

双光子显微镜系统二次谐波成像的功能开发

边玮

(中科院 分子细胞科学卓越创新中心 细胞分析技术平台, 上海 200031)

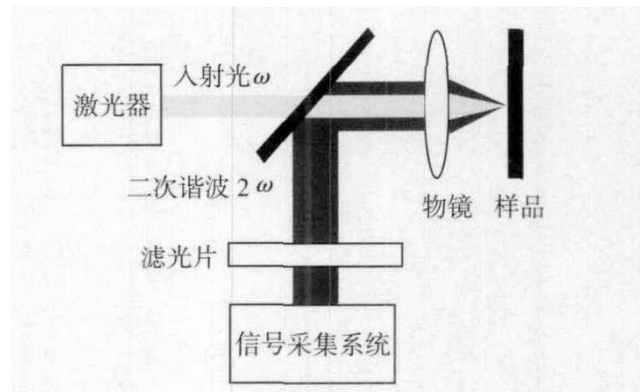
摘要: 本案例主要介绍了利用现有的双光子显微镜系统在拍摄荧光图片的基础上, 开发其采集二次谐波非线性光学图像并使其和荧光图片合并观察的功能, 实现多种生物组织多种结构的二次谐波信号的采集。

关键词: 二次谐波;非线性光学;双光子荧光成像;成像;胶原蛋白

1 专业技术成果介绍

作为项目负责人承担中科院仪器设备功能开发技术创新项目《双光子显微镜系统二次谐波成像的功能开发》, 并顺利通过验收。利用现有的双光子显微镜系统在拍摄荧光图片的基础上, 开发其采集二次谐波非线性光学图像并使其和荧光图片合并观察的功能, 实现多种生物组织多种结构的二次谐波信号的采集。

双光子显微镜系统结合了激光扫描共聚焦显微镜和双光子激发技术, 主要用于多波长荧光显微成像, 样品必须进行荧光染料、荧光抗体标记或荧光蛋白转染, 样品处理和分析时间长, 检测的灵敏度受限。二次谐波成像是近年发展起来的一种三维光学成像技术, 具有非线性光学成像所特有的高空间分辨率和高成像深度, 可避免激光扫描共聚焦显微成像和双光子荧光成像中的荧光漂白效应, 是一种理想的非侵入生物活体成像方法。生物组织的病变往往会引起微观结构的变化, 而二次谐波信号对组织的结构对称性变化高度敏感, 因此二次谐波成像具有很好的生物学应用前景。实验发现, 胶原、肌肉、微丝微管等生物样品都能够产生强烈的二次谐波, 信号的强度、偏振和空间分布同生物分子的结构、其长程链接方式、以及其所处微观环境都有密切的关系, 二次谐波技术可以用于这些指标的结构观测。二次谐波的产生并不依赖吸收过程, 光子与生物体作用时没有能量损失, 避免了荧光测量伴随的光漂白和光损伤作用。二次谐波测量不需要对样品染色, 可以简化实验过程并避免外源性染料分子对生物样品的影响。最重要的是, 二次谐波与双光子荧光测量实验装置基本相同, 很容易实现两者复合成像, 从互补的两个不同侧面获得生物体系信息。



双光子显微镜系统使用的红外波长的超快激光有很强的穿透能力，目前主要应用于厚的生物样品荧光的观察和图像拍摄及分析，根据样品情况，可以拍摄到 600 微米厚的样品，这样有利于观察荧光标记物在生物体内的整体分布情况。基于双光子显微镜系统使用的高能量超快脉冲激光器，可以实现生物样品的二次谐波非线性光学特性的采集，其特点有：1) 二次谐波是生物组织原发信号，从而光致毒性、光损伤和光漂白这些就不复存在。2) 二次谐波是相干散过程，所成的像能反映出样品内部的细微结构。3) 二次谐波的光谱宽度完全有激发光源决定，因为各种信号干扰就会被有效消除，从而获得较高的图像分辨率。4) 样品无需任何标记，生物组织的成像完好保存。对于活体生物样品，二次谐波还具有一些独特的优点，二次谐波一般为非共振过程，光子在生物样品中只发生非线性散射，不被吸收，因此不产生伴随的光化学过程，可减小对生物样品的损伤。

二次谐波成像设备主要有超快脉冲激光器、高数值孔径的物镜、高灵敏度的非解扫描探测器、滤光片等部分构成。项目在已有一套双光子共聚焦显微镜系统基础上，具体进行了超快脉冲激光器的波长及激发功率的调整、准相位匹配和具有高二阶非线性的生物样品的制备以及红外激光和可见光激光光路的调整。调试双光子脉冲激光器在 800nm 处输出功率可达 3.3w，波长连续可调，输出功率稳定。选择 63X 油镜物镜，调节发射波长为 450nm-550nm 区段。观察小鼠背部皮肤样品，获得清晰的二次谐波图像及荧光图像，可以原位重叠。获得图像如下：

小鼠皮肤二次谐波图像及荧光图像：

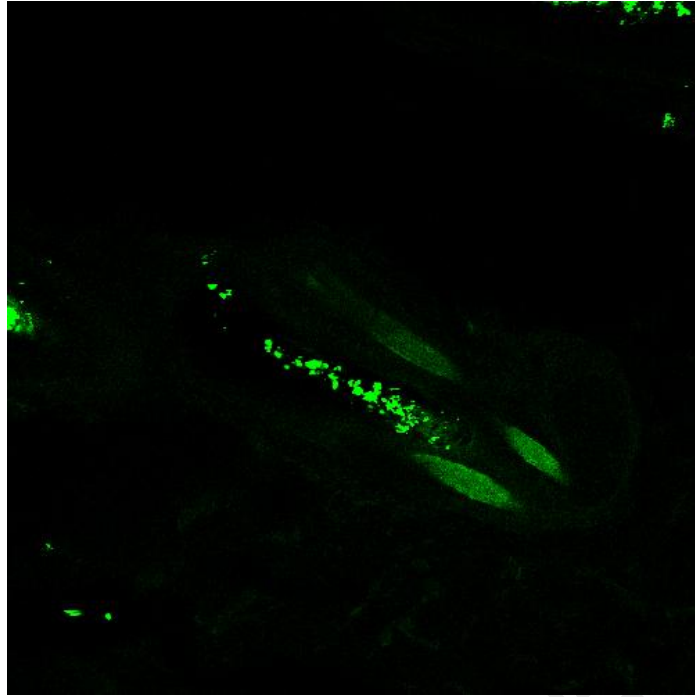


图1 小鼠皮肤二次谐波图像（双光子激光器波长 880nm，检测波长 450nm-550nm，63X 油镜）

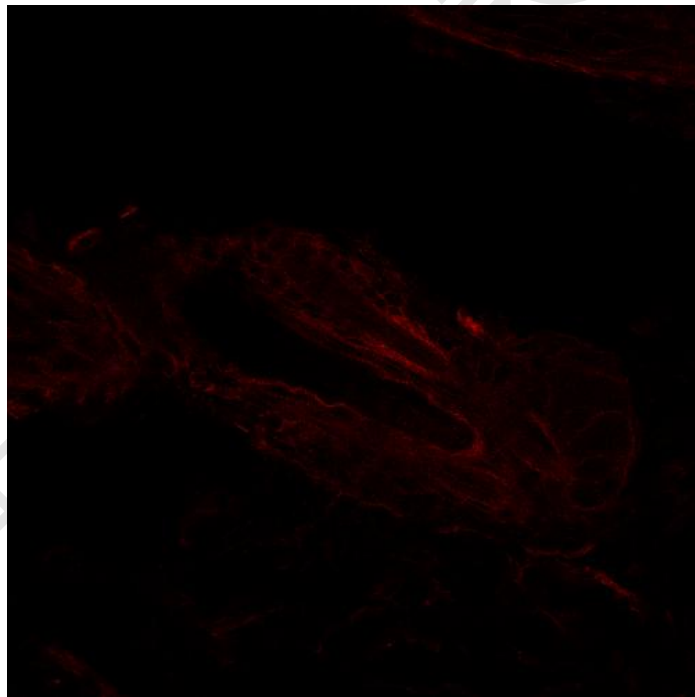


图2 小鼠皮肤荧光图像（单光子激光器波长 561nm，检测波长 550nm-620nm，63X 油镜）

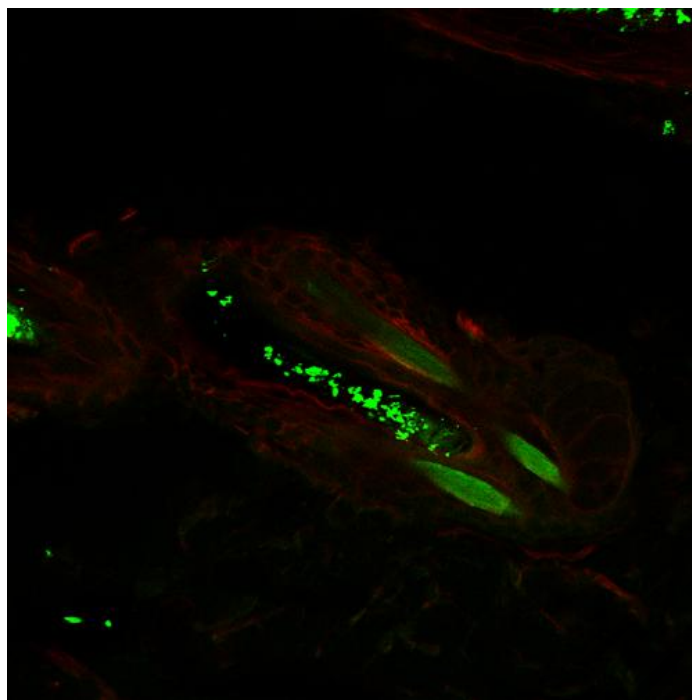


图3 二次谐波成像及荧光成像原位合成图像

目前国内已有很多双光子激光共聚焦设备用户，多用于生物样品荧光显微成像，没有充分开发其二次谐波等非线性光学成像功能。在现有的双光子激光共聚焦系统上，实现了生物样品二次谐波成像并使其与荧光图像重叠合并。

2 专业技术人才介绍

2.1 个人简介

边玮，正高级工程师，中科院分子细胞科学卓越创新中心细胞分析技术平台主任，负责细胞平台技术服务及运行管理，致力于平台的基础建设、人才队伍建设、技术建立和应用、以及新技术发展。承担十二五、十三五、十四五大型仪器设备修购专项(细胞生物学研究大型仪器技术部分) 规划编制工作及细胞生物学国家重点实验室大型设备项目申报，负责组织仪器调研采购、安装调试、培训、验收以及技术服务和运行管理工作。参与国家蛋白质科学研究（上海）设施建设，任复合激光显微成像系统副主任设计师，组织完成系统技术验收。参与国科大杭州高等研究院生命与健康科学学院建设，负责细胞生物学分析技术平台一期建设，完成一期项目验收。

现任上海显微学会理事，生命科学专业委员会主任；中国电子显微学会理事；《生命的化学》杂志编辑委员会编委。2015年上海市高峰学科建设计划项目评审专家，2017年国家重点实验室大型仪器设备评审专家，2021年国家重点研发计划重点专项项目评审专家。

2.2 专业技术研究方向

细胞生物学研究相关大型仪器技术服务及运行管理。擅长荧光显微镜成像、激光共聚焦显微成像、活细胞成像、转盘共聚焦显微成像等荧光显微成像技术及应用，近年来为满足科研实验需求，带领团队连续建立了超高分辨率荧光显微成像、多光谱荧光成像、光片显微成像、组织切片高通量扫描成像等新技术的应用，同时建立了流式细胞检测分析技术、流式细胞分选技术以及组化制样技术、生物电镜样品制备和成像技术应用。

2.3 承担科技项目及代表论著

作为项目负责人承担了四项中科院仪器设备功能开发技术创新项目，组织团队承担并完成两项上海市专业技术人才知识更新工程急需紧缺人才培养项目。

(1)《双光子显微镜系统二次谐波成像的功能开发》

(项目编号：1731317600311，2013年)

(2)《提高高压冷冻及冷冻替代技术电镜制样成功率的功能开发》

(项目编码：Y51LS11，2015年)

(3)《针对流式细胞仪分选后细胞活性提升的功能开发》

(项目编码：Y81LS21，2018年)

(4)《荧光显微镜细胞超高分辨率动态成像功能开发》

(项目编码：E11L3101，2021)

(5)上海市专业技术人才知识更新工程急需紧缺人才培养项目-流式细胞分析分选仪培训(2019年)

(6)上海市专业技术人才知识更新工程急需紧缺人才培养项目-荧光显微成像技术培训(2020年)

2.4 获奖及荣誉

荣获院所两级公共技术服务中心2018年度优秀个人，所带领团队荣获院所两级公共技术服务中心2019年度优秀集体。