一 超高分辨率显微镜：显微镜发展史上的新突破

显微镜技术经过长期发展，加之近年来物理学界接二连三出现的重大科研进展，终于，在2008年，显微镜发展史上的新成果——超高分辨率荧光显微镜为科学家所研制出。人们预言，它定会成为生物学家的好帮手。

1 Stefan Hell打破了物理学界的传统看法

自从1873年Ernst Abbe第一次发现光学成像具有衍射限制现象以来，物理学界就公认，显微镜的分辨率具有极限，该极限与光源的波长有关。直到一个多世纪之后，罗马尼亚物理学家Stefan Hell推翻了这一观点。他是首位不仅从理论上论证了，而且用实验证明了使用光学显微镜能达到纳米级分辨率的科学家。

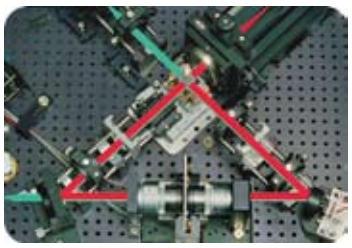
早在上世纪80年代中期，当时师从德国海德堡大学（University of Heidelberg）一位低温固态物理学家的Stefan Hell就已经发现，如果不是像常规那样使用一个透镜聚焦，而是将两个大孔径的透镜组合在一起聚焦，就可以提高光学显微镜的分辨率。Stefan Hell是首位发现这一现象的研究人员。

Hell于1990年顺利完成了他的博士学业，但同时，这也意味着他将无法再凭借奖学金的资助进行研究了。Hell最终决定独自一人继续在家研究以上的发现，并最终成功发明了4Pi显微镜。

图片说明：罗马尼亚物理学家Stefan Hell，现任德国马克斯·普朗克生物物理化学研究院（Max Planck Institute of Biophysical Chemistry）主任。

图片来源：Galonska, MPI BPC

> 时任美国马萨诸塞州坎布里奇市哈佛大学（Harvard University）化学系教授的Sunney Xie遇到了Hell，当他了解了Hell发明的4Pi高分辨率显微镜时，Xie对Hell勇敢地对传统物理学观点提出挑战的精神表示赞许。



图片说明：4Pi显微镜，超高分辨率成像中的一个步骤。

图片来源：Goldmann, MPIBC

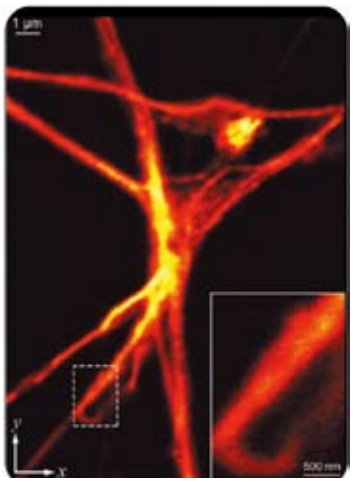
随后，Hell带着他的发明来到了位于德国海德堡的欧洲分子生物学实验室（European Molecular Biology Laboratory, EMBL），并获得了德国科学基金会提供的奖学金。1991年，Hell在该实验室开始他的博士后研究工作。

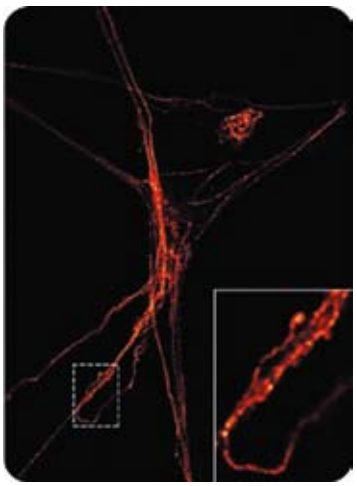
起初，许多科学家，包括那些声名显赫的物理学家都认为Hell的工作对于提高光学显微镜的分辨率没有太大的意义。他们认为，Hell仅用他那少得可怜的科研经费来从事这项研究简直就是在冒险。但Hell却始终坚信他能够打破衍射极限。

Hell的努力没有白费，他的冒险终于获得了回报。1992年，Hell第一次用他的4Pi高分辨率显微镜证明了他的确能将传统光学显微镜的分辨率提高3~7倍。然而，尽管Hell提高了Z方向的分辨率，他还是没能突破衍射极限的限制。

此后不久，Hell又在芬兰土尔库大学（University of Turku）得到了他的第二个博士后职位。一个星期六的早晨，Hell正躺在研究生公寓的床上看一本有关光学量子理论的书，突然，灵光一闪，Hell脑海里浮现了一个想法：如果使用一种合适的激光，仅激发一个点的荧光基团使其发光，然后再用一个面包圈样的光源抑制那个点周围的荧光强度，这样就只有一个点发光并被观察到了。Hell给他的这项发明取名STED，即受激发射损耗显微镜（stimulated emission depletion）。有了这个想法后，Hell立即行动，冲进实验室进行相关实验。每当回想起当时的心情，Hell都会觉得那是他科研生涯中最激动的时刻。

> 曾在EMBL与Hell共事，并共同研发4Pi显微镜的Pekka Hanninen指出，Hell在土尔库大学进行研究工作时非常刻苦。那时，他经常被许多问题困扰。尽管如此，研究过程中还是有许多快乐萦绕着他们。Hell不仅是一名严谨的科学研究者，还是一名音乐爱好者，每当工作至深夜时，实验室走廊总会回响起Hell吹奏萨克斯风的动听乐声。





图片说明：由共聚焦显微镜（左图）和STED（右图）成像的一个神经元。

图片来源：Rebecca Medda, Dominik Wildanger, Lars Kastrup, MPI BPC

1994年，Hell在《光学快报》（*Optics Letters*）上发表了他关于STED的理论文章。不过直到多年以后，这项理论才得以在实践中被证实。在那段时间里，Hell一面继续研究工作，一面四处奔走筹集科研经费，还卖掉了他4Pi 显微镜的专利。

但是那个时候Abbe的衍射极限理论仍然在学界占统治地位，许多物理学家对Hell的理论都持怀疑甚至批评态度，因此他们也都将研究重点放在其它的成像技术上。尽管如此，Hell还是在1997年与马普生物物理化学研究所签订了一份长达5年的合同，以继续他的STED研究。

1999年，Hell将他的研究成果分别投给了《自然》（*Nature*）杂志和《科学》（*Science*）杂志，不过都被退稿。当时两位杂志的主编都没有意识到他的研究成果将会改变整个显微镜领域。

直到2000年，事情才终于有了转机——《美国国家科学院院刊》（*PNAS*）发表了Hell的科研成果。采用 Hell的STED技术，人们第一次得到了纳米级的荧光图像。

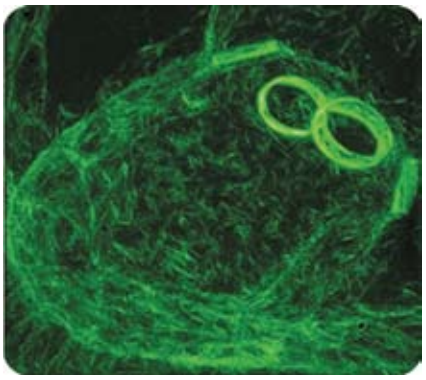
Hell的工作由此获得了广泛的肯定，2002年，他获得了马普研究所的终身职位。从此，Hell一直在马普研究所从事成像技术的研究工作。

紧随STED这项开创性工作之后，世界各地实验室等研究机构内陆续出现了一批高分辨率的显微镜技术。例如，由珍妮莉娅法姆研究学院（Janelia

Farm Research Campus）的物理学家兼工程师Mats Gustafsson领导的研究团队开发出了结构光学显微镜（structured-illumination microscopy, SIM）。

SIM技术的原理是通过一系列光成像的图案对低分辨率莫尔条纹形式的精细结构进行成像，此类图像是采用其它技术所无法观察到的。然后再由计算机处理、分析这些条纹中包含的信息，最终就可以获得高分辨率的图像。

同年，Gustafsson小组得到了HeLa细胞中肌动蛋白细胞骨架的图像，他的图像相比传统显微镜的图像来说，在测向上的分辨率提高了2倍。随后，Gustafsson小组又使用非线性技术将整体分辨率提高了4倍。



图片说明：果蝇卵母细胞内的肌动蛋白的3D SIM成像，该照片拍摄于完整的卵泡内。

图片来源：Hesper Rego, Margot Quinlan, Mats Gustafsson

2 科研竞赛

2006年，超高分辨率显微镜研究行业翻开了新的篇章。Eric Betzig、Harald Hess以及Lippincott-Schwartz小组、Samuel Hess小组以及庄晓威（音译）科研小组几乎同时报道了他们提高显微镜分辨率的科研成果，下面分别介绍这三个小组的研究情况。

2.1 Eric Betzig、Harald Hess以及Jennifer Lippincott-Schwartz小组

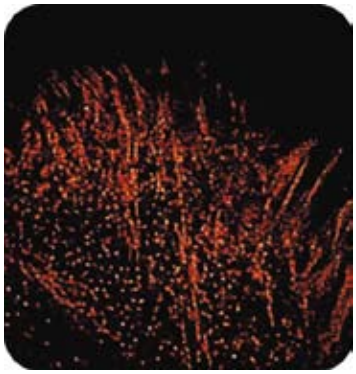
图片说明：Eric Betzig、Harald Hess以及Jennifer Lippincott-Schwartz（从左至右）。

图片来源：Howard Hughes Medical Institute & NIH record

2005年夏天，细胞生物学家Jennifer Lippincott-Schwartz卸下了她在美国马里兰州贝塞斯达美国国立卫生研究院（HIV）暗室里的红色灯泡。Lippincott-Schwartz正在为赋闲在家的两位物理学家Eric Betzig和Harald Hess腾出空间，筹备实验室。正是这两位物理学家研制出了光敏定位显微镜（photoactivated localization microscopy, PALM），他们的这种新产品能将荧光显微镜的分辨率提升至纳米级水平。

接下来的整个冬天，Eric Betzig、Harald Hess以及Lippincott-Schwartz等人都一直在那间狭小的没有取暖设备的实验室里工作。现在就职于美国弗吉尼亚州阿士伯恩霍华德休斯医学研究所珍妮莉娅法姆研究学院（Howard Hughes Medical Institute’s Janelia Farm Research Campus in Ashburn, Virginia）的Hess承认，自己与Betzig对生物学的认识都不深。不过近15年来，他们一直都在努力，希望能运用生物学知识获取高分辨率的显微图像，但是没有取得明显进展。然而，当Hess和Betzig了解到Lippincott-Schwartz和George Patterson在2002年发明的光敏绿色荧光蛋白（photoactivatable green fluorescent protein）后，他们知道他们已经找到了解决问题的关键所在。

> 回想起当时的情形，Lippincott-Schwartz指出：“他们当时非常激动。我还记得当我们得到第一张显微图像时，你根本无法看出那是什么东西。直到我看到他们将荧光图像和电镜图像叠加之后的结果才相信，我们成功了。我当时觉得这一切真是太神奇了。”



图片说明：PALM在哺乳动物细胞内拍摄到的粘附复合物。

图片来源：H. Shrott, C. Galbraith, J. Galbraith, E. Betzig

2006年，Eric Betzig、Harald Hess以及Lippincott-Schwartz小组在《科学》（*science*）杂志上发表了他们的PALM研究成果。使用PALM可以清楚得看到细胞黏着斑和特定细胞器内的蛋白质。

2.2 Samuel Hess小组

图片说明：Samuel Hess

图片来源：University of Maine

Samuel Hess小组是上述三个小组之一。Hess是美国缅因州立大学（University of Maine）物理系的助理教授。2005年夏天，Hess一直在和他们学校的化学工程师和生物学工程师，就如何提高观察活体细胞脂筏结构的分辨率等问题进行交流。

2005年的一个夏夜，Hess被邻居家举办舞会的声音吵醒。半睡半醒的Hess走下楼来，随手画了一副设计图，他的这种设计是需要借助荧光标记的蛋白质来显示细胞形态的。第二天早上，当Hess重新翻看这幅非清醒状态绘制的潦草的设计图时，不由得大笑起来。不过令人吃惊的是，他的这幅设计图竟然没有一点问题。于是他把这幅图拿给物理系的同事检查，但同事也没有发现任何问题。

接下来，Hess就按照他的设计图开始制作显微镜了。此时，他的科研经费所剩不多，而结题时间转眼就到。因此，Hess等人以最快的速度组装好显微镜，并进行了试验。同时，在不到两天的时间里，缅因州立大学表面科学技术实验室的同事就为Hess制备好供检验显微镜效果的蓝宝石晶体样品。

对于同事们的帮助，Hess总是不胜感激。

2006年，《生物物理学期刊》（*Biophysical Journal*）刊登了Hess小组的科研成果。他们将这项研究成果命名为荧光光敏定位显微镜（fluorescence photoactivation localization microscopy, FPALM）。2007年，Hess小组证明了FPALM可以分辨细胞膜脂筏上的蛋白质簇。

2.3 庄晓威科研小组

与此同时，另一个研究小组——哈佛大学霍华德休斯医学研究所（Howard Hughes Medical Investigator at Harvard University）的研究员庄晓威科研小组也在研究高分辨率成像技术。

其实，这三个小组都有一个共同的也是非常简单的理念，那就是先获得单分子荧光图像，再将成千上万个单分子图像叠加在一起，获得最终的高分辨率的图像。

早在2004年初，庄等人就已经意外发现了有一些花青染料可以用作光敏开关。这也就意味着这些染料既可以被激活发出荧光，也可以被关闭不发光，人们可以使用不同颜色的光束来随意控制这些花青染料的开和关。

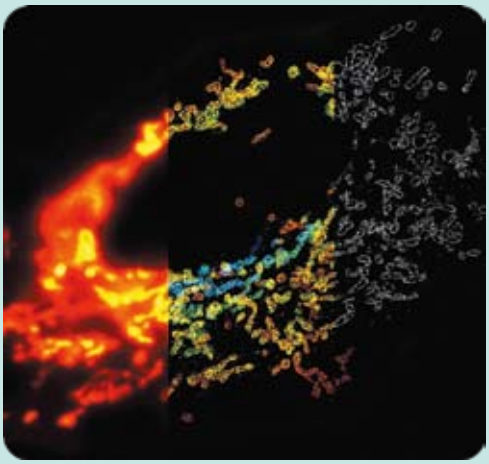
从那以后，庄等人就一直在研究如何用光敏开关探针来实现单分子发光技术。他们希望能用光敏开关将原本重叠在一起的几个分子图像暂时分开，这样就能获得单分子图像，从而提高分辨率。Eric Betzig小组和Samuel Hess小组也都采用了同样的策略，只不过他们使用的不是光敏开关而是一种可以先被荧光激活继而被漂白失活的探针。

2006年，庄的科研成果在《自然-方法》（*Nature Methods*）杂志上发表，他们将这项成果命名为随机光学重建显微镜（stochastic optical reconstruction microscopy, STORM）。使用STORM可以以20nm的分辨率看到DNA分子和DNA-蛋白质复合体分子。

此后几年，超高分辨率荧光显微镜又得到了进一步的发展。现在，生物学家已经能够使用超高分辨率荧光显微镜在纳米水平上观察细胞内部发生的生化变化了。以往那些大小在200nm至750nm之间的模糊泡状图像再也无法对他们造成困扰了。尽管早在上世纪80年代，科研机构里就已经出现了超高分辨率显微镜的构思，但只是最近几年里这项技术才伴随着它的商业化进程获得了快速发展。现在，已经有几十家实验室安装了这种最新型的显微镜并投入了使用。正像Lippincott-Schwartz所说的，超高分辨率显微镜正在以飞快的速度被科研界接受，在生物学界更是如此。

图片说明：庄晓威（音译）。

图片来源：Howard Hughes Medical Institute



图片说明：通过3D STORM观察到的一个哺乳动物细胞内线粒体网状系统。传统荧光成像（左图）；3D STORM成像（中图），其中，采用不同颜色标记出*z*的位置；3D STORM成像中*xy*维图像（右图）。

图片来源：庄晓威研究小组

3 超高分辨率显微镜的成绩

已经开始使用这些显微镜的生物学家对这项技术都表示出了极高的热情。Jan Liphardt这位在美国劳伦斯伯克力国家实验室（Lawrence Berkeley National Laboratory）工作的生物学家，还清楚地记得他2006年第一次在《科学》（*science*）杂志读到Betzig的那篇有关PALM技术的论文时的激动心情。当他看到那幅线粒体蛋白的图像时立刻想到了该技术可以用于他自己的微生物研究领域。

Liphard说道："通常，我们得到的大肠杆菌荧光图像都只有20像素，甚至更低，现在突然有一幅几千像素的图片摆在你面前，你可以想象那是一种什么感觉。"

Liphard现在正与Betzig以及其他一些研究人员一起研究大肠杆菌的趋化现象（chemotaxis）。Liphard还提到："我从没想到这项技术达到的分辨率有这么高，可以如此清楚地看到细胞内单个蛋白质分子的定位，甚至还能定量。而对我来说，每天的工作实际上就是在弄清楚这些蛋白质在什么位置，什么时候存在。而之前我们的研究主要采用间接方法。但超高分辨率显微镜这项新技术是我从事科研工作这么长时间以来，感触最深，获益最大的一项科技成果。"

美国丹佛市科罗拉多州立大学医学院（Medicine at the University of Colorado Denver）的助理教授Nicholas Barry也正在和Betzig合作，他们使用了一台蔡司的全内反射荧光成像系统（total internal reflection fluorescence imaging, TIRF）来研究肾细胞顶端胞膜上的蛋白质簇。

Barry指出，只需要一台蔡司显微镜和普通电脑，差不多就足够了。此外，他们还花费3万美元添置了两台激光发射器。现在，Barry等人可以在8分钟内得到一幅图像，这幅图像由10000帧图像合成，每一帧图像上显示10个分子。最后的图像文件大小大约是0.3GB。Barry等人还使用Perl语言自己开发了一套免费程序。Barry表示："这里面包含了每帧图像的资料信息，客户可以根据这些信息进行相关计算。"Barry充满信心地提到，很快就会有人为NIH的那套免费图像分析软件ImageJ开发出一套运算程序作为插件使用。

美国斯坦福大学（Stanford University）化学及应用物理系教授W.E. Moerner曾于1989年第一个在试验中使用光学显微镜得到了单分子图像。W.E. Moerner教授表示，这几年来，超高分辨率显微镜研究领域已经取得了巨大的进展，终于达到了纳米级单分子分辨率。他兴奋地说："经过了近20年对单分子成像课题的研究，我们终于取得了完美的成果。"

4 展望

自从2006年STORM技术和PALM技术问世以来，科技工作者就一直在不断努力，对它们进行改进、完善和提升。2008年，Lippincott-Schwartz的研究团队将PALM技术和单颗粒示踪技术（single-particle tracking）结合，成功地观测到活体细胞胞膜蛋白的运动情况。同年，庄小威研究组在《科学》（*science*）杂志上也发表了他们的3D STORM成像成果，该技术的空间分辨率比以往所有光学3D成像技术的分辨率都要高出10倍。论文中，他们展示了用3D STORM成像技术拍摄的肾细胞内微管结构图和其它的分子结构图。随后，他们又进一步将该技术发展成了多色3D成像技术（multicolor 3D imaging）。Gustafsson，还有其他

一些科研工作者使用3D SIM技术（该技术使用3束干涉光，而不是常见的2束）观察到了共聚焦显微镜（confocal microscopes）无法观测到的哺乳动物细胞核内结构。位于德国的世界知名光学仪器制造公司蔡司公司进一步发展了SIM和PALM技术，不过他们将PALM称为PAL-M。蔡司公司预计将于2009年末推出全新的成像产品。

2008年，Hell小组使用STED技术通过抗体标记目标蛋白，观察到了活体神经元细胞中突触小泡（synaptic vesicles）的运动过程。同年稍晚些时候，他们又使用4Pi显微镜和STED技术得到了固定细胞内线粒体的3D图像，分辨率达到了40至50nm。最近，他们又使用超高分辨率显微镜成像技术对脑切片组织中的形态学变化进行了研究，并得到了活体神经元细胞树突棘（dendritic spines）的3D图像。

由于最近几年这些新技术的不断涌现，现在可以对活体细胞进行三维观察了。Gustafsson指出，随着PALM技术和STORM等新技术的出现，以前很多看起来不可能的事情现在都变得可能了。

尽管已有许多科学家从这项技术进展中获益，但是仍然可以进一步提高，以使更多的研究人员能够在自己的工作中使用它。到目前为止，那些成功应用此项技术的实验室都采取了正确的技术组合：研究人员可以很好地将物理学与生物学相结合——他们将显微镜装配并做适当的调节，然后用它对生物学样品进行检测。Moerner指出，软件的编写也不容小觑：对检测到的光子进行定位和报告需要进行准确计算，从而得到合适的分辨率。

仅仅是显微镜的价格就已经限制了它的普及性，Leica’s TCS STED显微镜高达100万美元。因此，如何获得相应的资金来购置显微镜仍然是摆在研究人员面前的一个难题，位于丹佛市的科罗拉多大学（University of Colorado）光学显微镜组主任Bill Betz这样说道。

Betz曾申请用于显微镜购置的资金，但遭到了拒绝。但他表示，他们已经计划再次申请相关资金。而Stefan Hell曾指出，激光领域的技术进展已经可以使得研究人员自己在实验室内构建一个STED平台，花费只需不到10万美元。

除了要将这一技术方法普及，使生物学家能够加以利用之外，该项技术的研发人员还表示，他们已经开始致力于研究更宽范围及更多样的荧光探针了。更好的探针当然能够为我们带来更高的分辨率及更快速的图像处理。美国纽约阿尔伯特•爱因斯坦医学院（Albert Einstein College of Medicine）解剖学及结构生物学副教授Vladislav Verkhusha说到：“为了对活体哺乳动物细胞进行研究，你就需要有一整套的荧光标记蛋白和可通过光控开关控制的蛋白质。”他本人在荧光蛋白领域的研究工作就受益于PALM的出现。

庄晓威的众多项目之一便是与Alice Ting及其在麻省理工学院（MIT）的实验室合作，对蛋白标记技术进行研究，希望能够找到一种方法可以将小和明亮的光控开关可控的探针标记于细胞的特异蛋白上，从而可以对活细胞进行成像。她提到：“将遗传标记方法与小而明亮且可被光控开关控制的探针结合在一起，将是今后发展分子级别超高分辨率成像的十分理想的一种方法。”

尽管研发人员还将继续努力，以进行相应技术的提高，但是超高分辨率荧光显微镜更加广泛的应用还是毫无疑问地成为新的一年的标志。Harald Hess说：“这一技术的确会为生物学家的工作带来很大的帮助。同时，我们也在不断询问，‘你们想要用它做什么精彩的实验？’事实上，我们也得到了许多精彩的答案。”

原文检索：*Nature Methods* Published online: 17 December 2008; doi:10.1038/ Nmeth.f. 234

筱玥/编译

Kelly Rae Chi/原文作者。
Kelly Rae Chi是一名自由撰稿人，现居美国北卡罗来纳州罗利市（Raleigh）
联系方式：kellyraechi@gmail.com。