

基于宽场随机荧光漂白的超分辨显微方法

蔡欢庆 匡翠方 王轶凡 葛剑虹 刘旭

(浙江大学现代光学仪器国家重点实验室, 浙江 杭州 310027)

摘要 对基于宽场随机荧光漂白的超分辨显微方法进行了研究。通过对获取的荧光漂白图像进行差分处理, 获得大量稀疏的荧光分子图像, 相应的荧光分子被一一区分并通过点扩散函数(PSF)数字化的方法计算出中心位置, 从而重构超分辨显微图像。并对标记 Alex 488 普通荧光染料的人胚肾细胞进行了成像, 和普通荧光显微镜相比, 分辨率提升了约 40%, 表明该方法适用于常规荧光染料, 并能突破衍射极限达到超分辨效果。该方法克服了常用的基于单分子精确定位技术需要对荧光分子进行反复地激活-猝灭, 并难以适用于普通荧光染料的缺点。

关键词 显微; 超分辨; 随机荧光漂白; 单分子定位

中图分类号 TH742.65 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL201340.1110001

Superresolution Microscopy Imaging Based on Wide-Field Stochastic Fluorescent Bleaching

Cai Huanqing Kuang Cuifang Wang Yifan Ge Jianhong Liu Xu

(State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310027, China)

Abstract A superresolution imaging technique based on wide-field stochastic fluorescent bleaching is studied. A stream of fluorescence images is simply acquired, and single fluorophore is detected by subtracting each frame from the previous one. After image subtractions, a superresolution image is got by fitting images of single fluorescent molecules with a point dispersion function method to localize them. Then this method is used to image the human embryonic kidney cells with the conventional fluorescent probe Alex 488. Compared with the conventional fluorescence microscope, the resolution increases about 40%, showing that it works with the sample with conventional fluorescent probes and can break the diffraction limit. Also it overcomes the weakness of conventional techniques based on the precise localization of single molecules, which needs to activate and quench the fluorescent molecules repeatedly, and can not be applied to conventional fluorescent samples.

Key words microscopy; superresolution; stochastic fluorescent bleaching; localization of single molecule

OCIS codes 110.0180; 110.2960; 180.0180; 180.2520

1 引 言

随着现代生物医学的飞速发展,为了更好地了解生物生命的相关作用过程和疾病的产生机理等问题,需要对细胞的三维空间进行精确地定位。同时,在后基因组时代,生物体系中相关蛋白质结构和功能的动态研究已经成为了研究重点。20 世纪以来,

科学家们都在探索如何提升光学显微镜的分辨率,以便精确地观察和定位相关的生物细胞。然而,早在 1873 年德国人 Abbe^[1]就提出了衍射极限的概念,其研究表明,对于一般的透镜其聚焦光斑的光强分布为点扩散函数(PSF),PSF 的半峰全宽(FWHM)可作为系统可分辨的最小尺寸,大小约为

收稿日期: 2013-05-07; 收到修改稿日期: 2013-05-31

基金项目: 国家自然科学基金(61205160)、教育部博士点基金(20110101120061,20120101130006)

作者简介: 蔡欢庆(1990—),男,硕士研究生,主要从事超分辨显微成像方面的研究。E-mail: chqing@zju.edu.cn

导师简介: 葛剑虹(1972—),女,博士,副教授,主要从事超分辨显微成像方面的研究。

E-mail: jianhong@zju.edu.cn(通信联系人)

$\lambda/(2NA)$, 其中 λ 为入射光波长, NA 为系统数值孔径。因此为了提高光学显微镜的分辨率, 一般都是通过减小入射光波长或者增加光学系统的数值孔径。但是受限于经典的衍射极限理论, 常规光学显微镜的极限分辨率只有 200 nm 左右^[2], 难以满足现代生物医学的需要。

虽然当显微镜需要分辨两个或者更多点光源位置时难以突破衍射极限, 但当显微镜视野内仅有单个荧光分子时, 通过高斯拟合单分子的 PSF 可以很容易地突破常规光学显微镜分辨率的极限, 实现超分辨显微。理论上来说, 只要收集到足够多的光子, 并且有效控制背景荧光噪声和探测器噪声就可以精确地定位单分子的中心位置^[3-6]。

基于单分子定位理论, Betzig 等^[7]于 2006 年提出了光激活定位显微术 (PALM), 同年底, Rust 等^[8]提出了一种类似 PALM 的方法并命名为随机光学重构显微术 (STORM)。这两种光学超分辨技术都是利用荧光分子的光开关效应^[9], 首先采用一束特定波长的激活光使得同一时间只有极少数稀疏的荧光分子被激活, 并具备发射荧光的能力, 此时这些荧光分子所发出的荧光将不会由于衍射效应而发生空间上的串扰, 再利用另一个波长的激光来观察、精确定位并漂白这些荧光分子, 相应的荧光分子就可以被一一区分并通过 PSF 数字化的方法计算出中心位置, 重复这一过程逐个获取数微米尺度范围内所有荧光分子的中心位置, 最后叠加重构成一幅完整的图像, 即可实现超分辨显微。然而使用 PALM 或 STORM 技术对相关细胞组织进行超分辨成像时, 每次只能定位几个荧光分子, 为了保证足够高的定位精度以便获取超分辨图像, 需要足够多的光子, 因此在实验中要选择不同波长、不同能量的激光以便不断地激活、猝灭这些荧光蛋白分子或染料。同时当对高密度的荧光样品成像时, 由于荧光的漂白性, 一段时间后, 荧光样品的荧光强度会衰减, 影响荧光分子的观察和定位以及最终的显微成像效果, 所以无论是 PALM 还是 STORM 都是选用特殊的荧光蛋白染料, 同时对荧光的抗漂白性有较高要求, 难以应用于普通的荧光分子或染料, 需要量子效率更高、荧光更稳定的荧光蛋白或荧光染料^[10-15]。本文对基于宽场随机荧光漂白的超分辨显微方法进行研究, 该方法充分利用荧光的随机漂白性, 通过对获取的荧光漂白图像进行差分处理, 获得大量稀疏的荧光分子图像, 进而构建超分辨图像, 实现对细胞相关组织的超分辨成像。

2 实验方法

荧光成像的质量依赖于荧光信号强度, 然而由于荧光漂白效应, 荧光物质激发出来的荧光强度会随着时间的推移逐步减弱乃至消失^[16]。因此在使用荧光显微镜观察细胞或通过单分子定位技术重构细胞图像的过程中, 会利用各种办法克服荧光的漂白效应, 比如控制激发光强度、添加荧光抗漂白剂等。利用荧光的漂白性, 提出了基于宽场随机荧光漂白的超分辨显微方法。该方法首先是用一束激光激发样品中所有的荧光分子并发出荧光, 同时记录下图像, 然后对拍摄的相关图像进行差分处理以得到大量稀疏的荧光分子图像, 最后将这些荧光分子的 PSF 同二维高斯函数拟合, 来精确定位这些荧光分子的位置。该方法充分利用了荧光分子的随机漂白性, 不需要对被探测的荧光分子进行反复的激活-猝灭, 并且能够应用于所有常用的合成荧光染料以及基因表达的荧光蛋白。图 1 为基于随机荧光漂白超分辨显微方法原理图。

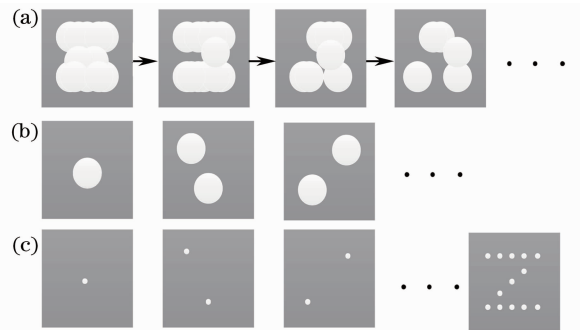


图 1 基于随机荧光漂白超分辨显微方法原理图。(a) 荧光随机漂白; (b) 差分得到稀疏荧光分子; (c) 单分子精确定位

Fig. 1 Schematic of superresolution microscopy based on stochastic fluorescent bleaching. (a) Stochastic fluorescent bleaching; (b) sparse fluorescent molecule by subtracting each frame from the previous one; (c) precise location of single molecule

如图 2 所示以标记 Alex 488 普通荧光蛋白分子的人胚肾细胞为实验样本, 将样品放置在奥林巴斯 IX71 型荧光显微镜的载物台上, 并选用放大倍率 100、数值孔径 1.49 的全内反射荧光 (TIRF) 物镜, 同时调节荧光显微镜的焦距, 在明场条件下观察需要进行超分辨成像的细胞组织形状及其所在位置, 接着根据实验选择与荧光染料匹配功率为 2.1 mW 的 488 nm 激发光并引入光路, 激活荧光蛋白分子使其全部发出荧光, 并使用 iXon897 型电子倍增电耦合器件 (EMCCD) 对样品拍照, 其中

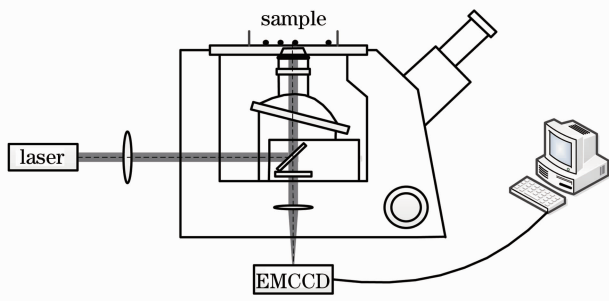


图2 基于宽场随机荧光漂白超分辨显微系统示意图
Fig. 2 Diagram of superresolution microscopy system based on stochastic wide-filed fluorescent bleaching

EMCCD的曝光时间为0.024 s,直至样品由于荧光漂白效应完全不能发出荧光。基于Matlab软件编程对EMCCD所拍摄的荧光漂白照片进行图像处

理后,获取单分子图像来重新构建肾细胞的超分辨图像。

3 实验结果与分析

为了验证基于宽场随机荧光漂白超分辨显微方法的效果,将EMCCD直接拍摄的人胚肾细胞图片和重构后的细胞图片进行直观对比,如图3所示。同时对细胞的部分微观结构进行强度分布的线扫描,并测量其强度分布的半峰全宽,可以看到EMCCD直接拍摄的图片分辨率约为250 nm,而重构的图像分辨率可以达到约150 nm,提升了约40%。可见基于宽场随机荧光漂白超分辨显微方法能够突破普通荧光显微镜的光学衍射极限,有效提高分辨率。

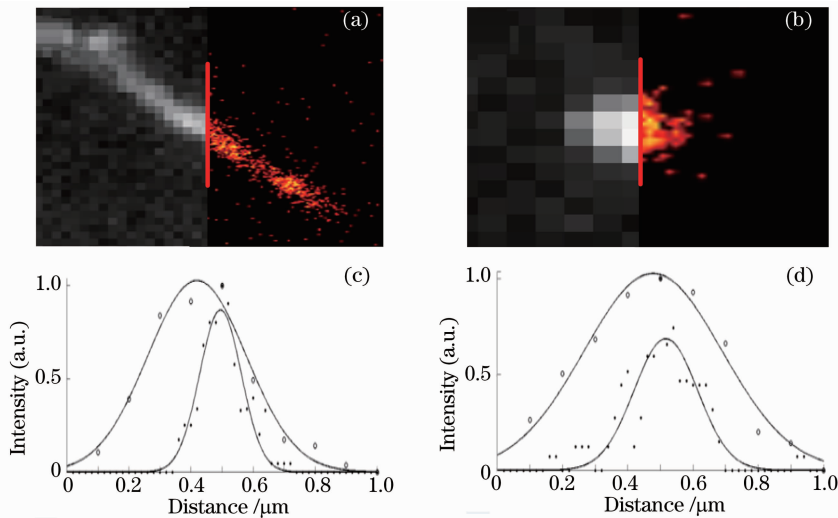


图3 EMCCD拍摄和重构后的细胞对比图。(a)细胞微管结构的放大对比图;(b)细胞点状结构的放大对比图;
(c)(a)中细胞的线扫描强度图;(d)(b)中细胞的线扫描强度图

Fig. 3 Comparison of images shot by EMCCD camera and reconstructed cell images. (a) Enlarged comparison image of the cell microtubules; (b) comparison image of the cell punctate structure; (c) line scans of the intensity distribution [line in (a)]; (d) line scans of the intensity distribution [line in (b)]

荧光的漂白特性不仅与荧光分子的自身结构相关,而且激发光照射的时间长短、功率大小及荧光分子所处的环境都会影响荧光的漂白过程。如图4所示,荧光的漂白并不是一个均匀、线性的过程,随着荧光强度的逐渐衰弱其漂白速率会越来越慢。因此荧光漂白前期可以适当增加EMCCD的拍照频率,拍摄更多的荧光漂白图片,以便在后期对图像进行差分处理时,获得更多的单分子荧光图像。同时要适当控制激发光的能量,防止荧光漂白速率过快,出现大面积漂白,这样就无法获得相应区域的单分子荧光图像,从而丢失细胞组织的细节部分信息,难以重构出相应的超分辨图像。

为了进一步研究图片数量的多少对重构的细胞图像质量的影响,以便在后期的图像处理中选取最合适数量的图片,既能减少需要处理的图片数量,又能获得最佳的成像效果,利用不同张数的图片分别重构细胞的图像,如图5所示。通过对图5中4幅图的比较发现,由于荧光漂白速率在前期相对而言较快,因此前期图片的数量对最终重构图的效果有非常重要的影响,而在荧光漂白的后半段,由于漂白速率的变慢,并且大部分荧光已经完全漂白,所以后期图片的数量对最终重构图的效果影响不大。因此在最后处理图片的过程中,可以适当的筛选后期的图片,以减少相关的计算量。

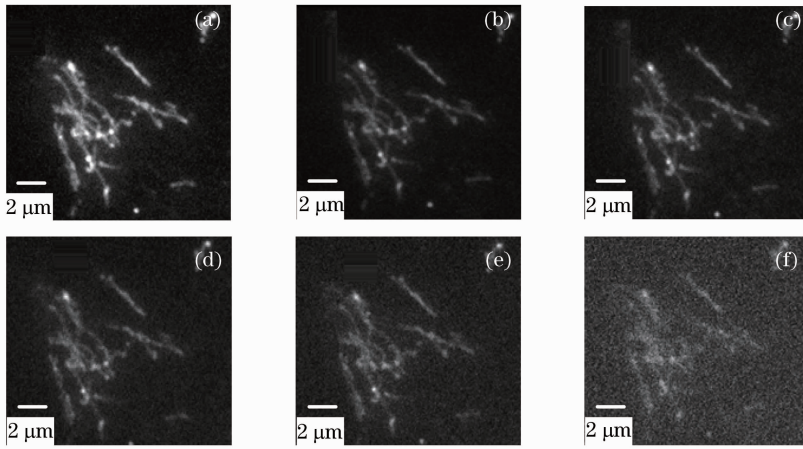


图 4 EMCCD 拍摄的荧光漂白图像。(a) 第 1 幅；(b) 第 100 幅；(c) 第 200 幅；(d) 第 500 幅；(e) 第 1000 幅；(f) 第 3000 幅

Fig. 4 Fluorescent bleaching images by EMCCD camera. (a) 1 st; (b) 100 th; (c) 200 th; (d) 500 th; (e) 1000 th; (f) 3000 th

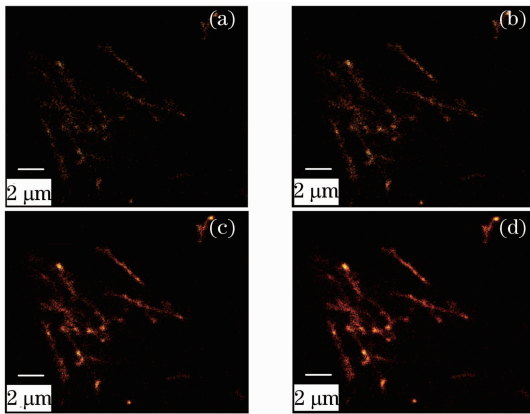


图 5 不同张数图片重构的细胞图像。(a) 100 张；(b) 200 张；(c) 500 张；(d) 1000 张

Fig. 5 Cell images reconstructed by different number of pictures. (a) 100 pictures; (b) 200 pictures; (c) 500 pictures; (d) 1000 pictures

4 结 论

主要对基于宽场随机荧光漂白的超分辨显微方法进行研究,包括其成像原理、实验系统等,并利用 EMCCD 拍摄的人胚肾细胞荧光漂白图像,重建其超分辨显微图像。研究表明,基于宽场随机荧光漂白的超分辨显微方法能够突破衍射极限,重构的肾细胞图像分辨率达到了约 150 nm,相较于普通荧光显微镜约 250 nm 的分辨率提升了 40%。由于稀疏的单分子图像是通过荧光漂白图像差分所获得,较大的背景噪声会影响最终的定位精度,虽然现有的分辨率同 PALM 和 STORM 相比没能达到亚百纳米级别,但是通过合理的控制激发光强度,并适当筛选后期需处理的图像,分辨率仍有很大的提升

空间。该方法只需要一束激发光激发荧光蛋白使其发出荧光,使用普通荧光显微镜观察即可,适用于普通的荧光染料,而且无需反复激活和猝灭荧光分子,便于在实验中应用。

参 考 文 献

- 1 E Abbe. Contributions to the theory of the microscope and that microscopic perception [J]. Arch Microsc Anat, 1873, 9: 413-468.
- 2 J Pawley. Handbook of Biological Confocal Microscopy (3rd Edition) [M]. New York: Springer, 2006. 20-42.
- 3 R Thompson, D Larson, W Webb. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes [J]. Biophys, 2002, 82(5): 2775-2783.
- 4 Yu Bin, Chen Danni, Liu Lei, et al.. Fast Fourier-domain localization algorithm of single molecule with nanometer resolution for super-resolution fluorescence imaging [J]. Acta Optica Sinica, 2012, 32(2): 0218001.
- 于 斌, 陈丹妮, 刘 磊, 等. 荧光单分子的频率域纳米级快速定位算法及其在超分辨荧光成像中的应用[J]. 光学学报, 2012, 32(2): 0218001.
- 5 Li Zhen, Qu Junle, Shao Yonghong, et al.. Multiple variational field-of-view multifocal multiphoton fluorescence microscope [J]. Acta Optica Sinica, 2012, 32(10): 1018001.
- 李 震, 屈军乐, 邵永红, 等. 多变视场的多焦点多光子激发荧光显微技术 [J]. 光学学报, 2012, 32(10): 1018001.
- 6 Zhai Yongping, Zhou Dongxiang, Liu Yunhui, et al.. Design of evaluation index for auto-focusing function and optimal function selection [J]. Acta Optica Sinica, 2011, 31(4): 0418002.
- 翟永平, 周东翔, 刘云辉, 等. 聚焦函数性能评价指标设计及最优函数选取 [J]. 光学学报, 2011, 31(4): 0418002.
- 7 E Betzig, G Patterson, R Sougrat, et al.. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. Science, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- 8 M Rust, M Bates, X Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. Nat Methods, 2006, 3(10): 793-796.
- 9 S Ram, E Ward, R Ober. Beyond Rayleigh's criterion: a resolution measure with application to single-molecule microscopy [C]. Proc. Natl. Acad. Sci., 2006, 103: 4457-4462.
- 10 Mao Zhengle, Wang Chen, Cheng Ya. Superresolution far-field

- fluorescence bio-imaging: breaking the diffraction barrier [J]. Chinese J Lasers, 2008, 35(9): 1283–1307.
- 毛峥乐, 王琛, 程亚. 超分辨远场生物荧光成像——突破光学衍射极限[J]. 中国激光, 2008, 35(9): 1283–1307.
- 11 G H Patterson, E Betzig, J Lippincott-Schwartz, *et al.*. Developing photoactivated location microscopy (PALM) [C]. Biomedical Imaging: From Nano to Macro 2007. ISBI 2007. 4th IEEE International Symposium on. IEEE, 2007. 940–943.
- 12 S Chen, H E Hamm. PALM reading: Seeing the future of cell biology at higher resolution [J]. Developmental Cell, 2006, 11(4): 438–439.
- 13 W E Moerner. New directions in single-molecule imaging and analysis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(31): 12596–12602.
- 14 K Xu, H Babcock, X Zhuang. Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton [J]. Nat Methods, 2012, 9(2): 185–188.
- 15 M Bates, B Huang, G Dempsey, *et al.*. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes [J]. Science, 2007, 317(5845): 1749–1753.
- 16 M Bopp, Y Jia, L Li, *et al.*. Fluorescence and photobleaching dynamics of single light-harvesting complexes [J]. Proc Natl Acad Sci 1997, 94(20): 10630–10635.

栏目编辑: 韩峰