

引用格式: WU Simin, ZHANG Bohan, ZHENG Bin, et al. Pump-probe Microscopy: Applications in Biomedicine and Materials Science (Invited)[J]. Acta Photonica Sinica, 2021, 50(8):0850211

吴思敏,张博涵,郑彬,等. 泵浦-探测显微镜在生物医学和材料科学领域的应用(特邀)[J]. 光子学报, 2021, 50(8):0850211

泵浦-探测显微镜在生物医学和材料科学领域的 应用(特邀)

吴思敏¹,张博涵¹,郑彬³,季敏标^{1,2}

(1 复旦大学物理学系表面物理国家重点实验室,上海 200433)

(2 复旦大学义乌研究院,浙江 义乌 322000)

(3 浙江省人民医院,杭州 310014)

摘要:对生物体系微观动态过程以及材料科学领域粒子超快行为的观测能够帮助人们更深入、更微观地去理解生物体系和材料中的超快响应。泵浦-探测显微镜是结合了超快激光领域的泵浦-探测技术以及显微成像技术的新型表征手段,通过选择不同的探测模式,可以实现对不同体系微观机制的探索和表征。本文从泵浦-探测技术的原理出发,阐述了泵浦-探测过程中涉及到的激发态吸收、受激辐射和基态损耗三种非线性过程,泵浦-探测显微镜的构成及其在生物医学和材料科学领域的发展现状和应用。

关键词:泵浦-探测显微镜;生命科学;生物医学;材料科学

中图分类号:O437

文献标识码:A

doi:10.3788/gzxb20215008.0850211

Pump-probe Microscopy: Applications in Biomedicine and Materials Science (Invited)

WU Simin¹,ZHANG Bohan¹,ZHENG Bin³,JI Minbiao^{1,2}

(1 State Key Laboratory of Surface Physics, Department of Physics, Fudan University, Shanghai 200433, China)

(2 Yiwu Research Institute of Fudan University, Yiwu, Zhejiang 322000, China)

(3 Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China)

Abstract: Observations of the microscopic dynamics of biological systems and the ultrafast behavior of particles in materials science can help us understand the ultrafast response of biological systems and materials in a deeper and more microscopic way. The pump-probe microscope is a new characterization method combing the pump-probe technology and microscopic imaging. By selecting different detection modes, the micro-mechanisms of different systems can be explored and characterized. In this review, the principle of pump-probe technology is first introduced. Then three major nonlinear principle in pump-probe process (excited-state absorption, stimulated emission and ground-state depletion), the construction of pump-probe microscope, and the current developments and applications of pump-probe microscopy in biomedicine and materials science are discussed.

Key words: Pump-probe microscopy; Life science; Biomedicine; Materials science

OCIS Codes: 300.6530; 160.1435; 160.4236; 160.4670

基金项目:国家自然科学基金(No. 61975033),上海市科技重大专项(Nos.2017SHZDZX01,2018SHZDZX01),上海市卫生计生委智慧医疗专项研究项目(No.2018ZHYL0204),浙江省自然科学基金/探索项目(No.LY20H130005),浙江省医药卫生科技计划(No.2019RC006)

第一作者:吴思敏(1998—),女,博士研究生,主要研究方向为非线性光学显微成像。Email: 20110190080@fudan.edu.cn

导师(通讯作者):季敏标(1982—),男,教授,博士,主要研究方向为非线性光谱学在交叉学科中的应用,包括新型光学显微成像技术研发并用于生物医学问题和新材料的光电子特性等。Email: minbiaoj@fudan.edu.cn

收稿日期:2021-06-21;**录用日期:**2021-07-28

<http://www.photon.ac.cn>

0 引言

泵浦-探测技术最早由 TOEPLER A 在 1867 年提出,之后由于脉冲激光的问世,研究者将泵浦-探测技术与超快光联系起来,用于研究超快时间尺度下的物理、化学过程。诺贝尔化学奖获得者 ZEWAIL A 在 1987 年首次利用飞秒激光泵浦-探测技术,以亚埃级别的分辨率观察到了碘化银的光分解反应,这是人类有史以来首次观察到了化学反应中的基元反应过程^[1]。ZEWAIL A 等的相关研究^[1-3]极大地加深了当时人们对溶质和溶剂中动力学的理解,在小分子系统的研究中获得了巨大的成功。之后,超快激光的泵浦-探测技术的发展突飞猛进,在生物学^[4-5]、生物医学^[6-7]、化学^[1-3]、半导体材料^[8-9]、纳米材料^[10-17]等领域广泛应用,因此为人们研究材料中的微观行为和超快动力学领域带来了新的曙光。

简单来说,泵浦-探测技术由第一束泵浦光将分子泵浦成激发态,第二束探测光以相对于泵浦激光不同的时间延迟来探测处于激发态的分子,由于激发态迟豫过程的时间尺度在飞秒或皮秒量级,因此通过泵浦-探测能够揭示激发态的动力学过程^[18-21]。近年来,结合显微成像技术,泵浦-探测显微镜^[19]作为一种新兴的非线性光学成像技术出现在大众面前,与一般的线性光学显微镜(如荧光显微镜)不同,泵浦-探测显微镜为双光子或多光子参与的过程,通过非线性光学过程来特异性地激发分子,提升分辨率和穿透深度。

在材料科学领域,泵浦探测显微镜作为一种重要的研究手段被用来表征不同的材料,例如纳米结构材料(纳米线^[11-15, 22]、纳米管^[17]、纳米带等)、二维材料(石墨烯^[16, 23-26]、黑磷^[27]、过渡金属硫化物^[28-31]、钙钛矿^[32-38]),以及金属纳米颗粒材料等。由于泵浦光和探测光均为超快光,他们的时间尺度为皮秒或者飞秒量级,通过改变泵浦光和探测光之间的时间延迟,能够对材料中不同粒子的基态和激发态进行探测。由此,通过泵浦-探测显微镜,不仅能够对材料进行成像表征,还能够得到其在光激发下相关的光物理信息,例如基态和激发态动力学、声子动力学^[14, 24, 27, 31],以及环境因素如基板接触等^[23, 26, 28]对材料动力学的影响等。

在生物医学领域,荧光显微镜技术^[39-42]为使用最频繁的线性光学显微镜,是基于单光子线性吸收的成像技术。虽然存在基于双光子或多光子吸收的非线性荧光显微镜,但它们都存在一个主要的限制,就是必须使用外源性(如染料、量子点)或者内源性(如细胞自发荧光)荧光标记物^[43-46]。因此,对于无荧光的物质无法进行探测,除此外,染料分子或许会对生物体系产生毒性。所以,相对一般的线性光学显微镜来说,泵浦-探测显微镜能做到:1)对细胞或者组织进行无损探测;2)作为一种无标签技术,不需要染色,不需要对生物组织之外的分子进行探测;3)由于非线性效应,成像具有高分辨率和高穿透深度的优点;4)只在焦平面处产生较强的信号,因此不会受到来自其它处样品散射光的影响,可以得到 z 方向不同深度的成像信息。

本文从泵浦-探测的原理出发,介绍泵浦-探测显微镜的基本结构和在材料科学以及生物医学领域的相关研究成果。

1 泵浦-探测技术基本原理

在泵浦-探测测量过程中,通过分别得到有无泵浦光情况下的探测光强度,可以得到泵浦光引起的探测光的强度变化。在半导体材料中,当这种光强度变化与电子激发态相关时,激发态的动态信息将经过调制过程编码到探测过程,再经过解调过程被测量到。在生物医学中,泵浦光的光强与分子的吸收与否有关,通过调制解调即能得到相应物质的动态变化过程。泵浦-探测显微镜最常见的模式为透射模式,在透射模式下能够采集到更多的信号,得到更优异的图像和动力学信息。此外,反射模式在泵浦-探测技术中也非常常见^[11, 31, 47-49],用于不同的探测条件和不同的探测样品中。本文主要以透射模式为主讲解泵浦-探测显微镜的原理。

泵浦-探测显微镜涉及到双光子探测,其主要物理机制涉及三个主要类型的过程,即激发态吸收(Excited State Absorption, ESA)、基态损耗(Ground-State Depletion, GSD)、受激辐射(Stimulated Emission, SE),其他例如受激拉曼散射(Stimulated Raman Scattering, SRS)、交叉相位调制(Cross Phase Modulation, XPM)和双光子吸收(Two-Photon Absorption, TPA)也是类似泵浦-探测的双光子探测过程,但不同的是他们虽然能够特异性地针对分子或者能级进行表征,但是不会携带物质分子或激发态的动力学信息。

对于一个典型的泵浦-探测过程,泵浦光引入的强度变化在归一化之后可以被表示成 $\Delta I_{pr}/I_{pr}$ 。为了在分子水平上描述这一过程,对于一个电子跃迁过程,定义能级 i 和 j 之间的吸收系数为

$$\alpha_{ij}(\omega) = \sigma_{ij}(\omega)(N_i - N_j) \quad (1)$$

式中, $\sigma_{ij}(\omega)$ 为从电子态 i 到 j 的散射截面, N_i 和 N_j 分别是初态和末态的粒子数。一般情况下, $\alpha_{ij}(\omega)$ 为正值代表了探测光吸收而负值代表了探测光增益。

泵浦光脉冲作用在分子上时,不同能级的分子数会发生变化,例如基态粒子数目减少使得激发态粒子数增多,探测光能够测量这一过程的变化,基于朗伯比尔吸收定律做近似,归一化之后的 $\Delta I_{pr}/I_{pr}$ 可以表示成

$$\frac{\Delta I_{pr}}{I_{pr}} = - \sum_{i,j} \alpha_{ij}(\omega) \Delta N_j d \quad (2)$$

式中, d 为样品的厚度, j 为所有的激发态。简单来说,在泵浦-探测过程中,首先泵浦光将粒子从基态激发到某一激发态 ($0 \rightarrow i$), 随后探测光入射, 涉及到的三个主要过程激发态吸收(ESA)、基态损耗(GSD)、受激辐射(SE)的具体机制如图1所示。

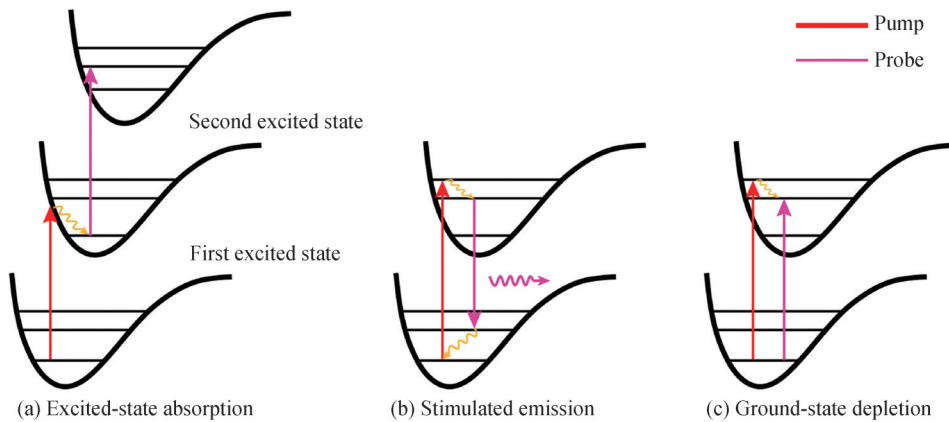


图1 泵浦探测过程中的三种主要原理

Fig.1 Three major processes in pump-probe process

1.1 激发态吸收

当泵浦光入射到样品上使得基态分子被激发至激发态 i 并产生聚集时,在第二束探测光作用下,可能会产生非常强的吸收特质,如果探测光的能量与两个激发态之间的能量相近,即与 $i \rightarrow j$ 跃迁共振,此时样品对探测光的吸收会增强,从而导致探测光在相应波长处的衰减透射, $\Delta I_{pr}/I_{pr}$ 为负,这个过程为激发态吸收过程。此时泵浦-探测的时域信息主要来自于激发态的动力学信息,衰减过程主要来自于激发态带间的衰减。

1.2 基态损耗

由于泵浦光改变了基态和激发态分子的数量,如果探测光的能量与基态和激发态之间的能量相近,即与 $0 \rightarrow j$ 共振时,泵浦-探测的过程会发生变化。在没有泵浦光的情况下,分子对探测光具有一定的吸收,而当泵浦光先入射后,由于基态分子数量减少,材料对探测光的吸收会减弱, $\Delta I_{pr}/I_{pr}$ 为正,这个过程为基态损耗过程。基态损耗机制中,泵浦-探测过程主要探测了材料被激发后基态的重新填充过程。对于一个强的吸收体,基于基态损耗机制的瞬态吸收过程会产生很强的吸收信号。

1.3 受激辐射

而当探测光的能量与最低激发态跃迁回基态需要的能量相近时,探测光入射时会产生受激辐射过程,分子将从激发态跃迁回基态,产生与探测光能量相同的光子,且方向与探测光方向相同,探测光的透射光强增多, $\Delta I_{pr}/I_{pr}$ 为正。对于一个特定的辐射波长,受激辐射的散射截面与自发辐射的散射截面成正比,并且由于在受激辐射和激发态吸收过程中,探测光作用的对象都是激发态的分子,因此通常情况下,受激辐射可能会与激发态吸收机制产生竞争。

对于上述三种过程,可以通过调节泵浦光和探测光的波长,使之与材料的不同能级匹配从而探测不同的分子态和不同的动力学过程。在不同的材料中,当泵浦光和探测光波长被调节到不同数值时,可能产生来自于一种或多种不同信号的叠加,对最终信号 $\Delta I_{pr}/I_{pr}$ 既有不同数值上的贡献,在符号上也有可能完全相反,在实际数据分析过程中,可能需要根据物质分子不同的动力学曲线,提取泵浦探测曲线中不同信号的组分来进行相应的分析。因此,为了探测更加纯粹的过程,更加清晰地分析不同激发态或者基态的动力学过程,需要根据材料的光谱信息分别选择泵浦探测的波长。

除了上述三种主要机制外,受激拉曼散射(SRS)、交叉相位调制(XPM)和双光子吸收(TPA)也是类似泵浦-探测的双光子过程,但由于其过程为相干过程,不能够提供长时间域的分子的动力学过程。受激拉曼散射(SRS)是自发拉曼的非线性形式,两束入射激光需要保证空间和时间上完全重叠,两束光的能量差与要探测的物质的拉曼活性振动模的能量相同,当两束光同时入射时,其中高能量的泵浦光子会失去能量转化为低能量的斯托克斯光子,泵浦光失去的能量将分子激发到更高的振动能级,通过结合激光扫描共聚焦显微成像技术,受激拉曼散射成像在生物医学领域得到了广泛应用。2008年,哈佛大学谢晓亮课题组搭建76 MHz高重频低峰值功率受激拉曼散射成像系统,对生物组织中的蛋白质、脂质进行高分辨率成像^[50]。在材料科学领域,SRS同样也被应用到二维材料表征当中,硼氮作为常用于保护空气敏感性材料的二维材料,由于其非常高的禁带宽度,无法利用光学线性吸收对其进行表征,通过利用硼氮中拉曼活性的声子产生的信号,LING J等采用SRS显微成像对不同厚度的硼氮进行了表征^[51]。与受激拉曼散射过程相似,交叉相位调制(XPM)以及双光子吸收(TPA)过程都需要保证两个光子在空间和时间上的重合。其中交叉相位调制利用了光学克尔效应,探测光的折射率在泵浦光存在的条件下会发生改变,折射率的变化值与泵浦光的光强有关,最终导致了探测光的相位变化,它是一种相位调制的过程。而双光子过程指的是泵浦光和探测光的能量之和等于分析物质的电子吸收能量,双光子吸收可以分为简并双光子吸收以及非简并双光子吸收,对应的分别是泵浦光和探测光的能量相同以及不同的情况,双光子吸收的强度取决于泵浦光和探测光两个光场强度的乘积。

2 泵浦-探测显微镜

一个典型的泵浦-探测显微镜系统需要的主要组成部分有脉冲光源、调制器、时间延迟器、探测器、锁相放大器以及显微镜系统等,如图2所示。

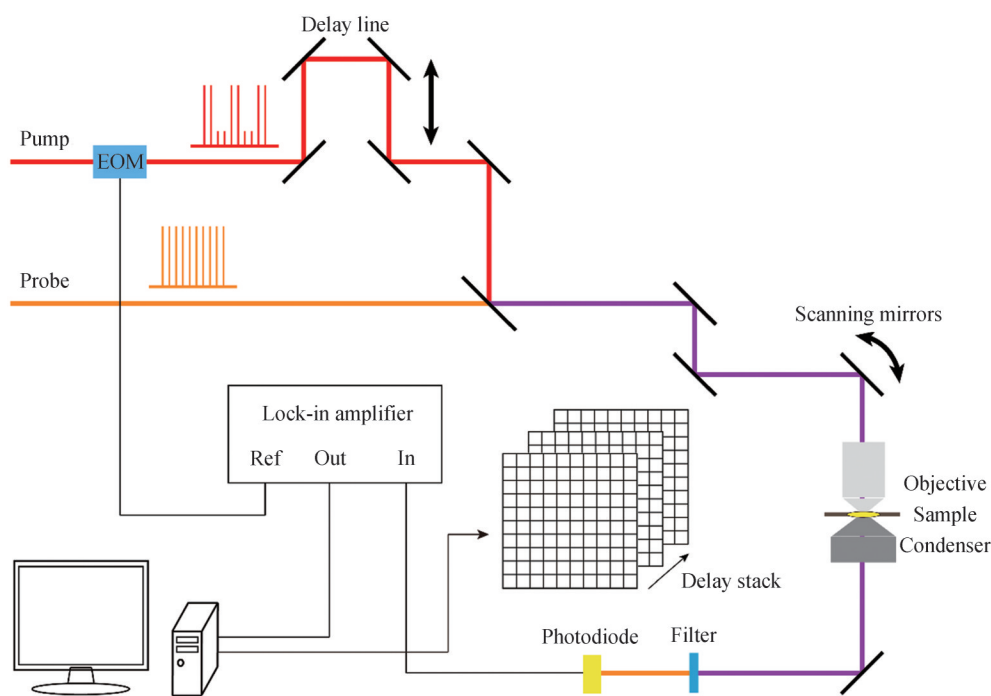


图2 泵浦-探测显微镜示意图
Fig.2 Schematic illustration of pump probe microscopy

一般泵浦-探测采用两个高度同步的脉冲光源,对于超快脉冲的产生,最常用的方法是利用一个高重频(~ 80 MHz)的Ti:蓝宝石振荡器,通过二次谐波(Second Harmonic Generation, SHG)或者光参量振荡器(Optical Parametric Oscillator, OPO)产生不同于基波的第二个脉冲序列,采用有不同周期的周期性排列的晶体能够在非常宽波长范围进行色彩转换。

一般采用电光调制器(Electro-optic Modulator, EOM)或者声光调制器(Acousto-optic Modulator, AOM)对泵浦光进行调制,探测光无需进行调制。调制频率需要足够高,在几MHz到几十MHz之间。若调制频率过

低,激光的噪音可能会对信号产生一定的影响,在高的调制频率下,能够实现的灵敏度量级在 $\Delta I_{pr}/I_{pr} \approx 10^{-7}$ 的数量级,而一般较低的调制频率下,灵敏度量级只能达到 $\Delta I_{pr}/I_{pr} \approx 10^{-4}$ 量级。两束光的时间延迟由任一束光路中的延迟位移台控制,之后两束波长不同的光通过二相色镜共线后输入到显微镜装置中进行扫描成像。当泵浦光激发样品之后,探测光与激发后的样品相互作用,泵浦光上携带的调制信息将通过不同的机制转移到探测光上。再经过滤波片可以将泵浦光滤除,从而对探测光进行收集。一般通过不同光敏波段的光电二极管来收集探测光,通过光电效应,能够将光信号转换为电信号,并输入到锁相放大器中,虽然只有百万分之一的调制深度被转移到探测光上,但通过锁相放大器的调制-解调过程,仍然能够将探测光中携带的与原始调制频率相同的微弱信号过滤出来。根据泵浦光和探测光的性质不同,最常用的滤掉泵浦光的手段为加滤波片,而当泵浦光和探测光的波长相近或者相同时,还可以通过加检偏器,或者分别对两束光进行不同频率的幅值调制来分开两束光。

由于显微镜成像系统的引入,泵浦-探测显微镜不仅仅能探测到不同时间延迟下的曲线,同时还可以对每一个时间延迟下的材料进行成像表征,每一幅图中的信号值随时间的变化曲线即为泵浦-探测曲线。对于泵浦-探测显微成像的结果,需要关注的参数有曲线信噪比、图像分辨率、成像速度等。

泵浦-探测显微成像系统中的噪音主要包含三个部分:激光强度过大产生的噪音、探测器产生的电噪声以及激光的散粒噪声。激光强度过大的噪声属于粉红噪声的一种,因此噪声的大小和频率成反比,因此在实验中,往往通过高频调制的手段,即将调制频率调制到几 MHz 到几十 MHz 的范围,来降低激光强度过大引入的噪声。高频调制同时要求了激光光源的高重频,高重频的超短脉冲同样也提高了图像的信噪比,因为在每个像素停留时间内(pixel dwell time),信噪比正比于每个像素点激光中光子数的平方根,对于 80 MHz 和 1 kHz 的光源,前者的信噪比相对后者提高了 280 倍,这里改善的噪音就是激光的散粒噪音。此外还可以通过以下方法提高信噪比:1)将激光束的波长调节到最优波长;2)将激光束的功率调整到接近饱和的水平;3)可以重复测量多次做平均来减少噪音。

泵浦-探测显微镜中的分辨率主要由光的衍射极限限制,其横向和纵向的分辨率分别为^[52]

$$r = \frac{0.53}{NA} \sqrt{1 / \left(\frac{1}{\lambda_{pu}^2} + \frac{1}{\lambda_{pr}^2} \right)} \quad (3)$$

$$z = \frac{0.53}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \sqrt{1 / \left(\frac{1}{\lambda_{pu}^2} + \frac{1}{\lambda_{pr}^2} \right)} \quad (4)$$

式中, λ_{pu} 和 λ_{pr} 分别是泵浦光和探测光的波长, NA 为物镜的数值孔径, n 为材料的折射率。在近红外激发,采用水镜聚焦的情况下,一般能达到的分辨率为横向约 300 nm,纵向约 1 000 nm。而对于很多细胞结构或者纳米材料来说,分辨率仍然不够,因此同样有很多致力于超分辨泵浦探测显微镜的研究。

3 泵浦-探测显微镜的应用

3.1 泵浦-探测显微镜在生物医学上的应用

近年来,非线性光学在生物医学领域的研究工作主要集中于对分子信号的探测上,并且不会产生不同颜色的光。双光子吸收可以存在于不产生荧光的分子中,比如黑色素和血红蛋白,然而,出现的困难在于生物样本提供的能量,大约在 100 万个光子中只有一个光子被双光子吸收,大量的光子被散射或者线性吸收了,因此会出现很强的背景干扰产生的信号。最基本的解决方法是使用飞秒脉冲或者是脉冲调制序列将非线性信号从线性背景中分离出来^[53]。泵浦探测显微镜就是一种方法,其中泵浦光是一个被严格控制其调制的激光脉冲序列,加上一个具有时间延迟的探测脉冲序列,即使在两个线性吸收光谱很相似的分子间,也能产生具有特异性的明显不同的信号,因此在分子特异性上,泵浦探测显微镜丰富的参数空间提供了的优势。

最早的飞秒泵浦探测成像实验使用摄影感光片技术在 100~600 fs 时间尺度上记录光诱导的硅材料的光诱导融化与蒸发。而现今,只要通过对传输光或散射光简单的探测,就可以获得高质量的成像图片,并且功率损耗适当,在很短的时间内有足够的灵敏度,特异性地对组织标记物成像,并且提高了信噪比^[54]。

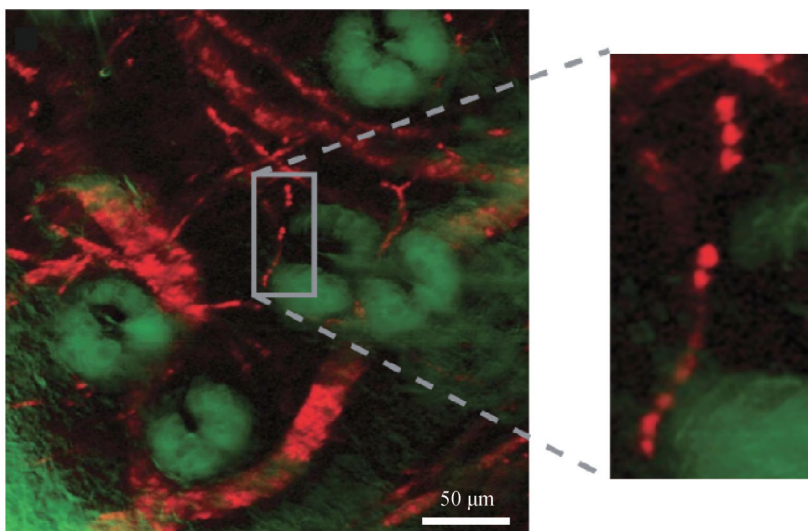
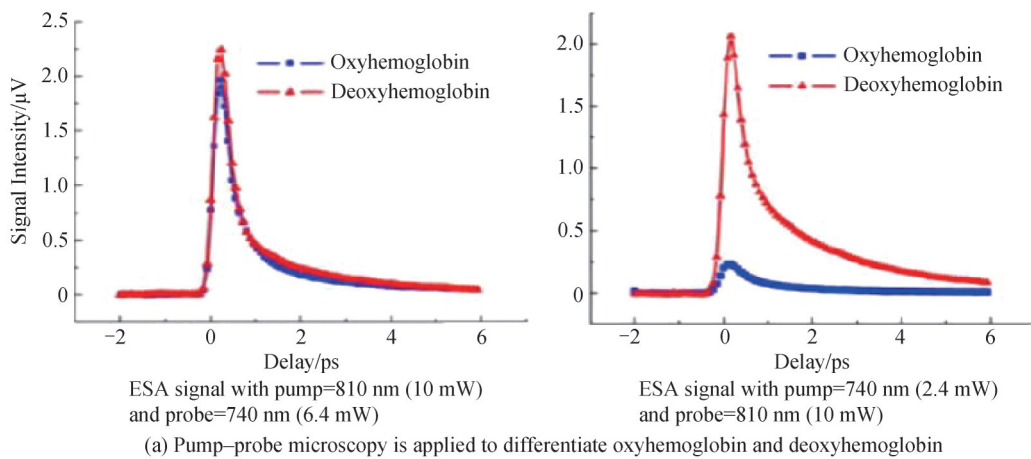
例如对于血细胞的成像,显微技术提供了一种直观的方式观察不同血管之间的差异,尤其是肿瘤里的血管生成和正常组织的血液流动,有很多方式应用于观察血管的生成,包括 X 射线电脑层析摄影技术、核磁共振成像、断层显像技术、超声波和近红外光学成像。这些技术可以测量很多重要的参数包括血液流动速

率、血管直径、血管密度、血管通透性等,在癌症治疗中,对血管生成抑制剂的评价有着潜在的利用价值。但是,大部分方法都需要标记物,缺乏分辨个别毛细血管的分辨率,并且很难测出血红蛋白的含氧浓度。在这些光学方法之中,近红外吸收和漫射光反射可以测量总共的血红蛋白浓度和含氧浓度,但是由于大部分光被组织散射掉,其分辨率被限制在几个毫米。共焦显微镜和双光子荧光显微镜由于其固有的三维分割能力可以阻止部分的散射,但是血红蛋白是一种非荧光标记分子,因此不能被直接成像。其它的显微技术比如相干反斯托克斯拉曼散射和三次谐波产生也能产生很好的效果,但是至今还没有用于活体成像^[55]。

基于很宽范围的分子非线性过程,通过调制传输的双泵浦探测成像方式是一种通用的能够产生很强对比度的技术,并且能够对生物和医学组织提供很高的特异性和功能性的图像。它的信号来源于和频吸收、激发态吸收、基态损耗或者受激辐射,随着这种技术的发展,泵浦探测技术可以对黑色素、氧化或脱氧血红蛋白成像,并且在活体内对动脉血管进行成像。

3.1.1 泵浦-探测显微镜探测细胞中的血红蛋白

在细胞中,血红蛋白作为氧气的携带者,主要负责运输氧气,是脊椎动物红细胞中的一种金属蛋白。众所周知,血红素基团表现出强吸收但弱荧光。这些特性表明泵浦探测显微镜是一种理想的研究血红蛋白的手段。FU D等^[56]证明了裸鼠耳中微血管的无标签深层组织成像。他们选择了775 nm的泵浦光束和650 nm的探测光束,成功地获得了在不同深度的微血管的双色双光子吸收图像,其穿透深度约为70 μm 。此外,他们还选择了更长的810 nm探测光束来区分氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白,如图3(a)所示。除了双光



(b) Ex vivo imaging of microvasculature network of a mouse ear based on endogenous hemoglobin contrast (Red, blood vessel network; green, surrounding sebaceous glands; pump=830 nm, probe=600 nm)

图3 泵浦探测显微镜对微血管的成像^[46,56]
Fig.3 Imaging microvascular by pump-probe microscopy^[46,56]

子吸收,还可以使用其他过程来观察微血管。MIN W等^[46]根据内源性血红蛋白对比,用830 nm光作为泵浦光和600 nm作为探测光,基于内源性血红蛋白对比,利用受激辐射原理,对小鼠微脉管网络进行成像,如图3(b)。

3.1.2 泵浦-探测显微镜检测脑瘤组织中的含铁血黄素

在所有生物体中,铁元素都维持着细胞和生物体的基本功能,人体中的铁元素主要存在于各种血红素蛋白中,例如血红蛋白、肌红蛋白等。当这些蛋白质被吞噬细胞消化和降解之后,它们含有的铁会以可溶性铁纳米颗粒和不溶性的含铁血黄素的形式保存起来并用于下一步的铁循环。铁过量会导致有毒的含铁血黄素,从而造成肝脏和脑组织等的损害。通过时间和光谱分辨的泵浦-探测技术能够全面研究血红蛋白和含铁血黄素在近红外波段的超快光学响应^[57]。

图4为时间分辨的红细胞中的血红蛋白(a)和含铁血黄素(b)的瞬态吸收曲线,以及在不同时间延迟下的成像。通过选择不同的探测波长和延迟时间,可以发现两者泵浦-探测曲线在不同波长下的行为不同,因此再选择不同的延迟时间,就可以在同一张图中区分血红蛋白和含铁血黄素,通过这种方法可以对同一组织中两种蛋白进行分布成像。图4(c)为不同波长和不同时间延迟下,两者的分布图像。

图5中采集了探测光波长范围从710到970 nm的光谱和时间分辨二维光谱,血红蛋白在超过800 nm的

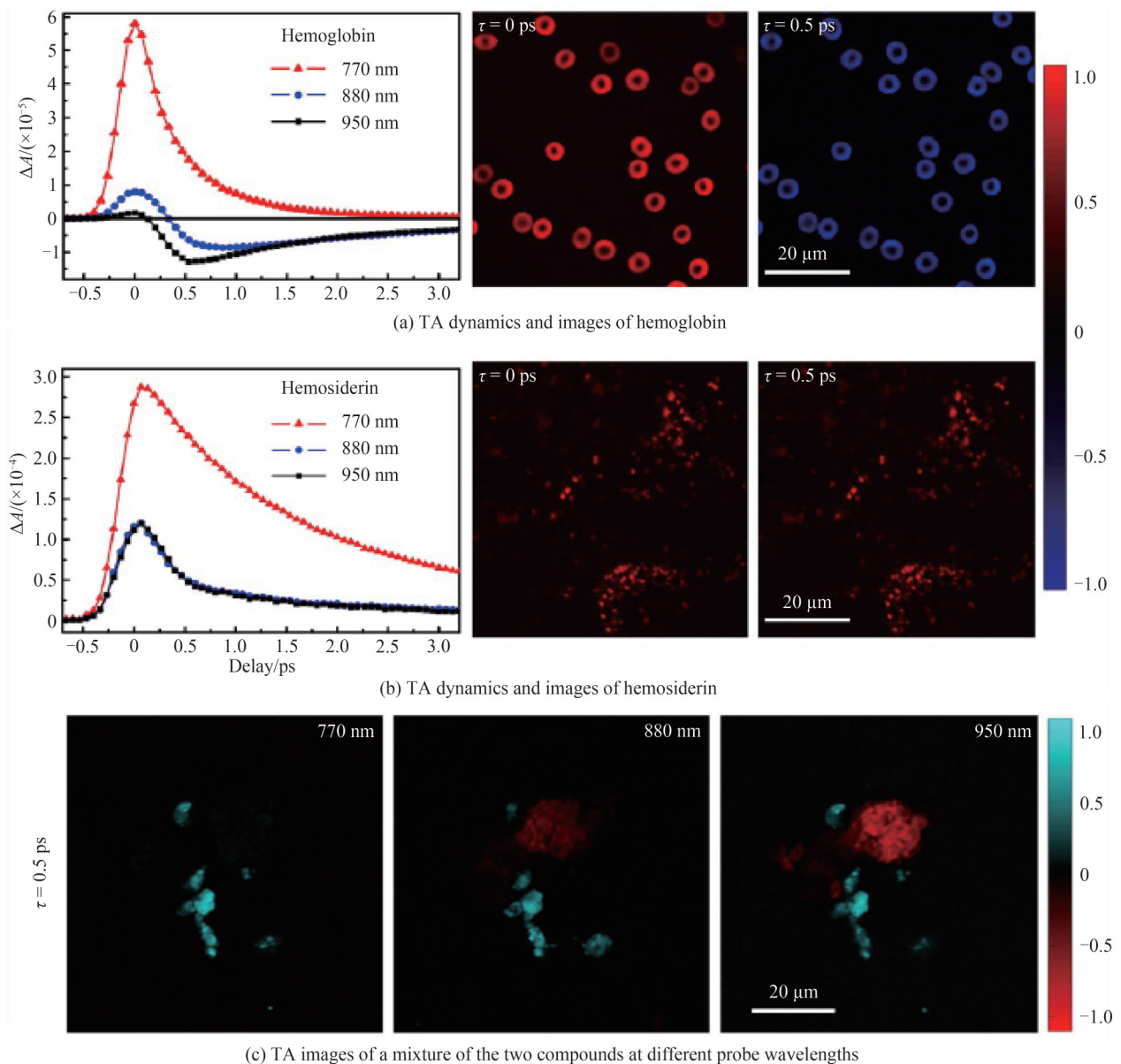


图4 血红蛋白和铁血黄素的瞬时光学响应^[57]

Fig.4 Characteristic transient optical responses of hemoglobin and hemosiderin^[57]

波长范围内存在光漂白机制且其信号随波长增加而增强,含铁血黄素在探测波段内只存在光诱导吸收机制。两种蛋白质的动力学曲线均可以用三指数函数来拟合,第一项为一个快于系统响应的超快过程,来源于交叉相位调制和电子散射。后两项代表了两个中间激发态的迟豫过程。两种蛋白质的迟豫过程可以认为是基态损耗和激发态吸收过程共同贡献的结果,两者之间存在一定的竞争关系。

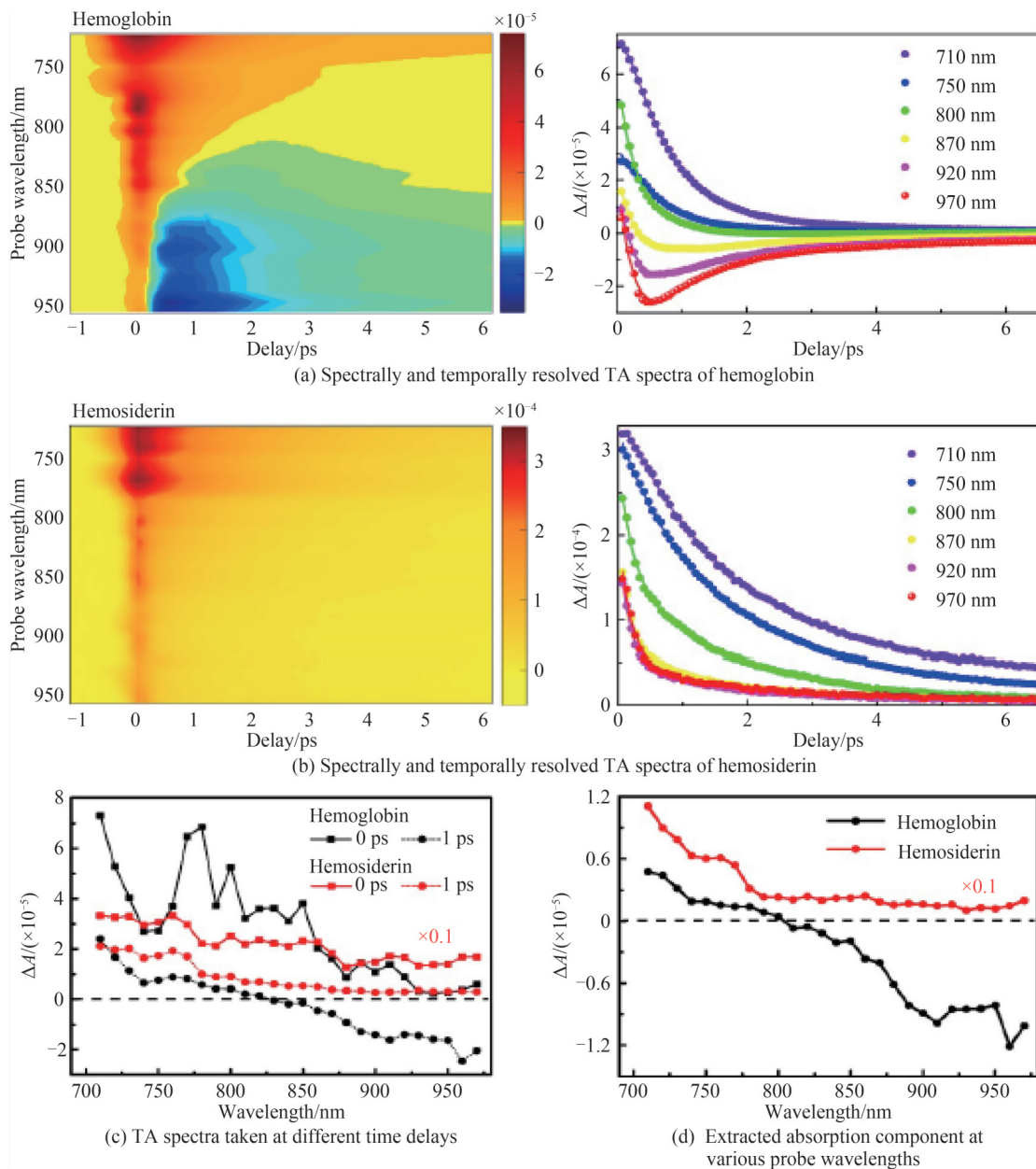


图5 血红蛋白以及含铁血黄素光谱和时间分辨的瞬态吸收光谱^[57]
Fig. 5 Spectrally and temporally resolved TA spectra of hemoglobin and hemosiderin^[57]

3.1.3 黑色素瘤的诊断及黑色素在病变细胞中的动力学特征

黑色素瘤是一种常见的皮肤癌类型,常规的诊断方法无法识别早期黑色素瘤,而泵浦-探测显微镜能够用于区分不同的黑色素,以及研究其在细胞和组织形态学中的动力学过程。

皮肤的色素沉积是两个过程的结果:黑色素瘤将黑色素合成,合成好的黑色素通过角质细胞进行运输。虽然所有种类的黑色素瘤细胞在体内的数量、性质、大小以及表现行为都不会发生变化,但黑色素的分布取决于角质细胞的不同。人类皮肤里黑色素细胞中黑色素含量的异质性,不仅仅取决于皮肤的不同,更取决于同一个体皮肤的不同部位,这种异质性被基因表达高度控制。

WARREN W S等一直致力于利用瞬态吸收显微镜对黑色素瘤的研究,利用黑色素为生物标记物,研究瞬态吸收信号对不同种类黑色素的响应。其团队在2016年在对切除的皮肤黑色素瘤切片测量瞬态吸收信号时发现,病变的皮肤黑色素瘤主要存在两种黑色素,分别为真黑色素与褐黑色素,这两种色素具有不同的瞬态吸收曲线。根据两种不同的瞬态吸收信号^[58],WARREN W S等在泵浦-探测显微镜下可以在病变的角质层、基底层等组织位置处分别观察到真黑色素与褐黑色素,并加上伪彩色,如图6所示。

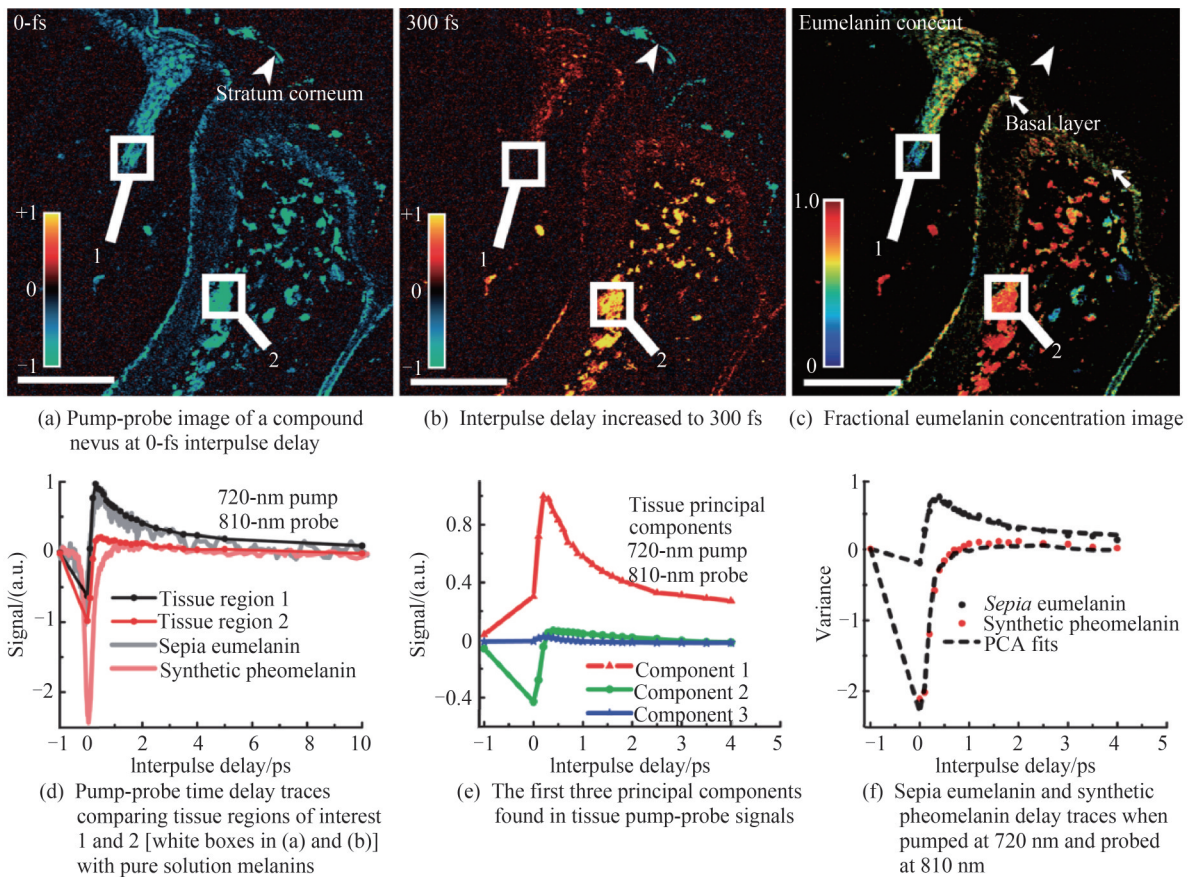


图6 黑色素瘤组织的泵浦-探测图像^[58]
Fig.6 Melanoma tissue pump-probe signals^[58]

结果显示,在泵浦光和探测光重合的时间零点位置处,两种色素都产生一个较强的负信号,如图6(a)所示。而当脉冲间隔增加到300 fs的时候,排除了任何瞬时的相干效应后,一部分组织区域呈现出正信号,另一部分没有,如图6(b)所示。将以上组织中测到的瞬态吸收曲线与纯标准样品的真黑色素与褐黑色素进行比较,部分组织区域表现出与褐黑色素相似的瞬态吸收曲线,而其他组织区域表现出与真黑色素相似的行为。褐黑色素显示出一个负信号,很可能来源于基态损耗。真黑色素表现出几皮秒的激发态寿命和一个正信号,表明真黑色素的瞬态吸收行为可能来源于激发态吸收^[58]。

当在两路光的时间零点处进行泵浦-探测成像时,所有的色素(包括真黑色素与褐黑色素)被可视化,并且呈现出一个负信号。因此,在0 fs延迟处所有的黑色素能够被成像。在黑色素瘤的边缘,黑色素分布在表皮的底部,以单层细胞的形式排布,如图7(a)箭头处所示。当泵浦光与探测光的时间延迟增加到300 fs时再次成像,此时真黑色素呈现正信号,然后褐黑色素没有贡献泵浦-探测信号。因此,褐黑色素主要分布在图像边缘和表皮,而真黑色素主要分布在黑色素瘤真皮深处的色素细胞中。H&E染色的结果显示,黑色素细胞位于病灶中心的真皮中,但边缘没有黑色素细胞。与黑色素瘤的图像相反,良性痣不具有这些特征。图7(e)显示了1.8 mm宽度的良性痣,图7(h)为邻近切片H&E染色。良性痣主要由黑色素信号构成。如图7(h)所示,真皮中存在许多黑色素细胞,但黑色素图像显示这些黑色素细胞未着色,表明它们已经成熟。未成熟的黑色素细胞更有可能在癌变中被观察到。

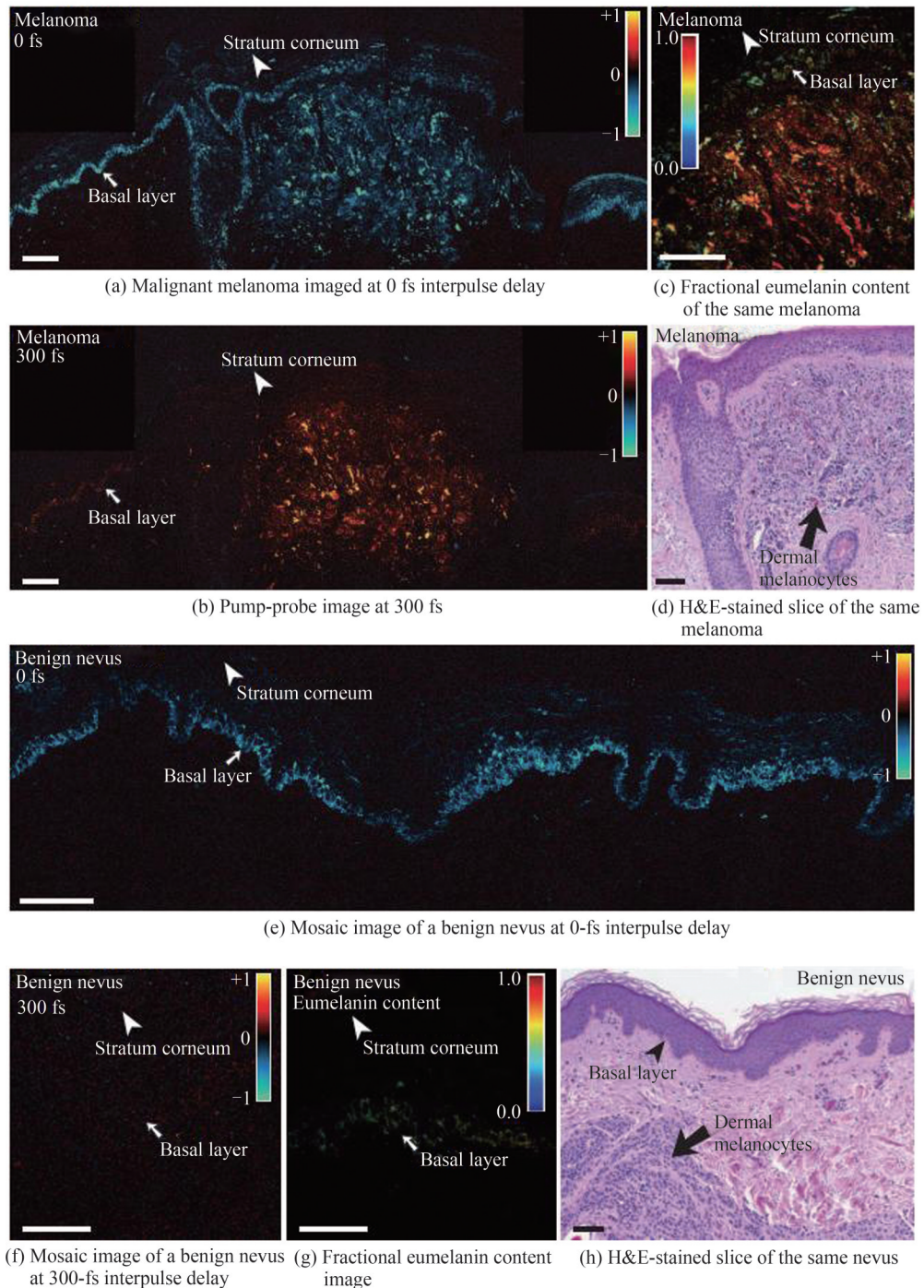


图7 恶性黑色素瘤与良性的比较^[58]
Fig.7 Malignant melanoma compared with a benign nevus^[58]

3.2 泵浦-探测显微镜在材料科学上的应用

3.2.1 二维材料中的超快动力学及范德华异质结构中的载流子转移

自2004年石墨烯问世以来,二维材料逐渐进入广大研究者甚至普通大众的视野中,它指的是在厚度上达到纳米量级的一类材料。现在,二维材料家族已经包括了许多不同类型的材料,包括半金属材料(例如石墨烯)、半导体(例如黑磷,MoS₂,WSe₂)、绝缘体(例如BN)、超导体和电荷密度波材料(例如NbSe₂和TiSe₂)。虽然与其块状材料的组分相同,但其性质却与块状材料有很大的不同,很多二维材料都展现出了更加优越的电学、光学、刚性性质等。而它们出现这种优异性质的主要原因有两个,一个是由于局域电子态存在量子限制效应,另一个是由于界面原子占比。为了实现二维材料在纳米器件中的应用,深入了解材料中的微观

物理机制非常重要。因此时间-空间分辨的泵浦探测显微镜有着极其重要的作用。

图8是外延生长的石墨烯的泵浦-探测研究结果^[23],图8(a)中的三条曲线为图8(b)中A、B、C三个不同位置石墨烯样品的动力学曲线,拟合函数为一个双指数函数和高斯响应的卷积,拟合结果显示了两个时间参数,其中第一个时间参数 τ_1 在三个位置处的数值均为0.2 ps,这一衰减过程被认为是激发态载流子通过将能量传递给光学声子发生迟豫,而第二个时间常数的数值在1.1~1.3 ps之间,随着样品的厚度和泵浦光的强度增加而增加,这一迟豫过程被认为是与光学和声学声子的耦合,且在较薄的样品中不存在,因此这一常数也可以用于估计石墨烯的层数。

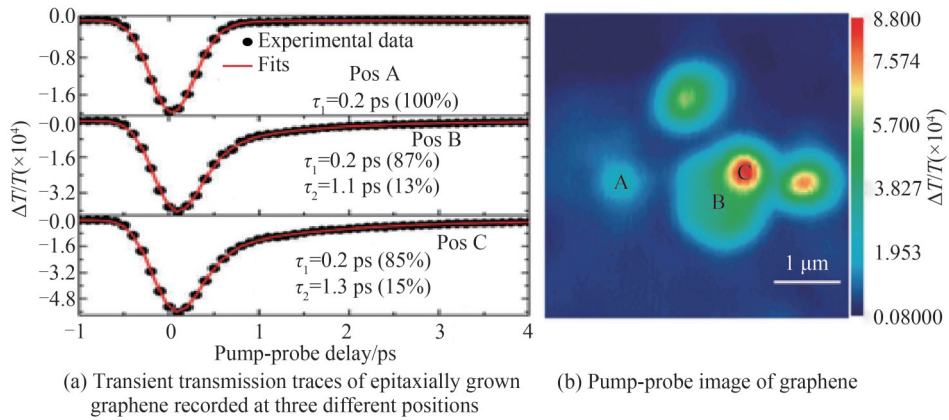


图8 外延生长的石墨烯泵浦-探测成像(泵浦光波长为390 nm,探测光波长为780 nm,泵浦光功率密度为14 mJ/cm²)^[23]
 Fig. 8 Pump-probe image of epitaxially grown graphene (Transient transmission data were probed at 780 nm following excitation at 390 nm. This data was recorded with a pump fluence of 14 mJ/cm²)^[23]

与石墨烯不同,过渡金属硫化物(Transitional Metal Dichalcogenides, TMDC)一族(具有2H对称性且M=Mo, W; X=S, Se, Te的MX₂层)均为非直接带隙的半导体,并且在低维体系下,其能带结构也会产生变化,随着层数逐渐降低,能带宽度增加,在单层时变为直接带隙半导体。TMDC半导体材料与光有很强的相互作用效应,极大地增强了电子与电子之间的相互作用,它的激子束缚能达到数百毫伏,其激子态的行为也值得研究。此外, TMDC材料中具有能量简并的K和K'谷为研究和控制谷自由度提供了平台。在过渡金属硫化物一族中,泵浦-探测技术也得到了广泛的应用。图9为单层MoS₂的吸收谱,以及泵浦-探测结

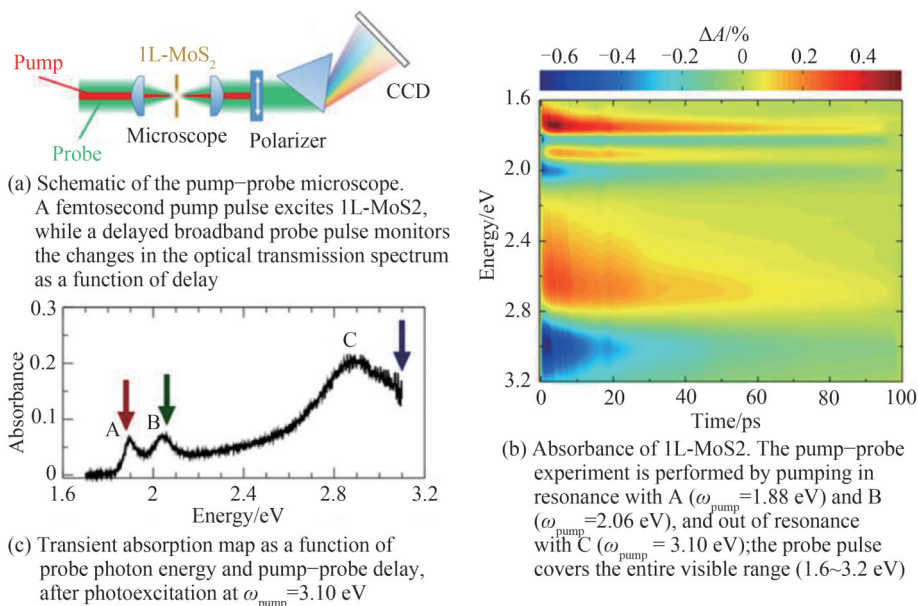
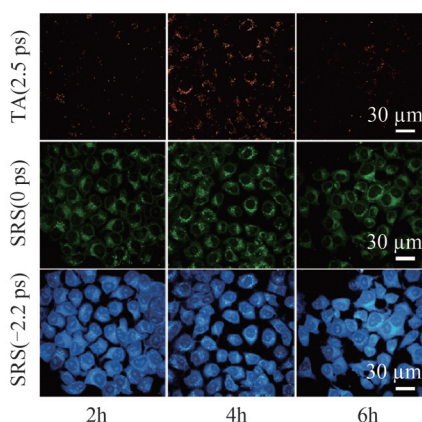
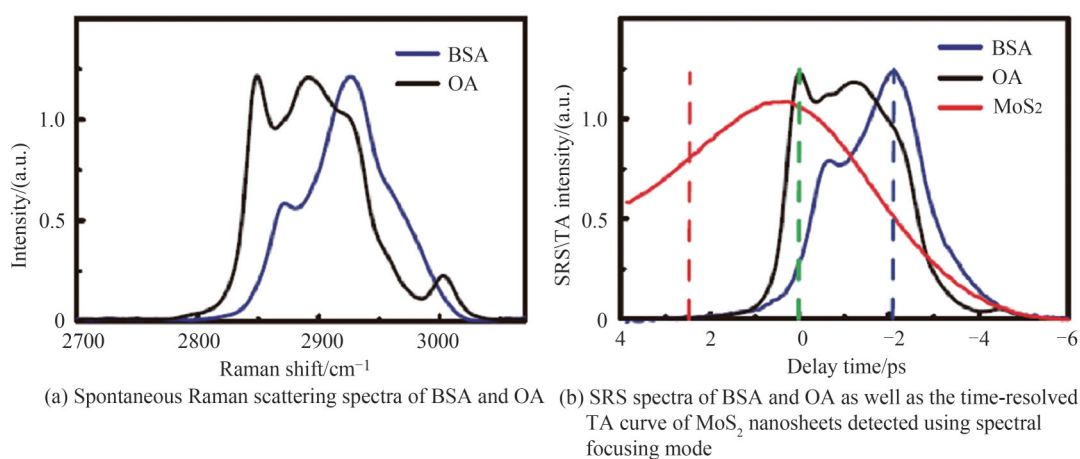


图9 单层硫化钼泵浦-探测结果^[59]
 Fig. 9 Pump-probe results of monolayer MoS₂^[59]

果^[59],所使用的飞秒瞬态吸收显微镜中,泵浦光的波长可调,探测光的波长范围也非常广。图9(b)中显示了在泵浦光能量为3.10 eV时的时间-光谱分辨的瞬态吸收值。在每个时间延迟下,都存在与A、B、C三个吸收峰相关的特征,每个特征都包含了一个负的光漂白和正的光致吸收过程。其中在激子能量共振处产生的负的光漂白信号来源于泡利阻塞效应,受激辐射或者是激子自能重归一化,而光致吸收则来源于双激子的吸收。除此外,WANG H等分析了单层MoS₂中电子-空穴在缺陷辅助下的复合过程^[60],多层MoS₂的泵浦-探测也有很多研究结果^[28, 61-62]。结合显微成像技术,ZHANG L等利用泵浦探测瞬态吸收显微镜,探索体内纳米颗粒与细胞之间的相互作用,分别利用瞬态吸收(TA)和受激拉曼散射(SRS)同时对细胞内的纳米颗粒和细胞内的生物分子(脂质和蛋白质)进行了成像^[63]。图10展示了MoS₂、脂质(Oleic Acid, OA)和蛋白质(Bovine Serum Albumin, BSA)在细胞中的分布。除了MoS₂外,其他TMDC材料的泵浦-探测研究也都各有千秋^[29, 64-69]。



(c) Representative SRS images of HeLa cells and TA images of intracellular MoS₂ detected at the three delay times marked in (b), showing the major contributions from MoS₂ (first row), lipids (second row), and proteins (third row)

图10 活 HeLa 细胞中 MoS₂ 的 SRS/TA 双模式成像^[63]

Fig.10 Dual-modal SRS/TA imaging of MoS₂ in live HeLa cells^[63]

黑磷(Black Phosphorus, BP)作为近年来各向异性二维材料的代表,除了拥有少层二维半导体材料随层数变化的能带结构,其面内结构各项异性带来了光学、电学、热学等方面的各向异性,为制造各向异性的电子学、光学器件提供了可能^[70-76]。MIAO X等首次利用瞬态吸收显微镜研究了少层(2-9L)黑磷中的超快动力学,包含了光激发载流子和相干声子的超快动力学行为^[27]。图11为少层黑磷的红外吸收光谱以及在不同时间延迟下的瞬态吸收图像。图11(d)展示了不同层数BP样品中的瞬态吸收曲线。文中还报道了与激子层数依赖线性吸收峰相呼应的共振的瞬态吸收光谱,以及少层BP中存在的一个显著的带隙重整化效应,这一特点反映了少层黑磷中较强的电子-电子相互作用。此外,在瞬态吸收共振峰能量处能够探测到很强的相干声子振荡信号,表明在少层黑磷中除了电子-电子相互作用以外,还存在巨大的电子-声子耦合效应。图12和13分别为4层和8层黑磷样品中的瞬态吸收行为。

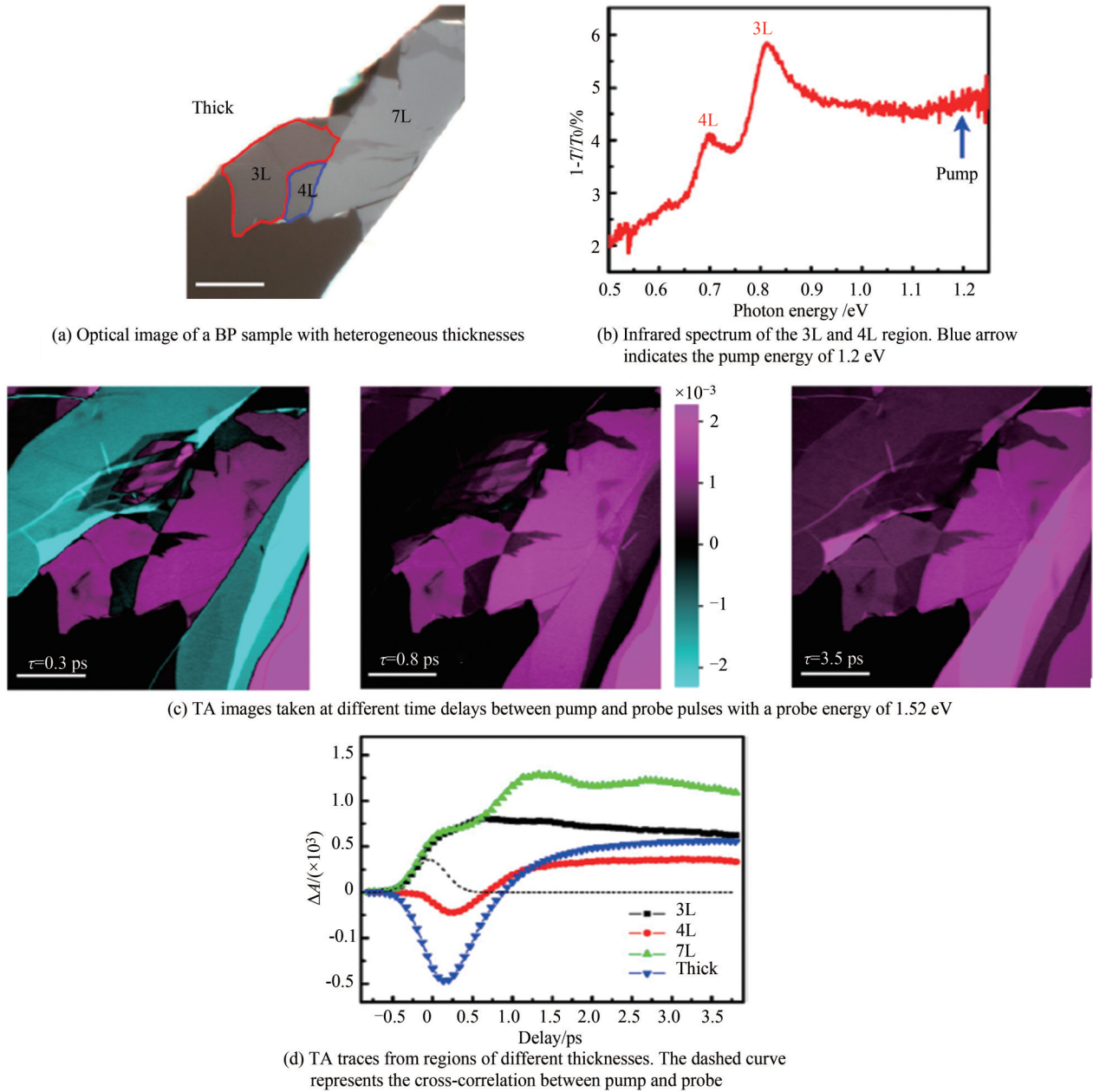
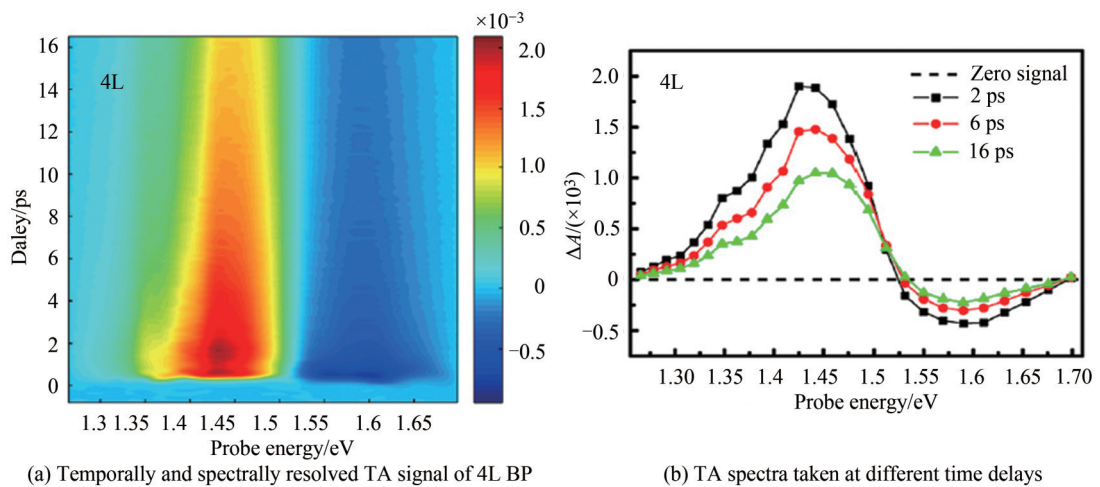


图 11 少层黑磷样品和泵浦-探测显微镜^[27]

Fig.11 Few-layer BP samples and pump-probe microscopy^[27]



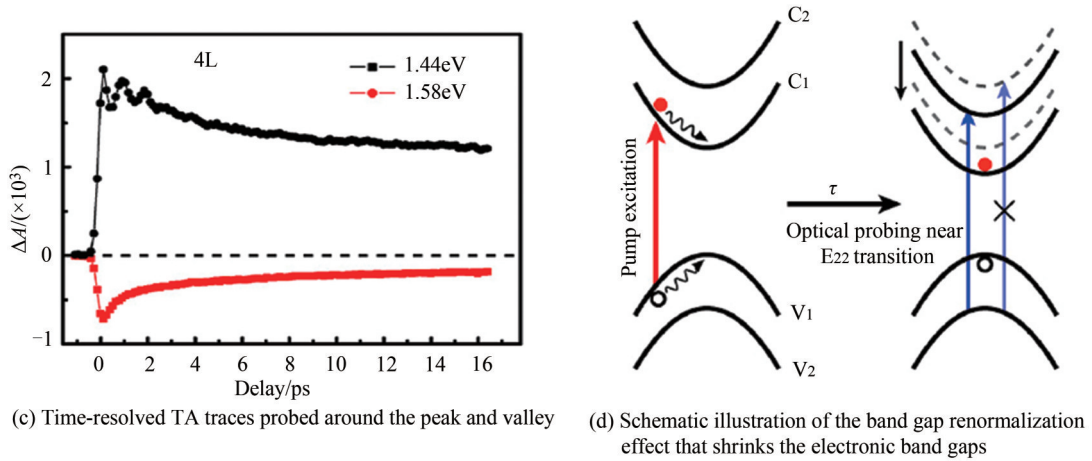


图 12 4L-BP 瞬态吸收光学响应^[27]
Fig.12 Transient optical response of 4L-BP^[27]

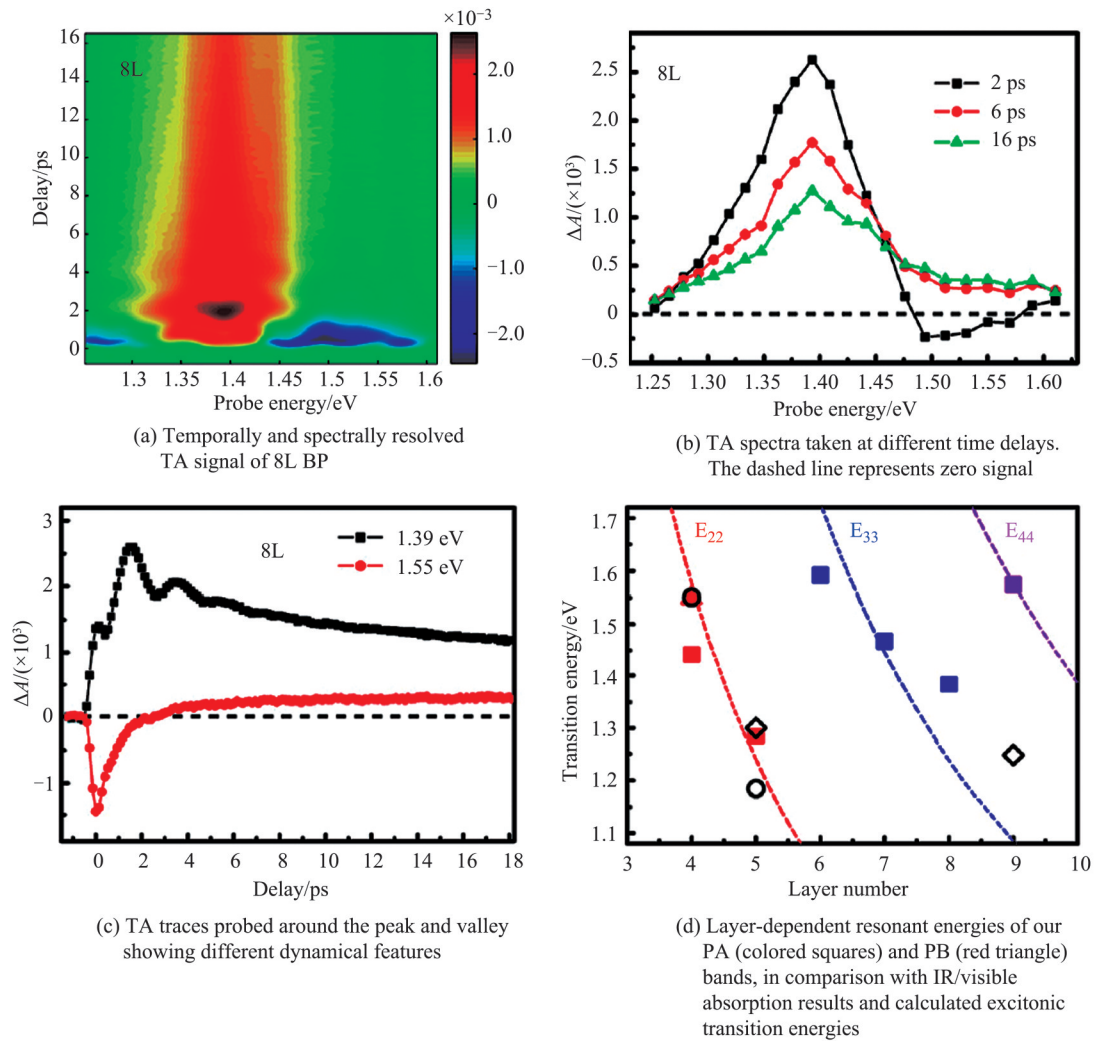


图 13 8L-BP 层数依赖的动力学响应^[27]
Fig.13 Transient dynamics of 8L-BP and layer-dependent resonances^[27]

除了单个二维材料的发展外,针对他们的混合系统的前沿研究也在不断探索中,二维材料的平坦和惰性表面能够构造具有原子级分辨率的界面,通过范德华力垂直耦合。这些范德瓦尔斯异质结构表现出很多在单个二维材料中无法实现的独特特性^[77-81]。例如,由于石墨烯和硼氮晶格之间的纳米周期性相互作用,六

方氮化硼上的石墨烯可能会表现出 Hofstadter 效应^[82]。由于不同 TMDC 层之间的交错排列, TMDC 异质结构可以容纳长寿命的层间激子^[83], 通常利用光致发光谱 (Photoluminescence, PL) 测量得到, 理解范德瓦尔斯异质结构 (vdW 异质结) 中电荷、自旋以及谷激发的动态相互作用和演化具有深刻的科学意义。不同二维材料之间的 vdW 异质结也存在非常多的研究, WANG K 等^[83] 利用瞬态吸收光谱证明了在 WSe₂/WS₂ 层间的快速电荷转移, 在空穴传输动力学中观察到了较长的复合时间, 证明了层间激子的产生, 并利用第一性原理计算了 WSe₂/WS₂ 异质结构的电子能带结构, 如图 14。YUAN L 等^[84] 以及 ZHU T 等^[85] 分别在 WS₂/石墨烯和 WS₂/并四苯异质结构界面研究了电荷转移态, 如图 15 和 16。

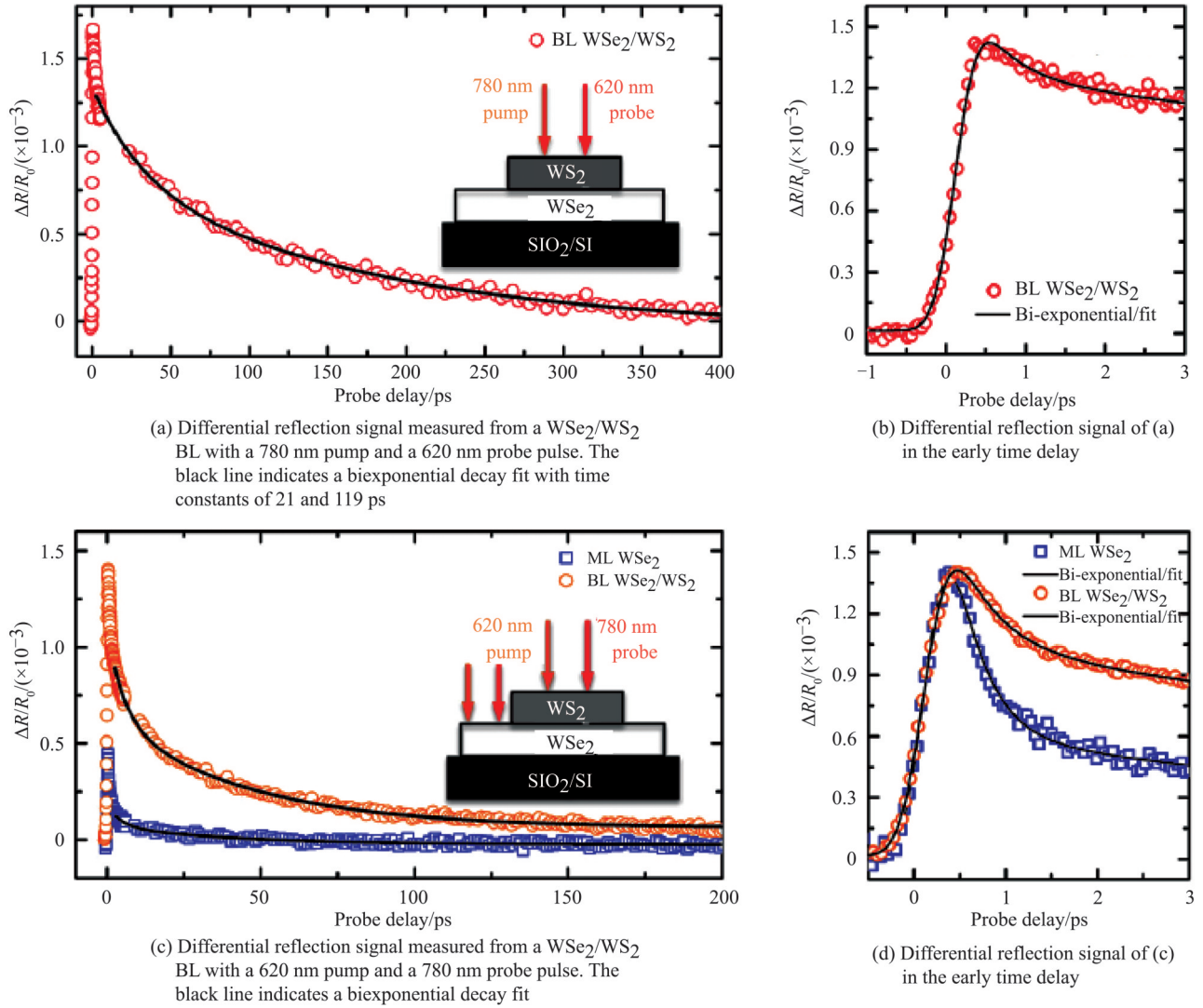
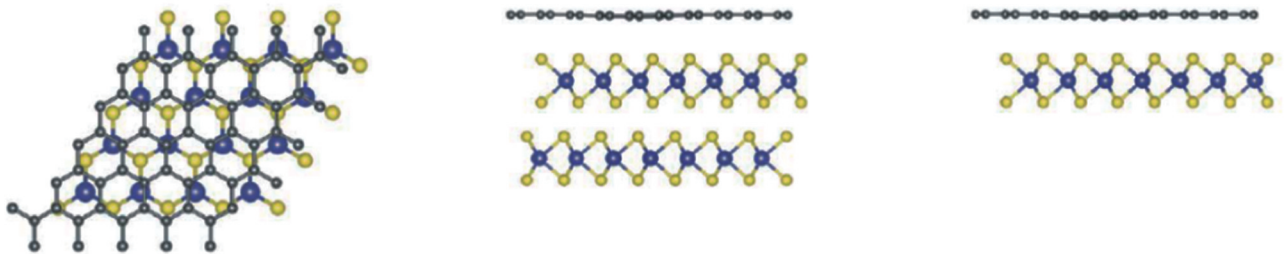


图 14 WSe₂/WS₂ 双层结构的层间过渡动力学^[83]
 Fig.14 Interlayer transition dynamics in WSe₂/WS₂ BL^[83]



(a) Atomic models of 1L-WS₂/G and 2L-WS₂/G interfaces, with aligned layers

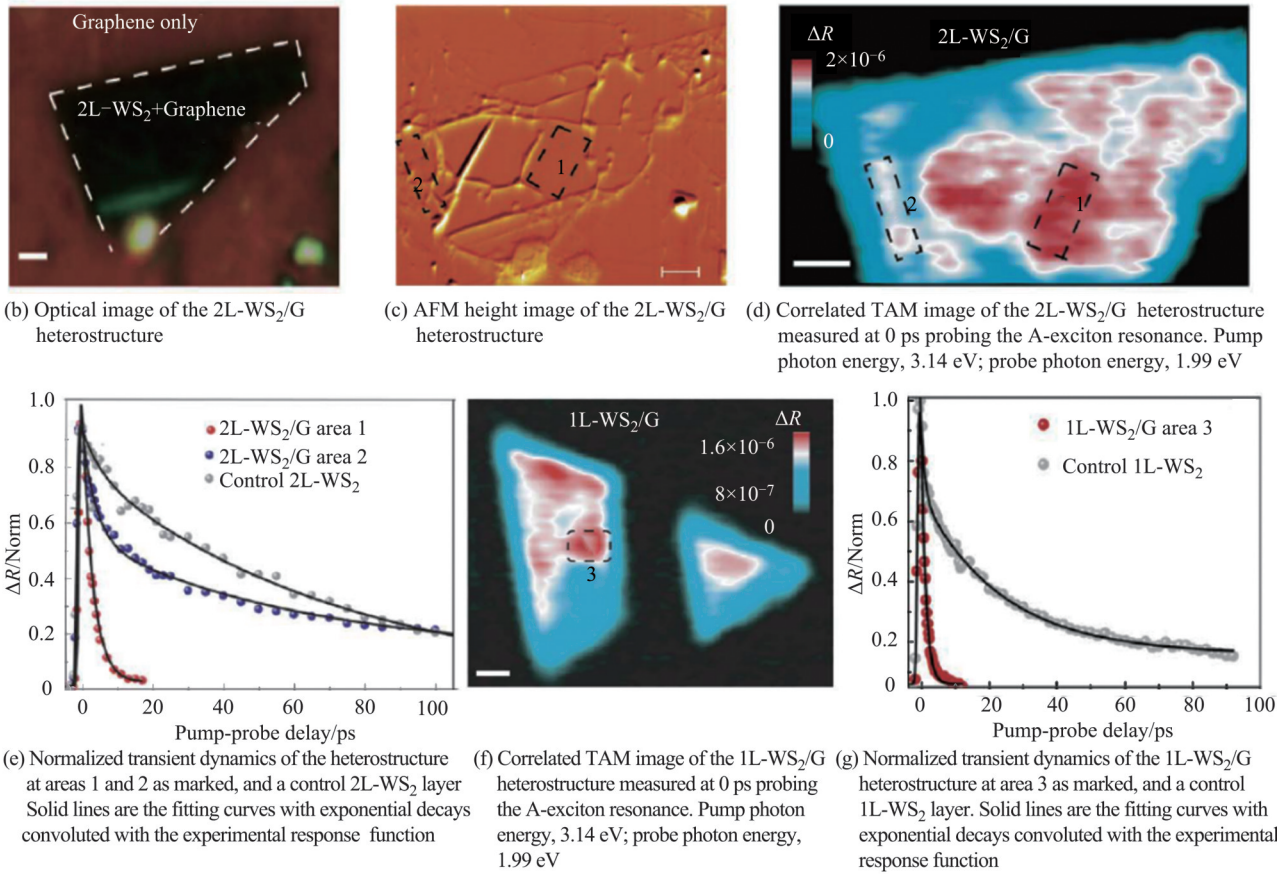


图 15 WS₂到石墨烯样品中层间耦合依赖的电荷转移过程^[84]
 Fig.15 Interlayer coupling-dependent charge transfer from WS₂ to graphene^[84]

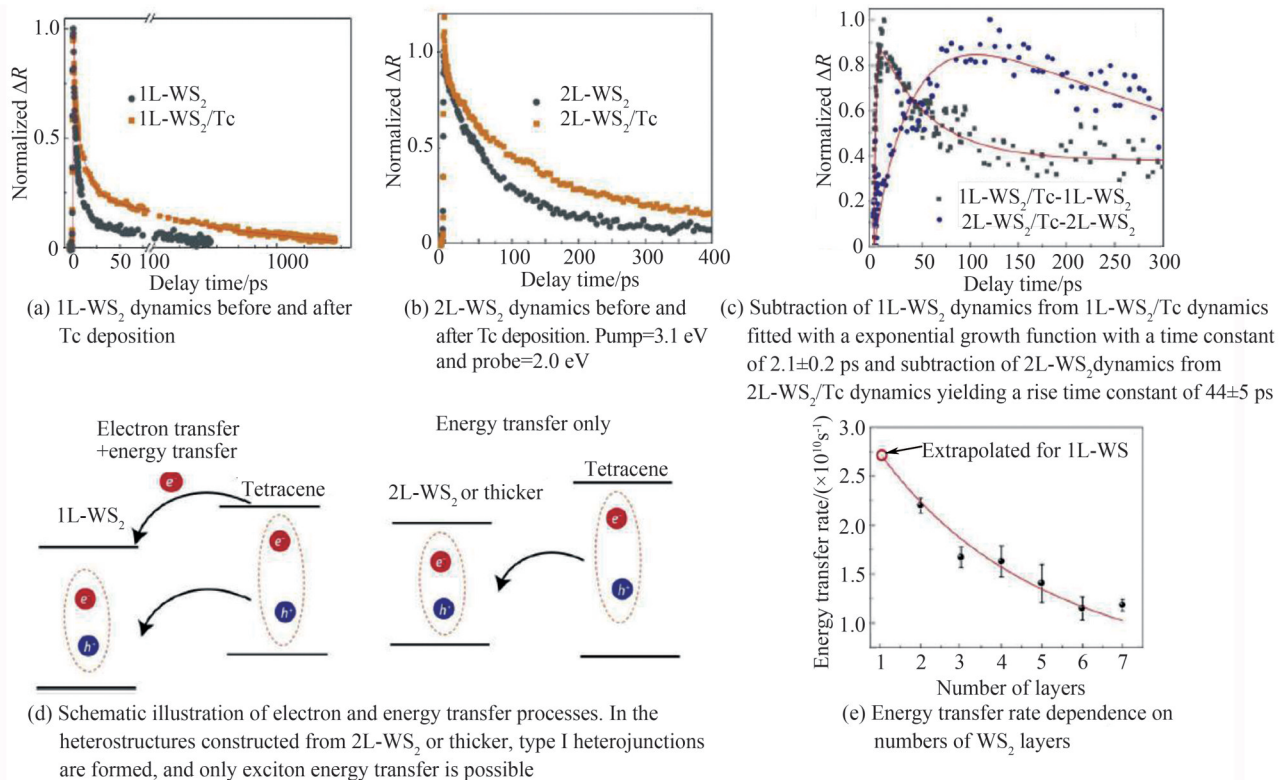


图 16 电子和能量从并四苯到 WS₂ 的传递过程^[85]
 Fig.16 Electron and energy transfer from tetracene (Tc) to WS₂^[85]

3.2.2 纳米管、纳米线中的动力学

在早期泵浦-探测研究中,碳纳米管和纳米线的超快动力学研究非常丰富。LAURET J S等^[86]最早利用时间分辨的双色泵浦-探测技术研究单壁碳纳米管中的超快动力学。JUNG Y等^[87]首次利用泵浦-探测的相位信号作为对照来研究单壁碳纳米管(Single-Walled Nanotube, SWNTs),能够快速无接触地对金属性或半导体性的SWNTs进行成像。利用锁相放大器解调出SWNTs同相和正交通道信号的成像图,可用于区分半导体相和金属相的SWNTs,并利用不同波长的泵浦光和探测光(707 nm和885 nm以及885 nm和707 nm)分别进行瞬态吸收成像。TONG L等^[88]利用瞬态吸收显微镜提供了一种无标记的方法,通过合适的近红外波长,以亚微米级的分辨率在体外和体内实时对半导体和金属碳纳米管进行成像。图17中展示的瞬态吸收显微成像中显示了半导体相和金属相的SWNTs中相位相反的泵浦-探测信号,以及中国仓鼠卵巢(Chinese Hamster Ovary, CHO)细胞中DNA-SWNTs的成像。LO S S等^[14]在CdTe的瞬态吸收研究中发现了非常快速的迟豫过程,而这一过程与材料表面载流子-缺陷复合过程有关,并且揭示了电子和空穴复合过程中不同的动力学行为。

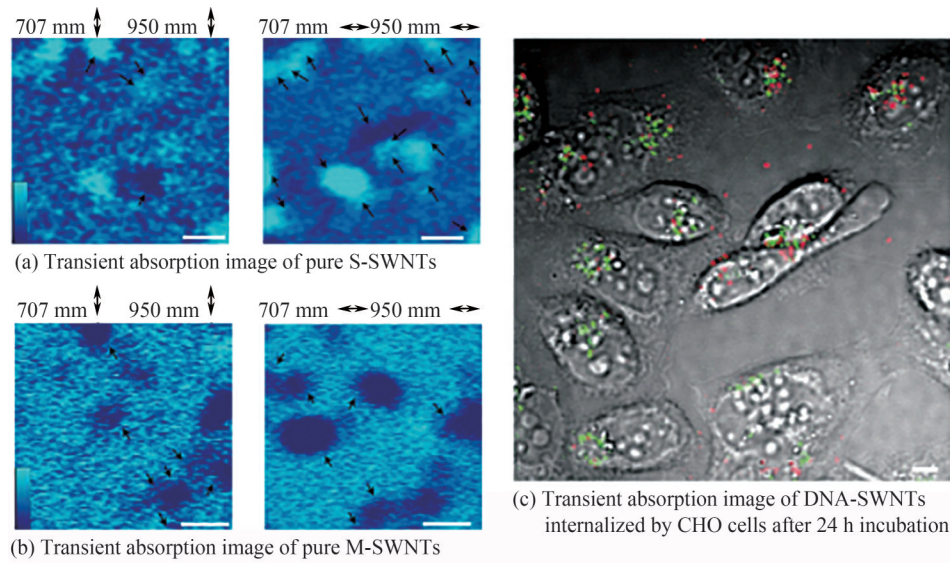
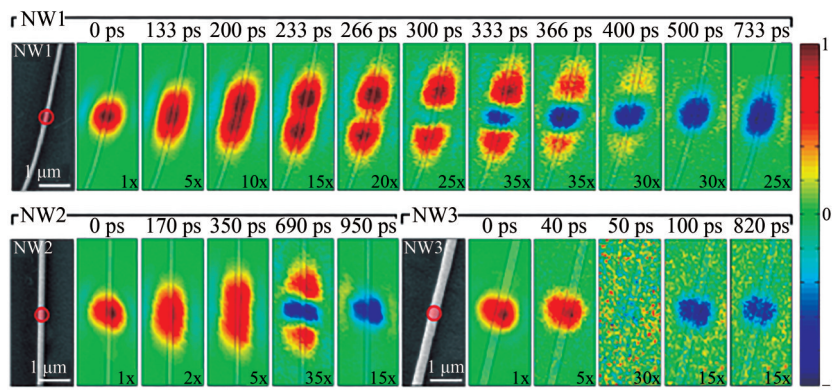


图17 M-SWNTs、S-SWNTs样品以及细胞中的DNA-SWNTs样品的瞬态吸收显微镜成像^[88]
 Fig.17 Transient absorption image of M-SWNTs, S-SWNTs and DNA-SWNTs in cells^[88]

3.2.3 材料中载流子漂移可视化

泵浦-探测显微镜还可以用于研究载流子漂移过程,在这类实验中,通过固定泵浦光的位置可以在材料上的单点光激发,激发之后的载流子从激发点往外扩散,并通过第二束探测光的扫描,能够在亚微米级别和超快的时间尺度上观察到激发后横向扩散的载流子。例如在图18所示的纳米线中,泵浦光首先在扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM)图中标红点的位置激发,之后通过在 $x-y$ 方向对探测光进行扫描可以观察到自由载流子的空间分布,红色区域表示的是载流子正向移动过程产生的信号,在0 ps位置红色信号的大小表示了聚焦泵浦光束产生的载流子云,可以看到随着时间迁移,载流子逐渐往外扩散,其中负信号代表了陷阱载流子迁移的过程。这项工作不仅在高的时间分辨率和高的空间分辨率下观测到了载流子的扩散过程,并且得到的自由载流子扩散和重组速度与 10^4 cm/s的双极性扩散和表面重组速度一致^[11]。

近年来,有机-无机杂化钙钛矿也是非常火热的研究材料之一。在GUO Z等的研究中^[35]阐明了 $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$ 钙钛矿薄膜中电荷在空间和时间尺度上的漂移,展示了三种不同的传输方式。在泵浦-探测过程中观测到了与过量能量相关的准弹道运输,由此达到能够克服晶界的230 nm的传输距离。而在非平衡态下,漂移距离约600 nm,持续时间约十几皮秒,超过了传统半导体,例如Si、GaS中几皮秒的漂移时间,如图19。



Left, SEM images of 5 μm sections of each wire centered around the pump laser excitation spot (image sizes: 2 μm \times 5 μm). The location of the excitation spot is depicted by the red circle

图 18 时间分辨的泵浦探测显微镜图像^[11]
Fig.18 Time-resolved SSPP microscopy images^[11]

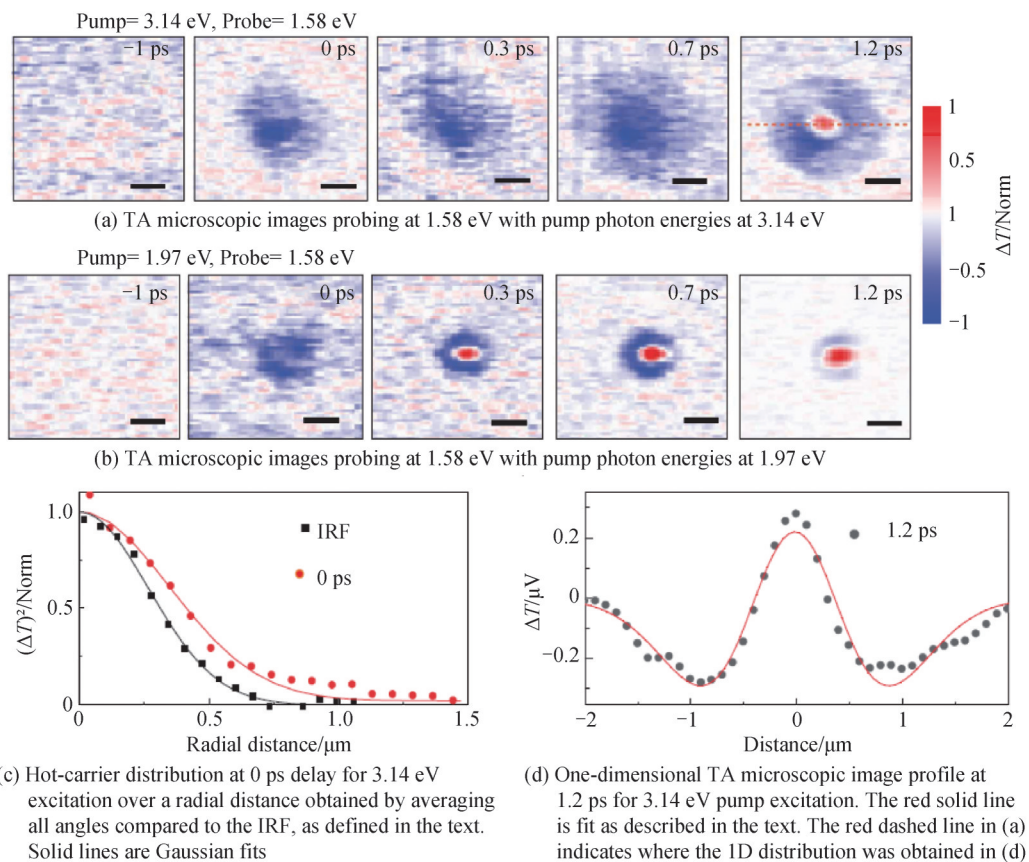


图 19 几皮秒内的热载流子传输过程^[35]

Fig.19 Hot-carrier transport in hybrid perovskites within the first picosecond^[35]

4 结论

本文回顾了泵浦-探测显微镜的原理和在生物学以及材料学领域的各类研究成果。基于激发态吸收、基态损耗、受激辐射等过程,泵浦-探测显微镜能够探测到生物、化学、材料学领域的不同种类材料的超快响应,不仅可以用于生物学领域的成像以及分子迟豫过程研究,使得人们可以更直观地观察到生物分子的分布和动态迟豫,还能够帮助人们更加深入地理解半导体材料、二维材料、量子点、拓扑绝缘体、狄拉克金属材料中光激发下的超快光物理,促进新型材料运用到光学、电学领域。随着泵浦-探测技术的发展,在不同的探测条件下可以得到更多材料的物理信息,泵浦-探测显微镜成为了各个领域研究超快过程的实用工具。

参考文献

- [1] ZEWAIL A H. Laser femtochemistry [J]. *Science*, 1988, 242(4886): 1645.
- [2] ZHONG D, PAL S K, WAN C, et al. Femtosecond dynamics of a drug-protein complex: Daunomycin with Apoferritin-binding protein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(21): 11873.
- [3] PAL S K, PEON J, BAGCHI B, et al. Biological water: femtosecond dynamics of macromolecular hydration[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002, 106(48): 12376-12395.
- [4] DONG C Y, SO P T, FRENCH T, et al. Fluorescence lifetime imaging by asynchronous pump-probe microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 1995, 69(6): 2234-2242.
- [5] BUEHLER C, DONG C Y, SO P T C, et al. Time-resolved polarization imaging by pump-probe (stimulated emission) fluorescence microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2000, 79(1): 536-549.
- [6] DAN F, TONG Y, THOMAS E M, et al. Two-color, two-photon, and excited-state absorption microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2007, 12(5): 1-8.
- [7] PILETIC I R, MATTHEWS T E, WARREN W S. Probing near-infrared photorelaxation pathways in eumelanins and pheomelanins[J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2010, 114(43): 11483-11491.
- [8] OTHONOS A, CHRISTOFIDES C. Spatial dependence of ultrafast carrier recombination centers of phosphorus-implanted and annealed silicon wafers [J]. *Applied Physics Letters*, 2002, 81(5): 856-858.
- [9] FUJII Y, HORIUCHI K, KANNARI F, et al. Optical imaging of defect density distribution in ion-implanted GaAs using ultrafast carrier dynamics[J]. *Japanese Journal of Applied Physics*, 2004, 43(1): 184-185.
- [10] YOON H W, WAKE D R, WOLFE J P, et al. In-plane transport of photoexcited carriers in GaAs quantum wells [J]. *Physical Review B*, 1992, 46(20): 13461-13470.
- [11] GABRIEL M M, KIRSCHBROWN J R, CHRISTESEN J D, et al. Direct imaging of free carrier and trap carrier motion in silicon nanowires by spatially-separated femtosecond pump - probe microscopy[J]. *Nano Letters*, 2013, 13(3): 1336-1340.
- [12] SEO M, YOO J, DAYEH S, et al. Mapping carrier diffusion in single silicon core-shell nanowires with ultrafast optical microscopy[M]. *Ultrafast Dynamics in Molecules, Nanostructures and Interfaces*, World Scientific, 2013: 128-143.
- [13] CAREY C R, YU Y, KUNO M, et al. Ultrafast transient absorption measurements of charge carrier dynamics in single II-VI nanowires[J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2009, 113(44): 19077-19081.
- [14] LO S S, MAJOR T A, PETCHSANG N, et al. Charge carrier trapping and acoustic phonon modes in single CdTe nanowires[J]. *ACS Nano*, 2012, 6(6): 5274-5282.
- [15] LO S S, SHI H Y, HUANG L, et al. Imaging the extent of plasmon excitation in Au nanowires using pump-probe microscopy[J]. *Optics Letters*, 2013, 38(8): 1265-1267.
- [16] GRANCINI G, MARTINO N, BIANCHI M, et al. Ultrafast spectroscopic imaging of exfoliated graphene[J]. *Physica Status Solidi (b)*, 2012, 249(12): 2497-2499.
- [17] GAO B, HARTLAND G V, HUANG L. Transient absorption spectroscopy and imaging of individual chirality-assigned single-walled carbon nanotubes[J]. *ACS Nano*, 2012, 6(6): 5083-5090.
- [18] KHITROVA G, BERMAN P R, SARGENT M. Theory of pump - probe spectroscopy [J]. *Journal of the Optical Society of America B*, 1988, 5(1): 160-170.
- [19] FISCHER M C, WILSON J W, ROBLES F E, et al. Invited review article: pump-probe microscopy[J]. *Review of Scientific Instruments*, 2016, 87(3): 031101.
- [20] GRUMSTRUP E M, GABRIEL M M, CATING E E M, et al. Pump-probe microscopy: visualization and spectroscopy of ultrafast dynamics at the nanoscale[J]. *Chemical Physics*, 2015, 458: 30-40.
- [21] ZHU Y, CHENG J X. Transient absorption microscopy: Technological innovations and applications in materials science and life science[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 2020, 152(2): 020901.
- [22] GABRIEL M M, GRUMSTRUP E M, KIRSCHBROWN J R, et al. Imaging charge separation and carrier recombination in nanowire p-i-n junctions using ultrafast microscopy [J]. *Nano Letters*, 2014, 14(6): 3079-3087.
- [23] HUANG L, HARTLAND G V, CHU L-Q, et al. Ultrafast transient absorption microscopy studies of carrier dynamics in epitaxial graphene [J]. *Nano Letters*, 2010, 10(4): 1308-1313.
- [24] GAO B, HARTLAND G, FANG T, et al. Studies of intrinsic hot phonon dynamics in suspended graphene by transient absorption microscopy[J]. *Nano Letters*, 2011, 11(8): 3184-3189.
- [25] GRAHAM M W, SHI S-F, WANG Z, et al. Transient absorption and photocurrent microscopy show that hot electron supercollisions describe the rate-limiting relaxation step in graphene[J]. *Nano Letters*, 2013, 13(11): 5497-5502.
- [26] MURPHY S, HUANG L. Transient absorption microscopy studies of energy relaxation in graphene oxide thin film[J]. *Journal of Physics, Condensed Matter*, 2013, 25(14): 144203.
- [27] MIAO X, ZHANG G, WANG F, et al. Layer-dependent ultrafast carrier and coherent phonon dynamics in black phosphorus[J]. *Nano Letters*, 2018, 18(5): 3053-3059.

- [28] SHI H, YAN R, BERTOLAZZI S, et al. Exciton dynamics in suspended monolayer and few-layer MoS₂ 2D crystals[J]. ACS Nano, 2013, 7(2): 1072-1280.
- [29] CUI Q, CEBALLOS F, KUMAR N, et al. Transient absorption microscopy of monolayer and bulk WSe₂[J]. ACS Nano, 2014, 8(3): 2970-2976.
- [30] SEO M, YAMAGUCHI H, MOHITE A D, et al. Ultrafast optical microscopy of single monolayer molybdenum disulfide flakes[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 21601.
- [31] GE S, LIU X, QIAO X, et al. Coherent longitudinal acoustic phonon approaching THz frequency in multilayer molybdenum disulphide[J]. Scientific Reports, 2014, 4(1): 5722.
- [32] GUO Z, MANSER J S, WAN Y, et al. Spatial and temporal imaging of long-range charge transport in perovskite thin films by ultrafast microscopy[J]. Nature Communications, 2015, 6(1): 7471.
- [33] SIMPSON M J, DOUGHTY B, YANG B, et al. Spatial localization of excitons and charge carriers in hybrid perovskite thin films[J]. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2015, 6(15): 3041-3047.
- [34] SIMPSON M J, DOUGHTY B, YANG B, et al. Imaging electronic trap states in perovskite thin films with combined fluorescence and femtosecond transient absorption microscopy[J]. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2016, 7(9): 1725-31.
- [35] GUO Z, WAN Y, YANG M, et al. Long-range hot-carrier transport in hybrid perovskites visualized by ultrafast microscopy[J]. Science, 2017, 356(6333): 59.
- [36] HILL A H, SMYSER K E, KENNEDY C L, et al. Screened charge carrier transport in methylammonium lead iodide perovskite thin films[J]. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2017, 8(5): 948-953.
- [37] GUO Z, ZHOU N, WILLIAMS O F, et al. Imaging carrier diffusion in perovskites with a diffractive optic-based transient absorption microscope [J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2018, 122(19): 10650-10656.
- [38] SNAIDER J M, GUO Z, WANG T, et al. Ultrafast imaging of carrier transport across grain boundaries in hybrid perovskite thin films[J]. ACS Energy Letters, 2018, 3(6): 1402-1208.
- [39] SCHULER B, LIPMAN E A, EATON W A. Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy[J]. Nature, 2002, 419(6908): 743-747.
- [40] LU H P, XUN L, XIE X S. Single-molecule enzymatic dynamics [J]. Science, 1998, 282(5395): 1877.
- [41] JOO C, BALCI H, ISHITSUKA Y, et al. Advances in single-molecule fluorescence methods for molecular biology[J]. Annual Review of Biochemistry, 2008, 77(1): 51-76.
- [42] PETERMAN E J G, SOSA H, MOERNER W E. Single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy of biomolecular motors [Z]. Annual Review of Physical Chemistry, 2004: 79-96.10.1146/annurev.physchem.55.091602.094340
- [43] MERTZ J. Nonlinear microscopy: new techniques and applications[J]. Current Opinion in Neurobiology, 2004, 14(5): 610-616.
- [44] PETTY H R. Fluorescence microscopy: established and emerging methods, experimental strategies, and applications in immunology[J]. Microscopy Research and Technique, 2007, 70(8): 687-709.
- [45] MIN W, FREUDIGER C W, LU S, et al. Coherent nonlinear optical imaging: beyond fluorescence microscopy[J]. Annual Review of Physical Chemistry, 2011, 62(1): 507-530.
- [46] MIN W, LU S, CHONG S, et al. Imaging chromophores with undetectable fluorescence by stimulated emission microscopy [J]. Nature, 2009, 461(7267): 1105-1109.
- [47] GE S, LI C, ZHANG Z, et al. Dynamical evolution of anisotropic response in black phosphorus under ultrafast photoexcitation[J]. Nano Letters, 2015, 15(7): 4650-4656.
- [48] WANG X, SHINOKITA K, LIM H E, et al. Direct and indirect exciton dynamics in few-layered ReS₂ revealed by photoluminescence and pump-probe spectroscopy[J]. Advanced Functional Materials, 2019, 29(6): 1806169.
- [49] NAKAGAWA K, TSUCHIYA S, YAMADA J, et al. Pump- and probe-polarization analyses of ultrafast carrier dynamics in organic superconductors[J]. Journal of Superconductivity and Novel Magnetism, 2016, 29(12): 3065-3069.
- [50] FREUDIGER C W, MIN W, SAAR B G, et al. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated raman scattering microscopy[J]. Science, 2008, 322(5909): 1857.
- [51] LING J, MIAO X, SUN Y, et al. Vibrational imaging and quantification of two-dimensional hexagonal boron nitride with stimulated raman scattering [J]. ACS Nano, 2019, 13(12): 14033-14040.
- [52] WANG P, SLIPCHENKO M N, MITCHELL J, et al. Far-field imaging of non-fluorescent species with subdiffraction resolution[J]. Nature Photonics, 2013, 7(6): 449-453.
- [53] SIMPSON M J, GLASS K E, WILSON J W, et al. Pump-probe microscopic imaging of jurassic-aged eumelanin[J]. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2013, 4(11): 1924-1927.
- [54] ROBLES F E, DEB S, WILSON J W, et al. Pump-probe imaging of pigmented cutaneous melanoma primary lesions gives insight into metastatic potential[J]. Biomedical Optics Express, 2015, 6(9): 3631-3645.

- [55] FU D, YE T, MATTHEWS T E, et al. High-resolution in vivo imaging of blood vessels without labeling[J]. *Optics Letters*, 2007, 32(18): 2641-2643.
- [56] FU D, MATTHEWS T E, YE T, et al. Label-free in vivo optical imaging of microvasculature and oxygenation level[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2008, 13(4): 1-3.
- [57] ZHANG L, ZOU X, ZHANG B, et al. Label-free imaging of hemoglobin degradation and hemosiderin formation in brain tissues with femtosecond pump-probe microscopy[J]. *Theranostics*, 2018, 8(15): 4129-4140.
- [58] MATTHEWS T E, PILETIC I R, SELIM M A, et al. Pump-probe imaging differentiates melanoma from melanocytic nevi[J]. *Science Translational Medicine*, 2011, 3(71): 71ra15.
- [59] POGNA E A A, MARSILI M, DE FAZIO D, et al. Photo-induced bandgap renormalization governs the ultrafast response of single-layer MoS₂[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(1): 1182-1188.
- [60] WANG H, ZHANG C, RANA F. Ultrafast dynamics of defect-assisted electron-hole recombination in monolayer MoS₂[J]. *Nano Letters*, 2015, 15(1): 339-345.
- [61] KAR S, SU Y, NAIR R R, et al. Probing photoexcited carriers in a few-layer MoS₂ laminate by time-resolved optical pump-terahertz probe spectroscopy[J]. *ACS Nano*, 2015, 9(12): 12004-12010.
- [62] BORZDA T, GADERMAIER C, VUJICIC N, et al. Charge photogeneration in few-layer MoS₂ [J]. *Advanced Functional Materials*, 2015, 25(22): 3351-3358.
- [63] ZHANG L, SHEN S, LIU Z, et al. Label-free, quantitative imaging of MoS₂-nanosheets in live cells with simultaneous stimulated Raman scattering and transient absorption microscopy[J]. *Advanced Biosystems*, 2017, 1(4): 1700013.
- [64] SCHMIDT R, BERGHÄUSER G, SCHNEIDER R, et al. Ultrafast coulomb-induced intervalley coupling in atomically thin WS₂ [J]. *Nano Letters*, 2016, 16(5): 2945-2950.
- [65] RUPPERT C, CHERNIKOV A, HILL H M, et al. The role of electronic and phononic excitation in the optical response of monolayer WS₂ after ultrafast excitation[J]. *Nano Letters*, 2017, 17(2): 644-651.
- [66] KIM J, HONG X, JIN C, et al. Ultrafast generation of pseudo-magnetic field for valley excitons in WSe₂ monolayers[J]. *Science*, 2014, 346(6214): 1205.
- [67] STEINLEITNER P, MERKL P, NAGLER P, et al. Direct observation of ultrafast exciton formation in a monolayer of WSe₂[J]. *Nano Letters*, 2017, 17(3): 1455-1260.
- [68] SINGH A, MOODY G, WU S, et al. Coherent electronic coupling in atomically thin MoSe₂ [J]. *Physical Review Letters*, 2014, 112(21): 216804.
- [69] GAO F, GONG Y, TITZE M, et al. Valley trion dynamics in monolayer MoSe₂[J]. *Physical Review B*, 2016, 94(24): 245413.
- [70] MENG S J, SHI H Y, JIANG H, et al. Anisotropic charge carrier and coherent acoustic phonon dynamics of black phosphorus studied by transient absorption microscopy[J]. *Journal of Physical Chemistry C*, 2019, 123(32): 20051-20058.
- [71] ZHANG G W, CHAVES A, HUANG S Y, et al. Determination of layer-dependent exciton binding energies in few-layer black phosphorus [J]. *Science Advances*, 2018, 4(3): 6.
- [72] WANG X M, JONES A M, SEYLER K L, et al. Highly anisotropic and robust excitons in monolayer black phosphorus[J]. *Nature Nanotechnology*, 2015, 10(6): 517-521.
- [73] ZHANG G W, HUANG S Y, CHAVES A, et al. Infrared fingerprints of few-layer black phosphorus [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 9.
- [74] TRAN V, SOKLASKI R, LIANG Y F, et al. Layer-controlled band gap and anisotropic excitons in few-layer black phosphorus[J]. *Physical Review B*, 2014, 89(23): 6.
- [75] LIU H, NEAL A T, ZHU Z, et al. Phosphorene: an unexplored 2D semiconductor with a high hole mobility[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(4): 4033-4041.
- [76] LI L, KIM J, JIN C, et al. Direct observation of the layer-dependent electronic structure in phosphorene [J]. *Nature Nanotechnology*, 2017, 12(1): 21-25.
- [77] GEIM A K, GRIGORIEVA I V. Van der Waals heterostructures[J]. *Nature*, 2013, 499(7459): 419-425.
- [78] NOVOSELOV K S, MISHCHENKO A, CARVALHO A, et al. 2D materials and van der Waals heterostructures [J]. *Science*, 2016, 353(6298): aac9439.
- [79] JIN C, MA E Y, KARNI O, et al. Ultrafast dynamics in van der Waals heterostructures [J]. *Nature Nanotechnology*, 2018, 13(11): 994-1003.
- [80] MASSICOTTE M, SCHMIDT P, VIALLA F, et al. Picosecond photoresponse in van der Waals heterostructures [J]. *Nature Nanotechnology*, 2016, 11(1): 42-46.
- [81] GONG C, KIM E M, WANG Y, et al. Multiferroicity in atomic van der Waals heterostructures [J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 2657.
- [82] HUNT B, SANCHEZ-YAMAGISHI J D, YOUNG A F, et al. Massive dirac fermions and hofstadter butterfly in a van

- der Waals heterostructure[J]. *Science*, 2013, 340(6139): 1427.
- [83] WANG K, HUANG B, TIAN M, et al. Interlayer coupling in twisted WSe₂/WS₂ bilayer heterostructures revealed by optical spectroscopy [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(7): 6612–6622.
- [84] YUAN L, CHUNG T F, KUC A, et al. Photocarrier generation from interlayer charge–transfer transitions in WS₂–graphene heterostructures [J]. *Science Advances*, 2018, 4(2): e1700324.
- [85] ZHU T, YUAN L, ZHAO Y, et al. Highly mobile charge–transfer excitons in two–dimensional WS₂/tetracene heterostructures[J]. *Science Advances*, 2018, 4(1): eaa03104.
- [86] LAURET J S, VOISIN C, CASSABOIS G, et al. Ultrafast carrier dynamics in single–wall carbon nanotubes [J]. *Physical Review Letters*, 2003, 90(5): 057404.
- [87] JUNG Y, SLIPCHENKO M N, LIU C H, et al. Fast detection of the metallic state of individual single–walled carbon nanotubes using a transient–absorption optical microscope [J]. *Physical Review Letters*, 2010, 105(21): 217401.
- [88] TONG L, LIU Y, DOLASH B D, et al. Label-free imaging of semiconducting and metallic carbon nanotubes in cells and mice using transient absorption microscopy[J]. *Nature Nanotechnology*, 2012, 7(1): 56–61.

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(No. 61975033), Shanghai Municipal Science and Technology Major Project (Nos. 2017SHZDZX01, 2018SHZDZX01), Specialized Research Project of the Shanghai Health and Family Planning Commission on Smart Medicine (No. 2018ZHYL0204), Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (No. LY20H130005), Medicine and Health Research Foundation of Zhejiang Province (No. 2019RC006)