



超高分辨率激光扫描共聚焦显微镜的 成像技术与应用

路 姣, 孟国龙, 余凌竹

(四川大学 生物医学材料工程技术研究中心, 成都 610065)

摘要: 超高分辨率激光扫描共聚焦显微镜在生命科学研究领域中的应用日益广泛。该文以 Zeiss LSM 880 Airyscan with STEDYCON 超分辨率激光共聚焦显微镜为例, 介绍了 Airyscan 技术和基于受激发射现象的超分辨技术(STED)的原理、应用和参数设置, 以期能够为科研工作者究竟采用哪种模式进行图像采集提供参考, 以获得最佳的成像效果。

关键词: 超高分辨率; 激光扫描共聚焦显微镜; Airyscan 技术; STED 技术

中图分类号: O657; TH742

文献标志码: A

DOI: [10.12179/1672-4550.20210357](https://doi.org/10.12179/1672-4550.20210357)

Imaging Techniques and Application of Super-resolution Laser Scanning Confocal Microscope

LU Jiao, MENG Guolong, YU Lingzhu

(National Engineering Research Center for Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: Super-resolution laser scanning confocal microscope has been widely used in the field of life science research. Taking Zeiss LSM880 Airyscan with STEDYCON super resolution laser scanning confocal microscopy(LCSM) as an example, this paper introduces the principle, application and parameter setting of two super resolution technologies Airyscan and stimulated emission depletion (STED) based on stimulated emission phenomenon, in order to provide a reference for the scientific research workers on which mode to adopt for image acquisition to obtain the best imaging effect.

Key words: super resolution; laser scanning confocal microscope; Airyscan technology; STED technology

激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)是目前生命科学研究领域中使用率非常高和功能非常强大的成像工具。然而传统的激光共聚焦显微镜受光学衍射限制, 横向(x 、 y 轴方向)分辨的最小直径是 200 nm 左右, 轴向分辨率(z 轴方向)为 500 nm 左右, 已不能满足对更微观的亚细胞结构、细胞器、生物大分子、细菌、病毒等几个到几百个纳米水平上的观测需求。为了获得更高分辨率的纳米级图像, 超高分辨率荧光显微技术应运而生。

超高分辨率荧光显微技术可以突破光学衍射极限, 获得较传统荧光显微镜更高的成像分辨率。目前的超高分辨率荧光显微技术有基于受激发射现象的超分辨技术(STED)、基于单分子定位

的光激活定位显微技术(photoactivated localization microscopy, PALM)和随机光学重建显微技术(stochastic optical reconstruction microscopy, STORM), 以及基于结构照明原理的结构光照明显微技术(structured illumination microscopy, SIM)^[1]。这些技术可以使横向分辨率达到 20~50 nm, 轴向分辨率达到 50~100 nm, 比传统的光学显微镜的空间分辨率提高了一个数量级。超高分辨率荧光显微镜可以提供此前未观察到的生物结构和过程细节, 有望阐明细胞和分子水平的生理过程。然而使用这些超分辨技术也有一定限制, 比如需要特殊的荧光探针针对样品进行标记; 激光功率过大会造成光漂白现象严重; 需要借助重构算法得到超

收稿日期: 2021-07-23; 修回日期: 2022-03-09

基金项目: 四川大学实验技术立项(SCU201195)。

作者简介: 路姣(1981-), 女, 硕士, 工程师, 主要从事激光扫描共聚焦显微镜和原子力显微镜等大型仪器的管理工作。E-mail: lujj1218@126.com

高分辨率图像,产生假象的概率较高等。蔡司的 Airysca 技术虽然只能达到在 x 、 y 轴上 120 nm, z 轴上 350 nm 的分辨率,但该技术具有一定优势,即不需要特殊的荧光探针,且具有较低的光毒性^[2]。

四川大学国家生物医学材料工程技术研究中心配置的超高分辨率激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM880 Airyscan with STEDYCON)是一台搭载了 Airyscan 和 STEDYCON(STED 技术升级版)两个超分辨模块和活细胞工作站,具备多种检测功能的超高分辨率共聚焦显微镜系统。本文将主要介绍该仪器超高分辨率成像功能的方法与应用,旨在为相关科学研究提供强有力的技术支持。

1 Airyscan 技术与应用

1.1 Airyscan 技术原理

传统的激光扫描共聚焦显微镜利用物理孔径(针孔)和单一探测器来创建光学切片的图像,激光共聚焦显微镜的针孔一般指探测针孔,针孔的直径对所得图像的空间分辨率有相当大的影响。针孔直径一般自动设置成和艾里斑直径一致(1 AU),此时将有 84% 的聚焦光到达检测器,图像的信噪比较好。然而从理论上讲,针孔直径为 0.2 AU 时,可以实现传统共焦成像系统的最大分辨率,即空间分辨率比 1 AU 针孔相比提高约 1.4 倍,但是使用 0.2 AU 的针孔直径到达检测器的信号只有 5% 左右,得到的图像质量被极大地降低。而大多数生物样品和荧光基团由于光损伤和光毒性无法提供足够强的荧光,无法得到信噪比较好的图像,因此传统共聚焦为了获得较好的信噪比,只能牺牲空间分辨率,将针孔直径设置为 1 AU。

Airyscan 利用 32 通道砷化镓磷化物光电倍增管(GaAsP-PMT)区域检测器,可在每个扫描位置收集针孔平面图像。每个检测器元件都像一个 0.2 AU

的小针孔,相当于拥有 32 个检测器元件,可以得到 1.25 AU 针孔的光收集效率,并利用线性反卷积技术,在 3 个空间维度将分辨率提高了 1.7 倍,同时获得信噪比(SNR)的大幅提升(4~8 倍)^[2]。

1.2 Airyscan 技术应用

Zeiss LSM880 with Airyscan 激光扫描共聚焦显微镜不需要特殊的荧光探针,具有较小的光毒性、超高分辨率和极佳的信噪比,因此在分子生物学领域得到广泛应用。文献[3]在具有 Airyscan 超分辨率的点扫描共聚焦显微镜中研究了分辨率和信噪比方面的不同共聚焦模式。结果表明, Airyscan 可以提供高速度、超分辨率和高 SNR 成像,然后将这种方式用于监测活的肿瘤细胞中的线粒体动力学,定量测量了线粒体直径,以检测不同细胞系之间线粒体形态的显著差异。文献[4]使用共聚焦和 Airyscan 模式,在转染的 HuH7 肝细胞中评估了 HBV P22 蛋白的亚细胞定位。文献[5]用 Airyscan 模式实现了对花粉粒的内部和外部结构成像,并可以获得花粉粒的完整三维形态,使大规模高通量分析花粉形态成为可能。还可以对植物角质层成像,精确地量化气孔密度和结构,从而可以更好地估算 $p\text{CO}_2$ 的波动^[6];或者联合多光子对生物样品中胶原纤维进行成像等^[7]。

1.3 参数设置

使用 Airyscan 模式成像时,和普通共聚焦成像一样,先选择使用的荧光染料,然后选择 ChA 检测器(Airyscan 检测器),选择合适的滤片、次级分色镜(SBS)和反射主分色镜(MBS),不要更改针孔(pinhole)大小(即系统默认的 2.5 AU), Airyscan mode 默认是“SR”模式, zoom 最小为 1.8。在低分辨快速预览模式下,点击 Continuous,选择 Airyscan,使 Detector View 的最亮光斑位于中心位置,如图 1 所示。

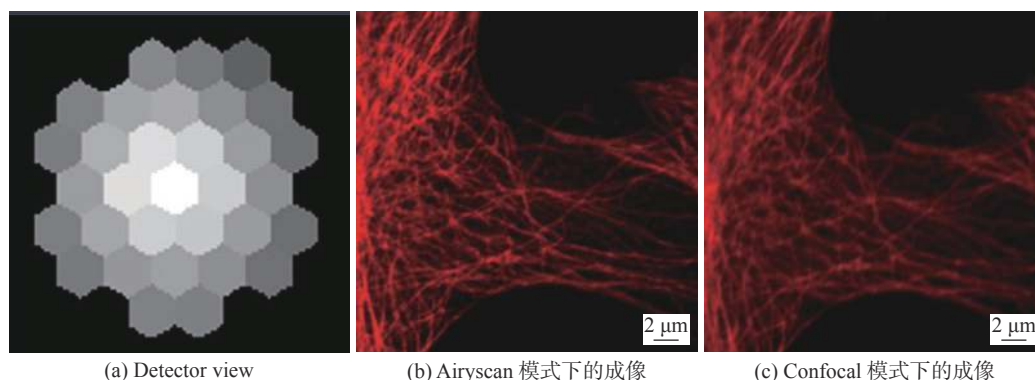


图 1 Airyscan 32 通道 GaAsP 阵列检测器(物镜为 63 倍油镜, zoom 为 5)

此时表示系统调整到正确的通路。之后 Frame Size 选择“Optimal”，即可进行 2D 或 3D 图像的拍摄，拍摄后的图片需要在“Processing”中进行后续处理。

2 STED 技术与应用

2.1 STED 技术原理

1994 年, 德国科学家 Stefan W. Hell 发明了 STED 技术, 突破了 200 nm 衍射极限, 并因此获得了 2014 年诺贝尔化学奖。STED 技术基于受激发射现象, 激发光(图 2(a)中蓝色箭头)将荧光探针从基态(S_0)激发到激发态(S_1), 此时会发生荧光探针的自发发射, 将分子送回基态, 形成艾里斑; 再利用引入的另外一束高能激光(图 2(a)中红色箭头, 图 2(b)中橙色圆环)发射中空圆环(甜甜圈)样的长波长激光, 淬灭“甜甜圈”部分的荧光, 而真正被探测器接收到的荧光来自“甜甜

圈”中央部分的荧光, 从而有效减少成像荧光的衍射面积, 提高图像空间分辨率, 且空间分辨率与 STED 激光束的强度成比例^[8], STED 设置的可实现分辨率不是显微镜硬件的恒定属性, 而是可调的, 并随观察到的荧光团类型和激光功率而变化, 其空间分辨率在理论上是无限的, 然而对于常规荧光团和生物样品, 可实现的分辨率通常在 30~70 nm。STED 显微镜图像的信噪比(SNR)取决于 STED 耗损光和激发光束之间的对准系统, 以保证“甜甜圈”位于激发点的中心。在此前的 STED 系统中, 通常使用分开的光路, 因此任何热漂移和/或机械振动都会限制系统的有效分辨率。而 Zeiss LSM880 搭载的 STEDYCON 系统, 通过获得专利的 easy STED 光学装置进行设计对准, 使仪器始终可以成像, 无需校准程序, 简化了 STED 显微镜的组装、维护和操作^[9]。

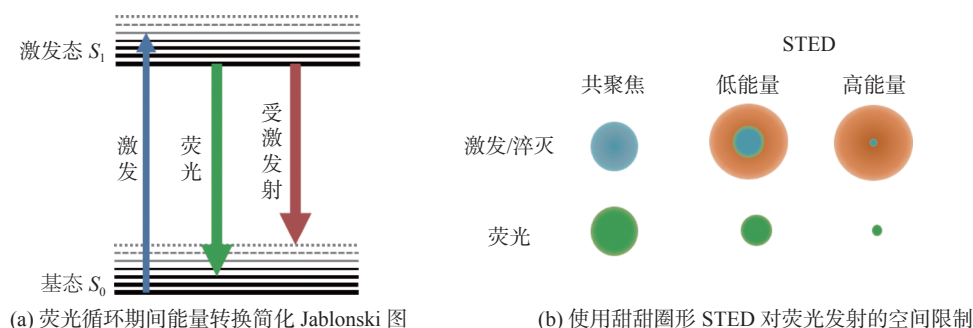


图 2 STED 技术原理^[8]

2.2 STED 技术应用

STED 超高分辨显微成像技术以其优异的空间分辨率在医学细胞生物学领域的应用日益广泛, 成为探索亚细胞器结构和功能蛋白等的强有力工具。STED 技术可以对固定细胞成像, 也可以对活细胞进行平面成像和三维成像, 以便于观察蛋白质的定位、细胞器活动及核酸分子成像等。文献[10]对小鼠海马神经元的兴奋性突触功能区的蛋白进行免疫荧光染色, 解析了单个兴奋性突触功能区内的纳米域的形态特征。文献[11-12]利用 STED-FCS 研究了纳米级的脂质膜动力学行为和 HIV-1 组装位点内部和外部的病毒蛋白 Env 的动态行为。文献[13]对活细胞内质网(ER)的单个结构元件进行成像, 获得了小于 50 nm 分辨率的

图像, 同时记录了 ER 随时间的形态变化。还可以利用 STED 技术揭示线粒体的融合、裂变过程^[14]和溶酶体动态行为^[15], 研究 DNA 的 3D 折叠与完整细胞核中核心组蛋白的组织关系^[16]以及 RNA 的功能和空间动力学^[17]。

2.3 参数设置

STEDYCON 由基于浏览器用户界面的 Smart Control 智能软件控制, 易于安装、操作及维护保养。在打开软件后, 首先在“Status Info”里确认 STEDYCON 状态, 保证“interlock(key, head, 1, 2, 3)”的状态均为“true”, 此时说明仪器通路正常, 之后点击“START UP”, 并在“Start New Session”里设置使用的 100 倍油镜的 NA 值, 同时选择所用的荧光染料, 即可进入拍摄界面对样品进行成像, 如

图 3 所示。STEDYCON 配备的耗损激光的波长为 775 nm, 因此需要所选用的荧光染料的发射波长能

够覆盖到 775 nm, 图 3 是用“STAR RED”染料分别对细胞的微管和纳米粒子进行染色后的成像。

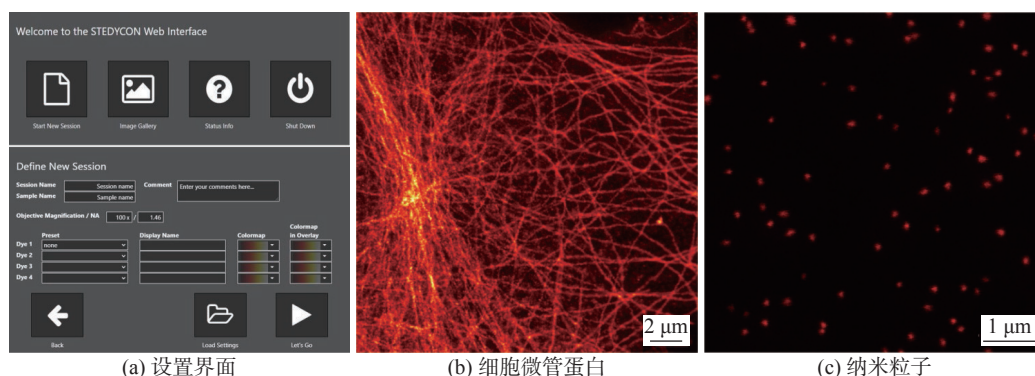


图 3 Smart Control 软件界面及采用 STEDYCON 技术拍摄的超分辨共聚焦显微镜图片

3 讨论

光学显微镜越来越成为生物医学研究的重要工具。在近几十年中, 基于荧光的成像技术已经从普通的宽场荧光显微镜到复杂的超分辨率成像系统做出了巨大飞跃。迄今为止, 现代荧光显微镜提供了多种可能, 可直接在纳米尺度上对生物样本进行可视化研究, 使通过传统分子和细胞生物学方法获得的见解得到补充, 增强我们对生命系统中分子相互作用和亚细胞器动态活动过程的了解。然而如何保持空间和时间分辨率之间的良好平衡, 仍然是一项具有挑战性的任务。这些参数对于活细胞成像尤其重要, 在活细胞成像中, 能够区分亚细胞特征通常是至关重要的, 同时还能够在低光毒性下跟踪动态过程, 以最大限度地减少生物标本的光毒性损伤。传统的共聚焦在扫描速度和光毒性方面都具有非常好的优势, 但不能提供足够的空间分辨率, 这限制了其在亚细胞形态学研究中的使用。相比之下, 超分辨率方法可提供低至几十个纳米尺度的成像, 满足了研究亚细胞形态学的分辨率需求。STED 技术是第一个开发的基于图案照明的超分辨率成像方法, 能够打破衍射极限, 其在空间分辨率可以低至 30 nm, STED 中的时间分辨率由成像区域上的扫描速度决定。因此, 可以以牺牲视野和/或空间分辨率为代价来实现高时间分辨率, 即扫描的视野越小, 用时越短。然而, STED 光束所需的相对较高的激光功率意味着光漂白和光毒性可能成为一个潜在的问题, 并限制了成像持续时间以及荧光标记物的选择, 使其不太适合活细胞成像。尽管存在这些

潜在的问题, 但采用高亮度和高稳定性的荧光探针, 最近已经证明了对活小鼠大脑神经突触结构 STED 成像采集后可直接生成超分辨图像^[18], 其优势是不需要进行任何额外的数据处理, 但又以高功率密度和长采集速度为代价, 这也对荧光探针的开发提出了挑战, 目前也不断有新的适用于 STED 的荧光探针被开发出来, 有生物相容性小分子有机染料和纳米材料, 包括量子点(Q dots)、碳点(C dots)、上转换纳米粒子(UCNPs)、聚集诱导发射(AIE)纳米粒子和聚合物点(P dots)^[19], 尽管新的荧光探针取得了多方面的进步, 但每种荧光探针都有其自身的优点和缺点, 在体内应用 STED 技术对样本进行大视野和高深度成像仍是一大挑战。

4 结束语

Airyscan 技术弥补了传统共聚焦显微镜和超分辨率显微镜之间的空白。Airyscan 技术是一种新的探测器设计, 它克服了传统激光共聚焦显微镜单一针孔的局限性, 由物理探测器和单一探测器组成, 并使用基于 32 通道 GaAsP-PMT 阵列探测器的新针孔平面图像检测方法。该技术提高了空间分辨率和 SNR, 而不需要特殊的荧光探针, 不需要更大的激光激发功率, 因此不会由于光漂白而导致荧光损失。文献 [20] 在对大鼠嗜碱性白血病(RBL)细胞进行的活细胞动态成像过程中发现, 在 400 s 的总持续时间内, 两次拍摄时间间隔为 10 s, 在整个采集时间内, 荧光损失不到其原始值的 5%。因此, Airyscan 技术有望被广泛用于活细胞成像。然而, Airyscan 显微镜的空间分辨率仅

为 120 nm 左右, 还不能完全满足亚细胞观察的分辨率需求。

因此, 我们在实际应用中究竟要选择用 STED 还是 Airyscan 模式进行扫描, 取决于具体的生物学应用方向, 特别是所需的时空分辨率、视场大小和成像时间, 必须仔细考虑和平衡这些参数, 以指导特定方法的选择, 从而得到最佳的成像效果。

参考文献

- [1] HUANG B, BATES M, ZHUANG X. Super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2009(78): 993–1016.
- [2] HUFF J. The Airyscan detector from ZEISS: confocal imaging with improved signal-to-noise ratio and super-resolution[J]. *Nature Methods*, 2015, 12: 1–2.
- [3] KOLOSSOV V L, SIVAGURU M, HUFF J, et al. Airyscan super-resolution microscopy of mitochondrial morphology and dynamics in living tumor cell[J]. *Microscopy Research and Technique*, 2018(81): 115–128.
- [4] DEROUBAIX A, MOAHLA B, PENNY C. Monitoring of intracellular localization of Hepatitis B virus P22 protein using Laser Scanning Confocal Microscopy and Airyscan[J]. *Microscopy Research and Technique*, 2020(83): 499–506.
- [5] ROMERO I C, URBAN M A, PUNYASENA S W. Airyscan superresolution microscopy: A high-throughput alternative to electron microscopy for the visualization and analysis of fossil pollen[J]. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 2020(276): 104192.
- [6] URBAN M A, BARCLAY R S, SIVAGURU M, et al. Cuticle and subsurface ornamentation of intact plant leaf epidermis under confocal and superresolution microscopy[J]. *Microscopy Research and Technique*, 2018(81): 129–140.
- [7] BARLOW A M, MOSTACO-GUIDOLIN L B, OSEI E T, et al. Super resolution measurement of collagen fibers in biological samples: Validation of a commercial solution for multiphoton microscopy[J]. *PLOS ONE*, 2020, 15(2): e0229278.
- [8] CUEREAU R, NNESEN, J T. NÄGERL U V. STED microscopy for nanoscale imaging in living brain slices[J]. *Methods*, 2015(85): 57–66.
- [9] REUSS M, ENGELHARDT J, HELL S W. Birefringent device converts a standard scanning microscope into a STED microscope that also maps molecular orientation[J]. *Optics Express*, 2010(18): 1049–1058.
- [10] KEDIA S, RAMANAN N, NAIR D. Quantifying molecular aggregation by super resolution microscopy within an excitatory synapse from mouse hippocampal neurons[J]. *Star Protocols*, 2021(2): 100470.
- [11] MUELLER V, HONIGMANN A, RINGEMANN C, et al. FCS in STED microscopy: Studying the nanoscale of lipid membrane dynamics[J]. *Methods in Enzymology*, 2013(519): 1–38.
- [12] CHOJNACKI J, EGGELING C. Super-resolution STED microscopy-based mobility studies of the viral env protein at HIV-1 assembly sites of fully infected T-cells[J]. *Viruses*, 2021, 13(4): 608.
- [13] BIRKA H, KATRIN I W, STEFAN W H. Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell[J]. *PANS*, 2008, 105(38): 14271–14276.
- [14] YANG X, YANG Z, WU Z, et al. Mitochondrial dynamics quantitatively revealed by STED nanoscopy with an enhanced squaraine variant probe[J]. *Nature Communications*, 2020(11): 3699.
- [15] FAN M, AN H, WANG C, et al. STED imaging the dynamic of lysosomes by dually fluorogenic Si-rhodamine[J]. *Chemistry*, 2021: 202100623.
- [16] GRAŽVYDAS L, CLAUDIA B, ELIAS P, et al. SiR-Hoechst is a far-red DNA stain for live-cell nanoscopy[J]. *Nature Communications*, 2015(6): 8497.
- [17] DUMBOVIC G, SANJUAN X, PERUCHO M, et al. Stimulated emission depletion (STED) super resolution imaging of RNA and protein-containing domains in fixed cells[J]. *Methods*, 2021(187): 68–76.
- [18] CALOVI S, SORIA F N, TNNESSEN J. Super-resolution STED microscopy in live brain tissue[J]. *Neurobiology of Disease*, 2021(156): 105420.
- [19] LIU Z, LIU J, WANG X, et al. Fluorescent bioconjugates for super-resolution optical nanoscopy[J]. *Bioconjugate Chem*, 2020(31): 1857–1872.
- [20] KSENIYA K, LAGERHOLM B, HUW C Y, et al. Exploring the potential of Airyscan microscopy for live cell imaging[J]. *Photonics*, 2017, 4(3): 41.

编辑 张俊