Science Advances
AAAS
稿件

标题

- **单脉冲受激拉曼光热显微术及富含胆固醇的膜结构域的直接可视化**
- 单脉冲受激拉曼光热显微术

作者

Yifan Zhu[1], Hongli Ni[1], Hongjian He[1], Yueming Li[1], Meng Zhang[1], Ji-Xin Cheng[1,2,3,4,*]

所属机构

[1]波士顿大学电气与计算机工程系，美国马萨诸塞州波士顿，02215。

[2]波士顿大学化学系，美国马萨诸塞州波士顿，02215。

[3]生物医学工程系，波士顿大学，美国马萨诸塞州波士顿，02215。

[4]光子学中心，波士顿大学，美国马萨诸塞州波士顿，02215

[*]通讯作者：jxcheng@bu.edu

摘要

通过测量受激拉曼激发产生的热效应，受激拉曼光热显微镜可为多种样本类型提供一种新的途径，以实现空间和时间分辨的拉曼特征分析。与受激拉曼散射显微术不同，SRP与噪声较大的超快激光源高度兼容，因此可使用高峰值功率、低重复频率的光学参量放大器激光器，提升灵敏度和成像速度。在此，我们报道了一种单脉冲SRP（spSRP）显微镜系统，其中SRP信号由OPA激光器产生的单对激光脉冲诱发。通过广泛的脉冲啁啾，最大限度地提高SRS激发速率并尽量减少光损伤。spSRP对二甲基亚砜的单像素检测限（LOD）达到890 μM，较SRS显微镜提高了~44倍。我们展示了该技术在真菌、细胞和组织中的多种应用。活细胞spSRP成像速度达到每秒10帧。尤其是，spSRP系统能够直接可视化HeLa细胞质膜中的富胆固醇结构域，这些结构域与小窝蛋白免疫荧光共定位。

导读：单脉冲受激拉曼光热成像为人们长期寻觅的完整细胞膜中的“脂筏”提供了直观证据。

正文

引言

相干拉曼散射（CRS）显微镜（*1*，*2*），包括相干反斯托克斯拉曼散射（CARS）（*3*，*4*）和受激拉曼散射（SRS）（*5–9*），已成为化学成像的重要基石。得益于其高灵敏度和振动对比度，CRS尤其适用于可视化富脂结构（*10–12*），例如细胞内脂滴、髓鞘和模型膜，这得益于其对强CH伸缩振动的利用。

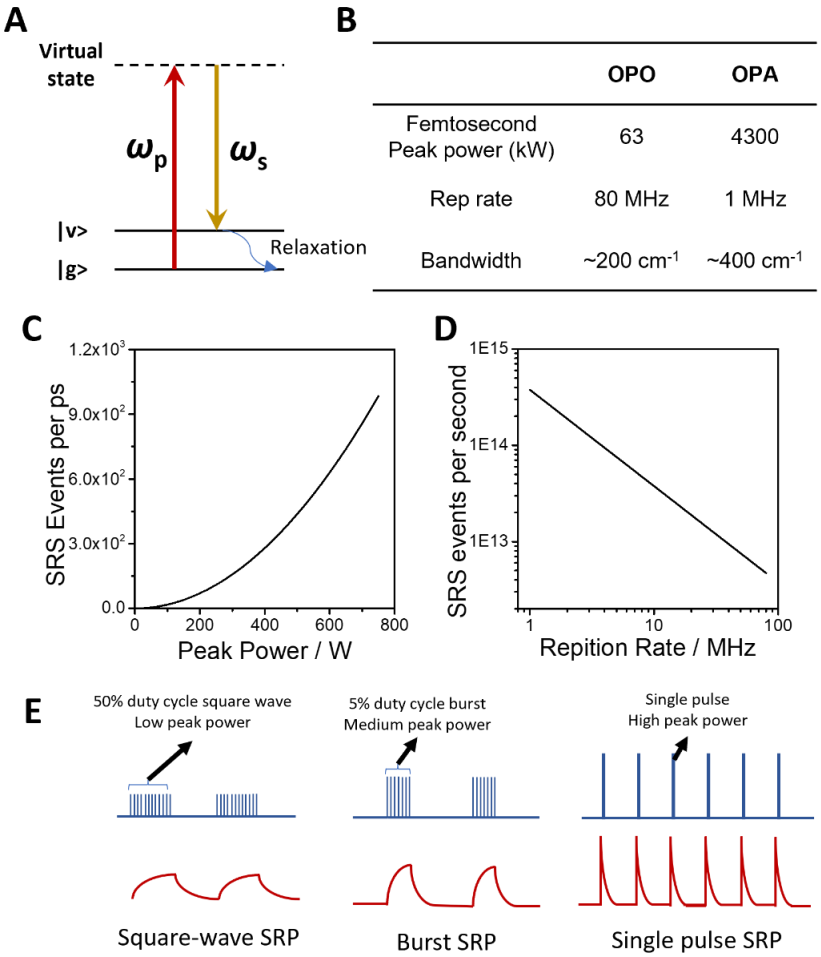
尽管取得了这些重大进展，一个关键且长期存在的挑战仍未得到充分解决：如何在不使用标记的情况下直接观察膜结构域。据推测（*13–15*），这些纳米尺度结构域是细胞信号传导和物质转运的基本组织者，但其尺寸微小、动态变化且化学差异细微，超出了当前相干拉曼散射（CRS）成像的能力范围。相干反斯托克斯拉曼散射显微镜受到非共振背景的限制（*16*），这种背景可能掩盖膜内脂质有序度和胆固醇含量细微变化所产生的微弱对比度。受激拉曼散射显微镜消除了这种背景，并能提供定量对比度，但其灵敏度最终受基本的激光散粒噪声限制（*16*）。近期提升受激拉曼散射灵敏度的尝试，要么如量子受激拉曼散射那样在降低噪声方面提升有限（*17–19*），要么需要复杂的标记或等离激元基底，例如受激拉曼激发荧光（SREF）（*20*，*21*）和等离激元增强受激拉曼散射（*22*，*23*）。因此，当前的相干拉曼散射显微技术不足以可靠地绘制生物膜中脂质结构域的细微化学特征。

受激拉曼光热（SRP）显微术（*24*，*25*）是一种新近开发的相干拉曼成像方式。在 SRP 测量中，一对激光脉冲串被照射到样品上，以激发化学键振动；与此同时，第三束探测激光束测量由受激拉曼散射加热引起的热透镜效应（**图 1A**）。SRP 将测量原理从光吸收（如受激拉曼散射）转变为光折射，因而具有三大优势：调制深度大、对收集数值孔径（NA）的要求低，以及易受超快激光噪声影响的程度低。这些优势促成了多种各具特色的 SRP 实现方式，对生物学研究和 / 或转化应用至关重要（ *25* ）。

目前的 SRP 演示采用高重复频率（> 40 MHz）、低峰值功率（< 10 kW）的光学参量振荡器（OPO）系统。与此同时，光学参量放大器（OPA）系统（**图 1B**）以峰值功率高、光谱可调范围宽著称，广泛用于非线性光谱学（*26*）和三光子荧光显微术（*27*）。OPA激光器可达到的飞秒峰值功率可能比 OPO 激光器高出 ~70 倍，从而使非线性受激拉曼散射激发的效率提高 2 个数量级（**图 1C、D**）。此外，单脉冲配置将加热时长从一串脉冲（~μs）缩短为单个脉冲（~ps），从而最大限度地减少加热期间热扩散造成的信号损失（**图 1E**）。另外，OPA激光器的重复频率较低（~1 MHz），因此各加热时段之间有充分的冷却时间，无需激光调制或脉冲挑选，便可实现高速 SRP 成像，成像速度最高可达每像素 1 μs。值得注意的是，尽管 OPA 激光器通常噪声过高，不适用于受激拉曼散射测量，但只要使用低噪声探测激光，它们就非常适合 SRP 测量。总之，这些特点使 OPA 成为 SRP 显微术的理想光源。

在本研究中，我们介绍了基于OPA的单脉冲SRP（spSRP）显微镜的理论建模与实现，并探讨其在高灵敏度、高速化学成像中的潜力。理论模拟表明，对于高峰值功率激发，飞秒脉冲持续时间会导致饱和并降低激发效率，而将脉冲大幅啁啾至数十皮秒则可显著提高激发效率。除脉冲啁啾外，我们的spSRP显微镜还配备了径向分段平衡探测器（*28*），以进一步提升

灵敏度。我们展示了spSRP的多种应用，包括监测癌细胞中的脂肪酸摄取、真菌中的重水摄取、脑组织指纹图谱，以及对活体癌细胞中脂滴进行高速追踪。由于OPA激光脉冲经过大幅啁啾，未观察到光损伤。最后，我们报告了借助高灵敏度spSRP显微镜实现的膜小窝直接可视化。



	OPO	OPA
Femtosecond Peak power (kW)	63	4300
Rep rate	80 MHz	1 MHz
Bandwidth	~200 cm^{-1}	~400 cm^{-1}

图1. OPA激光器提升受激拉曼散射激发效率。A. SRP能级图。泵浦光和斯托克斯脉冲使分子从基态跃迁至激发态。随后发生的振动弛豫会产生热。|g> 和|v> 分别表示基态和振动激发态。**B.** OPO与OPA激光器关键参数的比较。**C.** 受激拉曼散射激发速率与功率之间的非线性关系。x轴表示泵浦光束和斯托克斯光束的峰值功率。**D.** 激光重复频率与相对受激拉曼散射激发速率之间的倒数关系。**E.** 方波SRP、突发模式SRP和单脉冲SRP的示意图。**C**的参数：样品：14 M（纯）二甲基亚砜；拉曼峰：2913 cm^{-1} 处的C-H不对称伸缩，截面为1 GM；重复频率：80 MHz；脉冲宽度：5 ps。聚焦数值孔径：1.2。**D**的参数：样品：14 M（纯）二甲基亚砜；拉曼峰：2913 cm^{-1} 处的C-H不对称伸缩，截面为1 GM；泵浦光和斯托克斯光的平均功率均为30 mW；脉冲宽度：5 ps。聚焦数值孔径：1.2。

结果

高峰值功率条件下使 *SRS* 速率最大化的最佳脉冲啁啾

SRS可建模为一种双光子振动激发过程，其绝对截面的单位为戈佩特-迈耶（GM，10^{-50} $cm^4 \cdot s \cdot photon^{-1}$）(*29*)。由于SRS过程会将能量沉积到焦点处分子中，SRS速率是SRP显微术灵敏度的核心因素；提高峰值激光功率可以最有效地使其最大化**(图1C)**(*24*)。以低重复频率运行的激光器尤其适合这一目的，因为在给定平均功率下可实现更高的峰值强度，从而提高非线性信号的产率**(图1D)**。

然而，一个关键考量是跃迁饱和的起始，这是一种在高强度激发下发生的非线性现象。跃迁饱和源于SRS激发诱导的振动基态态布居耗尽，因为分子被跃迁至振动激发态**(图2A)**。

为定量估算受激拉曼散射中的饱和，研究建立了一个动力学模型，具体内容见补充材料。简而言之，受激拉曼散射激发和衰减被建模为一级化学反应，其中激发速率根据受激拉曼散射的绝对截面（*30*，*31*）计算，衰减速率则根据振动态寿命（*32*）确定。

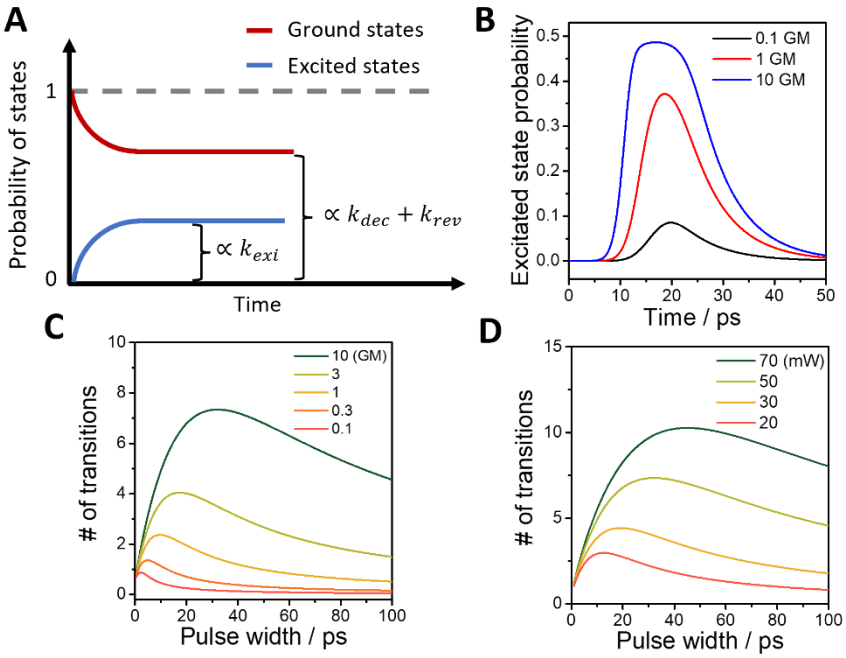


图2. 受激拉曼散射跃迁速率与激发脉冲宽度的关系。**A**。从态布居角度看受激拉曼散射。k_{dec}、 k_{rev}和k_{exi} 分别为受激拉曼散射自发衰减、逆向受激拉曼散射和受激拉曼散射激发的速率常数。为简化示意图，假设激发脉冲采用从$t = 0$ 开始的方波包络。**B**。高斯激发包络下，受激拉曼散射饱和度随时间的变化。**C**。产热受激拉曼散射跃迁次数与脉冲宽度及跃迁截面的关系。**D**。每个脉冲的产热受激拉曼散射跃迁次数与脉冲宽度及平均激光功率的关系。 **B**的参数：泵浦光和斯托克斯光的平均功率均为30 mW；脉冲宽度：10 ps；振动衰减寿命：5 ps；重复频率：1 MHz。聚焦数值孔径：1.2。 **C**的参数：泵浦光和斯托克斯光的平均功率均为30 mW；重复频率：1 MHz。聚焦数值孔径：1.2；振动衰减寿命：1 ps。 **D**的参数：受激拉曼散射截面：10 GM；重复频率：1 MHz。聚焦数值孔径：1.2；振动衰减寿命：1 ps。

我们首先以一个简单的恒定受激拉曼散射场说明该模型的基本原理，该场从 $t = 0$ 开始（**图 2A**）。在这种条件下，系统最终（$t > t_0$）会达到平衡态，随后即可求得振动态布居：

$$[v](t > t_0) = \frac{k_{exi}}{k_{rev} + k_{exi} + k_{dec}} \cdot [g](0) \qquad (1)$$

其中，k_{exi}、 k_{rev} 和 k_{dec} 分别为受激拉曼散射激发、逆向受激拉曼散射和自发衰减的动力学常数。$[v](t)$和 $[g](t)$分别为振动激发态和基态的时间依赖布居。在弱激发条件下（$k_{exi} \ll k_{dec}$），通常情况下，按惯例用于 OPO 受激拉曼散射的低峰值功率激发即属此类，平衡态振动态布居与受激拉曼散射激发的动力学常数成正比。然而，当 k_{exi} 足够大（例如在高峰值功率激发下）时，这种比例关系便不再成立，且 $[v](t > t_0)$

逐渐趋近于 $[g](0)$。这是因为强激发会耗尽基态，使分子数量实际上减少。在时间高斯激发下也能观察到这种现象。如**图 2B**所示，对于泵浦光和斯托克斯光均采用 60 kW、5 ps 脉冲的强激发，可以明显使截面较大的跃迁达到饱和，例如 C-H不对称伸缩振动模式（*30*）。

非线性受激拉曼散射响应、饱和与光损伤之间的相互作用，决定了给定条件下实现高效激发的最佳峰值功率。因此，要使受激拉曼散射激发获得最大的激光能量，必须采用适当的啁啾。值得注意的是，反向受激拉曼散射过程可以使振动激发态退激，而不会产生热（*30*）。因此，我们将自发衰减速率（r_{dec}）纳入计算，以求得产热跃迁总数（式 S12）。通过改变脉冲宽度，我们模拟了单个化学键上的产热受激拉曼散射跃迁数随脉冲宽度的变化，如**图 2C、D**所示。在平均功率和衰减寿命保持不变的情况下（**图 2C**），飞秒激发无法达到最佳激发效率，因为峰值功率过高。另一方面，过度的脉冲啁啾也会降低激发效率，因为 SRS 激发速率与峰值功率的平方成正比。相反，对于 3 GM 的受激拉曼散射截面，脉冲宽度为 ~20 ps 时可达到最佳值；截面越大，实现最佳激发所需的啁啾越长。保持截面不变、改变平均功率的补充模拟（**图 2D**）显示，平均功率越高，所需啁啾也越长，而 ~20 ps 仍是相对最佳值。这些结果为我们的 spSRP显微镜设计啁啾提供了指导。

具有平衡探测的单脉冲***SRP***显微镜

基于上述计算，我们开发了一台具有最佳脉冲啁啾的spSRP显微镜（**图3A**）。简而言之，一台1045 nm种子激光器和一台非共线光学参量放大器激光器用于受激拉曼散射激发。同步的泵浦光和斯托克斯光脉冲序列在空间和时间上对准并被啁啾，以振动激发样品分子。一束520 nm连续波探测光束与受激拉曼散射光束共线对准，以探测热透镜效应。一台望远镜调节探测光束的准直，从而在探测激光焦点与受激拉曼散射焦点之间引入轴向偏移。三束光被送入激光扫描显微镜与样品相互作用。光由高数值孔径油浸聚光镜收集。出射激光被一块12.7 mm椭圆镜沿径向分割为两部分，即内核和外环。两部分光的光强由两个相同的探测器支路探测，同时数字化，并相减以获得平衡探测信号。

值得注意的是，根据饱和模拟结果引入了强烈啁啾，以最大限度地提高激发效率。脉冲在公共光路中往返通过 15 cm 的 SF11玻璃材料 16 次，斯托克斯光另行通过 7 次后，其脉冲宽度达到 4.2 ps；据估算，泵浦脉冲的脉冲宽度为 >30 ps（**图 S1**）。如此长的啁啾降低了受激拉曼散射激发激光的峰值功率，有助于高效传递能量，从而产生更多受激拉曼散射跃迁。同时，它也减少了强烈的 OPA激光器造成的光损伤。

我们此前提出的球透镜模型（*24*）预测，探测光束的内侧和外侧部分会携带由热透镜效应引起的相反调制，如**图 3B**所示。因此，我们采用 Jun 及其同事提出的方法（*28*），进行径向分区探测，使信号增强两倍，同时抑制探测激光噪声。如**图 S2**所示，聚光镜经过对准，使探测光束发散地射向位于距瞳面两个焦距处的中继透镜。中继透镜可将聚光镜的瞳面共轭成另一个相距两个焦距的平面，并在该处对探测光束进行分区。在溶于二甲基亚砜中的 5 mM 氘代二甲基亚砜样品中，记录到的探测光束两个分区的时间动态（**图 3C**）携带了来自探测激光的共模激光强度噪声，

而信号调制的符号相反。将两者相减后，共模噪声被抵消，同时信号强度加倍。在频域中也清晰可见这一点：1 MHz 处的噪声底降低了 ~7 dB（**图 3D**）。较低频率处的噪声降低了 >15 dB，这有助于改善图像质量。值得注意的是，在高频（>6 MHz）处，平衡探测反而抬高了噪声底。这是由于两个探测器接收的光子数增加，导致散粒噪声升高。完整的频谱（包括探测器基线和代表性信号光谱）见**图 S3**。

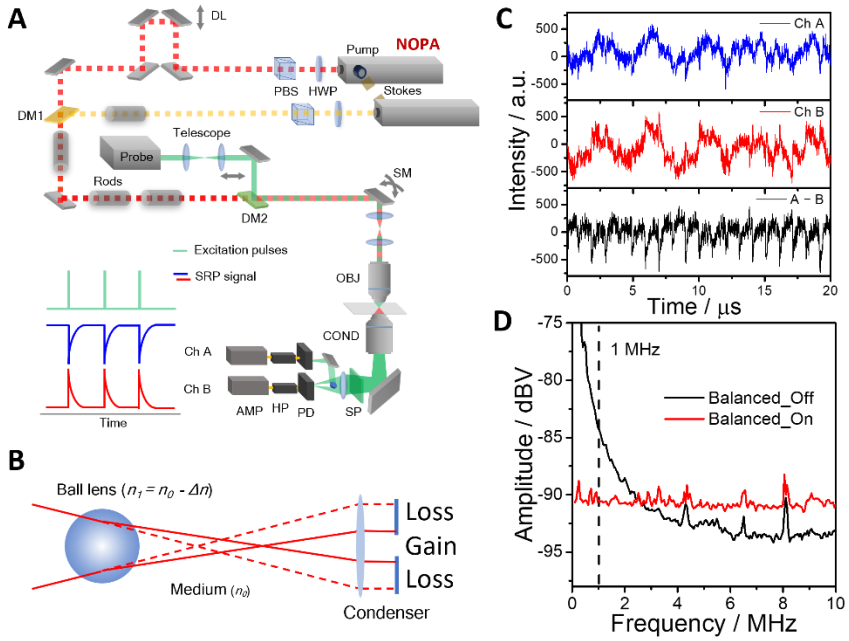


图3. spSRP显微镜的探测机制与示意图。A。spSRP显微镜示意图。DL：延迟线。PBS：偏振分束器。HWP：半波片。DM：二向色镜。SM：扫描镜。OBJ：物镜。COND：聚光镜。SP：光谱滤光片。PD：光电二极管。HP：高通滤波器。AMP：放大器。**B**。球透镜模型显示，在不同探测区域中探测光强度的增益和损耗。**C**。各探测通道的时域SRP信号及其相减结果；样品为溶解于二甲基亚砜中的5 mM氘代二甲基亚砜。**D**。频域比较：探测激光噪声（Balanced_Off）、噪声抵消后的探测激光噪声（Balanced_On），以及较弱的SRP信号（140 mM，或1%的二甲基亚砜溶解于氘代二甲基亚砜中）。

性能表征

针对 DMSO 的单像素检测限（LOD）测量聚焦于 2913 cm^{-1} 模式。为确保整个测量过程中热学和光学性质保持恒定，使用氘代二甲基亚砜（DMSO-d6）作为溶剂稀释 DMSO。如**图 4A,B**所示，在高浓度 DMSO 样品中，SRP 光谱干净且平滑；在浓度低至

1 7 890 . mM 时

μ = 3σ σ

仍可观测到信号。我们根据 LOD /k 将 LOD 计算为 M，其中 是基线的标准差，k 是强度-浓度线性校准曲线的斜率。相比之下，基于 OPO 的 SRP 的 LOD 为 2.3 mM（*24*）。因此，spSRP 测量的 LOD 提高了 ~ 2.5 倍。在使用 DMSO-d6 的 DMSO 介质中测量了碳氘键的 LOD（**图 4C,D**）。同样，spSRP 的灵敏度优于基于 OPO 的 SRP，LOD 提高了 ~ 1.7 倍，从 8.4 mM 降至 5.2 mM。测得的 DMSO-d6 光谱还表明其具有较高的光谱分辨率（**图 S4**）：2125 cm^{-1} 峰的半峰全宽（FWHM）达到 9.9 cm^{-1}，接近使用光谱分辨率为 2 cm^{-1} 的光谱仪获得的拉曼光谱（*33*）。

通过对聚合物纳米颗粒成像，对系统的光谱保真度和分辨率进行了表征，并使用由 500 nm 和 200 nm 聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）颗粒组成的混合物作为测试平台（**图 4E-G**）。spSRP 能够清晰分辨两种尺寸的颗粒；500 nm 颗粒和 200 nm 颗粒的信噪比分别为 ~120 和 ~17 （**图 4E**）。无论颗粒尺寸如何，均能高保真地记录 PMMA 在 2950 cm^{-1} 处的光谱峰（**图 4F**）。引入 520 nm 的第三束探测光束有助于提高空间分辨率（**图 4G**）。我们绘制了穿过 3 颗 200 nm PMMA 微珠的强度分布，拟合所得高斯曲线的半峰全宽为 ~265 nm。对微珠形状进行去卷积后，得到的半峰全宽为 ~ 194 nm，低于相同条件下受激拉曼散射的理论分辨率极限（~300 nm，即艾里斑的半峰全宽）。

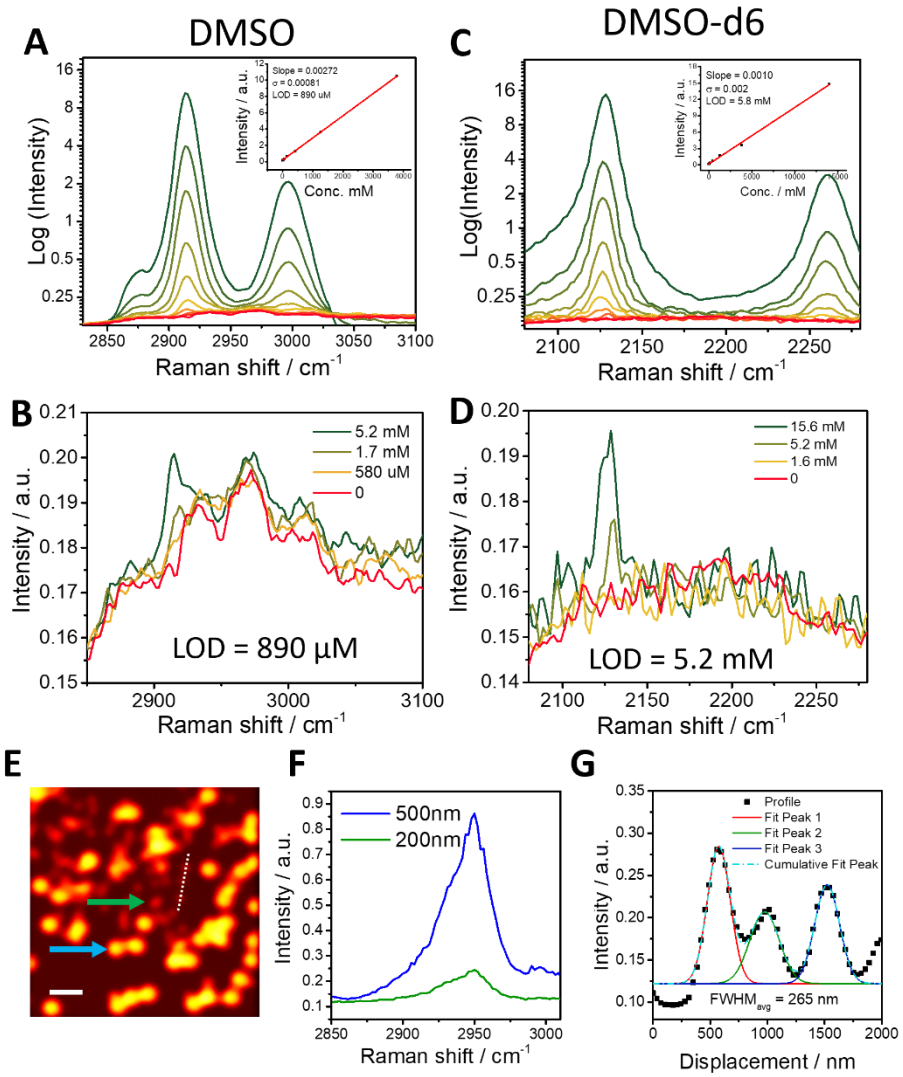


图4. spSRP显微镜的性能表征。A-D. spSRP显微镜的检测限. **A.** SRP光谱（对数刻度）随二甲基亚砜浓度的变化。插图显示强度与浓度之间的线性拟合。**B.** 低浓度二甲基亚砜的单像素SRP光谱（线性刻度）。**C.** 单像素SRP光谱（对数刻度）随氘代二甲基亚砜浓度的变化。插图显示强度与浓度之间的线性拟合。**D.** 低浓度氘代二甲基亚砜的单像素SRP光谱（线性刻度）。浓度单位：mM。**E-G.** 500 nm和200 nm PMMA纳米颗粒混合物的高光谱 spSRP 成像。**E.** 在2930 cm^{-1}处的spSRP成像。比例尺：1 µm。**F. E**中单个500 nm（蓝色箭头）或200 nm PMMA纳米颗粒（绿色箭头）的光谱。**G. E**中白色虚线的剖面。多峰高斯拟合得出的平均半峰全宽为~265 nm。

.

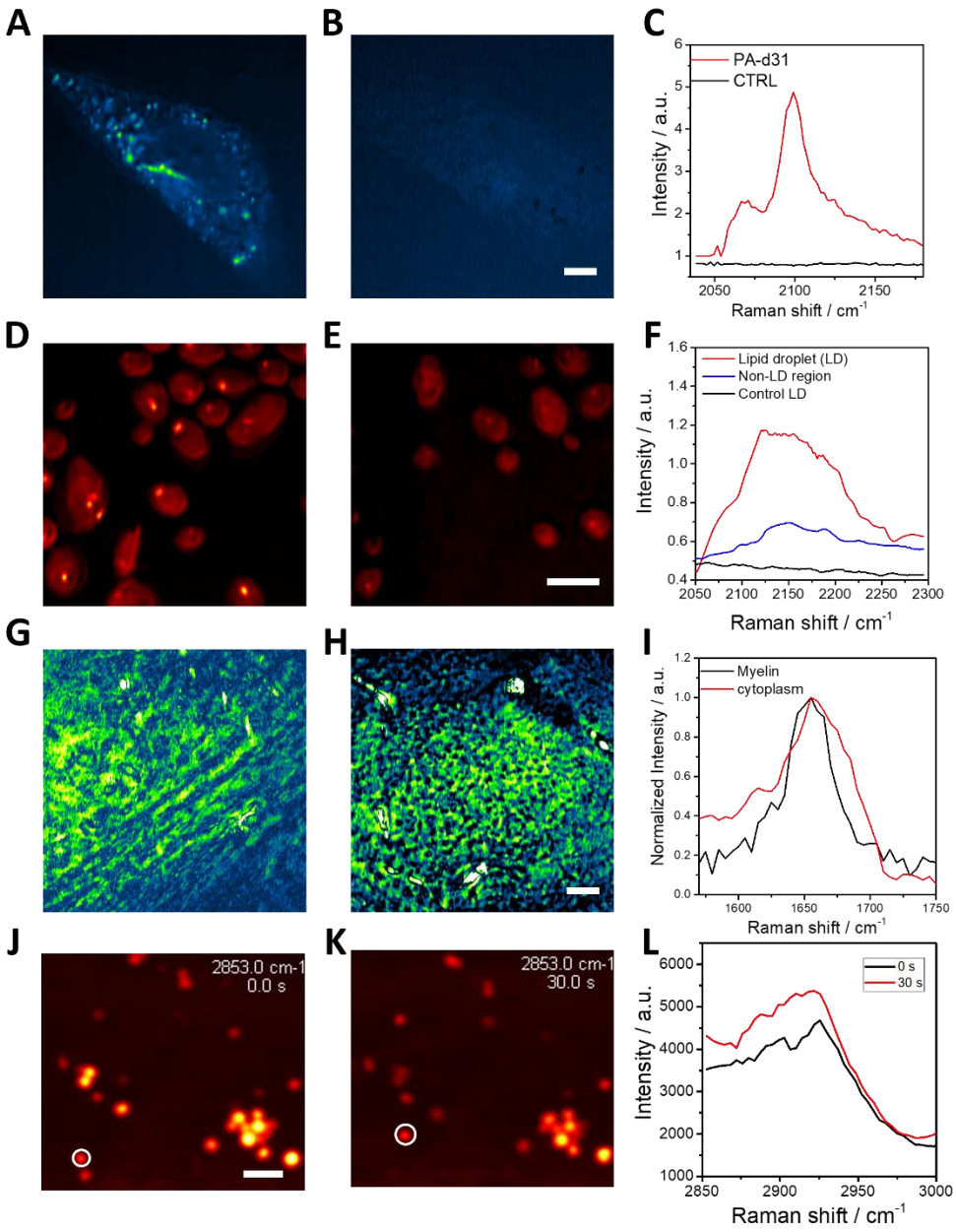


图5. 天然水环境中生物样品的SRP成像。 **A-C**. PA-d31培养的SJSA-1细胞的spSRP成像。比例尺：5 μm。**A**. 在2100 cm^{-1}处成像的PA-d31培养SJSA-1细胞。**B**. 培养基中未添加PA-d31的对照组，在2100 cm^{-1}处成像。**C**. PA-d31培养细胞中脂滴的光谱。对照细胞中未发现信号。**D-F**. 在50% D_2O中培养的白色念珠菌 真菌的spSRP成像。比例尺：5μm。**D**. 在50% D_2O中培养的白色念珠菌，于2150 cm^{-1}处成像。**E**. 未添加D_2O的对照组。**F**. 比较D_2O培养的白色念珠菌不同区域及对照组的光谱。**G-I**. 小鼠脑切片指纹区的spSRP成像。比例尺：15 μm。**G,H**. 脑部不同结构的代表性图像（**G**：髓鞘；**H**：细胞）。**I**. 代表性区域的光谱比较。**J-L**：活体HeLa细胞中脂滴的高速高光谱追踪。比例尺：2 μm。**J**和**K**分别显示细胞在t=0 和t=30 s时、2853 cm^{-1} 处的spSRP图像。**L**：受监测脂滴的SRP光谱，该脂滴以白色圆圈标示。

生物学应用

为探究spSRP成像在静默窗口中的适用性，我们研究了细胞对氘代棕榈酸（PA-d31）的摄取情况。**图5A-C**展示了与PA-d31孵育的 SJSA-1细胞的高光谱SRP图像。直接观察PA-d31拉曼共振处的SRP信号强度（2100 cm）可见，PA-d31在细胞内形成簇状分布，富含PA-d31的区域形态与脂滴和内质网相似。

光谱轮廓（**图5C**）在2100 cm^{-1}处显示一个峰，该处对应C-D伸缩振动。在未使用PA-d31处理的对照样品中，信号对比度非常弱（**图5B**），对应的信背比为~5。该信背比远高于此前使用基于OPO的SRP获得的结果（~1.3）（*24*），这主要归因于峰值功率的提升，进而使非线性光热过程与线性光热过程之间的比值更高。

为展示spSRP成像在微生物学应用中的可行性，我们通过测量重水的生物掺入情况，检测了白色念珠菌的代谢活性（**图5D-F**）。**图5D-E**展示了用（*D*）或未用（**E**）重水孵育的**白色念珠菌**的SRP图像。相比之下，处理组的信号明显强于未处理组，尤其是在其核心脂滴处。处理组的SRP光谱（**图5F**）在C-D伸缩振动窗口处呈现一个宽峰，主要来自掺入D_2O后产生的代谢产物。对照组的SRP光谱平坦且无明显特征，表明该信号并非源于拉曼效应。值得注意的是，随着高光谱扫描的持续进行，对照组的信号强度逐渐减弱，这表明存在色素电子吸收光热背景。理论上，可在SRP成像前通过光漂白降低或消除此背景。在漂白过程中，键选择性SRP信号不受影响。

我们进一步将应用范围拓展至指纹区，并以小鼠脑切片作为测试样本**图 5G-I**。我们选取了具有代表性的视野（FOV），以展示不同脑组织结构的成像效果。**图 5G**清晰呈现了髓鞘的形态，其光谱中具有相对窄带的 C=C 特征峰（~1650 cm^{-1}）（**图 5I**，黑线），表明髓鞘具有富脂特性。相反，**图 5H**突显了密集排列的细胞质细胞器，其光谱主要表现为相对宽带的酰胺I特征峰（~1650 cm^{-1}）（**图 5I**，红线）。这些结果共同证实，spSRP能够在复杂组织环境中实现高质量的指纹区成像。

单脉冲无调制测量方案进一步实现了活细胞的高速SRP成像。如**图 5J-L**所示，我们捕捉到了活体 HeLa 细胞内脂滴的动态变化。SRP图像以每秒10帧（FPS）的速度采集，获取一个30帧的高光谱图像堆栈仅需3秒。白色圆圈标出了一个在36秒数据采集期间持续移动的脂滴。凭借高速SRP成像能力，我们能够以极少的运动伪影获取该移动脂滴的光谱（**图 5L**）；而以往基于OPO的SRP每帧需~3.5秒（*24*），无法实现这一点。代表性图像（**图 S5**）和完整影片（**影片 S1**）见补充信息。这些数据还表明，采用适当脉冲啁啾的spSRP显微成像对活细胞造成的光损伤极小。

富含胆固醇的膜结构域的直接可视化

“脂筏”于 1997 年首次提出（*34*），是细胞膜内富含胆固醇和鞘脂的纳米尺度结构域（*14*、*35*），作为细胞信号传导（*36*）、物质转运（*37*）和病原体入侵（*13*）的重要组织中心发挥作用。人们通过去污剂处理的膜片发现了脂筏，这一发现彻底改变了我们对质膜的认识，使其从均一的“流动镶嵌”转变为动态组织的平台。然而，由于脂筏体积小、具有动态特性，且其脂质组成难以用荧光团标记（*15*），目前尚无直接的视觉证据。另一方面，无标记成像技术的灵敏度不足以呈现这些纳米尺度脂质结构。

spSRP的高灵敏度使其能够可视化此前在相干反斯托克斯拉曼散射或受激拉曼散射成像中无法观察到的纳米尺度脂质结构。如**图 6**所示，在固定并浸泡于氘代甘油-d8中的HeLa 细胞膜上，清晰观察到了细小的点状结构。在此，使用甘油可将SRP检测灵敏度提高~3倍（*24*）。这些膜结构域与抗小窝蛋白免疫荧光（**图 6B,C**、**图 S6**）共定位，表明它们很可能是小窝，这是一种细胞内吞过程中的关键结构。在这些膜结构域的光谱中发现了特征性胆固醇峰（2875 cm^{-1}）（**图 6E**，红线）；该峰有别于邻近膜区域（**图 6E**，黑线）和**图 6D**中标记的内部脂滴（**图 6E**，蓝线）。**图 6F**所示的一系列脂质结构域的光谱呈现于**图 6G**，所有光谱中均可见胆固醇特征峰。对这些膜结构域进行空间剖析（**图 6H,I**）并随后进行高斯拟合，得到~200 nm的半峰全宽，接近成像系统的衍射极限（~200 nm），表明这些膜结构域的尺寸可能远小于衍射极限。总之，通过spSRP显微成像，我们观察到在完整质膜环境中与小窝蛋白共定位良好的富胆固醇膜结构。

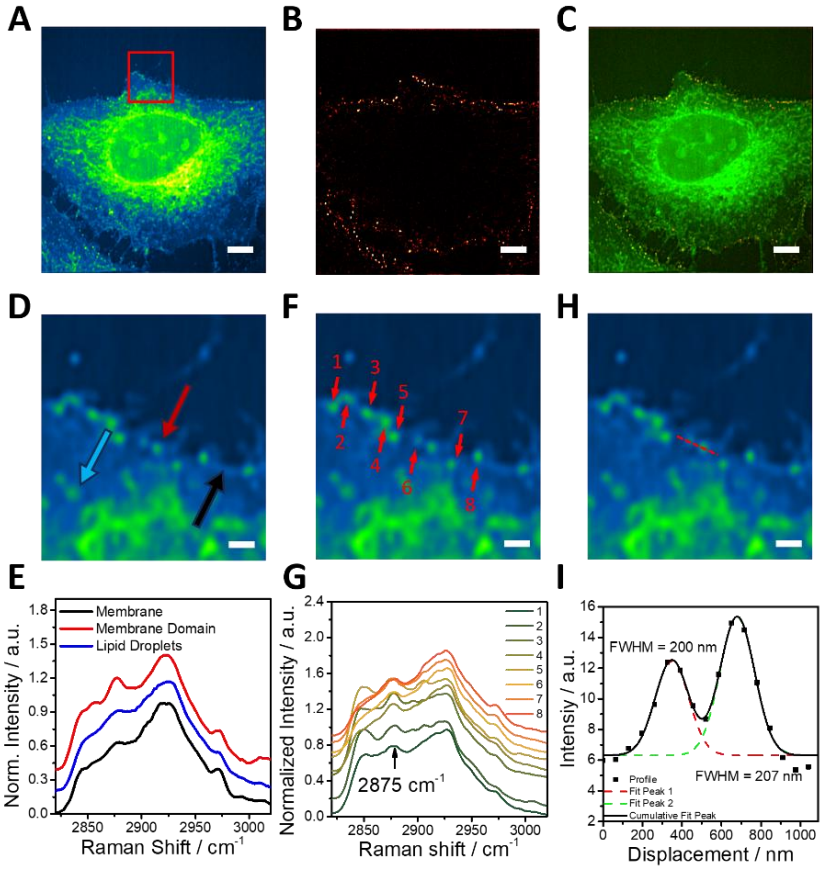


图6. spSRP可直接可视化富含胆固醇的膜结构域。A。将固定的HeLa细胞浸入氘代甘油-d8中进行spSRP成像。拉曼位移：2875 cm^{-1}。比例尺：3 μm。**B**。对同一细胞进行抗小窝蛋白免疫荧光染色。**C**。spSRP图像与免疫荧光图像的共定位。**D-I**。对**A**中红框区域进行放大分析。比例尺：600 nm。**D-E**。比较**D**中箭头所示不同区域的光谱（**E**）。**F-G**。膜上不同结构域的归一化SRP光谱（**G**），这些结构域由**F**中的红色箭头标示。为提高可视性，手动将光谱上移0.1。**H-I**。对**H**中的红色虚线进行强度分布分析和高斯拟合（**I**）。

讨论

我们报告了基于光学参量放大器的窄带受激拉曼散射光谱显微术（OPA-based spSRP microscopy）的理论分析与实验演示。我们对高激发峰值功率下受激拉曼散射（SRS）的饱和行为进行了数值建模，并据此指导泵浦激光脉冲的实验啁啾，使其达到~30 ps。我们还采用了径向分段平衡探测。结合光学参量放大器激光源的高峰值功率，这些创新使探测灵敏度优于常规SRS显微镜或基于光学参量振荡器的受激拉曼光谱显微镜。spSRP的高灵敏度使我们能够直接观察质膜中的富含胆固醇的结构域。下文将讨论spSRP显微术的优势、局限性、潜在改进及未来应用。

与基于OPO的受激拉曼散射或SRP显微术相比，spSRP在探测灵敏度和成像速度方面更具优势。得益于光学参量放大器激光器的高激光峰值功率，它能更高效地激发受激拉曼散射跃迁，从而产生较强的SRP信号。其固有的1 MHz测量频率也有助于避免探测激光的低频噪声。结合径向分段平衡探测的应用（该技术可进一步降低探测激光的噪声底），与先前报道的基于OPO的SRP显微镜相比，我们将灵敏度提高了~ 2.5倍；与常规SRS显微镜相比，则提高了~44倍。目前，高速spSRP成像已达到~10 帧每秒，采集一个30帧的高光谱图像堆栈仅需3秒，因此能够对活细胞的代谢活动进行光谱跟踪。

spSRP系统仍有进一步改进的空间。首先，当前配置中泵浦激光器与斯托克斯激光之间的光谱带宽差异，是阻碍灵敏度进一步提升的主要原因。目前，泵浦激光束的带宽为~ 300 cm^{-1}，而斯托克斯光带宽仅为~ 60 cm^{-1}。因此，经过啁啾后，斯托克斯脉冲的脉冲宽度仅为泵浦激光脉冲的~1/5，泵浦激光脉冲的大部分在时间上并未与斯托克斯脉冲重叠，这部分能量只会造成背景和光损伤，而不能提高信号。其次，当前成像速度受扫描器的带宽限制。将带宽限制为1 kHz的振镜替换为高速扫描器后，理想情况下可实现高达20~30 FPS的视频速率受激拉曼光谱成像。在如此高速的spSRP测量中，一个潜在问题是积分时间短导致信噪比低。不过，信噪比可通过去噪算法恢复，例如最近开发的、用于去除高光谱成像中非独立噪声的SPEND（*38*）。

通过匹配泵浦和斯托克斯激光脉冲的带宽，并采用高性能扫描器，我们预计当前版本的 spSRP显微镜的灵敏度将提高 ~5 倍，速度将提高 ~3 倍。凭借 ~200 μM 的检测灵敏度和 ~30 帧每秒的成像帧率，这项新技术将在生物学应用领域带来诸多机遇，例如研究膜结构域的结构与动态、评估抗微生物药物敏感性（*39*）、研究病毒-膜相互作用（*9*）等。

材料与方法

样品制备

SJSA-1细胞：购自美国典型培养物保藏中心（ATCC，货号：CRL-2098）。细胞培养于RPMI-1640培养基（Gibco）中，并补充10%（v/v）胎牛血清（FBS）和1%（v/v）青霉素/链霉素（P/S）。所有细胞均在37 °C、5%二氧化碳的加湿培养箱中培养。对于C-D标记组，先将细胞培养至贴附于玻底培养皿，然后在含去脂血清的RPMI-1640培养基中孵育3小时。随后，将细胞置于含50 μM PA-d31的培养基中孵育18小时。之后，用

10%中性缓冲福尔马林固定30分钟，随后用磷酸盐缓冲液（PBS）清洗3次，再进行显微成像。

小鼠脑组织样本：对小鼠实施安乐死后，经心脏灌注磷酸盐缓冲液（PBS， 1×，pH 7.4，赛默飞世尔科技公司）溶液和 10% 福尔马林，使固定液循环流经整个脉管系统。固定后，取出脑组织，并在 10% 福尔马林溶液中固定 24 小时，以确保完全固定。随后，将小鼠脑组织浸入 1× PBS 溶液中，再使用振荡组织切片机（OST-4500，电子显微镜科学公司）水平切成厚度为 100 μm 的切片。

HeLa细胞：进行活细胞成像时，将 HeLa 细胞置于 2 ml 最低必需培养基中，在 37°C、5 % CO_2, 条件下培养过夜，然后直接进行成像。进行脂质结构域成像时，以 1×10^5 ml^{-1} 的密度将 HeLa 细胞接种于 No.1 玻璃盖玻片上，在 2 ml 最低必需培养基中于 37°C、5% CO_2条件下培养过夜。随后，用 4% 甲醛固定细胞 15 分钟。用 PBS 清洗固定后的细胞两次，然后进行免疫荧光染色，以标记小窝蛋白。之后，弃去 PBS，并向细胞中加入 1 滴氘代甘油-d8。最后，将细胞夹在一片盖玻片下进行成像。

真菌：首先将真菌分离株（白色念珠菌 SC5314）复苏，并在无菌 YPD 琼脂平板上于 30 °C 培养。随后，将真菌分离株置于轨道振荡器（VWR，型号 3500I）中，在 45°倾斜角和 200 rpm 的振荡速度下，于 30 °C 在无菌 YPD 肉汤培养基中培养。收集对数期细胞并离心，然后稀释至 10^6 CFU ml^{-1} ，置于含 D_2O 的 RPMI 1640培养基（90% D_2O）中进行代谢掺入。配制 RPMI 1640培养基时，使用 MOPS 缓冲剂将培养基溶液的 pH 值调至 7.0。最终溶液经 200 nm 滤膜过滤灭菌。细胞经离心后，用新鲜的 1×磷酸盐缓冲液洗涤，然后固定于 10% 福尔马林溶液中。成像前，使用 1×磷酸盐缓冲液将真菌样本洗涤两次。成像时，将细胞夹在两片盖玻片（VWR国际）之间。

免疫荧光

固定的HeLa细胞首先用冷的含0.1%曲拉通X-100的磷酸盐缓冲液透化3分钟。用磷酸盐缓冲液洗涤3次后，细胞用溶于 0 1 2 1 1 . μ 12 M甘氨酸的5%牛血清白蛋白（BSA）封闭hr。然后将抗小窝蛋白抗体（Abcam）稀释至g/mL，并加入细胞培养物中hr。弃去溶液，细胞用磷酸盐缓冲液洗涤3次，然后在避光条件下与1 μg/mL二抗（抗兔IgG Alexa 488）孵育1小时。染色后的细胞在送去成像前用磷酸盐缓冲液洗涤3次。

spSRP显微镜

在Spectra-Physics Spirit30（Newport）泵浦激光器光路中插入一个90/10分束器，以提取部分1045 nm光束作为受激拉曼散射中的斯托克斯光束，并将NOPA系统的信号输出用作受激拉曼散射中的泵浦光束。斯托克斯光束首先7次穿过15 cm SF11玻璃棒（Vibronix Inc）进行啁啾，以补偿两个波长之间不平衡的啁啾。随后，这两列脉冲序列在空间和时间上对准，并16次穿过15 cm SF11玻璃棒进行啁啾。在斯托克斯光路上部署电子延迟线，以控制相对延迟，从而控制测量的光谱聚焦波数。520 nm连续波探测激光器首先用望远镜调节至合适的光束尺寸和准直状态，再经二向色镜合束，作为探测光束。三束光被导入二维振镜扫描单元（GVS002；Thorlabs），该单元通过四焦点系统与 60× 水浸物镜（数值孔径= 1.2，UPLSAPO60XWIR；Olympus）的后孔径共轭。调节聚光镜的数值孔径，使输出的探测光束略微发散。随后将瞳面中继

至一面小反射镜，在此处将输出光束的内圈与外圈部分分割并分别测量。探测器为两个宽带硅光电二极管（滨松），配有50欧姆电阻、一个130 kHz高通射频滤波器（Mini-Circuits）以及一个40 dB低噪声放大器（CMP60116-2；NF Electronics.）。在探测器前安装光学带通滤波器（FBH520-40；Thorlabs），以阻挡受激拉曼散射光束，仅检测探测光束。输出信号由快速数据采集卡（Alazar采集卡，ATS9462；Alazar Technologies）进行数字化。

参考文献

1. J.-X. Cheng, X. S. Xie, 生命系统的振动光谱成像：生物学与医学的新兴平台. 《科学》 **350**, aaa8870 (2015). 2. J.-X. Cheng, Y. Yuan, H. Ni, J. Ao, Q. Xia, R. Bolarinho, X. Ge, 面向生命科学的先进振动显微镜. 《自然·方法》 **22**, 912–927 (2025). 3. J.-X. Cheng, X. S. Xie, 相干反斯托克斯拉曼散射显微术：仪器、理论与应用. 《物理化学杂志*B*》 **108**, 827–840 (2004). 4. C. H. Camp Jr, M. T. Cicerone, 基于相干拉曼散射的化学敏感性生物成像. 《自然·光子学》 **9**, 295–305 (2015). 5. W. Min, J.-X. Cheng, Y. Ozeki, 受激拉曼散射显微镜的理论、创新与应用. 《自然·光子学》 **19**, 803–816 (2025). 6. X. Gao, N. Qian, W. Min, 受激拉曼散射显微镜原理：涌现于高时空极限. 《物理化学杂志*C*》 **129**, 5789–5797 (2025). 7. C. W. Freudiger, W. Min, B. G. Saar, S. Lu, G. R. Holtom, C. He, J. C. Tsai, J. X. Kang, X. S. Xie, 利用受激拉曼散射显微镜实现高灵敏度无标记生物医学成像. 《科学》 **322**, 1857–1861 (2008). 8. R. C. Prince, R. R. Frontiera, E. O. Potma, 受激拉曼散射：从块体到纳米. 《化学评论》 **117**, 5070–5094 (2017). 9. H. Lin, S. Seitz, Y. Tan, J.-B. Lugagne, L. Wang, G. Ding, H. He, T. J. Rauwolf, M. J. Dunlop, J. H. Connor, J. A. Porco, L. Tian, J.-X. Cheng, 通过超灵敏重加权可见光受激拉曼散射实现细胞代谢的无标记纳米显微术. 《自然·方法》 **22**, 1040–1050 (2025). 10. W.-W. Chen, G. A. Lemieux, C. H. Camp, T.-C. Chang, K. Ashrafi, M. T. Cicerone, 秀丽隐杆线虫的光谱相干拉曼成像揭示脂质颗粒多样性. 《自然 · 化学生物学》 **16**, 1087–1095 (2020). 11. H. Jia, S. Yue, 受激拉曼散射成像为脂滴生物学带来新启示. 《物理化学杂志*B*》 **127**, 2381–2394 (2023). 12. C. Zhang, 细胞和组织中脂滴的相干拉曼散射显微术. 《拉曼光谱学杂志》 **54**, 988–1000 (2023). 13. R. Kulkarni, E. A. C. Wiemer, W. Chang, 脂筏在病原体-宿主相互作用中的作用 -

A

迷你综述。免疫学前沿 **12**（2022）。

14. A. B. Ouweneel, M. J. Thomas, M. G. Sorci-Thomas, 《脂筏的来龙去脉：在细胞内胆固醇稳态、微粒和细胞膜中的功能》：专题综述系列：《脂质研究杂志》**61**，676–686（2020）。15. E. Sezgin, I. Levental, S. Mayor, C. Eggeling, 《膜组织之谜：脂筏的组成、调控及作用》。《自然综述：分子细胞生物学》 **18**，361–374（2017）。16. C. W. Freudiger, W. Yang, G. R. Holtom, N. Peyghambarian, X. S. Xie, K. Q. Kieu, 采用稳健光纤激光光源的受激拉曼散射显微镜。《自然·光子学》 **8**，153 159 2014–（）。17. Z. Xu, K. Oguchi, Y. Taguchi, S. Takahashi, Y. Sano, T. Mizuguchi, K. Katoh, Y. Ozeki，高功率范围内的量子增强受激拉曼散射显微镜。《光学快报》，*OL* **47**，5829–5832（2022）。18. Z. Xu, K. Oguchi, S. Nitanai, Y. Taguchi, Y. Sano, Y. Ozeki，双偏振量子增强受激拉曼散射显微镜。《应用物理快报》 **123**，024006（2023）。19. Z. Xu, S. Nitanai, K. Oguchi, Y. Ozeki，借助量子光提升受激拉曼散射显微镜的灵敏度：现状与未来挑战。应用物理学

s.

通讯 **127**, 040501 (2025). 20. H. Xiong, L. Shi, L. Wei, Y. Shen, R. Long, Z. Zhao, W. Min，受激拉曼激发荧光光谱与成像。《自然·光子学》 **13**, 412–417 (2019). 21. H. Xiong, N. Qian, Y. Miao, Z. Zhao, C. Chen, W. Min，通过受激拉曼激发荧光实现超分辨振动显微镜。《光：科学与应用》 **10**, 87 (2021). 22. C. Zong, Y. Xie, M. Zhang, Y. Huang, C. Yang, J.-X. Cheng，等离激元增强相干反斯托克斯拉曼散射与等离激元增强受激拉曼散射：线形和增强因子的比较。《化学物理杂志》 **154**, 034201 (2021). 23. C. Zong, R. Premasiri, H. Lin, Y. Huang, C. Zhang, C. Yang, B. Ren, L. D. Ziegler, J.-X. Cheng，具备单分子检测灵敏度的等离激元增强受激拉曼散射显微镜。《自然·通讯》 **10**, 5318 (2019). 24. Y. Zhu, X. Ge, H. Ni, J. Yin, H. Lin, L. Wang, Y. Tan, C. V. Prabhu Dessai, Y. Li, X. Ten

g,

J.-X. Cheng，受激拉曼光热显微术迈向超灵敏化学成像。《科学进展》 **9**, eadi2181（2023）。25. X. Ge、Y. Zhu、D. Sun、H. Ni、Y. Li、C. V. P. Dessai、J.-X. Cheng，基于光纤激光器的受激拉曼光热显微术：迈向高性能且用户友好的化学成像平台。*PhotoniX* **6**，35（2025）。26. A. Dubietis、A. Matijošius，桌面式光学参量啁啾脉冲放大器：过去与现在。《光电子进展》 **6**，220046–27（2023）。27. N. G. Horton、K. Wang、D. Kobat、C. G. Clark、F. W. Wise、C. B. Schaffer、C. Xu，完整小鼠脑内皮层下结构的活体三光子显微术。《自然·光子学》

n.

7, 205–209（2013）。

28. J. Miyazaki, H. Tsurui, K. Kawasumi, T. Kobayashi, 利用径向分段平衡探测增强光热显微镜的灵敏度。《光学快报》，*OL* **40**, 479 482 2015– ( )。29. X. Gao, X. Li, W. Min, 分子的绝对受激拉曼截面。《物理化学快报》 **14**, 5701–5708 (2023)。30. W. Min, X. Gao, 受激拉曼散射显微镜的绝对信号：一种量子电动力学处理。《科学进展》 **10**, eadm8424 (2024)。31. X. Gao, W. Min, 受激拉曼散射显微镜的量子理论。《化学物理评论》 **6**, 021306 (2025)。

32. A. Fendt, S. F. Fischer, W. Kaiser, 《多原子分子的振动寿命与费米共振》。《化学物理》 **57**, 55–64（1981）。

33. W. N. Martens, R. L. Frost, J. Kristof, J. Theo Kloprogge，298 时二甲基亚砜和氘代二甲基亚砜的拉曼光谱**33**，84 77 91 2002 和 K. 《拉曼光谱学杂志》–（）。

34. K. Simons, E. Ikonen，细胞膜中的功能性筏。《自然》*387*, 569–572（1997）。

35. J. Ando, M. Kinoshita, J. Cui, H. Yamakoshi, K. Dodo, K. Fujita, M. Murata, M. Sodeoka，通过拉曼显微镜观察人工单层膜脂筏中的鞘磷脂分布。《美国国家科学院院刊》 112, 4558–4563 (2015)。

36. P. Varshney, V. Yadav, N. Saini，免疫信号传导中的脂筏：当前进展与未来展望。《免疫学》 149, 13–24 (2016)。

37. M. A. Alonso, J. Millán，脂筏在T淋巴细胞信号传导和膜运输中的作用。《细胞科学杂志》 114, 3957–3965 (2001)。

38. G. Ding, C. Liu, J. Yin, X. Teng, Y. Tan, H. He, H. Lin, L. Tian, J.-X. Cheng，自监督消除高光谱成像中的非独立噪声。《牛顿》 1, 100195 2025( )。

39. M. Zhang, W. Hong, N. S. Abutaleb, J. Li, P.-T. Dong, C. Zong, P. Wang, M. N. Seleem, J.- X. Cheng，通过对 D27 进行受激拉曼散射成像，快速测定抗菌药物敏感性：单个细菌中的 O 代谢掺入。《先进科学》（），2001452，2020。

致谢与经费支持： 美国国立卫生研究院资助项目
R35GM136223（JXC）；美国国立卫生研究院资助项目
R01EB032391（JXC）；美国国立卫生研究院资助项目
R01EB035429（JXC）。**作者贡献：**概念构思：Y.Z.、
J.X.C.；方法学：Y.Z.、H.N.；软件：Y.Z。

调查研究：Y.Z.；可视化：Y.Z.；资源：H.H.、Y.L.、M.Z.；监督：J.X.C.；撰写—初稿：Y.Z.；撰写—审阅与编辑：Y.Z.、J.X.C。

利益冲突： J.X.C. 声明其在 VibroniX Inc. 和 Photothermal Spectroscopy Corp. 拥有经济利益，这两家公司均未资助本研究。J.X.C、Y.Z.、X.G.、H.N.、J.Y. 是一项专利申请（美国临时申请号63/441,297）的发明人，该申请由波士顿大学提交，涵盖受激拉曼光热显微术。所有其他作者均声明不存在利益冲突。

数据和材料可用性： 所有数据均可根据合理请求向通讯作者索取（jxcheng@bu.edu（J. X.C.））

Science Advances
AAAS

补充材料

单脉冲受激拉曼光热显微术可直接可视化富含胆固醇的膜结构域

Zhu Yifan 等

*通讯作者。电子邮箱：jxcheng@bu.edu

此 PDF 文件包括：

补充文本、图 S1 至 S6、影片 S1 说明

本手稿的其他补充材料包括以下内容：

影片 S1

补充文本

高峰值功率条件下受激拉曼散射激发饱和的建模

对于具有振动基态 |g> 和振动激发态 |v>的分子，在光子通量为 $\phi(t)$ 的泵浦和斯托克斯激光脉冲的受激拉曼散射激发下，任意时刻受激拉曼散射激发的速率常数 (k_{exi}) 为：

$$k_{exi}(t) = \sigma \cdot \phi_p(t)\phi_{St}(t) \quad (S1)$$

其中，σ 是受激拉曼散射跃迁的截面，$\phi_p(t)$和$\phi_{St}(t)$分别表示泵浦脉冲和斯托克斯脉冲的光子通量随时间的变化。相同的泵浦和斯托克斯激光脉冲也会以相同的速率常数诱导反向受激拉曼散射过程：

$$k_{rev}(t) = \sigma \cdot \phi_p(t)\phi_{St}(t) \quad (S2)$$

受激拉曼散射自发衰减的速率常数（k_{dec}）可由振动态寿命τ求得：

$$k_{dec} = 0.693/\tau \quad (S3)$$

请注意，衰减的速率常数不随时间变化。

Then the rate of SRS excitation (r_{exi}), reverse SRS (r_{rev}) and decay (r_{dec}) could be defined:

$$r_{exi}(t) = k_{exi}(t) \cdot [g](t) \quad (S4)$$

$$r_{rev}(t) = k_{rev} \cdot [v](t) \quad (S5)$$

$$r_{dec}(t) = k_{dec} \cdot [v](t) \quad (S6)$$

其中，$[g](t)$和$[v](t)$分别是在任意时刻处于基态（|g>）和激发态（|v>）的分子数，且满足：

$$[v](t) + [g](t) = [g](0) \quad (S7)$$

其中，$[g](0)$是分子总数。

例如，在从$t = 0$开始的恒定激发光通量$\phi_p(t)$和$\phi_{St}(t)$作用下，$k_{exi}(t)$会变为常数，受激拉曼散射激发与衰减最终达到平衡态，定义如下：

$$r_{exi}(t) = r_{dec}(t) + r_{rev}(t) \quad (S8)$$

在这种平衡态下：

$$k_{exi} \cdot [g](t) = (k_{dec} + k_{rev}) \cdot [v](t) \quad (S9)$$

公式 S9 中的条件如**图 1A** 所示。

任意时刻激发态布居的变化可表示为：

$$d[v](t) = \left(r_{exi}(t) - r_{dec}(t) - r_{rev}(t)\right)dt \quad (S10)$$

随后，激发态布居满足：

$$[v](t) = \int_0^t d[v](t) \quad (S11)$$

此外，累积的 SRS 非辐射衰变事件数与热量产生成正比，可表示为：

$$N_{SRS}(t) = \int_0^t r_{dec}(t)\, dt \quad (S12)$$

采用更接近实际情况的高斯光子通量，其中 ϕ_0 为脉冲的最大光子通量，t_0 为脉冲的时间中心，FWHM 为脉冲宽度：

$$\phi(t) = \phi_0 \exp\left(-\frac{(t - t_0)^2}{0.361 \cdot \mathrm{FWHM}^2}\right) \quad (S13)$$

模拟可通过联立式S1~S7与式S10~S13进行。

对于单分子（$[g](0) = 1$），$[v]$ 和 $[g]$ 成为该分子处于激发态或基态的概率，N_{SRS} 成为发生在该单分子上的SRS激发事件的期望值。单分子的模拟结果见**图2C-D**。

图 S1. 啁啾泵浦光和斯托克斯脉冲的自相关测量。最大测量范围为 50 ps。

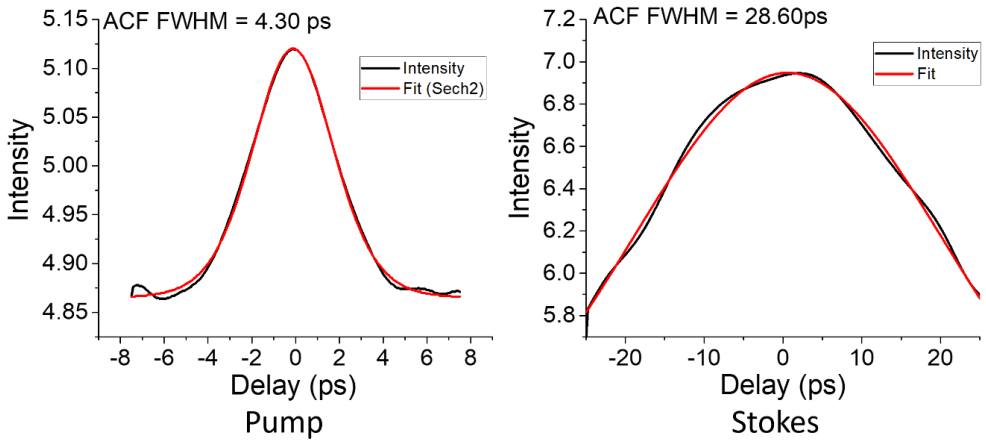


图 S2 平衡探测中聚光镜后焦面与分割镜之间的中继关系。

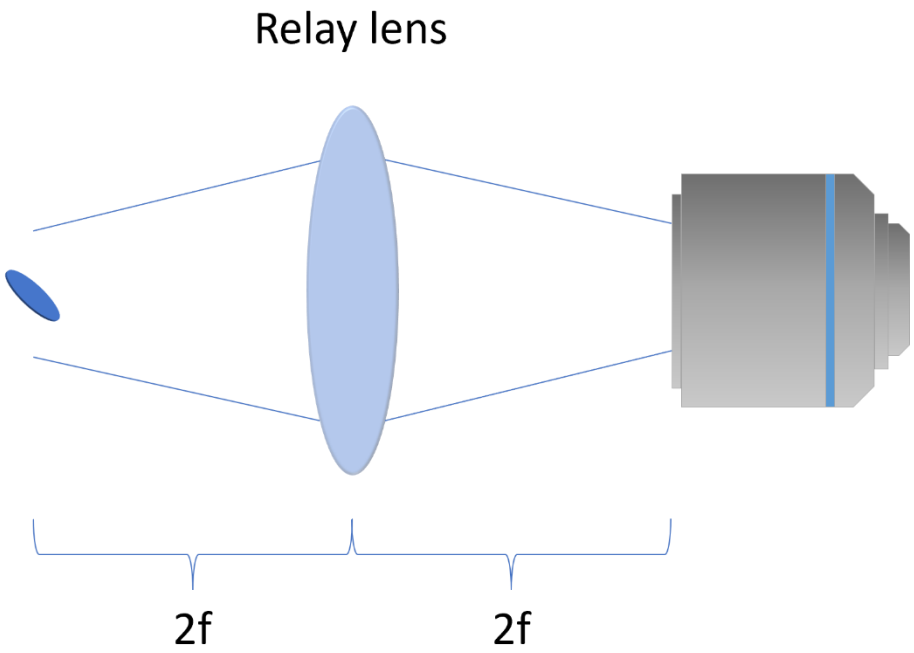


图 S3 平衡光热检测的傅里叶域分析。

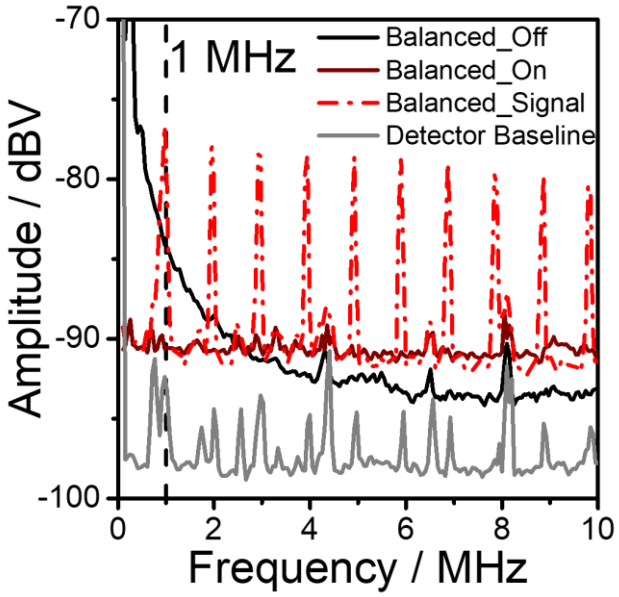


图 S4. 使用氘代二甲基亚砜作为测试平台的 spSRP显微镜光谱分辨率表征。对 2125 cm^{-1} 进行洛伦兹拟合，得到 9.9 cm^{-1} 光谱半高全宽。

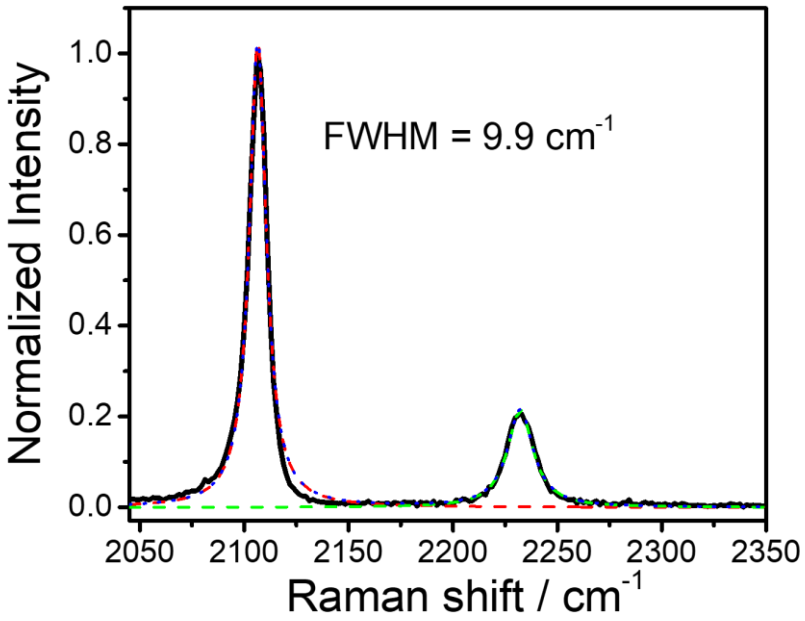


图 S5. 活体 HeLa 细胞的 spSRP 图像延时摄影。比例尺：2 μm。

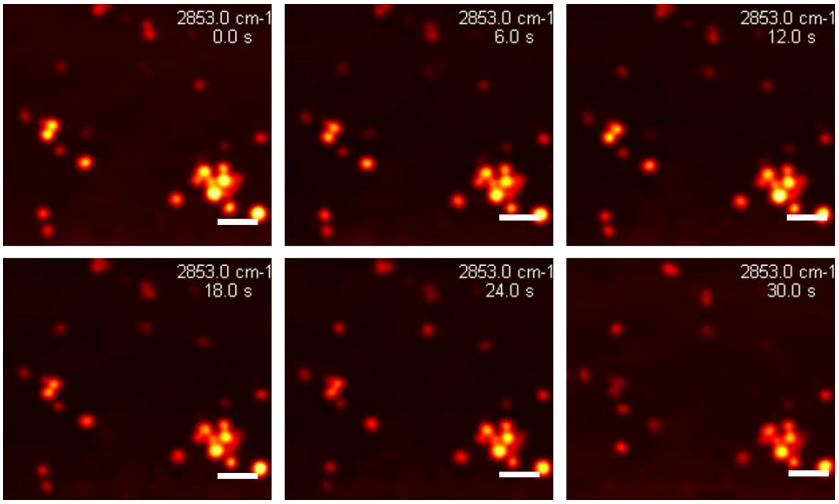
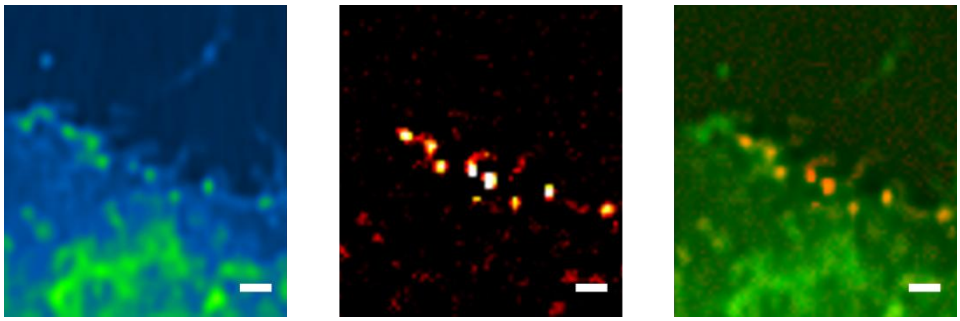


图 S6 富含胆固醇的膜结构域的spSRP图像（左）与小窝蛋白免疫荧光（中）之间共定位的放大图。比例尺：600 nm。



影片 S1。**活体HeLa 细胞内脂质动态的高光谱 spSRP 成像**。帧率：0.1 s/帧，每个高光谱图像堆栈3秒。