【光电工程 / Optoelectronic Engineering】

腺相关病毒标记神经细胞的三光子显微成像

全 申, 刘鸿吉, 王 科

深圳大学物理与光电工程学院, 教育部光电子器件与系统/广东省重点实验室, 广东深圳 518060

摘 要: 1 700 nm 波段三光子荧光成像已成为研究神经细胞的重要手段, 但该技术仅能在转基因小鼠中对荧光蛋白标记的神经细胞成像, 无法对普通小鼠的脑部神经细胞成像. 结合 1 700 nm 波段三光子显微成像技术和脑部注射神经细胞标记技术, 对普通小鼠急性脑切片中的神经细胞进行三光子荧光成像. 结果表明, 脑部注射腺相关病毒 (AAV9-hSyn-NES-jRGECO1a-WPRE) 能够标记普通小鼠灰质和海马体中的神经细胞. 三光子荧光成像再现了普通小鼠脑片中灰质和海马体神经细胞形态. 同时采集的三次谐波图像实现了普通小鼠脑片内白质等结构的无标记成像, 且神经细胞位置处的三光子荧光和三次谐波图像呈互补关系. 1 700 nm 波段的三光子显微成像技术, 结合脑部注射腺相关病毒神经细胞标记技术, 可为神经脑科学研究提供一种新颖的成像手段.

关键词: 光学工程; 三光子显微成像; 脑部注射; 腺相关病毒; 海马体神经细胞; 急性脑切片; 三光子荧光; 三次谐波产生

中图分类号: Q63; O437

文献标志码: A

doi: 10.3724/SP.J.1249.2020.01039

Three-photon microscopy imaging of adeno-associated viral labeled neurons

TONG Shen, LIU Hongji, and WANG Ke

College of Physics and Optoelectronic Engineering, Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong Province, P. R. China

Abstract: Recently, it has been demonstrated that three-photon fluorescence microscopy excited at 1 700 nm window provides a novel technique for imaging neurons. However, this technique can only be used for genetically modified mice rather than ordinary mice, because neurons from genetically modified mice express fluorescent proteins. In this paper, combining brain injection and three-photon fluorescence microscopy, we image neurons in acute brain slices of ordinary mice. The experimental results show that injection of adeno-associated virus (AAV9-hSyn-NES-jRGECO1a-WPRE) can be used to label neurons in the brain of normal mice. Three-photon fluorescence microscopy can reconstruct the neurons morphology of both the grey matter and hippocampus in common mouse brain slices. The simultaneously acquired label-free third-harmonic image shows the white matter, and is complementary to three-photon fluorescence image in neurons. Three-photon microimaging at 1 700 nm, combined with brain injection of adeno-associated virus, provides a new helpful method for neural brain research.

Key words: optical engineering; three-photon microscopy imaging; brain injection; adeno-associated virus; hippocampus neurons; acute brain slice; three-photon fluorescence; third harmonic generation

Received: 2019-09-05; **Accepted:** 2019-10-15

Foundation: Key Project of Department of Education of Guangdong Province (2017KZDXM073); China Postdoctoral Science Foundation (2019M653025)

Corresponding author: Professor WANG Ke. E-mail: kewangfs@szu.edu.cn

Citation: TONG Shen, LIU Hongji, WANG Ke. Three-photon microscopy imaging of adeno-associated viral labeled neurons [J]. Journal of Shenzhen University Science and Engineering, 2020, 37(1): 39-43. (in Chinese)

<http://journal.szu.edu.cn>

神经细胞是神经系统的重要组成部分, 具有感受刺激和传导兴奋的功能, 大脑通过神经细胞实现信息的存储和传递. 多光子显微成像 (multi-photon microscopy, MPM) 作为一种非线性光学成像技术^[1], 广泛用于活体小鼠脑部神经细胞的形态和功能研究^[2-8], 并且为活体生物的病理学^[5, 9] (如阿尔兹海默症) 和活体生物神经细胞的钙动力学^[10-11] 研究提供宝贵的观测工具. HORTON 等^[12-14] 演示的 1 700 nm 波段三光子显微成像技术同时支持三次谐波 (third-harmonic generation, THG) 和三光子激发荧光 (three-photon excited fluorescence, 3PEF) 成像两种成像模式, 均为神经细胞的形态信息和结构信息获取提供先进的成像方法.

1 700 nm 波段三光子显微成像可以进行光学切片 (焦点处采集信号, 避免焦点外的荧光标记漂白)^[15], 因此, 可实现普通小鼠皮层到白质的完整三维成像. 激发光波长越长 (近红外), 在高度散射的脑组织内散射越小, 到达焦点处的激发光信号越强, 从而获得更大的成像深度. 与之相比, 单光子荧光成像需要采用短波长 (可见光) 激发, 受组织散射影响大, 无法获得大的成像深度. 此外, 相比于其他成像技术, 如共聚焦显微成像技术^[16]、光声成像技术^[17]、相干层析成像技术^[18] 以及核磁共振成像技术^[19] 等, 三光子成像具有亚微米量级的分辨能力和毫米量级的深层组织穿透能力, 在普通小鼠脑成像方面具有独特的应用优势.

三光子显微成像中的三次谐波可以匹配脑组织细胞水平的特定几何结构和脂质含量, 通过部分相位匹配^[7], 实现普通小鼠脑组织无标记成像^[12], 避免荧光成像时染料可能会对细胞产生毒性等问题. 三光子显微成像作为一种可视化手段, 特别适合普通小鼠脑组织的深层成像^[13]. 然而在普通小鼠脑成像中, 白质以下由于受到脑组织散射和水吸收的影响, 无法实现普通小鼠海马体三次谐波成像. 为此, 本文结合脑部注射技术同步研究普通小鼠急性脑切片 (在小鼠死后马上进行切片)^[20] 海马体神经细胞的形态和结构. 脑部注射腺相关病毒 (AAV9-hSyn-NES-jRGECO1a-WPRE), 在特定启动子控制下, 实现普通小鼠大脑中星形胶质细胞、少突胶质细胞及神经细胞的长期、稳定表达.

脑部注射技术是活体生物脑科学研究的一种重要手段, 已有研究多集中在通过共聚焦显微镜观察脑片中腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 病毒标记细胞的成像上, 对于普通小鼠脑片在 1 700

nm 波段三光子显微成像的研究较少. 本研究利用脑部注射 AAV9-hSyn-NES-jRGECO1a-WPRE 病毒, 结合 1 700 nm 波段的三光子显微成像技术, 实现普通小鼠的脑片灰质、海马体神经细胞三光子荧光成像, 及脑片的灰质、白质和海马体的三次谐波成像, 讨论三光子荧光成像和三次谐波成像的相互关系. 本研究提出的多光子显微成像技术为脑科学研究提供一种有效的成像方法.

1 实验装置和方法

1.1 成像实验装置图

成像的实验装置如图 1. 重复频率为 1 MHz、脉宽为 500 fs 及输出波长为 1 550 nm 的光纤激光器 (FLCPA-02CSZU, Calmar Laser) 作为泵浦激光器, 其输出光经过聚焦透镜 (AC254-100-C-ML, Thorlabs) 后, 被耦合进入长度为 44 cm、纤芯直径为 100 μm 的棒状光子晶体光纤 (PC rod, SC-1500/100-Si-ROD, NKT Photonics) 中, 通过孤子自频移效应产生峰值波长为 1 665 nm 的高能孤子. 光纤输出端通过透镜 (AC254-125-ML, Thorlabs) 准直. 使用 1 635 nm 长波通滤光片 (1635lpf, Omega Optical) 得到干净的 1 665 nm 孤子. 随后激发光经过扫描振镜反射后, 经过 C-coating 扫描透镜 (AC254-040-C-ML, Thorlabs) 和套筒透镜实现 1:4 的扩束. 通过 965 nm 双色镜 (T965lpxxrt-UF1, Chorma) 进入工作距离为 2 mm、数值孔径为 1.05 的定制镀膜物镜 (XLPLN25XWMP2-SP1700, Olympus), 该物镜在 1 700 nm 波段具有高透过率 ($\sim 76\%$), 将激发光聚焦到样品上产生三光子信号, 三光子信号经定制镀膜物镜收集后通过双色镜反射到不同型号的光电倍增管, 实现三次谐波和三光子荧光信号双通道同步检测. 装有 558/20 nm 带通滤光片 (FF01-558/20-25, Semrock) 的砷化镓光电倍增管 (H7422p-50, Hamamatsu) 用于检测三次谐波信号, 装有 593 nm 长波通滤光片 (FF01-593/LP-25, Semrock) 和 630/92 nm 带通滤光片 (FF01-630/92-25, Semrock) 的镓砷磷光电倍增管 (H7422p-40, Hamamatsu) 用于检测外源性荧光标记物的三光子荧光信号. 整个显微系统通过 ScanImage (Vidrio Technologies) 软件控制, 图像采集速率为 2 s/幅, 图像大小为 512 $\times$ 512 像素. 采用 ImageJ (NIH) 软件处理获取的图像.

图 2 为光纤输出端的 1 665 nm 孤子光谱. 采用自建的干涉自相关仪定量测量孤子脉宽为 79 fs. 孤

图1 实验装置图

Fig. 1 Experimental setup

图2 光纤输出端的孤子光谱

Fig. 2 Measured soliton spectrum from the end of fiber

子平均功率为 110 mW.

1.2 成年小鼠的立体定向注射及脑片制备

本实验所有研究过程经由深圳大学实验动物伦理委员会同意. 本研究使用的 BALB/c 小鼠由广东省医学实验动物中心提供, 选择 6 周雄性普通小鼠注射, 立体定向注射装置如图 3.

首先, 使用麻醉机(5101IP, RWD Life Science)对小鼠进行麻醉; 然后, 将小鼠固定在自行搭建的脑固定仪上, 通过体温维持系统 (ALC-HTP, RWD Life Science) 维持小鼠体温(温度设置 36 ℃), 手术前将小鼠眼睛涂上白凡士林, 防止眼睛脱水失明. 用手术刀将头皮切开约 10 mm, 去掉骨膜. 使用颅钻 (STRONG204, STRONG) 和直径 0.5 mm 的钻头, 在颅点侧后方 2 mm 处钻一个直径 500 ~ 700 μm 的小孔.

利用微电极拉制仪 (P-97 Pipette Puller, Sutter Instrument Co.) 将硼硅酸玻璃微管 (BF120-69-10, Sutter Instrument) 拉制成为注射用微针, 微针外径 1.2 mm, 内径 0.69 mm, 长度 10 cm, 玻璃微针尖端直径 20 ~ 25 μm, 玻璃微管的 ramp 值为 504, 参

数设置为: heat: ramp + 25; pull: 0; velocity: 150; time: 0; pressure: 200. 通过角度台调整小鼠大脑的角度使微针方向垂直于小鼠大脑(图 3). 利用微量注射仪 (PICOSPRTIZER III, Parker) 和三维位移台 (MP285, Sutter Instrument Co.) 在小鼠大脑的不同深度(1 500、1 200、900、600 及 300 μm) 注射, 注射压力为 41.37 ~ 55.16 kPa. 微针在 300 μm 位置处停留 2 min 后离开大脑表面, 缝合伤口, 并涂上莫匹罗星软膏预防感染. AAV9-hSyn-NES-jRGECO1a-WPRE 病毒滴度不低于 2.00×10^{13} vg/mL, 每个位置注射量为 80 ~ 100 nL. 其中, hSyn 为成熟神经元特异性启动子; jRGECO1^[21] 为红色荧光蛋白钙指示剂; 单光子激发波长为 540 ~ 580 nm. 因此, 实验注射在普通小鼠大脑皮层和海马体的病毒, 能够促使小鼠神经细胞的特异性标记.

图3 立体定位注射装置

Fig. 3 Stereospecific injection setup

3 周后, 将注射的普通小鼠麻醉并处死, 取出小鼠大脑后用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗, 放入脑模具 (0.5 mm 40 ~ 75 g, 瑞沃德) 中, 在注射位置对大脑进行常温下切片.

2 脑片的三光子显微成像

采用上述实验装置对普通小鼠脑片无标记三次谐波成像结果如图 4 (a) — (c). 由于神经细胞体含有小的细胞器, 其结构在 20 ~ 100 nm 尺度, 这些

较小的结构不会产生明显的三次谐波信号^[7], 因此, 在图 4 (a) 的 P_1 位置无法观察到神经细胞的三次谐波图像, 即神经细胞位置对应的三次谐波图像呈现出“黑洞”形态. 这一实验结果与文献[7]的报道一致.

图 4 (d)–(f) 对应同步采集的三光子荧光图像. 图 4 (d) 中 P_2 位置的三光子荧光成像结果可以清楚显示标记的神经细胞. 因此, 实验证明通过 AAV9-hSyn-NES-jRGECO1a-WPRE 病毒, 可对普通小鼠脑中的神经细胞进行标记. 结合 1 700 nm 波段三光子激发, 可在该波段实现神经细胞的三光子荧光成像, 如图 4 (d)–(f). 由成像结果可知, 腺相关病毒 (AAV9-hSyn-NES-jRGECO1a-WPRE) 主要对神经细胞的细胞质进行标记.

三光子荧光成像结果还表明, 该腺相关病毒 (AAV9-hSyn-NES-jRGECO1a-WPRE) 主要对细胞质进行标记 (细胞核无荧光信号). 该成像结果存在

荧光信号亮度较低的问题, 认为是 AAV 病毒标记效率较低所导致.

以下分析三次谐波与三光子荧光成像结果的相互关系. 图 4 (a) 和 (d) 中 P_1 和 P_2 对应位置的三次谐波和三光子荧光图像互补. 图 4 (b) 为灰质和白质交界处的三次谐波成像结果. 白质处的髓鞘细胞膜^[22], 由于髓鞘拥有类脂质结构可以产生三次谐波信号. 图 4 (e) 是图 4 (b) 位置处的三光子荧光成像. 通过对比图 4 (b) 与图 4 (e) 可见, 该标记物只能标记神经细胞, 无法标记髓鞘, 因为髓鞘是寡突细胞而非神经细胞的附属结构. 图 4 (c) 和 (f) 是海马体 CA1 层的三次谐波成像和三光子荧光成像. 在脑片中可以清楚看到海马体丝状结构 (神经纤维) 的三次谐波成像. 以上结果表明, 三次谐波对结构敏感, 能够实现普通小鼠脑片灰质、白质和海马体等结构成像; 三光子荧光能够实现脑片灰质和海马体神经细胞成像.

图 4 脑片三光子成像

Fig. 4 Three-photon microscopy imaging for brain slices

结 语

通过 1 700 nm 波段三光子显微成像技术, 结合脑部注射技术, 实现 AAV9-hSyn-NES-jRGECO1a-WPRE 病毒对小鼠大脑灰质和海马体的神经细胞特异性标记, 在普通小鼠急性脑切片中实现从灰质到海马体的三光子荧光和三次谐波双通道同时成像. 对小鼠大脑注射腺相关病毒标记神经细胞, 相应三光子荧光成像揭示了细胞结构, 采集的三次谐波成

像可以提供互补的定位信息. 研究成果为神经脑科学, 特别是神经细胞研究提供一种新颖的可视化技术. 今后将开展活体普通小鼠脑部神经细胞成像的相关实验研究.

基金项目: 广东省教育厅省级重大研究资助项目 (2017KZDXM 073); 中国博士后科学基金资助项目 (2019M653025)

作者简介: 全 申 (1991—), 深圳大学博士研究生. 研究方向: 生物光子学. E-mail: 1456689864@qq.com

引 文: 全 申, 刘鸿吉, 王 科. 腺相关病毒标记神经细胞的三光子显微成像[J]. 深圳大学学报理工版, 2020, 37 (1): 39-43.

参考文献 / References:

- [1] HELMCHENH F, DENK W. Deep tissue two-photon microscopy [J]. *Nature Methods*, 2005, 2(12): 932-940.
- [2] OUZOUNOV D G, WANG Tianyu, WANG Mengran, et al. In vivo three-photon imaging of activity of GCaMP6-labeled neurons deep in intact mouse brain [J]. *Nature Methods*, 2017, 14(4): 388-390.
- [3] WANG Tianyu, OUZOUNOV D G, WU Chunyan, et al. Three-photon imaging of mouse brain structure and function through the intact skull [J]. *Nature Methods*, 2018, 15(10): 789-792.
- [4] DOMBECK D A, HARVEY C D, TIAN Lin, et al. Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation [J]. *Nature Neuroscience*, 2010, 13(11): 1433-1440.
- [5] BUSCHE M A, CHEN Xiaowei, HENNING H A, et al. Critical role of soluble amyloid-beta for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(22): 8740-8745.
- [6] LOW R J G Y, TANK D W. Cellular resolution optical access to brain regions in fissures: imaging medial prefrontal cortex and grid cells in entorhinal cortex [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(52): 18739-18744.
- [7] WITTE S, NEGREAN A, LODDER J C, et al. Label-free live brain imaging and targeted patching with third-harmonic generation microscopy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(15): 5970-5975.
- [8] BARRETTO R P, KO T H, JUNG J C, et al. Time-lapse imaging of disease progression in deep brain areas using fluorescence microendoscopy [J]. *Nature Medicine*, 2011, 17(2): 223-228.
- [9] LIEBSCHER S, MEYER-LUEHMANN M. A peephole into the brain: neuropathological features of Alzheimer's disease revealed by in vivo two-photon imaging [J]. *Frontiers in Psychiatry*, 2012, 3(26): 1-11.
- [10] CHEN Xiaowei, LEISCHNER U, ROCHEFORT N L, et al. Functional mapping of single spines in cortical neurons in vivo [J]. *Nature*, 2011, 475(7357): 501-505.
- [11] MITTMANN W, WALLACE D J, CZUBAYKO U, et al. Two-photon calcium imaging of evoked activity from L5 somatosensory neurons in vivo [J]. *Nature Neuroscience*, 2011, 14(8): 1089-1093.
- [12] HORTON N G, WANG K, KOBAT D, et al. In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain [J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(3): 205-209.
- [13] LIU Hongji, DENG Xiangquan, TONG Shen, et al. In vivo deep-brain structural and hemodynamic multiphoton microscopy enabled by quantum dots [J]. *Nano Letters*, 2019, 19(8): 5260-5265.
- [14] TONG Shen, LIU Hongji, CHENG Hui, et al. Deep-brain three-photon microscopy excited at 1600 nm with silicone oil immersion [J]. *Journal of Biophotonics*, 2019, 12(6): e201800423.
- [15] WANG Ke, HORTON N G, CHARAN K, et al. Advanced fiber soliton sources for nonlinear deep tissue imaging in biophotonics [J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2014, 20(2): 6800311.
- [16] YUN S H, XIA Likai, EDISON T N, et al. Highly selective fluorescence turn-on sensor for Cu^{2+} ions and its application in confocal imaging of living cells [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 240: 988-995.
- [17] KEMPSKI K M, WIACEK A, GRAHAM M, et al. In vivo photoacoustic imaging of major blood vessels in the pancreas and liver during surgery [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2019, 24(12): 1-12.
- [18] JIA Y L, BAILEY S T, HWANG T S, et al. Quantitative optical coherence tomography angiography of vascular abnormalities in the living human eye [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(18): E2395-E2402.
- [19] KWONG K K, BELLIVEAU J W, CHESLER D A, et al. Dynamic magnetic-resonance-imaging of human brain activity during primary sensory stimulation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(12): 5675-5679.
- [20] PAPOUIN T, HAYDON P G. Obtaining acute brain slices [J]. *Bio-protocol*, 2018, 8(2): e2699.
- [21] DANA H, MOHAR B, SUN Yi, et al. Sensitive red protein calcium indicators for imaging neural activity [J]. *Elife*, 2016, 5(24): e12727.
- [22] FARRAR M J, WISE F W, FETCHO J R. In vivo imaging of myelin in the vertebrate central nervous system using third harmonic generation microscopy [J]. *Biophysical Journal*, 2011, 100(5): 1362-1371.

【中文责编: 方 圆; 英文责编: 溯 心】