

# 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

像”（Grazing incidence SIM, GI-SIM）<sup>[6]</sup>通过掠射（Grazing incidence）照明产生一个厚度与物镜景深相匹配的照明光片，实现了快速二维超分辨成像，为多维度生命现象的动态研究提供了强有力的观察手段。

这些新型成像技术“打破”了曾被认为是不可逾越的光学衍射极限，可达到百纳米、甚至十几纳米的光学分辨率，故被称为“超分辨成像技术”（Super-resolution Microscopy）。而自问世以来，超分辨成像技术在观察和发现新的细胞超微结构、功能等方面已经成为不可或缺的利器。

## 2 激光共聚焦显微镜购置建设情况

根据国家网络管理平台数据统计，截止 2019 年底，50 万元以上科研仪器设备共计 96538 台套，其中显微镜类仪器 3363 台套，总值 559484.7 万元。50-200 万元之间的显微镜 2480 台套，总原值 265412.8 万元；200-500 万之间的显微镜 810 台套，总原值是 240898.61 万元。

### 2.1 采购主体分析

根据仪器信息网统计数据，2019 年我国共购置显微镜 316 台。从采购主体分析，其中高校占 61.83%，是激光扫描共聚焦显微镜采购的主力单位。医院和科研院所分别占 19.85% 和 13.74%，其中高校生命科学学院和医学院是主要采购单位（图 1）。

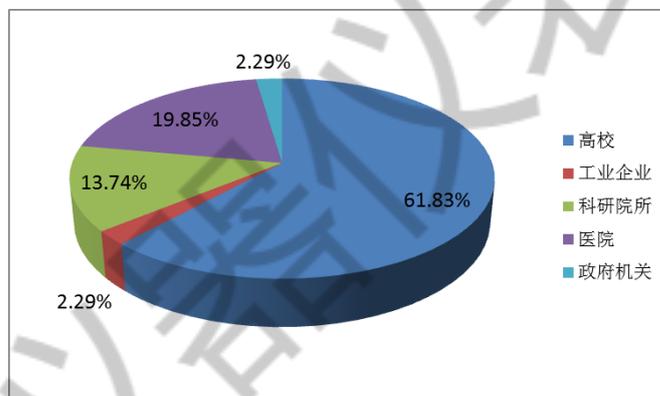


图 1

Fig. 1

### 2.2 品牌分析

从品牌分析，采购数量和金额前四位分别是徕卡、蔡司、奥林巴斯和尼康。四大显微镜厂商中标总数占到 91%（图 2），基本垄断了中国高端显微镜的行业。其中徕卡和蔡司两个品牌在中标数量上相差甚微，但徕卡在中标金额方面明显高于蔡司。

图 2

Fig. 2

### 2.3 中标价格分析

从仪器价格方面分析，激光共聚焦显微镜单套价格在 200-250 万元区间内的比例最高，占比 29%左右。普通单光子激光共聚焦价格集中在 100-350 万元，为一般应用领域。350 万元以上多为双光子共聚焦及超高分辨共聚焦（100nm 及以下分辨率）。此外，超过 500 万元的仪器也有一定需求。由于激光共聚焦显微镜货值较高，因此高校和科研院所多为公共平台统一采购。

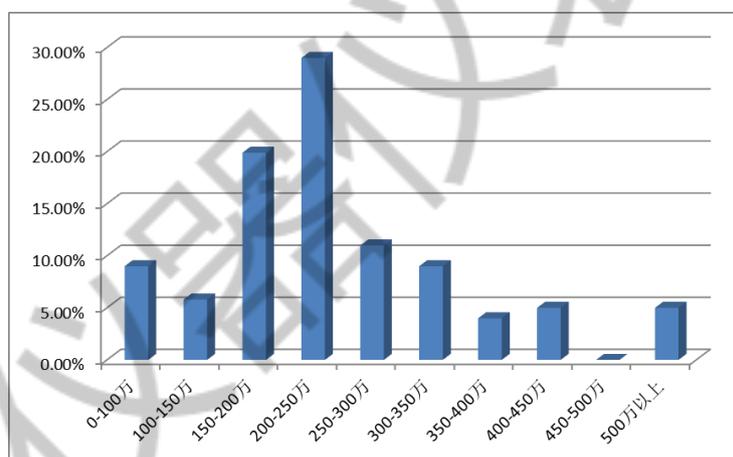


图 3

Fig. 3

### 2.4 功能分析

目前市面上双光子激光共聚焦显微镜主要以徕卡、蔡司、奥林巴斯三家居多，而近年来双光子显微镜的技术革新也较快，徕卡 SP8 DIVE 为 2018 年最新推出的全光谱式双光子共聚焦，基于 SP8 这个平台，有更快的扫描速度及灵敏度，双光子外置光谱式扫描检测器，无需更换滤块，可做双光子发射光全光谱扫描。

蔡司的 LSM NLO 是在 2014 年发布的，但技术革新较少，只是检测器部分作了新的改进，但整体光路变化不大。从发布至今，围绕着 LSM880 平台进行的研发升级也较少，只推出了 Airyscan，并且蔡司的价格普遍较高，同等价格下，蔡司的配置比徕卡和奥林巴斯逊色。

Olympus 的 FV MPE，其特点在于系统灵活性高，可以根据客户要求进行改装，且价格低廉。但光学敏感度以及重复精度均不理想，软件以及硬件的操作较为复杂，不够人性化。可作为一般用户入门级使用，重点实验室层面购置日系高端产品较少。

超分辨共聚焦（纳米成像）技术目前是国际上纳米分辨成像领域最先进的成像技术，只有 Leica 和 GE, Nikon 等技术储备及研发整合能力雄厚的几家公司拥有较为成熟的产品，而 GE 公司的系统为一体化仪器，使用 SIM 技术，对图像质量进行软件提升，分辨率只能在百纳米以上，无法对光学功能进行更多的拓展，无法满足厚组织的原位成像分析。Nikon 公司 N-STORM（类似 ZEISS 公司 PLAM）分辨率可以达到 20 纳米（软件计算），但是由于需要使用特殊的荧光染料，制样方式复杂难度较大，只能针对薄样品成像，不适用于活体与组织样本。

徕卡 STED 的设计则是以自己成熟的激光扫描系统为构架，可以较为灵活的扩充到纳米成像以及双光子等其他观察方式，对于活体组织以及动物实验的手段更多变。该设备需要的光照度是活细胞可以承受的一百万倍，因此不适于活细胞成像，同时实际分辨率受限于光漂白和光毒性，无法达到用荧光小球测出的理论分辨率<sup>[7]</sup>。例如，徕卡 STED 承诺可以实现优于 50nm 的分辨率，到目前为止仍然无法给出 90nm 的 Hessian SIM 揭示出来的活细胞线粒体内嵴的结构动态<sup>[8,9]</sup>。

### 3 中国自主创新高分辨荧光共聚焦显微技术进展

光学显微已有近 400 年的历史，在其发展过程中，分辨率的提升是一代又一代学者专家追求的目标。1873 年阿贝提出了光学显微镜分辨率受衍射现象的限制，只能达到 200 nm 左右，无法进一步提升。然而进入本世纪以来，单分子定位显微镜（STORM/PALM）、结构光照明显微镜（SIM）、受激辐射光耗竭显微镜（STED）等显微成像技术一起掀起了生命科学研究工具的技术革命，把显微镜分辨率又提升了一个数量级，其中 PALM 和 STED 于 2014 年获得诺贝尔化学奖。

在超分辨技术发展的浪潮中，我国科学家也迎头赶上，在该领域占有一席之地。其中以中国科学院和北京大学为代表的研究单位在超分辨仪器技术领域取得了重大突破。在结构照

明超分辨显微镜领域,北京大学的陈良怡科研团队和中国科学院生物物理研究所的李栋科研团队分别发展了海森结构光超高分辨率显微镜和掠入射结构光超分辨成像技术,在把分辨率提高到 100 nm 以内的同时把时间分辨率提升到数百幅每秒,非常适合细胞器互作等动态过程的研究。且所需要的光照度小于常用的共聚焦显微镜光照度三个数量级。由于极低的光漂白以及光毒性,可实现了高速超高分辨率成像下超长时间的动态观察<sup>[10]</sup>。在单分子定位显微镜领域,中国科学院生物物理研究所的徐涛/纪伟科研团队发展了冷冻单分子定位显微镜和一种新型的干涉单分子定位显微镜(Repetitive Optical Selective Exposure, ROSE)。冷冻单分子定位显微镜在提高分辨率的同时可实现与冷冻电镜融合成像,ROSE 显微镜实现了不同干涉条纹下单分子高速成像,避免了闪烁和发光时间短对定位精度的影响,把单分子定位显微镜的分辨率提升到 3 nm 以内的分子尺度,定位精度接近 1 nm,具有更高的亚细胞结构解析能力。这些仪器技术为生命科学研究提供了强有力的技术手段,是显微成像领域的重大突破,具有广泛应用前景<sup>[11]</sup>。

中国科学院苏州医工所张运海科研团队的肖昀等研究人员,对入射光进行偏振调制,得到尺寸较小的径向偏振光纵向分量的聚焦光斑,成功提高了现有图像扫描显微成像技术的分辨率,获得了高信噪比且更高分辨率的图像。该技术利用径向偏振光的纵向分量具有紧凑型光斑的特性,获得了较小的照明光斑,并进行图像扫描显微成像,与普通图像扫描成像相比,其分辨率提高了 7%。

北京大学陈良怡教授领导的生物光学成像前沿交叉科研团队历时 2 年研发了智能超高灵敏度活细胞超分辨显微镜(HiS-SIM),是现有商用超分辨率显微镜中成像灵敏度和分辨率最高的,并配备多种成像模式、便捷操控、高性能图像重建和智能图像处理,产品服务于基础生物学研究、临床医学及病理学研究、精准药物筛选等领域科技人员,致力于活细胞超分辨率智能成像解决方案。该设备价格较高,填补了我国高端显微镜的空白。中国科学院苏州医工所也开发了商品化的高速双光子显微镜和激光扫描共聚焦显微镜。

#### 4 激光共聚焦显微镜开放共享使用情况

按照《国务院关于国家重大科研基础设施和大型科研仪器向社会开放的意见》(国发〔2014〕70号,以下简称《意见》)和中央改革办督察组的要求,2019年5月至9月,科技部、财政部会同有关部门,委托国家科技基础条件平台中心,组织开展了2019年中央级高等学校和科研院所等单位科研设施与仪器开放共享评价考核工作。

总体看来，与 2018 年相比，参评单位对开放共享更加重视，科研设施与仪器利用率进一步提升，支撑科技创新的成效更加显著。参评的科研仪器年平均有效工作机时为 1440 小时，平均对外服务机时为 240 小时。纳入国家网络平台统一管理的仪器入网比例为 95%。80%的参评单位建立了在线服务平台，并实现了与国家网络管理平台互联对接。

其中中央级高校和科研院所单位激光共聚焦显微镜共有 497 台参加了考核，总运行机时为 487423.34 小时，平均运行机时为 980.73 小时，明显低于参评的科研仪器年平均有效工作机时（1440 小时）。其中 494 台激光共聚焦显微镜对外开放共享服务，总服务机时为 9553.90 小时，平均对外服务机时为 140.80 小时，明显低于参评的科研仪器年平均对外服务机时（240 小时）。由此可见，激光共聚焦显微镜的整体使用效率需要提升，对新购激光共聚焦显微镜要加强论证，在查重评议环节严格把关，提高科技资源的使用效率。

#### 参考文献：

- [1]Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*. 2006, 313(5793):1642-5.
- [2]Sahl, S.J., S.W.Hell, and S. Jakobs. Fluorescence nanoscopy in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017. 18(11):685-701.
- [3]Gustafsson M GL, Shao L, Carlton P M, et al. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophysical journal*, 2008, 94(12): 4957-4970.
- [4]Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005, 37(102):13081-13086.
- [5]Planchon TA, Gao L, Milkie DE, Davidson MW, Galbraith JA, Galbraith CG, Betzig E. Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination. *Nat Methods*. 2011, 8(5):417-23.
- [6]Guo Y, Li D, Zhang S, Yang Y, Liu JJ, Wang X, Liu C, Milkie DE, Moore RP, Tulu US, Kiehart DP, Hu J, Lippincott-Schwartz J, Betzig E, Li D. Visualizing Intracellular Organelle and Cytoskeletal Interactions at Nanoscale Resolution on Millisecond Timescales. *Cell*. 2018. 175(5):1430-1442.

- [7]Jans DC, Wurm CA, Riedel D, Wenzel D, Stagge F, Deckers M, Rehling P, Jakobs S. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 May 28;110(22):8936-41.
- [8]Stoldt S, Wenzel D, Kehrein K, Riedel D, Ott M, Jakobs S. Spatial orchestration of mitochondrial translation and OXPHOS complex assembly. Nat Cell Biol. 2018 Apr 16. doi: 10.1038/s41556-018-0090-7.
- [9]Shim SH, Xia C, Zhong G, Babcock HP, Vaughan JC, Huang B, Wang X, Xu C, Bi GQ, Zhuang X. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Aug 28;109(35):13978-83.
- [10]Huang X, Fan J, Li L, Liu H, Wu R, Wu Y, Wei L, Mao H, Lal A, Xi P, Tang L, Zhang Y, Liu Y, Tan S\*, Chen L\*. Fast, long-term super-resolution imaging with Hessian structured illumination microscopy, Nat Biotech., 2018 Jun;36(5):451-459.
- [11]Lusheng Gu, Yuanyuan Li, Shuwen Zhang, Yanhong Xue, Weixing Li, Dong Li, Tao Xu & Wei Ji Molecular resolution imaging by repetitive optical selective exposure Nature Methods volume 16,1114–1118(2019).