

# 双光子显微镜在生物学方面的应用

张萍

(中国科学院 过程工程研究所 公共技术中心, 北京 100084)

**摘要:** 双光子显微镜是结合了激光扫描共聚焦显微镜和双光子激光技术的一种新型显微镜。该显微镜由红外脉冲锁模激光器、显微镜以及双光子探测器等部分组成。红外脉冲激光器发出的红外光赋予了双光子显微镜穿透深、光漂白区域小、光损伤小、荧光收集率高等特点。目前被广泛应用于神经形态和行为研究、肿瘤免疫治疗、药物筛选、活体脊椎损伤等领域。

**关键词:** 双光子显微镜;生物学

## Applications of two-photon microscope in biology

Zhang Ping

(Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Institutional Center, Beijing 100084, China)

**Abstract:** Two-photon microscope is a new type of microscope which combines laser scanning confocal microscope and two-photon laser technology. The microscope consists of an infrared pulse mode-locked laser, a microscope and a two-photon detector. The infrared light emitted by the infrared pulse laser gives the two-photon microscope the characteristics of deep penetration, small photobleaching area, small light damage, high fluorescence collection rate and so on. At present, it is widely used in neuromorphological and behavioral research, tumor immunotherapy, drug screening, living spinal injury and other fields.

**Keywords:** two-photon microscopy; biology

1931年, Maria Goeppert-Mayer 科学家在她的博士论文中从纯理论的角度推导出在特定条件下双光子吸收是可能发生的。直到1960年激光器的出现, Kaiser、Garret 和 Abella 等科学家才验证了这一理论, 随后激光器被称为20世纪的四大发明之一。1976年, Berns 科学家第一次观察到活细胞中的双光子效应。1990年, 美国康奈尔大学 Winfried Denk 科学家结合双光子理论、激光器和扫描后发明了双光子显微镜。现如今双光子显微镜已成为较厚活体生物组织三维成像中不可或缺的工具, 可以用来探究样品荧光信号变化、获得荧光图像和

快速记录实时变化动态过程等。目前已在神经学、肿瘤免疫、类器官、遗传发育、药物代谢等领域得到了广泛的应用。

## 1 设备组成及工作原理

双光子显微镜采用红外微秒脉冲的激发光技术，这不仅满足了双光子的激发，还有利于生物组织的观察。由于红外光散射少、吸收低等特点，其在生物组织中具有非常好的穿透深度，利用该设备再结合生物组织透明化技术最深可以观察到 8mm 的结构。同时红外光只在焦点起作用，因此光毒性和光漂白区域非常的小、荧光收集率非常的高，比较适合对活体长时间的动态观察。除此之外，红外光的空间定位性很强，可以做一些光操控实验。

### 1.1 双光子显微镜的设备组成

双光子显微镜主要由红外脉冲锁模激光器、显微镜以及双光子探测器等部分组成。其红外脉冲锁模激光器是整个仪器的核心，既可以是单激光 680-1300 nm 的可调激光器也可以是双激光同步输出的激光器包含可调的 680-1300 nm 以及固定的 1045 nm 波长。双激光同步输出激光器可以满足更多的双光子成像要求，覆盖了更多的染料和荧光蛋白以及三次谐波成像并且还能有效的避免紫外损伤。

检测器是双光子显微镜的大脑，主要负责信号的接收，一般由两个常规的 PMT 检测器和两个高灵敏的 GaAsP PMT 检测器构成。其中 GaAsP PMT 检测器的灵敏度远高于常规的 PMT 检测器，在同等激光强度照射下，量子效率更高，可以捕捉到微弱的信号。GaAsP 检测器为信号弱的样品，活细胞样品低毒性成像带来了希望。

显微镜是双光子显微镜的眼睛，可以可视化活体样品的荧光信号，既可以是正置也可以是倒置的。这两种显微镜具有一定的区别，在外观方面，正置显微镜物镜在载物台的上方，透射光源在载物台的下方，倒置显微镜的物镜和光源位置则相反；在光学校正方面，正置显微镜的物镜是以很薄的盖玻片（一般数值为 0.18）或者直接与样品接触（一般数值为 0）进行校正，而倒置显微镜则是以较厚的载玻片或者培养皿底部进行校正（一般数值为 1）。

### 1.2 双光子显微镜的技术原理

当光照射到某些原子时，光的能量 $\lambda_1$ 使原子核周围的一些电子由原来的轨道跃迁到了能量更高的轨道，即从基态跃迁到高的激发态。由于高的激发态不稳定，电子会回到基态，当电子由高的激发态恢复到基态时，能量会以光的形式释放产生荧光 $\lambda_2$ 。单光子一般吸收一个光子的能量就会发生跃迁从而释放出荧光。双光子要在高光子密度的情况下，同时吸收 2

个长波长的光子 $\lambda_A$  和 $\lambda_B$ ，经过一个很短的所谓激发态寿命时间后，发射出一个波长较短的光子 $\lambda_2$ （图 1）。

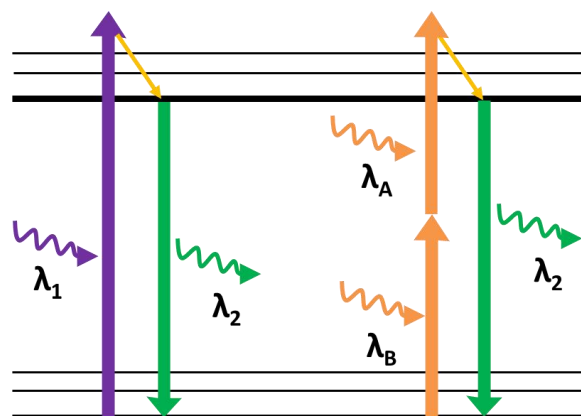


图 1 单双光子荧光激发原理

## 2 在生物学中的应用

近年来，随着活体成像设备的更迭以及生物科学的快速发展，国内外科科研机构已将双光子成像技术广泛应用于神经形态和行为研究、肿瘤免疫治疗、药物筛选、活体脊椎损伤成像研究等领域，并且取得了一定的科学进展<sup>[1-3]</sup>。并且双光子可以应用的模式动物也非常的多比如小鼠、大鼠、果蝇、斑马鱼、鸟、植物拟南芥，甚至灵长类动物猴子等等。

### 2.1 双光子神经形态观察

海马体位于两侧大脑半球颞叶内侧，由海马、齿状回和下托组成，是大脑边缘神经系统的重要组成部分，与长期记忆、情景记忆、空间记忆、空间定位、情绪变化和癫痫发作等密切相关。其中内嗅皮层(EC)到齿状回(DG)、DG 到 CA3、CA3 到 CA1 的三突触回路被认为赋予海马体特殊的生物学功能。科学家通过在小老鼠头部的硬脑膜和组织上做一个切口植入不同尺寸的玻璃潜望镜，用双光子显微镜观察海马体 CA1 区和海马横截面 CA1-CA3,DG(图 2) [4]。

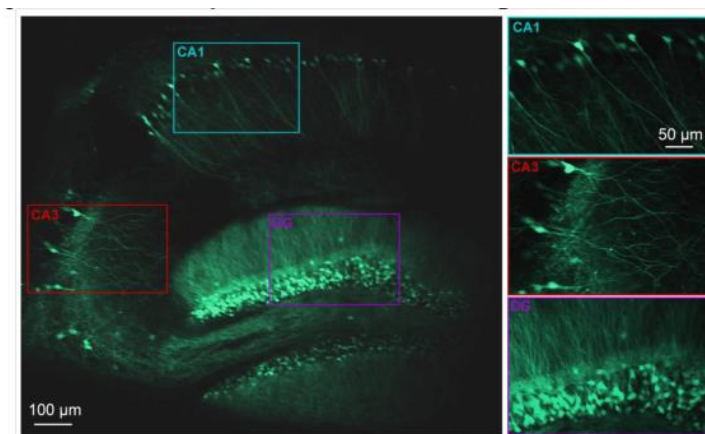


图2 海马横截面的双光子图像

神经元突触在神经系统的发育、行为、学习、记忆等认知活动中也起着非常重要的作用，因此亟需对神经元的精细变化进行探索研究。北京大学的甘文标课题组用一个定制钢板和一个颅骨支架固定小鼠头部，然后把感兴趣的头部区域暴露出来，并在其内剃掉一个圆形头骨区域形成薄骨视窗，最后用双光子显微镜在薄骨视窗内对神经元进行观察，发现连轴索曲张、树突轴和树突突起这样的精细结构都清晰可见（图3）<sup>[5]</sup>。

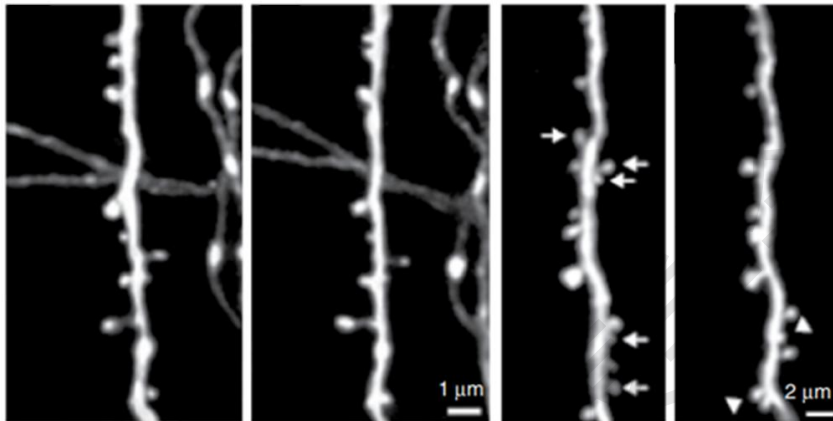


图3 神经元的精细结构

## 2.2 双光子钙成像

细胞钙信号与神经系统内的各种细胞之间的通讯、递质释放、细胞兴奋性以及基因转录等生理、病理过程密切相关<sup>[6]</sup>。对细胞内钙变化监测的过程中，钙指示剂的选择也尤为重要，常常需要根据实验需求去选择钙指示剂的染料性质和负载的方式，还需要考虑双光子激发的性质（如表1）。2019年 Haruhiko Bito 课题组研发了不同颜色的钙指示剂，该课题组通过在小鼠皮层标记不同的荧光的钙蛋白，观察它的反应和闪烁，甚至用波长较长的红色钙指示剂观察到了海马的钙反应<sup>[7]</sup>。

表1 钙指示剂的性质

| 钙指示剂                 | 激发波长 (nm) | 发射波长 (nm) | Kd (nM) |
|----------------------|-----------|-----------|---------|
| Fluo-3               | 800       | 526       | 325     |
| Fluo-4               | 800       | 516       | 345     |
| Calcium Green-1      | 740-990   | 531       | 190     |
| Oregon Green BAPTA 1 | 810       | 520       | 170     |
| Fura-2               | 800       | 505       | 140     |
| Indo-1               | 700       | 400       | 230     |

|          |     |     |     |
|----------|-----|-----|-----|
| GCaMP2   | 910 | 525 | 660 |
| X-Rhod-1 | 925 | 602 | 700 |

### 2.3 双光子肿瘤免疫治疗

肿瘤成像也是现在双光子应用的一个热点。传统肿瘤的研究方法,首先要把小动物猝死,然后把肿瘤取出来做切片,最后用显微镜观察。但是这种实验方法无法捕捉到肿瘤的一些动态过程。另一种也被常用来观察肿瘤的是活体小动物成像仪,这种成像仪分辨率很低,只能看到整个小动物它在某一个地方出现了肿瘤并没有办法达到细胞水平。而双光子显微镜的出现就弥补了上述两种观察肿瘤方法的不足,它既能观察活体还能在细胞水平进行成像。齐海课题组通过在体外标记荧光比如对 T 细胞或者 B 细胞,然后再注射回体内,最后观察携带荧光信号的免疫细胞在一到两个小时内的作用<sup>8</sup>。中科院过程所马光辉课题组研发了一种活体肿瘤的双光子探针,该探针可以与肿瘤细胞膜特异结合,从而可以观察到肿瘤发生的不同时期的变化图(图4)<sup>[9]</sup>。这类活体的肿瘤成像目前也是双方子应用比较多的方向。

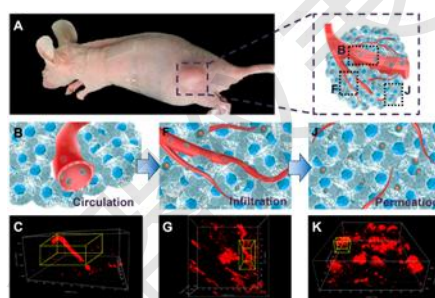


图4 不同时期的肿瘤双光子三维图像

### 2.4 活体脊椎损伤成像

脊椎损伤后轴突的再生与功能重建一直是神经学科领域研究的热点与难点。目前主要使用各种离体方法对脊椎损伤进行研究比如免疫组化,但是这些方法都不能捕捉脊髓损伤后轴突的动态变化。黄色荧光蛋白 H-line 小鼠是一种神经系统特异性表达黄色荧光蛋白的转基因小鼠,该模型鼠非神经细胞不表达黄色荧光蛋白。Young-Jin Son 小组通过对该模型鼠进行轴突横断损伤后,用双光子显微镜在不同时间节点观察单根轴突的再生过程<sup>[10]</sup>。

## 3 结论

双光子显微镜是结合了激光扫描共聚焦显微镜和双光子激光技术的一种新型显微镜。与传统的单光子显微镜相对比,双光子显微镜拥有穿透深、光漂白区域小、光损伤小、荧光收集率高等特点,这使得双光子显微镜被广泛的应用于活体组织研究中。除此之外,双光子显微镜是现在唯一一种能在活体条件下对亚细胞和多细胞水平的结构和功能研究的显微镜表

征工具。在过去三十几年里，双光子显微镜飞速的发展，使其被广泛的应用于多种领域并且取得了一定的成就。本文粗略介绍了其在神经形态和行为研究、肿瘤免疫治疗、活体脊椎损伤成像研究领域方面的应用。

## 参考文献

- [1] Alencar H, Funovics M A, Figueiredo J.et al.Colonic adenocarcinomas: Near-infrared microcatheter imaging of smart probes for early detection - Study in mice. *Radiology*, 2007, 244, 232-238.
- [2] Upadhyay R, Sheth R A, Weissleder R.et al. Quantitative real-time catheter-based fluorescence molecular imaging in mice. *Radiology*, 2007, 245, 523-531.
- [3] Gee M S, Upadhyay R, Bergquist H.et al. Human breast cancer tumor models: Molecular imaging of drug susceptibility and dosing during HER2/neu-targeted therapy. *Radiology*, 2008, 248, 925-935.
- [4] Redman W T, Wolcott N S, Montelisciani L.et al. Long-term transverse imaging of the hippocampus with glass microperiscopes. *Elife*, 2022, 11.
- [5] Yang G, Pan F, Parkhurst C N.et al. Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice. *Nature Protocal*, 2010, 5, 201-208.
- [6] Boulware M J, Marchant J S. Timing in cellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *Current biology : CB*, 2008, 18, 769-776.
- [7] Berridge M J, Lipp P, Bootman M D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2000, 1, 11-21.
- [8] Xu H, Li X, Liu D.et al. Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature*, 2013, 496, 523-527.
- [9] Lv Y, Liu M, Zhang Y.et al. Cancer Cell Membrane-Biomimetic Nanoprobes with Two-Photon Excitation and Near-Infrared Emission for Intravital Tumor Fluorescence Imaging. *ACS Nano*, 2018, 12, 1350-1358.
- [10] Skuba A, Manire M A, Kim H.et al. Time-lapse in vivo imaging of dorsal root nerve regeneration in mice. *Methods in molecular biology*, 2014, 1162, 219-232.