

# 超分辨荧光共聚焦显微技术进展、自主研发现状

张丽娜<sup>1</sup>, 王晋<sup>2</sup>, 李硕果<sup>3</sup>, 巫祥云<sup>1</sup>, 韩玉刚<sup>3</sup>

(1.中国农业科学院 作物科学研究所, 北京 100081; 2.国家科技基础条件平台中心, 北京 100862; 3.中国科学院 生物物理研究所, 北京 100101)

**摘要:** 本文梳理了超分辨荧光共聚焦显微成像技术发展历史, 在此基础上, 重点总结了中国自主创新高分辨荧光共聚焦显微成像技术取得突破, 特别是 2006 年以来, 中科院及北京大学成功研发了几款较为成熟的超分辨荧光共聚焦显微系统, 有力地推动了中国自主创新仪器研制的进展。最后, 在大型仪器设备开放共享评价考核数据分析的基础上, 着重分析了高校和科研院所激光共聚焦显微镜的开放共享使用情况。

**关键词:** 技术进展 自主创新 开放共享

## Progress and independent research status of super-resolution fluorescence confocal microscopy technology

Zhang Lina<sup>1</sup>, Wang Jin<sup>2</sup>, Li Shuoguo<sup>3</sup>, Wu Xiangyun<sup>1</sup>, Hanyugang<sup>3</sup>

(1.Institute of Crop Sciences,Chinese Academy of Agricultural Sciences, BeiJing 100081, China;2.National Science and Technology Infrastructure, BeiJing 100862, China;3. Institute of Biophysics,Chinese Academy of Sciences, BeiJing 100101, China)

**Abstract:** This article summarizes the development history of super-resolution fluorescence confocal microscopy imaging technology. On this basis, it focuses on independent innovation of high-resolution fluorescence confocal microscopy imaging technology in China, especially since 2006, the Chinese Academy of Sciences and Peking University have successfully developed several more mature super-resolution fluorescence confocal microscopy systems, which has effectively promoted the development of independent innovation instruments in China. Finally, based on the analysis of the evaluation data of the open sharing of large-scale instruments, this article focuses on the analysis of the open and shared use of laser confocal microscopes in universities and research institutes.

**Key words:** Technological progress;Innovation;sharing

# 1 超分辨荧光共聚焦显微技术进展

细胞内超微结构及其动态变化一直都是生物学研究中的重要内容，自 16 世纪末期简易显微镜的出现，到 1665 年 R·Hooke（罗伯特·虎克）用复合式显微镜观察软木塞的薄切片，发现并命名了 cell（细胞），再到 1674 年，荷兰显微镜学家 Antoni van Leeuwenhoek（列文虎克）用自制显微镜首次发现了微生物，随后三个多世纪以来，光学显微成像技术经历了从普通的明场显微镜到荧光显微镜，并进一步发展到激光共聚焦显微镜、双光子显微镜、超分辨率显微镜等不同成像技术，推动生物学研究进入了崭新的时代。

2014 年诺贝尔化学奖授予了美国科学家 Eric Betzig（埃里克·白兹格），美国科学家 William E. Moerner（威廉姆·艾斯科·莫尔纳尔）和德国科学家 Stefan W. Hell（斯特凡·W·赫尔），这三位科学家开创性的贡献使得光学显微成像技术的分辨极限拓展到了纳米尺度。其中，Eric Betzig 等人<sup>[1]</sup>实现了基于光活化（Photo-Activation）/光转换（Photo-Convertible）荧光分子的“（荧光）光敏定位成像技术”Photo-Activated Localization Microscopy, PALM），获得了定位精度可达 2-25nm 的超分辨率图像。德国科学家 Stefan W. Hell（斯特凡·W·赫尔）<sup>[2]</sup>在激光扫描共聚焦光路的基础上，利用荧光分子的受激辐射效应，将一个高强度的耗损光调制成面包圈形状，与激发光束中心准直，之后将两束光一起照射到样品上，通过抑制点扩散函数中心点之外的地方发出荧光的点扫描“受激辐射损耗成像技术”（ Stimulated emission depletion microscopy, STED），达到了缩小成像系统实际艾里斑的尺寸的效果，从而实现了提高系统分辨率的目的。随后，他们又进一步发展出了“可逆饱和光学荧光转化成像技术”（ Reversible Saturable Optical Fluorescence Transitions, RESOLFT），以及并行扫描（Parallelized scanning RESOLFT）技术，大幅提升了系统的时间分辨率。

另一种基于傅里叶光学原理发展起来的超分辨成像技术——结构光照明超分辨成像技术，通过不同角度、不同相位的结构光照明，获得了包含不同频率信息的原始数据，通过移频合并获得了远超过系统截止频率范围的更多高频信息的倒空间频谱图，即突破光学系统的衍射极限获得了更高空间频率的样品信息。线性结构光照明超分辨成像技术可以将横向空间分辨率提升至 100nm 左右，纵向分辨率提升到了 280nm<sup>[3]</sup>；而非线性结构光照明（Nonlinear SIM, NL SIM）通过控制照明光模式，可以使横向空间分辨率进一步提高到了 40nm<sup>[4]</sup>。随后出现的“贝塞尔光片结构光照明成像技术”（Bessel Light-sheet SIM）<sup>[5]</sup>，利用贝塞尔光片照明光路仅对在焦面的荧光分子进行激发成像，有效减少了非焦面荧光分子的发光，大大提升了图像信噪比，也有效降低了三维成像过程中对样品的辐照总剂量；“掠射结构光照明成