

超分辨率显微镜让人类看清纳米世界

(2014年诺贝尔化学奖让纳米天地进入人类视野)

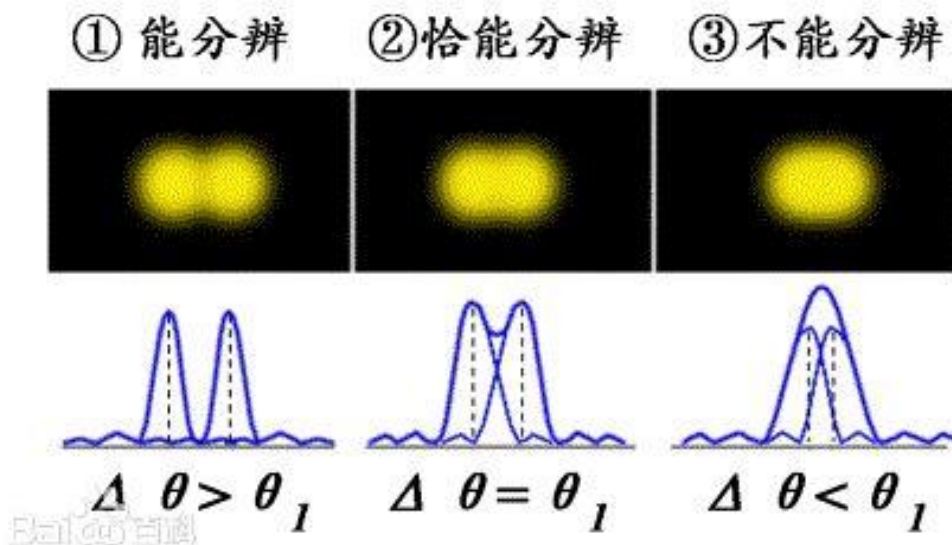
红血细胞、细菌、酵母细胞和精子。当17世纪的科学家第一次在光学显微镜下研究红血细胞、细菌、酵母细胞和精子这些活的生物体时，他们看到了一个新的世界。微生物学诞生了，从此，光学显微镜成为研究生命科学的工具箱中最重要的工具之一。

但在很长一段时间，光学显微镜无法突破一个物理局限，即所谓的阿贝衍射极限——德国物理学家恩斯特·阿贝于1873年提出的公式证明，受光的波长等因素影响，显微镜的分辨率是有限的。

在20世纪的大部分时间，科学家们都认为，光学显微镜永远无法看到小于光的波长一半的物体，也就是说，分辨率超不过0.2微米。虽然某些细胞的细胞器如线粒体的轮廓在光学显微镜下清晰可见，但它难以分辨更小的物体，这类似于能够看到一个城市的建筑，却不知道居民们如何生活。要充分了解细胞的功能，就需要具备跟踪单个分子活动的的能力。

衍射极限是指一个理想物点经光学系统成像，由于衍射的限制，不可能得到理想像点，而是得到一个夫朗和费衍射像。

因为一般光学系统的口径都是圆形，夫朗和费衍射像就是所谓的艾里斑。这样每个物点的像就是一个弥散斑，两个弥散斑靠近后就不好区分，这样就限制了系统的分辨率，这个斑越大，分辨率越低。这个限制是物理光学的限制，是光的衍射造成的



阿贝衍射极限仍然成立，但美国科学家埃里克·贝齐格、威廉·莫纳和德国科学家斯特凡·黑尔借助荧光分子的帮助，巧妙地绕过了经典光学的这一“束缚”，使光学显微镜发展到了一个新的层次——纳米显微镜。现在，科学家们可以监控细胞内单个分子之间的相互作用，观察与疾病相关的蛋白质如何聚集，并在纳米水平上跟踪细胞分裂过程。三位科学家也因在超分辨率荧光显微技术领域取得的成就而获得2014年诺贝尔化学奖殊荣。

斯特凡·黑尔：挑战百年既定法则

自1990年获得海德堡大学博士学位后，斯特凡·黑尔一直在寻找一种方法，希望能绕开阿贝定义了一个多世纪的衍射极限。挑战一个既定法则的想法是诱人的，但他的热情遭到了德国资深科学家的质疑，因此，黑尔躲到了芬兰，图尔库大学一位研究荧光显微镜的教授将他纳入了自己的研究团队。

所谓荧光显微镜，就是一种利用荧光分子，比如可与特定细胞DNA（脱氧核糖核酸）耦合的荧光抗体，来对细胞的某个部分成像的技术。如果抗体与DNA耦合，它们会在细胞的中心发光。这种方法可让科学家看到特定分子所处的位置，但他们找到的是一团分子，比如纠缠的DNA的链，过低的分辨率使他们无法分清单个的DNA链。

1993年，当黑尔在翻阅一本量子光学教科书上有关受激发射的内容时，突然灵光乍现——受激发射可以让荧光分子“熄灭”。1994年，黑尔发表文章阐述了自己的想法。他提出了所谓的受激发射损耗（STED）方法：利用一束光脉冲激发的所有荧光分子，而另一束光脉冲“熄灭”荧光，但每次保留一部分体积约纳米大小分子发着光。用这样一个纳米“手电筒”沿着样品扫描并连续地测量光强度，就能够获得一张综合的图像。每次扫描时保留的荧光分子体积越小，最终图像的分辨率就越高，因此，从理论上来说，光学显微镜的分辨率再无任何限制了。

黑尔的理论文章并没有立即引发轰动，但因足够有趣，他得以进入马克斯·普朗克生物物理化学研究所工作。在随后的几年中，他研制出一个STED显微镜，并在2000年以光学显微镜从未达到的分辨率获得了大肠杆菌的图像，用实践证明了自己的理论。

威廉·莫纳：探测单个荧光分子的第一人

大多数的化学方法，例如测量荧光，科学家需要同时研究数百万个分子。很长一段时间里，他们都在梦想能够测量单个分子，因为获得的认知越丰富、越详尽，理解就越深入，比如疾病是发展的。因此，1989年，当在IBM研究中心工作的威廉·莫纳成功地测量了单个分子的光吸收时，他也为单分子显微镜的发展奠

定了基础。他的实验启发了许多化学家们将目光投向单个分子，其中就包括埃里克·贝齐格。

1997年，莫纳进入加州大学圣地亚哥分校，开始了让绿色荧光蛋白呈现彩虹的所有颜色的研究。他发现，绿色荧光蛋白的一个变体发出的荧光可被随意地开启和关闭——当受到波长488纳米的光激发时，蛋白开始发出荧光，但不久就会逐渐熄灭。他将这些蛋白质分散到凝胶中，并让它们之间的距离大于0.2微米的阿贝衍射极限。在常规光学显微镜下，可以看到单个分子的光，它们就像一盏盏带开关的小灯。

通过这项研究，莫纳证明，可以对单个分子的荧光进行光学控制。而这解决了埃里克·贝齐格1995年构想出来的一个问题。

埃里克·贝齐格：通过叠加图像超越阿贝衍射极限

就像斯特凡·黑尔一样，埃里克·贝齐格也一心想要找到绕过阿贝衍射极限的方法。在20世纪90年代初，他在贝尔实验室里，致力于研究一种被称为近场显微镜的新型光学显微镜。这种显微镜可以规避阿贝衍射极限，但也有很多重大缺陷，比如很难看到细胞表面下的结构。他最终放弃了这个研究方向，转而设想，能否利用不同颜色的荧光分子来避开衍射极限？

2005年的一次实验过程，令贝齐格回想起莫尔纳尔的研究，当下茅塞顿开。他意识到，根本不需要不同颜色的荧光分子，通过“开关”控制，这些分子就可以在不同的时间里发出不同荧光。

仅仅过了一年，贝齐格成功了。他的研究团队将荧光蛋白与包裹溶酶体的膜耦合，并用微弱的光脉冲激活荧光蛋白，使其中的少量蛋白发光。由于数量少，几乎所有蛋白之间的距离都超过了阿贝衍射极限的0.2微米。每个荧光蛋白的位置都可以在显微镜下精确地记录下来。待荧光黯淡之后，研究人员又用光脉冲激活另一小群蛋白，如此反复。当贝齐格将所有图像叠加在一起，他得到了具有超高分辨率的溶酶体膜图像。

方法技术从来都是科学进步的推动力，三位获奖者的研究成果发展出了多项纳米显微技术，目前已被世界各地广泛使用。功能强大的纳米显微镜所展示的微小世界，也产生了很多前沿认知。斯特凡·黑尔看到了活神经细胞的内部，这能帮助更好地理解大脑突触；威廉·莫纳研究了与亨廷顿氏病相关的蛋白质；而埃里克·贝齐格对胚胎中的细胞分裂进行了跟踪。类似的例子不胜枚举。毫无疑问，2014年诺贝尔化学奖得主们所作出的成就，将对全人类的福祉作出重大贡献