



相干拉曼散射显微术

陈涛^{①②}, 虞之龙^{①②}, 张先念^{①②}, 谢晓亮^{①③}, 黄岩谊^{①②*}

① 北京大学生物动态光学成像中心, 北京 100871

② 北京大学工学院, 北京 100871

③ Department of Chemistry and Chemical Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

*通讯作者, E-mail: yanyi@pku.edu.cn

收稿日期: 2011-09-19; 接受日期: 2011-10-06; 网络版发布日期: 2011-11-25

doi: 10.1360/032011-609

摘要 相干拉曼散射显微术(Coherent Raman Scattering Microscopy)是一类植根于拉曼散射的光学显微成像方法, 主要包含相干反斯托克斯拉曼散射(Coherent Anti-Stokes Raman Scattering, CARS)和受激拉曼散射(Stimulated Raman Scattering, SRS)两种方法. CARS/SRS 显微术通过探测目标分子特定的振动来提供成像所需的衬度, 通过非线性光学过程大大提高了检测的灵敏度, 同时本征地具备三维成像能力. CARS 和 SRS 显微术可以对脂类等不易被标记的物质成像, 还可以很好地通过选择振动光谱, 对生物体内特定小分子物质如药物等, 以及生物大分子如核酸、蛋白质等进行无需标记的成像, 因此成为极有潜力的活体(*in vivo*)成像手段. 本文主要介绍了 CARS 和 SRS 显微术的基本原理、实验操作及其在化学和生命科学中的应用.

关键词

光学显微术
相干拉曼散射
反斯托克斯拉曼散射
受激拉曼散射
无标记成像

1 引言

光学显微镜通过光学系统放大微小物体的影像, 使之能够被肉眼观察. 它的发明为人们观察微米及亚微米尺度的事物提供了有力的工具, 使得人类对微观世界的认识有了巨大的提升. Anton van Leeuwenhoek 被认为是显微学之父, 早在 1674 年, 他就用自制的显微镜观察到了微生物; 英国科学家 Robert Hooke 也常被认为是显微学的鼻祖, 他观察到了死亡植物细胞留下的细胞壁. 最常见的显微观察操作, 是通过透射光照明来进行“明场”观察, 即利用样品对光吸收能力的不同来产生成像的衬度. Leeuwenhoek 和 Hooke 所自制的显微镜, 以及早期的其他光学显微镜, 都是利用这样的方法来观察的. 为了区分许多样本的精细结构, 人们还发展了许多染色剂, 以提高衬度便于观察.

然而透射光在观察透明样品时则遇到了困难, 因为难以仅仅通过光的吸收在这些样品中获得良好的图像衬度. Frits Zernike 于 1930 年代发明的相差显微术, 漂亮地解决了这类样本的观察难题, 极大地促进了生命科学的发展, 他本人也因此获得 1953 年的诺贝尔物理学奖. 这一技术的基本考虑在于透明样本的折射率分布会改变透射光波前的相位分布. 这样, 当通过样品的透射光与另一束参考光干涉时, 相位的差异可以转化为振幅的变化, 得到的图像就能反映透明样本的结构信息, 即由相位差提供了衬度. 相差显微术的发明是非标记显微术的重大突破, 这种方法避免了细胞染色过程中许多破坏性步骤, 可以用于无损地观察活细胞的动态过程. 在此基础上, Nomarski 发明的微分干涉显微术, 大大增强了透明物体的立体感, 方便了生命科学的研究和镜下操纵. 相差显微术和微分干涉显微术在现代生命科学研究

中已经成为最常用的非标记光学显微方法。

在生命科学研究中,对各种生化成分进行特异性的成像是了解生命活动细节的关键。要通过显微成像实现这一点,仅靠折射率来产生对比度是远远不够的。荧光显微术通过荧光发色团提供了化学衬度。利用荧光基团来特异性地标记化学物质,通过荧光信号在样本内的分布,就能获得目标化学物质的分布情况。因此,荧光显微术比简单的透射照明显微方法更适合生命科学和物质科学中复杂体系的观察。

共聚焦技术能够提供接近光学衍射极限的横向分辨率,同时依赖放置在激发光和样品各自焦面处的共轭光阑,还提供了三维成像能力。激光扫描共聚焦显微镜达到了光学显微术的一个顶峰,已经逐渐成为生命科学中的常规成像技术。进一步发展的多光子荧光显微术则利用多个低能量的光子(通常是双光子)来实现荧光发色团的激发。作为非线性光学过程,多光子激发只在物镜焦点处实现,大大减少了图像中的背景噪声,提高了图像的信噪比。同时,由于激发光的波长通常都位于红外区,相对于传统的共聚焦显微镜能够在样品中获得更大的穿透深度,有利于深层组织样本的激发。

在观察生物样本时,激光扫描共聚焦显微术和多光子显微术都需要挑选具备合适发色团的样本,或者对样本进行染色处理以提高成像的特异性和衬度。荧光染料和传统的染料一样,都必须具有针对一类或者某种化学物质的特异结合能力,从而使之在

检测时从背景中凸显出来。荧光标记方法由于技术的发展和成熟,以及很好的化学特异性,已经成为最主要的标记手段。荧光标记包括荧光染料、荧光探针和荧光蛋白等方法,但无论是哪种标记方法,都存在一定的局限性。首先,许多标记手段需要杀死细胞,而许多活细胞染色方法也常常不可避免地对所研究体系造成影响,标记分子的引入对细胞的正常生理过程可能不利;其次,由于荧光的产生要通过电子能级间的跃迁,样本容易受到激发光的损伤,另外荧光基团还存在光漂白的问题,这些都影响了长时间的观察;最后,许多重要的物质如细胞内的小分子和脂类等很难或者无法被荧光标记。

基于以上这些局限性,我们亟需摆脱荧光方法的束缚,发展一种具有良好特异性和灵敏度,而又无须标记(Label Free)的新型显微技术。可以利用的方法,除了上面提到的相差技术外,还包括吸收谱、多光子吸收、受激辐射以及拉曼散射。由于吸收信号存在于高背景中,所以利用吸收光谱来成像时不容易获得良好的衬度。相比之下,受激辐射和拉曼散射比较容易产生特异性的衬度,用于生物成像很有潜力。尤其是拉曼散射,探测的是光和物质非弹性散射后发生的频率移动,具有很好的化学特异性,非常适合化学和生物体系的成像需求。各个成像方式的特点比较见表 1。我们将在本文中着重阐述相干拉曼散射及其成像应用。

表 1 各种显微成像术的比较

方法	照明方式	衬度来源	优点	缺点
染料染色	宽场白光	吸收	简便,能够分辨细胞器	样品制备需要杀死细胞,很难分辨化学组成
相差	宽场相干光	偏振光干涉	能够看到透明样品	能够区分的物质非常有限
荧光染料	单色光	荧光	优秀的化学衬度	引入不便,对细胞伤害大,有时需要杀死细胞
荧光探针	单色光	荧光	标记分子小,对生物组织影响小	背景高
荧光蛋白	单色光	荧光	与生物样品亲和性高	信号强度低
吸收	白光	吸收率的分布	样品制备简单	光损伤大
多光子吸收	单色脉冲光	多光子吸收率的分布	穿透深度大,光损伤小	衬度不大
二次谐波	单色脉冲光	二次非线性极化率的分布	信号受微环境调控	普通分子的信号微弱
受激辐射	泵浦-探测	电子态或者化学键的分布	无背景	所需光强较高
拉曼散射	单色光	化学键的分布	化学专一性高,可以提供分子指纹信息	探测困难,采集时间长

2 拉曼散射

C. V. Raman 在 1928 年写给《自然》杂志编辑的信^[1]中首先指出了散射光中存在波长红移的次级线(即斯托克斯线), 从实验上开启了对于光和物质间非弹性相互作用的研究. 通常, 拉曼散射是发生在光和分子振动能级间的相互作用. 在不满足电子能级共振条件的情况下, 分子吸收光子的能量不能完成向电子激发态的跃迁, 但是可以到达一个中间态, 即虚态. 处在虚态的分子会迅速向低能态跃迁, 同时发射出一个光子, 这就是散射过程, 发射出的光子就是散射光. 如果散射光子和原来的光子频率相同, 称之为瑞利散射(Rayleigh Scattering). 如果分子从虚态向下跃迁时, 到达比原来能量高的态, 散射光的频率将降低, 称之为斯托克斯散射(Stokes Scattering); 相反, 如果终态的能量比初态低, 那么散射光的频率将升高, 称之为反斯托克斯散射(anti-Stokes Scattering). 斯托克斯与反斯托克斯散射统称为拉曼散射(Raman Scattering). 显然, 拉曼散射是光的非弹性散射. 拉曼散射的截面(cross section)很小, 因此自发拉曼散射的信号强度通常很低. 能量在分子振动能级和光子之间发生交换, 其大小对应振动能级间距, 散射光的频率移动(拉曼位移)也因此与分子振动的频率相同. 斯托克斯线与反斯托克斯线在光谱上则相对于入射光的频率对称分布.

拉曼位移与分子的振动模式密切相关. 特征振

动模式反映出分子结构上的特征, 在非简并的状态下, 不同模式之间的振动频率也不同. 分子的振动模式数目随着分子内结构复杂度的增加而增加, 但是由于影响分子振动的主要是化学键, 所以一个特定官能团的特征振动模式和频率是相对固定的. 因此, 拉曼光谱具有很好的化学特异性, 从拉曼光谱的峰位信息就可以推导化学键或者官能团的组成、含量及其周围的微观环境. 然而, 并不是每一种振动模式都具有拉曼活性. 与红外吸收光谱源于振动时偶极矩变化不同, 拉曼散射产生于振动中极化率的变化. 以 CH_2 为例, CH_2 有四种本征平面振动模式, 包含键长和键角的变化, 如图 1 所示. 这四种 CH_2 平面振动模式都会带来极化率的变化, 所以都具有拉曼活性.

拉曼散射有不同的实现条件. 在一般情况下, 拉曼散射可以自发产生, 如一束单色光在照射物质以后产生的就是这种信号, 是非相干的偏振光. 除此之外, 还有相干拉曼散射(Coherent Raman Scattering), 本文重点阐述相干反斯托克斯拉曼散射(Coherent anti-Stokes Raman Scattering, CARS)以及受激拉曼散射(Stimulated Raman Scattering, SRS)这两种技术. 相干拉曼散射与自发拉曼散射的本质区别在于由入射光诱导产生的偶极辐射是否具有相干性. 对于自发拉曼而言, 在样品的各个点产生的散射光的相位是随机的; 而相干拉曼散射在样品的不同点之间产生的散射光相位关联, 能够相干叠加. 发生在样品中的

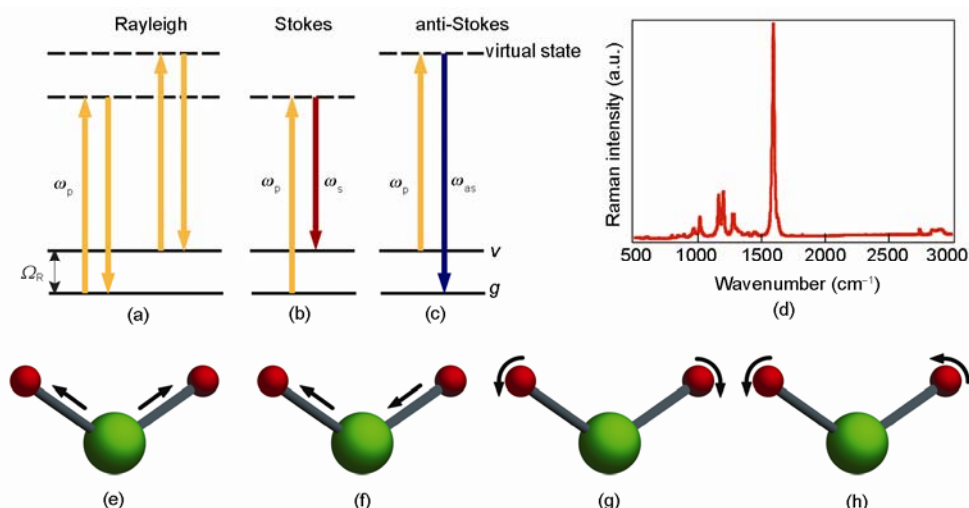


图 1 拉曼散射示意图. (a~c) 光散射的能级图, 分别表示瑞利散射、斯托克斯散射和反斯托克斯散射; (d) 视黄醇分子的拉曼光谱^[2]; (e~h) CH_2 的四种平面振动模式, 这四个振动都是拉曼活性的

相消干涉(Destructive Interference)和相长干涉(Constructive Interference)会改变信号的分布。

拉曼散射在生物显微学上的应用有独特的优势。首先, 与荧光显微术相比, 这是一个无标记的方法, 信号来源于分子的本征特性, 不需要引入任何外部标记。因此, 拉曼散射显然比荧光在活体(*in vivo*)观测上具有更大的优势。其次, 拉曼散射对入射光的波长没有要求, 可以使用红外光作为光源。对于生物样品, 由于在样品内的散射减少, 更长的波长可以获得更大的穿透深度。与此同时, 红外光激发下的拉曼散射不涉及电子激发态, 因此不存在光漂白问题, 对生物样本可能造成的光损伤相比荧光也要低得多。然而, 传统的拉曼显微术面临一个难以逾越的障碍, 就是拉曼散射信号十分微弱, 每获取一个像素的信号大约需要几十毫秒至 1 秒左右的时间。由此推算, 获得一幅具有实用意义的图像, 大约至少需要几十分钟的时间, 这大大限制了拉曼显微术在生物样品特别是活细胞和活体上的应用。

3 相干反斯托克斯拉曼散射(Coherent anti-Stokes Raman Scattering, CARS)

1965 年, 福特汽车公司的两位研究科学家发现了 CARS 现象^[3]。1982 年, 美国海军研究实验室的科学家们将 CARS 移植到显微镜上, 作为衬度来成像^[4]。此后, CARS 显微术一度发展缓慢。直到 1999 年, 美国太平洋西北国家实验室的谢晓亮研究组应用新的激光控制技术, 使 CARS 显微镜的装置布局从非共线^[4]转变为共线^[5], CARS 显微术才进入快速发展阶段, 逐步走向实用。

与自发拉曼散射不同, CARS 是一个非线性光学四波混频过程。通常我们利用泵浦和斯托克斯两束光来激发样品, 其频率分别为 ω_P 和 ω_S 。若所要探测的化学键振动频率为 Ω_R , 那么当三者满足共振条件 $\Omega_R = \omega_P - \omega_S$ 与相位匹配条件 $k_A = 2k_P \pm k_S$ 时, 将激发出频率为 $\omega_{AS} = 2\omega_P - \omega_S$ 的反斯托克斯光, 整个过程涉及四个光子(见图 2(a)), 这四个光子满足能量守恒和动量守恒关系, 在 CARS 过程中光与分子之间并没有能量或者动量的交换。泵浦光、斯托克斯光和反斯托克斯光的频率相位关系, 可以从图 2(b)和(c)中看出。

CARS 信号的产生是一个三阶非线性光学过程, 其信号的强度和激发光强度的关系可以写成(1)式^[2]:

$$I_{AS} \propto |\chi^{(3)}|^2 I_P^2 I_S \left(\frac{\sin(\Delta k z / 2)}{\Delta k / 2} \right)^2 \quad (1)$$

式中, I_{AS} 表示反斯托克斯信号的强度, 下标 S 和 P 分别代表斯托克斯光与泵浦光。 Δk 是相位失配量。而信号的特征可以用三阶电极化张量 $\chi^{(3)}$ 来描述。在实际体系中, $\chi^{(3)}$ 包含共振和非共振两个部分, 共振部分是我们所关心的信号, 它来源于上述的特定化学键振动模式。非共振部分来源于分子内电子对激发光的不同形式的响应。由此, 可以将 $\chi^{(3)}$ 写成

$$\chi^{(3)} = \chi_{NR}^{(3)} + \frac{\chi_R^{(3)}}{\Delta - i\Gamma} \quad (2)$$

其中, $\chi_{NR}^{(3)}$ 表示非共振部分, $\chi_R^{(3)}$ 表示共振部分。 Γ 表示均匀加宽的拉曼谱线宽, 而 $\Delta = \omega_P - \omega_S - \Omega_R$ 表示失谐量。由上面的强度公式可以得到

$$I_{CARS}(\Delta) \propto |\chi_{NR}^{(3)}|^2 + |\chi_R^{(3)}(\Delta)|^2 + 2\chi_{NR}^{(3)} \text{Re} \chi_R^{(3)}(\Delta) \quad (3)$$

I_{CARS} 是 CARS 信号的强度, 它是频率失谐量的函数, 式中右边各项的含义可以通过图 2(d)形象地反映出来。从图中可以看出, 第一项非共振项与失谐量无关, 是一个非零的常数。这对应于信号中一个恒定的背景。第二项共振项是我们想要探测的量, 它与体系内包含的振子数目相关。可以看到, 这是一个经典的共振曲线, 峰位在 $\Delta = 0$ 处, 此时信号最强。第三项则是共振项与非共振项的耦合。从曲线上可以看出, 耦合项在 Δ 变化时的行为可以明显分成三段, 最终的数值可以是正的也可以是负的。由此可见, 耦合项的存在使得 CARS 信号变得复杂。相位匹配条件的满足并不一定带来信号的增强。而且, 耦合项使得谱发生了移动, 即 CARS 信号的峰和自发拉曼散射的峰并不在同一个位置, 这为实验中激光波长的选择和结果中峰位的指认带来了一些困难。这一非共振的背景信号可以通过外差法^[6]或者调频法^[7]加以抑制或消除, 但是在客观上增加了实验难度。在实践中, 这一信号产生机制导致 CARS 信号的强度与被检测物的浓度之间没有明确的对应关系, 因此可能带来许多假象, 导致 CARS 信号或图像用于定量研究时面临许多挑战。值得高兴的是, CARS 信号的强度通常比自发拉曼信号提高了 $10^4 \sim 10^5$ 倍, 大大提升了应用范围, 特别是在快速动态的生命科学研究中信号强度的提升是必不可少的条件。

经过十多年的发展, CARS 显微术进步迅速。现

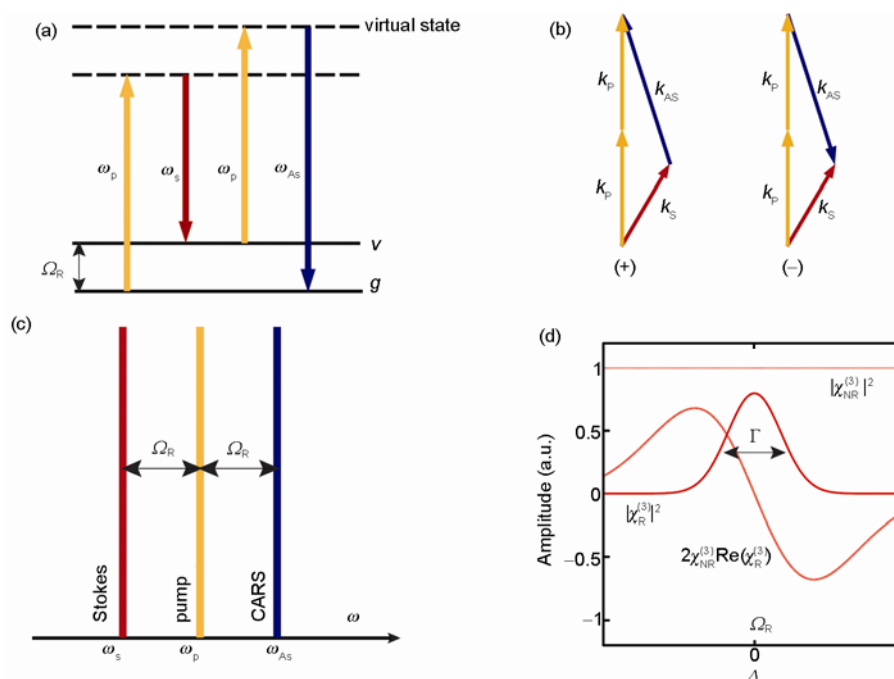


图 2 CARS 过程的能量、动量、光谱以及信号示意图. (a) CARS 过程的能级图, 两个频率为 ω_p 的光子和一个频率为 ω_s 的光子共同作用, 在样品中产生频率为 ω_{AS} 的 CARS 信号光子; (b) CARS 过程中满足的相位匹配条件 $k_A = 2k_p \pm k_s$, 这使得 CARS 具有两个信号传播方向, 对应图中的+和-; (c) 泵浦光, 斯托克斯光与 CARS 光的频率关系; (d) $\chi_R^{(3)}$ 的各个组成部分与频率失谐量 Δ 之间的关系, 包括共振部分 $\chi_R^{(2)}$, 非共振部分 $\chi_{NR}^{(3)}$ 以及二者的耦合项 $2\chi_{NR}^{(3)} \text{Re} \chi_R^{(3)}(\Delta)$

在可靠性与可操作性最高的 CARS 显微镜架构是由哈佛大学的谢晓亮研究组优化的, 其主要组成可以用图 3 来表示. 显微镜主体部分由一台激光扫描显微镜组成, 它通常由商品化的共聚焦显微镜或者多光子显微镜经过简单的改装或配置来实现对外部引入激光的扫描以及 CARS 信号的收集. 光源则采用空间上重合、时间上同步的两束脉冲激光, 分别称为泵浦光(pump)和斯托克斯光(Stokes). 脉冲激光器可以在相对低的平均功率下提供极高的峰值功率, 这是产生 CARS 信号的必要条件. CARS 显微镜装置的关键在于泵浦光和斯托克斯光的成功引入和同步. 要想获得 CARS 信号, 必须使泵浦光束和斯托克斯光束在空间上完全重合, 并且具有共同的焦点. 两束光在这一共同焦点处的耦合最强, 能够有效地产生 CARS 信号. 以上可以通过显微镜外适当的光路调节实现. 而在实验中更为重要和具有挑战性的, 是实现两束光的脉冲序列在时间上的重合, 因为只有当两束光的脉冲同时到达样品时, 才有可能产生四波混频过程.

两束不同波长的激光脉冲序列的时间重合可以

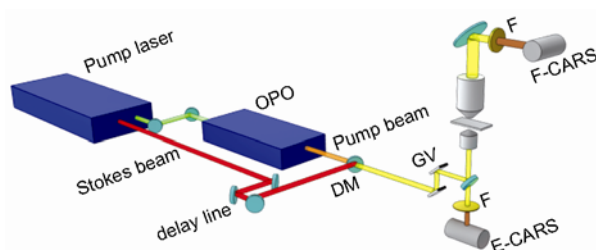


图 3 CARS 显微镜系统示意图. DM 表示二向色镜, F 表示滤色片, GV 表示扫描振镜. 光源为一台双输出的高重复频率皮秒脉冲激光器, 可以输出波长 1064 nm 的基频光和 532 nm 的倍频光. 基频光作为斯托克斯光(Stokes beam)进入显微镜. 倍频光作为泵浦源耦合进入 OPO. 在基频光路中增加一光学延迟线(delayline), 以进行脉冲重合的精细调节. 两束光在经过时间和空间的重合调节以后, 再扩束进入显微镜. CARS 信号能够向前和向后传播, 因而能够在前向(F-CARS)和背向(E-CARS)两个方向进行探测

通过多种方法来实现. 一种方法是使用两台钛宝石激光器, 分别产生波长合适的泵浦光束和斯托克斯光束, 然后利用外置的同步器, 将两个激光器的光脉冲序列同步, 再利用光学延时线使两束光的脉冲精

确重叠. 这个方法的好处是两束激光的波长都可以在很大的光谱范围内调谐(一般钛宝石激光器的调谐范围在 700~1100 nm), 其缺点在于利用外置同步器不仅增加了成本, 而且不容易维持同步的稳定性, 加大了实验难度, 从而限制了方法的推广. 另一种方法则利用光学参量振荡器(Optical Parameter Oscillator, OPO)作为波长调谐的关键装置, 近些年来逐渐成为 CARS 系统的主流设置方式. 这一方法需要一台脉冲激光器同时提供 CARS 信号所需的斯托克斯光和 OPO 的泵浦光. OPO 能够产生两束与泵浦光脉冲时序完全一致、波长可调的光, 分别称为信号光(Signal)和闲频光(Idler), 通常只采用其中的信号光作为 CARS 信号的泵浦光, 与前面的斯托克斯光一起激发样品. 在实验装置的实际搭建中, 最方便的配置是使用基频在 1064 nm 的高重复频率(76~80 MHz)皮秒脉冲激光器来作为 CARS 信号的斯托克斯光; 将其倍频后(532 nm)作为 OPO 的泵浦源, 获取波长位于 700~1000 nm 的同步脉冲激光作为 CARS 信号的泵浦光. 由于它们的脉冲序列是同步的, 通过光学延时线可以让脉冲精确重合, 产生 CARS 信号. 这一方法省去了两台独立脉冲激光器的同步控制, 大大简化了实验的难度, 成为应用最广的实验方案. 最近, 在商业化的产品中, 还可以在现有的多光子显微镜系统上通过简便的改装, 实现一部分 CARS 成像的功能^[8, 9]. 利用钛宝石飞秒激光器出射的激光通过光子晶体光纤, 产生超连续的宽谱飞秒脉冲激光, 再选择合适的波段与钛宝石激光器的部分出射光组成泵浦光和斯托克斯光, 来激发样品的 CARS 信号. 这个方法的好处是可以在现有的多光子显微镜光源与镜体之间通过添加一个附件实现 CARS 成像, 对于已经具有飞秒激光光源的多光子显微镜用户有一定的吸引力. 最近, 时间透镜(time-lens)技术被用于产生时序同步的脉冲激光序列. 时间透镜技术最早应用于光通信领域, 它可以改变光脉冲的持续时间. 使用时间透镜产生同步脉冲光序列时, 需要一台脉冲激光器 and 一台连续光激光器. 其中, 通过高速的光电二极管将脉冲激光器的脉冲序列 O_{s1} 转换为电脉冲序列 E_s , 作为时间透镜系统的触发源. 另一台连续激光器作为时间透镜的泵浦源. 时间透镜的时间聚焦通过相位调制实现, 一般用电光相位调制器来实现. 相位调制器的驱动信号来自前面的电脉冲序列的一个高次谐波, 以便在时间透镜后面实现一个波形良好的脉

冲光序列 O_{s2} . O_{s2} 与 O_{s1} 在重合之前, 需要经过时间延迟已达到两束脉冲光序列在时间上的精确同步. 这一调节可以通过电子延迟线来完成, 相比于前面的方法, 在调节难度上大为降低. 实现了两束光在时间和空间上的重合以后, 将它们作为激发光源引入显微镜.

然而, 以上每个方法并不是等同的, 例如 CARS 成像使用飞秒激光器和皮秒激光器的效果就完全不同. 飞秒激光器的脉冲宽度小, 峰值强度高, 非线性光学效应容易产生, 但是它的脉冲重合调节要求精度高, 而且光谱较宽. 拉曼光谱的特点是大多数分子振动特征峰都很尖锐, 宽度在 10 cm^{-1} 的量级, 飞秒激光器产生的激光光谱宽度远大于这个尺度, 使得成像的化学特异性不易实现, 只能用于探测碳氢键振动这种谱线很宽而干扰较小的化学键. 所以利用飞秒激光器建设的 CARS 显微镜系统大多数只用于脂类分子的检测. 皮秒脉冲激光器的谱线宽度要窄的多, 可以很好地应用到拉曼光谱的指纹区, 这对于物质科学与生命科学所研究的复杂体系十分重要. 实践上发现, 脉宽位于 1~10 ps 的激光光源在脉冲峰值强度与光谱分辨率之间达到比较好的平衡, 可以满足绝大多数样本的实验要求.

从上面的分析可以得出 CARS 成像的一些特点. 首先, 在近红外的泵浦光和斯托克斯光的共同作用下, 样品中产生了波长更短的 CARS 信号. 长波的激发光能够获得更大的穿透深度, 同时减少对样品的光致损伤. 其次, 作为三阶非线性光学效应, 信号只能产生于光束能量密度最大的地方, 即焦点处. 因此, 如同多光子显微技术一样, CARS 具有本征的三维成像能力. 第三, 从获得的 CARS 光谱考虑, 因为非共振背景的存在, 图像的信噪比受到了限制, 而耦合项的存在令 CARS 谱偏离了自发拉曼谱, 变得更加复杂, 导致对实验图像的解释也相应复杂; 同时, 耦合项使信号强度与被激发化学键的浓度不具备直接对应关系, 难以实现定量分析.

虽然 CARS 显微技术存在一些局限性, 但是这一技术的发展仍然为生物成像带来了新的解决方案. 例如重要的生命组成物质脂类分子的显微观察, 特别是在活细胞内和活体内的脂类分子成像, 一直是分子成像中的挑战. 对于脂类分子的成像观察, 长久以来都是基于一些脂溶性染料如尼罗红(Nile Red)、油红 O(Oil Red O)、苏丹黑(Sudan Black)、氟化硼络

合二吡咯甲川(BODIPY)等分子来进行标记. 很多时候, 要进行标记先要固定细胞, 这就意味着无法进行动态的观察, 而即便进行活细胞的标记, 也需要排除许多虚假的信息. 最近的研究发现, 长久以来一直用于细胞和线虫活体脂肪染色的荧光染料未必都是合适的, 染料的引入可能导致膜组织的相分离现象从而影响到包括胞吞在内的许多生理过程^[10]; 而利用尼罗红和 BODIPY 对线虫进行染色观察的结果出现了和生物化学分析的冲突^[11], 更进一步的研究发现, 在荧光显微镜下观察到的这些染料富集的区域, 其实并非体内真正的脂肪贮存区域. 油红 O 虽然相比之下是一个更好的脂肪标记荧光分子, 其标记结果的量化上和生物化学分析仍有一定出入^[12]. 这些问题的存在为进一步解释与脂肪相关的生理和病理现象与机理增加了难度. 而 CARS 为直接观察脂类提供了新的的重要手段, 在无须标记的同时, 能够同时做到高灵敏度、高空间分辨率和高时间分辨率. 谢晓亮研究组在 CARS 显微学上的开创性工作使生物学家可以更精确地观测脂类分子的体内分布与代谢过程. 他们利用 CARS 的高灵敏度, 成功观察到了单个磷脂双层膜的图像, 并借助 CARS 信号的偏振敏感性观察到了磷脂分子取向的不同^[13], 通过对不同分子的特征振动频率进行 CARS 成像, 还可以观察到磷脂膜内的相分离^[14]. 利用 CARS 显微镜的高灵敏度, 可以实现高速的活细胞成像, 观察细胞内脂滴的分布与动态行为^[15, 16]. 而通过对富含脂肪的组织样品进行碳氢键伸缩振动的 CARS 成像, 可以重建活体样本上组织的三维显微结构^[17]. 利用 CARS 优异的化学成像特性, 还可以从活细胞的动态脂肪代谢成像上来理解鱼油的生理学功能与医学价值^[18]. 美国普度大学的程继新研究组实验室通过 CARS 完成了离体和活体脂肪代谢的记录^[19]. 在活体实验中, 实验鼠的一部分肠道通过手术引到体外, 贴附在玻璃板上以利于显微观察, 而后用橄榄油对鼠进行灌胃处理, 分别记录不同时刻细胞质内脂滴的大小和数量, 如图 4(a)~(f). 从图中可以看出, 细胞内的脂滴很快出现了数量和尺寸上的增加(图 4(a), (d)), 在一段时间内会持续增加(图 4(b), (e)), 过了峰值后脂类的聚集开始消退(图 4(c), (f)), 清晰地从形态上反映了动态过程.

最近, 程继新与合作者一起, 针对上文提到的染料标记问题, 利用 CARS 对线虫体内的脂肪贮存进行

了细致的研究, 并与其他荧光标记方法进行了对比^[20]. 结果表明, CARS 显微技术比起原有的荧光染色方法能够更加准确地反映模式动物体内真实的脂肪贮存和分布, 具有巨大的优势. CARS 显微术还被用于神经生物学的研究, 程继新等人通过观察来自神经髓鞘中脂类的信号来观察坐骨神经组织^[21], 可以清晰地表现出神经的轮廓. 谢晓亮研究组对小鼠的脑部切片进行了 CARS 显微观察, 由于高倍数观察时受显微镜视野的限制, 所以他们利用平移台将每一个区域进行高分辨率 CARS 成像后再拼接组装成完整的大视野图像, 这一方法可以很精确地确定脑部肿瘤的边界, 在图 4(g)、(h)中可以发现肿瘤组织与正常组织的信号强度大大不同^[22]. 在结合了显微镜的快速扫描技术以后, CARS 还可以进行视频帧率的生物组织活体监测. 例如最近我们利用 CARS 显微成像手段, 充分发挥其无需标记、穿透深的优势, 直接观察活乳鼠的毛细血管, 实时地记录了毛细血管中单个血细胞的流动. 图 4(i)是一帧视频扫描时的 CH_2 伸缩振动 CARS 图像, 图中离散的亮点是流经毛细血管的单个红细胞. 对从视频帧率获得的图像序列进行分析, 还能够获得毛细血管中某一点(图 4(i)中的箭头所在位置)细胞流经的情况(图 4(j)), 实现活体内的“流式细胞观察”.

除了在生物体系内针对碳氢键振动成像, 通过 CARS 显微镜在相应化学官能团特征振动频率的探测还可以用来研究高分子材料例如聚苯乙烯小球的成像^[5], 光刻胶的化学组分成像^[23], 以及液晶分子的化学键取向^[24]. 在生物成像中, 除了对脂类分子进行成像, CARS 显微镜可以很好地对未经标记的蛋白质和核酸进行选择成像^[25], 还可以对体系内的水进行成像^[26]. CARS 显微镜的化学成像功能还可以很好地研究植物细胞壁中木质素的分布, 有助于理解物质转换过程中各种处理与反应的发生机理^[27], 而这样的结果通过其他手段很难获取.

4 受激拉曼散射(Stimulated Raman Scattering, SRS)

1962 年, E. J. Woodbury 和 W. K. Ng 首先在红宝石中观察到了 SRS 现象^[27]: 拉曼散射的斯托克斯光强度剧烈地增加, 并且表现出受激辐射的特点. 他们观察到的是激光器中增益介质红宝石在激励下发生

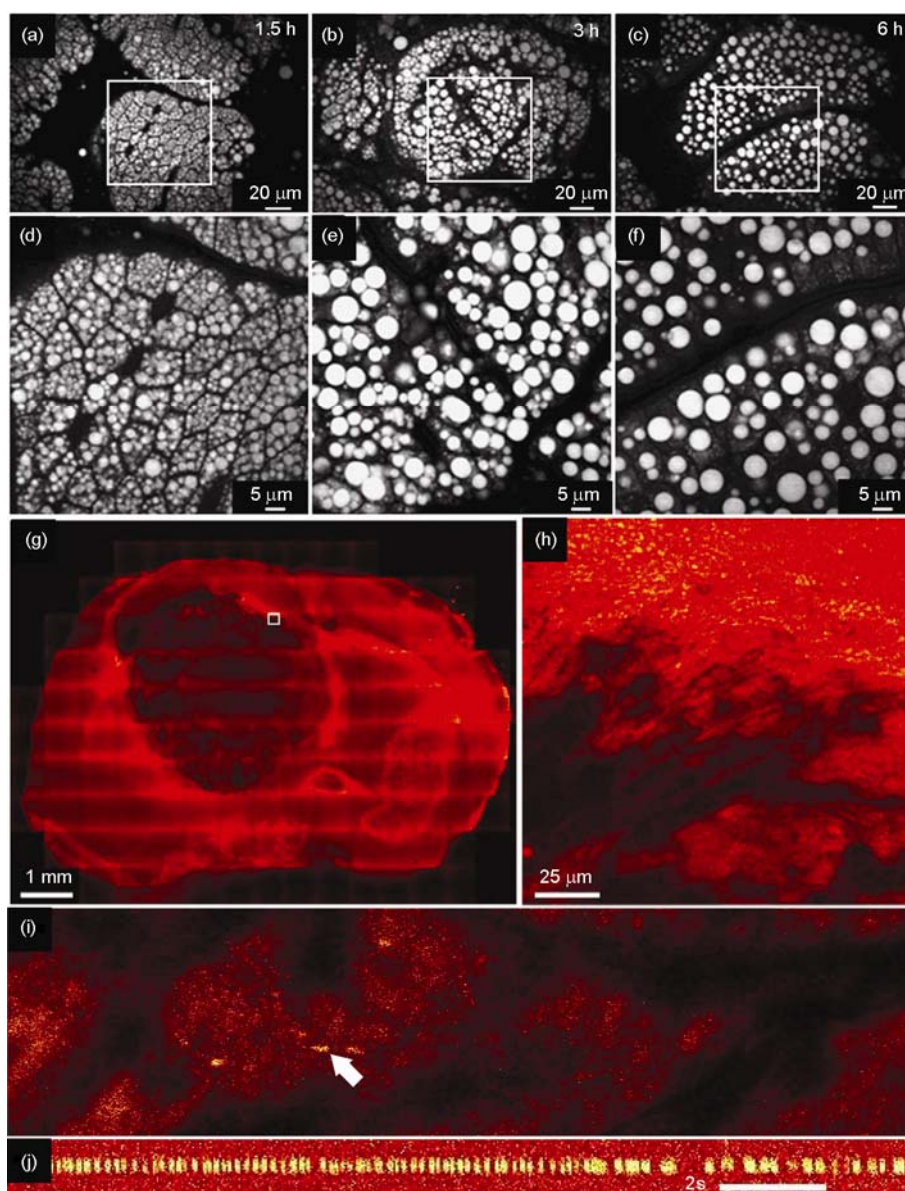


图4 CARS 成像举例. (a~f) 为实验鼠在被橄榄油灌胃后, 分别经过 1.5 h, 3 h 和 6 h 后, 细胞质内脂肪滴的位置和大小; 图 (d)、(e)、(f) 分别是 (a)、(b)、(c) 三图同一个区域的放大^[19]; (g)、(h) 是利用 CARS 技术在大范围内多次拍摄拼接重构出的鼠脑切片图像; (h) 图是 (g) 中白色小方框内的图像^[22]; (i) 视频帧率下小鼠红细胞流过毛细血管的记录, 截取一帧; (j) 对 (i) 中白色箭头所指的毛细血管位置进行图像序列分析, 得到这一点细胞流经情况随时间的变化.

的受激拉曼散射. 2009 年, 谢晓亮研究组首先将此应用于显微成像, 研制出 SRS 显微术. 这一进步在很大程度上摆脱了 CARS 显微术面临的一些困难, 成为相干拉曼散射显微术新的突破口.

应用于显微术的 SRS 与 CARS 相同, 采用两束满足共振条件的激光进行共线激发. 这样, 在引入的第二束光即斯托克斯光的诱导下, SRS 过程能够在诸

如生物组织的样品中发生. 在这个过程中, 光和分子发生了能量交换, 一个泵浦光子借助分子振动能级的跃迁而转化成为了斯托克斯光子. 这样, 泵浦光发生了受激拉曼损失 (Stimulated Raman Loss, SRL) ΔI_p , 导致强度降低, 而同时斯托克斯光发生了受激拉曼增益 (Stimulated Raman Gain, SRG) ΔI_s , 强度升高. 在泵浦光将能量转移给斯托克斯光的过程中, 同时将

一部分能量转移到样品的振动能级上面, 分子的振动能级布居发生改变. 通过一定的技术手段来检测 SRL 或者 SRG, 即可作为成像的对比度来源.

与 CARS 相比, SRS 虽然实验上相似, 在产生机理上却有着不同的特点. 最大的不同点在于 SRS 是受激过程, 只有在严格满足共振条件 $\Omega_R = \omega_p - \omega_s$ 的情况下才能发生, 因此本质上不会产生类似 CARS 的非共振背景, 同时也就不会存在类似式(3)所描述的非共振项和共振项的耦合. 因此, SRS 光谱与自发拉曼散射光谱是完全一致的, 可以直接利用拉曼光谱的数据库来进行组分分析和成像波长的确定, 比起 CARS 要方便不少. 在 SRS 过程中, SRG 与 SRL 的信号强度分别满足以下关系

$$\Delta I_s \propto N \times \sigma_{\text{RAMAN}} \times I_p \times I_s$$

$$\Delta I_p \propto -N \times \sigma_{\text{RAMAN}} \times I_p \times I_s$$

其中, N 是所探测化学键的浓度, σ_{RAMAN} 则是拉曼散射截面. 显然, SRL 与 SRG 都与被探测物的浓度成正比, 实验也给出了相同的结果. 因为信号强度对浓度的线性依赖, 利用 SRS 进行定量分析成为可能, 而这正是 CARS 所不具备的特点. 另一方面, 作为一个非线性光学过程, SRS 信号的产生集中在光束的焦点处. 这样, SRS 具备类似于 CARS 和其他多光子显微术的三维成像能力.

与自发拉曼散射相比, SRL 和 SRG 的信号得到了大大增强. 但是总体而言, 它们依旧非常微弱, 一般来说与入射光强度 I 相比, $\Delta I_p/I_p$ 和 $\Delta I_s/I_s \sim 10^{-4}$, 要在一个高背景下检出如此微小的变化非常不易. 除此之外, 来自泵浦光的强度波动同样会为信号检测带来不利影响. 由于激光强度的波动频率一般较低, 所以为了实现微弱信号的检出, 可以采用高频的强度调制与锁相探测相结合的方法. 实验中使用的高频强度调制器, 通常是声光调制器 (Acousto-Optical Modulator, AOM) 或者电光调制器 (Electro-Optical Modulator, EOM). 以检测 SRL 为例, 对脉冲斯托克斯光施加强度调制, 如图 5(d) 所示, 将使得 SRL 在泵浦光中以相同频率周期性地发生, 从而泵浦光的强度也将包含一个相同频率的周期性变化. 虽然这个变化量很小, 但是通过锁相放大器特异性地检测这个周期性变化, 就可以将微弱的信号提取出来并放大. 利用这种方法能够达到的检出限为 $\Delta I/I \sim 10^{-7}$, 完全能够满足对 SRL 或者 SRG 的检测. 对于调制频

率的选择, 主要还要考虑以下几个方面: 一方面, 调制频率越高, 能够实现的成像速度也越快; 另一方面, 调制频率受到激光脉冲序列重复频率的限制, 每个调制周期中应该有足够的光脉冲数目. 同时, 还需要考虑所使用的调制方式的频率响应. 综合这些考虑, 常用的调制频率为 10 MHz. 与 CARS 不同, 在 SRS 中, 我们所检测的信号不是一个新产生的波长, 而是和原有的激光波长相同. 为了检测 SRS 信号, 在使用大面积的硅光电二极管做光敏器件时, 需要对光电二极管施加很高的反向偏置电压, 以获得足够快的响应速度.

SRS 显微术无需标记, 没有非共振背景的干扰, 同时信号强度与浓度呈线性关系, 这些要素大大简化了图像数据的处理与定量分析, 可以获得更多信息. 2008 年谢晓亮研究组首次利用 SRS 显微镜在实验中观察了组织中无标记的药物输运过程. 常用的荧光标记方法往往会导致所标记上的荧光基团比小分子药物还大, 影响其转运过程^[28], 通过 SRS 实现无标记的化学成像则避免了这个问题. 图 6 显示了我们最近获得的二甲亚砜(DMSO)和维甲酸(RA)两种物质在小鼠皮肤组织中的转运过程图像, 并对其作了 x 和 z 两个方向的分布分析. 二甲亚砜和维甲酸亲水性不同, 通过角质层的方式也不同. SRS 图像显示了这两者在输运方式上的差别和在角质层中的分布, 具有很强的药代动力学探测能力. 这一实验不仅仅展示了 SRS 显微术和 CARS 显微术一样, 具有本征的三维化学成像能力, 而且通过定量化的图像获取和分析还可以精确描述生命活动的动态过程.

谢晓亮实验室利用 SRS 的高化学特异性, 对市售食品的成分进行了研究^[29]. 这里使用皮秒脉冲激光器与光参量振荡器作为激发光源, 配合一台正置显微镜进行观察. 食品样本包括蛋黄酱、奶酪和豆奶类饮品. 在进行成分分析之前, 首先采集了这些样本的自发拉曼光谱, 以对不同组分选择合适的拉曼峰位于成像. 蛋黄酱中不饱和脂肪和水的空间分布互补, 清晰地呈现出两者不互溶的本质特性. 同时, 这也表现了 SRS 在多相体系中实现非标记成像的能力. 奶酪和豆奶类饮品中蛋白质、脂类和碳水化合物的图像表明, 蛋白质和碳水化合物的分布有相当大的重叠, 而脂类则分布在与之互补的区域当中. 食品是一类成分复杂的多相多态体系. 在这个实验中, SRS 的高化学特异性与高成像速度在食品成分鉴别

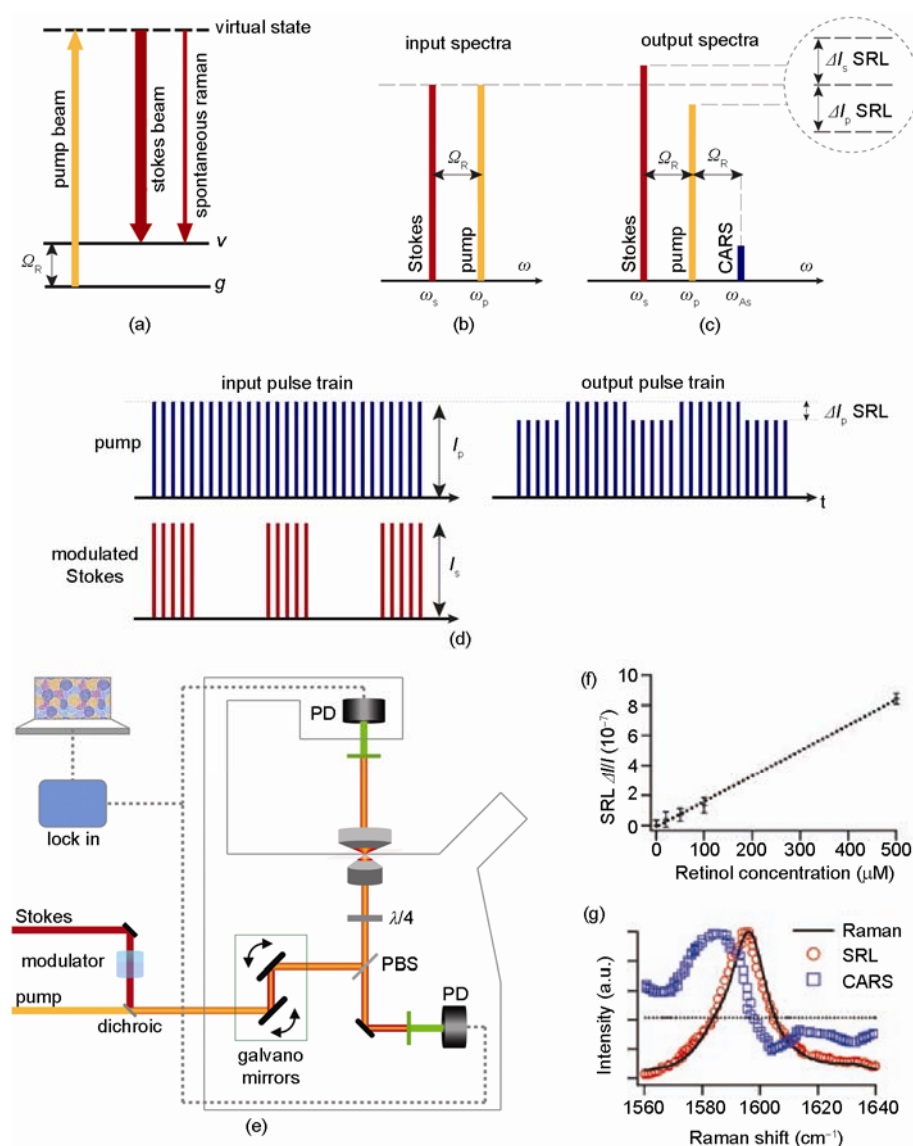


图 5 SRS 显微术的原理、组成以及特点. (a)自发拉曼与受激拉曼的能级图表示; (b, c) SRS 过程的光谱表示, 值得注意 CARS 信号也同时出现, 只是没有被探测; (d) 产生 SRS 过程的激光脉冲序列关系; (e) SRS 显微镜的示意图, 这里只给出了与 CARS 有区别的部分, 二者在其余部分是相同的. 相比 CARS, SRS 主要增加了一个斯托克斯光路上的调制器与信号后的锁相放大器; (f) 视黄醇浓度与其被激发出的 SRS 信号强度的关系, 二者为线性关系; (g) SRS 光谱与自发拉曼光谱、CARS 光谱的比较, SRS 光谱完全没有 CARS 光谱相比自发拉曼谱的变形和移动^[28].

中的优势得到了充分的体现.

SRS 的高化学特异性和可量化的特点, 还使其特别适合与分子成像相关的基因筛选工作. 线虫在关于脂肪代谢的研究中被广泛地选作模式生物, 对于脂类分子的分布检测, 长期以来依赖上文提到的染料染色方法, 带来许多不便和人工干扰因素. CARS 凭借非标记的优势很快成为重要的脂类成像

手段, 在线虫这一模式生物的脂肪代谢研究中体现出重大优势^[30], 而 SRS 则更进一步, 将无标记成像的优势充分拓展, 实现实验的量化^[31].

在利用 CARS 进行生物质处理的成像检测^[32]后, 谢晓亮研究组和美国可再生能源实验室的科学家继续合作, 利用 SRS 显微术进行生物质转化成生物燃料过程的动态监测^[33]. 他们搭建了一套双色 SRS 显

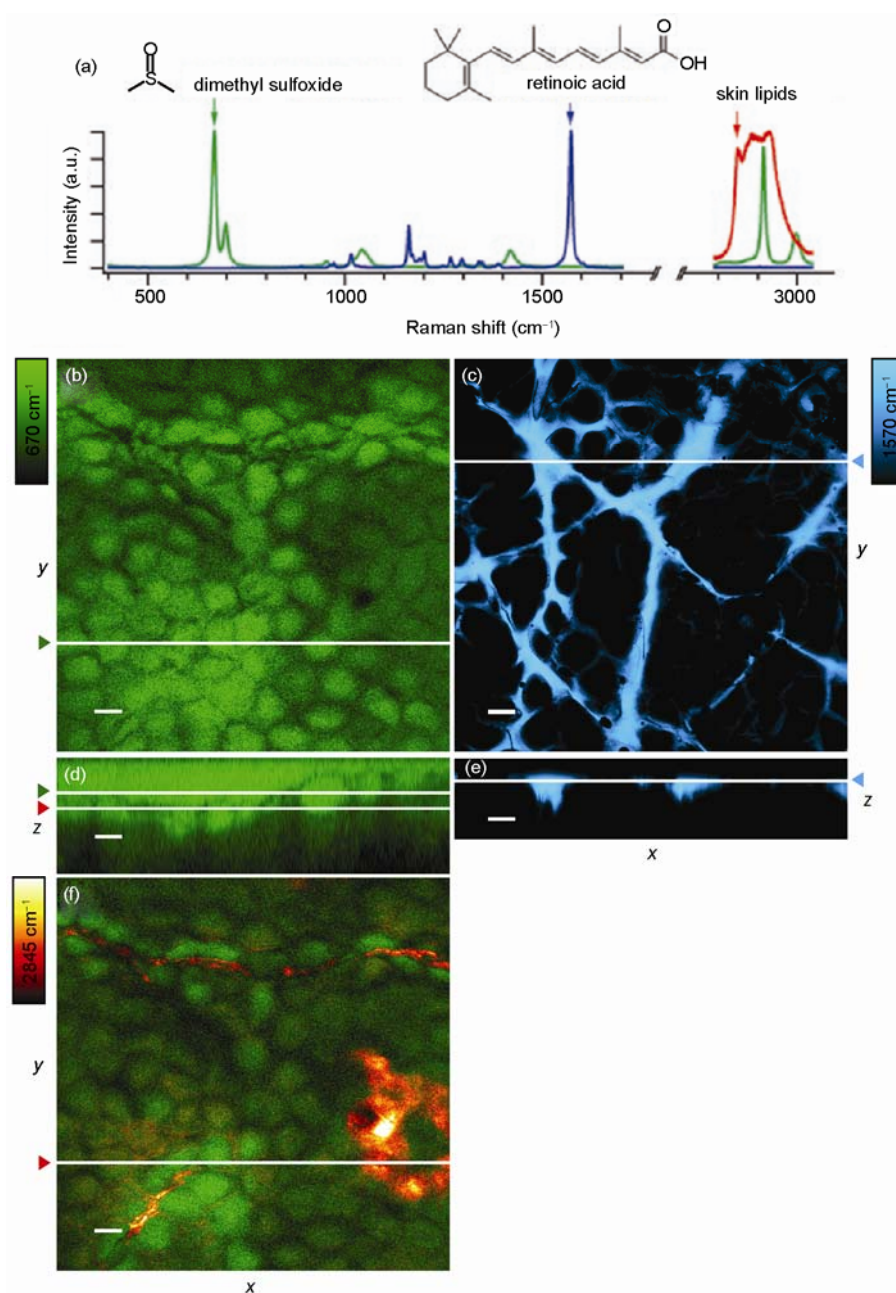


图 6 SRS 显微术用于药物输运的监测. 图中标尺均为 10 μm . (a) 用作样品的二甲亚砷(绿色)与维甲酸(蓝色)的拉曼光谱^[28], 红色曲线是鼠皮中的脂肪的拉曼光谱; (b) 二甲亚砷穿过角质层时的分布情况; (c) 维甲酸穿过角质层的分布情况; (d) (b)中白线所示位置的 z 方向分布情况; (e) 维甲酸在 z 方向的分布, 在(c)中白线所示位置采集图像; (f) 二甲亚砷与皮内脂肪的多色图像, 在(d)中红色箭头所指白线处采集图像

微系统用于同时监测两种不同化学物质的动态图像, 利用一台高功率的脉冲激光光源同时泵浦两套 OPO 系统, 获取不同波长的激光作为不同物质的泵浦光, 而基频的 1064 nm 激光则作为共同的斯托克斯光. 玉

米秸秆中木质素和纤维素是主要组成成分, 经过 NaClO_2 处理可以除去木质素, 而纤维素的含量几乎不受影响, 这一反应在工业上也常用于处理纸张原料. 通过 SRS, 对这一反应过程中的木质素和纤维素

的含量可以进行实时的监测, 每隔 8 秒钟获取一幅 SRS 显微图像, 得知木质素和纤维素的分布并通过其强度获得含量的定量信息. 在几个不同的结构中, 经过约一个小时的处理, 木质素的含量都有了不同程度的下降, 而纤维素的含量基本保持稳定(参见图 7).

在利用 SRS 进行生物学问题研究的同时, SRS 显微技术自身也在不断推进. 2010 年以来, 谢晓亮研究组相继实现了视频帧率的 SRS 以及 SRS 的光谱成像^[34, 35]. 传统的 SRS 由于信号强度低, 图像采集速率很低, 只有 1 帧/分钟, 严重制约了 SRS 在活体成像中的应用. 通过计算机仿真, 他们发现背向散射光的分布有其特定的规律: 在物体内部散射回来的信号光到达物镜前端的时候, 主要集中在一个直径 5 mm 的范围内(图 8(b), (c)). 通常的高数值孔径物镜的光瞳尺寸大约是 1~2 mm, 这样很大一部分 SRS 信号无法通过物镜后被检测器收集. 为了解决这一矛盾, 他们采用了一种新的背向散射信号采集方法, 在物镜前放置一个中央开孔的光电二极管作为探测器, 其面积足以覆盖主要散射光的范围. 激发光可以穿过小孔照射样品, 而散射光则被探测器以高效率收集(图 8(a)). 另一方面, 他们制作了一台全模拟的锁相放大器, 相比于商业产品, 速度提高了三个数量级. 利用这套系统, 他们实现了对鼠表皮快速活体成像, 分别探测了其中脂类、水、和蛋白质的信号(图 8(d)~(i)).

实验显示, 反式维甲酸在进入皮肤时, 是通过发根到达皮脂腺, 证实了关于此运输过程的一个假说. 在另一个实验中, 通过对毛细血管进行线扫描, 实现了血细胞在线计数(图 8(j)). 这些实验显示了新的落射 SRS 在活体成像应用中的巨大价值, 以及应用于医疗诊断的前景.

当几种物质的拉曼光谱的特征峰发生了重叠无法简单分离的时候, 直接利用这个振动频率进行 SRS 成像无法将其中单独的成分直接提取出来, 这将丧失拉曼光谱高化学特异性的优势. 最近, 谢晓亮研究组通过光谱裁剪激发(Spectrally Tailored Excitation, STE)的方法, 实现了对这类混合物质的光谱分离成像. 与之前普遍使用的皮秒脉冲激光不同, 在 STE 中泵浦光采用飞秒脉冲, 以便对其宽光谱进行裁剪. STE 方法对不同的物质采用不同的激发谱. 通过光谱在频率空间的形状控制, 可以将所有遇到的重叠光谱中不同组分的分立谱进行线性组合, 合成为一个有效激发谱(图 8(k)). 该有效激发谱中即包含了对不同物质的光谱的综合考虑: 为各个成分的光谱添加权重, 目标成分的光谱在权重上与背景光谱的权重“正交”, 这样在最终的有效激发光谱中将会排除掉背景光谱的干扰(图 8(l)). 特殊形状的激发光谱是通过使用一个偏振相位调制器对光谱进行空间调制来获得的. 经过调制的光即形成了具有特定光谱形状的泵浦光, 与窄谱的脉冲斯托克斯光一起

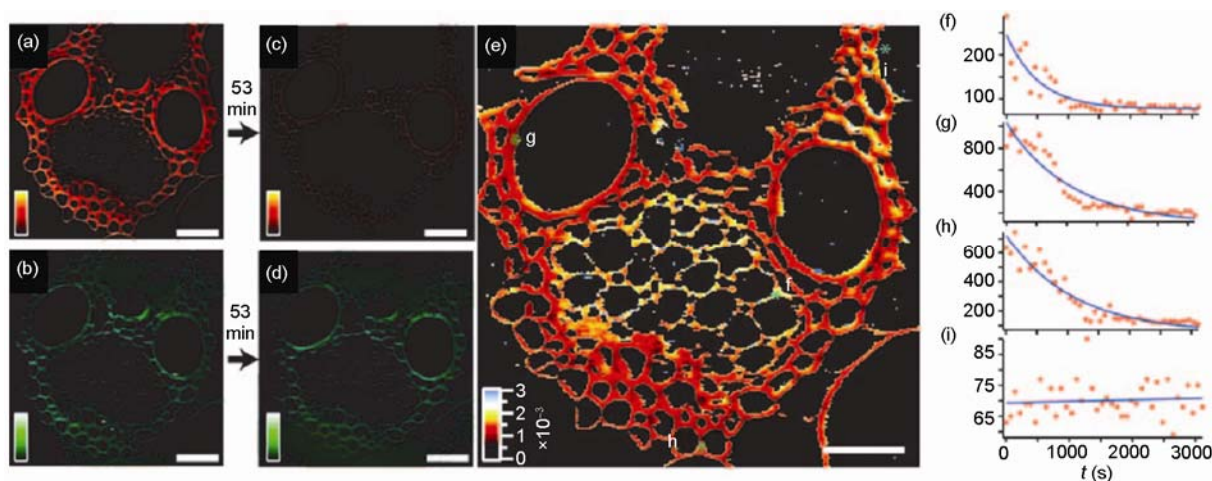


图 7 玉米秸秆中木质素与纤维素含量的 SRS 图像. (a) 木质素在反应开始前的分布^[33]; (b) 纤维素在开始前的分布; (c, d) 反应开始 53 分钟后, 木质素和纤维素各自的含量, 可以看到木质素明显减少而纤维素含量基本不变; (e) 表示了维管束不同区域的木质素反应速率, 以(a)(c)为时间起讫点, 在单指数衰减拟合下的结果; (f~i) 对应(e)图中各点(绿色, 分别为 f-韧皮部, g-导管, h-木纤维, i-无细胞的空白对照处)木质素在一段时间内的含量变化

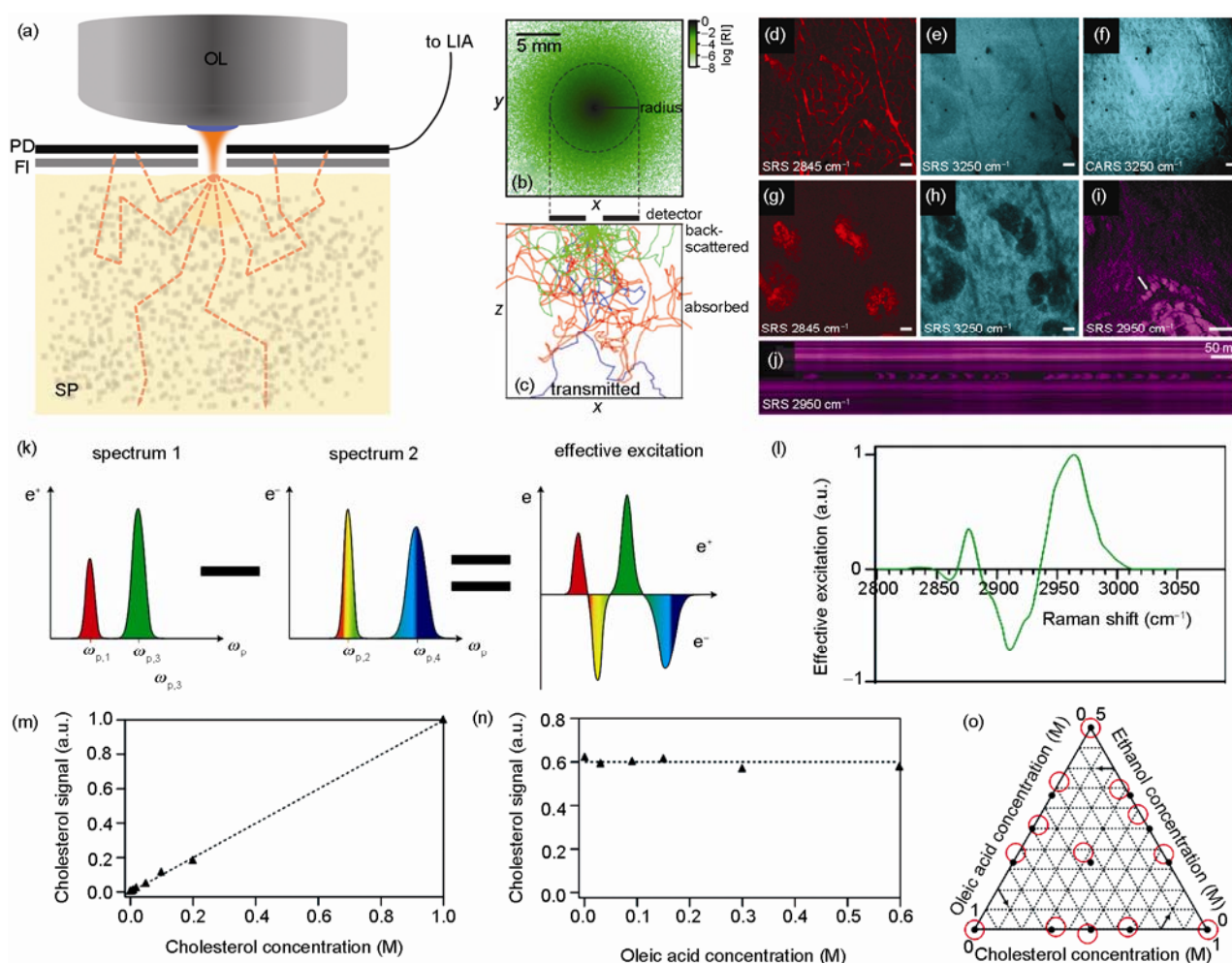


图 8 落射 SRS(E-SRS)与光谱裁剪激发 SRS(STE-SRS)技术. (a) 改进的背向散射光采集^[34, 35]; (b, c) 背向散射光分布的计算机模拟结果; (d) SRS 采集的鼠皮角质层中的脂类分布; (e) SRS 采集的相同组织中水的分布; (f) CARS 采集的相同组织中水的分布, 可以看到与(d)中脂类分布类似的信号; (g~i) 上皮组织中皮脂腺的图像, 分别采集了脂类和水的信号; (j) 对(i)中白色箭头处的毛细血管进行线扫描得到的流式细胞计数图像; (k) 光谱裁剪示意图; (l) 一个实际裁剪过的有效 SRS 激发光谱; (m) STE-SRS 的浓度与信号强度关系; (n) 胆固醇与油酸混合, 固定前者浓度, 改变后者浓度, 然后检测胆固醇的含量, 可以看到二者的相互干扰基本被消除了; (o) 胆固醇、油酸与乙醇三元组份, 利用 STE-SRS 对不同的组成比例进行检测. 图中黑点为设计配比, 红圈为检测值, 可以看到 STE-SRS 极高的光谱分辨能力.

激发样品, 再收集 SRS 信号, 这一信号就反映了样品中特定组分的信息. 为了考察 STE-SRS 的光谱分离能力, 他们选用了线虫作为实验动物, 对其中的油酸、硬脂酸和蛋白质进行了观察. 这三者的拉曼光谱在 $2800\sim3000\text{ cm}^{-1}$ 之间有很大的重叠, 普通方法无法拆分. 通过 STE-SRS, 单一的油酸、硬脂酸和蛋白质在线虫中的分布及定量信息均被呈现出来(图 8 (m)~(o)). 结果表明, 线虫有两个主要的脂肪贮存区域, 分别是皮下和肠道. 脂肪也不会以单一成份独立

存在, 通过 STE 手段还可以清晰看出皮下脂肪周围蛋白质的聚集.

5 总结与展望

我们将 CARS、SRS 与常用的激光共聚焦及双光子显微镜技术做了相应的对比, 可以参见表 2. CARS 和 SRS 显微术都是基于相干拉曼散射现象的无标记光学成像技术, 两者具有很多相似点. 通过探测化学

表 2 相干拉曼散射显微术与其他技术比较

	共聚焦	双光子荧光	CARS	SRS
检流计式扫描(fps)*	1~5	1~5	1~5	1~5
共振式扫描(fps)	30~120	30~120	30~120	30~120
横向分辨率(nm)	~250 ^[38]	~250 ^[38]	~350 ^[32]	~350 ^[33]
纵向分辨率(nm)	~800	~1000	~1100 ^[37]	~1100
灵敏度**	单分子	单分子	>10 ³	~10 ³
穿透深度(um)	≤150 ^[36]	≤1000 ^[36]	≤400 ^[2]	≤400
标记	荧光	荧光	非标记	非标记

* 激光扫描显微镜的扫描方式包括检流计式(Galvano Scanning)和共振振镜(resonant scanning)两种, 所实现的扫描速度差别很大, 因此分列表中. 表中所列的数据均为图像分辨率 512×512 时所能达到的帧率(fps); **焦点处最低可探测分子数.

键的振动, CARS 和 SRS 显微术能够以特定化学成分的浓度作为衬度成像, 而不需要引入荧光标记. 利用近红外区域的激光光源, 相干拉曼散射在穿透深度上优于单光子荧光, 有利于组织水平和活体模式生物的成像. 而非线性的强度依赖还能够提供内禀的三维成像能力, 分辨率可以与多光子显微镜比拟. 在泵浦光和斯托克斯光两束激光照射样品的情况下, CARS 和 SRS 信号是同时产生的, 两种显微术通过光路上的一些改动, 可以分别探测相应的信号. 在光谱上 CARS 与相应的自发拉曼散射存在一定的偏移, 峰形存在区别, 信号的强度与物质浓度也不存在线性关系, 这些问题是由非共振的背景信号所导致的, 不仅降低信噪比, 还由于这一背景信号与共振信号的耦合带来了图像获取和数据定量处理上的困难. 最近发展的 SRS 显微术则避免了 CARS 显微术的上述问题, SRS 在光谱上与相应自发拉曼散射是一致的, 还可以在消除背景的同时提供信号强度与目标物质浓度成线性关系的高分辨率三维图像. 与此同时, SRS 还具备了视频帧率的图像采集速度, 实现了活体成像. 这些优势使得它表现出了巨大的应用前景. 目前 SRS 技术还在日益进步与快速发展中, SRS 在灵敏度、化学选择性、定量分析等方面已经超越了 CARS, 成为相干拉曼散射显微技术发展的最前沿.

在 SRS 技术发展的道路上, 尚存在一些问题, 例如光源的稳定性和易用性有待提高, 更加稳定的替代光源也是技术上的一个挑战, 最近发展迅速的光纤激光器和频率变换元件将有望改良并简化光源; 另一方面, 背向 SRS 信号检测仍然是一个技术难题, 如何提出更好的解决方案, 还需要许多工程学上的努力; 同时, 如何进一步区分各个不同的化学组分, 特别是如何更好地利用分子特征拉曼峰来观察特定分子在活细胞内的动态分布与行为, 将是无标记成像技术长久的目标.

诺贝尔物理学奖获得者 Nicolaas Bloembergen 在 1978 年第六届国际拉曼光谱学会议上说: “正像自发拉曼光谱学半个世纪以来不断兴旺与壮大一样, 我们可以信心十足地预测相干非线性拉曼光谱学在今后半个世纪将产生许多新的成果.” 相干拉曼散射显微技术在近年来的飞速发展无疑印证了这一预言. 相干拉曼散射显微术的发展, 为生命科学和物质科学研究提供了灵敏和便利的无标记成像手段, 同时还成为了医学研究的有力工具. 随着该技术的进一步发展, 相干拉曼散射显微术的检测灵敏度和特异性将继续提高, 继续推进我们对微观世界动态过程的理解.

致谢 CARS 和 SRS 显微实验得到了美国哈佛大学的 Christian Freudiger 博士、傅丹博士、Gary Holtom 博士、Brian Saar 博士、宋琳博士以及美国哥伦比亚大学的闵玮教授大力协助. 部分实验样品的准备得到申洁的协助, 部分实验数据取自 2011 年 8 月于北京大学举办的第八届相干拉曼散射显微学国际研讨会, 何姣、纪旭和史晓做了大量工作. 作者衷心地感谢来自以上人士的协助与支持. 本文获得国家重点基础研究发展规划项目(2011CB809106)资助, 特此一并致谢.

参考文献

- 1 Raman CV. A change of wavelength in light scattering. *Nature*, 1928, 121: 619–619
- 2 Evans CL, Xie XS. Coherent anti-Stokes raman scattering microscopy: Chemical imaging for biology and medicine. *Ann Rev Anal Chem*, 2008, 1: 883–909
- 3 Maker PD, Terhune TW. Study of optical effects due to an induced polarization third order in electric field strength. *Phys Rev*, 1965, 137(3A): A801–A818
- 4 Duncan MD, Reintjes J, Manuccia TJ. Scanning coherent anti-Stokes raman microscope. *Opt Lett*, 1982, 7(8): 350–352
- 5 Zumbusch A, Holtom GR, Xie XS. Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering. *Phys Rev Lett*, 1999, 82(20): 4142–4145
- 6 Potma EO, Evans CL, Xie XS. Heterodyne coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) imaging. *Opt Lett*, 2006, 31(2): 241–243
- 7 Ganikhanov F, Evans CL, Saar BG, Xie XS. High-sensitivity vibrational imaging with frequency modulation coherent anti-Stokes Raman scattering (FM CARS) microscopy. *Opt Lett*, 2006, 31(12): 1872–1874
- 8 Pegoraro AF, Moffatt DJ, Jia YW, Pezacki JP, Ridsdale A. Optimally chirped multinodal CARS microscopy based on a single Ti: sapphire oscillator. *Opt Express*, 2009, 17(4): 2984–2996
- 9 Monat C, Corcoran B, Ebnali-Heidari M, Grillet C, Eggleton BJ, White TP, O’Faolain L, Krauss TF. Slow light enhancement of nonlinear effects in silicon engineered photonic crystal waveguides. *Opt Express*, 2009, 17(4): 2944–2953
- 10 Le TT, Yue SH, Cheng JX. Shedding new light on lipid biology with CARS microscopy. *J Lipid Res*, 2010, 51(11): 3091–3102
- 11 Wang MC, O’Rourke EJ, Ruvkun G. Fat metabolism links germline stem cells and longevity in *C. elegans*. *Science*, 2008, 322(5903): 957–960
- 12 O’Rourke EJ, Soukas AA, Carr CE, Ruvkun G. *C. elegans* major fats are stored in vesicles distinct from lysosome-related organelles. *Cell Metab*, 2009, 10(5): 430–435
- 13 Potma EO, Xie XS. Detection of single lipid bilayers with coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy. *J Raman Spectrosc*, 2003, 34(9): 642–650
- 14 Potma EO, Xie XS. Direct visualization of lipid phase segregation in single lipid bilayers with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *ChemPhysChem*, 2005, 6(1): 77–79
- 15 Nan XL, Cheng JX, Xie XS. Vibrational imaging of lipid droplets in live fibroblast cells with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *J Lipid Res*, 2003, 44(11): 2202–2208
- 16 Nan XL, Potma EO, Xie XS. Nonperturbative chemical imaging of organelle transport in living cells with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Biophys J*, 2006, 91(2): 728–735
- 17 Evans CL, Potma EO, Puoris’haag M, Côté D, Lin CP, Xie XS. Chemical imaging of tissue *in vivo* with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(46): 16807–16812
- 18 Xie XS, Yu J, Yang WY. Living cells as test tubes. *Science*, 2006, 312(5771): 228–230
- 19 Zhu JB, Lee B, Buhman KK, Cheng JX. A dynamic, cytoplasmic triacylglycerol pool in enterocytes revealed by *ex vivo* and *in vivo* coherent anti-Stokes Raman scattering imaging. *J Lipid Res*, 2009, 50(6): 1080–1089
- 20 Yen K, Le TT, Bansal A, Narasimhan SD, Cheng JX, Tissenbaum HA. A comparative study of fat storage quantitation in nematode *Caenorhabditis elegans* using label and label-free methods. *PLoS ONE*, 2010, 5(9): e12810
- 21 Huff TB, Cheng JX. *In vivo* coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of sciatic nerve tissue. *J Microsc*, 2007, 225(2): 175–182
- 22 Evans CL, Xu XY, Kesari S, Xie XS, Wong STC, Young GS. Chemically-selective imaging of brain structures with CARS microscopy. *Opt Express*, 2007, 15(19): 12076–12087
- 23 Potma EO, Xie XS, Muntean L, Preusser J, Jones D, Ye J, Leone SR, Hinsberg WD, Schade Wolfgang. Chemical imaging of photoresists with coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy. *J Phys Chem B*, 2004, 108(4): 1296–1301
- 24 Saar BG, Park HS, Xie XS, Lavrentovich OD. Three-dimensional imaging of chemical bond orientation in liquid crystals by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Opt Express*, 2007, 15(21): 13585–13596
- 25 Cheng JX, Volkmer A, Book LD, Xie XS. An epi-detected coherent anti-Stokes raman scattering (E-CARS) microscope with high spectral resolution and high sensitivity. *J Phys Chem B*, 2001, 105(7): 1277–1280
- 26 Cheng JX, Pautot S, Weitz DA, Xie XS. Ordering of water molecules between phospholipid bilayers visualized by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(17): 9826–9830
- 27 Woodbury EJ, Ng WK. Ruby laser operation in the Near IR. *Proc of the IRE*, 1962, 50: 2367
- 28 Freudiger CW, Min W, Saar BG, Lu SJ, Holtom GR, He CW, Tsai JC, Kang JX, Xie XS. Label-free biomedical imaging with high

- sensitivity by stimulated raman scattering microscopy. *Science*, 2008, 322(5909): 1857–1861
- 29 Roeffaers MBJ, Zhang X, Freudiger CW, Saar BG, Ruijven MV, Dalen GV, Xiao CH, Xie XS. Label-free imaging of biomolecules in food products using stimulated Raman microscopy. *J Biomed Opt*, 2011, 16(2): 1–6
- 30 Le TT, Duren HM, Slipchenko MN, Hu CD, Cheng JX. Label-free quantitative analysis of lipid metabolism in living *Caenorhabditis elegans*. *J Lipid Res*, 2010, 51: 672–677
- 31 Wang MC, Min W, Freudiger CW, Ruvkun G, Xie XS. RNAi screening for fat regulatory genes with SRS microscopy. *Nat Methods*, 2011, 8(2): 135–138
- 32 Zeng YN, Saar BG, Fredrich MG, Chen F, Liu YS, Dixon RA, Himmel ME, Xie XS, Ding SY. Imaging lignin-downregulated alfalfa using coherent anti-Stokes raman scattering microscopy. *Bioenerg Res*, 2010, 3(3): 272–277
- 33 Saar BG, Zeng YN, Freudiger CW, Liu YS, Himmel ME, Xie XS, Ding SY. Label-free, real-time monitoring of biomass processing with stimulated raman scattering microscopy. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49(32): 5476–5479
- 34 Saar BG, Freudiger CW, Reichman J, Stanley MC, Holtom GR, Xie XS. Video-rate molecular imaging *in vivo* with stimulated raman scattering. *Science*, 2010, 330: 1368–1390
- 35 Freudiger CW, Min W, Holtom GR, Xu BW, Dantus M, Xie XS. Highly specific label-free molecular imaging with spectrally tailored excitation-stimulated Raman scattering (STE-SRS) microscopy. *Nature Photon*, 2011, 5(2): 103–109
- 36 Hama H, Kurokawa H, Kawano H, Ando R, Shimogori T, Noda H, Fukami K, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A. Scale: A chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci*, 2011, advance online publication
- 37 Ozeki Y, Dake F, Kajiyama S, Fukui K, Itoh K. Analysis and experimental assessment of the sensitivity of stimulated Raman scattering microscopy. *Opt Express*, 2009, 17(5): 3651–3658
- 38 Cox G, Sheppard CJR. Practical limits of resolution in confocal and non-linear microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 2004, 63(1): 18–22

Coherent raman scattering microscopy

CHEN Tao^{1,2}, YU ZhiLong^{1,2}, ZHANG XianNian^{1,2}, XIE XiaoLiang Sunney^{1,3},
HUANG YanYi^{1,2*}

1 Biodynamic Optical Imaging Center, Peking University, Beijing 100871, China

2 College of Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

3 Department of Chemistry and Chemical Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

*Corresponding author (email: yanyi@pku.edu.cn)

Abstract: Coherent Raman Scattering Microscopy is an optical imaging method rooted in Raman Scattering. It involves Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) and Stimulated Raman Scattering (SRS). CARS and SRS offer chemical contrast via detecting vibration of chemical bonds. Both CARS and SRS are nonlinear optical processes, offering high sensitivity and 3-dimensional sectioning capability intrinsically. As label-free imaging technologies, CARS and SRS have been employed to observe substance that is hard to label, such as lipids and specific small molecules including metabolites, and large biomolecules including proteins and nucleic acids. These features also ensure CARS and SRS as promising imaging methods for *in vivo* studies. In this paper, we focus on the principle, methodology, as well as the applications of CARS and SRS microscopies in chemistry and life sciences.

Keywords: optical microscopy, coherent raman scattering, coherent anti-stokes raman scattering, stimulated raman scattering, label-free imaging