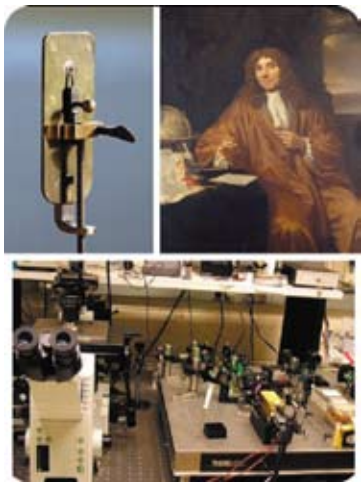
二 超高分辨率荧光显微镜的应用

超高分辨率荧光显微镜正在不断改变我们对细胞内部结构及运作的认识。不过在现阶段，显微镜技术还是存在着种种不足，如果人们希望显微镜能在生物研究领域发挥重要作用，就必须对其加以改进和提高。

1 光学显微镜的出现及其影响



图片说明：Leeuwenhoek和他发明的第一代显微镜（上图）； 最新一代的SR PALM成像系统（下图）。

图片来源：Lippincott-Schwartz Lab

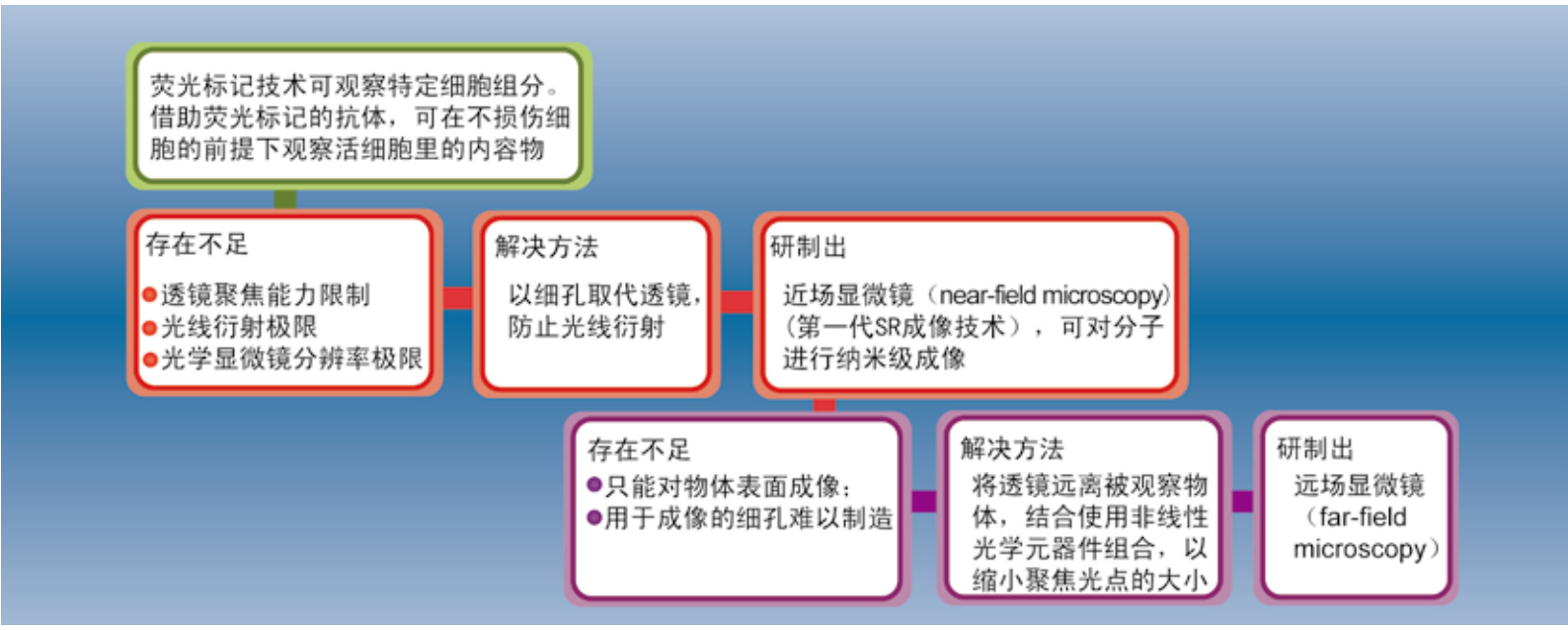
自荷兰博物学家、显微镜创制者Antonie van Leeuwenhoek（1632-1723）在17世纪第一次将光线通过透镜聚焦制成光学显微镜并用它观察微生物（microorganisms or animalcule）以来，显微镜就一直是生物学家从事研究工作、探寻生命奥秘必不可少的利器。正是因为有了Leeuwenhoek的这项伟大发明及其后继者对显微镜技术的不断改进和发展，人们才能够对细胞内部错综复杂的亚细胞器等结构的形态有了初步的了解。

此后，研究人员对显微镜技术的追求从未停歇过，他们总是希望能得到分辨率更高的显微镜，从而更好地观察细胞内部更细微的结构。最近，《自然-方法》（*Nature Methods*）杂志上报道的超高分辨率成像技术（super-resolution imaging, SR imaging）终于使得人们可以在单分子水平上进行观察研究。

2 SR技术的发展过程

在达到今天SR技术水平的过程中，承载了许许多多研究人员辛勤劳动的汗水，也面临着诸多亟待解决的难题。

在以上这些光学SR成像技术中有两种技术——受激发射减损显微镜（stimulated emission depletion microscopy, STED）和饱和结构光学显微镜（saturated structured illumination microscopy，SSIM）最受关注。



最近，基于探针SR成像技术的光敏定位显微镜（PALM）和随机光学重建显微镜（STORM），以及借助荧光基团随机激活特性的荧光光敏定位显微镜（FPALM）都已经取得了成功。

通过基于探针的SR成像技术，可以获得多张原始图像。在每一张原始图像中，细胞内只有一部分被荧光标记的分子能发出荧光，即这些荧光分子都处于不断激活和灭活的交替状态，每一次都只有部分分子能被观察并成像。而且由于每次发出荧光的分子都分散得较为稀疏，因此相互之间不会受到影响，也就避免了因相邻分子发出荧光而无法分辨的问题。最后将这些原始图片叠加、重合在一起就得到了最终的高分辨率图像。这样，就能使得那些以前由于荧光点太密以至于无法成像的结构的分辨率达到纳米级水平，而且成像的分子密度也相当高，可以达到10^5个分子/μm^2。

这种分辨率对于生物学家来说，意味着现在可以在分子水平上观察细胞内的结构及其动态过程了。

虽然显微镜技术已经发展到了如此高度，但它仍然只是生物学家研究中使用的一种工具。因此还需要将显微镜获得的图像与其它的试验结果互相参照，才能获得准确的结果。人们需要认清SR显微镜的优势与劣势，为操作以及判断SR图像制定出标准化的操作规范，只有这样才能最大限度地发挥SR显微镜的作用。

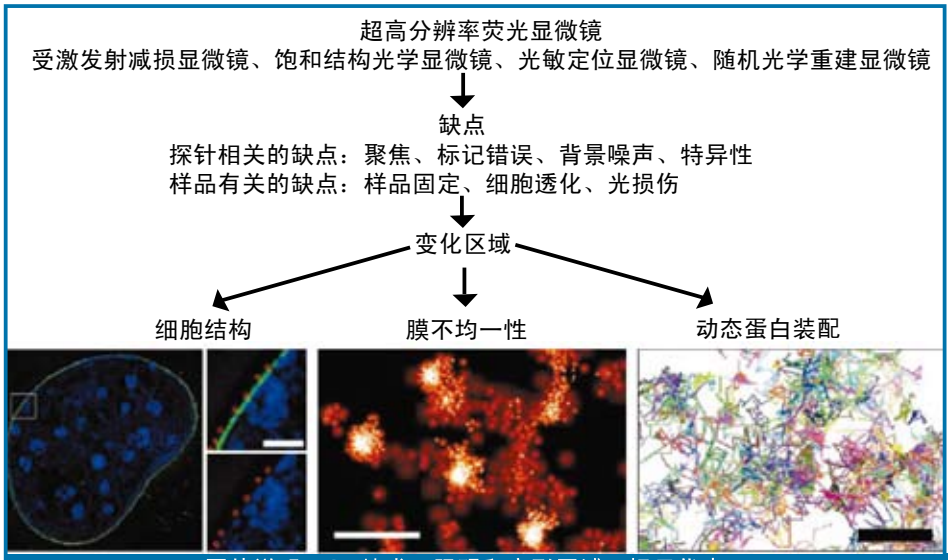
现在，由于人们对细胞内各组份的组织结构以及它们的动态变化过程都只有一个概念上的认识，因此，借助显微镜从纳米水平上对这些结构及过程进行真实的观察能让人们发现许多以往所不了解的东西。例如，以前人们通过电镜发现细胞骨架是由大量丝状网格样组织构成时，就有人对此现象持怀疑态度。那些认为细胞骨架是一种用来稀释细胞内生化物质浓汤这样一种结构的细胞生物学家把这种观测结果称作僵化的人为试验结果。

除非最新的SR显微镜图像或者其它的试验结果都能证明细胞骨架是由大量的丝状网格样组织构成的，否则还会有人持上述的怀疑观点。不过已经有其它的生化试验结果证实了早期的电镜观察结果是正确的。当然新兴的SR技术也需要其它传统的生化试验结果予以佐证才有价值，同时还需要电镜的辅助。因为电镜能提供纳米级的观察结果，这对于佐证具有同样分辨率的SR显微镜观测结果来说是最有价值的。

今后，大家在逐步了解、接受和广泛使用SR显微镜的同时，需要注意将会出现的各种问题，以下的表格列出了部分与SR显微镜使用相关的缺点及其目前的解决方法。

注意事项	缺点	解决方法
SR结果	欠精确性	结合生化试验/电镜结果来证实结果
操作过程	荧光标签蛋白与任意蛋白连接后，一旦大量表达，就会导致荧光聚集或判读错误	需采用未被荧光标记的蛋白图像或低水平表达的蛋白图像对照
	细胞自发荧光或其它基团发出的荧光会影响图像，使得原本分布稀疏的荧光蛋白难以获得高质量图像	可使用全反射显微镜解决，但为了获得最好的图像，还需要使用其它方法来降低背景噪声
	虽然荧光染料能获得更好的荧光强度和光稳定性，但却无法像荧光蛋白那样可以和待测蛋白融合表达	通过抗体等其它手段与待测蛋白结合。不过抗体标记方法的效率非常低，同时使用大量的抗体会给试验带来假阳性。加上抗体无法透过细胞膜，需要使用去垢剂溶解胞膜，才能给胞内的分子成像，但这就算活体成像技术
	在STORM观测中使用的花青染料这类可逆的光控开关探针一旦被置于暗环境下，就会被重新激活、定位，从而影响结果的准确性	
	样品固定、细胞透化、曝光等步骤存在多种问题，例如，在进行细胞免疫荧光染色时常用的甲醛固定法对细胞超微结构的保存作用就很差	在使用SR显微镜观察细胞超微结构时最好使用电镜操作的戊二醛细胞固定方法，但这种戊二醛固定法又会严重减弱探针荧光强度，缩短探针的半衰期
	细胞固定和透化操作会导致细胞形态变化，且在进行活体细胞观察时，用于光激活的紫外线对细胞也会造成伤害	

最近几年，就如何处理图像已经有了非常严格的操作规范。不过迄今为止，对于怎么处理SR图像还没有一个标准的操作规范。尤其需要指出的是，PALM和STORM数据在某些重要因素上，graph方面的共性要多于image方面。在一张SR图像上，分子的不确定性和密度都能用颜色表示出来，这种图像把细胞内该分子有可能出现的任何地点都标示出来了。而且只有被标记的分子按照一定的标准（发出的光子数）判断它的确是一个单分子并且定位准确之后才显示出来。必须对获得的图像进行这样的标准化处理之后才能分析结果。同样，对于试验数据也需要如此进行标准化处理。要提高分辨率不仅需要分子定位、分布得比较好，还需要分子数目够多，以致能达到尼奎斯特判断法（Nyquist criterion）的要求，即分子间的平均距离要小于显微镜分辨率的一半。虽然上述问题都不会影响SR显微镜的应用，但由于存在这些问题，所以我们应该时刻提醒自己，一定要仔细判读、分析SR显微镜的图像结果，只有这样才能得到有价值的生物学结论。



图片说明：SR技术、阻碍和变形区域。标尺代表1μm。
图片来源：Suliana Manley, Jennifer Lippiniott-Scwartz

3 SR荧光显微镜在生物学研究中的应用

到目前为止，人们还很难得知，SR荧光显微镜会对生物学界的哪一个领域带来重大变革，但已经有几个领域出现了明显的改变。这些研究领域是动态及静态的细胞组织结构研究领域、非均质分子组织研究领域、蛋白动态组装研究领域等。这几个领域都有一个共同的特点，那就是它们研究的重点都是分子间如何相互作用、组装形成复合物。因此，能在纳米水平观察这些分子对它们来说具有重大的意义。

3.1 通过观察蛋白质之间的组合关系来了解它们的作用，并能为后续的细胞功能试验打下基础

结构生物学研究在这方面已经取得了很大的进展，目前已经发现了4-8纳米大小的分子间相互作用组装成细胞微管、肌丝、中间丝这些超过10微米大小聚合物的机制。不过对于核孔复合体、中心体、着丝点、中间体、粘着斑这些由许多不同蛋白经过复杂的三维组装方式组合起来的复合体，还需要更好的办法来进行研究。目标就是要达到分子水平的分辨率，这样就可以观察大复合体形成过程中的单个分子，也就能对这些分子的化学计量学有所了解了。要得到更多的生物学信息就需要SR显微镜这样的三维成像技术，例如可以使用活体细胞SR成像捕捉细胞骨架的动态重构过程等等。

3.2 SR成像有助于人们更好地了解分子间的差异

细胞膜蛋白组织方式的经典模型已经从随机分布的液态镶嵌模型转变成了脂筏模型、穴样内陷模型或特殊蛋白模型。这种差异与细胞不同功能相关，例如在高尔基体、cargo蛋白和高尔基体酶蛋白之间必须发生相互作用，但最终它们会按照各自的功能分开，发挥各自的作用。有很多试验手段，例如免疫电镜技术、荧光共振能量转移技术（FRET）等都已经被用来研究这种膜不均一性问题了。多色PALM技术（Multicolor PALM）为人们提供了一种新的手段用来观察膜蛋白集合、组织的过程，并且还能定量分析不同蛋白间的空间距离关系。因为有了PALM提供的单分子信息，人们就可以清楚地了解蛋白分子间的空间关系，甚至有可能计算出相隔某一距离的分子之间发生相互作用的可能性。这种方法除了用于研究膜蛋白之外，还能用于许多非随机分布的生物系统研究，例如研究微管上的马达蛋白。

3.3 SR成像技术还能用于在单分子水平研究蛋白动态组装过程

细胞对外界刺激信号的反应起始于胞膜，在胞膜上受体蛋白之间发生动态的集合，用来调节细胞的反应活性。像HIV这种有被膜病毒也是在细胞膜上完成病毒颗粒组装过程的病毒，也是利用了细胞的物质转运机制。尽管现在蛋白组装的物理模型还远远没有完成，但研究人员知道膜蛋白的动态组装过程是不均一的，所以通常使用荧光试验手段很难获得分子水平上的信息。同样，单分子测量技术（Single molecule measurements）也存在着类似的局限，因为单分子测量技术只能观察细胞内的几个分子，所以缺乏整体的信息。因此由于缺乏空间分辨率，很难动态地研究蛋白质组装过程。SR荧光成像技术与活细胞成像技术和单分子示踪技术（sptPALM）结合就能解决这一问题。我们可以借助分子密度准确地看出PALM图像中的蛋白质簇，蛋白质簇动态的统计数据和形态学数据能帮助我们了解蛋白质动态组装的机制。

上面只是选了生物学研究中的3个方面来说明SR技术的用途，但这已经很好的展示了我们是如何从Leeuwenhoek最初对于生命组成的假设一步一步走到了今天，使用SR显微镜来证实构成生命体的最基本材料——分子的组合过程。STED和PALM的商业化产品已经上市了，这标志着SR显微镜的时代来临了。我们相信SR显微镜在充满创造力的生物学家们手中，一定会充分发挥它的作用，帮助我们发现更多生命的奥秘。

原文检索：*Nature Mehtods* Published online: 17 December 2008; doi: 10.1038/ Nmeth.f. 233

筱玥/编译

Jennifer Lippincott-Schwartz, Suliana Manley/原文作者
Jennifer Lippincott-Schwartz和Suliana Manley都就职于美国马里兰州贝塞斯达美国国立健康研究院儿童健康及人类发育国立研究所细胞生物学及代谢组学中心。