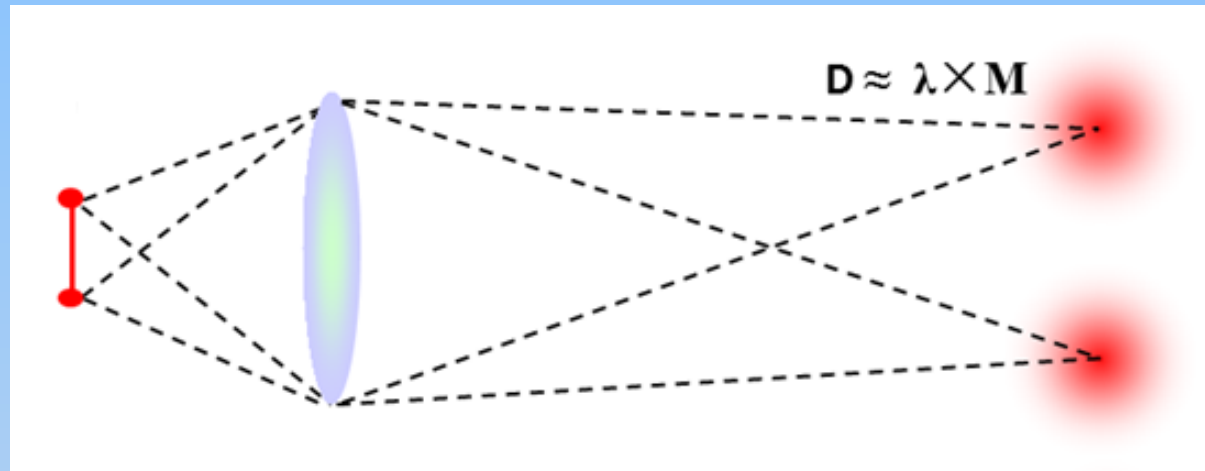


能看多小？



阿贝衍射极限

阿贝衍射极限

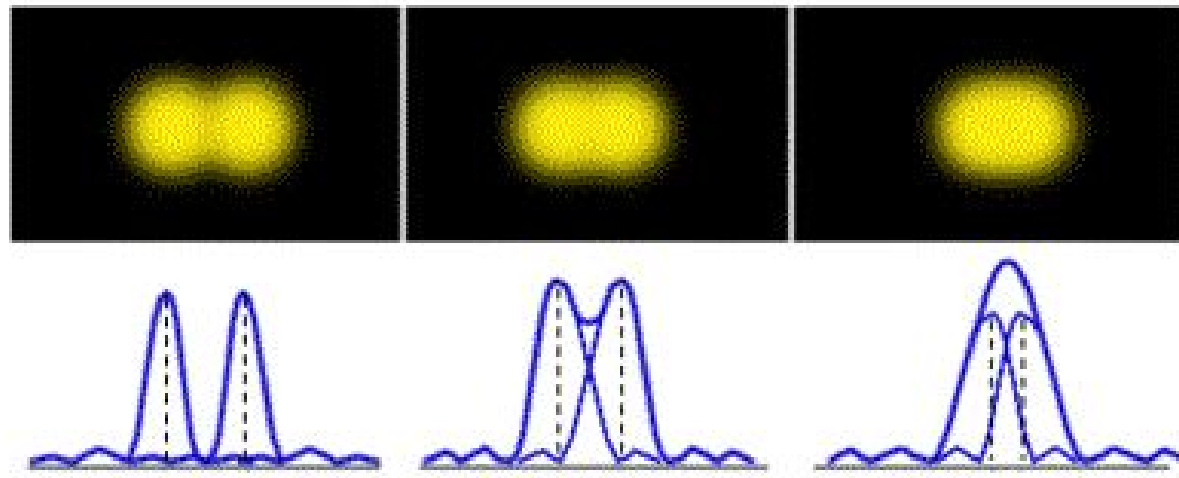


显微镜可分辨的最小线度为：

$$L = 0.61\lambda / \text{N.A.}$$

N.A.为镜头的数值孔径。

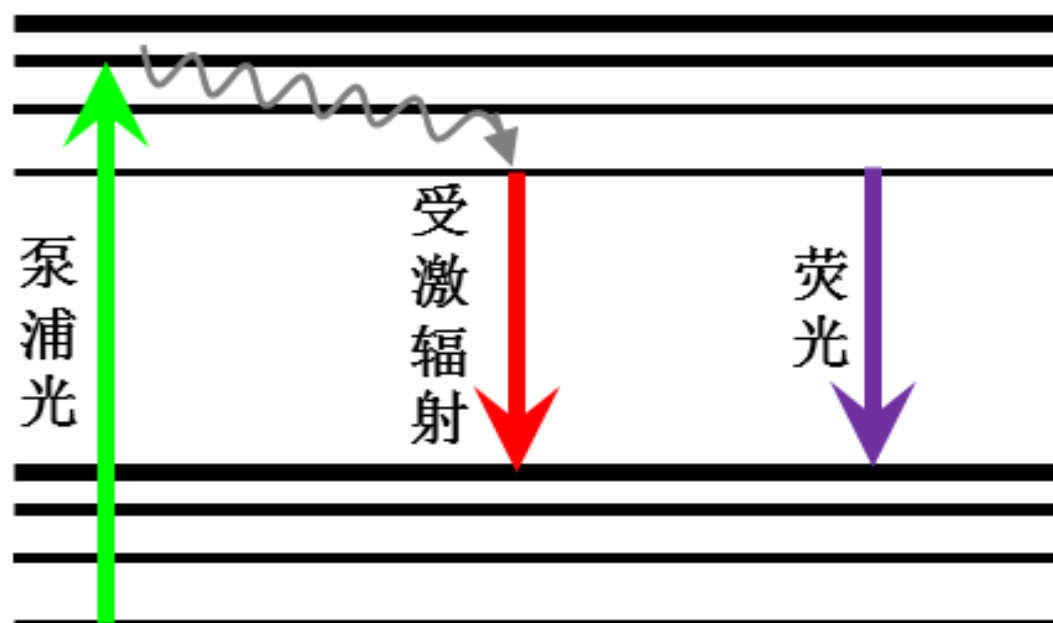
① 能分辨 ② 恰能分辨 ③ 不能分辨



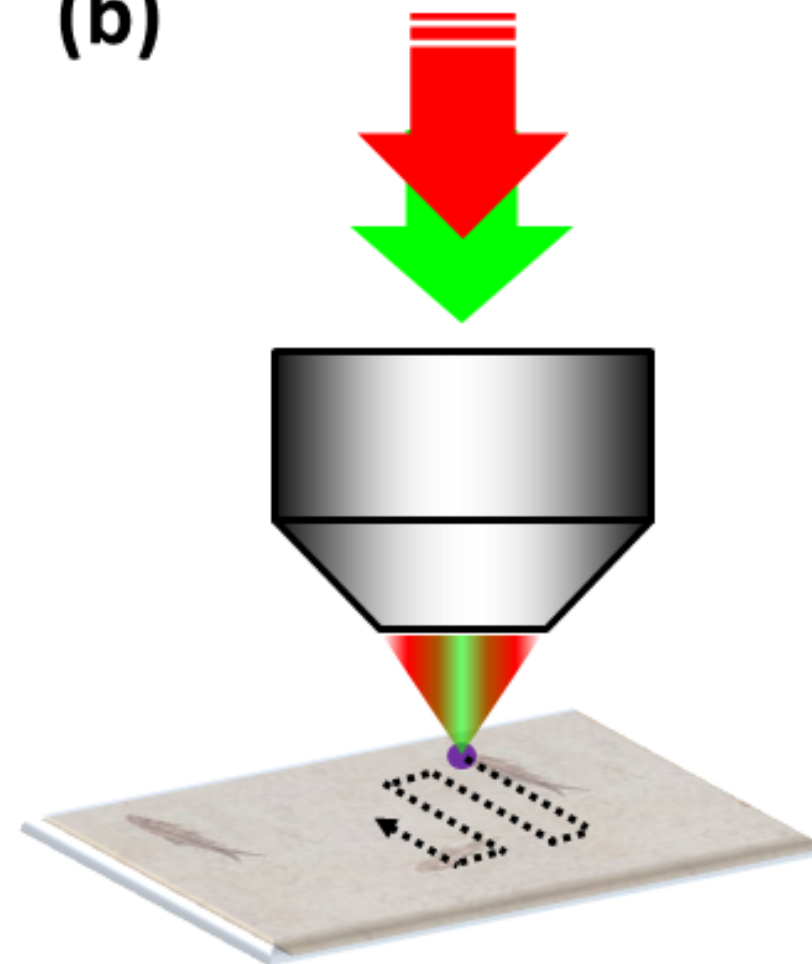
可见光：380~780nm
普通显微镜的分辨率一般为
200nm以上。

斯特凡·赫尔的受激发射损耗 (STED)

(a)



(b)



STED扫描成像过程

1994年，赫尔提出STED的概念

Opt. Lett. 19, 780 (1994)

Breaking the diffraction limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy

Stefan W. Hell and Jan Wichmann

954 OPTICS LETTERS / Vol. 24, No. 14 / July 15, 1999

Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy

Thomas A. Klar and Stefan W. Hell

经过5年的时间，STED在实验上得以实现

Opt. Lett. 24, 954 (1999)

High Resolution Optics

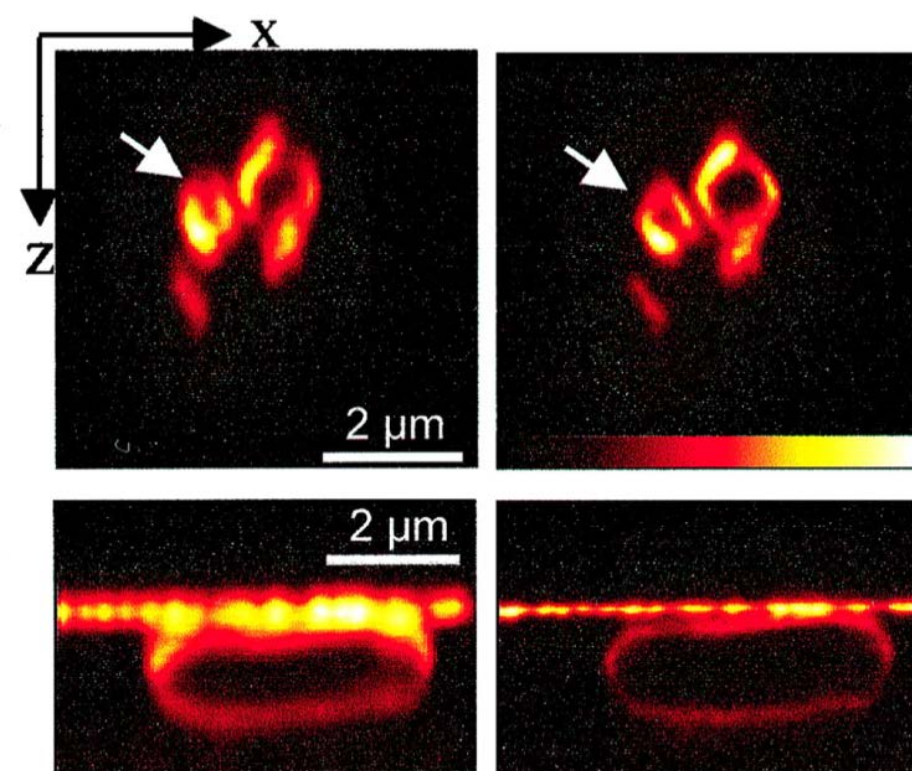
We overcome the

outer part of the focal spot. Whereas a near-UV pulse generates a diffraction-limited distribution of molecules, a spatially offset pulse quenches the excited molecules from the outer part of the focus by stimulated emission. This results in a subdiffraction-sized effective point-spread function. For a 1.4- μ m 388-nm excitation wavelength spatial resolution is increased from 150 ± 8 nm to 106 ± 8 nm by the offset beam. Superior lateral resolution is demonstrated by separation of adjacent Pyridine 2 molecules that are otherwise indiscernible. © 1999 Optical Society of America
 S: 00031110, 180.2520, 350.5730, 320.7150.

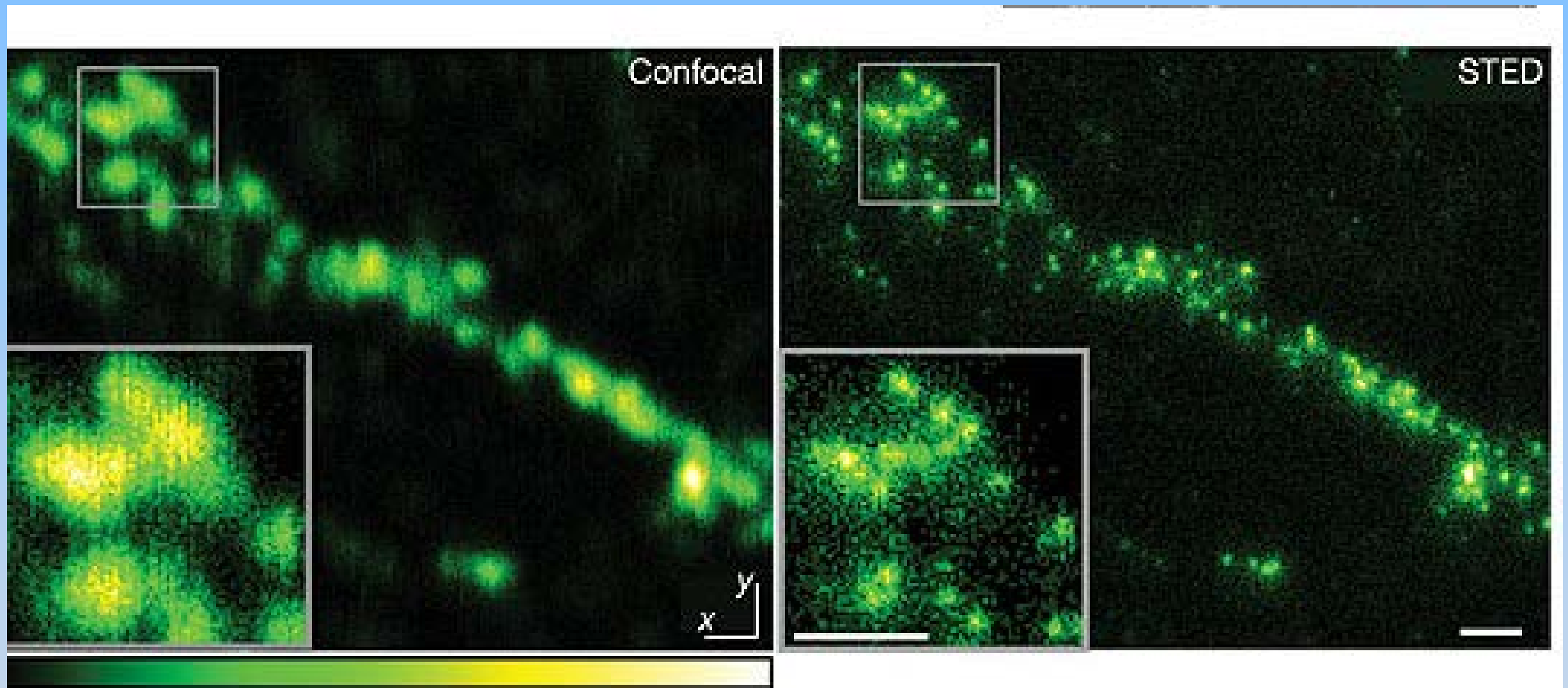
2000年，第一次将STED方法用于活细胞成像，记录了一个酵母活细胞的液泡膜

PNAS 97, 8206-8210(2000)

Y
c
t
t



活细胞研究



共聚焦显微图像

无法区分单个突触囊泡

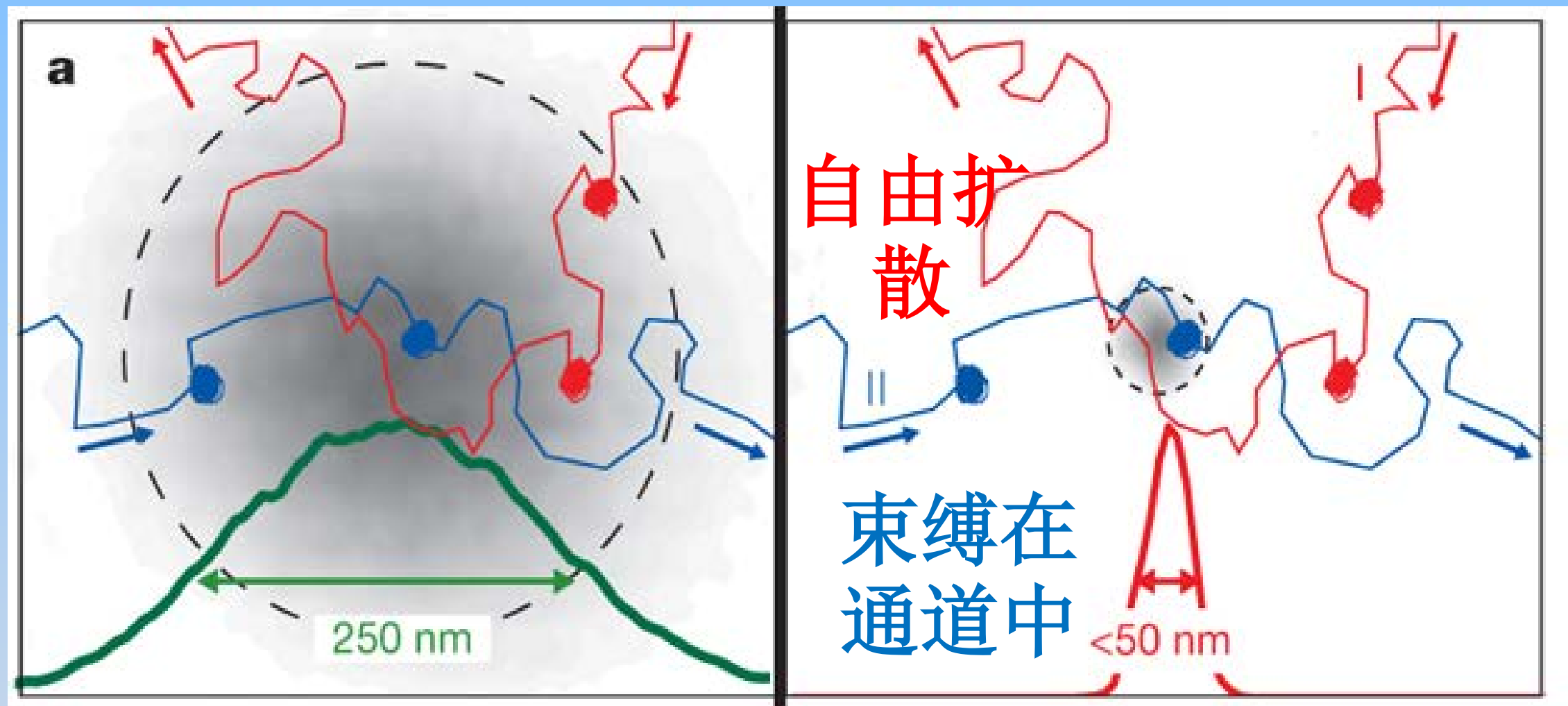
(直径大约40 nm)

STED显微图像

观察到单个突触囊泡

Nature, 440, 935(2006)

活细胞研究



传统显微镜光斑太大（黑圈），难以追踪细胞膜表面脂类分子的纳米运动。脂类分子的协作参与信号转导和物质转运。

STED显微分辨率足够高，直接追踪单膜脂分子在活细胞细胞质膜中的扩散运动，显示分子的两种运动模式。

Nature 457, 1159(2009)

威廉姆·艾斯科·莫尔纳尔的单分子成像技术

VOLUME 62, NUMBER 21

PHYSICAL REVIEW LETTERS

22 MAY 1989

Optical Detection and Spectroscopy of Single Molecules in a Solid

W. E. Moerner and L. Kador^(a)

IBM Research Division, Almaden Research Center, San Jose, California 95120

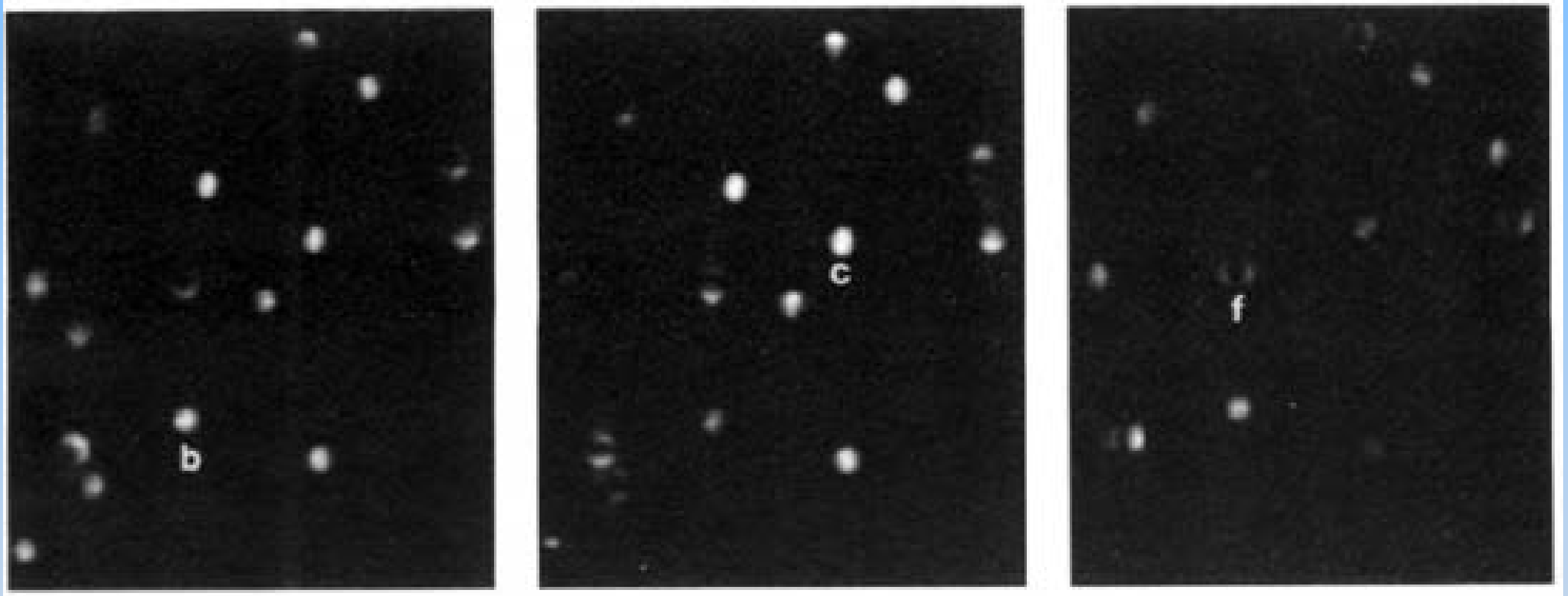
(Received 17 March 1989)

Using two different double-modulation techniques, we have observed the optical-absorption spectrum of single dopant molecules of pentacene in a *p*-terphenyl host crystal at liquid-helium temperatures. To achieve this, frequency-modulation spectroscopy was combined either with Stark or ultrasonic modulation to remove interfering background signals from residual amplitude modulation, and the number of molecules in resonance was reduced to one by operating in the wings of the inhomogeneous line. Triplet bottleneck saturation appears to be suppressed in the single-molecule regime.

PACS numbers: 78.50.-w, 33.20.Kf, 33.70.Jg

1989年，Moerner成功地在低温下首次实现了单个分子的光吸收的测量。

单分子的光学探测



1993年，Betzig等人在室温下看到了单个的染料荧光分子。

Science, 262, 1422 (1993)

埃里克·白兹格的光激活定位显微镜 (PALM)

February 1, 1995 / Vol. 20, No. 3 / OPTICS LETTERS 237

Proposed method for molecular optical imaging

E. Betzig

NSOM Enterprises, 17 Webster Drive, Berkeley Heights, New Jersey 07922

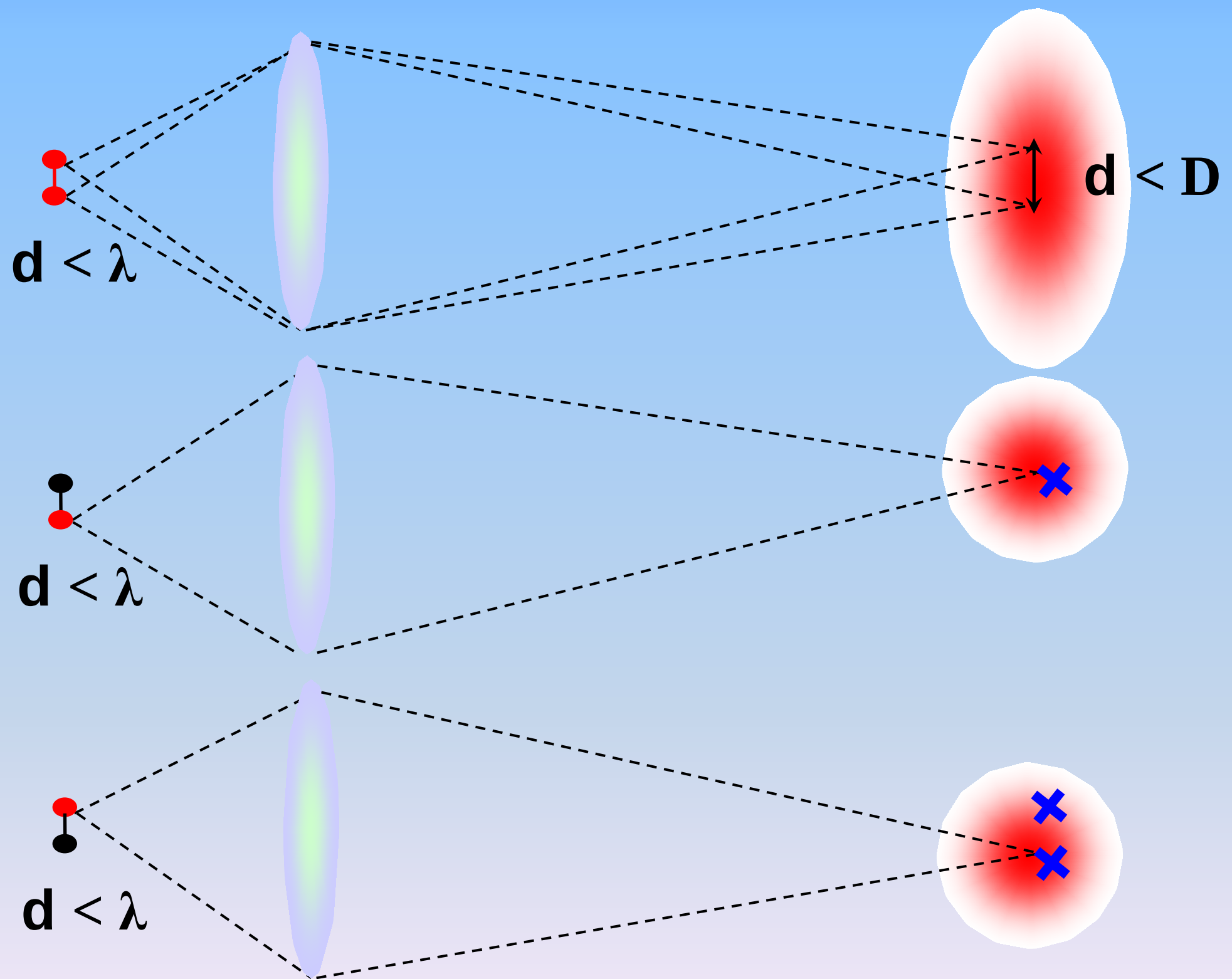
Received September 20, 1994

We can resolve multiple discrete features within a focal region of m spatial dimensions by first isolating each on the basis of $n \geq 1$ unique optical characteristics and then measuring their relative spatial coordinates. The minimum acceptable separation between features depends on the point-spread function in the $(m + n)$ -dimensional space formed by the spatial coordinates and the optical parameters, whereas the absolute spatial resolution is determined by the accuracy to which the coordinates can be measured. Estimates of each suggest that near-field fluorescence excitation microscopy/spectroscopy with molecular sensitivity and spatial resolution is possible.

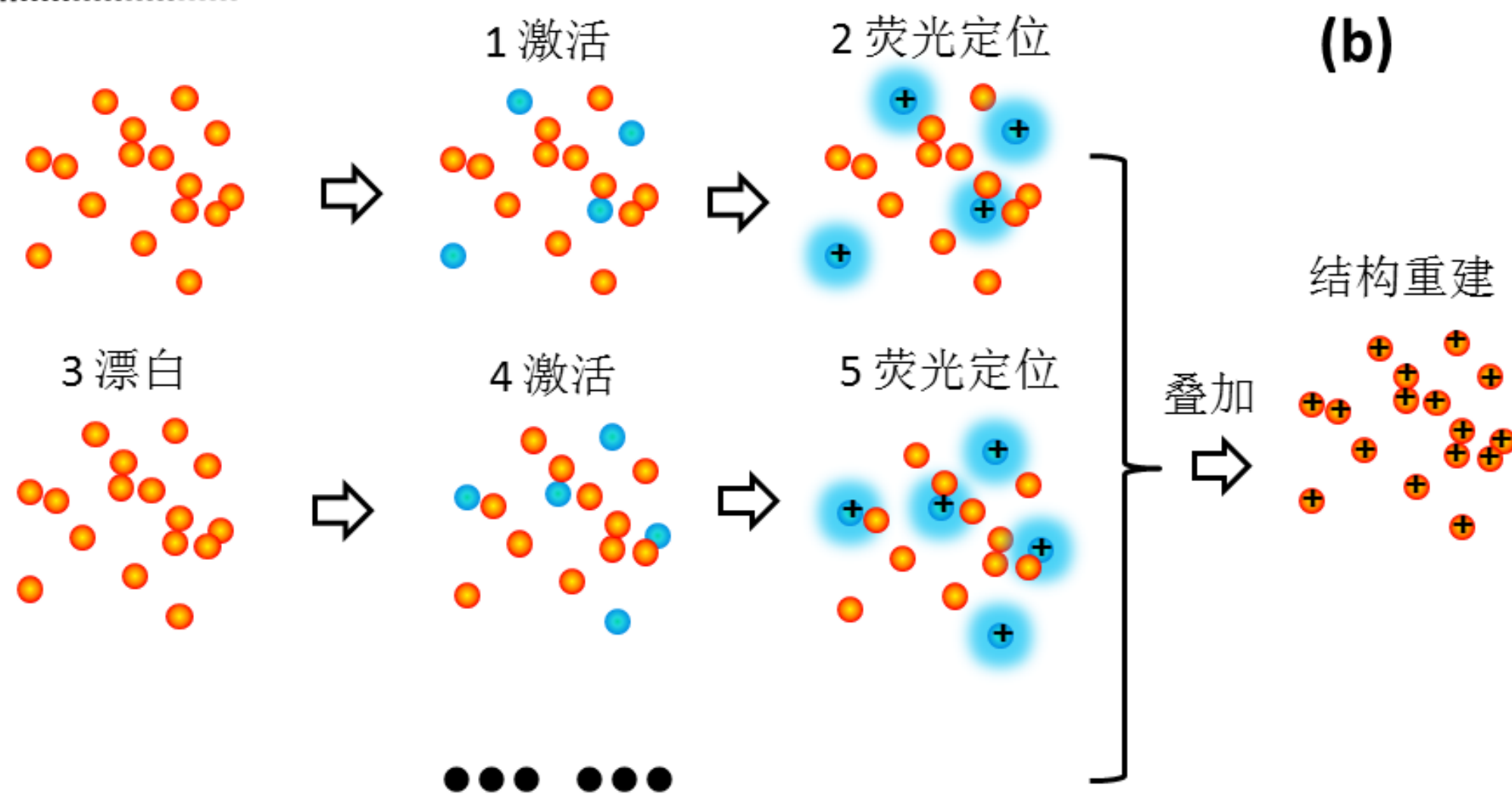
The power of optical microcharacterization methods provides a strong incentive to seek means whereby they can be extended beyond the $\lambda/2$ limit of diffraction. One approach, near-field scanning optical microscopy (NSOM),¹ uses an illuminated subwavelength-sized aperture to generate a super-resolution image. As with other scanning optical techniques, spatial resolution is determined by the

high spatial resolution of NSOM with the high spectral resolution of cryogenic fluorescence excitation spectroscopy.⁶ This reduces the minimum mean separation acceptable for isolation, improves the absolute spatial resolution by minimizing the spatial PSF used in localization, and greatly reduces photostability and background noise problems associated with far-field single-molecule detection (SMD) under

PALM原理示意



PALM原理示意



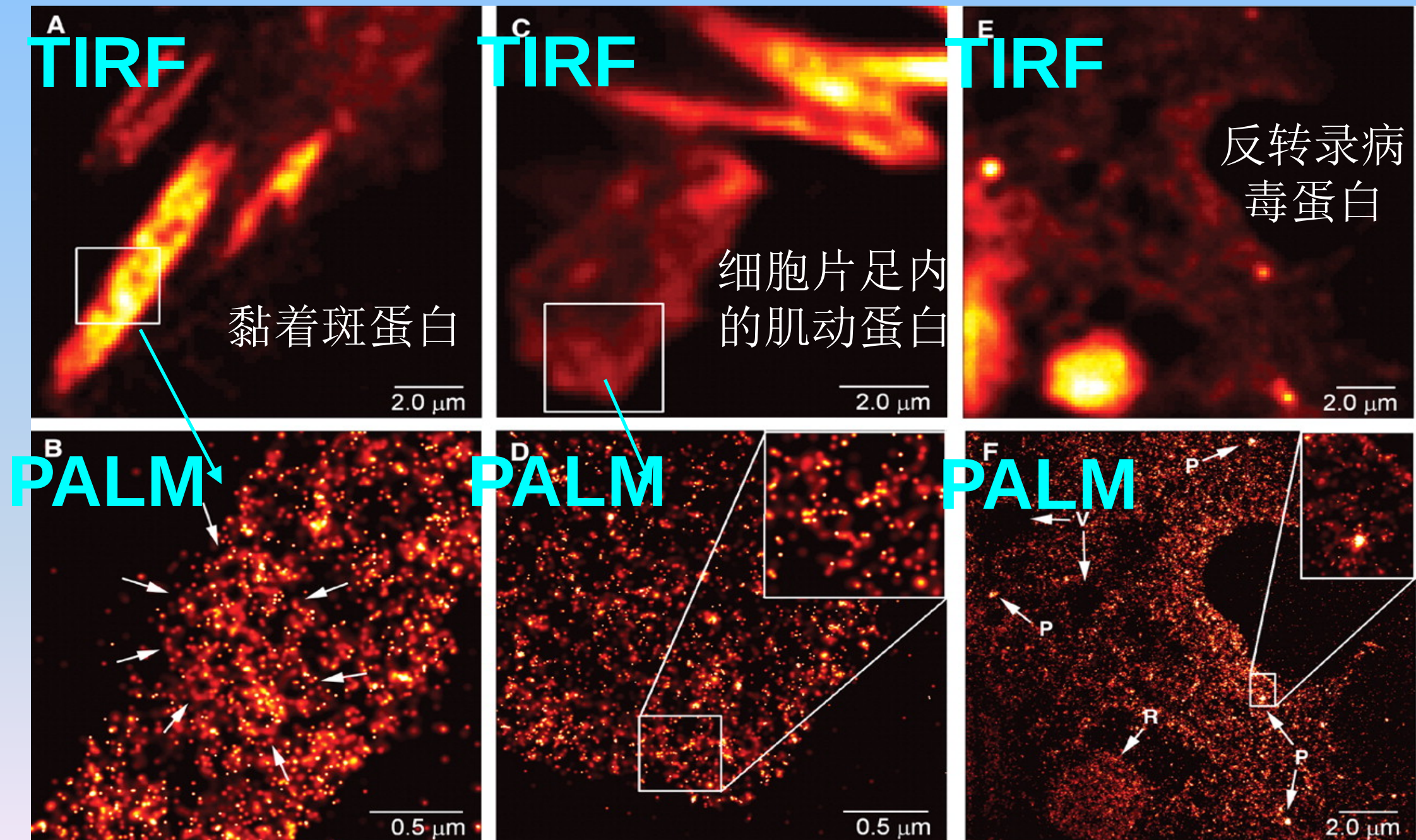
起居室中的科学实验



<http://cen.acs.org/>

高分辨率荧光蛋白成像

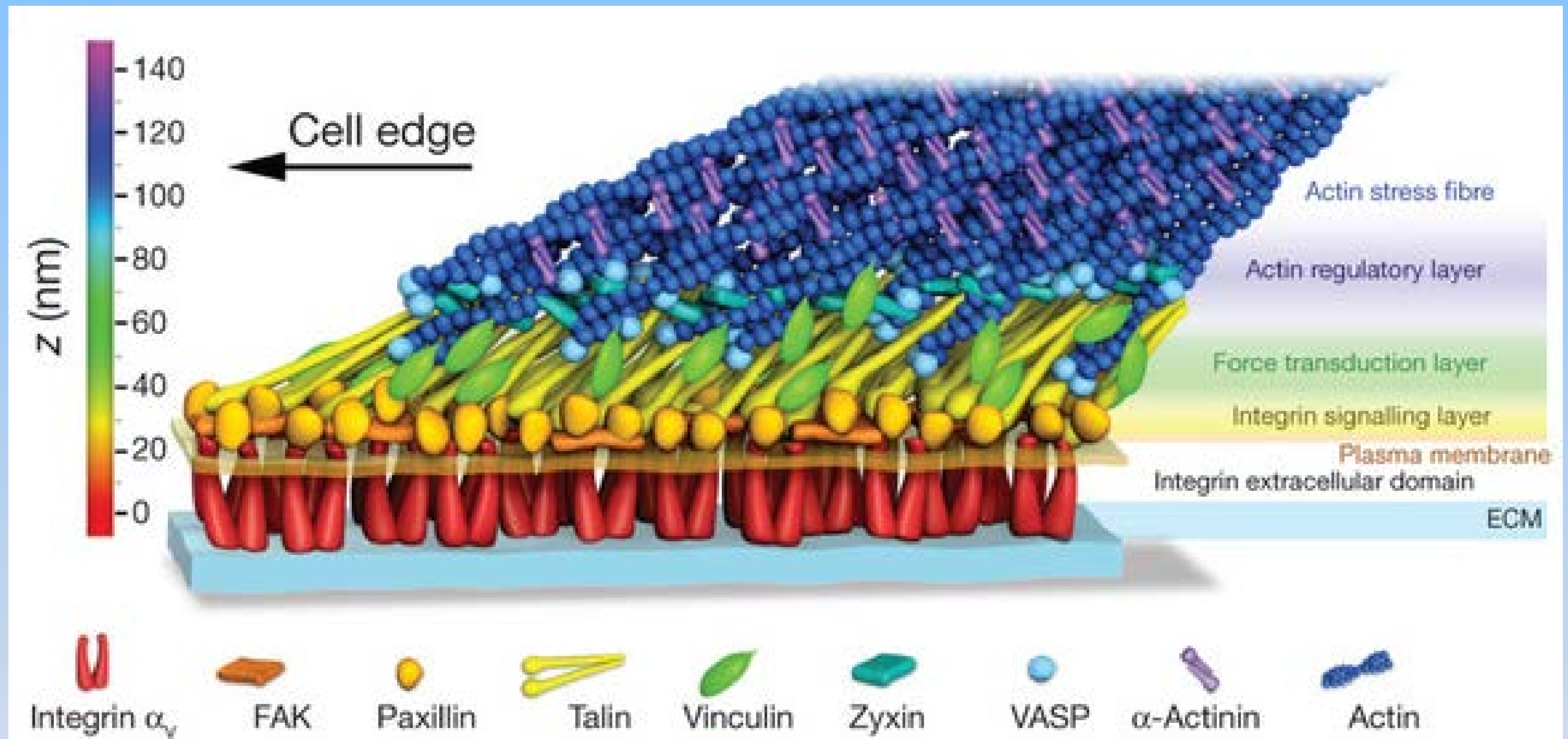
利用PALM技术，将密布于仅为头发丝截面的1/5000的面积中的十万个分子进行高分辨观测，分子间隔约为20纳米。



Science 313, 1642 (2006)

黏着斑的显微结构

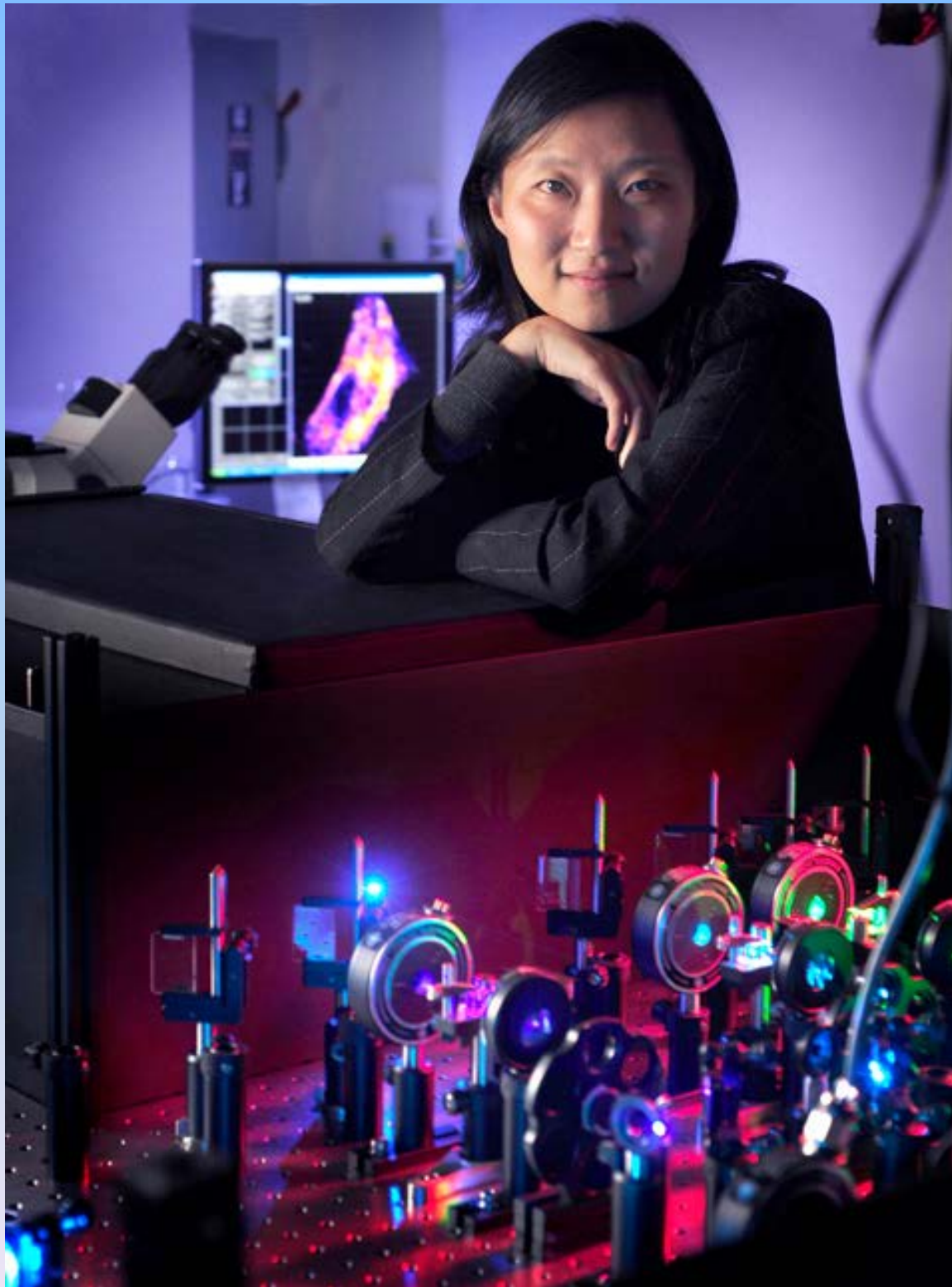
基于超分辨显微结果，在纳米尺度上确定蛋白组织方式：



黏着斑是组织良好的超级结构：整联蛋白(integrins)和肌动蛋白(actin)被一个40 nm长、由部分重叠的蛋白特异性层组成的核分开，又被人踝蛋白(talin)联系在一起。

Nature 468, 580(2010)

随机光学重建显微技术(STORM)



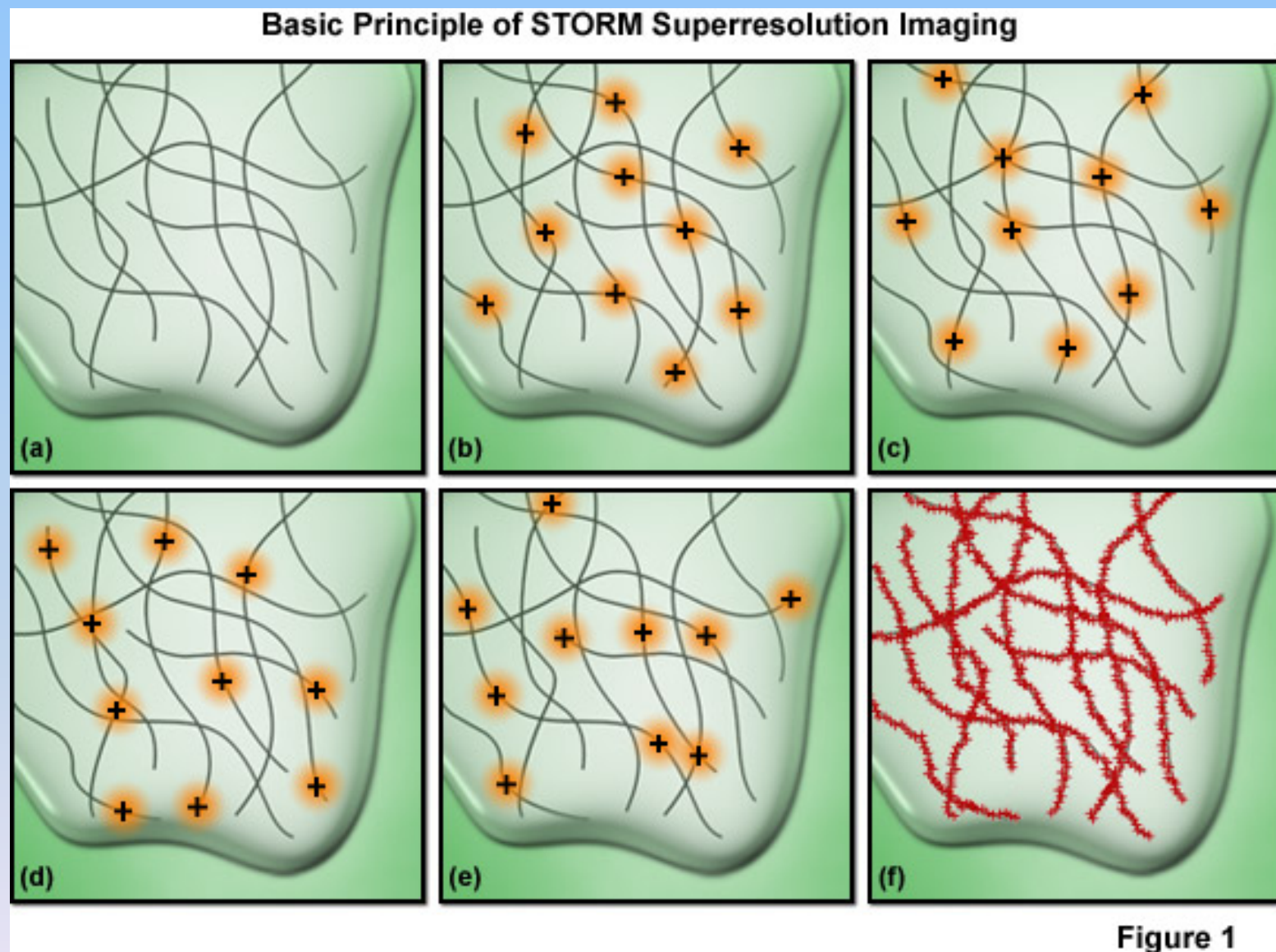
PALM 和 STORM 的区别：

原理一致，标记方法不同

PALM使用从外部引入的光激活蛋白基因（由2009年诺贝尔奖获得者钱永健教授和本次诺贝尔奖获得者莫尔纳尔发现的光激活绿色荧光蛋白分子）标记样品；

STORM使用化学合成的有机荧光分子对（Cy5-Cy3）进行细胞内生物蛋白标记。

2006年 **STORM**: 随机光学重构显微镜
Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
可以超高分辨率定位细胞内源蛋白



商用STORM分辨率
横向 ~20nm 轴向~50nm

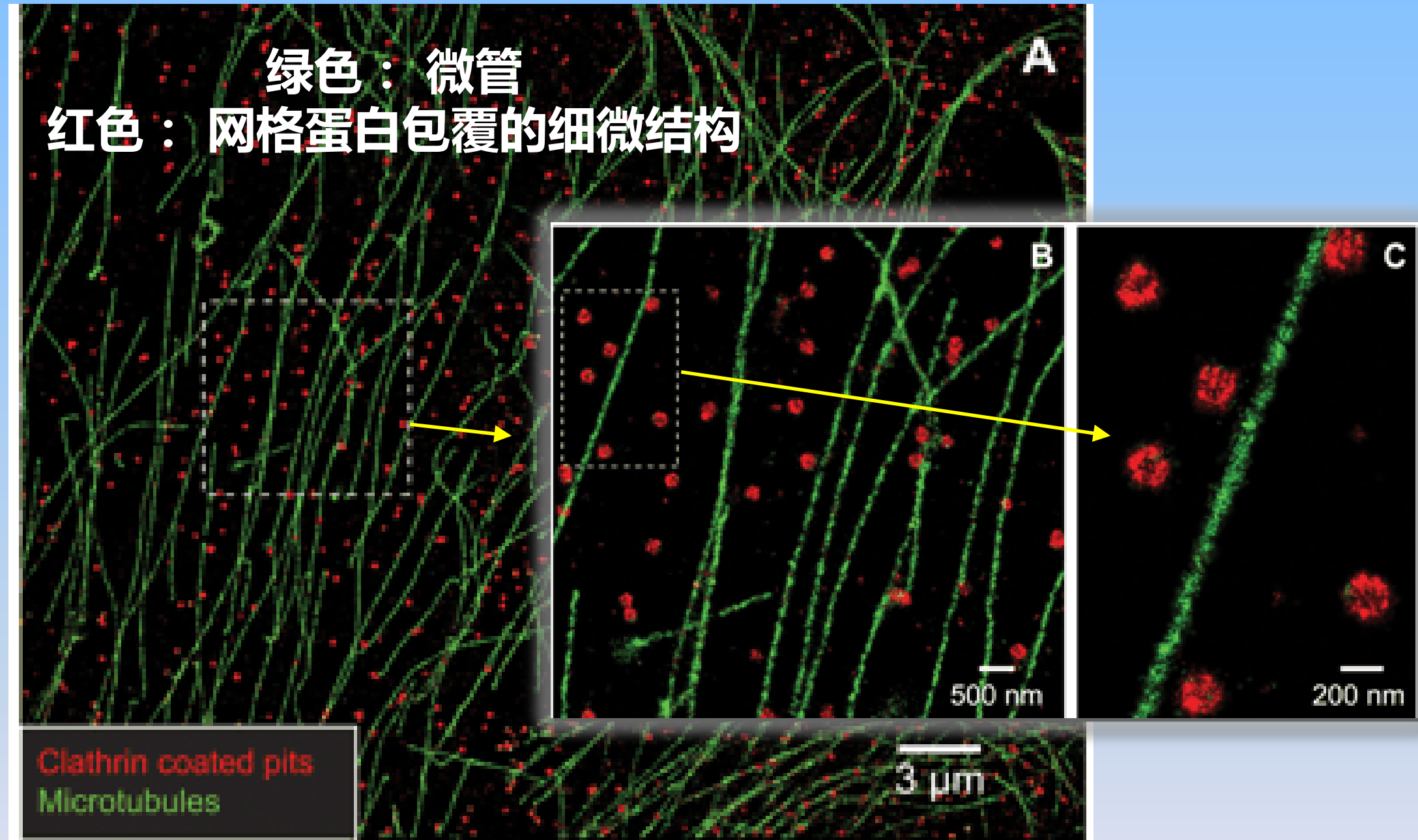
荧光分子太小，不能直接分辨，对其大量测量统计，中心定位精度 ~1nm

两种荧光探针分子

单次随机激发极少数荧光探针分子，多次重复，重构二维或三维图像。

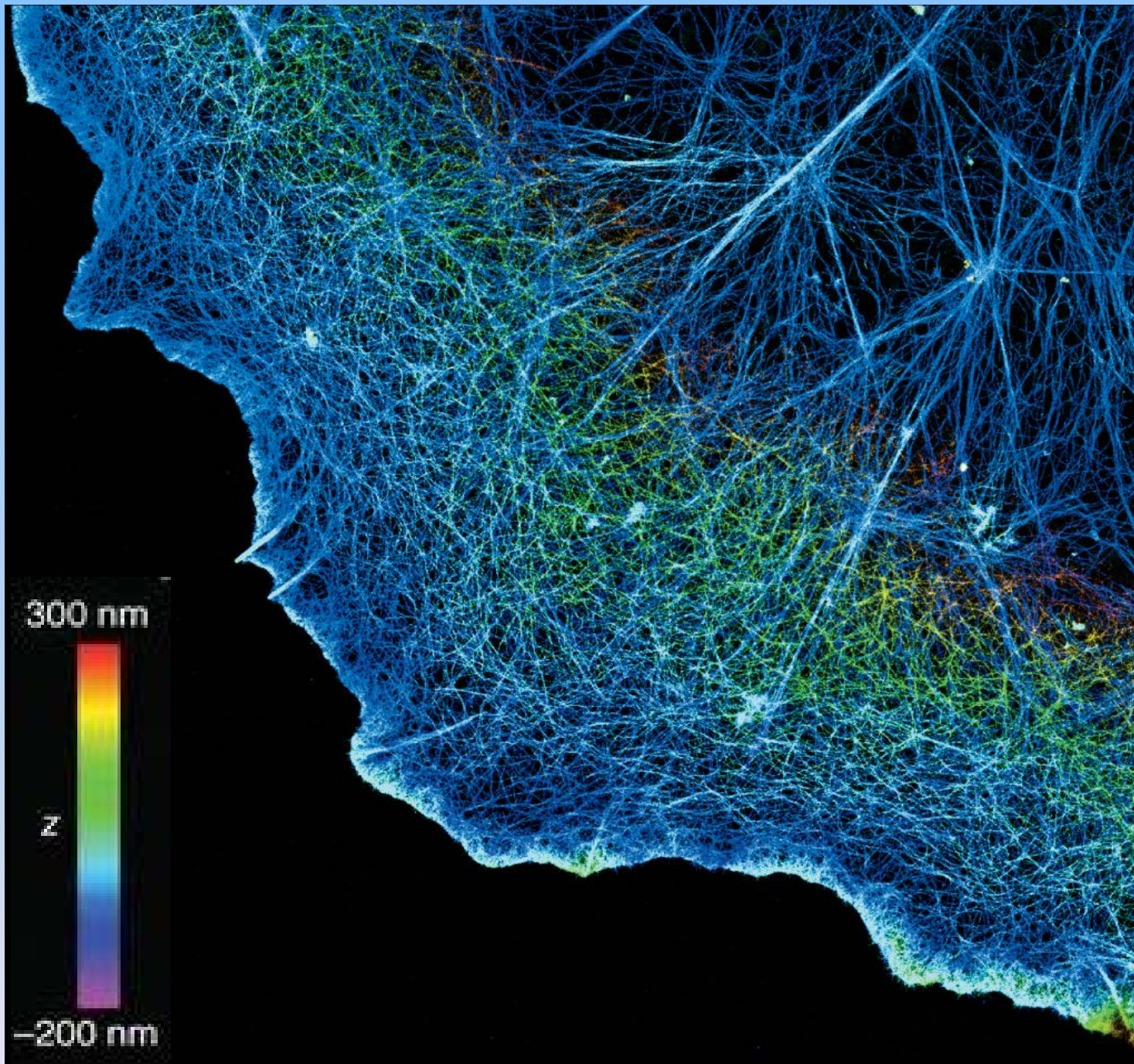
在Cy3的多次作用下，Cy5的中心就可以精确定位。

哺乳动物细胞的多色成像



Science 317, 1749 (2007)

微丝的超微结构



微丝的三维显微:

由肌动蛋白 (Actin) 组成的直径约为8 nm的纤维结构, 不同的颜色表明结构在深度方向的位置;

深度方向的分辨率达到20 nm, 原有的二维超分辨技术拓展到三维。

结构光照明显微镜(SIM)



麦茨·古斯塔夫森
(Mats Gustafsson)
(1960–2011)

Journal of Microscopy, Vol. 198, Pt 2, May 2000, pp. 82–87.
Received 12 January 2000; accepted 3 March 2000

SHORT COMMUNICATION

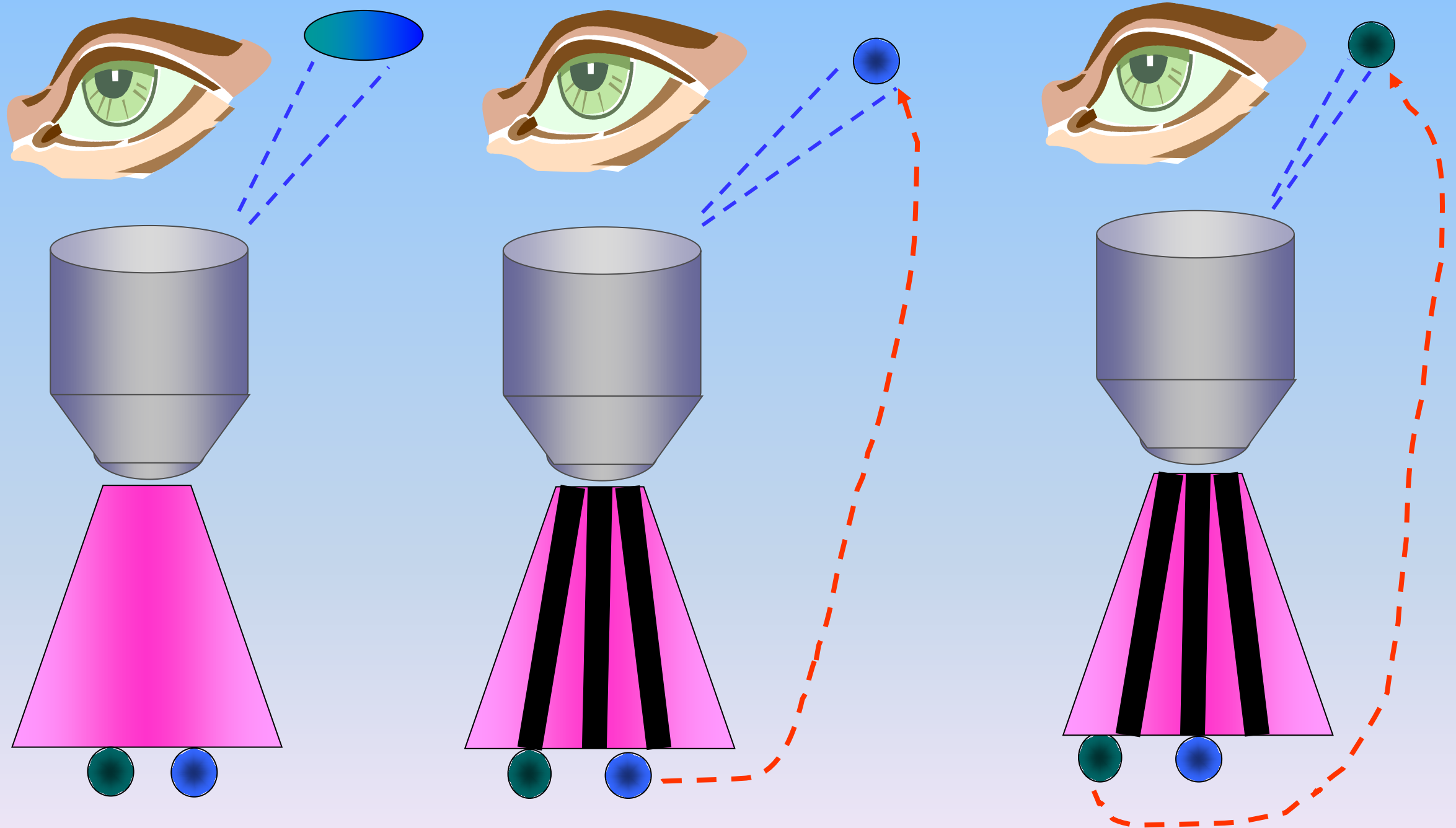
Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy

M. G. L. GUSTAFSSON

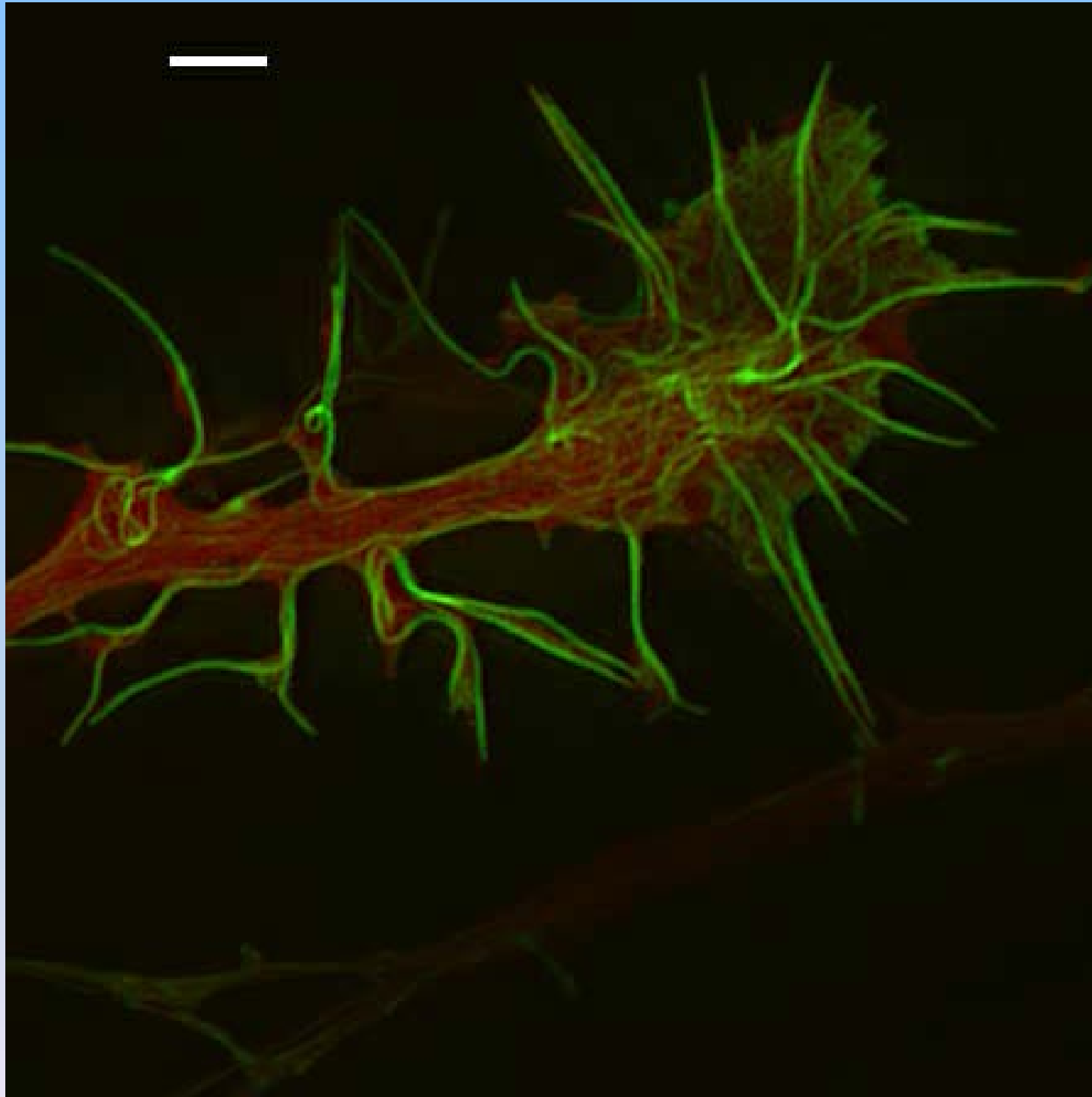
*Department of Biochemistry and Biophysics, University of California San Francisco,
San Francisco, California 94143-0448, U.S.A.*

Key words. Actin, cytoskeleton, fluorescence microscopy, interference, lateral resolution, moiré microscopy, optical transfer function, patterned excitation, resolution, structured illumination, super-resolution, wide-field microscopy.

结构光照明显微镜(SIM)



SIM : 宽视场快速成像



3D SIM记录了
海马神经元丝状
伪足的运动

8.5 秒/帧
标尺2 微米

四、看不见光 —— 新波段应用

利用显微镜

人类通过眼睛来观察世界，从而能动地改造世界。

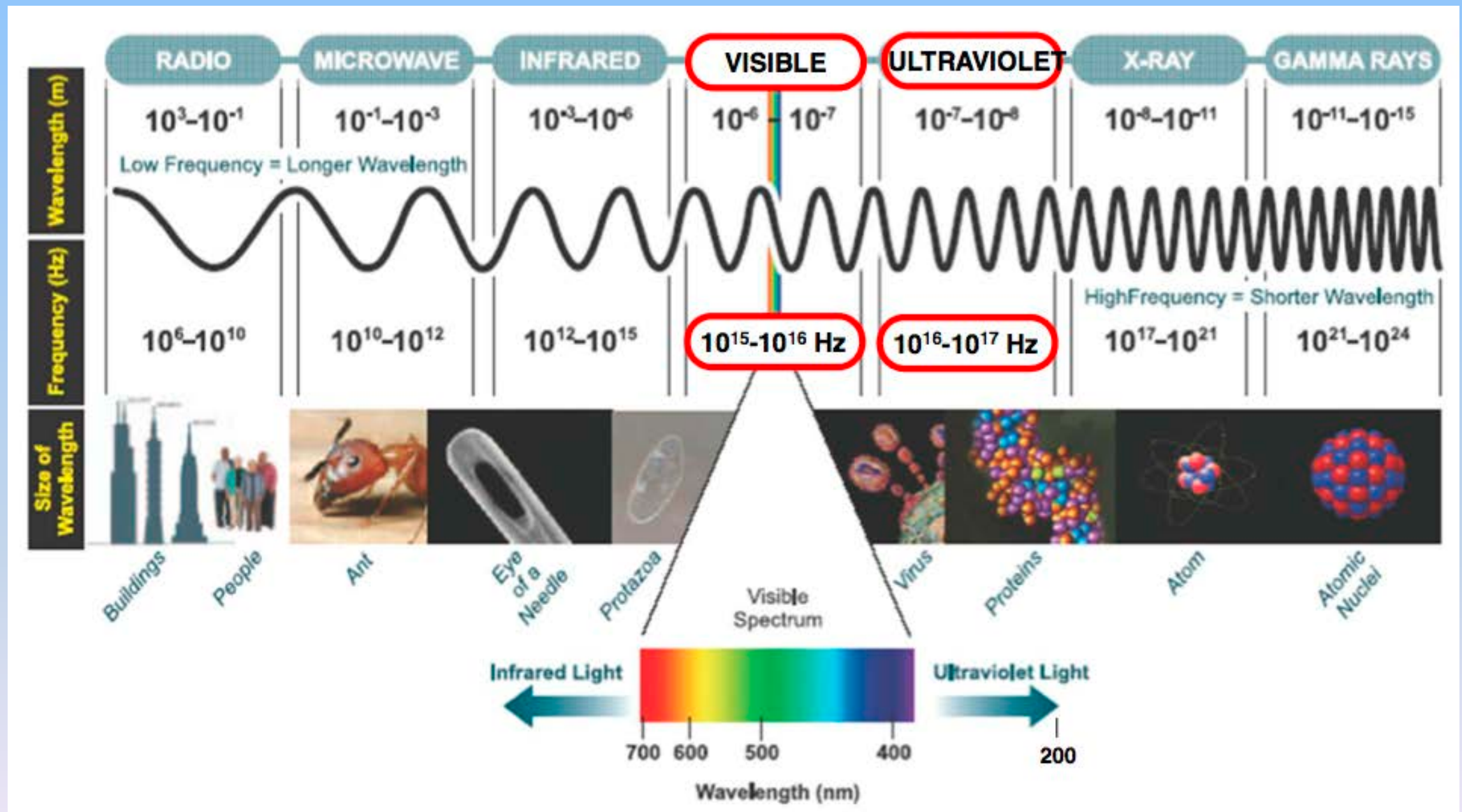


可见光 380~780nm

光的本性

光波 —— 电磁波 波长（频率）

眼睛可感受到的光波波长范围——可见光



不同的波长尺度对应着不同的生物特征尺寸

短波区域：X光的发现

波长 $0.01 \sim 10 \text{ nm}$

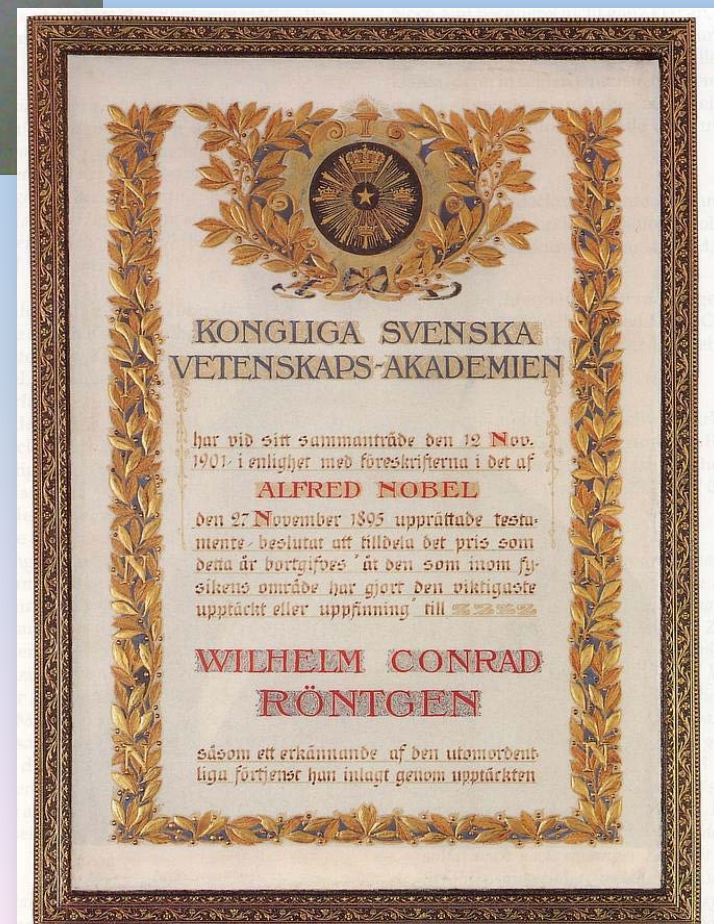


伦琴



伦琴妻子的手

研究阴极射线时发现X射线。1901年，获得首届诺贝尔物理学奖

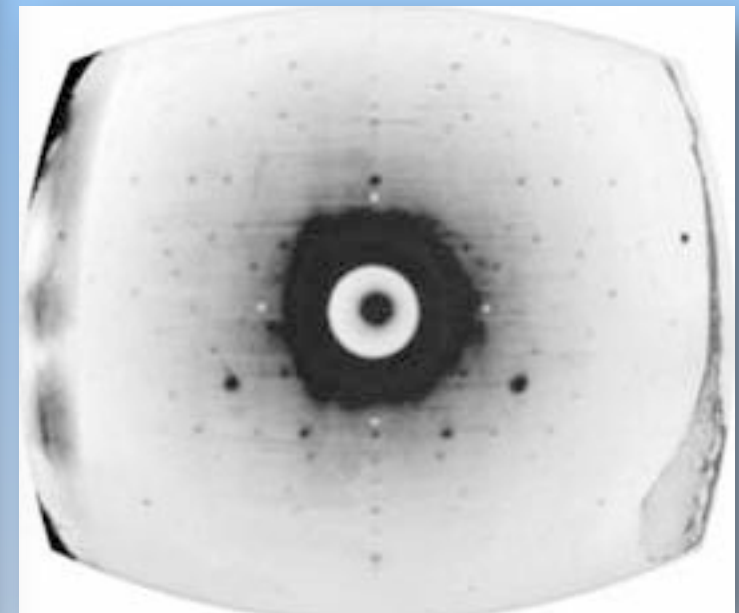


X射线衍射



劳埃 (M. von Laue)

1914年诺贝尔物理学奖



X射线晶体衍射图样

1912年

1962年，沃森、威尔金斯、克里克因发现DNA双螺旋结构模型获诺贝尔生理学或医学奖，其中女科学家富兰克林的DNA的X射线衍射图对推测结构起到关键的作用。



Francis Harry
Compton Crick



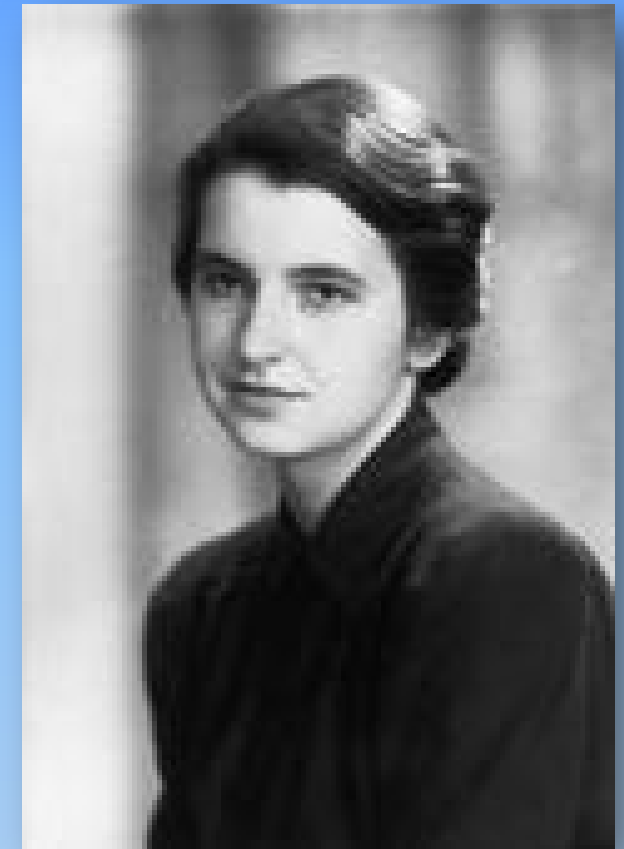
James Dewey
Watson



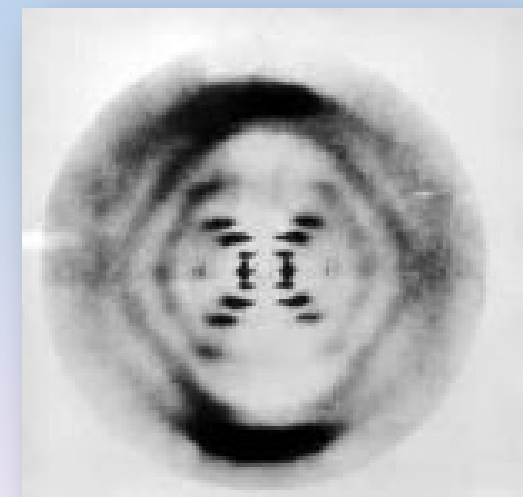
Maurice Hugh
Frederick Wilkins

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1962 was awarded jointly to Francis Harry Compton Crick, James Dewey Watson and Maurice Hugh Frederick Wilkins "for their discoveries concerning the molecular structure of nucleic acids and its significance for information transfer in living material".

- 标志着分子生物学发展到了一个崭新的阶段
- 标志着医学研究进入了一个新的领域

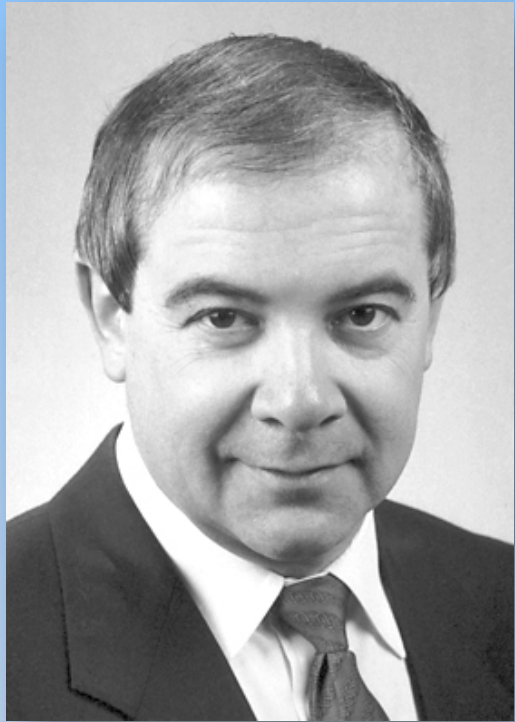


罗莎琳·富兰克林（Franklin, Rosalind Elsie, 1920-1958）英国女物理学家和化学家富兰克林

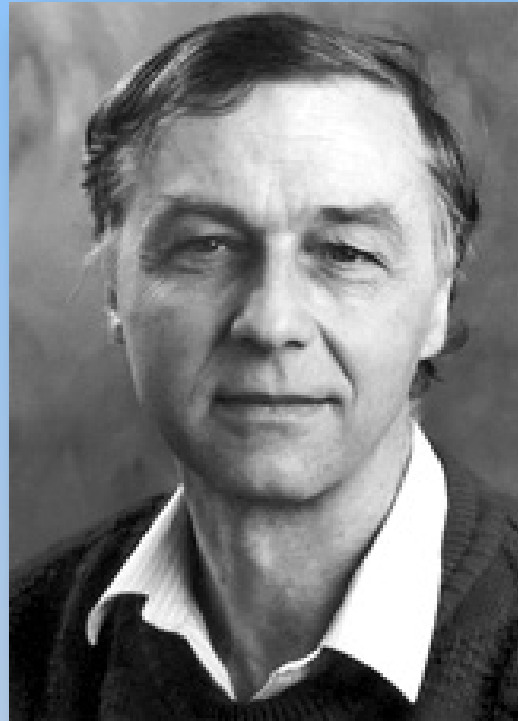


DNA X射线衍射图

1988年，德国科学家戴森霍弗、胡贝尔、米歇尔3位科学家因为用X光测定出了光合作用**反应中心膜蛋白—色素的三维空间结构**，揭示出电子和能量的传递作用，共同获得了度诺贝尔化学奖。



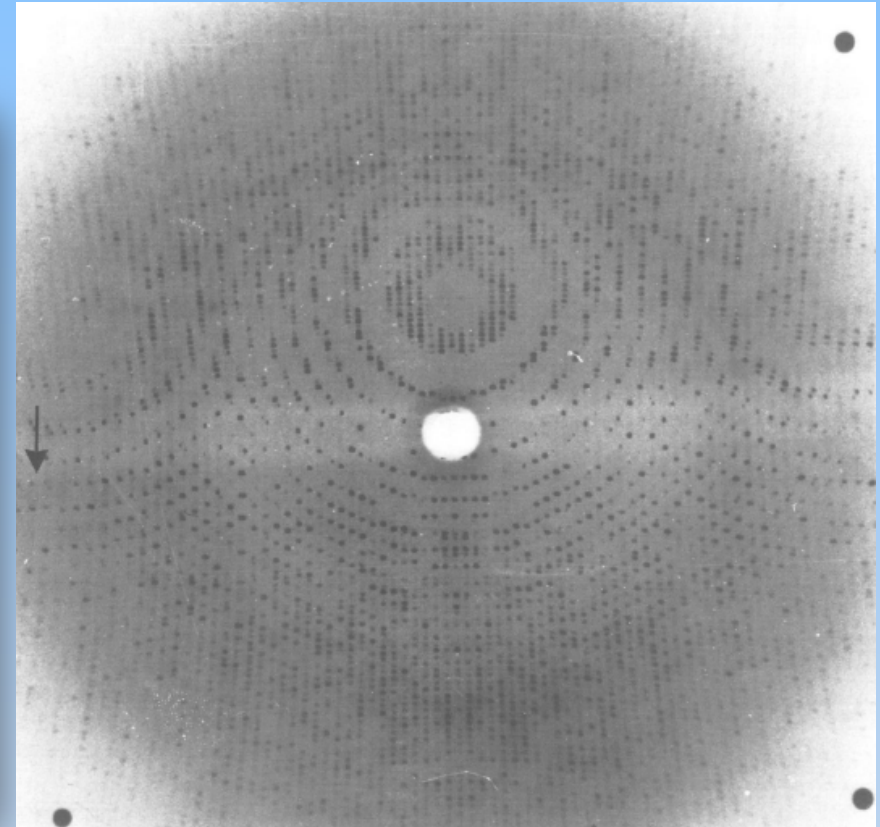
Johann Deisenhofer



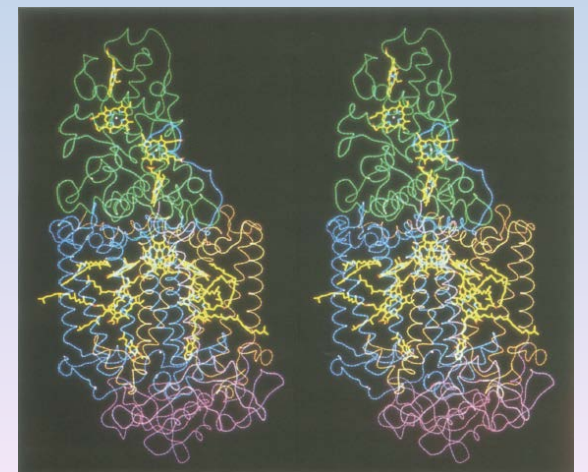
Robert Huber



Hartmut Michel



光合作用被诺贝尔奖基金委员会是“地球上最重要的化学反应”它是地球上一切生命生存和发展的基础。到目前为止，共有8次诺贝尔奖的桂冠被从事光合作用研究的科学家所摘取。



其它X射线相关工作多次获得诺贝尔奖

1915年，布拉格父子因导出X射线晶体结构分析的基本方程获诺贝尔物理奖

1924年，卡尔希格班因 X射线光谱学获诺贝尔物理奖

1937年，德拜因为应用X射线测定许多有机分子结构获诺贝尔化学奖

1946年，马勒发现X射线照射可致基因突变而获诺贝尔生理学或医学奖

1962年，肯德鲁、佩鲁兹因为借助X射线、研究了肌红蛋白的三维结构，而获诺贝尔化学奖

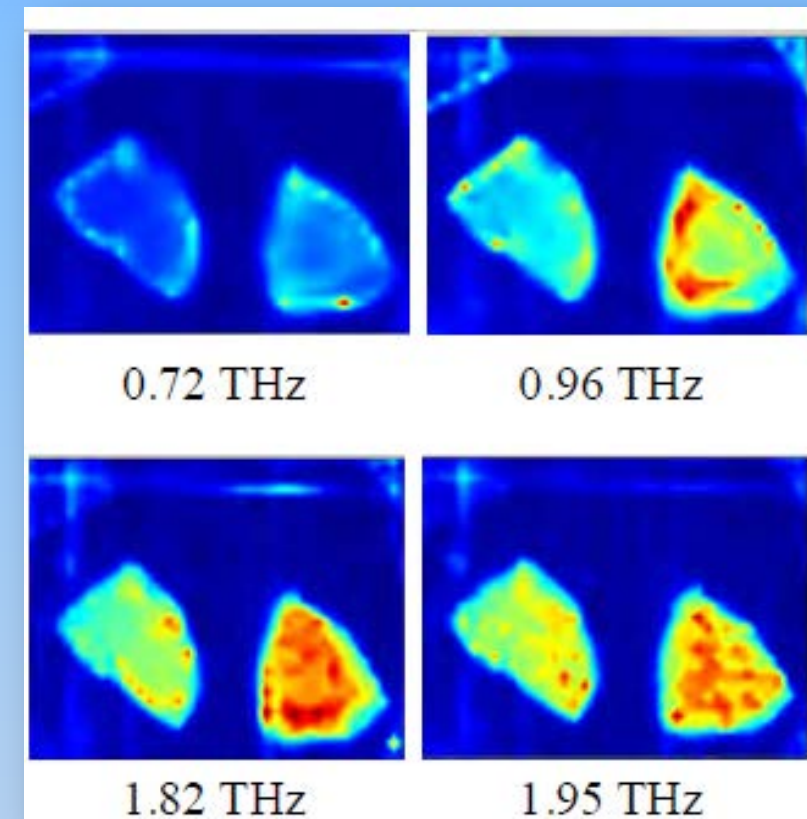
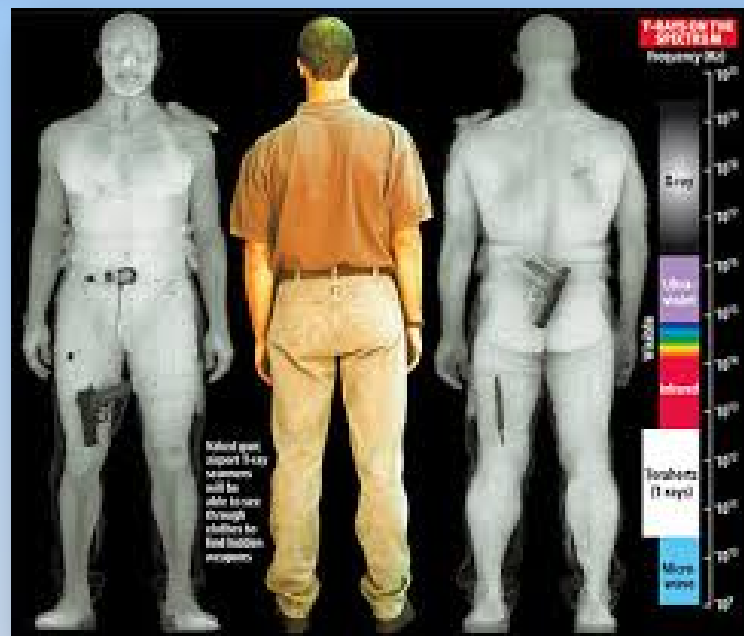
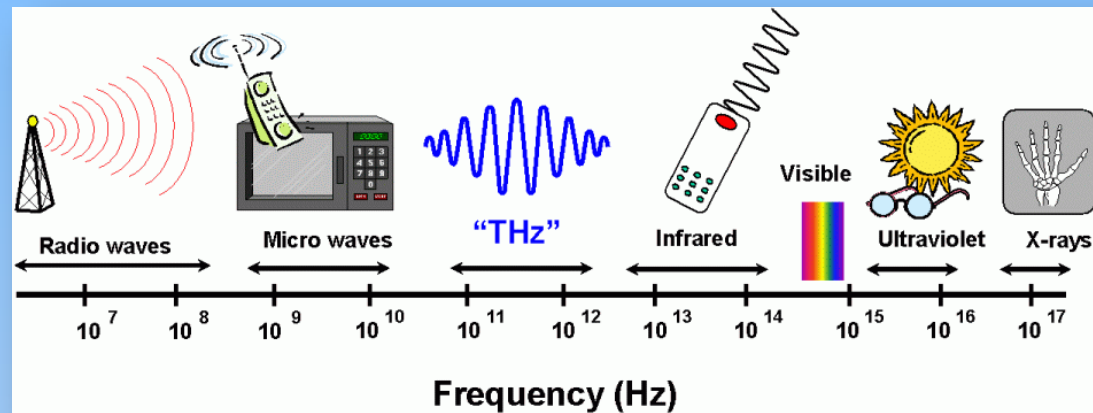
1964年，霍奇金因为用X射线晶体学确定了青霉素，B12等重要生化物质的晶体结构，而获诺贝尔化学奖

1979年，豪恩思费尔德、科马克因开发计算机辅助体层摄影术（CT），而获诺贝尔医学或生理学奖

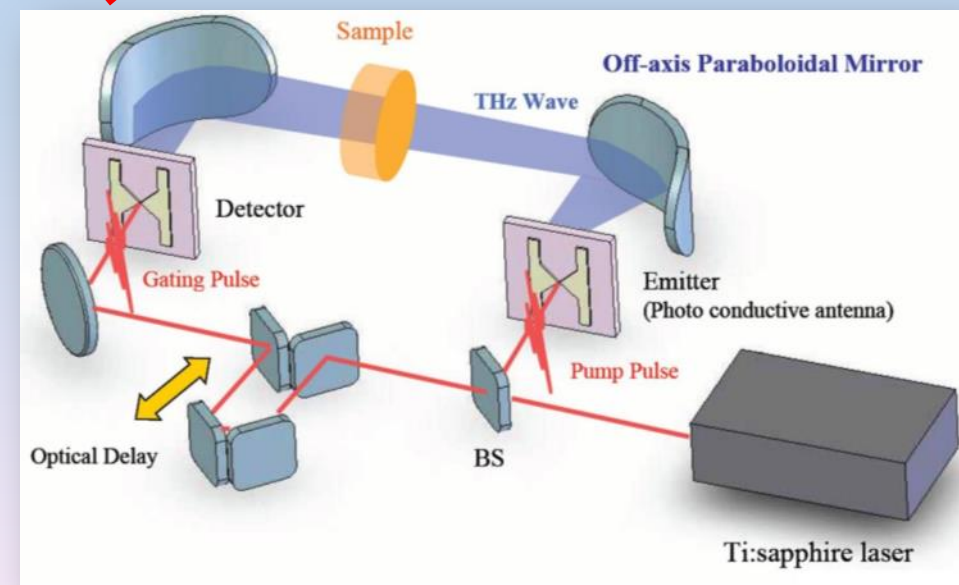
1985年，霍普托曼、卡尔因直接法解析结构获诺贝尔化学奖

长波区域: THz 生物医学成像

λ : 0.03 – 3mm



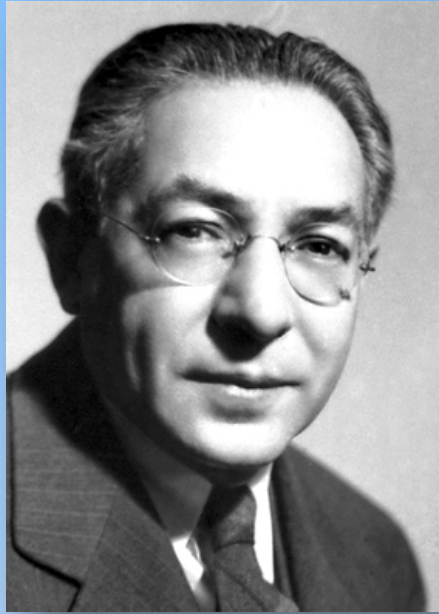
癌症肝脏THz吸收图像



太赫兹波是指频率在0.1THz到10THz范围的电磁波，介于微波与红外之间。太赫兹波具有**很强的穿透能力**，与X光相比对生物样品组织**辐射损伤小**，在生物医学成像领域有广泛的应用。例如皮肤癌、乳腺癌以及肝癌的检测。右边所示为患癌肝脏在特定太赫兹波谱的成像结果。

射频波段

核磁共振谱学及成像 —— 波谱学技术的代表之一



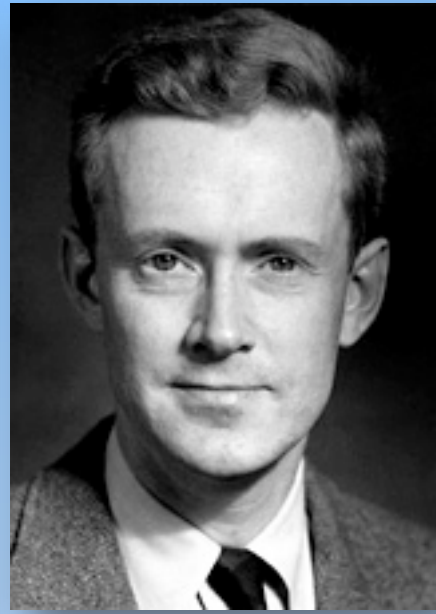
Isidor Isaac Rabi

气态原子磁共振
1944年诺贝尔物理学奖

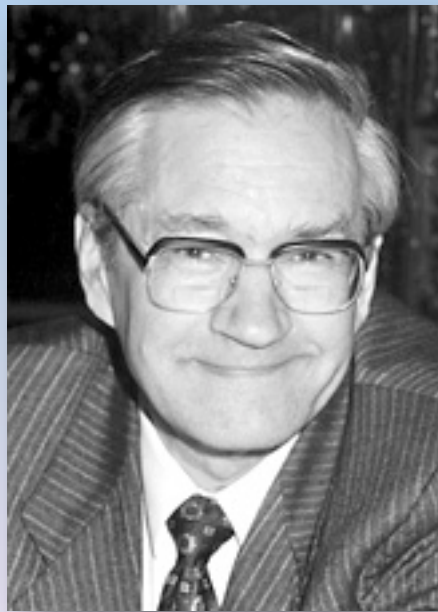
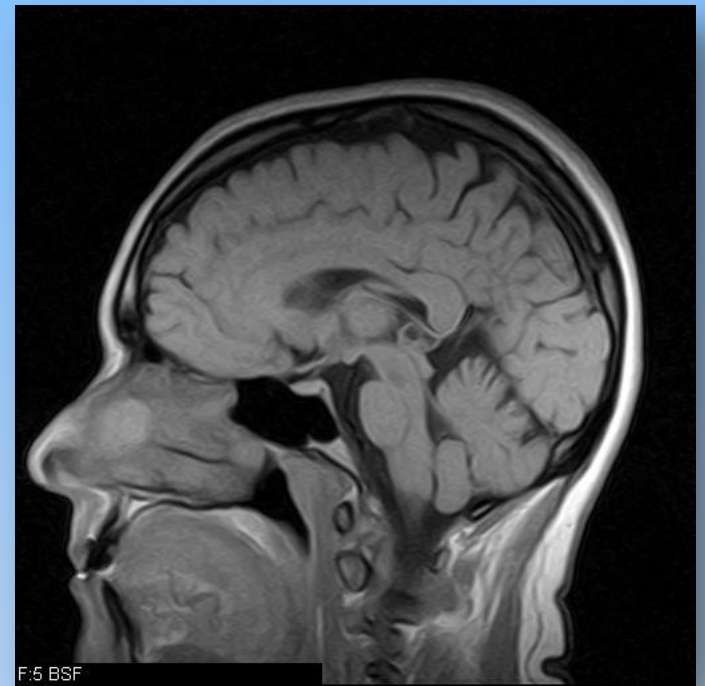


Felix Bloch

宏观核磁共振 - 1952年诺贝尔物理学奖



Edward Mills Purcell



Richard R. Ernst

高分辨NMR
1991年诺贝尔化学奖



Kurt Wüthrich

NMR蛋白结构解析
2002年诺贝尔化学奖



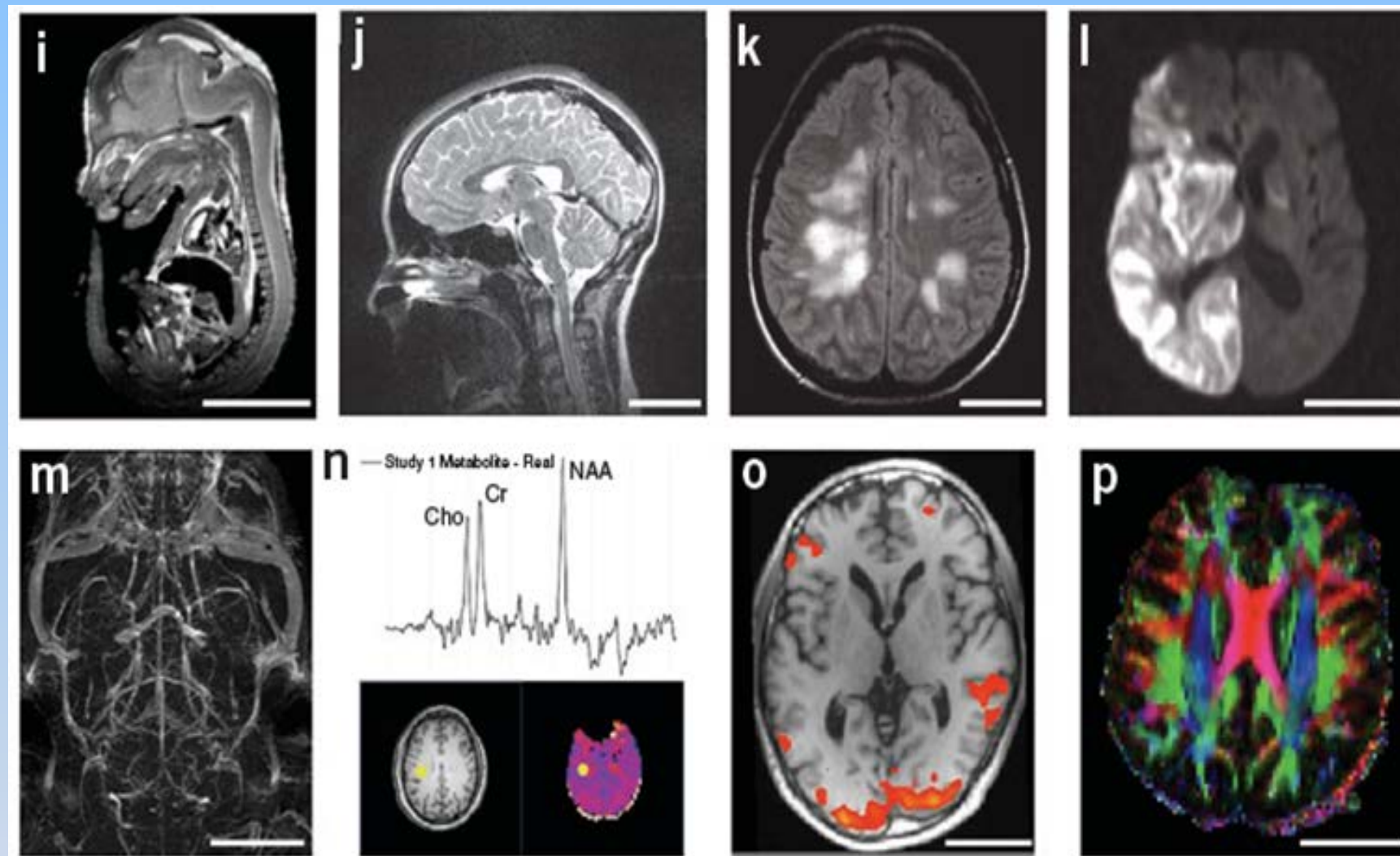
Paul C. Lauterbur

MRI - 2003年诺贝尔医学及生理学奖



Sir Peter Mansfield

NMR成像技术的发展，促进了生命科学与医学的进步



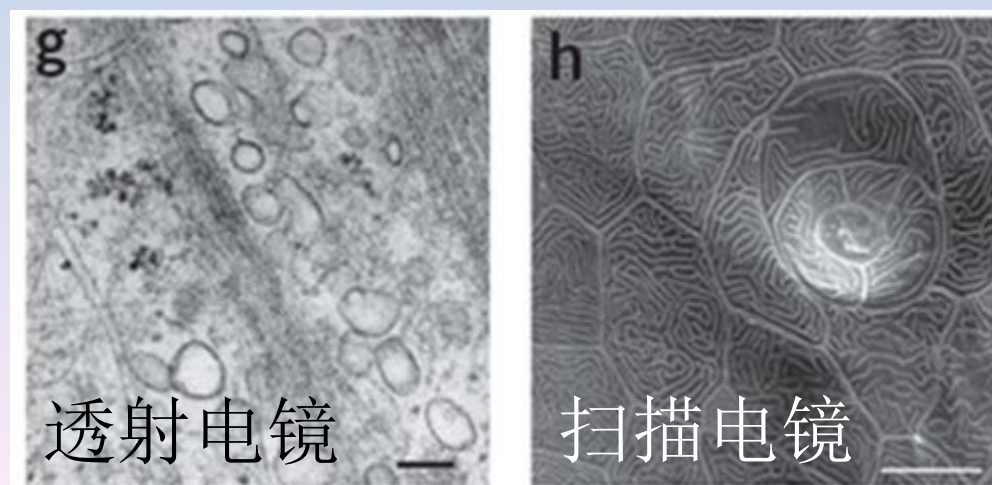
各种磁共振成像

“电子束” 代替 “光束”

—— 电子显微镜

1931年，恩斯特·鲁斯卡通过研制电子显微镜，电子束和电子透镜代替光束和光学透镜，使物质的细微结构在非常高的放大倍数下成像的仪器。使生物学发生了一场革命。这使得科学家能观察到百万分之一毫米那样小的物体。

1986年恩斯特·鲁斯卡被授予诺贝尔奖。



透射电镜

扫描电镜

结语



http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/advanced-chemistryprize2014.pdf

Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2014

SUPER-RESOLVED FLUORESCENCE MICROSCOPY

4. After the discovery

The history of super-resolved fluorescence microscopy is short. The ensemble-fluorophore STED-microscopy was first demonstrated in the year 2000, and single-molecule methods in the year 2006. In spite of this, the rapidly developing techniques (e.g. Sahl and Moerner, 2013) of super-resolved fluorescence microscopy have already had a large impact on the fields of the biological sciences, especially in microbiology and neurobiology (e.g. Huang *et al.*, 2010). At this point there is all reason to forecast that this development, already producing hosts of novel and previously unreachable results, will accelerate over the next decades. This development is expected to revolutionize biology and medicine by, not the least, eventually allowing for realistic, quantitative descriptions at nano-scale resolution of the dynamics of the complex, multidimensional molecular biological processes that define the phenotypes of all life forms.

致谢:

上海光机所

程亚研究员、倪洁蕾博士

北京大学物理系

陈志坚教授、李焱教授、杨宏高工、
王树峰副教授、吕国伟副教授、施可彬研究员
肖云峰研究员

北京大学工学院

黄岩谊研究员

谢谢!

