



科学访谈

记新一代微型化高分辨率双光子显微镜的诞生——程和平院士专访

在生物医学领域,成像技术是最重要的技术手段之一,它让研究者能够观察到组织和细胞内正在发生的过程,为各项研究提供直接而确切的证据.传统的单光子荧光显微镜用单个光子将荧光分子激发到激发态,进而产生可被观测的荧光,而发明于1990年的双光子显微镜则是用两个光子来激发同一个荧光分子.与单光子显微镜相比,它所使用的激光波长更长(单个光子的能量更小),具备更高的组织穿透性和更小的光毒性.此外,双光子的激发能力与能量密度的平方成正比,因此只有位于焦平面上的荧光分子才能被激发,产生的光学断层效应可以有效提高成像的纵向分辨率.这些优点使双光子显微镜更适合观测厚度较大的生物样品,在脑科学等领域中具有独特的优势.

2017年,中国科学院院士、北京大学分子医学研究所教授程和平领衔的跨学科团队实现了双光子显微镜核心部件的微型化,将原本几百公斤的仪器缩减为几十公斤的组合物,核心部件缩减至2.2克,成为可被自由活动的小鼠戴在头上的观测利器(图1,2).这一成果是生物医学成像技术的重大突破,也是我国科学家在自主研发大型仪器方面取得的重大进展.

2018年5月2日,北京大学120周年校庆前夕,习近平总书记在考察北京大学期间参观了多模态微型化双光子显微镜整机,听取了程和平院士的介绍和汇报,并给予高度评价.

近日,程和平院士接受《中国科学:生命科学》专访,回顾这一成果的研发历程,讲述了从技术创新



图1 多模态微型化双光子显微镜整机

到产品、再到规模化高通量平台的“三级跳设想”.程和平认为,在国家级大仪器项目的指导下,用原创性大仪器平台促进大科学发展的科学研究转型正在中国发生.

《中国科学:生命科学》:您是如何提出“微型化双光子显微镜”这一研究项目的?

程和平:世界上第一台双光子显微镜由美国康奈尔大学 Winfried Denk 和 Watt W. Webb 在1990年研制成功,在那之后的两年,我和双光子显微镜开始

引用格式: 赵维杰, 卢珊. 记新一代微型化高分辨率双光子显微镜的诞生——程和平院士专访. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 802–806

Zhao W J, Lu S. Birth of a new generation of high-resolution two-photon microscope—interview with Prof. Heping Cheng, member of CAS (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 802–806, doi: 10.1360/N052018-00125

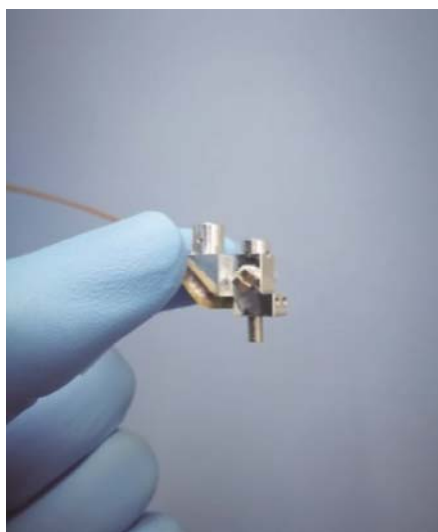


图 2 2.2g 微型双光子荧光显微镜

结缘。当时我在美国读博士，有机会到康奈尔大学使用世界上第二台双光子显微镜进行了心肌细胞中线粒体的荧光成像，拍到了一些非常经典的照片。

双光子显微镜有很多优点，但是非常昂贵，而且十分娇气、难以维护。由于我当时的研究主题是钙火花，而双光子显微镜一时没有合适的荧光染料可对它进行观察，因此在那之后的很多年，我没有再使用过双光子显微镜。

双光子显微镜微型化工作最早的尝试是在 2012 年前后。当时单光子显微镜已经实现了微型化，我意识到双光子显微镜的微型化将是一项很有意义的工作，于是就请一位北京大学信息科学技术学院的本科国防生在他的毕业设计中做了这一课题。这名学生花了一年的时间，做出一个质量为 100 多克的探头。虽然只是一个很粗糙的产品，也没有实现成像。但这位名叫宗伟健的国防生，后来成为我们研究团队中的主力。

2013 年，国家自然科学基金委员会启动了国家重大科研仪器研制项目。在基金委有关领导的鼓励下，我们申请了微型化高分辨率双光子显微镜项目，经过同行专家评审、学部咨询委员会评审、专家委员会答辩评审和专家现场考察等程序，我们获得了 7200 万元人民币的支持。可以说，如果不是基金委的顶层设计，我不会离开自己原本的研究领域，来组建这样一个跨学科的大团队，并且完成这一工作。

《中国科学：生命科学》：这个跨学科的大团队是如何组建起来的？

程和平：北大是一所综合性的大学，为跨学科团队的组建提供了很多便利。同时，我个人的背景又比较交叉，我在北大有三个“娘家”，力学系(现工学院)和生物系(现生命科学学院)都读过书，后来又在无线电系，也就是现在的信科院做过两年助教。这三个院系都为这个项目提供了巨大的支持。当然，除了北大，我们也联合了来自中科院自动化所、计算所、北航、华中科大等单位的人才，最后组建了一个非常交叉的队伍，团队里有做激光器的、做微马达的、做射频电路的、做图像处理的、做大数据分析的、做生物等等。

北大还给了我们招生方面的支持，除了博士生名额，研究生院给了我们每年三个专业硕士的名额。利用这些名额，我们招到了不少各领域中的高手，包括在国际机器人大赛中获奖的优秀人才。这些学生都在我们的研发过程中起到了关键作用。

而北大给我们提供的最大支持来自我任教的分子医学研究所，研究所提供了一个约 300 平米的研究空间，使我们这些不同专业背景的人，能够在一个屋檐下共同学习、共同工作，为了一个目标而共同努力，我把它叫做“大仪器联合实验室”。没有这个场所、没有这支队伍，就不会有最后的成果。

《中国科学：生命科学》：研发过程中遇到的主要困难有哪些？

程和平：主要的困难有两个：第一，我们缺少自主研发系统性设备的经验，第二，技术路线的不确定性。

我们团队中的所有人都缺少从头研制系统性科研设备的经验。没经验就要学习，所以我定下了“请进来，走出去”的策略。

我们把世界上最有经验的人请过来做报告，请他们看我们做的东西，然后讨论听取他们的意见。在大概一年时间里，我们先后邀请了十几位专家。不只是外国的专家，国内大连化物所的杨学明研究员在这方面很有经验，在项目管理等方面给了我们很多帮助。

此外，我们还要“走出去”。我、陈良怡、周专等人，到美国、欧洲的很多研究机构去请教和学习。我们每去一个地方，都会在当天晚上写好总结，发给整个团队来共同学习。

在项目的前两年,有记录的学习和交流就有一百多次。我们花了很大的功夫来弥补经验上的不足。我常跟他们说,我是抱着重新从幼儿园开始读一个博士学位的心态来做这件事的。

在我们走出去的过程中,很多世界顶级的专家都认为我们的目标是不可能实现的,比如斯坦福大学单光子微型化专家。因为,包括双光子显微镜的发明者 Denk 在内,已经有一些人尝试过对它进行微型化,但是都没有得到兼顾重量和分辨率,能够走出实验室的成果。所以,这个项目确实是有难度的,它的技术路线具有不确定性。

所以,我们选择了并行的研究策略:有人做微型化、有人做超分辨,有人做超快,还有人做超深。最后再把各个路线的探索结果创造性地集成起来,才得到最终的 2.2 克。在这个过程中,是 7200 万资金给了我们试错的资本和底气。一个创新性的工作,一定要允许试错才可能成功。

事实上,除了核心成果微型化双光子显微镜,我们的各个技术路线上都结出了硕果。在超快领域,我们发明了快速扫描双光子光片显微镜,它是世界上第一个三轴扫描式的光片显微镜。在超深领域,我们搭建的三光子显微镜可以看到近 2 毫米的深度。在超分辨领域,我们最近发表的超灵敏超分辨结构光显微镜是非常出色的成果。在超大视场领域,我们也有成果产出,即将投稿。

《中国科学:生命科学》:核心成果“微型化高分辨率双光子显微镜”实现了哪些突破?

程和平:最主要的突破就是微型化的实现。我们把几十公斤重的双光子显微镜核心部件集合到了 2.2 克,其中包括成像、扫描和收集部分,在另一个版本中,也可以包括探测部分。这其中,我们完成了对高性能透镜组等关键部件的微型化设计、制造和集成,取得了突破性的进展;此外,920 纳米全正色散掺铒飞秒光纤激光器是我们在国际上首次实现;而专用传导此波段飞秒光束的空心晶体光纤等部件也是我们自主设计和定制的。

920 纳米波长的激光能够有效激发 GFP, GCaMPs 等常见荧光标记分子,在双光子显微成像中应用广泛。920 纳米光纤激光器能够产生优质的飞秒激光脉冲,而在激光脉冲通过空心晶体光纤传输到微型化探头的过程中,我们的光纤相当于做成了一个柔性

可变的空气通道,能够在最大程度上保持激光脉冲传输过程中不畸变不损耗。

在我们的技术之前,双光子显微镜只能观察死的、麻醉的或者固定的动物。而现在,经过训练的小鼠可以戴着只有 2.2 克的探头自由活动(图 3)。我们可以在不影响实验动物生活质量的前提下,对自由状态下实验动物的大脑进行长时间的观测,分辨率达到细胞,甚至是突触的水平。此外,对于大鼠或者体型更大的实验动物,我们还可以对一个个体进行多探头的观测,可以对不同脑区之间的远距离相互作用进行研究。

在脑科学研究中,在真实场景中对活动中的动物大脑进行观测非常重要,所以,我们的技术将可以为脑科学的发展提供巨大的推动力。

《中国科学:生命科学》:是否已经有实验室在应用此项技术开展研究?

程和平:这项成果花费了巨额经费和巨大的精力,不应该只以发表文章为目的,而应该被广泛应用,真正产生影响力,推动科学的进步。目前,德国和挪威的两个实验室在使用我们的核心装置,其中 2014 年诺贝尔奖得主 Edvard Moser 的实验室已经完成了一项不错的工作,初步结果投在美国神经科学大会交流。此外,德国的一个医院以及国内的三四个实验室都已经在应用我们的技术。

《中国科学:生命科学》:为推动这项技术的进一步实用化,您的团队做了哪些工作?

程和平:我对这项技术有一个“三级跳”的设想。第一跳是技术创新,这一点已经基本完成;第二跳是把技术转化为产品,也就是通用化的仪器;第三跳是基于产品的大规模高通量平台,这个平台将可以改变整个脑科学研究的范式。

为了实现“第二跳”,将实验室里的原型机转化为产品,我们成立了一个超微型的小公司。公司设在中关村智造大街,名叫“超维景”,经过一年多时间,公司目前已可以生产整机,但是在真正实现销售之前,我们还希望再多做一些优化,使生产出的仪器具有更高的可靠性和稳定性。“超维景”的创立得到了几家投资公司的投资,也在专利使用等方面得到了北大的支持。我们希望“超维景”生产的仪器能够得到科学家的认可,使我们开发的技术在脑科学领域中发挥影响力。

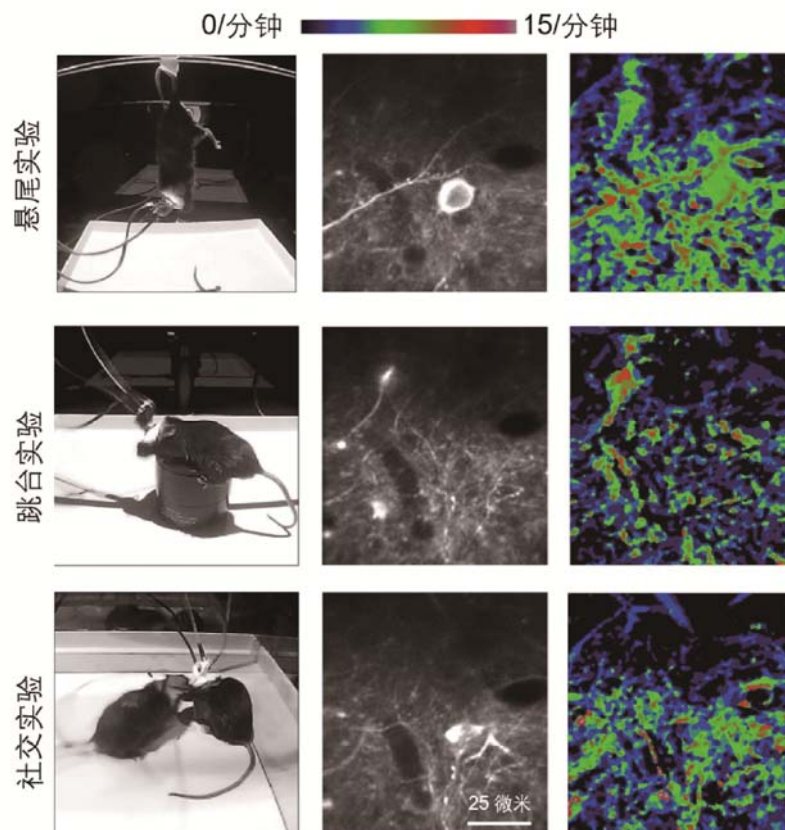


图3 实验中的小鼠及脑成像照片

而“第三跳”的设想,是受到了基因测序的启发.测序领域的技术创新正是通过规模化的方式,才对整个生命科学领域产生革命性的影响.规模化的发展策略特别适合复杂的科学问题,而脑科学正是如此.一个规模化的微型化双光子显微镜实验平台,将可以成为脑科学研究中的超级工具,改变脑科学研究的范式:在提高研究效率和数据质量的同时,也为重要的大科学问题提供支持.

为此,我们已经和南京江北新区建立了合作.江北新区将提供数亿资金,支持我们建立一个百台规模的高通量平台.除了资金密集的特点,这个平台也将是技术密集和人才密集的.每一台仪器都需要技术人员来进行操作和维护,此外还需要实验动物相关、大数据分析相关的人才团队,以及对整个平台进行统筹的管理团队.

我们把这个平台命名为叫做“脑观测台”,英文是 Brain Observatory. Observatory 是天文学研究中的“天文台”,而大脑就是小宇宙.

除了南京的脑观测台,在怀柔科学城正在筹建的多模态跨尺度生物医学成像设施里,我们的技术也将得到应用.怀柔科学城是国家战略工程,国家发改委牵头“十三五”基础科学大设施,该成像设施正是十项优先建设项目之一,也是生物医学领域中的唯一项目.

《中国科学: 生命科学》: 这项技术和近年来不断涌现的其他新技术,将如何影响生命科学的研究范式?

程和平: 生命科学是一门极其复杂的科学.在时间尺度和空间尺度上,生物体都横跨十个量级以上.在自然科学领域,最难研究的,除了极微和极大,就是极复杂.

在过去,生命科学研究常常是手工作坊式的,以实验室为单位,研究一个个具体的科学问题.而近几十年中各种新型技术和仪器的涌现,提示我们需要在思维上有所突破,要向大科学的格局进行转变.大

仪器、大平台、大数据,都将帮助我们全景式的角度来看待生命科学,并且对真正重要的大科学问题进行解答。

当然,小仪器、小项目的传统式研究依然是重要的。需要强调的是,许多小项目合在一起并不能等同于一个大项目,所以国家层次上的大科学计划是必要和重要的。

《中国科学: 生命科学》: 超微型双光子显微镜项目为我国的仪器研发积累了哪些经验? 我国的科研原创能力如何提升?

程和平: 在团队的组建和管理等方面,这个项目的许多经验是值得适当推广的。中国现在科技论文的发表数量已位居世界第二,但我们真正做到世界顶尖的领域依旧极少。大多数情况下,我们都是其他人开辟的田地里耕种,极少能开辟自己的领域。

但国家已经意识到了这些问题,并且给了很大的支持,支持原始创新。要做出原创性的工作,首先要有人力、物力和财力的投入,足够的投入才能提供

足够的容错空间,给原创性工作提供土壤。其次需要的就是时间,任何成果的产生都需要时间。创新环境和文化的培养需要时间,只看文章而不要求扎实工作的评价风气也需要时间来逐渐纠正。我认为,现在国家的引导方向是正确的,只要能有足够的耐心并且坚持下去,情况一定会越来越好。

《中国科学: 生命科学》: 对于年轻的科研人员,您有哪些建议?

程和平: 我们这个项目产出了很多成果,但最重要的成果就是我们的团队——一群年轻人(图 4)。他们在这么年轻的时候就参与了一个重要的项目,并且从中学到了做科学研究的正确方法,他们的未来发展是不可限量的。

我希望大家能够多去研究各个领域内的核心问题,做出真正能够沉淀下来的工作。另外,虽然说做研究要基于个人兴趣,但在某些时候,如果能够把个人兴趣和国家需求结合起来,从更高的角度来选择研究方向,将可以得到更好的研究成果。超微型双光子显微镜的成果就是这样产生的。



图 4 微型化高分辨率双光子显微镜研发团队

从左到右: 陈良怡、吴润龙、王爱民、胡炎辉、张云峰、程和平、李京航、宗伟健

(赵维杰, 卢珊)