

激光扫描共聚焦显微镜的检测模式及其在生物医学领域的应用

吴晶, 刘皎*

(北京大学 医药卫生分析中心, 北京, 100191)

摘要: 由于激光扫描共聚焦显微镜 (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) 特有的分辨率和技术优势, 使得其成为了生物学、医学及药学等领域重要的科研工具。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 CLSM 适用的样本、检测模式以及在生物医学领域的应用, 以期对相关科研技术人员提供参考。

关键词: 激光扫描共聚焦显微镜;检测模式;应用

Abstract: Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) has become an important scientific research tool in the fields of biology, medicine and pharmacy due to its unique resolution and technical advantages. Based on the author's work experience in the confocal center of Peking University Medical and Health Analysis Center, this paper summarizes the applicable samples, detection modes and applications of CLSM in the biomedical field, in order to provide reference for related scientific researchers and technicians.

1 引言

从 17 世纪世界上第一台原始的光学显微镜问世以来, 光学显微镜在 20 世纪经历了快速发展时期^[1]。但由于普通的光学显微镜受光波衍射效应的限制, 分辨率已接近理论极限值。因此, 为改善成像质量, 提高图像清晰度, 从而提高显微镜的成像分辨率, 人们采用增加物象与背景的反差来实现此目的^[2]。激光扫描共聚焦显微镜 (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) 的诞生, 在一定程度上实现了这一目的。1984 年, Bio-Rad 公司首次推出世界第一台商品化的 CLSM, 从此 CLSM 迅速发展成为现代生物医学等领域科研的有力工具, 广泛应用于细胞生物学、生理学、病理学、解剖学、胚胎学、免疫学和神经生物学等领域。

伴随着光学、计算机等技术的迅速发展, CLSM 的分辨率甚至可以突破光学极限 ($0.2\mu\text{m}$), 达到 $0.05\mu\text{m}$ 甚至 $0.02\mu\text{m}$ 。与分辨率可以达到 0.2nm 的电子显微镜相比, CLSM 的优势是既可以用于固定样品的拍摄, 还可以用于活细胞实验, 比如观察在特定刺激下细胞某个结构或

者荧光强度的变化等。同时还可以通过 XYZ, XYT, XYλ, XYZT, XYλT 等多种模式实现多维成像, 亦可进行更复杂实验的拍摄, 比如荧光共振能量转移 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET), 荧光漂白恢复 (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP), 荧光寿命成像 (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM), 荧光相关光谱/荧光互相关光谱 (Fluorescence Correlation/Co-Correlation Spectroscopy, FCS/FCCS) 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。

本文拟通过按 CLSM 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 CLSM 适用的样本

CLSM 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、培养的粘附细胞、悬浮细胞、细胞团、类器官、各种染色、非染色荧光标记的组织或组织切片、到各种动物 (如模式动物线虫、果蝇、斑马鱼、小鼠、大鼠等), 都可以通过搭载不同载物台进行测试。所有的样品都可以通过匹配不同的器皿 (包括共聚焦专用小皿、玻片、transwell 小室、孔板等等) 和固定器 (比如不同热台、孔板支架等) 放置到载物台上进行测试。

3 CLSM 的检测模式

3.1 单一光切片模式 (XY 或 XZ)

CLSM 的最基本优势在于利用激光代替传统场光源, 借助于激光扫描共聚焦显微镜的软件系统, CLSM 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。

CLSM 特有的 zoom 功能, 可以用来调节扫描区域的放大倍数。增加选定区域的 zoom 值, 其图像会被放大。但 zoom 值会受晶分辨率的限制, 一味的增大 zoom 值, 不能得到相应的高清图像。因此, 需根据实际情况参考 pixel size 进行设定。

3.2 三维成像模式

3.2.1 Z 轴系列及三维成像模式, 三维定位/图像重构

CLSM 可对活的或固定的细胞及组织进行无损伤的系列光学切片, 获得标本真正意义上的三维数据, 这一功能被称为“细胞 CT”: 通过扫描振镜在 X、Y 方向的连续扫描, 控制软件将扫描的像素点组成共聚焦图像, 通过电动载物台沿 Z 轴方向的连续扫描, 可获得样品不同层面连续的光切图像 (xyz)。同理, 通过沿 Y 轴方向连续扫描, 可获得连续的 xzy 图

像。再经计算机图像处理及三维重建软件，可产生生动逼真的动态效果。

3.2.2 时间序列扫描模式 (XYT)

共聚焦显微镜若按照一定的时间间隔、重复地采集样品内固定区域的荧光图像，并对其定位、定性及定量分析，则可实现对该样品的实时监测 (XYT)，此类实验可观察特异荧光探针标记的单个细胞不同部位或不同组织区域接受刺激后的整个变化过程，常用于对单个细胞内各种离子、膜电位、活性氧的比例及动态变化做实时定量分析，例如动态测定活细胞或组织内游离 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 等离子的分布和浓度的变化、活细胞内 H^+ 浓度的变化、细胞/线粒体膜电位，自由基等。当 Y 方向上的扫描行数设为 1 时，便可进入特殊的 XT 模式，在这种扫描模式下得到的图像，可以用来计算血流速度等。

3.2.3 光谱扫描模式 (XY λ /XY Λ /XZ λ)

通常配置有可调节接受范围的检测器的 CLSM，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白激光，CLSM 还可以实现激发波谱扫描。

3.3 四维成像模式 (XYZT/XY λ T/XY Λ T)

基于上述三维成像模式，结合时间序列扫描，可以实现 CLSM 的四维成像。

3.4 反射光/透射光/微分干涉 (DIC) 成像模式^[3-4]

反射光成像主要是指光源发出的光到达样品后发生反射，检测器将此反射光信号转化为电信号进而生成样品表面的图像。利用反射光成像，能够更好的获得样品的表面纹理等信息，是对荧光图像信息的进一步补充。

透射光成像技术是通过光源发出的光到达样品后，透过样品的光进入检测器生成光信号，再由检测器转变为电信号所形成的图像信息。透射光成像通常能够更好的呈现目标的外轮廓信息，亦是对荧光图像信息的进一步补充。

很多 CLSM 配置有 DIC 模式。与其他成像技术相比，DIC 成像技术通过对光路中梯度变化的呈现，实现“伪立体”效果，如在梯度比较小的区域中，相对比较扁平的上皮细胞亦可以较好的实现“立体”结构，同时，由于 DIC 成像技术不存在相差成像等技术中出现的光晕，还可以利用这个特点检测到细胞表面分布着的细菌，这是很多成像技术所观察不到的。因此 DIC 成像技术的主要优势在于不需要对相差环和聚光镜遮挡等因素进行考虑，可以直接实现高数值孔径的物镜观察，即可以提高轴向分辨率，这在分辨率要求十分高的实验中具有重要的应用价值。

3.5 特殊检测模式

3.5.1 荧光漂白恢复 (FRAP) ^[5]

FRAP 技术由 Axelrod 等于 20 世纪 70 年代研发，指对细胞内的某一区域荧光漂白后，通过测定荧光分子的恢复速率，来研究活细胞中生物分子的动力学特征。通过 FRAP 实验可以研究生物膜脂质分子的侧向扩散、细胞间的通讯、胞浆及细胞器内小分子物质转移性的观测、以及细胞骨架、核膜结构或大分子组装等。

3.5.2 荧光能量共振转移 (FRET) [6]

FRET 是指两个荧光基团间能量通过偶极-偶极耦合作用以非辐射方式从供体传递给受体的现象。目前 FRET 技术可广泛用于单个固定细胞、亚细胞或活细胞原位生理环境下检测生物大分子的构象变化和分子间的直接相互作用，如检测配体-受体、蛋白分子共定位、转录机制、蛋白折叠以及蛋白质二聚化等，亦可用于检测酶活性变化、细胞凋亡以及膜蛋白的研究等。

在 FRET 体系中，常用的荧光能量供体、受体对主要有：CFP/YFP、BFP/RFP、CY3/CY5 等。进行 FRET 实验时，需要满足以下几个条件：① 所检测样品包含两个荧光分子，能量的提供者叫做供体，能量的接受者叫做受体；② 供体与受体的距离在 <10nm 之间；③ 供体的发射波长与受体的激发波长一致。当供体的激发波长照射样品时，若没有 FRET 效应产生，只会检测到供体的发射光；反之，如果有 FRET 效应发生，则 CLSM 可检出供体发射的荧光减弱，而受体的发射光增强。

3.5.3 荧光寿命成像 (FLIM) [7]

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。

3.5.4 荧光共振能量转移-荧光寿命成像 (FRET-FLIM) [8]

FRET 本身不是一种成像技术，而是一个物理过程。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。

3.5.5 荧光相关光谱/荧光互相关光谱（FCS/FCCS）[9-12]

FCS 和 FCCS 都是在涨落光谱技术的基础上衍生而来的，通过检测某一微小区域内荧光信号的瞬时涨落变化，分析分子的密度、扩散以及分子之间的相互作用，是一种新兴的单分子检测技术。由于 FCS/FCCS 的高灵敏性可以用来检测生物系统中发生的小概率事件，因此此技术主要用于分子之间相互作用、活细胞分析、核酸分析、蛋白质的寡聚化、蛋白质的动力学研究以及纳米制剂粒径测量等研究，在检测物质浓度、扩散速度、分子结合速率等方面体现出巨大的优越性，亦可用于肿瘤的早期诊断以及高通量药物筛选等。

FCS 技术，即在 CLSM 焦点的微小测量区域内，通过对荧光强度随时间变化的自发性波动分析和其时间函数自相关的分析，并通过计算机统计与拟合运算，在活细胞内单分子水平给出分子的扩散系数、分子数目、分子浓度及分子之间结合与分离状态等动力学参数的检测方法。其实质是监测带有荧光基团的物质在激光作用体积内的扩散情况，可揭示异质群体中的每个个体，并对各自的亚群进行鉴定、分类、定量比较，亦可对复杂的生化反应提供详细、确定的动力学参数。

发明 FCS 的最初目的是在生物系统中研究非常稀的样本浓度的化学动力学特征。随着探测手段、自相关电子学等方面的技术进步，FCS 在生物化学中的研究和应用越来越广泛，如经典的细胞膜中脂质扩散研究就是通过 CLSM 整合了 FCS 技术后所取得的巨大进展。

FCCS 技术，确切来说是 FCS 技术的一种延伸应用。其既保持了 FCS 技术的灵敏性，又可以解决 FCS 对两种粒子的扩散速度要有明显不同的要求（至少相差 2 倍，即二者质量差相差 8 倍）。该技术在实验中通常将两种粒子用不同的荧光进行标记，荧光分子被激发后，产生两种互不干扰的荧光信号，分别被两个独立的检测器探测，然后将探测到的信息进行交叉函数分析。如果分子间存在相互作用，那么两种不同的荧光信号将同时经过检测通道，这时两个检测器就会产生同步的信号波动，从而产生互相关信号；而当单色荧光分子独立在微区域内运动时，则不会产生互相关信号。这样，相互作用的荧光分子和独立运动的荧光分子就被区分开来。由于 FCCS 技术直接反映分子间的相互作用，而不像 FRET 技术那样受分子扩散或聚集的影响，因此在生物分子互作、蛋白寡聚化、酶活性研究领域中有重要的应用前

景。

4 结论和展望

综上, CLSM 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 CLSM 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), CLSM 必将成为助力生物医学领域研究的有力工具。

参考文献

- [1] 黄德娟, 浅谈显微镜的发展史及其在生物学中的用途。赤峰教育学院学报, 2000, 2: 51-52
- [2] 肖艳梅, 付道林, 李安生, 激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)及其生物学应用。激光生物学报, 1999, 8(4): 305-311
- [3] 弓宇, 郭英玲, 张枫, 刘红旗, 基于反射光和透射光成像的图像识别方法比较。机电产品开发与创新, 2013, 26(3): 7-9
- [4] 虞兆芳, DIC 成像技术的优势。求知导刊, 2016, 2: 53
- [5] 隋鑫, 满奕, 张越, 林金星, 荆艳萍, 荧光漂白恢复技术及其在生物膜系统研究中的应用。电子显微学报, 2017, 36(6): 601-609
- [6] 肖忠新, 张进禄, 荧光共振能量转移技术在激光共聚焦显微镜中的应用。中国医学装备, 2014, 8(11): 73-75
- [7] 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
- [8] 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
- [9] 曲绍峰, 林金星, 李晓娟, FCS/FCCS 技术及其在植物细胞生物学中的应用。电子显微学报, 2014, 33(5): 461-468
- [10] 张普敦, 任吉存, 荧光相关光谱及其在单分子检测中的应用进展。分析化学, 2005, 33(6): 875-880
- [11] 黄茹, 周小明, 荧光相关光谱在生物化学领域中的应用。激光生物学报, 2013, 22(4):

289-293

- [12] 游俊, 荧光相关光谱 (FCS) 在生物活细胞中的应用。湖北大学学报 (自然科学版), 2005, 27 (1): 53-56

中国仪器仪表学会