



基于时间门技术的纳米显微镜原理及应用

侯尚国, 王坤, 王丽华, 黄庆, 邓素辉*

中国科学院上海应用物理研究所物理生物研究室, 上海 201800

*通讯作者, E-mail: dengsuhui@sinap.ac.cn

收稿日期: 2015-03-17; 接受日期: 2015-04-23; 网络版发表日期: 2015-06-02

doi: 10.1360/N032015-00037

摘要 很久以来, 光学显微镜的分辨率受限于光学衍射极限. 最近几年, 发展了很多突破光学衍射极限的技术方法. 其中, 受激发射损耗(stimulated emission depletion, STED)显微镜因能够提供超快超高的分辨率而备受关注. 在这类方法中, 脉冲式 STED 分辨率较高但搭建复杂; 连续光 STED 虽然搭建简单, 但分辨率有所下降; 时间门调制 STED (gated-STED, gSTED)在简化 STED 搭建的同时, 又可以实现与脉冲式 STED 相比拟的分辨率. 本文详细介绍了时间门在 STED 纳米显微镜中的应用.

关键词

超分辨成像

时间门

纳米显微镜

受激发射损耗显微镜

1 引言

光学显微镜可以对生物样品进行无损的实时观测成像. 自 1665 年列文虎克第一次使用光学显微镜观测细胞以来, 光学显微镜就成了生物学家不可或缺的工具, 其也伴随着生命科学的进步而有了巨大发展^[1]. 尽管在技术上可以做出无限放大倍数的透镜组, 但是显微镜的空间分辨率却不能进行无限提高. 如何提升显微镜的空间分辨率也是一个备受关注的问题. 1873 年蔡司公司的科学家 Abbe 提出, 远场光学显微镜的空间分辨率是有极限的; 远场显微镜不能区分出两个相距小于 $d=\lambda/(2n\sin\alpha)$ 的目标点^[2]. 其中 λ 是所使用的照射光的波长, $n\sin\alpha$ 为显微镜物镜的数值孔径, n 为介质的折射率, α 为孔径角. 通过 Abbe 的理论可以得出, 使用的照射光波越小, 显微镜的分辨率越高. Abbe 分辨率极限的存在也限制着生物学的进一步研究.

直到 20 世纪 90 年代, 来自德国马克斯·普朗克生物物理化学研究所的 Stefan Hell 发明了一系列的光学显微技术克服了这个难题^[3-6]. 紧接着其他课题组也分别独自发明了各种突破光学衍射极限的显微

技术^[7-14]. 这些技术被称为“超分辨显微术”或者“纳米显微术”. 总的来讲, 超分辨显微术的实现方式为避免在一个衍射光斑内同时激发所有荧光分子. 目前主要有两类手段来实现这种控制; 随机开关法和顺序开关法^[15]. 这些超分辨技术的提出为生物学家们的研究提供了有力的工具^[16-19].

尽管在一个衍射光斑的大小内不能够同时分辨出两个荧光分子, 但是 Abbe 衍射极限并不妨碍在衍射光斑内只有一个荧光分子的情况下对单个荧光分子进行定位(精度可以达到 1 nm)^[20,21]. 因此, 随机开关法是指让成像范围内的荧光分子随机的处于亮态和暗态, 通过控制外界条件保证在每个衍射光斑大小内只有单个荧光分子处于亮态. 再对每个处于亮态的荧光分子进行单分子定位. 成像过程包含一系列的周期, 在每个周期里让只有一小部分的荧光分子处于亮态, 使得这部分荧光分子能够与其他荧光分子区分出来并被精确地定位. 重复这些周期使得所有的荧光分子都被定位, 然后叠加这些定位后的点并进行拟合即可重建出一幅超分辨图像. 这样经过一段时间之后, 所有的荧光分子都被定位, 然后重建出超分辨图像. 其典型代表有光活化定位显微术

(photoactivated localization microscopy, PALM)和随机光学重建显微术(stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)^[7,8].

顺序开关法是指让激发光顺序扫描过样品, 每步扫描只让少数荧光分子处于荧光态“亮态”, 而其他荧光分子处于非荧光态“暗态”. 最后读出的荧光信号组成一幅超分辨图像. 其典型代表为受激损耗显微术(stimulated emission depletion, STED)^[5]. STED 使用两束激光照射样品, 一束光为短波长高斯形激发光, 另一束为长波长环形损耗光. 当荧光分子被激发光激发到激发态之后, 受到损耗光的照射会发生受激发射而不再发射荧光, 所以处于“暗态”. 荧光发射(即“亮态”)由于环形损耗光的存在被压缩到了环形光中心的区域. 依次顺序扫描整个样品, 组合每步扫描的结果就得到了超分辨图像. 相比于单分子定位显微镜, STED 技术能够实现超快(28 帧/秒)和超高的分辨能力(30 nm)而备受关注. 目前的 STED 技术, 按照照明光源的不同可分为两类: 脉冲 STED 和连续光 STED.

2 时间门 STED

尽管 Stefan Hell 在 1994 年就提出了 STED 的理论, 但直到 2000 年第一台脉冲式 STED 才被搭建成功, 这里使用的激发光和损耗光都是脉冲激光^[3]. 2007 年 Hell 等^[22]使用连续波激发光和损耗光建立起连续波 STED, 使得 STED 的搭建大大简化. 尽管脉冲式 STED 显微镜在时间和空间分辨率上均能取得不错的效果, 但是其昂贵的造价以及搭建的复杂性难以被生物学家所接受. 而连续波 STED 虽然搭建相对比较简单(不需要对脉冲时间进行同步), 但是它的分辨率相对于脉冲式 STED 下降了很多^[22,23]. 例如, 对于荧光小球进行成像, 脉冲式 STED 的有效分辨率可以达到 22 nm, 连续波 STED 只能达到 29 nm^[22,24].

连续波 STED 的分辨率主要是受损耗光峰值强度的影响^[25]. 在脉冲式 STED 中, 所有的损耗脉冲光能量瞬时作用在受激发后的荧光基团上, 而在连续波 STED 中损耗光的能量是平均分配在整个成像时间里. 所以在总功率相同的情况下, 连续波 STED 作用在激发态上的损耗光要比脉冲式 STED 的小, 从而降低了分辨率. 当损耗光的能量不够时, 被损耗的激

发态荧光基团仍然会发射荧光, 影响到损耗光的空间调制能力^[26]. 换句话讲, 通过受激发射来抑制荧光发射主要取决于作用在激发态荧光基团上的损耗光光子数目, 即损耗光光强. 所使用的损耗光光强越大, 损耗光对荧光的抑制能力越强(图 1(a)), 所得到的成像分辨率越高(图 1(b)). 此处用半高全宽(full width at half maximum, FWHM)来表征分辨率.

因此, 为了改善连续光 STED 的分辨率, 提出了基于时间门的 STED (gated-STED, gSTED)技术^[26-30]. 时间门经常被用于减少背景荧光的收集以提高成像对比度^[31], 在这里被用于提升连续波 STED 的分辨率. gSTED 使用一个脉冲式激光作为激发光源, 连续波作为损耗光光源, 在检测荧光时采取了时间门控制检测. 这种时间门检测方案无需对两束光束的时间进行同步调节, 同时又可以达到脉冲式 STED 的分辨能力.

在 STED 上可以通过时间门来提升分辨率, 是因

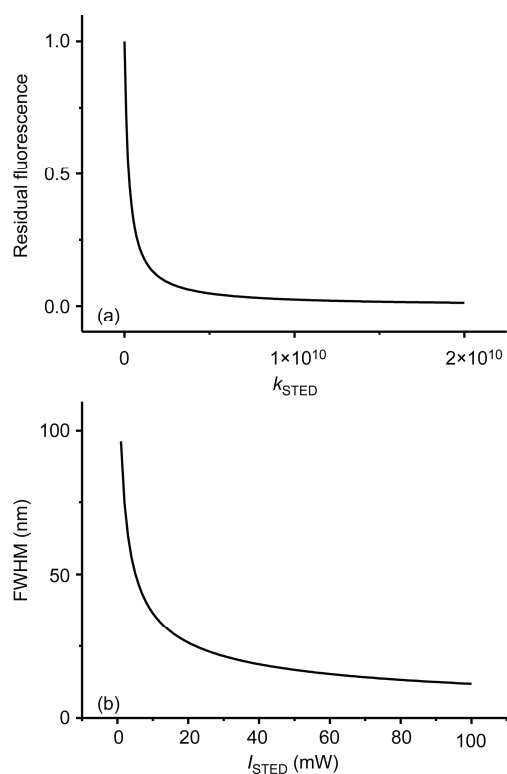


图 1 STED 损耗光对荧光发射的抑制(a)以及对 STED 分辨率(b)的影响. (a) k_{STED} 为受激发射速率, $k_{\text{STED}} = \sigma_{\text{STED}} I_{\text{STED}}$, σ_{STED} 为损耗光吸收截面, I_{STED} 为损耗光强度; (b) FWHM 表示对应损耗光光强下 STED 的分辨率. 在模拟计算中取 $\sigma_{\text{STED}} = 3 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$; STED 损耗光波长为 592 nm.

为 STED 的损耗光的叠加能够改变激发态荧光的寿命. 荧光分子的荧光寿命是指电子在回到基态之前处于激发态的平均时间. 处于激发态的分子以指数形式衰减, 这个衰减所需的时间即为荧光寿命:

$$\tau = \frac{1}{k} \quad (\text{其中 } k \text{ 为荧光自发发射速率}).$$

激发态的荧光分子受到损耗光照射后, 荧光寿命缩减至 $\frac{1}{k + k_{\text{STED}}}$,

可以看出, 荧光寿命与损耗光强之间存在负相关关系. 在环形光中心部分损耗光强最小, 因而此处的荧光分子的激发态荧光寿命也最大. 环形部分的损耗光强较大, 此处的激发态荧光寿命比较小(图 2(a)). 在激发脉冲后 t_g 时间进行荧光检测, 则将荧光寿命小的荧光去除掉, 将荧光检测进一步限制在环形光中心荧光寿命大的部分, 减小了有效荧光发射范围. 在进行时间门检测时需要知道荧光基团在普通激发下的荧光寿命以确定合适的 t_g . 理论上讲, t_g 越大, 分辨率越高, 然而因为噪声的存在必须寻找到一个合适的 t_g . 若 t_g 太大, 检测到的荧光信号会过弱从而影响信噪比; 若 t_g 太小, 则对分辨率的提升又不太明显. 最终的 gSTED 成像分辨率取决于所使用的损耗光强以及设定的门限时间 t_g (图 2(b, c)). 而在实际实验中, 可以通过在检测器上添加电子门^[27]或者通过时间相关单光子计数(TCSPC)来实现时间门控制^[32].

3 gSTED 理论

下文详细分析时间门在 STED 中的作用. 为了便于分析, 假设: (1) 荧光基团的电子能级为简单的二能级系统, 包含一个基态(S_0)和一个初级激发态(S_1). 忽略三重态和振动能级; (2) 忽略由损耗光激发荧光分子部分; (3) 荧光基团的初始态设为 S_1 且在位置 r 处有 n_0 个激发态的荧光基团; (4) 激发脉冲间隔时间远大于荧光基团的激发态寿命 τ , 即在下一个脉冲到来之前所有的荧光基团已经到达基态, 这是为了保证每个激发周期的初始态相同; (5) 自发辐射 S_1-S_0 速率为 $k=1/\tau$, 量子产率为 1; (6) 受激发射速率为 $k_{\text{STED}}=\sigma_{\text{STED}}I_{\text{STED}}$, σ_{STED} 为损耗光吸收截面; (7) 忽略 STED 损耗光束的噪声.

此时, 激发态荧光基团数目随着时间变化为:

$$\frac{dn(r, t)}{dt} = -kn(r, t) - \sigma I(r)n(r, t) \quad (1)$$

其中 $kn(r, t)$ 是通过自发辐射衰减数目, $\sigma I(r)n(r, t)$ 是通过受激发射衰减数目, $I(r)$ 是 STED 损耗光强. 自发辐射通道 N_F 和受激发射通道 N_S 可以表示为:

$$\frac{dN_F(r, t)}{dt} = kn(r, t) \quad (2)$$

$$\frac{dn(r, t)}{dt} = \sigma I(r)n(r, t) \quad (3)$$

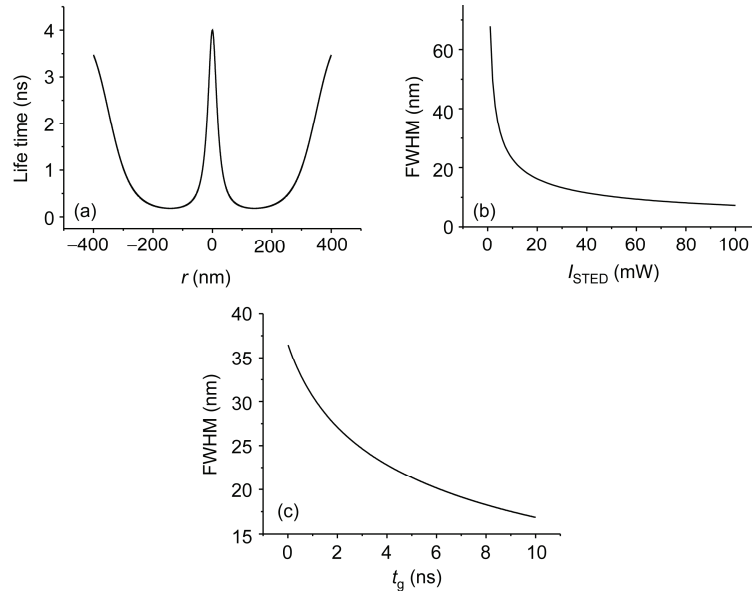


图 2 (a) 环形损耗光作用下激发态荧光分子的寿命分布一维轮廓(使用的荧光分子为 Atto488, 其荧光寿命约为 4 ns); (b) gSTED 分辨率与 STED 的激光功率关系曲线; (c) gSTED 分辨率与门限时间的关系曲线

以上方程可以通过直接积分解出, 得到激发态荧光基团数目随着时间变化的关系式:

$$n(r, t) = n_0 e^{-(k+\sigma I(r))t} \quad (4)$$

以及分别在两个通道内衰减的光子总数:

$$N_F(r, t) = n_0 \frac{k}{k + \sigma I(r)} (1 - e^{-(k+\sigma I(r))t}) \quad (5)$$

$$N_S(r, t) = n_0 \frac{\sigma I(r)}{k + \sigma I(r)} (1 - e^{-(k+\sigma I(r))t}) \quad (6)$$

通过无限时间积分可以得到两个通道的光子占总光子数的比例:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \frac{N_F(r, t)}{n_0} \equiv \eta_{\text{STED}}(r) = \frac{k}{k + \sigma I(r)} \quad (7)$$

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \frac{N_S(r, t)}{n_0} = \frac{\sigma I(r)}{k + \sigma I(r)} \quad (8)$$

其中 $\eta_{\text{STED}}(r)$ 为 STED 损耗因子, 表示 STED 损耗光对荧光的抑制程度.

荧光通道光子总数为:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} N_F(r, t) = n_0 \frac{k}{k + \sigma I(r)} \quad (9)$$

式(9)体现了 CW-STED 的空间分辨率对 STED 损耗光强度的依赖性.

激发完成后 t_g 时间再收集荧光, 则所收集到的荧光通道光子总数为:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} N_F(r, t) = n_0 \frac{k}{k + \sigma I(r)} e^{-t_g(k+\sigma I(r))} \quad (10)$$

STED 损耗因子 $\eta_{\text{STED}}(r)$ 可以表示为:

$$\eta_{\text{gSTED}}(r, t_g) = \frac{k}{k + \sigma I(r)} e^{-t_g(k+\sigma I(r))} \quad (11)$$

由上式可以看出, gSTED 的最终分辨率由两个因素决定, 即 STED 损耗光的空间分布(r)以及门限时间 t_g . 如图 2(b, c)所示, 随着损耗光功率或门限时间的增加, gSTED 的分辨率也在不断提升. 由公式(11)可以看出, 信号强度与门限时间的关系为 $e^{-t_g k}$, 即信号强度随着门限时间的增加呈指数衰减趋势.

图 3(a)描述了引入环形 STED 损耗光后荧光发射的概率分布. 在损耗光强最大的地方(红色圆圈)荧光发射降低了 68%, 但残留的 32% 荧光仍然会使得最终的分辨率变差. 图 3(b)展示了如何使用时间信息来提升分辨率. 在经过半个荧光寿命(对于 Atto488, 时间为 2 ns)的时间之后, 环形光中心位置(黑色圆圈)的

那部分荧光分子只发射了 39% 的光子(黑色点线), 而在损耗光强最大的位置荧光分子(红色圆圈)已经发射了 78% (红色实线). 而经过一个荧光寿命的时间之后, 在损耗光强最大的位置荧光分子几乎已经发射出所有的光子, 而在中心位置还有 37% 没有发射. 这种时间上的差异即可被用来提升 STED 的分辨率.

我们将数值模拟时间用于 STED 后, 相对于激光共聚焦显微镜的分辨率改善. 假设使用的是拉盖尔-高斯函数和高斯函数来描述 STED 损耗光束和激发光束.

$$I(r) = \frac{4P}{\pi\omega^4} r^2 e^{-\frac{2r^2}{\omega^2}} \quad (12)$$

其中 P 为控制损耗光功率, ω 为控制损耗光分布.

$$\text{PSF}_{\text{Confocal}}(r) \sim e^{-\frac{4r^2}{\omega^2}} \quad (13)$$

$$\text{PSF}_{\text{gSTED}}(r) \sim e^{-\frac{4r^2}{\omega^2}} \frac{k}{k + \sigma I(r)} e^{-t_g(k+\sigma I(r))} \quad (14)$$

对比激光共聚焦显微镜、STED 和 gSTED 的分辨率(图 4(a)), 可以看出, gSTED 相对 STED 分辨率的提升是以牺牲信号强度为代价的. 由式(14)可以看出, 信号强度与门限时间的关系为 $e^{-t_g k}$, 即信号强度随着门限时间的增加呈指数衰减. gSTED 的分辨率(FWHM)相比于激光共聚焦显微镜的分辨率的提升倍数如图 4(b, c)所示. 其中图 4(b)为门限时间与提升倍数之间的关系, 而图 4(c)为损耗光强与提升倍数之间的关系. 有意思的是, gSTED 分辨率较 STED 分辨率的提升倍数随着损耗光强的增加, 呈现出一种逐渐饱和的现象(图 4(d)).

4 时间门的应用

在 gSTED 里, 影响分辨率的主要因素是信噪比^[27,28]. 在没有噪声的情况下, 即使在一定的损耗光强下, 也可以通过设置门限时间取得无限高的分辨率. 然而在实际情况中, 噪声的存在往往使得在设置门限时间时到达一定程度后分辨率就不能再提高了.

一种优化信噪比的方案是在显微镜上使用高量子效率和高时间分辨率的光子探测器. 高量子效率的光子探测器意味着更多的荧光信号被检测到, 而高时间分辨率的光子探测器的发生时间抖动的几率

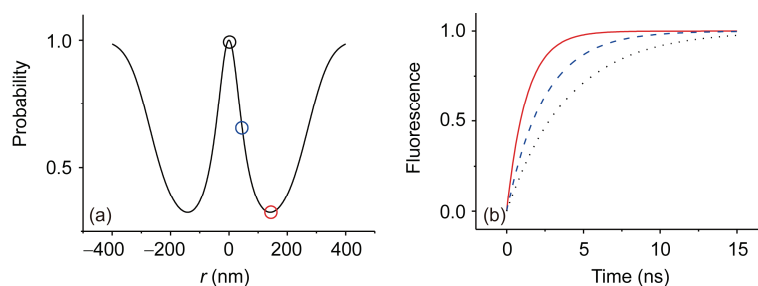


图3 (a) 处于激发态的 Atto488 在环形损耗光作用下的荧光发射几率, 损耗光光强为 1 mW; (b) 不同位置处((a)中圆圈所示)分子的荧光随时间的变化曲线, 荧光值使用总荧光进行归一化

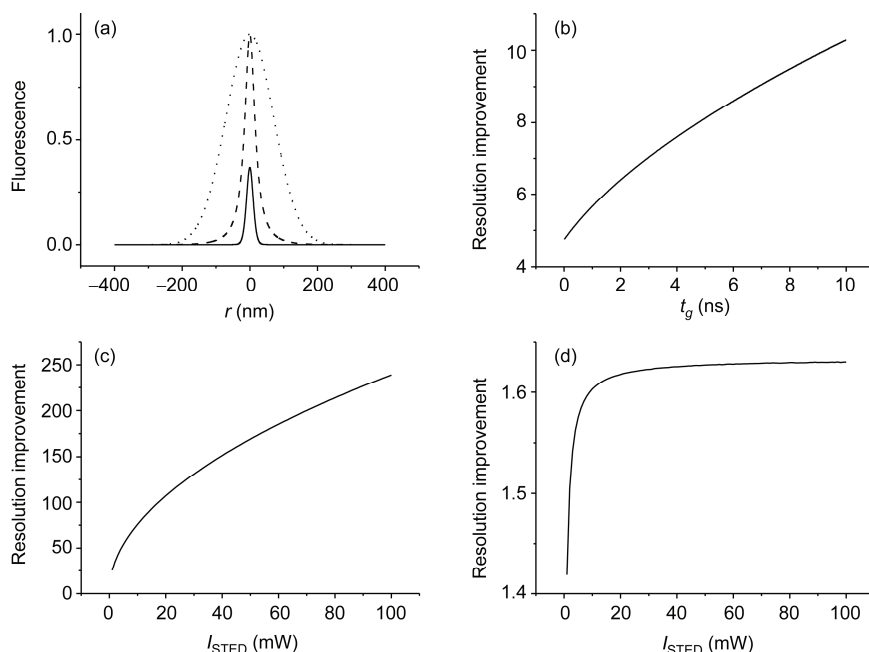


图4 (a) 在激光共聚焦显微镜 (点线)、STED (虚线)与 gSTED(实线)的分辨率和信号强度的对比(横轴表示位置, 纵轴为荧光强度, 可以看出, 虽然 gSTED 在分辨率上有着一定程度的提高, 但是也牺牲了荧光强度); (b, c) gSTED 相比于激光共聚焦显微镜的分辨率提升倍数与门限时间(b)和损耗光功率(c)之间的关系曲线; (d) gSTED 相比于 STED 的分辨率提升倍数与 STED 的损耗光强度之间的关系曲线

更少, 而时间抖动将导致检测到早发射的荧光光子从而降低空间分辨率和图像对比度。

另一种提升信噪比的方法是去除背景噪声。背景噪声的一个来源是由 STED 损耗光激发出样品的荧光。而由 STED 损耗光激发出荧光(反斯托克发射)通常发生在损耗光波长接近于标记荧光的荧光发射波峰时。反斯托克发射主要发生在环形光亮的部分, 这部分光子与样品的荧光一起被收集到了检测器中。若反斯托克发射信号大到能够与环形光中心的荧光信号相比拟时, 就会导致图像的对比度以及分辨率

下降。这种情形在使用大的门限时间 t_g 时尤为常见, 因为增大门限时间会使得正常荧光信号呈指数级下降而反斯托克信号呈线性下降。

将使用的损耗光波长红移会使得反斯托克发射减小, 但这也会使损耗光的损耗效率下降, 从而最终降低图像分辨率。最近, Vicidomini 等^[33,34]提出了一种滤波方法, 可以去除反斯托克发射的光子: 首先使用 gSTED 对样品进行一次正常成像; 然后第二次成像时将激发光强设为 0 而损耗光强不变; 最后通过两者相减的方案将反斯托克发射去掉。图 5 比较了

Confocal、STED、gCW-STED 以及滤波之后的 gCW-STED 成像结果. 可以看出, 使用滤波之后的图像信噪比明显得到改善^[34]. 浙江大学的匡翠方课题组^[32]则采用了另一种相减法. 在成像过程中, 使用由荧光寿命长的光子构成的图像减去荧光寿命短的光子构成的图像, 同样也提升了信噪比和分辨率. 此外, 图像去卷积法也可以用于增加信噪比^[35,36].

5 gSTED 在生物学中的应用

自发明 gSTED 以来, 生物学家已经利用这种技术解决了许多生物学问题. 瑞士苏黎世大学的 Greber 课题组^[37]使用 gSTED 显微镜以单分子级分辨率在宿主细胞内跟踪病毒基因(图 6(a)). 在细胞内进行病毒 DNA 跟踪对于疾病的研究和治疗具有重大的意义, 然而在此之前, 受分辨率和精度限制, 不能对病毒 DNA 进行单分子级别的可视化定量跟踪. 他们借助 gSTED 超分辨显微镜建立起一种无损的病毒 DNA 跟踪检测方法, 使用乙炔基修饰核苷酸, 然后将其标记在腺病毒、疱疹病毒和牛痘病毒的 vDNA 上. 使用 gSTED 在动物细胞内进行超分辨成像. 分析腺病毒的侵染过程显示大量的无壳 vDNA 聚集在胞质溶胶上, 表明进入的 vDNA 的核进入是此侵染过程的瓶颈. 而挪威奥斯陆大学的 Bøe 等^[38]利用

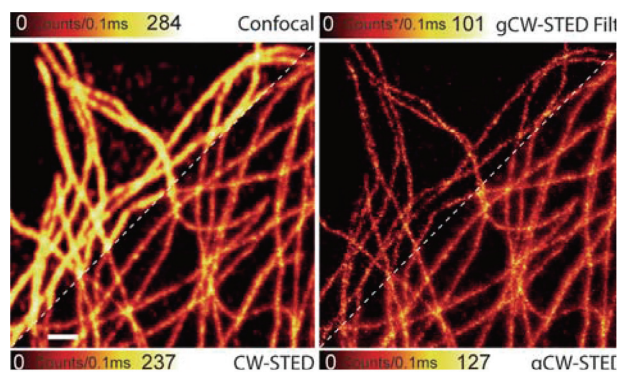


图 5 Confocal、CW-STED//gCW-STED 和滤波之后的 gCW-STED 对标记了 Alexa 488 的 HeLa 细胞微管成像结果比较^[33] (标尺: 1 μ m)

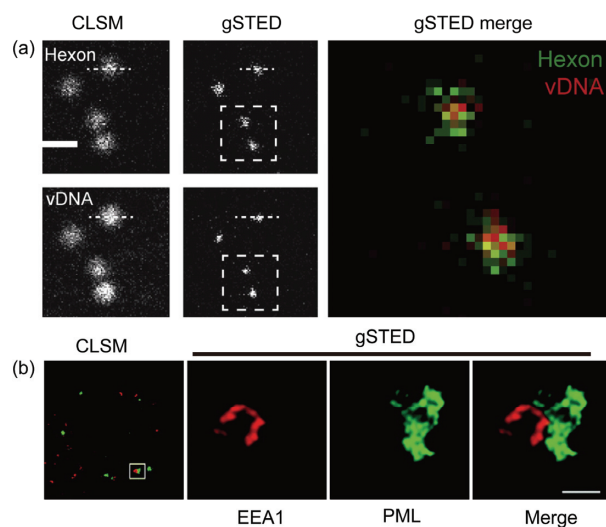


图 6 (a) Abberior STAR 440SX 标记的病毒衣壳(hexon)以及 Alexa Fluor 488 标记的 vDNA 在激光共聚焦显微镜以及 gSTED 显微镜下的成像结果^[37]; (b) 在 gSTED 下观测的有丝分裂期间的 HaCaT 细胞中的 PML 小体与早期内含体(EEA1)结合图像. 其中最左图为激光共聚焦显微镜对整个细胞进行的成像^[38]

gSTED 研究了 PML 小体, 揭示了 PML 小体在进入有丝分裂期后立即与早期内含体进行反应(图 6(b)). 而这两种成分在整个有丝分裂期间稳定地结合在一起, 然后在分裂后的子细胞内解离. 研究揭示了在胞质和细胞核组分之间存在稳定的有丝分裂特异性反应.

6 展望

gSTED 纳米显微镜的高时间分辨和空间分辨率以及其相对简单的搭建要求使得 gSTED 越来越容易被生物学家所青睐. 随着制造工业的发展, 有理由相信 gSTED 在不久的将来会取代激光共聚焦显微镜成为生物实验室常用的成像工具. 另外, gSTED 与其他技术手段的联用也是未来的一个趋势. 我们可以期待 gSTED 与荧光相关谱(FCS)、原子力显微镜(AFM)以及同位素显微镜等技术进行联用, 为生命科学的进步作出越来越大的贡献^[39-42].

致谢 本工作得到国家自然科学基金(61378062)和国家重大科研仪器设备研制专项(21227804)资助, 特此一并致谢.

参考文献

- 1 Roy R. Next-generation optical microscopy. *Curr Sci*, 2013, 105: 1524–1536
- 2 Abbe E. Beiträge zur theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv f mikrosk Anatomie*, 1873, 9: 413–418
- 3 Klar TA, Jakobs S, Dyba M, Egner A, Hell SW. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 8206–8210
- 4 Hell SW, Kroug M. Ground-state-depletion fluorescence microscopy: a concept for breaking the diffraction resolution limit. *Appl Phys B*, 1995, 60: 495–497
- 5 Hell SW, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated-emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett*, 1994, 19: 780–782
- 6 Hell SW, Hofmann M, Eggeling C, Jakobs S. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 17565–17569
- 7 Rust MJ, Bates M, Zhuang XW. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods*, 2006, 3: 793–795
- 8 Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 2006, 313: 1642–1645
- 9 Gustafsson MGL. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc-Oxford*, 2000, 198: 82–87
- 10 Heintzmann R, Jovin TM, Cremer C. Saturated patterned excitation microscopy: a concept for optical resolution improvement. *J Opt Soc Am A*, 2002, 19: 1599–1609
- 11 Schoen I, Ries J, Klotzsch E, Ewers H, Vogel V. Binding-activated localization microscopy of DNA structures. *Nano Lett*, 2011, 11: 4008–4011
- 12 Dertinger T, Colyer R, Iyer G, Weiss S, Enderlein J. Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 22287–22292
- 13 Burnette DT, Sengupta P, Dai Y, Lippincott-Schwartz J, Kachar B. Bleaching/blinking assisted localization microscopy for superresolution imaging using standard fluorescent molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 21081–21086
- 14 Hess ST, Girirajan TPK, Mason MD. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys J*, 2006, 91: 4258–4272
- 15 Hell SW. Far-field optical nanoscopy. *Science*, 2007, 316: 1153–1158
- 16 Gould TJ, Hess ST, Bewersdorf J. Optical nanoscopy: from acquisition to analysis. *Annu Rev Biomed Eng*, 2012, 14: 231–254
- 17 Loew LM, Hell SW. Superresolving dendritic spines. *Biophys J*, 2013, 104: 741–743
- 18 Cognet L, Leduc C, Lounis B. Advances in live-cell single-particle tracking and dynamic super-resolution imaging. *Curr Opin Chem Biol*, 2014, 20: 78–85
- 19 Dani A, Huang B, Bergan J, Dulac C, Zhuang XW. Superresolution imaging of chemical synapses in the brain. *Neuron*, 2010, 68: 843–856
- 20 Qu XH, Wu D, Mets L, Scherer NF. Nanometer-localized multiple single-molecule fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 11298–11303
- 21 Yildiz A, Forkey JN, McKinney SA, Ha T, Goldman YE, Selvin PR. Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science*, 2003, 300: 2061–2065
- 22 Hell SW, Willig KI, Harke B, Medda R. STED microscopy with continuous wave beams. *Nat Methods*, 2007, 4: 915–918
- 23 Leutenegger M, Eggeling C, Hell SW. Analytical description of STED microscopy performance. *Opt Express*, 2010, 18: 26417–26429
- 24 Hell SW, Donnert G, Keller J, Medda R, Andrei MA, Rizzoli SO, Lurmann R, Jahn R, Eggeling C. Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 11440–11445
- 25 Harke B, Keller J, Ullal CK, Westphal V, Schonle A, Hell SW. Resolution scaling in STED microscopy. *Opt Express*, 2008, 16: 4154–4162
- 26 Vicidomini G, Hernández I, Diaspro A, Galiani S, Eggeling C. *The Importance of Photon Arrival Times in STED Microscopy*. Berlin Heidelberg: Springer, 2014
- 27 Hell SW, Vicidomini G, Moneron G, Han KY, Westphal V, Ta H, Reuss M, Engelhardt J, Eggeling C. Sharper low-power STED nanoscopy by time gating. *Nat Methods*, 2011, 8: U571–U575
- 28 Moffitt JR, Osseforth C, Michaelis J. Time-gating improves the spatial resolution of STED microscopy. *Opt Express*, 2011, 19: 4242–4254
- 29 Vicidomini G, Hernandez IC, D'Amora M, Zanicchi FC, Bianchini P, Diaspro A. Gated CW-STED microscopy: a versatile tool for biological nanometer scale investigation. *Methods*, 2014, 66: 124–130

- 30 Vicidomini G, Schonle A, Ta HS, Han KY, Moneron G, Eggeling C, Hell SW. STED nanoscopy with time-gated detection: theoretical and experimental aspects. *PLoS One*, 2013, 8: e54421
- 31 Gordon CL, Yin GY, Lemoff BE, Bell PM, Barty CPJ. Time-gated imaging with an ultrashort-pulse, laser-produced-plasma X-ray source. *Opt Lett*, 1995, 20: 1056–1058
- 32 Hao X, Kuang C, Gu Z, Li S, Ge J, Liu X. Optical super-resolution by subtraction of time-gated images. *Opt Lett*, 2013, 38: 1001–1003
- 33 Coto Hernández I, Peres C, Cella Zanacchi F, D'Amora M, Christodoulou S, Bianchini P, Diaspro A, Vicidomini G. A new filtering technique for removing anti-Stokes emission background in gated CW-STED microscopy. *J Biophoton*, 2014, 7: 376–380
- 34 Vicidomini G, Moneron G, Eggeling C, Rittweger E, Hell SW. STED with wavelengths closer to the emission maximum. *Opt Express*, 2012, 20: 5225–5236
- 35 Zanello R, Zanghirati G, Cavicchioli R, Zanni L, Boccacci P, Bertero M, Vicidomini G. Towards real-time image deconvolution: application to confocal and STED microscopy. *Sci Rep*, 2013, 3: 2523
- 36 Schoonderwoert V, Dijkstra R, Luckinavicius G, Kobler O, van der Voort H. Huygens STED deconvolution increases signal-to-noise and image resolution towards 22 nm. *Microsc Today*, 2013, 21: 38–44
- 37 Wang IH, Suomalainen M, Andriasyan V, Kilcher S, Mercer J, Neef A, Luedtke Nathan W, Greber UF. Tracking viral genomes in host cells at single-molecule resolution. *Cell Host Microbe*, 2013, 14: 468–480
- 38 Palibrk V, Lång E, Lång A, Schink KO, Rowe AD, Bøe SO. Promyelocytic leukemia bodies tether to early endosomes during mitosis. *Cell Cycle*, 2014, 13: 1749–1755
- 39 Honigsmann A, Mueller V, Ta H, Schoenle A, Sezgin E, Hell SW, Eggeling C. Scanning STED-FCS reveals spatiotemporal heterogeneity of lipid interaction in the plasma membrane of living cells. *Nat Commun*, 2014, 5: 5412
- 40 Harke B, Chacko J, Haschke H, Canale C, Diaspro A. A novel nanoscopic tool by combining AFM with STED microscopy. *Opt Nano*, 2012, 1: 1–6
- 41 Saka SK, Vogts A, Kröhnert K, Hillion F, Rizzoli SO, Wessels JT. Correlated optical and isotopic nanoscopy. *Nat Commun*, 2014, 5: 3664
- 42 Leutenegger M, Ringemann C, Lasser T, Hell SW, Eggeling C. Fluorescence correlation spectroscopy with a total internal reflection fluorescence STED microscope (TIRF-STED-FCS). *Opt Express*, 2012, 20: 5243–5263

The principle and the application of time gating in nanoscopy

Shangguo Hou, Kun Wang, Lihua Wang, Qing Huang, Suhui Deng*

Division of Physical Biology, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

*Corresponding author (email: densuhui@sinap.ac.cn)

Abstract: For a long time, the resolution of optical microscopy has been limited by diffraction. In recent years, many methods have been developed to break the diffraction barrier. Among them, stimulated emission depletion (STED) microscopy becomes very popular for being able to provide high speed and high resolution imaging. The pulsed STED can provide higher resolution but its construction is rather complex. STED with continuous wave can be built easier but its resolution is deteriorated. Applying time gating in the STED with continuous wave (gSTED) can further improve the resolution. In this paper, we discussed the principle and the application of time-gating in STED.

Keywords: superresolution imaging, time gating, nanoscopy, stimulated emission depletion (STED) microscopy