

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.01.038

· 技术与方法 ·

激光扫描共聚焦显微镜活细胞成像方法优化*

张彦丽^{1,2} 刘冰钰^{1,2} 陈亚兰^{1,2} 王瑾瑜^{1,3} 曹慧珍^{1,3}

(1 清华大学生命科学学院 北京 100084;

2 清华大学蛋白质研究技术中心 北京 100084; 3 清华大学生物医学测试中心 北京 100084)

摘要:激光扫描共聚焦显微镜可用于固定样品和活细胞样品的成像,近年来得到了广泛的应用。本文介绍了激光扫描共聚焦显微镜的基本原理及其在活细胞成像中的应用,并以 FV10-ASW Viewer4.2 软件为例,从扫描速度、分辨率、降噪、光电倍增调节、多参数协同优化、成像质量评估、图像后期处理等多个角度总结了激光扫描共聚焦活细胞成像系统的方法优化和推荐参数设置。本文的工作可以为活细胞实验提供一定参考。

关键词:激光扫描共聚焦显微镜;活细胞成像;参数优化

中图分类号:TN16;O657.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)01-196-05

Optimization of Live Cell Imaging with Laser Scanning Confocal Microscopy*

ZHANG Yan-li^{1,2}, LIU Bing-yu^{1,2}, CHEN Ya-lan^{1,2}, WANG Jin-yu^{1,3}, CAO Hui-zhen^{1,3}

(1 School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China;

2 Technology Center For Protein Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China;

3 Center of Beijing Biomedical Analysis, Tsinghua University, Beijing, 100084, China)

ABSTRACT: The laser scanning confocal microscope (LSCM) has been widely used in the imaging of fixed and live cell samples. We introduced the basic principle of LSCM and its application in live cell imaging. Take FV10-ASW Viewer4.2 software as an example, we summarized the optimization and recommended parameter settings of live cell imaging system from the aspect of scanning speed, resolution, noise reduction, photomultiplier, multi-parameter collaborative optimization, imaging quality evaluation and post-processing. This work may provide some reference for live cell experiment.

Key words: Laser scanning confocal microscopy; Live cell imaging; Parameter optimization

Chinese Library Classification(CLC): TN16; O657.3 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2022)01-196-05

前言

激光扫描共聚焦显微镜(Laser Scanning Confocal Microscope, LSCM)是一种在传统荧光显微镜的基础上发展起来的技术,不仅用于固定样品的拍摄,还可用于活细胞样品的成像,因此获得了广泛的应用^[1,2]。活细胞成像(Live Cell Imaging, LCI)要求在不破坏细胞整体结构的条件下进行多靶点多通道扫描成像。由于在拍摄过程中既要保持细胞结构的完整性和生理活性,同时还要获得好的成像效果,以准确捕捉活细胞的真实生理状态,所以与固定样品相比,活细胞样本的拍摄更具难度,也对拍摄技术和成像系统提出了更高的要求^[3-5]。本文根据对激光扫描共聚焦活细胞成像系统的使用和优化经验,总结并提出了一些实用的优化建议和方法,以期帮助初学者更好地使用激光扫描共聚焦显微成像系统高效完成活细胞实验。

1 激光扫描共聚焦显微镜的原理和应用

激光扫描共聚焦显微镜利用激光束作为光源对荧光样品进行激发,在样本焦平面的共轭焦平面上安装了一个微小的光栏,即针孔,利用针孔来排除非焦平面信号进入探测器,针孔仅允许样本焦平面的光通过,因而只有焦平面上的信号被检测到,而非焦平面的信号被屏蔽。之后经过一系列光电成像部件进行信息采集和信号放大,最后经过信号处理输出到计算机上得到整个图像^[6]。自 20 世纪 80 年代以来,激光扫描共聚焦显微成像技术发展迅速,在提高分辨率和扫描速度、降低光毒性、活体观察、大视野图像拼接和三维重建等方面的功能获得提升,进一步扩展了其在生物医学领域的应用,例如:干细胞分化和迁移的动态过程观察、药物对肿瘤细胞的作用和影响、生物大分子的亚细胞定位和相互作用、细胞通讯及脑屏障研究、囊

* 基金项目:清华大学实验室创新基金(53100100519)

作者简介:张彦丽(1987-),硕士,工程师,主要从事细胞影像相关大型仪器的使用与管理,

电话:010-62772736, E-mail: yanlizhang12@mail.tsinghua.edu.cn

(收稿日期:2021-05-23 接受日期:2021-06-18)

泡和外泌体的功能研究、免疫细胞分型、肠道菌群研究等^[7,8]。

激光共聚焦显微镜可以进行活细胞实验,用来观察细胞在特定刺激下,细胞内某个结构或者荧光强度的变化等。对于活细胞或者固定组织等样品一般可以进行 XY 单通道或者多通道二维成像,并可以对拍摄后的样品进行初步定量分析或者进行细胞结构的定位分析等。细胞样品本身有一定的厚度,如果要拍摄完整的细胞,可以进行 XYZ 三维成像,或者拍摄活细胞的动态变化进行 XYT 三维成像或者 XYZT 四维成像。除了可以进行基础的 2D(XY),3D(XYT,XYZ)成像外,也可以进行 4D(XYZT)及 5D(XYZTP)等多维成像。此外,还可以进行复杂实验的拍摄。比如,共聚焦显微镜加上特定硬件之后可以进行荧光共振能量转移(FRET),荧光漂白后恢复(FRAP)及荧光寿命成像(FLIM)等实验,满足多维度及细胞内部不同蛋白之间相互作用过程的研究^[9-11]。对于特殊实验,比如合成特定染料,激发和发射波长与常用商业化染料不一致的,可以根据不同染料的特点,调节特定的激发或者发射波长,也可以进行单个波长激发,不同波段范围接收的调节,以达到预期的实验效果。对于大的组织样品及需要大量统计的样品,可以根据需要及实验目的进行快速实验的调节,或者大图拼接及多点拍摄来实现相应的实验目的^[12-14]。

2 活细胞成像技术概述

活细胞成像技术自 20 世纪 60 年代伴着绿色荧光蛋白的发现而开始,并于 20 世纪 90 年代随着显微镜成像技术的进步而发展。绿色荧光蛋白(GFP)技术的出现为活细胞成像带来一场改革^[15]。活细胞成像技术彻底革新了生物学家研究细胞、蛋白质以及众多分子之间相互作用和生理过程的方式。这项技术使得科学家们可以实时或者在一段时间内观察细胞内部结构和细胞生理过程。了解这些细胞结构和动态过程对于解释许多细胞生物学问题是至关重要的。与固定细胞的成像研究中提供的“快照”相比,对于动态变化的观察使得人们对细胞的运动过程的认识更加深入。使用活细胞成像方法可以回答一系列的生物学问题。最热门的应用包括细胞内相变的研究、细胞结构组分的检测,动态过程的研究以及分子的定位等^[16-18]。细胞完整性、胞吞、胞吐、蛋白质转运、信号转导和酶活性等过程都可以被检测^[19,20]。此外,由于活细胞成像不容易引入实验伪影,它通常能提供比固定细胞成像更加真实可靠的信息。

活细胞样品与固定样品在进行共聚焦成像条件设定时的基本原则基本一致。为了获得可靠地数据,活细胞成像需要若干特征来保持细胞的健康,其中重要的一项就是为细胞提供一个最佳的生理环境。此时,科学家们在进行科学研究时不仅要确保细胞的存活,还要将细胞保持在一个稳定的代谢状态,使其不至于产生能够改变待观测过程的非特异变化。这就包括维持温度、pH 值稳定、湿度、活细胞生长所需的气体、并减少物理震动。能提供最佳成像条件的一些系统属性对于活体成像来说也是必要的。检测系统既必须对弱荧光样品足够敏感以获取目标图像,又需要在背景噪声或者样品自发荧光之上获得高的信号水平。为了捕捉动态过程,这个系统必须足够快;为了捕捉到非常好的细节,必须拥有足够高的分辨率;为了精确的测量非常微小的光强变化,检测系统同时也必须具有一个较宽的动态

范围^[21,22]。同时满足分辨率、信噪比和速度三方面的需求是拍摄任何样品特别是活细胞样品的终极目标,也是一大难点。

3 激光扫描共聚焦活细胞成像系统优化(以 FV10-ASW Viewer4.2 软件为例)

如何对激光扫描共聚焦显微成像系统进行参数优化,进行活细胞拍摄,得到稳定和最佳的图像信噪比及分辨率,以降低样品光毒性及荧光淬灭风险、真实反映活细胞的生理状态,是进行活细胞成像的最终目标。以下将以 IX83 激光扫描共聚焦显微镜系统上的 FV10-ASW Viewer4.2 软件为例,从扫描速度(Speed)、分辨率设置(Image Size)、是否进行降噪处理(Kalman)、光电倍增光(PMT)电压值的设定、多参数优化处理、成像质量评估和图像后期处理等多个角度进行讨论并提供参考。

3.1 扫描速度控制

扫描速度指激光在每个像素点上停留的时间,激光在每个像素点上停留的时间越长,提取到有效信息越多。但是由于在一个像素点上停留时间越长就会造成由于光照而对样品造成一定程度的损伤,特别是对光比较敏感的样品,停留时间过长会对样品造成淬灭。所以对于扫描速度的选择要根据样品本身情况选择合适的扫描速度,活细胞样品尽量选择比固定样品稍快的扫描速度。速度太快,提取的有效信息相对较少,图像上会有模糊的信号,图像质量不如速度慢的好,并且速度慢的信噪比要高一些。所以速度慢的图像质量要好一些,但相对需要的时间要长一些。对不同扫描速度下的花粉样品进行拍摄的结果可以看出(图 1),扫描速度为 2 $\mu\text{s}/\text{pix}$ 时,无法清楚拍摄到全部细胞结构。随着扫描时间的增加,图像质量逐渐变好,可以清楚拍摄到细胞结构,当扫描速度到达 8 $\mu\text{s}/\text{pix}$ 时,再增加扫描时间,不能明显提高拍摄效果,并且长时间拍摄会造成对活细胞样品的淬灭。因此,根据实际需要调整要拍摄的速度,一般推荐 4-8 $\mu\text{s}/\text{pix}$ 。

3.2 分辨率设置

图像分辨率的设定直接影响图像的质量,一般分辨率设置越高,扫描速度就会越慢,图像尺寸大小也会越大,图像质量越高(图 2)。对于大部分的固定样品,如果想要拍摄非常清晰的图像,一般选择 1024×1024 进行拍摄;对于活细胞样品,特别是对速度要求较快的活细胞样品的拍摄可以适当将图像分辨率调小,以期达到快速及低漂白的目的。一般可以选择 800×800 或者 512×512 即可。

3.3 降噪处理

激光共聚焦样品由于是逐点进行扫描,点成线,线成面进行成像,在扫描过程中会产生随机噪点,所以在拍摄过程中一般可以选择多次扫描进行平均的方法,尽可能减少随机噪点,以提高图像信噪比(本文中以图中最高荧光信号强度与最低荧光信号强度的比值 S/N 暂作为信倍比)。一般可以将 Kalman 设为 2-4(图 3)。一般线或者面平均次数越多,随机噪点就会越少,得到的图像质量越清晰,图像信噪比就越高。但是需要的时间就会成倍的递增,同时也会对样品造成一定程度的损伤,特别是对光敏感的活细胞样品,可能扫描一次就会产生淬灭现象,或者活细胞样品运动比较快,在进行平均降噪的过程中活细胞快速的动态过程就不能被迅速捕捉到,这种情况下为了保

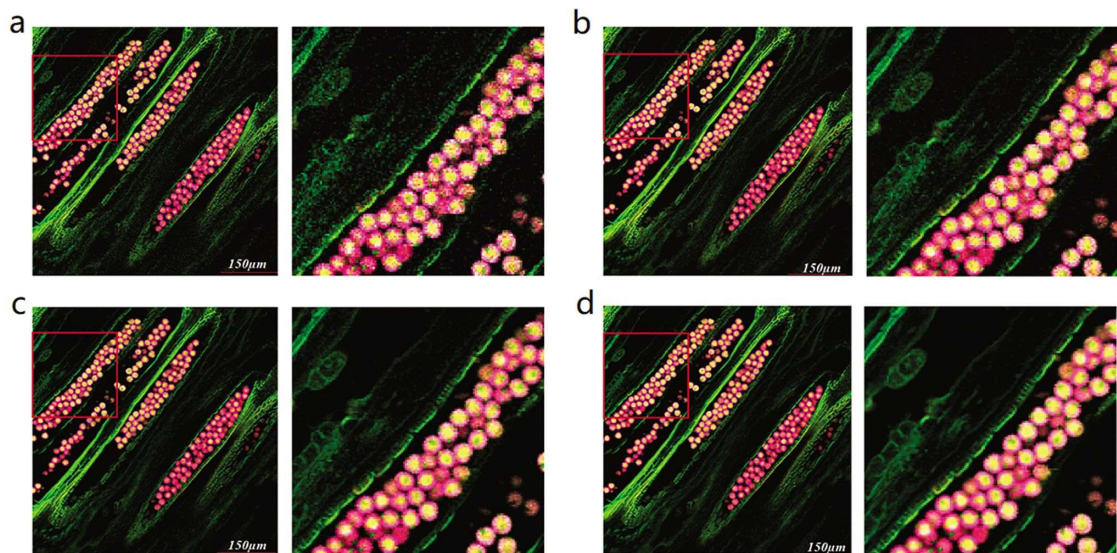


图 1 不同扫描速度下成像效果比较

醋栗花粉组织样品,拍摄参数为:PMT(HV)=680, Image Size=1024×1024, Kalman=2.(a)扫描速度为 2 μs/pix;(b)扫描速度为 4 μs/pix;(c)扫描速度为 8 μs/pix;(d)扫描速度为 12.5 μs/pix。每一组图右图为左图红框范围的局部放大

Fig. 1 Comparison of imaging quality at different scanning speeds

Gooseberry pollen tissue sample with the following parameters: PMT(HV)=680, Image Size=1024×1024, Kalman=2.

(a) The scanning speed is 2 μs/pix; (b) The scanning speed is 4 μs/pix; (c) The scanning speed is 8 μs/pix; (d) The scanning speed is 12.5 μs/pix.

The image on the right of each set is a partial enlargement of the red box range on the left

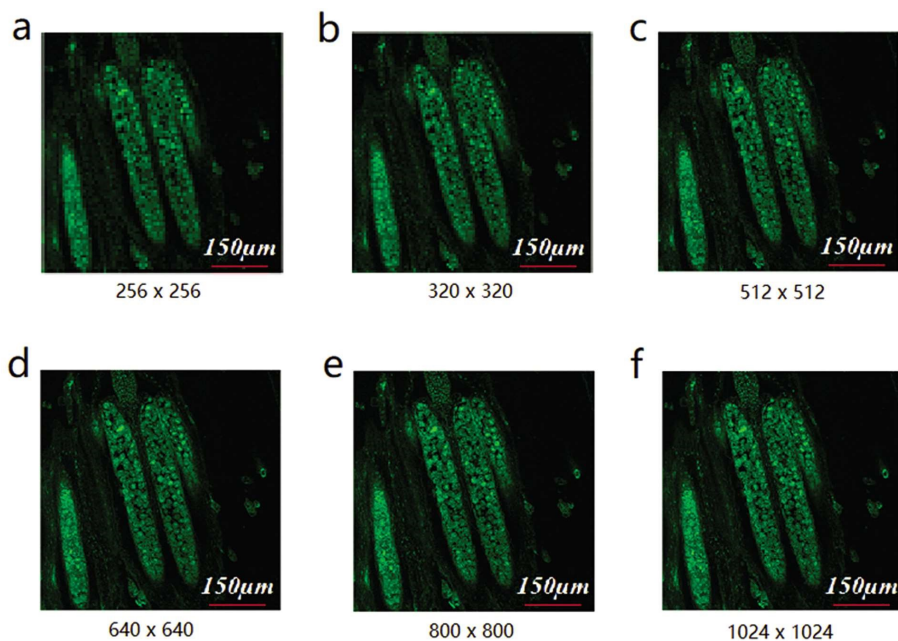


图 2 不同分辨率设置成像效果比较

醋栗花粉组织样品,拍摄参数为:Speed=8 μs/pix, Kalman=2. a-f 为在其他条件一致的情况下,不同分辨率设置下图像缩放到相同大小时的清晰度效果

Fig. 2 Comparison of imaging quality with different image size settings

Gooseberry pollen tissue sample with the following parameters: Speed=8 μs/pix,

Kalman=2. a-f are the images scaled to the same size with different image size settings under the same condition

证细胞正常状态应减少或者不做降噪处理。

3.4 光电倍增调节

光电倍增管即 PMT 上的电压在一定范围内,随着 PMT 电压的增加,样品亮度会相应提升,但是 PMT 电压也不能无限增加,当电压增加到一定程度(即 HV 为 800 以上)再增加时,背景

信号就会增加非常明显(图 4)。所以,PMT 值建议在一定范围内调节,不能调节太高或者太低。对于对光比较敏感并且荧光强度又非常弱的活细胞样品,为了保证细胞的完整性可以适当降低激光强度,将 PMT 电压值稍微调高一些,牺牲一定的图像信噪比来保证活细胞长时间拍摄的相对稳定。也可以选择高灵

敏度光电倍增管 GAasp 或者 HyD 提升灵敏度。

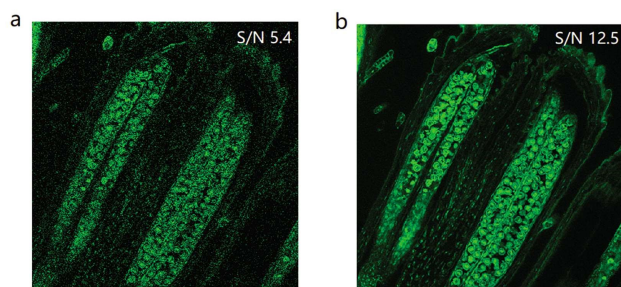


图 3 不同降噪处理下成像效果比较

醋栗花粉组织样品,拍摄参数为:Speed=4 $\mu\text{s}/\text{pix}$, Image Size=1024 $\times$ 1024.(a) 没有对图像进行降噪处理(Kalman=0),图像随机噪音较多;(b)对图像进行了降噪处理(Kalman=2),减少了随机噪音,细胞结构更清晰

Fig. 3 Comparison of imaging quality under different denoising treatments
Gooseberry pollen tissue sample with the following parameters:
Speed=4 $\mu\text{s}/\text{pix}$, Image Size=1024 $\times$ 1024. (a) The image is not de-noised (Kalman=0), and the image has a lot of random noise; (b) The image was de-noised (Kalman=2), which reduced the random noise and made the cell structure clearer

3.5 多参数协同优化和成像质量评估

对于不同的样品需要综合各个参数进行优化,达到最佳的实验效果。对于不易漂白的固定样品,为了得到最佳图像质量,可以将扫描速度调低、图像分辨率调大,PMT 电压调到相对较低并通过降噪处理来综合优化图像质量。对于相对容易漂白,同时对速度要求比较快的活细胞样品,可以将扫描速度提升,图像分辨率调小,PMT 电压调高,减少或者不降噪来实现活细胞样品快速运动及样品光漂白、光淬灭的问题。同时如果条件允许的情况下,可以根据样品特点选择其他类型的仪器,比如速度更快分辨率更高的转盘共聚焦显微镜或者宽场荧光显微

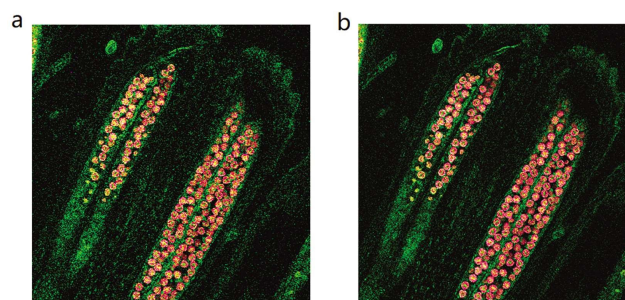


图 4 光电倍增调节对成像效果的影响

醋栗花粉组织样品,拍摄参数为:Speed=4 $\mu\text{s}/\text{pix}$, Image Size=1024 $\times$ 1024, Kalman=2. (a) PMT 电压调高,PMT(HV)=850; (b) PMT 电压调低,PMT(HV)=620

Fig. 4 Influence of photomultiplier regulation on imaging quality
Gooseberry pollen tissue sample with the following parameters:
Speed=4 $\mu\text{s}/\text{pix}$, Image Size=1024 $\times$ 1024, Kalman=2. (a) the PMT voltage is a higher value, PMT(HV)=850; (b) the PMT voltage is a lower value, PMT(HV)=620

镜进行高速活细胞成像,同时减少对样品的光损伤及淬灭。不论对于活细胞还是固定样品,如何达到最佳的成像效果是一个需要进行多参数综合调节的过程,而图像的动态范围可用于评估成像质量,这里以小鼠细胞样品为例来说明图像动态范围和成像质量的关系。进行多参数协同优化,要确保图像亮度合适,尽量充满整个图像的动态范围,参数既不要太高,也不能太低(图 5 a-b);如果参数太高,将会导致图像过曝,不能清晰地将细胞结构呈现出来(图 5 c-d);背景(offset)扣除过多,细胞内微弱的结构将被扣除,不能在图像中展现出来(图 5 e-f);信号调节太弱,亮度不能充满整个动态范围(图 5 g-h),造成部分浪费。

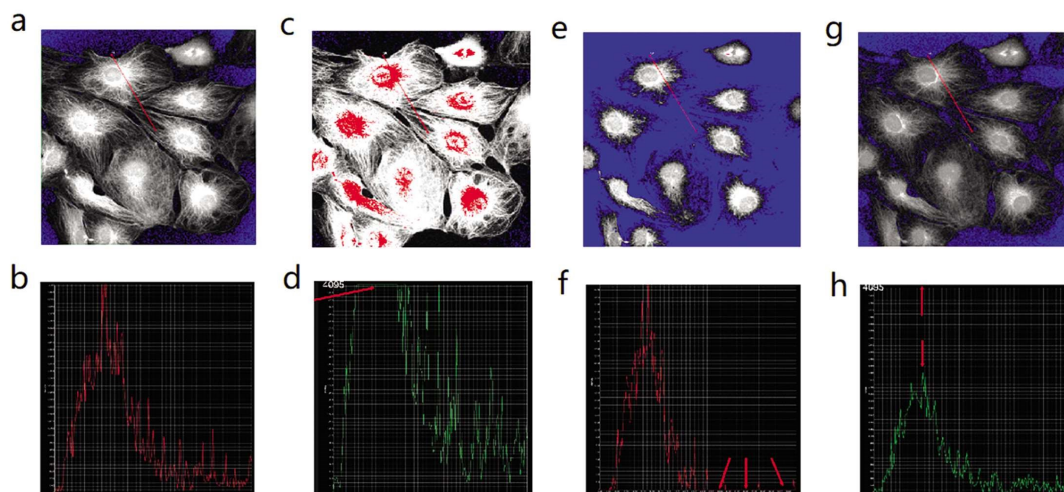


图 5 多参数协同优化和成像质量评估

小鼠肾细胞样品,拍摄参数为:Speed=8 $\mu\text{s}/\text{pix}$, Image Size=1024 $\times$ 1024.(a)参数调节合适;(b)a 对应图像动态范围;(c)图像亮度过高;(d)c 对应图像动态范围;(e)背景扣除过多;(f)e 对应图像动态范围;(g)图像亮度过低;(h)g 对应图像动态范围

Fig. 5 Multi-parameter collaborative optimization and imaging quality evaluation

Mouse kidney cells sample with the following parameters: Speed=8 $\mu\text{s}/\text{pix}$, Image Size=1024 $\times$ 1024. (a) Appropriate parameter adjustment; (b) the dynamic range of image a; (c) Image brightness is too high; (d) the dynamic range of image c; (e) Excessive background deductions; (f) the dynamic range of image e; (g) Image brightness is too low; (h) the dynamic range of image g.

3.6 图像后期处理

样品拍摄完成之后可以对样品进行后期的处理与分析,可以利用仪器对应的离线软件进行简单的数据导出,标尺的标定,测量,图像对比度的调节等。如果需要深入精确的分析可以利用 Imagj(Fiji)等开源软件进行分析,也可以利用商业化的软件 Imaris、IPP 等专业的图像处理软件或者自己编程的软件进行分析与处理,具体要根据分析目的进行选择。

4 小结与展望

活细胞成像技术可以捕捉细胞运动过程的信息,结果直观可靠,在生物医学领域正得到越来越广泛的应用,如观察细胞的结构与组分、观察胞吞胞吐等动态过程、研究蛋白转运和信号转导、研究分子的细胞定位等^[23-25]。使用激光共聚焦显微镜系统进行活细胞成像,具有快速直观,简单易操作的优点。本文介绍了激光共聚焦显微镜的原理和活细胞成像的应用,对不同扫描速度、不同分辨率设置、降噪参数设置、光电倍增调节、多参数协同优化和成像质量评估、图像后期处理等多方面通过实例,对不同参数条件下激光扫描共聚焦显微镜成像效果进行分析和比较,并提出了活细胞拍摄参数的优化方法和建议,该方法对拍摄其他样品同样适用。相信随着科学技术及成像技术的发展,未来会有更多的新技术及方法应用到科学研究中。

参考文献(References)

- [1] 王韦刚,涂真珍,吕兰兰. 激光共聚焦显微镜的主要功能及用于研究生科研工作的开放管理思路 [J]. 实验室科学, 2019, 022(004): 208-211
- [2] White J G, Amos W B. Confocal microscopy comes of age[J]. Nature, 1987, 328(6126): 183-184
- [3] Wang C, Du W, Su QP, et al. Dynamic tubulation of mitochondria drives mitochondrial network formation [J]. Cell Res, 2015, 25(10): 1108-20
- [4] Danni Wu, Yue Xu, Tianlun Ding, et al. Pairing of integrins with ECM proteins determines migrasome formation[J]. Cell Res, 2017, 27(11): 1397-1400
- [5] 王小利, 杨怡姝, 刘思杨, 等. 活细胞成像系统在创新实践课程教学中的应用[J]. 中国教育技术装备, 2019, 000(016): 9-10, 14
- [6] 李成辉, 田云飞, 闫曙光. 激光扫描共聚焦显微成像技术与应用[J]. 实验科学与技术, 2020, 18(04): 35-40
- [7] 李秀丽, 平家奇, 薛丽, 等. 激光共聚焦显微镜在肿瘤免疫治疗检测中的应用[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(017): 3270-3273
- [8] 张彦丽, 代亚丽, 陈亚兰, 等. 利用转盘共聚焦显微镜进行快速实验的新方法[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(19): 194-198
- [9] Shen Z, Liu S, Li X, et al. Conformational change within the extracellular domain of B cell receptor in B cell activation upon antigen binding[J]. Elife, 2019, 8: e42271
- [10] Xing J, Li X, Wang X, et al. Secretion of Phospholipase D δ Functions as a Regulatory Mechanism in Plant Innate Immunity [J]. Plant Cell, 2019, 31(12): 3015-3032
- [11] Liu Y, Song Y, Zhang S, et al. PSGL-1 inhibits HIV-1 infection by restricting actin dynamics and sequestering HIV envelope proteins[J]. Cell Discovery, 2020, 6: 53
- [12] Yu M, Li R, Cui Y, et al. The RALF1-FERONIA interaction modulates endocytosis to mediate control of root growth in Arabidopsis[J]. Development, 2020, 147(13): dev.189902
- [13] Jiang X, Wang X, Yao C, et al. Surface-Engineered Gold Nanoclusters with Biological Assembly-Amplified Emission for Multi-Mode Imaging[J]. Journal of Physical Chemistry Letters, 2019, 10(17): 5237-5243
- [14] Zheng Y, Ding Y, Ren J, et al. Simultaneously and Selectively Imaging a Cytoplasm Membrane and Mitochondria Using a Dual-Colored Aggregation-Induced Emission Probe [J]. Anal Chem, 2020, 92(21): 14494-14500
- [15] Lippincott-Schwartz J, Patterson G H. Development and use of fluorescent protein markers in living cells [J]. Science, 2003, 300(5616): 87-91
- [16] Ying Liu, Yutong Song, Siyu Zhang, et al. PSGL-1 inhibits HIV-1 infection by restricting actin dynamics and sequestering HIV envelope proteins[J]. Cell Discov, 2020, 6: 53
- [17] Keliang Pang, He You, Yanbo Chen, et al. MagR Alone Is Insufficient to Confer Cellular Calcium Responses to Magnetic Stimulation[J]. Front Neural Circuits, 2017, 11: 11
- [18] Liang Wang, Yifei Gao, Xiangdong Zheng, et al. Histone modifications regulate chromatin compartmentalization by contributing to a phase separation mechanism [J]. Mol Cell, 2019, 76(4): 646-659.e6
- [19] Zamponi N, Zamponi E, Cannas S A, et al. Mitochondrial network complexity emerges from fission/fusion dynamics [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 1-10
- [20] Su Q P, Du W, Ji Q, et al. Vesicle Size Regulates Nanotube Formation in the Cell[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 1-11
- [21] Li D, Li Y, Li G, et al. Fluorescent reconstitution on deposition of PM2.5 in lung and extrapulmonary organs [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(7): 2488-2493
- [22] David J, Stephens', Victoria J, 等. 活细胞成像中的光学显微技术 [J]. 中山大学研究生学刊(自然科学, 医学版), 2008, 29(3): 91-102
- [23] 余沈桐, 周汝, 杨桐, 等. 缺氧通过 SIRT1 调控结直肠癌细胞自噬 [J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(13): 48-53
- [24] 高关刚, 盛园园, 张嘉杰, 等. HepG2 细胞中线粒体形状的动态变化[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(02): 11-18
- [25] 廖鼎, 龙子, 海春旭, 等. ROS 在脂肪分化中的作用研究新进展[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(15): 206-210