

科研论文中显微图像的获取和处理

吴航军¹, 戎叶², 肖桂凤¹, 韩琴¹, 林赵肖楠¹

(1. 浙江大学医学院, 浙江 杭州 310058;

2. 杭州师范大学基础医学院, 浙江 杭州 311121)

摘要: 显微成像是科学研究中重要且直观的方法, 插图是科研论文的重要组成部分, 对于成像技术的初学者而言, 在显微图像获取和处理过程中容易面临各种问题及误区, 该文围绕显微图像的获取和处理过程, 详细阐述了样本制备、显微镜选择和图像处理与分析的各个步骤及其注意事项, 为成像技术的初学者提供重要的参考依据, 以便能合理利用显微成像技术获得可靠的实验数据, 科学地展示论文插图。

关键词: 显微成像; 科研论文; 图像处理; 学术不端行为

中图分类号: Q31 **文献标识码:**

How to present your microscopic images in a scientific paper

WU Hangjun¹, RONG Ye², XIAO Guifeng¹, HAN Qin¹, LIN Zhaoxianan¹

(1. Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China;

2. Hangzhou Normal University School of Basic Medical Sciences, Hangzhou 311121, China)

Abstract: Microscopic imaging is essential and direct method for scientific research, and figures are important compartment of a scientific paper. For the beginners of microscopy, they can easily face some common problems and pitfalls. Focusing on acquisition and processing of microscopic images, this article provides a useful guide including sample preparation, microscope selection and image processing and analysis for the beginners, so that they can take good advantages of microscopy to obtain the reliable data and present scientific figures.

Key words: microscopic imaging; scientific paper; image processing; scientific misconduct

1 引言

科学 (science) 是发现事物的真相, 揭示事物的本质^[1], 研究 (research) 是发现事物

真相的过程，方法（method）或技术（technique）是发现事物真相的手段。研究人员利用合适的方法和技术探究事物，获取必要的证据（evidence），通过发表科研论文的方式向公众揭示事物的本质，这就是一种典型的探索科学的过程。科研图像是展示科研证据最直观的表现方式之一，俗话说“眼见为实”，“百闻不如一见”，英语中也有类似的俗语：“Seeing is believing”，“A picture worth a thousand words”。然而，科研论文中的图像并非普通的图像，需要通过恰当且严谨的方法获取和处理分析。

显微成像是现代科学研究中被广泛应用的一类图像获取方式，早在 16 世纪末，世界上第一台显微镜问世，经过四百多年的发展，现已衍生出各种类型的显微镜，如激光共聚焦显微镜、双光子显微镜、超高分辨率显微镜、电子显微镜等，显微镜已成为研究探索微观世界必不可少的工具。19 世纪末，神经生物学家卡哈尔（Santiago Ramón y Cajal）利用普通的单筒光学显微镜，描绘了神经系统的各类细胞，为现代神经生物学的发展做出了重要的贡献，并因此获得了 1906 年诺贝尔生理学或医学奖^[2]。1962 年，日本科学家下村脩（Osamu Shimomura）在水母中发现了绿色荧光蛋白（GFP），而后华裔科学家钱永健（Roger Y. Tsien）、美国科学家马丁·查尔菲（Martin Chalfie）对荧光蛋白的发光波长和强度做了广泛的拓展，使得荧光蛋白对固定或活细胞状态下的细胞骨架结构、细胞器、细胞膜等结构进行分别标记和观察，并使在同一细胞中探究不同蛋白功能或相互作用成为可能，这极大提升了显微成像技术的应用范围。2008 年，下村脩、钱永健和马丁·查尔菲共同获得了诺贝尔化学奖^[3,4]。

显微图像获取和处理典型的流程为：细胞培养（cultivation）→固定（fixation）→透膜（permeabilization）→封闭（blocking）→一抗标记（first antibody incubation）→二抗标记（secondary antibody incubation）→封片（mounting）→成像（imaging）→图像处理（processing）^[5]，如图 1 所示。本文将围绕这一流程阐述各个步骤及注意事项。

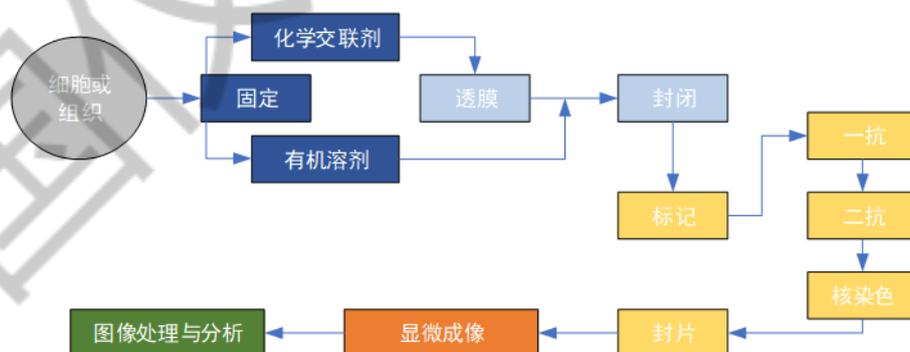


图 1 图像获取和处理基本流程

2 样本制备

样本制备是显微图像获取的第一步，也是最重要的一步，样本制备水平的高低直接决定了成像质量的好坏。免疫荧光标记（immunofluorescence, IF）是常用的样本制备方法之一，是对细胞结构和细胞内动态过程实现可视化的有力手段，经免疫荧光标记后的细胞结构可以通过不同的显微技术获得图像。免疫荧光标记主要包括：固定、透膜、标记（一抗和二抗标记）和封片四个步骤。固定和透膜是样本制备过程中的关键步骤，将决定样本制备的成败。

众多实验室会有一套标准化的实验方案来标记所有目的结构，无论细胞膜、细胞骨架、细胞核蛋白或者细胞质蛋白等。但这是一个误区，不同结构、不同抗体的标记方案并不相同，特别是固定和透膜两个步骤，会影响细胞形态、蛋白质定位和目标抗原。不同的试剂、作用时间和固定时间可能会得到不同的结果，因此需要针对具体实验目标进行优化。

2.1 固定

固定可以尽可能将细胞结构或组织结构保持原始构象，以便进行标记。不同类型的固定剂因作用位点的不同，影响一抗的结合，有时候抗原位点在固定过程中会被封闭或者受损，进而影响免疫荧光标记的结果，使固定的效果不尽相同。对于新的目标结构或者抗体，需要对固定的条件进行优化，有些抗体使用手册中也会给出推荐的固定方法^[5-7]。通常固定试剂分为化学交联剂（chemical crosslinkers）和有机溶剂（organic solvents）两类。详见表 1 所示。

化学交联剂通过游离氨基形成交联蛋白，如甲醛/多聚甲醛（formaldehyde / paraformaldehyde, PFA）和戊二醛（glutaraldehyde），能使细胞保持良好的形态，但抗原也可能被交联，影响抗体标记效果。另外，戊二醛会导致较强的自发荧光，主要用于电镜样本的固定^[5, 8]，当然，固定引起的自发荧光可以通过 BH_4 或 NH_3Cl 还原醛基来消除^[6]。对于大多数细胞和抗体而言，4% PFA（室温 10 min）可以作为优化的起始方案。需要注意的是，由于 PFA 较难溶解，配制过程较为关键，可尝试 James Bear 实验室推荐的配方，用 Krebs Buffer 代替 PBS 进行配制^[9]。在标记多种结构或不稳定的结构时，如同时标记粘着斑（focal adhesion）、次级内体（late endosome）和肌动蛋白丝（actin filament），可尝向培养液中缓慢滴加 PFA 进行温和固定，此法可有效固定这三种结构^[10]。

有机溶剂会使蛋白质沉淀，产生类似交联的效果，能维持较好的细胞骨架结构，但该

过程会导致可溶性组分和脂质组分的损失，细胞中的荧光蛋白会被破坏。此外，有机溶剂在固定过程中同时具有透膜作用。常用的有机溶剂有甲醇和丙酮，由于甲醇对抗原破坏较大，而丙酮破坏性小，因此，也可用甲醇和丙酮组合作为固定剂。需要注意的是，用鬼笔环肽（phalloidin）标记微丝（actin）时，不能用甲醇固定；标记微管（microtubules）时不推荐用 PFA 固定。

表 1 不同固定方法的比较

固定剂类别	固定剂	固定效应	优点	缺点	推荐起始条件
化学交联剂	甲醛/多聚甲醛	通过氨基形成交联蛋白	细胞形态好；	抗原易被交联。	4% PFA 10 min
	戊二醛		利于荧光蛋白。		
有机溶剂	甲醇	沉淀蛋白质	细胞形态好；	抗原易被交联；	常温
			利于荧光蛋白。	较强自发荧光	
	丙酮	细胞结构好；	部分抗原受损大；	不适合荧光蛋白；	甲醇 10 min
		速度快；	可溶性和脂质组分损失。		
丙酮		抗原破坏少；	不适合荧光蛋白；	-20°C	
		渗透性好；	可溶性和脂质组分损失。		
			速度快；	失。	
			有透膜效果。		

2.2 透膜

细胞是一个相对封闭的结构，标记膜内蛋白时需要通过透膜处理，让抗体进入细胞内与相应抗原结合。通常透膜剂分为去垢剂（detergents）和有机溶剂（organic solvents）两类。详见表 2。

甲醇和丙酮等有机溶剂同时具有固定和透膜作用，无需额外透膜。传统的去垢剂有 Triton X-100 和 NP-40，此外，Saponin、Digitonin、Tween 20 等也是常用的去垢剂。不同的试剂、作用浓度和透膜时间会产生不同的效果，因此，需要对透膜方案进行优化，以维持细

胞形态和结构的完整^[8]。0.1% Triton X-100（室温 10 min）可以作为优化起始方案。Saponin 是一种相对比较温和的透膜剂，会选择性地去除细胞膜上的胆固醇，形成的小孔足以让抗体进入细胞，而不破坏细胞膜，特别是对于一些囊泡的标记，Saponin 相比 Triton X-100 在维持囊泡结构稳定上具有更好的效果^[11]。

需要注意的是，Triton X-100 会破坏细胞膜，不适用于研究膜相关抗原，甲醛固定后用 Triton X-100 透膜会导致细胞质密度降低，细胞器明显减少。研究细胞膜蛋白时，如果抗体识别的是抗原的胞外段，则无需透膜。核酸标记物如 DAPI 或 Hoechst 本身具有透膜性，无需透膜^[5]。

表 2 不同透膜方法的比较

透膜剂类别	透膜剂	特点	推荐起始条件
去垢剂	Triton,	应用广, 适用核抗原	0.1% Triton 10 min 室温
	NP-40	不适用膜相关抗原	
	Saponin,		0.2% Saponin
	Tween 20,	作用温和, 适用膜蛋白	10 min 室温
有机溶剂	Digitonin		室温 甲醇
	甲醇	较好的细胞结构	10 min
	丙酮		-20°C

2.3 封闭和标记

封闭是指在抗体标记前对一些非特异位点进行阻断的过程。有效的封闭可以提高抗体标记效率。通常用牛血清白蛋白（bovine serum albumin, BSA）、脱脂奶粉或血清等作为封闭试剂，1% BSA（室温 60 min）是一个常用方案。需要注意的是，封闭试剂的种属来源应不同于一抗和二抗的种属^[5, 12]。

封闭完成后，就可以依次进行一抗和二抗的标记，标记浓度、孵育时间和温度通常可以参考抗体手册。常用的方案是用封闭液稀释一抗（4°C孵育过夜），洗脱（PBS 洗三次，每次

10 min), 用封闭液稀释二抗 (室温孵育 1 h), 洗脱 (PBS 洗三次, 每次 10 min)。需要注意的是, 一抗和二抗需对应其种属来源。至此, 样本的免疫荧光标记已完成。

2.4 封片

样本完成标记后, 应根据不同的需求进行封片, 以便进行后续的显微成像。商业化的封片剂通常可以防止荧光淬灭, 利于长时间保存样本, 也可以维持样本的折射率稳定, 有利于在油镜下获得高质量的图像。常见封片剂有 SlowFade、ProLong Gold、ProLong Diamond、Qmount Qdot 等, 需要注意的是, 不同的封片剂针对的荧光染料不一样, 应仔细阅读实验手册加以区分。此外, 如 ProLong Gold 需要 2-7 天的固化后才能达到稳定的折射率。封片后可以用透明的指甲油对玻片边缘进行密封, 在 -20°C 长期保存。对于不需要长期保存的样本, 可以用 90% 甘油封片后成像。

3 图像采集

3.1 显微镜的选择

样本制备完成后, 根据实验需求选用合适的显微镜进行成像。由于传统的宽场荧光显微镜在成像分辨率、成像深度、成像速度和成像尺度等方面存在局限性, 因此, 更高的成像需求要通过不同的成像技术来实现, 图 2 展示了不同的生物样品的尺度及显微镜的选择。

(1) **更清晰:** 激光共聚焦扫描显微镜 (laser confocal scanning microscope) 是在传统宽场荧光显微镜基础上发展起来的, 现为最广泛使用的成像技术之一, 利用针孔 (pinhole) 排除非焦平面的信号, 从而在 Z 轴方向上实现光学切片和较高的分辨率。通常共聚焦可以实现: 分辨率 XY 轴 200 nm / Z 轴 500 nm、深度 100 μm 、速度 1 f/sec。由于衍射极限的限制, 光学成像的分辨率难以突破 200 nm。全内反射成像技术利用全反射形成的消逝波 (evanescent wave) 成像, 将 Z 轴的分辨率提高至 100 nm^[13]。超高分辨技术利用不同的方式, 突破了衍射极限, 实现了最高 20 nm 分辨率的成像^[14]。更高分辨率则需要通过电镜或者冷冻电镜技术来实现, 最高分辨率接近 0.1 nm^[15]。

(2) **更深:** 双光子显微镜 (two-photon microscope) 利用长波长的红光或近红外光激发^[16], 较共聚焦的短波长具有更强的组织穿透能力, 且只激发焦平面上的荧光分子, 从而减少了光漂白、降低了细胞的光毒性和自发荧光信号。因此双光子显微镜比普通荧光显微镜更适合用来长时间观察厚样本、活细胞或活体样本^[17-19], 通常双光子显微镜成像的最大深度可达 1000 μm 。此外, 双光子显微镜还可以检测二次谐波信号, 无需外源标记, 可用于胶原纤维结构、肿瘤、电生理等领域的研究^[20-22]。利用双光子显微镜, 可以实现对样本的多色、长

时程、多时间点的观察。双光子显微成像技术已成为研究活体动物生物过程的首选方法^[16]，为细胞生物学、免疫学、肿瘤生物学、神经生物学和药理学等领域提供定量和动态的研究手段^[23, 24]。

(3) 更快和更大：共聚焦和双光子的点扫描方式限制了成像速度，难以满足如捕捉钙信号等细胞内快速变化的成像需求，因此，转盘式共聚焦显微镜（spinning disk confocal microscope）利用多个针孔及 EM-CCD 成像，可以实现接近 10 msec/frame 的高速成像^[25]。此外，小鼠全脑等更大尺度样本的成像需要更快的速度以及更大的成像范围来实现，光片显微镜（lightsheet microscope）利用光片照明方式及 sCMOS 实现快速、大尺度成像，经过透明化处理后的样本，可以实现 10 mm 级别的大尺度成像^[26]。

当然，没有一种成像技术是完美的，有时候需要联合多种技术来解决科研问题，如光电关联技术（correlative light and electron microscopy），是一种结合光学显微镜和电子显微镜的技术体系，光学显微成像和电子显微成像这两项技术在成像特点、分辨率及应用范围上有很程度的互补。通过技术的结合弥补各自技术存在的缺陷、突破单一技术的限制，获得更多的样本信息^[27]。因此，在同一样本的分析中结合两种或多种成像技术的模式使用越来越普遍。

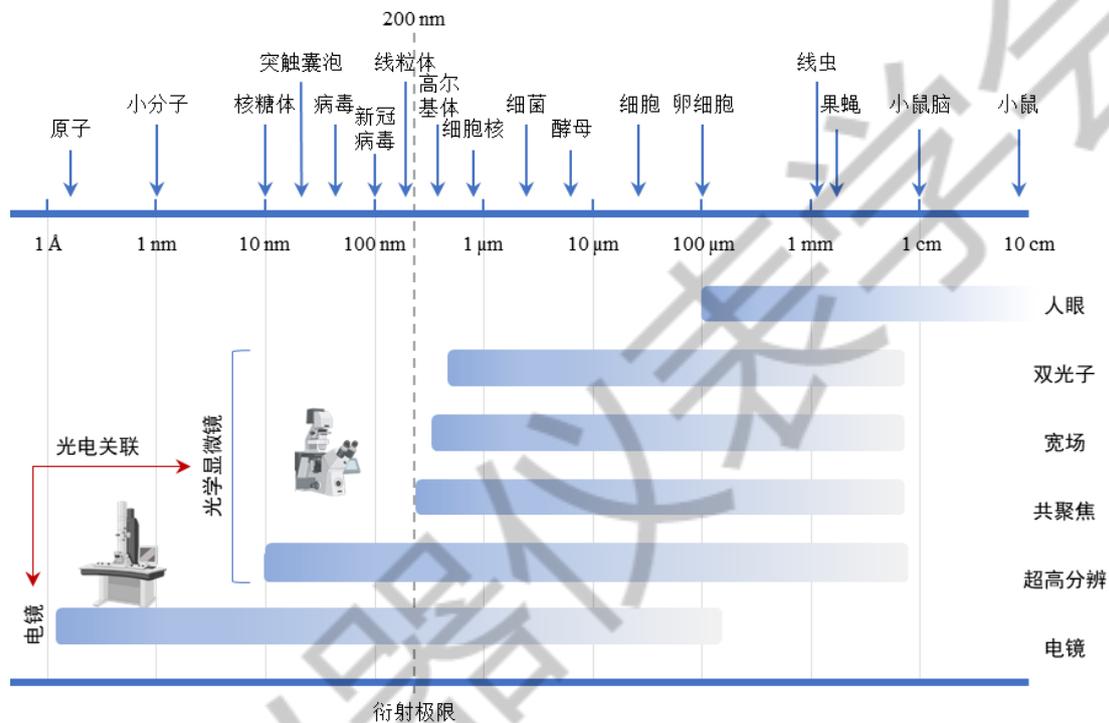
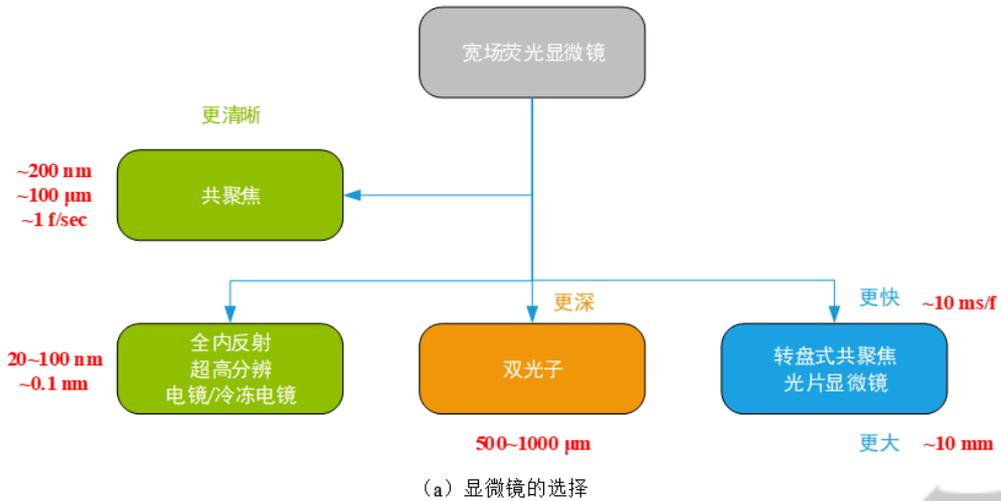


图 2 不同的生物样品的尺度及显微镜的选择

3.2 重要参数及设置

在确定成像所需的显微镜后，仍需了解一些特定的光学特性，调整显微镜参数，优化成像条件，以获取最佳质量的图像，尤其是以下几方面：

(1) 放大倍数和数值孔径

物镜是显微镜最关键的部件之一，其性能决定了分辨率和图像质量。很多初学者在选择物镜时仅关注放大倍数，然而，物镜的数值孔径 (numerical aperture, NA) 是显微镜分辨率

的重要决定因素之一，光学分辨率可以简化为 $d=0.61\cdot\lambda/NA$ （其中 d 为分辨率， λ 为激发光波长， NA 为数值孔径）^[28]。例如 $60\times 1.4 NA$ 的物镜和 $60\times 0.75 NA$ 的物镜放大倍数相同，但前者拥有更好的解析能力，能获得更强的信号。此外，成像分辨率还会影响共定位分析，例如对于两个间距 500 nm 的荧光点 A 和 B，分别用 $10\times 0.25 NA$ 和 $100\times 1.45 NA$ 两个物镜成像，得到的结论将完全相反，根据上述光学分辨率公式计算， $10\times 0.25 NA$ 物镜的分辨率约为 1000 nm ，无法区分 A、B 两点，结论是 A 和 B 共定位；而 $100\times 1.45 NA$ 物镜的分辨率约为 200 nm ，可以分辨，结论是 A 和 B 不共定位。因此，在做共定位分析实验时，应尽可能选择数值孔径大的物镜。

（2）色差

由于同一种介质对不同波长光的折射率不同，不同波长的光经过光学透镜后会聚焦在不同的焦点，形成色差。物镜厂商通过镀膜在一定程度上抵消了色差，按色差消除的效果分为复消色差、半消色差和消色差物镜。需要注意的是，色差校准只在一定波长范围内有效，大多数物镜在绿色到红色范围内色差校准的效果较好^[29]。高质量的成像，特别是共定位分析时，应选择复消色差物镜，选择绿色到红色范围内且两者波长靠近的荧光染料。

（3）荧光染料的选择

多色成像时需要考虑不同荧光染料间的干扰，特别是共定位分析时，要避免不同通道间因激发光谱或发射光谱的重叠而引起的串色（cross-talk）等问题。荧光染料的选择，需要了解染料的应用范围和光学特性，可以参考文献、厂商的手册，如 ThermoFisher 的《The Molecular Probes Handbook》^[30]。此外，可以利用 ThermoFisher 提供的荧光光谱查看器（SpectraViewer）^[31]，来模拟染料应用和成像条件的实施过程，帮助实验者确定相应的染料以及成像时的参数设置。

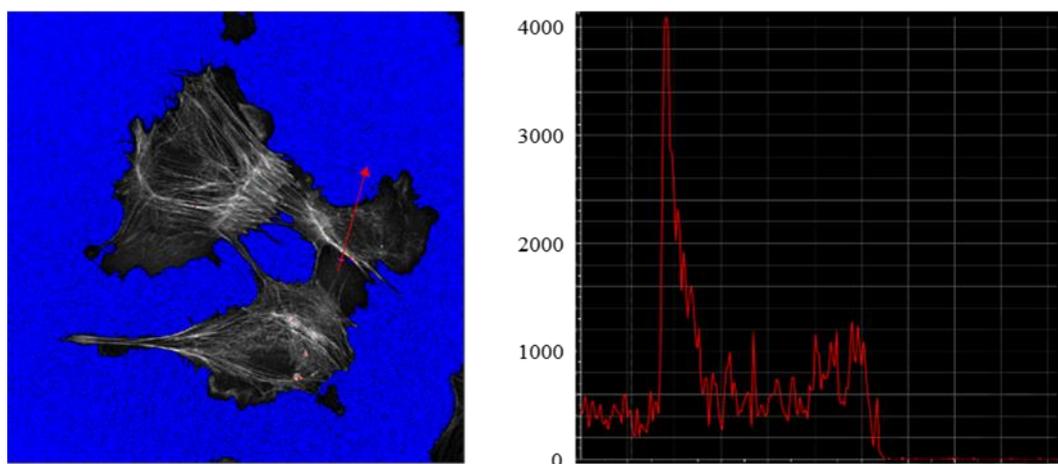
（4）图像获取

合适的采集参数对于获取高质量的图像至关重要。通过显微镜采集的图像要体现样本真实的特征，对照组与实验组要保持一致的采集参数。优质的图片不能曝光过度、不能太暗、并且信噪比（SNR）高。

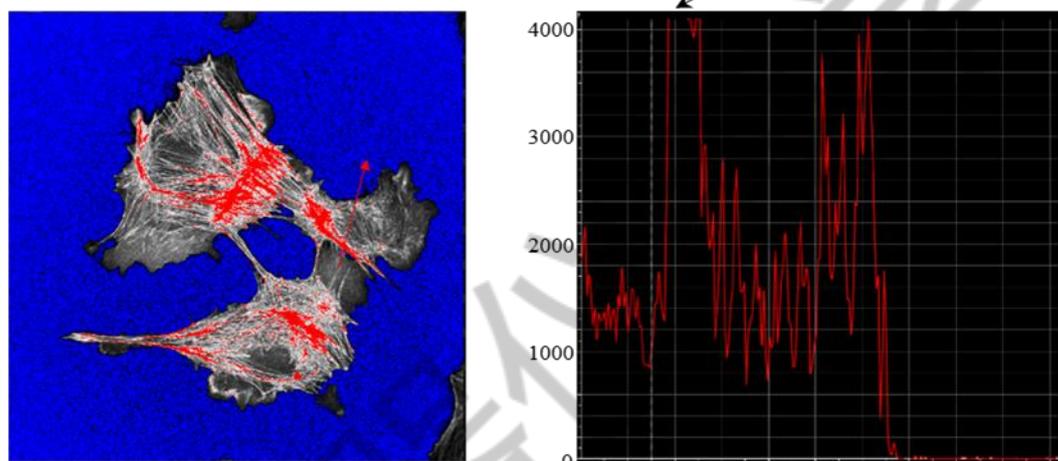
1) 降低噪声：图像的噪声主要来自热噪声和随机噪声，降低扫描速度或做平均扫描均可降低噪声，提高信噪比，如果需要做活细胞等对扫描速度有要求的实验，则需要兼顾噪声和成像速度。

2) 图像动态范围设置：一般显微图像的灰度格式为 8 位、12 位或 16 位，分别对应 2^8 、 2^{12} 和 2^{16} 的动态范围，需要量化分析的图片推荐使用 12 位或 16 位格式。可以利用成像软件

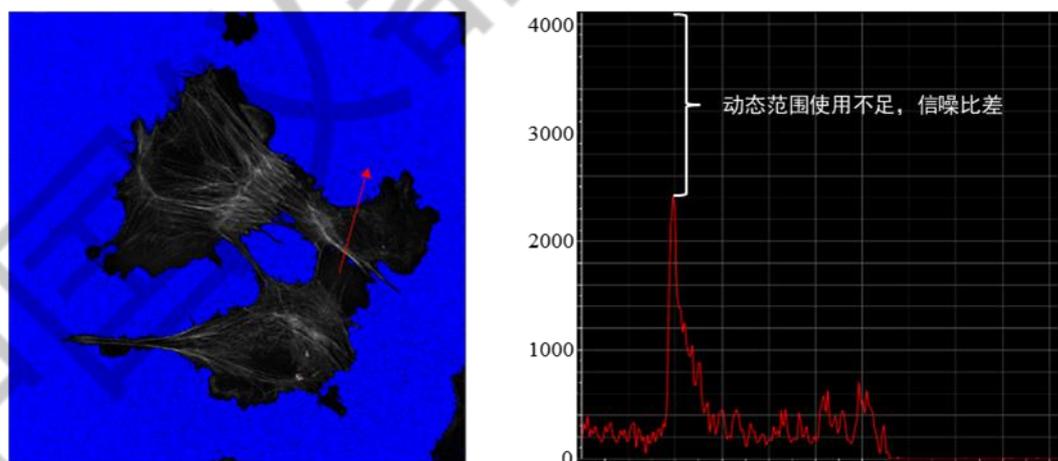
中 Profile 功能进行查看，如图 3 红色箭头所示，在感兴趣区域画一条线，测量线上的灰度值。最佳的成像应充分利用图像的动态范围，基本达到饱和，若参数设置过高，将会有部分信号丢失，反之，则会影响图像的信噪比，如图 3 所示。



(a) 合适的动态范围



(b) 超出动态范围



(c) 动态范围使用不足

图 3 成像过程中图像的动态范围

3) **激光强度及检测器设置:** 在调整图像信号强度时, 最主要的两个参数是激光强度和检测器的电压, 激光器的强度决定了激发光的强度, 荧光染料被激发后, 通常由检测器 (光电倍增管, PMT) 检测, 检测器的电压决定了其灵敏度。较高的激光强度会引起光漂白和光毒性, 过高的检测器电压会引入较高的背景噪声。一般情况下, 应尽可能降低激光强度、适当提高检测器电压, 同样可以获得高质量的图像。图 4 案例中将激光强度从 4%降低到 2%, 同时将检测器电压从 70V 提高到 100V, 两者的成像效果相近, 但后者更有利于样本的保护。

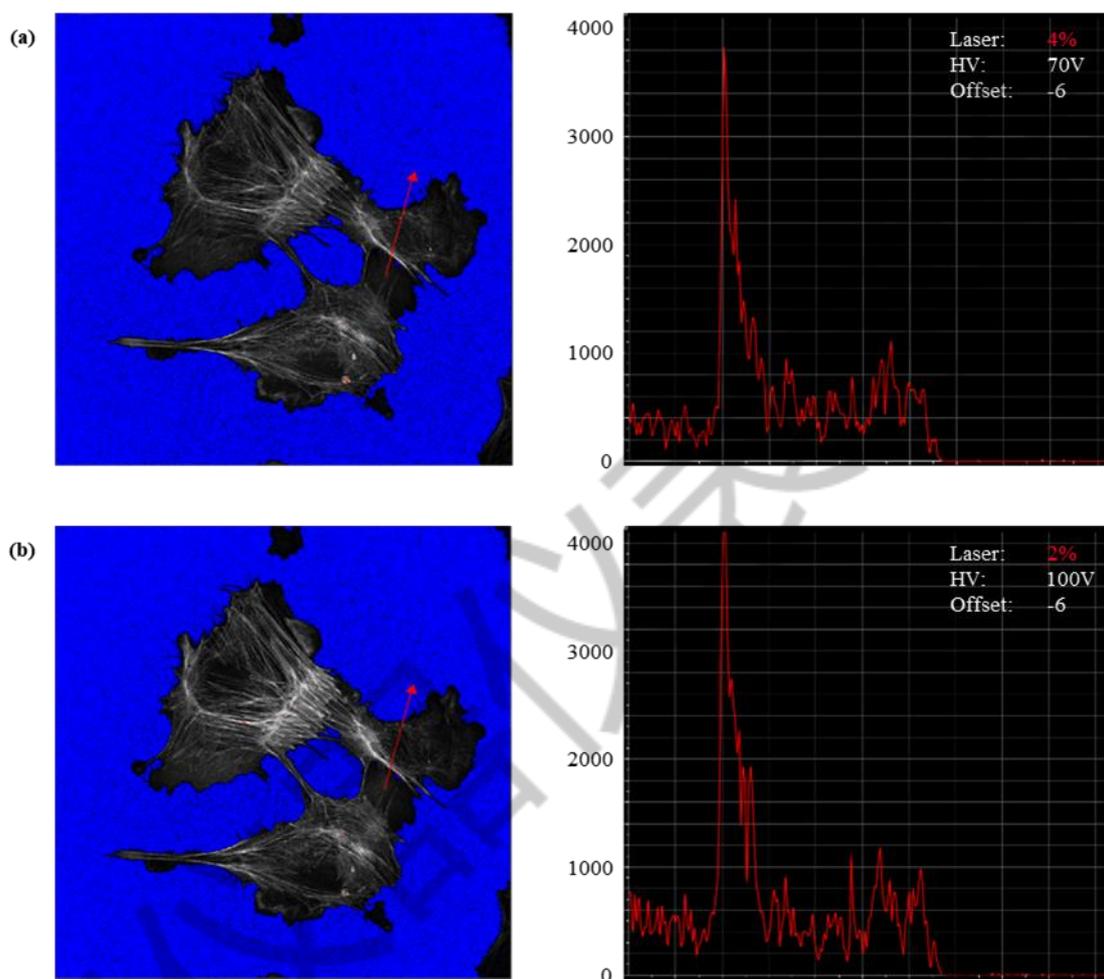


图 4 成像过程中激光强度和检测器电压设置比较

4) **图像分辨率和光学切片厚度:** 根据奈奎斯特-香浓 (Nyquist-Shannon) 采样定理, 采样间隔小于样本最小需要分辨距离的二分之一时, 能采集到完整的信息^[32]。图像分辨率的参数涉及物镜、扫描尺寸 (scan size) 和缩放 (zoom) 等, 通过设置, 需要实现的像素尺寸 (pixel size) 小于分辨率的 1/2 才能满足采样定理, 一般而言, 扫描尺寸 1024*1024 可以满足大部分期刊对图像分辨率 300 dpi 的发表要求^[33]。在图像采集时可利用缩放 (zoom) 功能

来调整像素尺寸，但由于系统分辨率有限，放大超过一定倍数会导致无效放大，无法获得更多的信息，反而会导致更长的采集时间，从而对样本造成更大的光损伤^[29]。一般推荐像素尺寸为分辨率的 1/2.5~1/3，做 Z 轴扫描时，光学切片的间距通常为 Z 轴分辨率的 1/2^[34]。

3.3 图像处理与分析

获得原始图像 (raw image) 后，需要对其进行处理和分析，主要分两个步骤：一是转化成支撑研究结论的数据 (data)，二是编辑成满足发表要求的插图 (figure)，这两个步骤都需要借助专业的图像软件。图像处理和分析的原则是客观的展现实验的真实情况，避免不恰当的修饰，严禁弄虚作假。

(1) **图像处理与分析 (从图像到数据)**：根据图像的维度可以分为二维和多维，二维图像分析包括计数、面积、光强、分类、共定位分析、时间序列追踪、细胞周期分析等，常见的专用分析软件有 Image-Pro Plus、MetaMorph、ImageJ 和 MATLAB 等，其中 ImageJ 是免费开源软件，基于插件的功能非常强大，覆盖了大部分图像处理和分析功能，中科院研究生赵钰琛将自己所学整理成教程通过网络分享，推荐学习^[35]。多维图像分析包括三维重构、三维形态分析 (形状、长度、体积)、三维追踪等，常见的分析软件有 ImageJ 3D plugins、Image-Pro Plus 3D、MetaMorph 3D、Imaris 和 Amira 等，Imaris 对三维荧光图像的处理和分析功能较为强大，Amira 主要针对三维电镜图像分析。此外，可以通过去卷积 (deconvolution) 算法，利用点扩散函数 (point spread function, PSF) 特点来提高图像的质量，即便是超高分辨图像，也能利用去卷积提高图像质量，常见的去卷积软件有 AutoQuant、Huygens 等。

(2) **插图处理 (从图像/数据到论文插图)**：这一过程要严格根据期刊要求，对图片或图表进行编辑、排版，推荐使用 Adobe Photoshop、Adobe Illustrator、Origin 等软件，由于 PowerPoint、Excel 等软件进行图片或图表编辑后，图片输出会因压缩过程导致部分信息丢失，不推荐使用。期刊的图片编辑指南中会详细列出具体要求^[36]，包括格式、尺寸、分辨率、图片压缩、字体、线条、文件大小等。插图通常要求 PDF、EPS、AI 等格式，图片通常要求 TIFF 格式，图片分辨率通常要求 300-900 dpi，可以借助 Adobe Photoshop 来调整 (图像-图像大小-分辨率)，注意此调整只是改变了图片的印刷尺寸，不能勾选“重新采样”。

(3) **重要的注意事项**：图像和插图处理过程中，应始终保留原始文件；避免使用软件中的滤镜功能；同一组实验中，图像处理和分析的条件需要保持一致；尽量避免非线性的调整；图像处理的过程要尽可能详细地在论文中说明。

(4) **避免造假**：随着近年来科研论文产出的高速增长，科研诚信问题和学术不端现象频发，图片造假的问题备受关注，国内外相关的协会和委员会均出台了期刊出版伦理规范^[37]

^{40]}, 致力于推动问题的解决。造假的行为不仅会给作者本人带来影响, 还会给所在团队、单位带来巨大的负面影响。实验结果受到多种因素的影响, 图像处理和分析最重要的是客观的体现真实结果, 关键是实验数据能够支撑研究结论, 而不是制造完美的数据。

4 结语

显微图像是科研论文中重要的组成部分, 优质的样品准备、合适的显微镜选择和优化的拍摄参数设置、规范的图像处理和分析, 是获得高质量科研图片的重要过程。科研人员要根据科研需求, 优化样本制备条件, 选用合适的显微镜获取最佳图像, 并合理利用图像处理和分析软件, 依据科学的准则和规范^[34], 客观准确地呈现真实的数据。同时, 重视科研诚信问题, 避免不恰当的图像修饰, 更应该杜绝有意的学术不端行为。

参考文献:

- [1] 李醒民. 科学是什么? [J]. 湖南社会科学, 2007, (01): 1-7.
- [2] BRITANNICA. Santiago Ramón y Cajal [EB/OL]. (2021-10-13) [2022-04-21]. <https://www.britannica.com/biography/Santiago-Ramon-y-Cajal>.
- [3] BRITANNICA. Roger Y. Tsien [EB/OL]. (2022-01-28) [2022-04-21]. <https://www.britannica.com/biography/Roger-Y-Tsien>.
- [4] SHANER N C, STEINBACH P A, TSIEN R Y. A guide to choosing fluorescent proteins [J]. Nature Methods, 2005, 2(12): 905-909.
- [5] HOFF F. How to Prepare Your Specimen for Immunofluorescence Microscopy [EB/OL]. (2022-01-10) [2022-04-21]. <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/how-to-prepare-your-specimen-for-immunofluorescence-microscopy/>.
- [6] DUKE L M C F. Introduction to Sample Preparation: Immunofluorescence [EB/OL]. (2009-07-24) [2022-04-22]. <https://microscopy.duke.edu/guides/intro-sample-prep-immunofluorescence>.
- [7] IM K, MARENINOV S, DIAZ M F P, et al. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining [M]. New York, NY: Springer New York, 2019: 299-311.
- [8] STANFORD C S I F. Sample preparation [EB/OL]. [2022-04-22]. <https://microscopy.stanford.edu/sample-preparation>.
- [9] CAI L. B.9 Prepare 4% paraformaldehyde fixation buffer [EB/OL]. (2007-12-15) [2022-04-22].

<http://cailiang.net/cail-protocols/B9.pdf>.

- [10] SCHEFFLER J M, SCHIEFERMEIER N, HUBER L A. Chapter Six - Mild Fixation and Permeabilization Protocol for Preserving Structures of Endosomes, Focal Adhesions, and Actin Filaments During Immunofluorescence Analysis [M]. Oxford, UK: Academic Press, 2014: 93-102.
- [11] SCHEFFLER J M, SCHIEFERMEIER N, HUBER L A. Mild Fixation and Permeabilization Protocol for Preserving Structures of Endosomes, Focal Adhesions, and Actin Filaments During Immunofluorescence Analysis [M]. Academic Press, 2014: 93-102.
- [12] JOSHI S, YU D. Chapter 8 - Immunofluorescence [M]. Boston: Academic Press, 2017: 135-150.
- [13] FISH K N. Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy [J]. *Current Protocols in Cytometry*, 2009, 50(1): 12.18.1-12.18.13.
- [14] SCHERMELLEH L, FERRAND A, HUSER T, et al. Super-resolution microscopy demystified [J]. *Nature Cell Biology*, 2019, 21(1): 72-84.
- [15] NAKANE T, KOTECHA A, SENTÉ A, et al. Single-particle cryo-EM at atomic resolution [J]. *Nature*, 2020, 587(7832): 152-156.
- [16] DENK W, STRICKLER J H, WEBB W W. Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy [J]. *Science*, 1990, 248(4951): 73-76.
- [17] SO P T C, DONG C Y, MASTERS B R, et al. Two-photon excitation fluorescence microscopy [J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2000, 2: 399-429.
- [18] SOULET D, LAMONTAGNE-PROULX J, AUBE B, et al. Multiphoton intravital microscopy in small animals: motion artefact challenges and technical solutions [J]. *Journal of Microscopy*, 2020, 278(1): 3-17.
- [19] TAKATA N, HIRASE H. Cortical Layer 1 and Layer 2/3 Astrocytes Exhibit Distinct Calcium Dynamics In Vivo [J]. *Plos One*, 2008, 3(6): e2525.
- [20] MARX V. It's free imaging - label-free, that is [J]. *Nature Methods*, 2019, 16(12): 1209-1212.
- [21] CAMPAGNOLA P J, LOEW L M. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms [J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(11): 1356-1360.
- [22] BAKER M. Laser tricks without labels [J]. *Nature Methods*, 2010, 7(4): 261-266.
- [23] WANG H, HONG L J, HUANG J Y, et al. P2RX(7) sensitizes Mac-1/ICAM-1-dependent leukocyte-endothelial adhesion and promotes neurovascular injury during septic encephalopathy [J]. *Cell Research*, 2015, 25(6): 674-690.

- [24] PITTET M J, WEISSLEDER R. Intravital Imaging [J]. *Cell*, 2011, 147(5): 983-991.
- [25] WINTER P W, SHROFF H. Faster fluorescence microscopy: advances in high speed biological imaging [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2014, 20: 46-53.
- [26] WEBER M, MICKOLEIT M, HUISKEN J. Chapter 11 - Light sheet microscopy [M]. Oxford, UK: Academic Press, 2014: 193-215.
- [27] PARLANTI P, CAPPELLO V. Microscopes, tools, probes, and protocols: A guide in the route of correlative microscopy for biomedical investigation [J]. *Micron*, 2021, 152: 103182.
- [28] UNIVERSITY F S. Numerical Aperture and Resolution [EB/OL]. (2018-09-20) [2022-04-22]. <https://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/numaperture.html>.
- [29] NORTH A J. Seeing is believing? A beginners' guide to practical pitfalls in image acquisition [J]. *Journal of Cell Biology*, 2006, 172(1): 9-18.
- [30] THERMOFISHER. The molecular probes handbook—A guide to fluorescent probes and labeling technologies [EB/OL]. [2022-04-22]. <https://www.thermofisher.cn/cn/zh/home/references/molecular-probes-the-handbook.html#>.
- [31] THERMOFISHER. Fluorescence SpectraViewer [EB/OL]. [2022-04-22]. <https://www.thermofisher.cn/order/fluorescence-spectraviewer#!/>.
- [32] WEBB R H, DOREY C K. The Pixilated Image [M]. Boston, MA: Springer US, 1995: 55-67.
- [33] ROSSNER M, YAMADA K M. What's in a picture? The temptation of image manipulation [J]. *Journal of Cell Biology*, 2004, 166(1): 11-15.
- [34] CROMEY D W. Avoiding Twisted Pixels: Ethical Guidelines for the Appropriate Use and Manipulation of Scientific Digital Images [J]. *Science and Engineering Ethics*, 2010, 16(4): 639-667.
- [35] TREASURE 琛 . ImageJ 实用教程 [EB/OL]. (2022-04-28) [2022-04-30]. <https://zhuanlan.zhihu.com/p/60999196>.
- [36] NATURE. Image integrity and standards [EB/OL]. [2022-04-30]. <https://www.nature.com/nature-portfolio/editorial-policies/image-integrity>.
- [37] 中国科学技术协会. 中国科协全国学会学术出版道德公约 [EB/OL]. (2022-02-16) [2022-04-30]. https://www.cast.org.cn/art/2022/2/16/art_43_179196.html.
- [38] 中国科学技术协会. 科技期刊出版伦理规范 [M]. 1 ed. 北京: 中国科学技术出版社, 2019:
- [39] EDITORS C O S. CSE's White Paper on Promoting Integrity in Scientific Journal Publications [EB/OL]. (2022-02) [2022-04-30]. <https://www.councilscienceeditors.org/resource-library/editorial->

[policies/white-paper-on-publication-ethics/](#).

[40] ICMJE. Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals [EB/OL]. (2021-12) [2022-04-30]. <https://www.icmje.org/recommendations/>.

中国医学人文杂志