

随机光学重构超高分辨显微镜的应用与管理

尹伟, 刘双双

(浙江大学医学院公共技术平台, 浙江 杭州 310058)

摘要: 随机光学重构超高分辨成像技术 (STORM) 是一种基于光控荧光分子和计算的方法, 通过调节激光强度而随机激发全部荧光中的一小部分, 并通过数学计算得到中心点位置。相比其他显微镜, STORM 的横向和轴向分辨率最高 (~20nm, ~50nm), 能提供更精细的单分子信息。介绍了超高分辨 STORM 显微镜的软硬件组成和技术参数, 样品制备方法, 超高分辨图像采集的常用操作流程, 日常维护和仪器管理, STORM 显微镜的应用等方面, 并进行展望。旨在为超高分辨 STORM 仪器的使用者与管理者提供参考, 使之更好地服务于教学与科研。

关键词 随机光学重构; 超高分辨; 应用与管理;

中图分类号: Q 3; 34 **文献标识码:** A

Application and Administration of Stochastic Optical Reconstruction Microscopy(STORM)

YIN Wei, LIU Shuang-shuang

Zhejiang university school of medicine, Zhejiang university, Hangzhou

Abstract : Stochastic Optical Reconstruction Microscopy(STORM) is a method based on light-controlled fluorescence molecules and calculation, which randomly activates a small part of all fluorescence by adjusting the laser intensity, and obtains the location of the center point through mathematical calculation. Compared with other microscopes, STORM has the highest lateral and axial resolution (~20nm, ~50nm), which can provide finer single-molecule information. The software and hardware components and technical parameters of the super resolution STORM microscope, sample preparation methods, common operation procedures for super resolution image acquisition, daily maintenance and instrument management, and the application of the STORM microscope are introduced and prospected. The aim is to provide reference for users and managers of super resolution STORM instruments so as to better serve teaching and scientific research.

Keywords: Stochastic Optical Reconstruction; super resolution; Application and Administration

1 引言

在生命科学领域,人们常常需要在细胞内精确定位特定的蛋白质以研究其位置与功能的关系。多年来,宽场/共聚焦荧光显微镜的分辨率受限于光的阿贝/瑞利极限,不能分辨出 200 nm 以下的结构,即所谓的衍射极限^[1]。近年来,新的荧光探针和成像理论不断涌现,研究者开发了多种实现超出普通共聚焦显微镜分辨率的超高分辨率成像方法。主要包括基于单分子定位成像的超分辨率显微成像方法:光激活定位显微技术(photoactivated localization microscopy, PALM)^[2]和随机光学重构显微技术(stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)^[3],还有两大类通过改造光源的点扩散函数和“结构光照明”来提高成像分辨率的方法,分别是受激发射损耗显微技术(stimulated emission depletion, STED)^[4]和结构照明显微技术(structure illumination microscopy, SIM)^[5]。

2006 年底,华裔科学家庄晓薇研究组开发出一种类似于 PALM 的方法,可用来研究细胞内源蛋白的超分辨率定位。他们发现应用特定波长的激光来激活探针,然后应用另一个波长激光来观察、精确定位以及漂白荧光分子,此过程循环上百次后就可以得到最后的内源蛋白的高分辨率影像,命名为随机光学重构显微技术(Stochastic optical Reconstruction Microscopy, STORM)^[6]。STORM 图像由一系列循环图像构成:在每个循环中,视野中只有很少的荧光分子发光,每个发光分子可以被分辨出来,发光位置的图像不重叠,这些荧光分子的位置可被精确定位,然后重复这些过程,每次随机让不同的荧光分子发光再确定其位置,然后将所有图像进行重构,分辨率可达 20 nm。由庄小威教授^[7]与尼康公司合作研发的 N-STORM 系统,正是基于此原理的超分辨显微镜系统。

浙江大学医学院公共技术平台于 2014 年引进一台随机光学重构超高分辨显微镜(Nikon N-STORM),具备随机光学重构超高分辨、激光扫描共聚焦、全内反射三大重要技术。仪器配置高,从三大主要研究方向满足了学院内外众多研究组在科学研究方面的需求。本文对其随机光学重构超高分辨部分软硬件组成、技术参数、样品制备方法、仪器操作使用、应用及维护做系统介绍。

2 随机光学重构超高分辨显微镜(Nikon N-STORM)的组成和技术参数

2.1 STORM、共聚焦成像用激光系统

配备激光耦合平台 LU4A Laser Module, 激光耦合器, 红色激光器(647 nm, 200 mw), 紫色激光器(405 nm, 100 mw), 多线氩离子激光器(Multi-Ar laser, 65 mw), 黄色固体激

光器 (561 nm, 150 mw)。

2.2 STORM 成像光学组件、相机

单模光纤, 3D-STORM 组件, 电缆, 高灵敏度电子倍增相机 (Andor ixon DU-897)。

2.3 工作站、超高分辨成像及分析软件包

惠普工作站, 共聚焦软件包 (NIS-Elements), 超高分辨率图像分析包 (NIS-A STORM Analysis)。

2.4 超高分辨专用成像物镜

100 倍超高分辨专用成像物镜: CFI Apochromat TIRF 100X, 数值孔径 NA=1.49, 工作距离 WD= 0.12 mm。

3 随机光学重构超高分辨显微镜 (N-STORM) 样品制备

3.1 nSTORM 特异荧光抗体标记制备方法

在随机光学重构超高分辨系统中, 主要有 nSTORM 和 cSTORM 两种成像方式, 最主要的不同在于染色使用的荧光二抗不同。其中 nSTORM 使用的抗体是自制标记有特定比率的活化染料和成像抗体分子, 具有波长特异性光学可控开关的性质。以 Rabbit-Cy3-Alexa647 抗体为例, 标记过程如下:

(1) 将商业化的 Cy3 染料 (PA23001, GE Healthcare) 溶于 20 μ l 的 DMSO 中并混匀, 分装为 10 管, 真空离心至只剩下染料粉末保存于-20 度。

(2) 将商业化的 Alexa647 染料 (A20006, invitrogen)溶于 100 μ l 的 DMSO 中并混匀, 均分为 50 管, 真空离心至只剩下染料粉末保存于-20 度。

(3) 取出 Cy3 染料和 Alexa647 染料各自一管, 使之溶于 10 μ l DMSO 中, 吹打混匀。

(4) 将 3 μ l Cy3+1 μ l Alexa647 溶液混入 50 μ l 无任何染料标记的抗体 (711-005-152)中, 充分吹打混匀, 放在微震荡器上慢速反应 30min, 且在此过程中用手轻微震荡摇晃, 以保证反应充分。

(5) 准备 NAP-5 凝胶柱: 取 50%乙醇封存的 NAP-5 凝胶柱, PBS 洗 3 次。

(6) 混合液定容: 混合液加 PBS 至 200 μ l (约加 140 μ l), 轻轻混匀。

(7) 过柱: 待柱中液体全部进柱后加入混合液, 待混合液全部进柱后 (可根据柱子不再滴液作为判断依据) 再加 550 μ l PBS, 可见到柱中混合液会分层, 待不滴液时再加 300 μ l PBS, 并以 1.5 ml EP 管收集此后滴出的抗体混合液。过柱时应呈现两条带, 分带清晰且颜色明显者为佳。两条带中, 下半部分颜色较浅, 即为结合了染料的二抗, 上半部分为未结合的染料;

如果同时做 A405-A647 和 Cy3-A647 这两对，可以以后者颜色为准，因为前者颜色很浅，不易看到两条带；能够看到两条带，说明抗体和染料的成功结合。

(8) 利用紫外分光光度计测量抗体和染料浓度。一般来说可获得 200-300 ug/ul 的抗体，总量约为 300ul 的抗体，其中 Cy3:Alexa647:antibody 的比例约为 2:0.6:1 最佳，在抗体标记的实验中差异性略大，经常需要用紫外分光光度计测量比例后，根据数值调整所加染料并再次进行标记。

3.2 STORM 样本免疫荧光染色

(1) 配制固定液等溶液：固定液（3%PFA+0.1%异戊醇）；Blocking buffer: 3%BSA+0.2% TritonX-100 in PBS；Washing buffer: 0.2%BSA+0.05% Triton X-100 in PBS，一抗及二抗均用 Blocking buffer 进行稀释。

(2) 将细胞均匀接种于玻璃底面的培养皿内，培养 1-2 天，此处以八孔板为例，其他容器可酌情增减溶液加入量。

(3) 去除皿内培养液，用 500 μ l PBS 洗一次；

(4) 加入 200 μ l 3% PFA + 0.1% 异戊醇固定细胞 10min；

(5) 吸掉固定液，加入 200 μ l 0.1%NaBH₄（需新鲜配制）孵育 7min，从这一步开始（除了第 12、14 步）都要在摇床慢速混匀；

(6) 用 500 μ l PBS 洗 3 次，每次 5 min；

(7) 加入 200 μ l Blocking buffer，孵育 20 min；

(8) 吸掉 Blocking buffer，加入 200 μ l 一抗，孵育 30 min 或者静置过夜；

(9) 吸掉一抗，用 200 μ l Washing buffer 洗 5 次，每次 15 min；

(10) 加入 150 μ l 荧光二抗孵育 30 min；

(11) 吸掉二抗，用 200 μ l Washing buffer 洗 3 次，每次 10 min；

(12) 用 200 μ l 3% PFA + 0.1% 异戊醇进行后固定 10 min；

(13) 吸掉固定液，用 500 μ l PBS 洗 3 次，每次 5min；

(14) 染色完成后，直接进行成像，或者 4°C 保存于 PBS 溶液内。

3.3 STORM 成像 Buffer 配制

在 STORM 成像之前，还需要配制成像 Buffer，以提供实验所需要的巯基^[8]，除氧剂，抗光漂白能力，调整缓冲液 PH 值到 7.5 左右为宜。溶液成分为：Buffer A: 10 mM Tris (pH8.0) + 50 Mm NaCl; Buffer B: 50 mM Tris-HCl (pH8.0) + 10 mM NaCl + 10% Glucose；Buffer C for live cell : DMEM + 75 mM HEPES + 1% Glucose；GLOX solution (25 μ l)，母液配制方法为：

(1) 用 Buffer A 配制 70mg/ml Glucose Oxidase 溶液，可配制一定量的储液，以 20 μ l 每管分装，-20 $^{\circ}$ C 冰箱冻存；

(2) 用 Buffer A 配制 17 mg/ml Catalase 溶液，可配制一定量储液，以 5 μ l 每管分装，-20 $^{\circ}$ C 冰箱冻存；

(3) 将 Glucose Oxidase 和 Catalase 溶液以 4: 1 的比例混合，用移液枪吹打均匀。

(4) 1 M MEA 配制：77 mg MEA 溶解到 1 ml 0.25N HCl 中，可在 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存一个月左右。

根据超高分辨样品不同，可选择不同的 buffer 配制方案，成像前将 Buffer 加入样本槽内，每个八孔板推荐加入 500-700 μ l 左右；溶液需新鲜配制，不可以配成储液冻存。三种配制方案如下：

(1) 方案一、STORM Imaging Buffer with MEA（拍摄持续时间 2 小时左右），在冰上将 7 μ l GLOX，70 μ l 1M MEA 和 620 μ l Buffer B 加入 1.5 ml EP 管内，移液枪吹打均匀；

(2) 方案二、STORM Imaging Buffer with 2-mercaptoethanol（拍摄持续时间 1 小时左右），在冰上将 7 μ l GLOX，7 μ l 2-mercaptoethanol 和 690 μ l Buffer B 加入 1.5 ml EP 管内，移液枪吹打均匀；

(3) 方案三、Live Cell STORM Imaging Buffer with 2-Mercaptoethanol（拍摄持续时间 1 小时左右），在冰上将 7 μ l GLOX，3.5 μ l 2-mercaptoethanol 和 690 μ l Buffer C 加入 1.5 ml EP 管内，移液枪吹打均匀；

4 随机光学重构超高分辨显微镜（N-STORM）操作流程

4.1 开机顺序

开机时遵循“先开硬件，再开软件”的原则，打开激光台，分别开启所需激光器（先打开激光器电源，再拧钥匙）。注意 647 nm 激光器需先打开硬件控制器开关和钥匙，再通过软件开启。依次开启显微镜 Ti-E 电源，电动载物台电源，piezo 控制器电源，汞灯电源，开启计算机与显示器，启动“NIS-Elements”软件，选择 ANDOR with N-STORM 模块进入系统。

根据自己实验设定和需求选择不同拍摄模式，STORM 分三种拍摄模式，如下图所示。

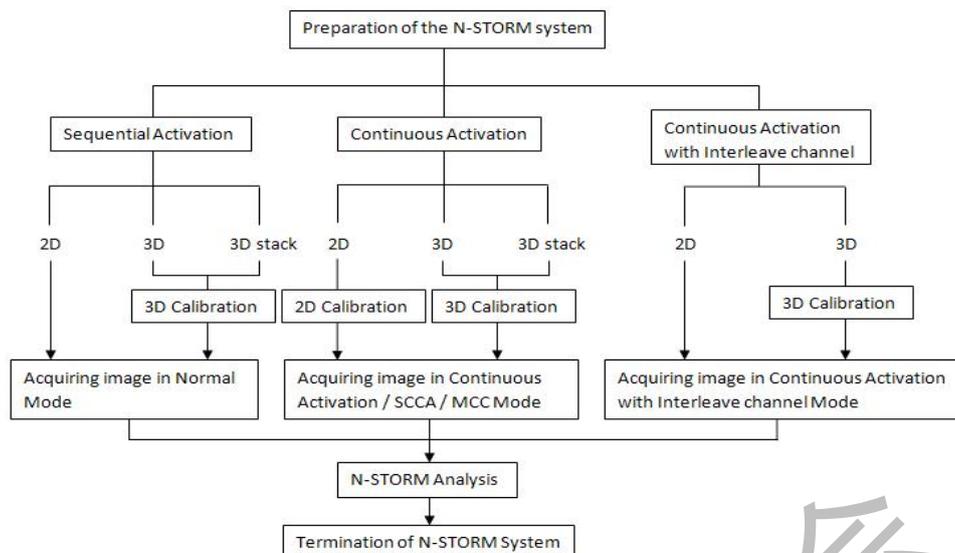


图 1 Storm 拍摄模式

Figure 1 Storm imaging mode

4.2 STORM 成像基本操作

4.2.1 拍摄前预览

设定 647 nm 激光约 0.5-1% 的功率并选中；点击 shutter 按钮以打开 647 nm 激光；Live 找到标本拍摄区域后，此时可以拍摄一张该画面的宽场图像以作为 STORM 图像的对比图。将光路切换到 EMCCD 端口，确认 3D-STORM lens 的位置。用 TIRF 照明方式观察标本并切换不同拍摄模式的滤光块后，点击 N-STORM 面板中【INTERLOCK】，打开激光锁，点击【Live】获取实时预览影像。

4.2.2 Sequential Activation 拍摄流程

STORM 拍摄主要有 2D-STORM 和 3D-STORM 两种模式。为实现 3D-STORM 超分辨率成像，一般在光路中加入柱状透镜（照相机平面和物镜间），引入非对称性来实现三维成像。和 2D-STORM 拍摄比，3D-STORM 操作较为复杂，以下对 3D-STORM 操作做介绍，为方便说明，举例用如下两染料对拍摄（通道 1: Alexa405-Alexa647 通道 2: Cy3-Alexa647）。

(1) 点击 N-STORM 面板中的 settings 按钮，确认拍摄模式为【Sequential Activation】和每次循环拍摄帧数等参数，点击【Edit】进入通道设置，【Activation Frame】通常为 1，【Reporter Frame】通常为 3，再确认好 Activator 和 Reporter 的激发波长及通道颜色，点击 OK 确认。

(2) 在【N-STORM】控制面板中选择【3D-STORM】，若拍摄 2D-STORM 图片，则选择 2D-STORM。

(3) TIRF 照明器的角度设定，选中 647 nm 激光器，打开【Ti Pad】调节 PFS 并找到焦面，

细微调节照明器角度，使脱焦点尽可能少，背景尽可能干净。

(4) 检查 activation laser，确保 reporter laser 647nm 已被选中，将功率升至 100%。

确保 activation laser (405nm 或者 561nm) 没有被选中，将功率设置为 0.3-1%。打开 shutter，选中 activation laser 约停留一秒，再取消选中 activation laser，重复此过程，检查实时图像有没有因为选中了 activation laser 而瞬时变得更亮，即闪烁的点数变多。当有多通道成像时，记得对每个通道分别进行此项操作。

(5) 让染料进入暗态。将 647nm 激光功率开到 100%，使画面里的荧光信号从全亮逐渐变为闪烁的单分子点状态。期间可以适当移动画面，将感兴趣区域附近的样本也进行激光照射，以减少周围过亮的信号会干扰感兴趣区域的成像。

(6) 设置 N-STORM 拍摄条件。

选中所用的荧光染料(此处为 Alexa405/Alexa647 and Cy3/Alexa647), Activation laser (此处为 405nm and 561nm) 功率设定，约 0.3-1% 根据实际情况而定，Imaging laser (此处为 647nm)，功率设定皆为 100%。【Period Count】通常设置为 5000-20000，可往大处设定，因为拍摄途中可以随时停止。【Path】【File Name】文件存储路径及文件名称的设定，【STORM Image】拍摄过程中实时预览显示 STORM 图像，通常勾上，【Graph】拍摄过程中实时显示图像里点的个数的图标，通常勾上。【Minimum Height】点数的一个显示值，通常设定 50-300，但可根据样本本身的背景点亮度自行设定。

(7) 点击【Run Now】。

(8) 计算玻片表面至观察目标位置之间的 z 轴距离，将 3D 助透镜推进去 (2D-STORM 中此步骤不需要进行)。当此窗口出现时，选择 647nm 成像波长，将焦面从标本面移动到玻片表面并聚焦。此过程可 X-Y 移动成像区域，聚焦好玻片表面后，点击【OK】，载物台 XY 方向将自动回到设定前的原始位置。Z 轴位置无法自动回位，需要提前记住焦面坐标，然后此时调回焦面 Z 轴位置。将焦面聚焦到标本面后点击【OK】。

(9) 实时图像采集过程中，可通过调节光强和 ND 片来控制每帧上的采集点数。通常点的密度应不浓密到重叠也不要太过稀疏，比如 256 x 256 像素的每帧图片上有分布均匀的 100-200 个点为最优。在调节好激发光功率得到不错的点数后，点击【N-STORM】面板里的【Auto LP】，可自动调节激发光光强以便保证获得对应的点数。当图片拍摄完成后，点击【x】可关闭预览和图表等窗口。

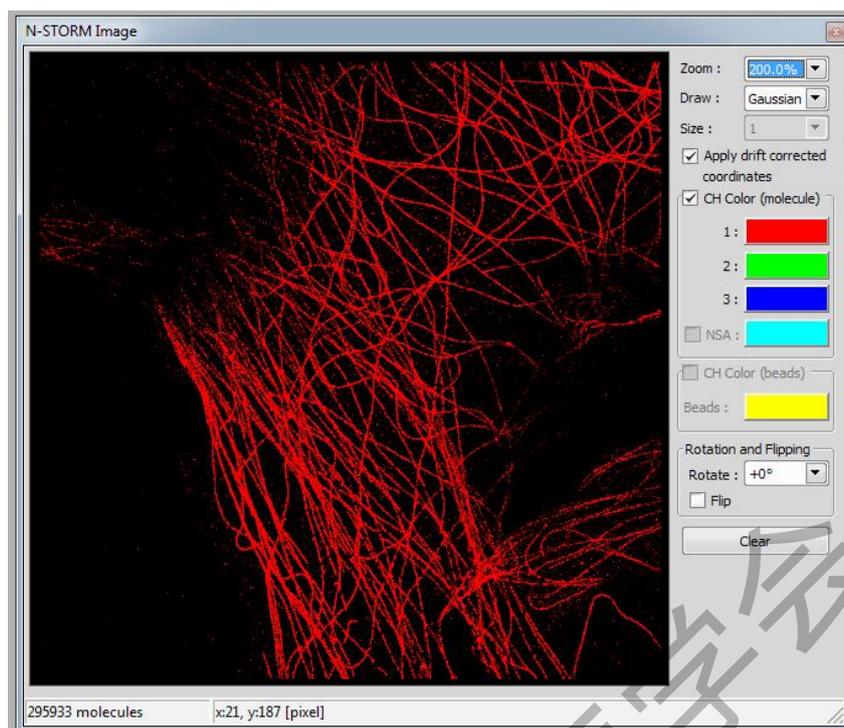


图2 Storm 实时图像采集

Figure 2 Storm real-time image acquisition

4.2.3 Continuous Activation 拍摄

点击 N-STORM 面板中的 settings 按钮，确认各参数，模式选择为【Continuous Activation】，在【Interleave Channels】前打勾，打开设置面板，选择细胞类型，固定细胞选【Fixed Cell】，活细胞选【Live Cell】，因为活细胞对速度要求很高，通常只做一个通道，多通道下难以捕捉连贯动作，其余步骤同 3.2.2。

4.2.4 STORM 图像分析处理

(1) 点击【Analysis GUI】，点击【File Open】，选择需要分析的 ND2 文件，点击 open。

(2) 点击小山峰图标检查被认为是信号的亮点的最低荧光值。选择被认定为信号的亮点中最暗的点，将鼠标移动到其中心，读取【Peak Height】的数值，此数值会在下一步中用来设定阈值以区分信号和噪点。当分析多通道图像时，每一个通道都需要做这一步。

(3) 点击筛选信号亮点，根据前一步中确定的信号亮度最小值指定 Minimum Height 这里的参数大小，设定好参数后，点击开始 STORM 分析。

(4) 勾选【Drift Correction】，设定【Periods】为 1，点击【Test】，试分析会针对当前显示的这一个 period 进行。试分析完成后，会弹出对话框，点击【OK】，对其检查以确保亮点信号都被正确的筛选。选择【Start】对整个图像数据进行分析。

(5) 当分析结束时弹出右边对话框，点击【OK】。有关信号亮点位置信息的两个文件 (.bin

和.txt) 会被存储到与 ND2 原始文件相同的地址文件夹里。

(6) 点击三维框可以展示 3D STORM 图像，并制作视频文件。

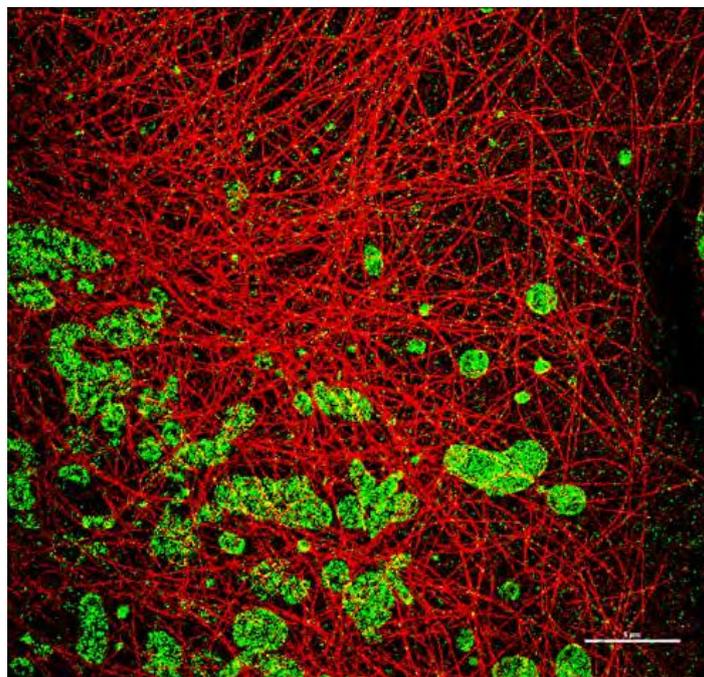


图3 重建好的 STORM 双色图像

Figure 3 The reconstructed STORM two-color image

4.2.5 STORM 日常关机步骤

关闭 NIS 软件，打开 Laser 647 软件，将 200mV 的激光功率逐渐降至 20mV(200→150→100→50→20)，再将“ON”状态打到“OFF”状态，退出软件，关闭 647 nm 激光器钥匙，关闭 647 nm 激光器电源。显微镜 Ti-E 电源，电动载物台电源，piezo 控制器电源这三个硬件处于常开状态，不需要关闭。用 100%无水乙醇擦拭物镜。关闭其余激光器，关闭激光台钥匙，关闭电脑。

5 随机光学重构超高分辨显微镜的日常维护和管理

严格遵守仪器的开、关流程。无独立操作资格者在未获得仪器管理员允许下严禁自行操作仪器。使用油镜，需用擦镜纸蘸取 100%无水乙醇擦拭物镜。汞灯开关间隔时间至少 30 分钟。使用预约网站、FTP、光盘刻录，严禁使用 U 盘、移动硬盘。经常擦拭仪器，注意防尘，对于物镜、目镜等易污染的光学部件应经常用酒精擦拭，物镜分类放到防潮柜中保管。实验室内要安装空调、除湿机、防潮柜，环境温度始终保持在 22°C 左右，温度太高相机会报警。湿度 40%-60%，防潮柜温度设置在 22°C 为宜。

6 随机光学重构超高分辨显微镜的应用及展望

随着生命科学、材料、光学各交叉学科的不断发展,随机光学重构超高分辨显微镜得到广泛应用。孙育杰课题组一直在进行 STORM 单分子成像技术的研究^[9-10],分辨率均可达到 20 nm,比传统光学显微镜分辨率提高 10 倍。Haynes^[11]等使用 Alexa Fluor 488 激活的羧酸酯对革兰氏阴性细菌表面外膜蛋白标记,得到了 30~40 nm 的定位精度。韩峰^[12]课题组利用 STORM 显微镜方法观察了 GPR124 在人脑血管周细胞中的表达和精确分布,唐睿康^[13]课题组利用 3D-STORM 来测定矿化的胶原,通过 z-stepping 不同层面展示及高分辨率三维渲染,得到了矿化胶原纤维的三维超高图片。

随机光学重构超高分辨显微镜具有宽视场成像,分辨率高,可实现多色成像等优点,但同时也存在如下缺点:如不适用于活细胞、组织等厚样品、对样品制备要求高,需特殊染料^[14-15],成像速度慢,需反复成像进行叠加,以时间换空间,时间分辨率相对较低,通道间串色等。随着超高分辨显微镜新原理和新标记方法、多种技术关联使用的不断涌现,基于不同原理的各种显微镜仍有各自的局限性,如何突破这些局限,进一步提高时空分辨率依然是亟待解决的难题。该类设备非常昂贵,掌握其常规使用方法,懂得日常维护事项显得尤为重要。浙江大学医学院公共技术平台的随机光学重构超高分辨显微镜系统实行开放共享,共享效果较好^[16-20],为多个国家级、省部级项目提供有力支撑。

参考文献:

- [1] Patterson G, Davidson M, Manley S, et al. Super resolution imaging using single-molecule localization[J].Annual review of physical chemistry.2010,61:345-67.
- [2] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J].Science. 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [3] Gustafsson M G. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy [J].Journal of Microscopy, 2000, 198(2): 82-87.
- [4] Bates M, Huang B, Rust M J, et al. Sub-diffraction -limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy(STORM)[J].Nature Methods, 2006, 3(10): 793-796.
- [5] Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy[J].Journal of microscopy, 2000, 198: 82-87.
- [6] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy(STORM) [J]. Nat Methods, 2006, 3: 793-795.
- [7] Huang B, Wang W, Bates M, Zhuang X. Three-dimensional Super-resolution Imaging by

- Stochastic Optical Reconstruction Microscopy[J].*Science*,2008, 319(5864):810-813.
- [8] Dempsey GT,Vaughan JC,Chen KH,et al. Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging[J].*Nature Methods*,2011,8(12): 1027-36.
- [9] Zong W, Zhao J, Chen X, et al. Large-field high-resolution two photon digital scanned light-sheet microscopy[J]. *Cell Research*,2014,25:254-257.
- [10] Liu Z, Xing D, Su Q P, et al. Super-resolution imaging and tracking of protein-protein interactions in sub-diffraction cellular space[J].*Nature Communications*, 2014, 5:4443.
- [11] GUNSOLUS I L, HU D, MIHAI C, et al. Facile method to stain the bacterial cell surface for super-resolution fluorescence microscopy[J].*Analyst*, 2014, 139(12):3174-3178.
- [12] Dan-Yang Chen, Ning-He Sun, Ya-Ping Lu,et al. GPR124 facilitates pericyte polarization and migration by regulating the formation of filopodia during ischemic injury[J].*Theranostics* ,2019; 9(20): 5937-5955.
- [13] C Shao, R Zhao, S Jiang, et al. Citrate Improves Collagen Mineralization via Interface Wetting: A Physicochemical Understanding of Biomineralization Control[J]. *Advanced Materials* , 2018, 30(8):201704876.
- [14] Allen J R,Ross S T, Davidson MW. Sample preparation for single molecule localization microscopy[J]. *Phys Chem Chem Phys*. 2013,15(43):18771-18783.
- [15] Whelan D R,Bell T D. Image artifacts in Single Molecule Localization Microscopy: why optimization of sample preparation protocols matters[J]. *Scientific Reports*,2015,5:7924.
- [16] Yao S,Xu Y,Shao C,et al. A Biomimetic Model for Mineralization of Type-I Collagen Fibrils[J].*Methods Mol Biol*.2019;1944:39-54.
- [17] WQ Xia,Y Liang, Y Chi, Intracellular trafficking of begomoviruses in the midgut cells of their insect vector[J]. *Plos Pathogens*, 2018, 14(1):e1006866.
- [18] Bin Zhang, Yong-lan Du, Wen Lu,et al. Increased Activity of Src Homology 2 Domain Containing Phosphotyrosine Phosphatase 2 (Shp2) Regulates Activity-dependent AMPA Receptor Trafficking[J].*Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(36):18856.
- [19] N Zhou, G Xing, J Zhou, et al. In Vitro Coinfection and Replication of Classical Swine Fever Virus and Porcine Circovirus Type 2 in PK15 Cells[J].*Plos One*,2015, 10(10):e0139457.
- [20] Xiao-min Zhang, Xun-yi Yan, Bin Zhang, et al. Activity-induced synaptic delivery of the GluN2A-containing NMDA receptor is dependent on endoplasmic reticulum

chaperone Bip and involved in fear memory[J]. Cell Research, 2015, 25:818-836.

中国仪器仪表表学会