

# 超分辨显微, 至极至美: 2014年诺贝尔化学奖述评

李明<sup>†</sup>

(中国科学院物理研究所 北京 100190)

2014-11-05 收到

<sup>†</sup> email: mingli@iphy.ac.cn

DOI: 10.7693/wl20141205

## Beyond the limit: super-resolution microscopy earned the Nobel Prize in Chemistry 2014

LI Ming<sup>†</sup>

(Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

**摘要** 三个物理学家, 因为对生命科学的贡献, 赢得2014年的诺贝尔化学奖。他们做了什么重大贡献? 恩斯特·阿贝为常规光学显微镜的分辨率设定了一个限制——半波长极限。贝齐格、赫尔和莫纳将已知的技术推至极限, 最早探测到凝聚态体系中的单个荧光分子, 利用荧光分子的开关效应, 加上物理教科书上的受激辐射原理和数据分析中常用的拟合定位方法, 绕开了这个似乎不能突破的极限。他们将光学显微技术带入到纳米尺度, 引发了常温下活体生物学研究的又一场革命。他们对科学的追求堪称至极至美。这样的典范将来还会有, 尤其是在物理学与生命科学的交叉领域。

**关键词** 超分辨显微镜, 光激活定位, 受激辐射损耗, 单分子荧光

**Abstract** Three physicists, Eric Betzig, Stefan Hell and William E. Moerner were awarded the Nobel Prize in Chemistry 2014 for developing super-resolution optical microscopy. They pushed the techniques of their time to extremes to image single molecules, discovered the on/off switching behaviors of fluorescent molecules, and applied the well-known stimulated emission phenomenon to bypass a presumed scientific limitation stipulating that an optical microscope can never yield a resolution better than 200 nm. The new techniques will lead to a revolution in life science. Using them, scientists can now monitor the interplay between individual molecules inside cells and track cell division at the nano-level, to name but a few.

**Keywords** super-resolution microscopy, photoactivated localization, stimulated emission depletion, single molecular fluorescence

2014年的诺贝尔化学奖授予了三位物理学家: 埃里克·贝齐格(Eric Betzig)、斯特凡·赫尔(Stefan Hell)和威廉·莫纳(William E. Moerner)。他们将技术推至极限, 最早探测到凝聚物质系中的单个荧光分子, 然后发现了荧光分子的开关效应, 并巧妙利用物理教科书上的受激辐射原理和数据分析中常用的拟合定位法, 将光学显微镜的分辨率提高至纳米尺度。这类技术从诞生到现在

还不到二十年, 却已对多个领域产生了重大影响, 并将在未来给生命科学带来更多革命性的变化。

自恩斯特·阿贝(Ernst Abbe)1873年发表著名的阿贝分辨率极限公式以来, 人们一直认定显微镜的分辨率只有光波长的一半(见图2)。对可见光而言, 这个数值大约是250 nm。于是, 物理学家很自然地将思路转向波长更短的射线, 发明了电子显微镜和X射线显微镜。这两种显微镜都能达

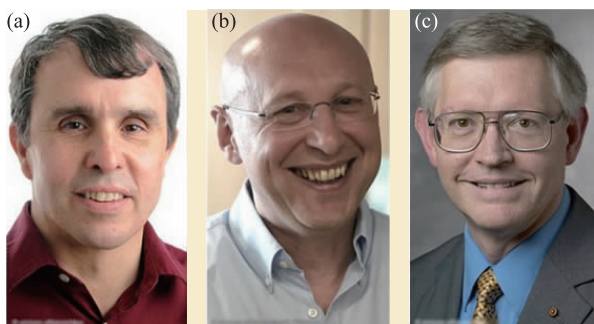


图1 (a)埃里克·贝齐格(Eric Betzig); (b)斯特凡·赫尔(Stefan Hell); (c)威廉·莫纳(William E. Moerner)



图2 阿贝墓(a)和他的墓志铭(b)及头像(c)。墓志铭上的公式就是著名的阿贝衍射极限公式

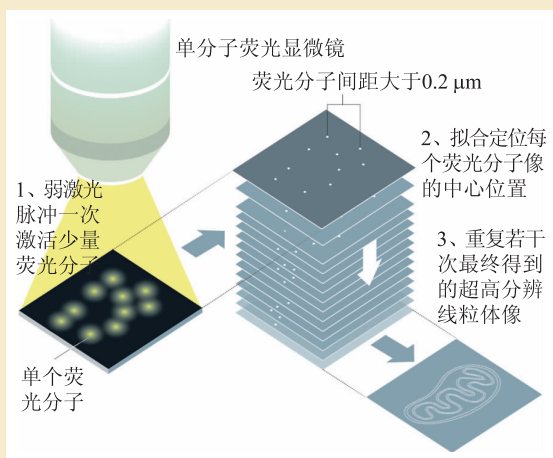


图3 荧光激活定位超分辨显微镜的工作原理

到纳米甚至更高的分辨率。可惜这两种显微镜都不是生物学家的最爱。他们更喜爱能在常温下对活体进行有效且无损观察的光学显微镜，特别感兴趣的尺度是 $10\ \text{nm}$ 左右，这大约是一个普通蛋白质的尺寸。但阿贝分辨率极限让他们断了念想。例如，一个大肠杆菌的尺寸大约是 $300\ \text{nm}$

宽， $500\ \text{nm}$ 长。在其中放入两个发光的分子就超出了光学显微镜的分辨能力。这个分辨率极限似乎限制了人们的思路，一百多年来光学显微技术一直没有重要进展。阿贝的公式没有错，它源自严密的物理学推演，并在实践中经受了严格的检验。错的是人们忽略了阿贝极限存在的条件：单一物镜的传统光学显微镜；观察目标的发光不可控。改变其中任何一个条件，都有可能让光学显微镜绕开阿贝极限。这正是本年度诺贝尔化学奖获得者所做的事情。科学史上这样的例子绝不只这一个，只可惜人们在惊羡过后很快就忘了自己或许也该有这样的机会。

当然，他们的成功也不是一蹴而就的，而是源自单分子显微镜技术艰辛发展道路上的一系列重要突破。此次诺贝尔化学奖获得者之一莫纳在1989年任职于美国IBM研究中心时，成为世界上第一个测量单个分子光吸收的科学家<sup>[1]</sup>，这正是单分子荧光显微镜成功的关键。不要小看这个在现在看来不难实现的测量，以当时的技术条件，这几乎就是天方夜谭。但莫纳和他的团队就是想挑战一下光学测量技术的极限，结果获得了成功。它带来的震撼不亚于当年爱因斯坦用布朗运动证实分子的真实性和对怀疑论者的冲击。没想到事情的发展是那么富有戏剧性。此后单分子检测一路凯歌，由低温发展到可在室温下进行，并且陆续实现了固体、微滴和溶液中的单分子荧光检测<sup>[2-9]</sup>。室温下溶液中单分子检测的实现为以后在实际生物体系中的应用提供了可能性。

莫纳的又一个重要贡献是他与2008年度诺贝尔化学奖获得者钱永健等一起发现了单个荧光分子的“开关”效应<sup>[10]</sup>。该效应被等待了多年的另一位获奖者贝齐格用来实现他1995年的设想，并于2006年证实可以获得超越阿贝极限的显微成像。贝齐格的方法是这样的(见图3)：控制荧光分子，每次只让少量几个荧光分子发光，用CCD记录并拟合每个荧光分子像的中心位置，以时间来换空间，将多次观察得到的位置信息拼凑起来得到完整的图像。很显然，这样得到的图像的分辨率取决于单分子像之中心位置的拟合精度。目前

一般情况下可以达到 10 nm 量级，这正是生物学家多年来所企盼的分辨率。多年后，当莫纳被问到为什么没有想到将自己的发现用于显微镜研究时，莫纳只能很尴尬地说自己确实很笨。我们看到，大师莫纳也有头脑没有准备好的时候。可见，知识的广度与深度是多么重要，除了有一颗勇于创新的心，还要有一个不断思考的脑。

与莫纳一直处于优雅的学术殿堂相比，贝齐格的学术生涯还带点传奇色彩。贝齐格在 1990 年代研究近场光学显微技术(SNOM)，是当时这个领域最好的研究者之一，在 *Science* 杂志上发表了一系列重要文章<sup>[11, 12]</sup>。不过，他追求的不是发表多少文章，而是超越极限的理想。当他意识到用 SNOM 不可能将光学显微技术的分辨能力推至纳米极限后，失望地离开了科学界，去了他父亲的公司做工程师。但这位曾首次在室温下获得单分子荧光光谱的科学家，并不是狼狈地逃离，而是在离开之前(1995年)抛出了一篇奠基性文章，提出了我们现在称之为光激活定位显微术(photoactive localization microscopy, PALM)的理论思路<sup>[13]</sup>。两年后莫纳与钱永健等发现了荧光蛋白的“开关”效应<sup>[10]</sup>。随后 Lippincott-Schwartz 等在 2002 年发明了光敏绿色荧光蛋白<sup>[14]</sup>。贝齐格意识到他可以借此实现自己 1995 年的设想，并与合作者一道发明了 PALM 显微镜。该成果于 2006 年发表在 *Science* 杂志上<sup>[15]</sup>。

在光学显微镜的发展史上，2006 年是一个奇迹年。在这一年，三个研究小组几乎同时报道了超分辨显微镜。Samuel Hess 小组是其中之一。2005 年夏天，还是缅因州州立大学物理系助理教授的 Hess，一直在与化学教授和生物学教授就如何提高观察活细胞脂筏结构的分辨率等问题进行交流。有一天他突然灵光闪现，设计了与贝齐格思路相似的显微镜，并与合作者一道组装好显微镜。2006 年，他们在 *Biophysical Journal* 期刊上发表了他们的研究成果<sup>[16]</sup>。令人称奇的是，他们用了几乎相同的名字来命名他们的技术：荧光光敏定位显微镜(fluorescence

photoactivation localization microscopy, FPALM)。同一时间段，哈佛大学的庄小威小组也在研究荧光成像技术。她的研究小组在 2004 年发现有一些花青染料可以用作光敏开关，并于 2006 年在 *Nature Methods* 期刊上发表了她们称之为随机光学重构显微术(stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)的成果<sup>[17]</sup>。

与上面提到的一群学术大师一样，斯特凡·赫尔也一直对阿贝极限耿耿于怀，只不过在学术上他更像一位孤胆英雄。赫尔在发明超分辨显微镜之前的传奇一点不比贝齐格逊色。但他做的事情不是在小有成就之后离开学术界，而是一直在为得到承认而辛苦奔波。在读博士期间，赫尔发现如果不拘泥于使用单个显微镜物镜，而是将两个高数值孔径的物镜头对头组合在一起，可以提高光学显微镜沿光轴方向的分辨率。博士毕业后，他独自一人继续在家研究以上问题，并最终成功发明了 4Pi 显微镜<sup>[18]</sup>。可惜这并不被当时的主流学术界所重视，因为他只是将显微镜沿光轴方向的分辨率提高了几倍而已。他只好一个博士后接着一个博士后地辗转于欧洲各地。1994 年，赫尔在翻阅量子力学书籍时突然想到可以利用分子的受激辐射达到目的。他的设想是(见图 4)：用一束激光激发荧光分子，很自然地，点扩散函数所覆盖范围内的分子都会被激发。此时若用另一束激光让点扩散函数中心点外围的荧光通过受激辐射回到基态，就只剩下纳米尺度内的分子发射自发辐射荧光并被探测器记录。这样，通过扫描样品即

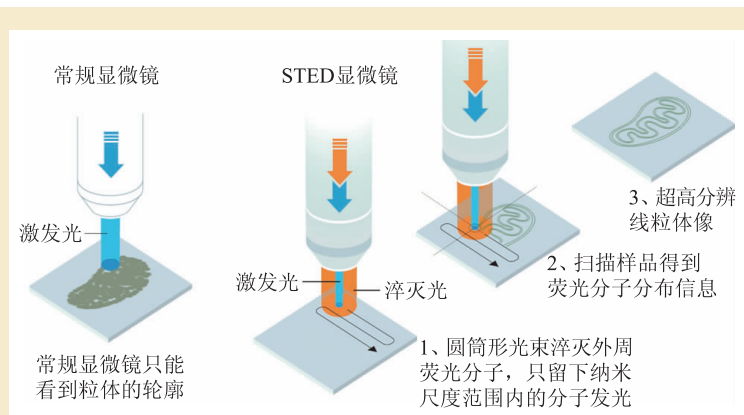


图 4 受激辐射损耗(STED)超分辨显微镜的工作原理

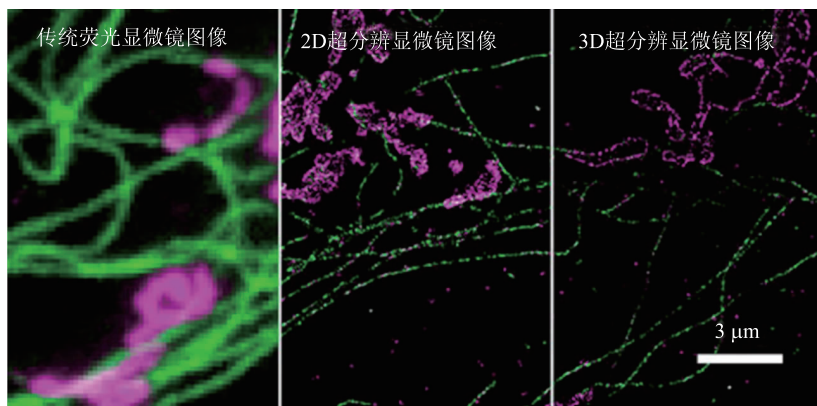


图5 超分辨显微镜图像与传统显微镜图像的比较

可呈现出远远高于阿贝极限的显微图像。这就是现在所谓的受激辐射损耗技术(stimulated emission depletion, STED)。1994年,赫尔在*Optics Letters*期刊上发表了他的理论文章<sup>[19]</sup>。多年以后这项理论才得以在实践中被证实。在那段时间里,赫尔一边继续科研工作,一边四处奔走筹集科研经费。赫尔的研究终于得到德国马克斯-普朗克研究所的认可,回到德国后他成功验证了自己的设想。受激辐射损耗技术(STED)看起来更符合物理学家的品位,所以使用起来也稍微复杂一点。当然,其最根本的基础还是莫纳等所奠定的单分子荧光成像技术。1999年,赫尔将他的研究成果前后投给*Nature*和*Science*杂志,不过都被退稿。直到2000年,美国科学院院刊*PNAS*才发表了他的成果<sup>[20]</sup>。采用STED技术,人们第一次得到了纳米级的荧光图像。回忆一下,你是不是也曾经有过

类似的灵感?只可惜,或许你想了一下就放下了。

超分辨显微技术是对分子科学的重大贡献,它对生物医学研究的影响更是革命性的。它让人们能够观察到活生生的纳米尺度的生命现象。借助超分辨显微技术的强大威力,今天的我们能够从最微小的分子细节着手来研究活细胞(见图5)。这在前人看来简直是不可思议的事情。正如诺贝尔化学奖评选委员指

出的那样,利用分子的荧光,科学家们可以监测细胞内部分子之间的相互作用,也可以观察与疾病相关的蛋白质聚合现象,在纳米世界里追踪细胞的分裂。如今,纳米显微镜已在世界各地被广泛运用,每天人类都能从其带来的新知识中获益。

今年的三位诺贝尔化学奖得主都是物理学博士,他们获奖的成果是典型的跨学科研究成果。这是物理思想、光学技术和分子探针相结合的产物,是又一个技术型诺贝尔奖。生命科学和医学领域大量的悬疑正持续吸引着具有不同专业背景的有识之士,学科的交叉融合将大力促进生物医学研究的进步。毋庸置疑,未来我们还将看到更多像这样的诺贝尔奖级别的跨界研究成果。下一个摘取桂冠的会不会是你?或许就是你,只要你不被所谓的主流所迷惑,不被现有的成规所羁绊,并有一个勇于探索的心。

## 参考文献

- [1] Moerner W E, Kador L. *Phys. Rev. Lett.*, 1989, 62: 2535
- [2] Orrit M, Bernard J. *Phys. Rev. Lett.*, 1990, 65: 2716
- [3] Shera E B, Seitzinger N K, Davis L M *et al.* *Chem. Phys. Lett.*, 1990, 174: 553
- [4] Rigler R, Widengren J. *Bioscience*, 1990, 3: 180
- [5] Betzig E, Chichester R J. *Science*, 1993, 262: 1422
- [6] Ambrose W P, Goodwin P M, Keller R A *et al.* *Science*, 1994, 265: 364
- [7] Xie X S, Dunn R C. *Science*, 1994, 265: 361
- [8] Nie S, Chiu D T, Zare R N. *Science*, 1994, 266: 1018
- [9] Funatsu T, Harada Y, Tokunaga M *et al.* *Nature*, 1995, 374: 555
- [10] Dickson R M, Cubitt A B, Tsien R Y *et al.* *Nature*, 1997, 388: 355
- [11] Betzig E, Trautman J K. *Science*, 1992, 257: 189
- [12] Betzig E, Chichester R J. *Science*, 1993, 262: 1422
- [13] Betzig E. *Opt. Lett.*, 1995, 20: 237
- [14] Patterson G H, Lippincott-Schwartz J. *Science*, 2002, 297: 1873
- [15] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R *et al.* *Science*, 2006, 313: 1642
- [16] Hess S T, Girirajan T P K, Mason M D. *Biophys. J.*, 2006, 91: 4258
- [17] Rust M J, Bates M, Zhuang X. *Nat. Methods*, 2006, 3: 793
- [18] Hell S W, Stelzer E H K. *Opt. Commun.*, 1992, 93: 277
- [19] Hell S W, Wichman J. *Opt. Lett.*, 1994, 19: 780
- [20] Klar T A, Jakobs S, Dyba M *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97: 8206