
无旁瓣轴向 33分辨率4Pi显微术

作者：writer 来源：科学网

本文原地址：<https://www.iikx.com/news/progress/34978.html>

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

无旁瓣轴向 33分辨率4Pi显微术。 导读

确定性三维物空间超分辨显微术能够在微小体积内实现光与物质的相互作用，但通常其轴向扩展会明显长于横向2-3倍。基于双物镜架构的4Pi显微术可以显著提升轴向分辨率，然而其固有的强干涉旁瓣效应长期制约了技术性能和应用范围，且系统结构复杂、稳定性较差。

近日，华南师范大学詹求强教授团队利用超高阶非线性荧光与双焦干涉场调制，在单物镜、单光束（180 μ W, 852-nm-CW）显微系统中实现了轴向分辨率仅 $\lambda/33$ （26 nm），横向分辨率仅 48 nm的远场三维聚焦与成像。该工作首次在物空间中彻底解决了4Pi显微术中高强度旁瓣的原理性难题，标志着确定性三维超分辨显微术的重要进展。研究成果以Sidelobe-free deterministic 3D nanoscopy with $\lambda/33$ axial resolution为题发表于国际顶尖光学期刊《Light: Science Applications》。博士生潘彬雄、特聘副研究员王保举为共同第一作者，詹求强教授为通讯作者。

研究背景

三维极窄空间内的光与物质相互作用研究，对突破衍射极限的成像、传感、光刻等前沿技术发展具有重要意义。受制于显微物镜有限的孔径角，传统远场三维聚焦方法的轴向分辨率通常较横向差2-3倍。4Pi显微术通过相干地叠加两个对置物镜的球面波，可将轴向分辨率提升3-7倍。然而，4Pi及其衍生超分辨技术（如isoSTED）依赖于双物镜架构和多光束的精密耦合，系统复杂且稳定性较差。值得指出，干涉特性引发的高强度旁瓣将扩大光与物质的作用范围。在成像应用中，反卷积算法可一定程度上抑制4Pi成像中的旁瓣伪影，但对于其他应用，无法消除真实物理空间中的旁瓣影响。因此，如何实现无旁瓣的三维空间紧聚焦是当前光学超分辨领域亟待解决的重要难题。

研究亮点

4Pi显微术能够大幅压缩物镜聚焦光斑的轴向尺寸，然而其干涉特性会导致发光中心的上下两侧产生高强度的干涉旁瓣（旁瓣强度为发光中心强度的48%，图1a）。理论计算表明，多光子激发效应可以有效抑制4Pi干涉旁瓣，当非线性（N）达到10阶时，高强度旁瓣将被完全消除（图1b）。为此，研究团队利用超高阶非线性激发（UNEx）的光子雪崩荧光（N>30），无需借助反卷积算法，首次在真实的物理空间中实现了无旁瓣的4Pi聚焦（图1c）。同时，高阶非线性效应还能在三维空间大幅压缩光斑作用尺度，轻松实现三维超分辨突破（图1d）。

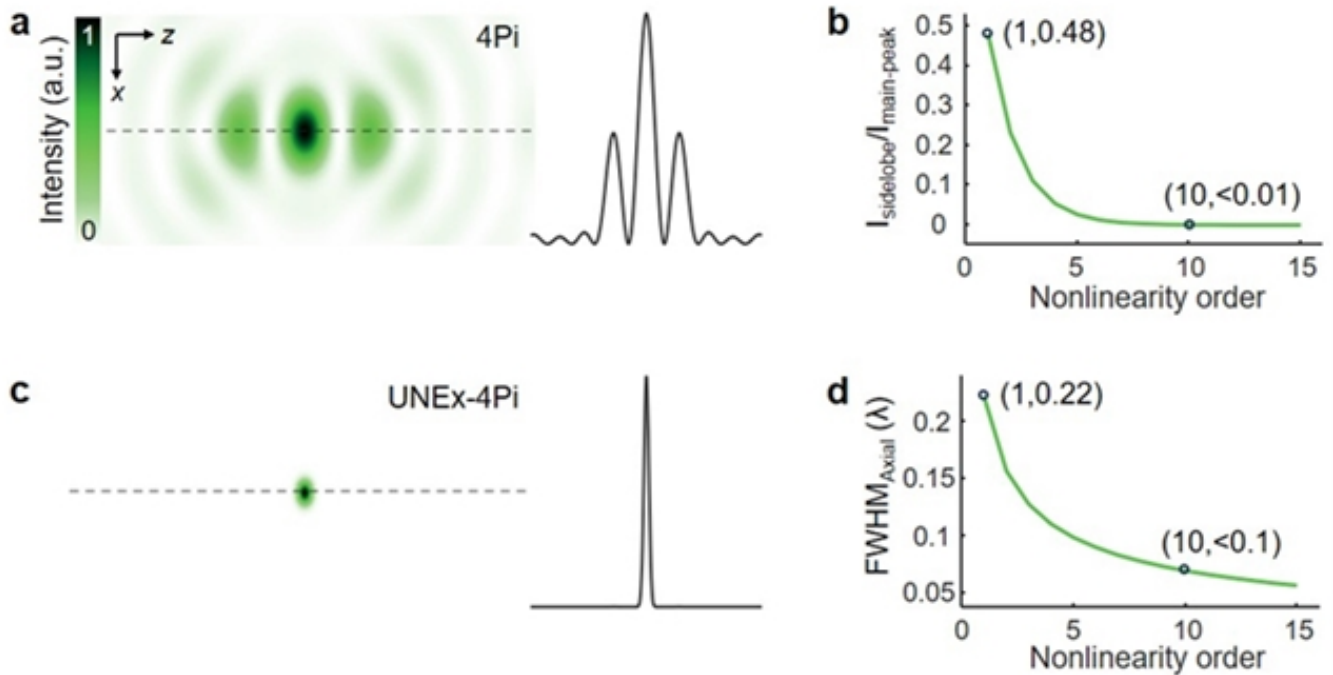


图1. (a) 4Pi点扩散函数；(b) 旁瓣强度与非线性的依赖关系；(c) UNEx-4Pi点扩散函数；(d) 轴向分辨率与非线性的依赖关系。

此外，针对传统双物镜4Pi架构系统复杂、稳定性差的问题，研究团队巧妙地利用反射镜替代其中一个物镜，并通过矢量光场调制沿光轴生成两个分离的焦点，经镜面反射后实现单物镜的4Pi干涉照明（图2a）。同时，实现4Pi干涉的关键在于确保两个激发焦点沿光轴的精确对准，即使是微小的对准偏差或机械抖动（100 nm），都会加剧干涉旁瓣的强度（图2b）。在当前UNEx-4Pi工作中，得益于超高阶非线性效应，该方法能够容许误差高达一个波长范围（850 nm）内，能始终保持紧凑且无旁瓣的4Pi聚焦（图2c）。

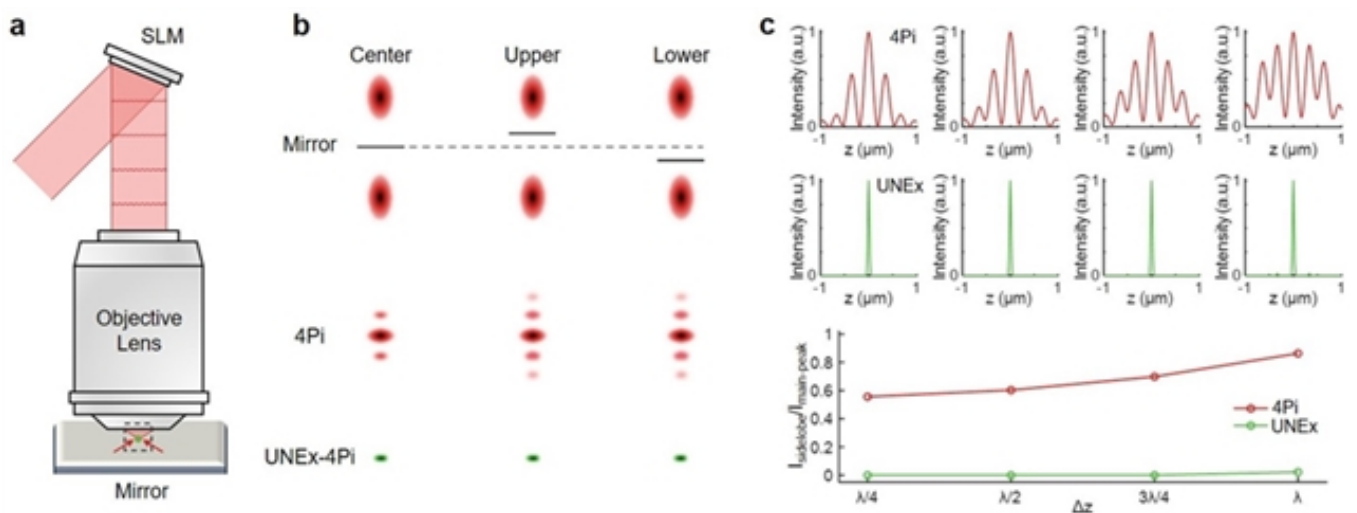


图2. (a) 单物镜4Pi干涉装置；(b) 双焦对准偏差对4Pi及UNEx-4Pi点扩散函数的影响；(c) 双焦对准偏差导致的旁瓣强度分析。

单荧光颗粒成像结果表明，UNEx-4Pi方法能在简易的单物镜、单光束系统中实现横向48 nm以及轴向26 nm ($\lambda/33$)的极限远场聚焦，有效发光体积较共聚焦缩小超过1500倍（图3）。此外，研究团队还演示了UNEx-4Pi方法的生物成像应用，成功分辨出轴向间隔为32 nm的亚细胞结构（图4）。

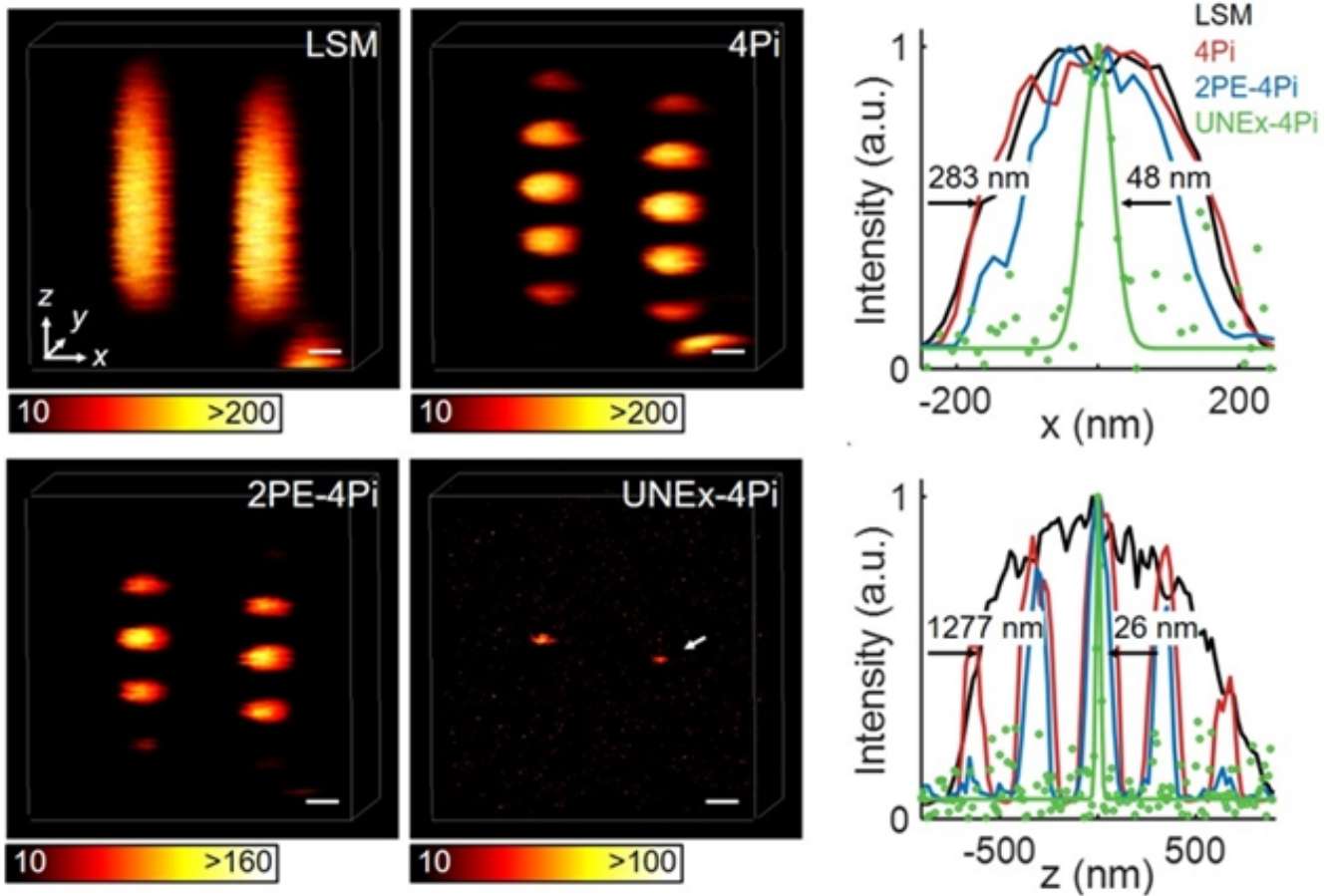


图3. 激光扫描显微镜（LSM）、4Pi、双光子4Pi（2PE-4Pi）和UNEx-4Pi模式下的单纳米颗粒成像及分辨率对比。

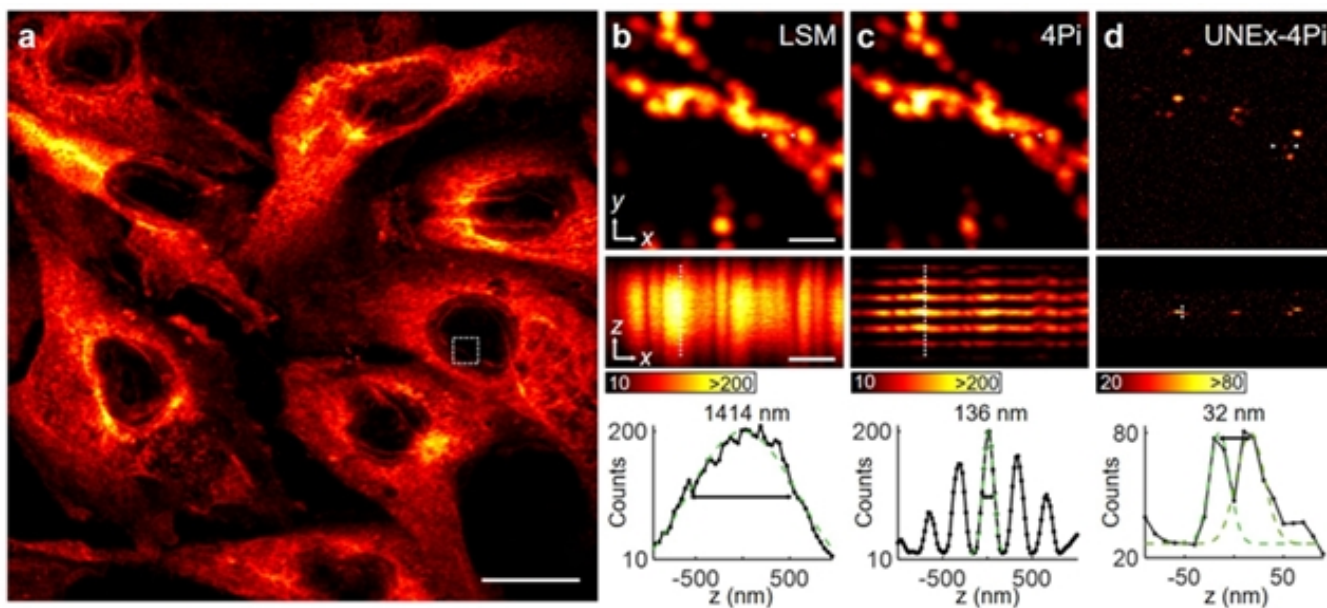


图4. (a) 无光漂白的固定细胞成像；(b) 核膜结构在不同显微方法（LSM、4Pi、UNEx-4Pi）下的成像结果及分辨率对比。

前景展望

UNEx-4Pi三维超分辨方法仅需单个物镜和单束180 μ W连续光即可实现，具有系统简单、低成本、高鲁棒性等优势，且能够完美兼容商业化的激光点扫描显微镜系统。同时，光子雪崩荧光技术所独有的高阶非线性、低功率近红外激发和抗光漂白特性，非常适合长时程、低光毒性的超分辨生物观测。此外，UNEx-4Pi超分辨技术不仅仅局限于成像领域，凭借其独特的真实物理空间超高分辨率紧聚焦特性，还可应用于低能耗低成本的超分辨光学传感、激光光刻和光存储等前沿信息技术领域。（来源：LightScienceApplications微信公众号）

相关论文信息：<https://doi.org/10.1038/s41377-025-01833-x>

特别声明：本文转载仅仅是出于传播信息的需要，并不意味着代表本网站观点或证实其内容的真实性；如其他媒体、网站或个人从本网站转载使用，须保留本网站注明的“来源”，并自负版权等法律责任；作者如果不希望被转载或者联系转载稿费事宜，请与我们联系。

作者：詹求强等 来源：《光：科学与应用》

更多科学进展 请访问 <https://www.iikx.com/news/progress/>

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，[爱科学iikx.com](https://www.iikx.com)转发