

超分辨显微技术在活细胞中的应用与发展

胡春光, 查日东, 凌秋雨, 何程智, 李奇峰, 胡晓东, 胡小唐

(天津大学 精密仪器与光电子工程学院, 天津 300072)

摘要: 细胞是生命体的基本单位 and 功能单位, 对活细胞内部结构及其功能的研究是了解掌握生命本质的基础之一, 因此活细胞的实时观测对生命科学的发展具有重要意义。传统的光学显微技术受衍射极限的限制, 无法观测 200 nm 以下的生物结构细节。近 20 年来, 随着超衍射极限光学理论、技术、器件和荧光探针等方面的快速发展, 超分辨显微成像技术已成为应用于生命科学研究的重要手段。然而, 大多数超分辨显微方法或测量耗时长, 或易引起荧光蛋白漂白/细胞损伤, 在活细胞研究中受到极大限制, 已成为超分辨显微领域重点攻关的方向之一。为此, 文中结合作者在快速超分辨显微技术研究的基础上, 介绍了基于单分子成像的光激活定位显微技术和随机光学重构显微技术、基于荧光非线性可饱和光转换的受激发射显微技术以及基于结构光照明超分辨显微技术, 并探讨了在活细胞成像中的发展应用。最后, 文中展望了超分辨显微成像技术在活细胞成像中的未来发展趋势。

关键词: 超分辨显微技术; 单分子定位显微技术; 受激发射损耗显微技术; 结构光照明显微技术

中图分类号: O439 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3788/IRLA201746.1103002

Super-resolution microscopy applications and development in living cell

Hu Chunguang, Zha Ridong, Ling Qiuyu, He Chengzhi, Li Qifeng, Hu Xiaodong, Hu Xiaotang

(School of Precision Instrument & Opto-Electronics Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Cell is the basic unit and functional unit of living body. The study of the internal structure and function of living cells is one of the foundations of mastering the essence of life. Therefore, the real-time observation of living cells is of great significance for the development of life sciences. Conventional optical microscopy is limited by the diffraction limits and can not observe the details of biological structures below 200 nm. In the past 20 years, with the rapid development of super-diffraction limit optical theory, technology, devices and fluorescent probes, super-resolution microscopy has become an important method for life science research. However, most super-resolution microscopic methods or measurements take a long time, or are likely to cause photobleaching/phototoxicity, and are severely limited in living cell studies. In this paper, based on the study of fast super-resolution microscopy, the photoactivated localization microscopy and stochastic optical reconstruction microscopy were introduced based on single molecule localization microscopy. The stimulated emission depletion microscopy based on fluorescence non-linear saturated light conversion and structured illumination microscopy based on

收稿日期: 2017-10-10; 修订日期: 2017-11-20

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFF0107003); 天津市应用基础及前沿技术研究计划重点项目(15JCZDJC31600)

作者简介: 胡春光(1981-), 男, 副教授, 博士, 主要从事超分辨显微技术、光学精密测量等方面的研究。Email: cghu@tju.edu.cn

通讯作者: 何程智(1986-), 男, 博士后, 主要从事超分辨显微、生物单分子测量等方面的研究。Email: czhe@tju.edu.cn

structured light illumination was also introduced. Besides, the development and application of cell imaging were explored. Finally, an outlook of the future development trend of super-resolution microscopy in living cell imaging was provided.

Key words: super-resolution microscopy; single molecule localization microscopy; stimulated emission depletion microscopy; structured illumination microscopy

0 引言

在纳米技术和生物技术的研究中,高分辨显微成像技术至关重要。特别在生命科学领域,细胞内各种结构的特征尺度大多在纳米量级,如核糖体和微管在 20 nm 左右,一些蛋白质、分子生物化学的传动装置常小于 10 nm。为了能够直接观察活体细胞内的生命活动,纳米量级空间分辨率的又不影响生物体系活性的快速显微方法十分必要。凭借非接触、无损伤、高对比度和特异性标记等优点,荧光宽场显微成像技术和共聚焦激光扫描显微术 (CLSM)^[1]成为观察细胞生命活动的有力工具之一^[2]。但是由于空间分辨率不可避免地受到光学衍射极限的限制,即横向分辨率约为 200 nm,轴向约为 700 nm,难以满足纳米量级样本的观测需求。另一方面,近场扫描光学显微镜(NSOM)^[3]和扫描探针显微镜(SPM)^[4]以及全内反射荧光显微镜(TIRF)^[5]受限于近场,只能探测到生物样本表面的信息,无法给出细胞内的结构信息。此外,电子显微镜(SEM)的分辨率虽然是亚纳米量级,可以观察到精细的亚细胞和生物分子结构,但是必须在真空环境下工作,难以测量活细胞样本的动态信息。这些都阻碍了人们进一步地对生命科学领域的探索。

随着超快激光技术、荧光探针标记技术、微弱信号探测技术的进步,在过去 20 年中,科学家们开创性地提出了几种突破光学衍射极限的远场荧光显微技术。从原理上,它们可以简单地划为 3 类:第一类基于荧光开关效应的单分子定位显微技术,典型的如光激活定位显微技术(PALM)、随机光学重构显微技术(STORM);第二类基于荧光非线性饱和和光转换的显微技术,典型代表为受激发射损耗显微技术(STED);第三类基于结构光照明和显微成像的结构光照明显微技术 (SIM)。这些技术的发展极大地推动了生命科学的发展,但活细胞成像相对于固定细胞成像,需要考虑更多的因素。活细胞成像对成像环

境的要求更加苛刻,实验中需要严格控制实验温度、湿度等条件;细胞只有在很短的曝光时间才能保持细胞活性,长时间曝光会引起细胞死亡;实验中对光强的选择需要避免过度照射和光损伤,需要长时间保持细胞的活性;成像时的取样频率必须足够高,这样才能观测细胞动态信息而不至于丢失信息。因此对活细胞超分辨成像技术的研究对进一步探索生命活动具有极其重要的意义。因而,上述超分辨显微技术在活细胞中的应用需要综合考虑空间分辨率、时间分辨率、成像深度以及对活细胞的光损伤和光致漂白效应等因素,如图 1 所示。下面将分别介绍上述超分辨显微技术的基本原理以及在活细胞成像中的应用与发展。

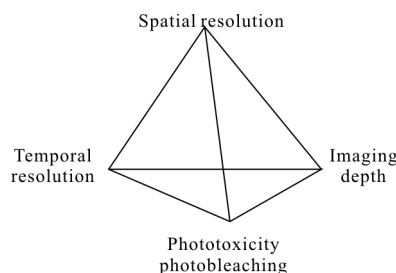


图 1 活细胞成像的影响因素

Fig.1 Influencing factors of living cell imaging

1 单分子定位显微技术

单分子定位显微技术(Single Molecule Localization Microscopy, SMLM)^[6]是使用特定的荧光探针,用特定波长的激光来激活荧光分子,然后用另一波长的激光激发荧光分子并成像。其中,控制激光的强度,使得每一幅图像中都只有少量稀疏的荧光分子被激活。采集成千上万帧的图像以获得足够的单分子,随后利用单分子定位算法(如二维高斯拟合)精确定位单分子的中心位置。最后,将所得到的单分子定位点进行叠加重建,最终获得一幅超分辨图像,如图 2 所示。目前基于单分子定位显微技术的超分辨成像技术主要包括光激活定位显微技术 (Photo Activated Localization

Microscopy, PALM)、随机光学重构显微技术 (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM)以及由这两种技术衍生出的其它成像技术。

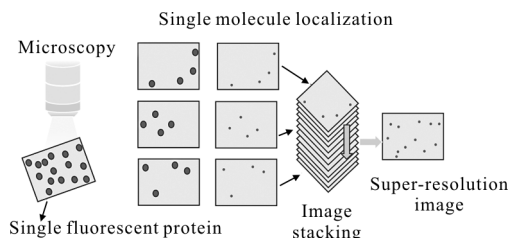


图 2 单分子定位显微技术原理

Fig.2 Principle of the single molecule localization microscopy

PALM 的概念在 1994 年首先由 Eric Betzig 提出^[7],并且在 2006 年通过实验实现^[8]。PALM 技术结合了单分子检测技术、光激活荧光蛋白标记技术以及单分子定位算法,将显微技术的定位精度提高到 20 nm 以内。与此同时,庄小威提出了 STORM 技术,其原理与 PALM 技术基本相同,同样利用单分子检测技术和单分子定位算法提高显微技术的定位精度,区别在于 PALM 技术利用荧光蛋白的光激活效应实现开关,而 STORM 技术利用荧光探针和免疫荧光技术进行标记^[9]。PALM 技术通过细胞自身表达荧光蛋白的方式进行成像,因此更适合用于活细胞内蛋白的超分辨成像。2007 年, Betzig 等人将 PALM 显微技术应用于记录两种蛋白质的相对位置^[10],并且在次年开发出可用于活细胞上记录细胞黏附蛋白的动力学过程的 PALM 成像技术^[11]。2007 年, STORM 技术实现了多色成像,在原有的 Cy3~Cy5 荧光分子对的基础上,发展了不同荧光分子对, Cy3 与一系列荧光分子在不同波长激光激发下产生不同的荧光,可以用来实现多色荧光成像分析,同时记录两种甚至更多中蛋白质的空间相对位置^[12]。

STORM 技术和 PALM 技术这类单分子定位显微技术的分辨率取决于单分子成像的定位精度,理论上可以达到 1 nm 的分辨率,现阶段可得到的横向分辨率小于 20 nm、纵向分辨率小于 50 nm。PALM 需要使用能被激活并转化的荧光分子,并且由于其相对较高的背景噪声,使其应用受到限制。Matsuda 等人发现通过对采集的图像进行去噪和去卷积的预处理重构出的超分辨图像的空间分辨率大

大提高,利用改进的算法来处理背景噪声并采用这种方法来对果蝇有丝分裂的染色体的结构进行成像,观测到约 30 nm 的丝状物质,这是首次观测到组蛋白变体的精细染色质细丝,其分辨率接近于传统的电子显微镜图像(10~30 nm)^[13]。PALM 技术与光学干涉技术相结合,可将三维的分辨率提高到小于 20 nm,在收集同等大小光子时极大地提高了定位精度^[14-15],基于这一技术观测到了细胞黏着斑蛋白的显微结构。研究人员利用 iPALM 技术,同时采用双聚物探针,分别吸引两种蛋白,从而了解蛋白如何以及为什么在一个位点作用于细胞的分裂和生长,而在另一个位点使细胞死亡,利用 iPALM 技术,研究人员能够在细胞的各处快速操纵蛋白活性^[16]。

在活细胞实验中,为了更好地研究细胞的动力学特性,时间分辨率是非常重要的。根据 Nyquist 准则,图像的采样间隔必须小于想要得到的分辨率的一半。因此,活细胞成像的时间分辨率取决于累积足够多的单分子以达到预期的 Nyquist 分辨率所需要的时间。为了提高时间分辨率,可通过增大照明激光的光强使得光转换染料标记的蛋白在同一时间内转换更多的次数,从而累积足够的单分子以达到预期的分辨率。但是高光强造成的光致漂白问题限制了活细胞成像时间,因此,满足活细胞实时超分辨成像可以从开发出量子效率更高、荧光更稳定、颜色不同的荧光蛋白或荧光染料(提高分辨率);开发新型的、高通量的光控开关荧光分子(接收到足够多的光子);以及采用高浓度的分析方法等几个方面来实现。

2011 年, Jones 等人利用 Alexa Fluor 647 作为标记,实现了 20 nm 的空间分辨率(2D)和 0.5 s 的时间分辨率,同时使用光转换染料通过 SNAP 标签标记细胞转铁蛋白,实现了活细胞三维成像,得到 30 nm 的横向分辨率和 50 nm 的轴向分辨率,时间分辨率为 1~2 s^[17]。

增加每次激活的荧光分子总数,即高密度分子采集,从而提高单位时间内的荧光分子定位密度。随着荧光分子激活密度的提高,荧光分子信号不再完全稀疏分布,开始出现荧光信号的局部重叠,并且信号的重叠程度随着激活密度的上升而上升。此时,不仅需要荧光分子的中心位置进行拟合,还需要确

定荧光分子的来源。之前的单分子定位算法都是基于光子具有单一分子来源的前提条件,因此不再适用于高密度分子定位的情况。2011年 Hoden 等人首次提出了高密度分子定位算法 DAOSTORM。它通过高斯模板消减法进行初始模型的预估,通过最小二乘拟合并利用最小训练误差选取最佳拟合模型,将可定位分子密度提高 6~9 倍,DAOSTORM 的数据处理速度为每秒 100 个分子,对于一般超分辨定位数据的处理时间要大于 2 h,但 DAOSTORM 的定位精度严重依赖于信噪比,当信噪比较低时,最小训练误差统计量选取最优模型的准确度较低,DAOSTORM 的性能急剧下降^[18]。2012年, Babcock 等人提出三维高密度定位算法 3D-DAOSTORM,实现对荧光信号重叠和点扩散函数变化的荧光分子的定位^[19]。2011年,研究者将极大似然拟合法引入高密度定位领域,并且利用图形处理器(Graphic Processing Unit, GPU)进行运算,实现 1 200 个/s 分子的定位速度,但其定位精度较低^[20]。然而这些算法只针对弱背景情况下的荧光分子成像,针对这一问题, Quan 等人建立了 SSM-BIC 算法,实现弱信号水平下高密度荧光分子的定位,在保证定位精度的情况下将定位密度提高了 3~6 倍^[21]。另外还有基于分子密度估计的算法,利用贝叶斯分析方法(Bayesian Analysis of the Blinking and Bleaching, 3B),将所有采集的数据建模,构建闪烁与漂白的多

荧光团模型,最终得到的是荧光分子的概率分布图。3B 方法对普通的宽场照明显微技术采集的图像处理也能得到约 50 nm 的高空间分辨,其最大的优点在于可以降低超分辨显微技术对光学系统和荧光探针的苛刻要求,但算法较复杂且计算时间长^[22]。2017年 Xu Fan 等人开发出 Quick-3B 算法,将计算速度提高的 17 倍,极大地提高了时间分辨率,并且可以将此算法应用于各类显微技术如全内反射荧光显微技术、PALM 技术、STORM 技术以及层光显微技术^[23]。

无论 PALM 还是 STORM 技术,由于需要反复激活-淬灭荧光分子,需要获得许多幅原始图像来重构出一幅超分辨图像,因此在活细胞成像时其时间分辨率相对较低,限制了其在跟踪细胞内动态生命活动中的应用。

2 受激发射损耗显微技术

受激发射损耗显微技术利用荧光饱和与激发态荧光受激损耗的非线性关系,通过两束激光实现,激发光和损耗光,其中损耗光的波长大于激发光的波长。激发光照射被荧光标记的样品,使样品发出荧光物质,另一束损耗光通过相位调制形成中空型的光圈,光圈将激发光斑焦点外围的荧光淬灭,通过减小有效荧光发光面积,减小系统点扩散函数,实现超衍射极限的分辨率,其原理如图 3 所示。

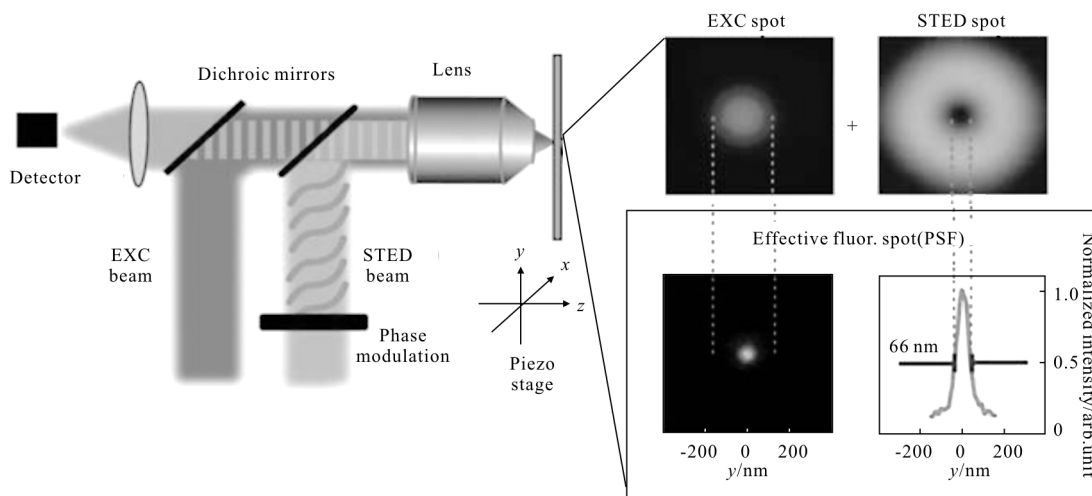


图 3 受激发射损耗显微技术原理^[24]

Fig.3 Principle of the stimulated emission depletion microscopy^[24]

1994年,德国的Stefan W.Hell首次提出受激发射损耗(Stimulated Emission Depletion, STED)显微技术,计算出理论分辨率 35 nm ^[25]。1999年 Hell 和 Thomas 等人首次在实验上验证了受激发射损耗显微技术,在横向分辨率上突破了衍射极限,分辨率为 106 nm 。STED 显微技术由于采用聚焦光束扫描时间过长,不利于对成像面积较大的活细胞等生物样本内生物分子的动态过程或相互作用过程进行实时监测;另一方面,STED 技术要实现高的空间分辨率,需要在样本上施加较强的损耗光,而增加损耗光强同时也会对荧光样本造成光漂白和光毒害。为此,STED 显微技术在活细胞成像中减小对活细胞的损伤可以从降低损耗光的光强以及提高成像速度着手。

2.1 降低损耗光的光强

2011年,Vicidomini 等提出了基于时间门的 STED(g-STED)显微技术。g-STED 显微技术在激发光照射后,隔一段时间再进行荧光探测,对荧光信号进行实时过滤,去除激发光边缘位置的短寿命自发荧光,从而极大地减少了所需要的荧光强度(衰减3倍),并且提高系统的分辨率^[24]。换句话说,g-STED 能够在损耗光光强较弱的情况下得到与普通 STED 相同的分辨率^[26]。但是,g-STED 显微技术会造成信噪比和信背比的降低,2016年,Hernandez 等人将 g-STED 显微技术与双光子 STED 显微技术结合起来,提出一种多图去卷积算法解决 g-STED 检测荧光信号方法造成的信噪比和信背比降低的问题,通过算法将早期光子(采用时间门检测时去除的光子)移动到其原本的位置,并且移除由损耗光造成的背景光,从而实现信噪比和信背比的恢复^[27]。此外,实验表明,实现 g-STED 显微技术,激发光必须采用脉冲光,而损耗光必须采用连续光,脉冲光作为损耗光时,g-STED 显微技术不能提高 STED 显微技术的分辨率,从而无法降低损耗光的光强^[28-29]。

Hao Xiang 等人提出一种对环形损耗光中间光斑大小控制的方法,利用一对普罗棱镜实现图像反相以及相位调制实现对环形损耗光中间光斑大小的控制,使其中间光斑的大小能够在 $0.555\sim 0.830$ 之间变化,当中间光斑最小时,若不需要提高分辨率时,损耗光相对于常用的损耗光的光强可减少

33% ^[30]。

2.2 提高成像速度

原则上,STED 显微技术的成像速度等同于激光共聚焦扫描显微技术或荧光扫描显微技术的速度。实际测量中,成像速度取决于信噪比,视场的大小和最大扫描速度等因素^[31]。为了提高 STED 显微技术的成像速度, Hell 等人利用扫描振镜代替电动平台,在激发光和损耗光方向上对区域内进行双向扫描,实现以 28 帧/s 的视频扫描速度观测区域内囊泡的运动。这一速度已经满足 STED 显微技术对活体样品的探测,但能够观测的视场范围较小^[32]。

为了进一步提高 STED 显微技术的成像速度,提出了一种并行的方法。通过对照明光束调制使其经过物镜聚焦后在样品上同时形成多个聚焦光斑的方法提高扫描速度。通过在 STED 显微系统中增加两块沃拉斯顿棱镜,使得激发光和损耗光在被测样品上形成4个聚焦光斑,与之相对应的,采用4个点探测器同时采集荧光信号,在实现 38 nm 超高空间分辨率的同时,将 STED 显微技术的成像速度提高4倍^[34]。Yang B 等人利用空间光调制器/沃拉斯顿棱镜对将损耗光分成四束光,经物镜后在样品面上相互干涉形成光学晶格,结合宽场照明的激发光和高速相机实现了高并行的 STED 显微技术。实现了 70 nm 超高空间分辨率和 12.5 帧/s 的高速成像,且成像速度仅受 CMOS 相机输出时间的限制^[35-36]。

3 STED 显微技术成像深度的突破

STED 显微技术中激发荧光探针的过程是单光子激发(线性激发),光学穿透性较差,对较厚的生物样品成像时,受生物组织内部散射的影响,照明光束的穿透深度较小,且光束在较厚的生物样品中传播时会产生较大的像差,影响损耗光斑的质量,降低系统的分辨率,因此 STED 显微技术只能用于组织表面(<100)的成像^[37]。为了实现对较厚生物样品的成像,2009年 Hell 等人将双光子激发荧光显微技术与 STED 技术结合起来,将 STED 显微技术中的单光子激发替换为双光子激发,双光子激发中常用的激发光为近红外光,穿透能力强,因此双光子激发显微技术和 STED 显微技术的组合既提高了空间分辨

率又扩展了成像深度,并实现了焦平面处各方向上均小于 50 nm 的分辨率,在不强调超高分辨率的情况下,可以降低损耗光的光强获得一般 STED 显微技术的分辨率^[38]。此外,采用双光子激发代替单分子激发可以使用同一波长的激光实现双光子激发和受激发射损耗,仅需一个激光器便可实现高分辨率成像,降低了系统成本,并且可以简化系统^[39]。因而 TPE-STED 在高散射特性的生物活体组织以及厚样品成像中具有显著的优势。相似的,2011 年,Harms 等人首次将选择平面显微技术 (SPIM) 与 STED 相结合,充分发挥了 STED 成像速度快以及 SPIM 成像深度深、光强低等优点,使得轴向分辨率提高 60%,实现对 >100 μm 厚的活体生物快速、高分辨成像^[40-41]。

STED 通过扫描方式对样品成像,可以快速观察活细胞内实时变化过程,目前可达到视频速度;STED 数据处理仅仅是将对应的点在图像的特定位置排列起来就可以了,因此 STED 的超分辨图像从根本上杜绝了产生假象,可靠性更强。目前 STED 成像的主要缺陷在于光路复杂,设备昂贵,对系统的稳定性要求很高。

4 结构光照明显微技术

结构光照明显微技术 (Structured Illumination Microscopy, SIM) 的基本思想是由荧光标记的生物样品被周期性的结构光照明,被测样品与照明图案两个高频信号图案的叠加产生低频可测的莫尔条纹,而照明图案的频率已知,从而可以解算出未知样品的空间频率,从而实现超高分辨率成像。其原理如图 4 所示。

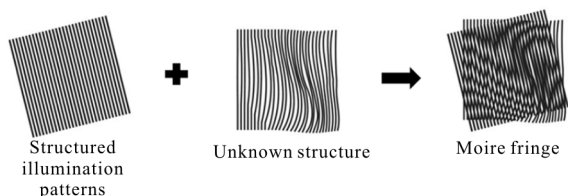


图 4 结构光照明显微技术原理

Fig.4 Principle of the structured illumination microscopy

结构光照明显微技术最早在 1999 年由伦敦大学国王学院的 Heintzmann 研究小组提出,其详细地描述了此方法的物理原理及实现超分辨图像重构

的步骤。该方法利用结构光频率和样品频率分量形成的莫尔条纹,即将原本不可分辨的高频空间信息编码入荧光图像中,来提高横向空间分辨率^[42]。2000 年, Gustafsson 等人^[43]在实验上得到了约为 115 nm 的横向空间分辨率,将成像分辨率提高到了衍射极限分辨率的 2 倍。2008 年实现了三维的结构光照明超分辨荧光显微成像 (3D-SIM)^[44], 横向与轴向的成像分辨率都提高到了传统光学荧光显微镜衍射极限分辨率的 2 倍。同年,该研究小组还将结构光照明技术与双向照明的 I5 M 技术结合,演示了三维成像分辨率都 <100 nm 的成像结果^[45],使得对细胞内部各种细胞器以及活细胞三维超分辨成像成为可能。

由于线性结构光照明只能将成像分辨率提高到 2 倍,即该方法本质上仍然受到阿贝衍射极限的制约。为了进一步提高成像空间分辨率,将结构光照明显微技术与荧光分子激发态饱和效应相结合,将荧光发射图案中以结构光照明空间频率为基频的高次谐波与样品中的高频信息叠加同样产生了莫尔条纹,将空间分辨率提高到 50 nm 左右,此技术被称为饱和结构光照明显微镜 (SSIM)^[46]。由于荧光饱和和需要极高的激发光强,从而加速了对样品的光漂白且易产生光损伤,阻碍了其在生物研究中的应用。可以为了实现结构光照明显微技术在活细胞中实时超高分辨率成像可从削弱照明强度和提高了成像速度来减少对样品的损伤。

4.1 削弱照明强度

为了能够降低激发光强且同时实现非线性结构光照明,利用可逆光转换荧光蛋白 Dronpa 代替荧光饱和。Dronpa 的主、次激发峰位于 503 和 390 nm 处,发射峰位于 518 nm 处。当用蓝光 (488 nm) 激发 Dronpa 时,发出荧光并转换到“关闭”状态,当用 UV 光 (405 nm) 照明时, Dronpa 恢复到“开”状态。Dronpa 这种在非常低的照明功率 (1~10 W/cm²) 下的“开”和“关”状态的转换可循环超过 100 次,但发射的荧光强度逐渐减小 (~75%)^[47-49]。在 2012 年 Gustafsson 研究小组利用 Dronpa 观测了固定细胞中的纯化的微管、核孔复合物和肌动蛋白纤维,实现了约 50 nm 的空间分辨率,同时将所需激发光强降低了 6 个数量级,揭示了 <50 nm 活细胞成像的可能性,该方法被称为基于非线性结构光照明显微术 (NL-SIM)^[50]。

4.2 提高成像速度

由于结构光照明显微技术是通过将多幅图像重构出一幅超分辨图像,时间分辨率较低不能满足活细胞成像的需要。采集图像过程中照明图案移动的距离必须小于空间分辨率以防止产生超分辨图像重建过程中的运动伪影。采用液晶空间光调制器代替之前使用的物理光栅来产生结构光照明,无需机械移动任何光学元件,仅需改变空间光调制器中液晶的方向,可在 1 ms 内产生所需的照明图案,大大提高了系统的时间分辨率和稳定性,从而实现了活细胞的超分辨显微,Kner 等人^[51]和 Shao 等人^[52]分别实现了结构光照明的约 100 nm 的二维和三维活细胞超分辨成像^[51-52]。

通过改变结构光照明显微技术的照明图案来提高系统的时间分辨率。将结构光照明显微技术与点扫描照明技术相结合,且将点探测器替换为阵列探测器(EM-CCD),如多焦点结构光照明显微技术(MSIM)、共聚焦旋转盘图像扫描显微技术(CSD-SIM)以及实时结构光照明显微技术(instant SIM)等。MSIM^[53]通过数字微透镜器件(DMD)产生的近似等边三角形的晶格点阵激发光,最终获得横向 145 nm、轴向 400 nm 的空间分辨率,实现生物活细胞的快速成像。CSD-SIM^[54]通过普通商用共聚焦旋转盘(CSD),CSD 包括 1 个微透镜阵列和 1 个共对准针孔,以此产生多焦点的照明结构光,实现生物活细胞的快速成像,在提高系统时间分辨率的同时也提高了系统的空间分辨率(1.35~1.55 倍)^[55]。在 CSD-SIM 的基础上增加了 1 个微透镜阵列。第一组会聚的微透镜阵列多焦点激发光,在激发样品后,与微透镜阵列相匹配的针孔阵列去除离焦荧光,相机单次曝光过程中,第二组与针孔阵列相匹配的微透镜阵列将通过针孔阵列的荧光缩小两倍且经由振镜扫描叠加形成超分辨图像。利用光学的方法代替 CSD-SIM 中数字图像处理过程,去除了采集、存储和组合多个相机曝光的需求,实现了横向 145 nm、轴向 350 nm 的实时超高分辨率成像(100 帧/s)。

将结构光照明技术与层光显微技术结合,层光显微技术利用两个或多个镜头成像,将激发光路和探测光路分开,这样可以选择需要观察的区域去激发,减小激发区域,从而减小光漂白和光毒性。2014 年美国霍华德休斯医学研究院(HHMI)的

Betzig 研究小组将结构光照明显微(SIM)技术与层光显微技术(Light Sheet Microscopy, LSM)结合,提出 Bessel SIM 的概念,利用一个基于光栅的衍射光学元件产生多个平行的贝塞尔光束作为结构光照明样本,获得 N 幅相位偏移的图像并重构出一幅超分辨图像,对 LLC-PK1 细胞内的微管进行成像,获得了 x 方向 180 nm, y 方向 230 nm, z 方向 350 nm 的空间分辨率,10~20 Hz 的帧速率^[56]。2017 年 Chang B J 等人将层光显微技术与结构光照明技术结合,对活的野生酵母细胞的内质网进行观测,实现横向、纵向都小于 100 nm 的超分辨成像^[57]。

为了进一步提高分辨率并减少激发光强度,同年, Betzig 研究小组又提出晶格层光显微术(Lattice Light-Sheet Microscopy), 又称 Lattice SIM。其结合 2005 年提出的光学晶格的设计理论,使用 SLM 产生的多束贝塞尔光束相互干涉产生六方晶格图样的结构光照明样本(激发的视野范围为传播方向约 20~40 μm ,垂直方向约 80 μm ,产生约 0.4~0.6 μm 厚的光学切片),如图 5 所示。以约 50 Hz 的帧速率实现对活体胚胎进行成像,获得了 x 方向约 150 nm、 z 方向约 280 nm 的分辨率。作者又提出扫描模式 Lattice SIM, 将其六方晶格图样沿 x 方向扫描,每个

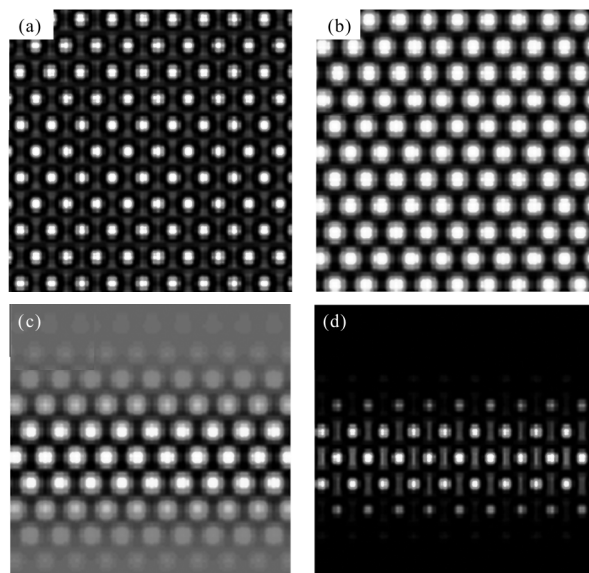


图 5 (a)理想晶格的光强分布;(b)理想晶格的电场分布;
(c)束缚晶格的电场分布;(d)样品上的光强分布

Fig.5 (a) Intensity distribution of ideal lattice; (b) electric field distribution of the ideal lattice; (c) electric field distribution of the bound lattice; (d) intensity distribution of the sample

照明平面高度聚焦,极低的背景荧光,使得 z 方向的分辨率得以提高,最终以 100 Hz 的帧速率得到横向约 230 nm、轴向约 370 nm 的分辨率^[58]。

为了进一步提高活细胞结构光照明显微的成像分辨率,Betzig 研究小组在 2015 年提出了基于高数值孔径全内反射荧光显微的结构光照明显微术 (high-NA TIRF-SIM),其使用 $NA=1.7$ 的物镜将 TIRF 和 SIM 技术结合对基质膜成像,得到了在 50~200 nm 厚度范围内 84 nm 的空间分辨率。为得到更高的成像分辨率,同年 Betzig 研究小组又提出图样激活非线性结构光照明显微术 (PA NL-SIM),借助于绿色光可开关荧光蛋白 Skylan-NS,对活细胞进行成像,得到了 62 nm 的横向空间分辨率和毫秒级的时间分辨率,同时图像 SNR 高、激发光和激活光强度低。为了克服传统 3D-SIM 的诸多局限:如因为离焦背景干扰使得 SNR 低而不适用于厚样本,由于长时间连续照明整个细胞产生光漂白和光毒性等,Betzig 研究小组将 PANL-SIM 技术与 Lattice SIM 结合,使用六方晶格光激活并激发可开关荧光蛋白产生高次谐波信息。用此方法对

COS-7 细胞中 Skylan-NS 标记的线粒体成像,获得了 118 nm×230 nm×170 nm 的分辨率^[59]。

2016 年,Wesley R Legant 等人将晶格层光显微技术与纳米形貌显微技术 (Point Accumulation for Imaging of Nanoscale Topography Microscopy) 相结合,即 LLS-PAINT microscopy。通过限制照明量,结合高标记密度,LLS-PAINT 显微技术可以实现对 20 μ m 厚的密集样品包括细胞分裂以及斑马鱼胚胎的神经丘的高精度定位^[60]。

尽管结构光照明显微技术的分辨率提高不如其他几种超分辨显微技术,但结构光照明显微技术对于样品的要求相对于其他超分辨显微技术较低,无需特殊的光切换标记的荧光蛋白,制备过程简单,任何在宽场荧光显微技术中使用的生物样本在 SIM 中都可使用,适用于多色成像,SIM 可与其他显微技术结合,并且结构光照明显微技术所需的照明强度较低。

文中,将各种超分辨技术的主要优缺点总结如表 1 所示。

表 1 不同技术的主要优缺点

Tab.1 Main advantages and disadvantages of different technologies

	PALM	STORM	STED	SIM
Resolution(live samples)/nm	<30	<30	20-70	10-100
Imaging depth/ μ m	Typically<10	Typically<10	Typically<100	Typically<30
Imaging speed	Slow	Slow	Medium	Fast
Phototoxicity	Moderate to high	Low to moderate	Moderate to high	Low to moderate
Suitable fluorophores	Photostable fluorophores	Photostable fluorophores	Photostable fluorophores	Typically all common fluorophores
Endogenous	No	Yes	Yes	Yes

5 结束语

近 10 年来,随着显微技术的发展,超分辨显微技术突破了光学成像中的衍射极限,将传统的成像分辨率提高了 10~20 倍,实现了多色、三维和活细胞的高速成像,在生命科学领域研究细胞内部结构以及生命活动中发挥了重要作用。文中讨论了几种超分辨成像技术的基本原理,以及它们在活细胞成像中的发展情况。对活细胞成像的超分辨成像相对于固定样品,其成像条件更加苛刻,故其空间分

率远低于固定样品成像,且时间分辨率同样较低。因此,当前的研究热点集中在荧光探针的改进、物理上显微镜系统和软件的改进、成像模式的改进等方面,促使超分辨成像技术的时空分辨率的提高,使得实时动态观测活细胞内部结构以及生命活动成为现实。而未来超分辨成像技术在生物活体中的应用必将朝着分辨率更高、成像速度更快、成像深度更深发展。

参考文献:

[1] Minsky M. Microscopy apparatus: US, 3013467 [P]. 1961-

- 12–19.
- [2] Stephens D J, Allan V J. Light microscopy techniques for live cell imaging[J]. *Science*, 2003, 300(5616): 82–86.
- [3] Ash E A, Nicholls G. Super-resolution aperture scanning microscopy [J]. *Nature*, 1972, 237(5357): 510–512.
- [4] Binning G, Rohrer H, Gerber C, et al. Surface studies by scanning tunneling microscopy [J]. *Physical Review Letters*, 1982, 49(1): 57–61.
- [5] Axelrod D. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence [J]. *Journal of Cell Biology*, 1981, 89(1): 141–145.
- [6] Yildiz A, Forkey J N, McKinney S A, et al. Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization[J]. *Science*, 2003, 300(5628): 2061–2065.
- [7] Betzig E. Proposed method for molecular optical imaging[J]. *Optics Letters*, 1995, 20(3): 237–239.
- [8] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642–1645.
- [9] Rust M, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793–795.
- [10] Shroff H, Galbraith C G, Galbraith J A, et al. Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 2007, 104(51): 20308–20313.
- [11] Shroff H, Galbraith C G, Galbraith J A, et al. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(5): 417–423.
- [12] Bates M, Huang B, Dempsey G T, et al. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes [J]. *Science*, 2007, 317(5845): 1749–1752.
- [13] Matsuda A, Shao L, Boulanger J, et al. Condensed mitotic chromosome structure at nanometer resolution using PALM and EGFP-histones[J]. *Plos one*, 2010, 5(9): e12768.
- [14] Shtengel G, Galbraith J A, Galbraith C G, et al. Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(9): 3125–3130.
- [15] Wang Y, Kanchawong P. Three-dimensional super resolution microscopy of actin filaments by interferometric photoactivated localization microscopy [J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2016, 118: e54774.
- [16] Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera A M, et al. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions [J]. *Nature*, 2010, 468(7323): 580–584.
- [17] Jones S A, Shim S H, He J, et al. Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(6): 499–505.
- [18] Holden S J, Uphoff S, Kapanidis A N. DAOSTORM: an algorithm for high-density super-resolution microscopy [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(4): 279–280.
- [19] Babcock H, Sigal Y M, Zhuang X W. A high-density 3D localization algorithm for stochastic optical reconstruction microscopy [J]. *Optical Nanoscopy*, 2012, 1(1): 1–6.
- [20] Huang F, Schwartz S L, Byars J M, et al. Simultaneous multiple-emitter fitting for single molecule super-resolution imaging [J]. *Optic Express*, 2011, 2(5): 1377–1394.
- [21] Quan T W, Zhu H Y, Long F, et al. High-density localization of fluorescent molecules using Structured Sparse Model and Bayesian Information Criterion [J]. *Optic Express*, 2011, 19(18): 16974.
- [22] Cox S, Rosten E, Monypenny J, et al. Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(2): 195–200.
- [23] Xu Fan, Zhang Mingshu, He Wenting, et al. Live cell single molecule-guided Bayesian localization super resolution microscopy [J]. *Cell Research*, 2016, 27(5): 713–716.
- [24] Willig K I, Rizzoli S O, Westphal V, et al. STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis [J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 935–939.
- [25] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy [J]. *Optics Letters*, 1994, 19(11): 780–782.
- [26] Vicidomini G, Moneron G, Han K Y, et al. Sharper low-power STED nanoscopy by time gating [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(7): 571–575.
- [27] Hao Xiang, Kuang Cuifang, Gu Zhaotai, et al. Super resolution microscopy of offline g-STED nanoscopy based on time-correlated single photon counting [J]. *Chin J Lasers*, 2013, 40(1): 0104001.
- 郝翔, 匡翠方, 顾兆泰, 等. 基于时间相关单光子计数的离线式 g-STED 超分辨显微技术 [J]. *中国激光*, 2013, 40(1): 0104001.

- [28] Hernandez I C, Castello M, Lanzano L, et al. Two-photon excitation STED microscopy with time-gated detection [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19419.
- [29] Vicidomini G, Schonie A, Han K Y, et al. STED nanoscopy with time-gated detection: theoretical and experimental aspects[J]. *Plos One*, 2013, 8(1): e54421.
- [30] Vicidomini G, Hernandez I C, Damora M, et al. Gated CW-STED microscopy: A versatile tool for biological nanometer scale investigation[J]. *Methods*, 2014, 66(2): 124-130.
- [31] Hao Xiang, Kuang Cuifang, Li Yanghui, et al. Manipulation of doughnut focal spot by image inverting interferometry[J]. *Optics Letters*, 2012, 37(5): 821-823.
- [32] Stender A S, Marchuk K, Liu C, et al. Single cell optical imaging and spectroscopy [J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113(4): 2469.
- [33] Westphal V, Rizzoli S O, Lauterbach M A, et al. Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement[J]. *Science*, 2008, 320(5873): 246-249.
- [34] Bingen P, Reuss M, Engelhardt J, et al. Parallelized STED fluorescence nanoscopy [J]. *Optics Express*, 2011, 19(24): 23716-23726.
- [35] Yang B, Przybilla F, Mestre M. et al. Large parallelization of STED nanoscopy using optical lattices[J]. *Optics Express*, 2014, 22(5): 5581-5589.
- [36] Yang B, Fang C Y, Treussart F, et al. Polarization effects in lattice-STED microscopy [J]. *Faraday Discussions*, 2015, 184: 37-49.
- [37] Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy [J]. *Nature Methods*, 2005, 2(12): 932-940.
- [38] Moneron G, Hell S W. Two-photon excitation STED microscopy[J]. *Optics Express*, 2009, 17(17): 14567.
- [39] Scheul T, D' Amico C, Wang I, et al. Two-photon excitation and stimulated emission depletion by a single wavelength[J]. *Optics Express*, 2011, 19(19): 18036-18048.
- [40] Friedrich M, Gan Q, Ermolayev W, et al. STED-SPIM: Stimulated emission depletion improves sheet illumination microscopy resolution [J]. *Biophysical Journal*, 2011, 100(8): L43-L45.
- [41] Friedrich M, Harms G S. Axial resolution beyond the diffraction limit of a sheet illumination microscope with stimulated emission depletion [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(10): 106006.
- [42] Heintzmann R, Cremer C. Laterally modulated excitation microscopy: Improvement of resolution by using a diffraction grating[C]//SPIE, 1999, 3568: 185-196.
- [43] Gustafsson M G L, Agard D A, Sedat J W. Doubling the lateral resolution of wide-field fluorescence microscopy using structured illumination[C]//SPIE, 2000, 3919: 141-150.
- [44] Gustafsson M G L, Shao L, Carlton P M, et al. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination [J]. *Biophysical Journal*, 2008, 94(12): 4957-4970.
- [45] Shao L, Isaac B, Uzawa S, et al. ISS: wide field light microscopy with 100-nm-scale resolution in three dimensions[J]. *Biophysical Journal*, 2008, 94(12): 4971-4983.
- [46] Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(37): 13081-13086.
- [47] Ando R, Mizuno H, Miyawaki A. Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting[J]. *Science*, 2004, 306(5700): 1370-1373.
- [48] Habuchi S, Ando R, Dedecker P, et al. Reversible single-molecule photoswitching in the GFP-like fluorescent protein Dronpa [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(37): 9511-9516.
- [49] Habuchi S, Dedecker P, Hotta J, et al. Photo-induced protonation/deprotonation in the GFP-like fluorescent protein Dronpa: mechanism responsible for the reversible photoswitching [J]. *Photochem & Photobiological Science*, 2006, 5(6): 567-576.
- [50] Rego E H, Shao L, Macklin J J, et al. Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(3): E135-E143.
- [51] Kner P, Chhun B B, Griffis E R, et al. Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 339-342.
- [52] Shao L, Kner P, Rego E H, et al. Super-resolution 3D microscopy of live whole cells using structured illumination [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(12): 1044 - 1046.
- [53] York A G, Parekh S H, Dalle Nogare D, et al. Resolution doubling in live, multicellular organisms via multifocal structured illumination microscopy [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 749 - 754.

- [54] Schulz O, Pieper C, Clever M, et al. Resolution doubling in fluorescence microscopy with confocal spinning-disk image scanning microscopy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(52): 21000–21005.
- [55] York A G, Chandris P, Nogare D D, et al. Instant super-resolution imaging in live cells and embryos via analog image processing[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(11): 1122–1126.
- [56] Gao L, Shao L, Chen B C, et al. 3D live fluorescence imaging of cellular dynamics using Bessel beam plane illumination microscopy[J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(5): 1083–1101.
- [57] Chang B J, Meza V D P, Stelzer E H K. csiLSFM combines light-sheet fluorescence microscopy and coherent structured illumination for a lateral resolution below 100 nm [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(19): 4869.
- [58] Chen B C, Legant W R, Wang K, et al. Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatio-temporal resolution[J]. *Science*, 2014, 346(6208): 1257998.
- [59] Digg Li, Lin Shao, Chen Bichang, et al. Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics[J]. *Science*, 2015, 349(6251): 6251.
- [60] Legant W R, Shao L, Grimm J B, et al. High-density three-dimensional localization microscopy across large volumes[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(4): 359–365.