

# 双光子激光扫描显微镜的检测模式及其在生物医学领域的应用

刘皎, 吴晶\*

(北京大学 医药卫生分析中心, 北京, 100191)

**摘要:** 双光子激光扫描显微镜 (two-photon laser scan microscope, TPLSM) 具有低光毒性、高时空分辨率、高信噪比等优点, 结合了激光扫描共聚焦显微镜和双光子激发技术, 广泛应用于脑科学、免疫学、肿瘤、胚胎发育等生物医学相关研究领域。本文结合作者所在的北京大学医药卫生分析中心共聚焦平台的工作经验, 概述了 TPLSM 适用的样本、检测模式以及在生物医学领域的应用, 以为相关科研技术人员提供参考。

**关键词:** 显微镜双光子;检测模式;应用

## 1 引言

双光子激发技术的基本原理是在高光子密度情况下, 荧光分子可同时吸收 2 个长波长光子, 产生一个一半波长光子去激发荧光分子的相同效果。双光子激光扫描显微镜 (two-photon laser scan microscope, TPLSM) 在激光扫描共聚焦显微镜的基础上, 以红外飞秒激光作为光源, 长波长的近红外激光受散射影响小, 易穿透标本, 可深入组织内部非线性激发荧光, 对细胞毒性小且具有高空间分辨率, 适合生物样品的深层成像及活体样品的长时间观察成像<sup>[1]</sup>。使用高能量锁模脉冲激光器, 物镜焦点处的光子密度最高, 在焦点平面上才有光漂白及光毒性, 焦点外不损伤细胞。双光子效应只发生在焦点处, 所以双光子显微镜无需共聚焦针孔, 也能做到点激发点探测, 提高了荧光检测效率<sup>[2]</sup>。

双光子激光扫描显微镜显微镜可以通过 XYZ, XYT, XY $\lambda$ , XYZT, XY $\lambda$ T 等多种模式实现多维成像, 亦可进行更复杂实验的拍摄, 比如二次谐波成像 (Second Harmonic Generation Imaging, SHG)、双光子荧光寿命成像 (Two-photon Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, TP-FLIM)、荧光寿命-荧光共振能量转移成像 (Fluorescence Lifetime - Fluorescence Resonance Energy Transfer Imaging, FLIM-FRET) 等实验以满足对样品的定性、定量、定位、共定位等多维度多功能的研究。TPLSM 已成为生命科学各领域重要的研究工具, 可在细胞及亚细胞水平对活体动物的神经细胞形态结构、离子浓度、细胞运动、分子相互作用等生理现象进行直接的长时间成像监测, 还能进行光激活染及光损伤等光学操纵, 广泛应用于脑科学、免疫学、肿瘤、胚胎发育等生物医学相关研究<sup>[3-5]</sup>。

本文拟通过按 TPLSM 常见的检测模式分别阐述其在生物医学领域的应用, 以其为相关科研技术人员提供参考。

## 2 TPLSM 适用的样本

TPLSM 适用的样本非常广泛, 从液体、固体等形式的材料或制剂、细菌、细胞、细胞团、类器官、组织切片、到各种模式动物 (如线虫、果蝇、斑马鱼、小鼠、大鼠、兔、猴等) 及其脑、脊髓、肝脏、肺、皮肤等器官, 都可以通过搭载不同载物台进行测试。相对于传统激光扫描共聚焦显微镜  $200\mu\text{m}$  的成像深度极限, 双光子显微镜成像深度可达  $800\mu\text{m}$ , 如果是透明化样品可更厚。TPLSM 尤其适合活体动物成像, 且比小动物荧光成像有更高的分辨率和信噪比, 一般 TPLSM 的 XY 轴分辨率为  $200\text{ nm}$  左右, Z 轴分辨率为  $300\text{ nm}$  左右。

## 3 TPLSM 的检测模式

### 3.1 二维成像模式

TPLSM 可以实现点扫描、点探测, 得到生物样品高反差、高分辨率、高灵敏度的二维图像, 从而获得细胞/组织等光学切片的物理、生物化学特性及变化。也可以对所感兴趣的区域进行准确的定性、定量及定位分析。激光扫描显微镜的 zoom 功能, 可以用来调节扫描区域的放大倍数。但受物镜分辨率的限制, 一味的增大 zoom 值, 不能得到相应的高清图像, 需根据实际情况参考 pixel size 进行设定。TPLSM 可以实现 XY、XZ 或 XT 的二维成像模式, XT 线扫会在后文与 XYT 时间序列成像一起进行举例说明 (图 2b)。

### 3.2 三维成像模式

#### 3.2.1 Z 轴序列三维成像 (XYZ)

TPLSM 可沿 Z 轴方向通过电动载物台的连续扫描对样品进行无损伤的光学切片 (XYZ), 获得三维立体图像。同理, 通过沿 Y 轴方向连续扫描, 可获得连续的 XZY 图像。如图 1 所示 TPLSM 可以顺利观察到可以观察到血管清晰形态结构: 单个胚胎的胎盘微血管 (图 1a)、肝脏血窦微血管 (图 1b) 和后肢微血管 (图 1c) [6]。

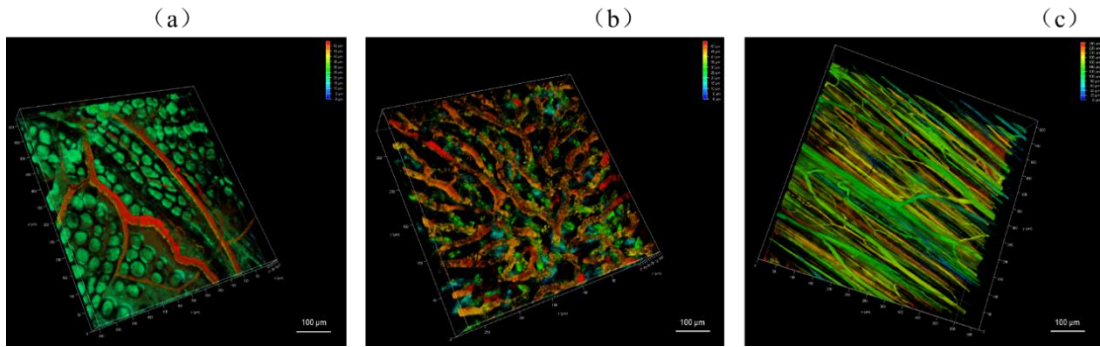


图1 (a) 胚胎胎盘微 (b) 肝脏血窦和 (c) 后肢的微血管三维成像

### 3.1.2 时间序列扫描模式 (XYT)

按照一定的时间间隔重复采集, 则可实现对该样品的实时监测 (XYT)。此类实验可观察组织区域内特异荧光探针标记的单个细胞或细胞内不同部位接受刺激后的整个变化过程。如图 2 (a), 可以根据微血管 XYT 序列扫描的成像结果中某一血细胞在前后两张图的位置移动和这两帧图的扫描时间间隔计算血流速度。若血流速度很快, XYT 扫描不足以捕捉实际流速, 可以使用 XT 线扫计算。如图 2 (b), 微血管 XT 扫描图像中绿色荧光背景里的黑色线条代表单个血细胞的流动轨迹, 每条线条的横坐标代表血细胞移动的距离 (distance /  $\mu\text{m}$ ), 纵坐标代表此段时间 (time / ms), 根据这两个数据可以计算出单位时间内血细胞的流动速度 ( $\mu\text{m} / \text{ms}$ ) [6]。

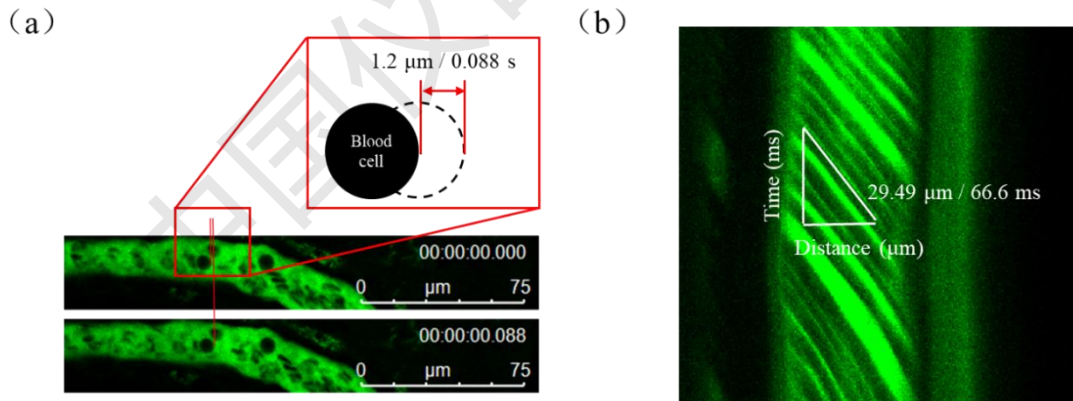


图2 微血管 (a) XYT 扫描结果和 (b) XT 一维扫描结果图像计算血流说明示意图

### 3.1.3 光谱扫描模式 (XYλ/XYλ)

通常配置有可调节接受范围的检测器的 TPLSM, 可以实现从 400nm-800nm 的发射波谱扫描。通过配置具有连续可调波长的双光子激光器, 还可以实现 750nm-1300nm 激发波谱扫描。这对于开发研制特殊染料探针的课题来说是很方便、全面的检测功能。

### 3.3 四维成像模式 (XYZT/XYλT/XYAT)

基于上述三维成像模式, 结合时间序列扫描, 可以实现 TPLSM 的四维成像。

### 3.4 二次谐波成像 (SHG)

SHG 是一个二阶非线性过程, 且一般为非共振过程, 适合富含胶原纤维的样本成像, 如角膜、鼠尾肌腱、皮肤等。生物组织产生的二次谐波最主要的转换源自胶原, 不同生物组织中的二次谐波信号强弱与组织中的胶原含量密切相关, 含胶原丰富的组织包括结缔组织和肌肉组织等二次谐波信号也比较强, 另外还有一些能产生强二次谐波的生物结构是微管, 如细胞分裂中纺锤体。对于具有中心对称性的生物结构, 如果局部中心对称性的破坏也会产生二次谐波: 在两中心对称介质的界面, 不同物态分子的相互作用使局部微观场特性在交界面 (如细胞膜) 发生突变, 从而产生界面二次谐波<sup>[7]</sup>。除了动物组织外, 一些含有特殊分子结构的植物组织也能产生二次谐波。二次谐波显微成像具有高空间分辨率、深成像深度、低损伤、以及对结构对称性的高度敏感性的特点, 如果能与其他成像技术结合, 将成为生物样品研究的有力工具<sup>[8]</sup>。

### 3.5 双光子荧光寿命成像 (TP-FLIM) <sup>[9]</sup>

FLIM 技术是研究细胞内生命活动状态的一种非常可靠的方法。荧光寿命是荧光团在返回基态之前处于激发态的平均时间, 是荧光团的固有性质, 因此其不受探针浓度、激发光强度和光漂白效应等因素影响, 且能区分荧光光谱非常接近的不同荧光团, 故具有非常好的特异性和很高的灵敏度。此外, 由于荧光分子的荧光寿命能十分灵敏地反映激发态分子与周围微环境的相互作用及能量转移, 因此 FLIM 技术常被用来实现对微环境中许多生化参数的定量测量, 如细胞中折射率、黏度、温度、pH 值的分布和动力学变化等, 这在生物医学研究中具有非常重要的意义。目前 FLIM 技术在细胞生物学中一些重要科学问题的研究、临床医学上一些重大疾病的诊断与治疗研究以及纳米材料的生物医学应用研究等方面均有广泛应用, 并取得了许多利用传统的研究手段无法获取的数据。FLIM 检测需要脉冲激光, TPLSM 带有的高能量锁模脉冲激光器可以满足激发要求。

### 3.6 荧光寿命-荧光共振能量转移成像 (FLIM-FRET) <sup>[10]</sup>

传统的 FRET 过程分析通常是基于荧光强度成像来实现, 分析的结果容易受光谱串扰的影响。而将 FLIM 技术应用于 FRET 过程分析, 利用 FLIM 技术可定量测量这一优势, 可非常灵敏地反映供体荧光分子与受体荧光分子之间的能量转移过程。当受体分子与供体之间的距离 $<10\text{nm}$ 时, 供体的能量转移到受体, 受体从基态发生能量跃迁, 从而影响供体的荧光寿命。与没有受体分子的时候相比, 发生 FRET 的供体分子的荧光寿命降低。

因此，FRET-FLIM 联合能够实时监测生物细胞中蛋白质的动态变化，如蛋白质折叠、分子间（蛋白-蛋白，蛋白-核酸）相互作用和细胞间信号分子传递、分子运输以及病理学研究等。

## 4 结论和展望

综上，TPLSM 应用灵活，具备多种检测模式，适用于多种样本，亦可实现多种实验目的，如荧光的定量、定性、定位、共定位，动态荧光的测定等。一些特殊的实验模式，将 TPLSM 在生物医学领域的应用进一步扩大。通过结合其他技术（多手段联合拓展，如膜片钳、原子力显微镜、光电联用等），TPLSM 必将成为助力生物医学领域研究的有力工具。

双光子荧光成像由于具有天生的三维层析能力以及深穿透能力，在活体生物组织成像上广受欢迎。双光子显微镜镜下空间增大后，可广泛应用于猴、大小鼠、兔等较大的模式动物的活体成像。且可结合电生理技术、光遗传技术，广泛应用于麻醉、清醒或运行行为等生理状态下的动物脑科学神经相关研究，在单细胞、单树突精度上对神经元群体活动进行监控。如结合膜片钳技术，对活体脑组急性切片神经元进行双光子深层成像<sup>[11]</sup>；结合光遗传技术，实现视觉皮层同一神经元和神经元群体的稳定操控和长期多次重复记录<sup>[12]</sup>；对在健身球上移动的头固定小鼠小脑进行成像，探讨觉醒状态和运动行为对胶质网络中钙离子的激发的影响<sup>[13]</sup>；结合多种疾病模型，探讨大脑皮层神经元及胶质细胞活性的改变及作用等<sup>[14]</sup>。随着多种双光子显微镜系统的出现，双光子显微镜成像技术将以其实时、无损地探测、诊断及检测能力，在生物医药及临床医学应用中发挥更大作用。

### 参考文献：

- [1] 李娟,张岚岚,吴珏珩.双光子显微镜的应用优势与维护要素[J].中国医学装备,2021,18(12):158-163.
- [2] Hendel T,Mank M, Schnell B,et al.Fluorescence changes of genetic calcium indicators and OGB1 correlated with neural activity and calcium in vivo and in vitro[J].J Neurosci, 2008,28(29):7399-7411.
- [3] Dolgin E.What lava lamps and vinaigrette can teach us about cell biology[J].Nature,2018,555(7696):300-302.

- [4] Noguchi J, Nagaoka A, Watanabe S, et al. *In vivo* two-photon uncaging of glutamate revealing the structure-function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice[J]. *J Physiol*, 2011, 589(Pt 10):2447-2457.
- [5] Bishop D, Nikiél, Brinkoetter M, et al. Near-infrared branding efficiently correlates light and electron microscopy[J]. *Nat Methods*, 2011, 8(7):568-570.
- [6] 刘皎, 丛馨, 何其华. 活体小鼠微血管血流倒置双光子激光扫描显微镜检测方法的建立[J]. *解剖学报*, 2022, 53(02):261-265.
- [7] 屈军乐, 陈丹妮, 杨建军, 许改霞, 林子扬, 刘立新, 牛憨笨. 二次谐波成像及其在生物学中的应用[J]. *深圳大学学报*, 2006, (01):1-9.
- [8] 孙娅楠, 赵静, 李超华, 等. 二次谐波结合双光子荧光成像方法观察人源胶原蛋白透皮吸收情况[J]. *激光生物学报*, 2017, 26(1):24-29.
- [9] 刘雄波, 林丹樱, 吴茜茜, 严伟, 罗腾, 杨志刚, 屈军乐. 荧光寿命显微成像技术及应用的最新研究进展. *物理学报*, 2018, 67(17): 178701-1-178701-14
- [10] 罗淋淋, 牛敬敬, 莫蓓莘, 林丹樱, 刘琳. 荧光共振能量转移-荧光寿命显微成像(FRET-FLIM)技术在生命科学研究中的应用进展. *光谱学与光谱分析*, 2021, 41(4): 1023-1031
- [11] Isom-Batz G, Zimmem PE. Collagen injection for female urinary incontinence after urethral or periurethral surgery[J]. *J Urol*, 2009, 181(2):701-704.
- [12] Ju N, Jiang R, Mrcknik SL, et al. Long-term all-optical interrogation of cortical neurons in awake-behaving nonhuman primates[J]. *LOS Biology*, 2018, 16(8):e2005839.
- [13] Nimmerjahn A, Mukamel EA, Schnitzer MJ. Motor behavior activates Bergmann glial networks[J]. *Neuron*, 2009, 62(3):400-412. [23] Huang L, Lafaille JJ, Yang G. Learning-dependent dendritic spine plasticity is impaired in spontaneous autoimmune encephalomyelitis[J]. *Dev Neurobiol*, 2021, 81(5):736-745.
- [14] Huang L, Lafaille JJ, Yang G. Learning-dependent dendritic spine plasticity is impaired in spontaneous autoimmune encephalomyelitis[J]. *Dev Neurobiol*, 2021, 81(5):736-745.