亮点

运用结构光照明的活细胞超高分辨率成像技术

陈良怡

北京大学分子医学研究所, 北京 100871

E-mail: lychen@pku.edu.cn

收稿日期: 2015-09-08; 接受日期: 2015-09-14

进入 21 世纪以来出现了多种超高分辨率荧光成像技术, 打破了光学分辨率的极限, 将光学分辨率提高到几十纳米的尺度, 可以用来观察精细的细胞内器官的结构和位置信息, 因此被广泛地应用于生物学研究中. 超高分辨率荧光成像技术主要分为三大类, 基于受激发射光淬灭 (stimulated emission depletion, STED) 技术, 基于单分子开关的超高分辨率定位技术 (包括光激活定位显微成像术 (photoactivated localization microscopy, PALM) 和随机光学重构显微成像术 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)) 和基于结构光成像的超分辨率技术 (structured illumination microscopy, SIM). 2014 年, 诺贝尔化学奖授予了 STED 技术的发明人, 德国马克斯普朗克生物物理化学研究所 Stefan W. Hell 教授和 PALM 技术的发明人美国霍华德·休斯医学研究所 Eric Betzig 教授, 表彰他们在超分辨率荧光显微成像技术方面的重大贡献.

诺贝尔化学奖并没有表彰基于结构光成像的 SIM 超分辨率技术, 一个原因是其发明人 Mats Gustafsson 于 2011 年 51 岁时因癌症去世, 另一个原因是线性 SIM 的分辨率只有传统显微镜的两倍, 大约为 100 nm. 尽管 STED 和 PALM/STORM 类型的超高分辨率成像可以得到更高的分辨率, 它们的缺点也很明显: 需要很强的激发光来照明样品. 通常地球上的生物体受到的太阳的辐射在 0.1 W/cm^2 , 而 STED 和 PALM/STORM 通常所需要的辐射在 $10^3 \sim 10^8 \text{ W/cm}^2$, 相当于一千个到一亿个太阳的照射.

在这种情况下, 荧光蛋白/分子很快就被漂白, 产生大量的自由基损伤细胞样品. 因此, 本质上 STED 和 PALM/STORM 类型的超高分辨率成像不适合活细胞长时间成像, 而比较适合于死细胞和固定样本的成像. 相对应的, SIM 成像的方法非常有效地利用荧光分子所发出的光子, 有可能成为活细胞超高分辨率成像的利器. 针对这个方向, Eric Betzig 教授的团队和中国科学院生物物理研究所、美国国立科学研究院和哈佛医学院等的科学家们合作探索, 发展了新型的 SIM 成像技术, 使活细胞超高分辨率成像成为现实. 这一研究成果于 2015 年 8 月 28 日在美国 *Science* 杂志上以封面文章发表^[1].

在传统的 SIM 显微镜中, 物体被非均匀的结构光 (类似于条纹码) 所照明. 在实验中, 不同相位和方向的结构光依次照明物体, 它们和物体在不同角度混频所产生的摩尔条纹被相机依次采集并解码生成超高分辨率的图像. 最终重建的 SIM 图像具有高于传统显微镜图像 2 倍的空间分辨率. 通过利用商业化的超高数值孔径的油镜 (NA 1.7), 全内反射的照明模式 (total internal reflection fluorescence, TIRF) 和空间光调制器 (spatial light modulator, SLM) 来快速产生光栅, 李栋博士和 Betzig 教授实现了线性 SIM, 其分辨率达到 82 nm. 在这种模式下, 照明用的强度仅为其他超高分辨率成像所用强度的 3%, 双色成像的时间分辨率为 1.67 s, 也是相应的超高分辨率成像所用时间的 1/15. 利用这个技术, 他们观察了活细胞内的网格蛋白小窝以及细胞内不同的骨架蛋白的精细动态

引用格式: 陈良怡. 运用结构光照明的活细胞超高分辨率成像技术. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 903-904

Chen L Y. Superresolution imaging of live cell dynamics using structural illumination microscopy. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 903-904, doi: 10.1360/N052015-00275

变化过程.

进一步的提高分辨率是通过非线性 SIM 显微成像模式来实现的. 与以往的非线性 SIM 相比, 新技术在两个方面做了改进, 使用了新型可开关荧光探针和新型开关结构光的模式. 合作者中国科学院生物物理所徐平勇课题组发展了一种新型反复光激活荧光蛋白 Skylan-NS. 对比现有的其他反复光激活的荧光蛋白, 该蛋白具有高对比度、高光学稳定性等特性, 能够实现在活细胞上的低光强照明, 高速反复开关以及发射出足够多的光子数. 另一方面, Betzig 研究小组发展了新的结构光激活非线性 SIM 的模式, 其关键在于一开始用结构光只激活样品里的一部分荧光蛋白分子, 得到超高分辨率的信息. 然后通过另一束结构光用于反激活分子, 再读出额外的信息. 这

样, 完成一幅完整的超高分辨率采样只需要拍 25 张图, 其重组出来的最终空间分辨率可以达到 62 nm, 时间分辨率也可以达到 350 ms. 这个方法可以用于观察快速运动的细胞器, 例如, 追踪细胞膜上的 50~100 nm 大小的细胞膜穴样内陷(caveolae)的运动. 最后, Betzig 研究小组将新的非线性 SIM 成像技术和他们组之前发明的晶格层状光显微镜(lattice lightsheet)结合, 在三维尺度上超高分辨率的观察线粒体和高尔基的相对运动的动态过程, 实现了超高分辨率和活细胞成像的完美结合.

眼见为实, 在活细胞中实时观察到精细结构的动态变化一直以来是生物学家的梦想. 新的结构光成像手段大大提高了 SIM 的时间和空间分辨率, 有望为解析细胞内部的工作机理提供重要的手段.

参考文献

- 1 Li D, Shao L, Chen B C, et al. Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics. *Science*, 2015, 349: aab3500