

生命奥秘

LifeOmics

2015年 4月刊 总第74期



光片荧光显微技术

- 疼痛的真相
- 鸟类的辨色力低于人们的期望值



无奇不有

生命世界

解读生命

走进科学



目录 | CONTENTS

专题

光片荧光显微技术

前言	01
一、光片显微技术发展简史	02
二、增大成像的样本体积	03
三、光片成像技术在系统神经科学研究工作中的应用	11
四、光片荧光显微技术在定量生物学研究工作中的应用	16
五、为具有探索精神的生物学家定制的光片显微技术应用指南	23

下一期（2015年5月刊）预告：生物技术方法的十年

2004年至2014年经历了生物研究方法突飞猛进的快速发展期，在此期间，各个生物研究领域的进展都是突飞猛进、日新月异的。如今的生物学领域，与2004年相比，已经大不相同，这很大程度上要归功于方法及技术的大步迈进。下一期《生命奥秘》介绍了过去十年里，对生物研究领域起到最重要影响的十个领域里的研究方法进展。其中一些方法，包括其发展历史、可应用的领域，以及需要改善的方面以便发挥最大的潜能——会有更为详细的介绍。

热点

疼痛的真相	32
-------------	----

百态

鸟类的辨色力低于人们的期望值	40
红边束带蛇释放的外激素源自体内的荷尔蒙竞争	42

本刊文章主要由国外网站文章编译而成，如有版权问题，请版权所有人与本刊联系。
凡本刊所载文章，版权归作者本人和本刊所有，如需转载，请注明作者及出处“生命奥秘”。
本刊提供的任何信息都不能作为医疗凭证和依据，仅供科研参考。



专题

Worthy Issues

光片荧光显微技术

每年年底，《自然-方法》（*Nature Methods*）都会对过去一年中推动生物学发展的技术方法进行回顾与总结，由此评选出当年最受瞩目、影响力最大的技术。2014年，光片荧光显微技术（light-sheet fluorescence microscopy）荣膺《自然-方法》年度生命科学技术。这一期专题的四篇文章，将会详细介绍光片显微技术如何与日益成熟的摄像技术以及强大的计算机技术相结合，极大地改变了现有的成像技术，从而实现对活体生物样品（从发育中的胚胎到行使相应功能的脑部）的成像观察。

一、光片显微技术发展简史

虽然光片显微技术（light-sheet microscopy）只是最近一段时间才开始在生命科学研究领域里流行起来，但是这种显微技术的关键工作原理却早在一百多年前就已经由Richard Zsigmondy和Henry Siedentopf建立起来了。Zsigmondy和Siedentopf都是光学巨头Carl Zeiss公司的员工，他俩在1902年就发明了一台超级显微镜（ultramicroscope）。这是一种暗场照明（dark-field illuminator）显微镜，能够让观察者判断红宝石玻璃（‘gold ruby’ glass）里胶状纳米颗粒（colloidal nanoparticles）的大小。这种显微镜的工作原理很简单，就是用一束非常细的光束从旁边呈垂直方向照射被观察样品，然后观察该样品（图1）。Zsigmondy随后更进一步改进了这款显微镜，并于1925年因其在胶体溶液和超级显微镜方面做出的贡献，获得了诺贝尔化学奖。

在整个20世纪，光片显微技术主要应用于化学和材料科学的研究工作。到了20世纪90年代初期，Voie等人开发了现代的激光光片荧光显微技术（laser light-sheet fluorescence microscopy）。这种直角相交式的荧光光学分段技术（orthogonal-plane fluorescence optical sectioning technique）能够将激光束聚焦成非常窄的光栅，获得极薄的样品图像。Voie等人通过不断的旋转、调整样品的角度，获得了豚鼠耳蜗（guinea pig cochlea）样品的3D结构图。大约十年后，这种新型的激光光片荧光显微技术为广大生命科学研究者所使用，获得了各种非常漂亮的生物样品的图片，其中最主要的应用领域是海洋

微生物学（microbial oceanography）和发育生物学（developmental biology）。自此，光片显微技术的时代真正来临。近十年来，光片显微技术不论是在新技术开发方面，还是在拓展更多的应用领域方面，都取得了不错的成绩。

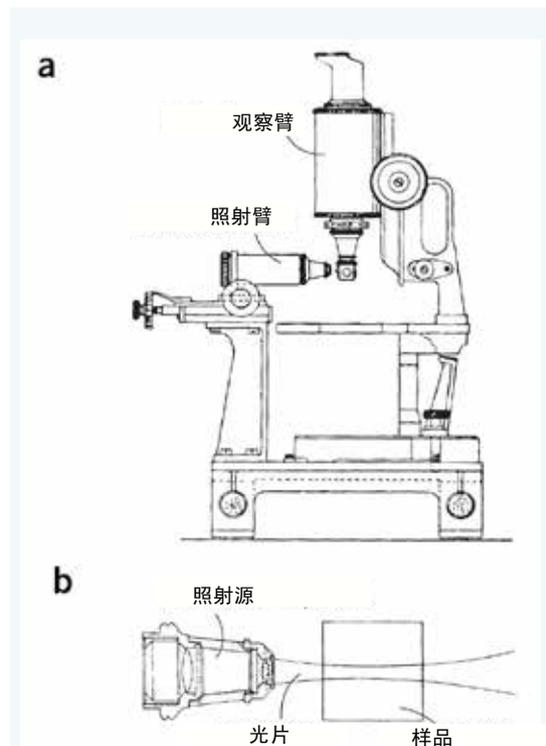


图 世界上第一台光片显微镜模式图。(a) Zsigmondy和Siedentopf最初拿出的超级显微镜设计图。(b) 光片照射玻片中的样品示意图。图片来源：Siedentopf, H. and Zsigmondy, R. (1902), *Über Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen, mit besonderer Anwendung auf Goldrubingläser. Ann. Phys.*, 315: 1–39. doi:10.1002/andp.19023150102.

二、增大成像的样本体积

研究人员能够利用光片荧光显微技术（light-sheet fluorescence microscopy, LSFM）对各种样本（小至单个细胞，大至整个胚胎）进行长时间的动态成像，并且重建这些样本的三维结构。

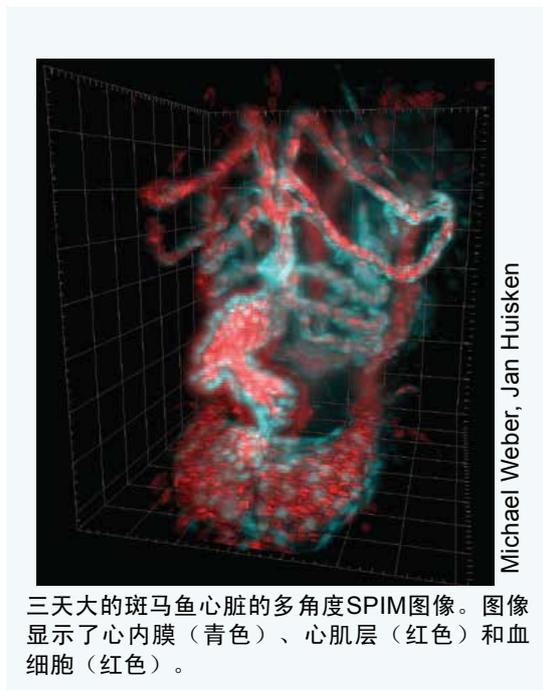
下面，让我们仔细比较一下这两种显微镜。第一种显微镜能够以令人惊叹的速度和分辨率对整个胚胎或活体器官进行成像。马克斯·普朗克心肺研究所（Max Planck Institute for Heart and Lung Research）的Jan Huisken研究团队运用这种仪器，重新构建了一个可以跳动的斑马鱼心脏。这种显微镜具有非常高的速度和精度，甚至能够捕获到红细胞在血管内流动的图像（*Nat. Methods* 11, 919–922, 2014）。

第二种显微镜也能够提供相当清晰的3D图像，但是成像的样本尺寸更小——可以生成细胞丝状伪足、增长中的微管、甚至单个转录因子的动态图像（*Science* 346, 1257998, 2014）。该显微镜的发明者Eric Betzig指出，合作者热情地接待了他们，并且对他们的成果感到异常兴奋。Betzig对这种显微镜的感觉远远好过自己职业生涯中所获得的其他任何成就。由于Betzig对成像领域做出了巨大贡献，并且与其他科学家共同获得了2014年的诺贝尔化学奖（Nobel Prize in Chemistry），因此他的这番言论并非谦虚。

这两种显微镜都是基于相同的基本成像策略来进行成像的。它们并不会将逐点收集来的图像数据进行精细汇总，而是将光片穿透样本后，迅速生成平面图像薄片，然后利用另一个可以二维定位的物镜来检测所产生的荧光信号。随后将这些平面图像薄片重新构建成为一些代表整个样本体积的图像堆栈——要么是苍蝇胚胎，要么是细胞核。此外，不同寻常的是，

这种成像方式不会产生干扰，从而有利于生物学家更能不受干扰地思考图像数据的“自然性”。

LSFM的灵活性和强大性令生物成像领域的科学家兴奋不已；尽管LSFM只有十年的历史，但是很多专家认为，这种成像技术能够改变科学家对各种生物学和生理学现象的研究方法。苏格兰邓迪大学（University of Dundee）的Jason Swedlow表示，这是另一个可以说明以下情况的实例：正当你自认为已经掌握做某事的最佳方法时，另一种办事方法是如何出现的，并且是如何在很大程度上打乱我们的计划的。



三天大的斑马鱼心脏的多角度SPIM图像。图像显示了心内膜（青色）、心肌层（红色）和血细胞（红色）。

1. 超越点扫描法

尽管共聚焦激光扫描显微技术（**confocal laser-scanning microscopy**）对生命科学研究领域产生了毋庸置疑的深远影响，但是这种技术也存在着非常明显的局限性。首先，该技术需要使用大量的能量来破坏被检测的样本，从而迅速破坏荧光团，并且促使细胞生成一些可损伤和杀死细胞的活性氧自由基（**reactive free radical**）。此外，共聚焦成像过程中的逐点扫描步骤非常耗时，而且难以捕获到活体样本中的大多数生理学过程。因此，很多科学家发现自己常常会因为无法充分利用这些日益增多的细胞成像工具而苦恼不堪。华盛顿大学（**Washington University**，位于圣路易斯）的**Tim Holy**回想起他早期的研究工作——利用基因编码的钙离子指示剂来监测小鼠嗅觉系统中的神经元激活情况。研究工作刚开始，**Holy**等人采用了共聚焦显微技术，但这种显微技术实在太慢了，让他感到极度烦恼。

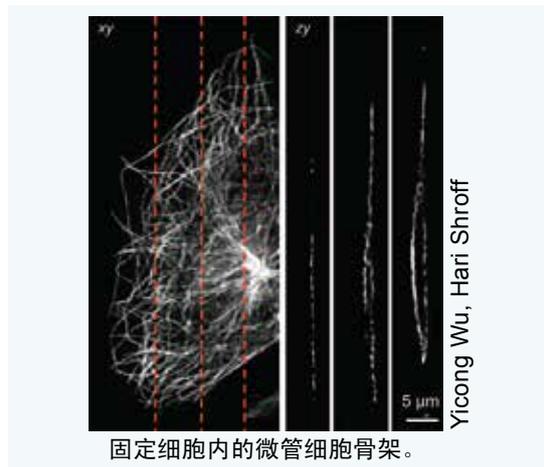
2004年8月出现了一种令人激动的新型显微技术。**EMBL**的**Ernst Stelzer**研究团队深入研究了共聚焦成像技术的发展历程，充分了解了这些显微仪器的局限性。**Stelzer**指出，如果幸运的话，你每秒钟会得到三个或四个图像。自20世纪90年代中期以来，他的研究团队一直都在不断地试验一种替代性的显微镜，该仪器的照明镜片和荧光观察镜片之间呈90°的夹角。这种“共聚焦 θ （**confocal theta**）”显微镜可以降低焦点上方和下方的荧光背景信号，从而提高成像的分辨率。**Stelzer**意识到，如果同时收集整个二维平面上的荧光信号（而不是仅仅收集单个点的荧光信号），并且单纯地扫描这一薄层，可能会进一步提高成像的效率。据**Stelzer**回忆，他们最终确认可以利用柱形透镜来产生这些光片。**Stelzer**也意识到，他们可以根据这一原理来制作一种显微镜。**Stelzer**认为这种显微镜的配置应该能够与可极为详细地呈现大型样

本图像的高数值孔径镜片（**high-numerical-aperture lenses**）相兼容，因此他与**Huisken**一起研发了一种工作原型机，而**Huisken**在随后成为了**Stelzer**实验室中的一名研究生。

实际上，科学家早就怀有这样一种一般概念：即在一个平面上垂直成像，而不是在一个光点上成像。19世纪早期，在德国耶拿工作的**Richard Zsigmondy**和**Henry Seidentopf**设计了一种“缝隙超显微镜”（**slit ultramicroscope**），这种显微镜能够发出一束光锥，从胶质样本的侧面进行照明，从而能使他们看到胶质中的单个金纳米粒子。虽然激光在几十年以后开始得到发展，但是这两位科学家转而使用反射的阳光和聚焦的阳光，因而开启了胶体化学的研究领域，这使**Zsigmondy**赢得了1925年的诺贝尔奖。在将近一个世纪以后，以光片为基础的成像方法才渗透到生命科学领域之中。华盛顿大学（**University of Washington**，位于西雅图）的**Francis Spelman**研究团队在1993年发表了一篇论文，描述了“正交平面荧光光学切片（**orthogonal-plane fluorescence optical sectioning**）”的方法；根据这种方法，他们利用激光片光源对切除下来的豚鼠耳蜗进行了精细成像。

然而，直到**Huisken**和**Stelzer**在2004年发表了另一篇论文（*Science* 305, 1007-1009, 2004）之后，这种方法才引起了人们的广泛关注。他们研发的选择性平面照明显微技术（**selective-plane illumination microscopy, SPIM**）将光片成像技术带进了一个全新的、令人激动的发展方向——这种方法让科学家可以对整个活体胚胎（而不是固定后的样本）进行长时间的成像，并且能够生成空间分辨率低至6微米的3D重建图。**Huisken**指出，**SPIM**的成功其实就是在适当的时间内将一种理念推向了适当的方向。他指

出，2004年时，科学家纷纷为观察到培养细胞或活体组织和胚胎（而不是盖玻片上的扁平细胞）的3D图像而感到兴奋不已。Huisken继续补充，此外，我们现在已经能够观察所有可表达荧光蛋白的转基因动物。的确，Stelzer研究团队中的物理学和光学专家在EMBL内部的发育生物学家的帮助之下，使用可表达绿色荧光蛋白（green fluorescent protein, GFP）的果蝇和青鳉鱼样本，验证了SPIM的概念。Huisken表示，提供这些样本的科学家告诉他们，‘我从来没有看到过这样的图像’。



固定细胞内的微管细胞骨架。

2. 任意的切割方式

除了速度快以外，LSFM还带来了其它一些重要的益处。共聚焦成像技术利用激光来扫描整个样本，以此获得所有的2D图像；而与共聚焦成像技术相比，LSFM只会照亮那些需要成像的平面。这就意味着我们可以在样本接受较少光照量的情况下，较长时间地激活每个荧光标记的分子，如此一来就可以降低光漂白和光损伤的程度。Huisken表示，你可以用几小时甚至几天来进行长期的延时性成像工作，而样本并不会出现漂白现象。Stelzer也指出，在极大地降低光毒性水平之后，研究者应该会相信被观察的生物系统不会受到干扰。Stelzer等人对甲虫幼虫进行了长达50-150个小时的观察，随后将这些幼虫转移到有盖培养皿中，确保它们可以发育成为活体成虫。这种方法为Stelzer等人提供了良好的质量控制效果——（被观测的样本）不只是拥有一点点生存力，而是拥有戏剧性的生存力。

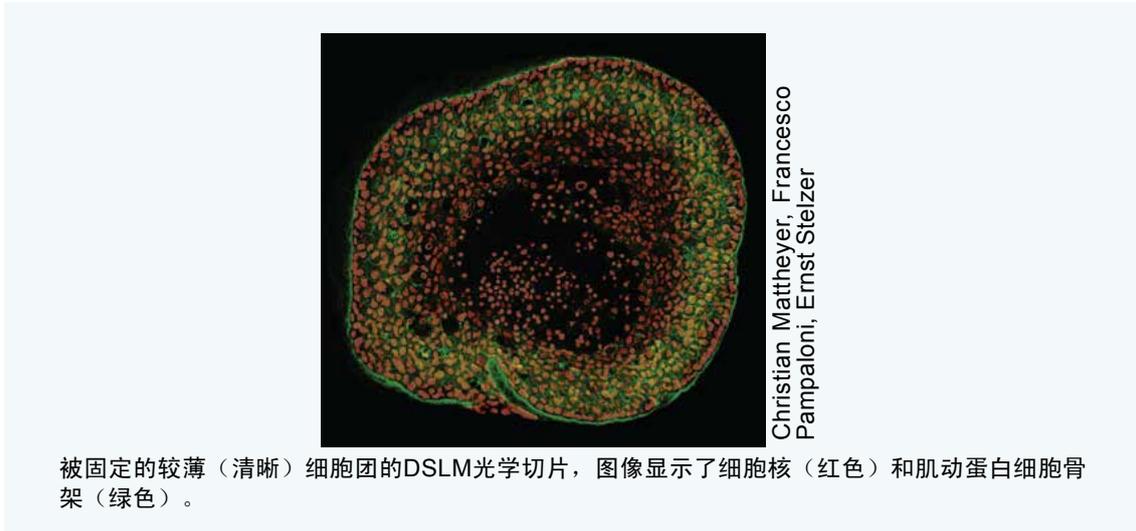
研究人员在接下来的几年里对这种核心方法进行了大量的重复和改进。即便对于高度透明的样本而言，光片所穿透的厚度也较浅，随后它便会停止生成高质量的图像数据。SPIM在一定程度上可以解决这一问题：它能够旋转样本，然后从多个角度来收集图像片段。然

而，光片不可避免地会遇到一些质地不均匀的样本，如果质地不均匀的话，就会投射出“阴影”，在最终的图像中显示为条纹状的图案。为了解决这一问题，Huisken研发出了多角度SPIM（multiview SPIM, mSPIM）这种SPIM发射两束光片，从两侧连续照射样本，然后我们就可以用单个镜片来收集光片的数据了。

作为Stelzer实验室中的一名学生兼博士后研究员，Philipp Keller研发出了另一种不同的多角度SPIM：在样本的每个层面上迅速扫描一束激光后就可以生成一种“虚拟”的光片，这种光片可以替代二维光片来发挥作用（*Science* 322, 1065-1069, 2008）。数字化扫描光片显微技术（digitally scanned light-sheet microscopy, DSLM）可以使样本的照明过程更快更有效，让使用者能够更严格地控制光片的深度，此外也能将LSFM的优势和其它以激光为基础的显微技术结合起来，使混合策略（hybrid strategy）变得有效可行。例如，我们可以用脉冲近红外光束代替DSLM激光，从而提高双光子显微镜（two-photon microscopy, 2PM）的成像深度，与此同时也会加快数据采集的速度。加州理工学院（California Institute of Technology）的

Scott Fraser研究团队报道指出，他们研发的2P-DSLM显微镜比传统DSLM显微镜的成像

深度高两倍，比点扫描式2PM显微镜的成像速度要快十倍。



3. 联合运用所有强大的工具

20世纪80年代时，John Sulston曾经花费了一年半的时间，煞费苦心地去跟踪秀丽隐杆线虫（*Caenorhabditis elegans*）发育过程中的细胞分裂事件。而现如今，研究人员通过联合使用快速发展的LSFM技术和强大的细胞谱系绘制软件工具，在一周之内就能重复开展这项研究工作。美国国家生物医学成像和生物工程研究所（National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering）的Hari Shroff研究团队利用一种不同的SPIM，在14个小时内就对秀丽隐杆线虫的整个发育过程进行了成像（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 17708-17713, 2011）。今天，研究人员也可以在更具挑战性的实验模型上开展类似的长时间发育学研究了。珍妮雅法姆研究院（Janelia Research Campus）的Keller研究团队已经汇总了一系列详细的“数字化胚胎（Digital Embryo）”数据集，跟踪了果蝇和斑马鱼的整个胚胎形成过程。

在一般情况下，显微镜无法实现较大型样

本的成像，而LSFM却可以。Stelzer目前正在对拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）开展SPIM研究，以探索其根系发育的过程以及植物细胞和周围土壤中的微生物之间的相互作用。他指出，你只需要将它们垂直放在显微镜下，不需要将它们放平或夹在两片盖玻片之中，就可以连续三到五天对其开展成像工作了。

LSFM所产生的光毒性较弱、成像速度较快，让研究人员能够重新构建一些迅速发生的、难以用共聚焦显微技术或2PM技术跟踪的生物学过程，或者也可以重新构建一些需要用侵入性实验操作才可观测到的生物学过程。Huisken在谈到他的心脏成像研究时指出，他们已经对固定的心脏组织进行了成像，但是一旦心脏被固定并发生塌陷之后，他们就无法得到合适的心脏形态图像了——他们只能迅速进行观察。”最近研制出来的电控透镜（electrically tunable lens, ETL）可以改变自身的形状，并以前所未有的速度进行3D快速扫描。Huisken将mSPIM和ETL联接起来后，

就能够直接显示出心脏中的血液流动情况。

LSFM也为脑功能成像领域开创了新的局面。Keller研究团队与珍妮雅法姆研究学院的同事Misha Ahrens展开了合作，他们使用高速DSLM，对斑马鱼大脑中将近80%的神经元进行了成像，并且利用钙离子指示剂标记出具有相关放电模式的神经回路（*Nat. Methods* 10, 413-420, 2013）。斑马鱼的身体高度透明，尤其适用于该方法，但是Keller坚信，相同的成像策略也适用于更具挑战性的实验模

型。他认为他们能够切合实际地期盼——在未来几年内获得果蝇胚胎神经系统的完整重构图。Holy研究团队已经对小鼠嗅觉系统开展了类似的功能成像：他们首先通过手术去除了小鼠的犁鼻器，随后利用自主研发的LSFM，直观地记录了活体组织内成千上万个神经元的活动情况（*J. Neurosci.* 32, 1612-1621, 2012）。Holy等人能够对感觉神经元的轴突末端进行记录，真正地绘制出一副其他任何技术都无法完成的图像。”

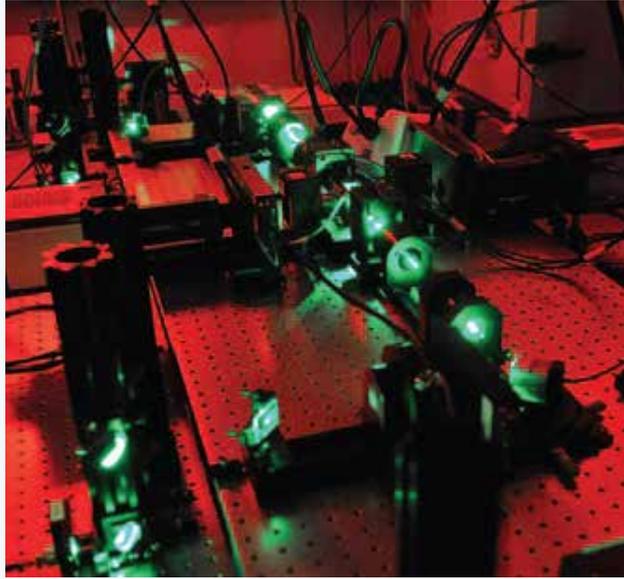
4. 晶格成像

一些研究团队对LSFM进行了改造，以便对细胞内部结构（或者甚至单个分子）进行衍射极限或亚衍射极限的光学成像。例如，哈佛大学（Harvard University）的Sunney Xie研究团队利用垂直放置的照明物镜来反射光片，随后用这些光片水平切割培养细胞的样本。这种配置让他们能够使用数值孔径更高的显微镜物镜，从而获得更高的分辨率。在这项技术的帮助之下，他们能够直接显示出活体细胞内类固醇受体蛋白与DNA的结合情况。

珍妮雅法姆研究学院的Betzig研究团队已经研发了各种奇特的光束架构，以便打破光束扫描法的极限。传统的激光束会引起能量的高斯分布（Gaussian distribution）：即到达靶标上的光子数量呈现为一条钟形曲线，其中曲线的最高点是激光的中心焦点。当激光所产生的光片在穿过样本时，会形成一个“沙漏”，其纤细的“腰部”可以产生最高的深度分辨率。2011年，Betzig实验室证实以贝塞尔光束（Bessel beam）进行照明的方案切实可行，贝塞尔光束可以产生一个高度聚焦的主光束，其周围包裹着由弱光形成的同心环（*Nat. Methods* 8, 417-423, 2011）。贝塞尔光束的主光束不仅比高斯激光要薄，而且能够在整个照明区域内保持这种薄度，从而产生分辨率较

高的切片。

贝塞尔光束存在着散焦照明（out-of-focus illumination）的问题，而且其外环产生的“旁瓣（side lobe）”会引起毒性作用；为了解决这些问题，Betzig开始定制各种不同的多贝塞尔光束照明模式。他指出，我们将会来到一个‘神奇’的时期，到那时你会将旁瓣近乎完全地相消干涉掉（destructive interference），但是仍然会拥有结构完美的薄层激发光。”他的研究发现帮助其研究团队研发出最新版本的LSFM：其中的激光束将被改造为绚丽的二维晶格结构，通过扫描样本中的这种晶格结构，就可以产生超薄层光照，极大地降低散焦激发光的出现概率（*Science* 346, 1257998, 2014）。Betzig与其他几十个研究团队一起检测了这种LSFM的性能：他们标记了组蛋白的位置，可视化了有丝分裂过程中微管的组装情况，跟随了细胞在细胞外基质中迁移，并且追踪了秀丽隐杆线虫胚胎中的单个蛋白质。Betzig指出，它将会成为一个极好的工具，被用在各种单分子研究中。但是Betzig认为它的适用空间还非常广泛，就好像你用LSFM观察任何物体，都可以从中了解到一些新的知识。



Matt Staley and Philipp Keller, Janelia Research Campus

SimView光片显微镜。

5. 海量信息

由于LSFM的应用范围非常广泛，因此LSFM技术的开拓者对它的未来充满了信心。Keller指出，它具有很大的潜力，能够真正地填补活体成像领域中的很大一部分空缺。Keller认为，共聚焦显微镜等技术基本上会无可避免地被逐渐消失掉。但是从另一方面来说，并不是每个实验室都会在意成像速度和光毒性。Shroff就表示，研究人员在将金钱或时间投入到这些新技术之前，需要扪心自问：‘为了回答生物学问题，我真的需要这个工具吗？’。

研究人员应当记住，LSFM也存在着重要的局限性。虽然我们在成像过程中设置了样本旋转和多角度检测的步骤，但是当成像深度较高时，LSFM的图像质量仍然容易发生散射效应和光学像差。Betzig表示，提高分辨率，直到能看清楚果蝇体内任何部位的细胞——这并不是小菜一碟。他认为大家言过其实了。虽然将荧光标记改良后可以带来一些好处，但是为

了提高真正的深度，我们不可避免地需要使用更复杂的光学方法。天文学家通常使用“自适应光学（adaptive optics）”法来抵消大气的模糊效应，而这些方法似乎最有可能解决样本像差的问题，尽管它们会不可避免地增加成本和复杂性。即便使用了自适应光学法，像差的校正程度也存在着极限，我们在对如哺乳动物大脑等致密组织进行成像时就会达到这一极限；此外，LSFM所需要的透镜的几何结构会阻碍我们观察某些特殊的样本，例如小鼠头骨内部。Holy指出，单点扫描双光子显微镜在成像深度上存在着优势，因此可被用来对光片无法抵达的样本区域进行成像。

一般而言，如果研究人员需要对样本进行数小时或数天的成像，那么他们就需要深思熟虑：如何使样本快乐、健康和稳定呢？研究人员已经为LSFM所常用的典型样本（例如果蝇或斑马鱼）研发出了一些有效的样本固定策略，但是还需要学习每种新实验模型的特性。

Stelzer表示，你可以很容易地将果蝇胚胎放置在琼脂培养基中，它仍然可以正常发育，但是据**Stelzer**所知，其他所有昆虫的胚胎都会死亡。因此你首先需要考虑样本的问题。

研究人员面临的最大的挑战可能是如何处理空前海量的图像数据。**Swedlow**指出，他知道有很多拥有这些成像仪器的实验室在一夜之间成为了企业级别的数据生成器，如今他们不知道该如何处理这些数据。一个显微镜摄像头每小时可以产生几百兆的图像数据，而有一些显微仪器则需要使用多个摄像头。据**Betzig**回忆，他曾经将拷贝有5-10兆兆字节的图像数据的移动硬盘交给晶格显微镜的早期使用者，并送他们回家。除此之外，这些仪器本身就是用来在前所未有的长时间内进行成像工作的，因此海量数据的问题变得非常棘手。

增加计算机的速度，增大硬盘的容量——这只是一些临时的解决方案。**Stelzer**指出，

如果你提供了十倍大的空间，那么人们将会记录十倍多的样本数据。他的研究团队正在采用JPEG2000等压缩策略，将图像的尺寸减少一百倍，但是他们也试图寻找一些方法，使显微镜在成像的早期阶段进行最困难的计算工作，以方便使用者更轻松地开展后续的数据分析工作。**Huisken**研究团队朝着这个方向迈出了一步：他们公布了一种方法，该方法能够利用斑马鱼胚胎的常规发育模式，将球型样本拟合到预先定义的坐标上。这样就简化了图像的分析工作，与此同时也将数据的规模降低了几个数量级。然而，相同的解决方法并不能用于**Keller**的果蝇胚胎成像工作和**Holy**的小鼠大脑功能成像工作。**Swedlow**指出，单纯的一个扳手并不能够解决问题。未来将会有有一个更大的工具箱，而人们目前正在制造工具箱中的各种组件。

6. 发展空间

到现在为止，LSFM对生物学领域的影响仍然较小。2014年春天，**Carl Zeiss**推出了首台商用LSFM仪器——Z.1成像平台，这一平台是由众多物理学、光学和数学专家推动研发的，可以为缺乏这些专家的发育生物学实验室创造LSFM入门的机会。目前，**Betzig**已经将他的贝塞尔光束技术和晶格技术授权给了**Zeiss**，而且研究人员可以从智能成像创新公司（**Intelligent Imaging Innovations**）那里购买获得晶格光片显微镜的原理样机。然而对于缺少物理学、光学和数学专家的研究团队而言，以上介绍的先进的活体成像实验可能仍然需要在很多年以后才会付诸现实。

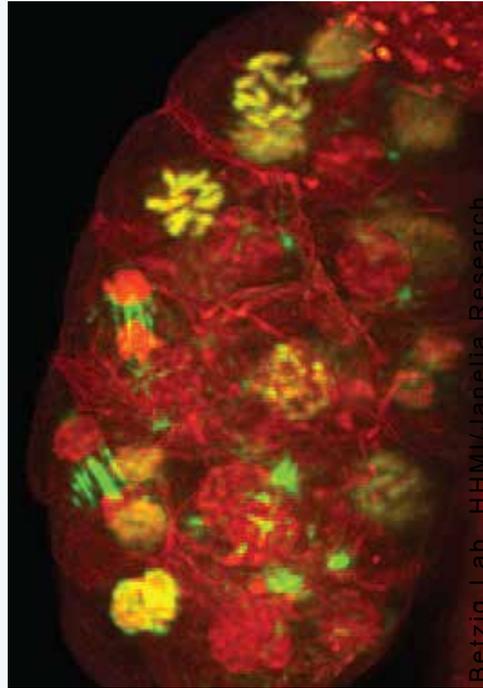
LSFM研究团体希望能够将自己的知识和专业技术分享给那些有兴趣亲自尝试成像解决方案的实验室。**Huisken**与马克斯·普朗克心肺研究所的同事**Pavel Tomancak**合作，共同启

动了**OpenSPIM**平台。**Huisken**表示，它主要提供了零件清单、蓝图和使用说明，告诉人们如何自己制作（LSFM成像）系统。**Keller**研究团队也向外界免费提供了他们的数字化胚胎数据集和软件，而其他研究团队正在积极地协助生物学家开始使用最新的光片工具，包括**Swedlow**的开放式显微镜环境（**Open Microscopy Environment**）以及**Fiji**软件等开源软件的研发。

尽管从某种程度上来说，共享是一种利他行为，但也有助于实现一个更远大的目标——将愿意贡献自己的数据、为数字生物学（**digital biology**）领域创造资源的用户汇集起来，建立一个用户网络。时至今日，数字生物学仍然如同科幻小说一般。**Shroff**的愿景是：某人在某一天打开自己的网络浏览器，抓起并旋转一个秀丽隐杆线虫胚胎，就能够准确

地知道某种特殊的细胞在某个特殊的时候发生了什么生物学事件。在这样的背景之下，人们不太有兴趣去了解LSFM与其他成像平台相比有哪些更好或者不好的地方；相反，他们更想

知道LSFM如何能够扩展我们在生物学领域中的视野。Swedlow指出，技术并不会取代之前的所有事物——它只是展示了大量之前完全不可能的新方法。宇宙现在更加广阔了。



Betzig Lab, HHMI/Janelia Research
Campus; Bembenek Lab,
Univ. of Tennessee at Knoxville

采用光片显微技术对正在发育中的秀丽隐杆线虫胚胎进行成像。图像表明染色体乘客蛋白（chromosomal passenger protein）AIR-2（绿色）与组蛋白和细胞质膜（红色）均存在关联。

三、光片显微技术在系统神经科学领域里的应用

电子记录技术及光记录技术的进步让我们拥有了更强大的技术手段，能够同时对更多的神经细胞进行监测。光片成像技术（Light-sheet imaging）由于能够对大规模神经网络的活动进行光学观察，所以越来越受欢迎，但另一方面，它也给神经网络功能研究带来了机遇和挑战。

1. 在大规模的神经记录中的应用

在光片显微技术的多种应用中，其中一项最新的应用就是进行大规模的神经记录（neural recordings）。光片显微技术在系统神经科学（systems neuroscience）方面的功用就在于它能够让科研人员同时记录多个神经细胞的信息。这种群体记录功能的重要性早就被神经科学家关注了，几乎所有的神经细胞都是属于某个神经回路的，所以这些细胞不太可能“单独行动”。所以我们最好用感觉运动转换通路（sensorimotor transformation）或记忆检索系统（memory retrieval system）等形式来描述神经细胞的功能和作用。不过这些系统往往在脑内都会跨越多个区域，比如视网膜至高级视觉中枢这种通路就是一个非常典型的例子。了解这种完整系统某个方面的信息，有助于我们从整体层面上观察和认识这个系统。实际上，对全脑，或者对其中相当大的一个部分的脑组织的神经活动进行检测，一直都是神经科学家的“圣杯”。诸如光片显微技术这种大范围光学记录手段已经开始为神经科学家提供这类数据了。

光片显微技术是第一个被系统神经科学家在对小鼠鼻（vomeronasal organ）进行研究时，用来记录嗅觉反应（olfactory responses）的手段和设备。这样在一次实验中就能够记录到大量细胞对化学刺激物的气味的反应情况了。然后，我们和其他一些科研人员又用光片显微技术对幼年斑马鱼的神经活动

情况进行了研究。之所以选择幼年斑马鱼是因为它们的大小，以及透明的身体比较适合在光镜下进行观察（图1）。大约10万个中枢神经系统神经元细胞的图像为我们提供了极为丰富的信息，不论是空间层面还是时间层面的信息都相当丰富。随后，我们再用计算机对这些数据进行处理，那么就能够重建整个神经系统的活动情况。然而有些重建是基于上万个细胞的数据，而有些重建则只源自100多个细胞的数据。但是后面这种结果却更加重要，因为相较整个神经系统而言，它们就相当于大海中的一个孤岛，虽然小，但是也有自己独特的功能和作用。接下来我们准备在斑马鱼实验中引入虚拟有意运动（intended locomotion）参数，将光片显微技术与视觉刺激及行为刺激结合起来。这样就在显微镜下建立了一个现实的、但又是光学手段可及的神经行为系统，让我们能够直接发现与斑马鱼游泳相关的神经功能。

将来，我们希望能够看到用这种大规模的显微技术（比如光片显微技术或者其它新技术）对更多的模式生物的神经活动进行观察、记录和研究，比如用于对更大的小鼠大脑的研究等。除此以外，神经科学家也正在开发新的、经过人工遗传学改造过的模式生物，由于CRISPR-Cas9系统等各种最新转基因技术的出现，这项改造工作也变得容易了许多。因此，未来将会有更多可以被光学显微镜观察的模式生物接受人工遗传学改造；抑或是对较容

易被改造的生物进行遗传学改造（比如提高其透明性等），使其更适于在光镜下被观察、或者被操作。

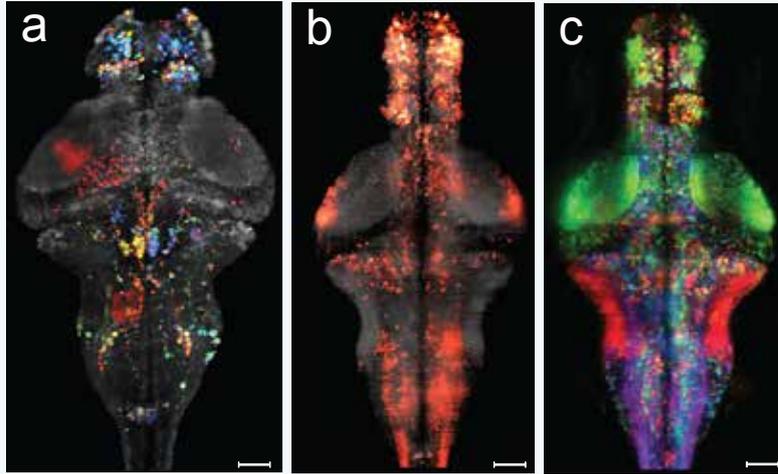


图1 现代光片显微技术在系统神经科学研究中的应用情况。（a）能够表达钙离子指示标志物（calcium indicator）的幼年斑马鱼的脑神经活动情况，由荧光激光光片显微镜拍摄。每一种颜色代表不同时间点的神经活动情况。图片来源：*Methods*, 62/3, cover, Copyright (2013)。（b）幼年斑马鱼大脑在某一个时间点的活动情况。在a和b中，所有灰色展示出了斑马鱼大脑的解剖图像。（c）计算机重建的与b图为同一大脑的所有相关神经活动情况。同样的颜色表示同样的活动。比例尺50 μ m。

2. 面临的挑战与机遇

用高级的光片设备对大量神经细胞进行钙离子成像（calcium imaging）已经帮助科学家发现了很多与神经系统功能相关的新线索。不过这种实验操作和实验技术还存在一定的局限性，还需要做更进一步的改进和优化，比如提高实验在时间及空间上的分辨率，以及对非透明标本的物理覆盖率等。

使用目前常用的光片显微技术，是可以对诸如幼年斑马鱼大脑这样比较透明的标本进行观察，并取得高质量图像数据的。可如果观察对象是透明度更高或更低的神经系统，就得使用更好的技术（比如，更先进的多角度同时成像技术）才能够取得同样高质量的图像。到目前为止，3D立体成像技术的成像速度已经达到了数十秒，这种速度已经可以满足对果蝇

（*Drosophila*）胚胎这种中等大小的样品开展成像工作的需要。如果将成像速度进一步提高，比如只需要几秒钟就能够获得一个完整动物的立体图像，那么就可以对透明度不太高的样品进行钙离子成像实验，并且能够获得高质量的图像。

对于透明度更高的样品，目前的成像速度虽然已经足以满足钙离子成像的需要，但是还是达不到满意的时间分辨率，所以无法捕捉能够代表信息流过大脑的某一次神经冲动发生的具体时刻。此外，虽然从理论上来说，通过转瞬即逝的、经过遗传学改造的钙离子标志物的间接指示，我们也能推导、破解出这些神经冲动的信息，但还是有必要进一步提高成像的速度，从而开发出更多的、经过人工遗传学改

造过的电压标志物 (voltage indicators)。现有的成像技术对于研究某些神经计算功能 (比如视网膜视觉信息处理等功能) 也并不是最佳的选择, 这主要是因为目前只使用了单光子激发 (one-photon excitation) 和光感受器刺激 (photoreceptor stimulation) 方法。如果使用双光子光片成像技术 (two-photon light-sheet imaging assays), 我们就可以获得更高的成像速度, 满足钙离子成像的要求, 同时减少成像过程中出现的各种不良反应。

3. 数据解读

由于对大脑神经活动进行光片成像检测非常复杂, 而且数据规模也很大, 所以给数据计算, 以及相关理论提出了很大的挑战。最基础的层面就是图像处理步骤的问题, 比如数据存储量 (registering volumes)、与通用参照数据的比对及时间顺序过滤 (filtering time series) 等问题。虽然有很多关键的技术已经出现了 (比如那些从医学成像和人体神经成像技术中衍生出来的技术), 但是当实验数据一下子扩展到TB这个数量级的时候, 数据的存储以及常规的一些操作都将面临很大的挑战。

很快, 我们还将面临另外一个问题, 面对如此巨大的数据, 我们应该如何从中提取出自身感兴趣的信息呢? 对此, 有好几种方案可供我们选择, 并对其效果进行评价。比如, 有些人会对第一个层面 (first segment) 进行分析, 并从单个的细胞体 (individual cell bodies) 中提取数据; 还有些人则会对由细胞体与轴突 (axons) 及树突 (dendrites) 这种其它神经结构组成的单个3D结构 (voxel) 进行分析。使用第一种方法可以极大地缩小数据量和后续数据分析的复杂程度, 但是后面一种方法却能够给我们提供一个更加真实可靠、无偏倚的角度来审视数据, 而且从理论上来说, 后面这种方法也能够获得更多的信息。

最后, 要进行大脑光片功能成像 (light-sheet functional imaging), 还需要我们在时间和空间分辨率方面进行权衡和折衷。虽然空间分辨率 (即图像平面内的分辨率) 通常要求都更高, 但是与图像平面垂直的纵向分辨率 (axial resolution) 往往都会因为样品自身在纵向上的限制 (纵向层面较少) 而比较低。所以在这方面也需要做出更进一步的改进, 但是一定不要以牺牲成像速度为代价。

不过最有趣的一个问题却还是更高的另外一个层面的问题, 那就是我们必须将神经活动与真实的外界联系起来看, 例如与动物可被我们观察的行为, 或者我们无法直接观察到的内在状态联系起来看, 或者是以上这3种情况的组合联系起来看, 只有这样才能够了解神经活动的真实意义。到目前为止我们唯一取得共识的一件事情就是, 没有一种公认的方法可以实现这一目的。很多技术都是源自现有的神经科学计算 (computational neuroscience) 工作或者神经成像 (neuroimaging) 工作, 这些技术都非常有价值。这些技术从维度 (dimensionality) 减少和汇聚的方向转向了联合非线性时间顺序分析网络化、图形化理论模型。但是由于这种实验非常复杂, 所以没有哪一种实验技术是最富信息含量的, 我们需要进行更多的尝试, 或者开发出新的技术。光片成像技术必将产出越来越多包含时空信息的数据, 而且是与其他检测技术结果完全不同的数据, 所以我們也需要开发出对应的数据分析和处理技术。

我们需要回答很多问题, 比如大脑中的某一个区域是如何对另外一个区域进行控制或调整的? 神经网络的组织 and 动态活动的背后是否存在某种机制, 我们是否应该从数据中发掘

出相关的信号，或者直接从数据中提炼出这种机制？我们应该如何将大规模的实验数据与源自同一系统的其它补充数据，比如结构联系信息、形态学信息和基因表达等信息联系起来？除此之外，还有一个关键的问题就是，面对同一个数据，我们可以有很多种不同的审视方法。我们需要很多计算方法，不仅是用对大型的数据库进行标准化处理，同时还需要能够以极富灵活性和开拓性的方式对数据开展分析。最后，大规模的成像和运算

都应该是更大规模科研工作的一个部分，它还需要其它技术，比如神经干扰技术（neural perturbation techniques）、电子询问技术（electrical interrogation）、解剖识别技术（anatomical characterization）、连通性分析技术（connectivity analysis），以及神经发育研究等技术的参与和配合。只有这样才能让我们对神经系统的功能和工作方式有一个全面和完整的认识。这些技术领域的不断发展也势必会给神经科学家带来更多的惊喜。



资讯 · 频道

www.LifeOmics.com

特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

岗位职责：

独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

要求：

- 1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
- 2.具备良好的生命科学前沿触觉；
- 3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
- 4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
- 5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 editor@lifeomics.com

四、光片荧光显微技术在定量生物学研究工作中的应用

光片荧光显微技术 (light sheet-based fluorescence microscopy, LSFM) 在激发过程中的光学切面 (optical sectioning) 能够将荧光基团漂白 (fluorophore bleaching), 并将光毒性作用 (phototoxic effects) 降至最低限度。因此, 生物样本能够很好地适应, 从而在LSFM下进行长时间的、高分辨率的时空三维 (3D) 成像观察, 所以LSFM已经成为了发育生物学家们离不开的好帮手。

虽然透射光显微技术 (transmitted light microscopy) 能够让我们观察到被测样品的形态, 但是只有加上荧光标签之后, 我们才能在样品中准确地找出我们感兴趣的器官、细胞器或大分子等目标。荧光显微技术获取的图像有很高的对比度, 闪亮的目标荧光图像在一片灰暗的背景下异常醒目。

传统的宽视野共聚焦落射荧光显微镜 (wide-field and confocal epifluorescence microscopes) 在激发并收集荧光时使用的是同一套镜片。激发光穿过被观察物体, 沿着光线的方向, 均匀激发荧光基团, 在每一个焦平面 (focal plane) 上产生同样个数的激发荧光基团 (这是以荧光基团均匀分布为前提的)。因此, 虽然我们只聚焦在一个平面上, 但样品里的所有荧光基团 (焦平面上或以下的荧光基团) 实际上都是被激发了的。

共聚焦荧光显微镜 (confocal fluorescence microscope) 在强度探测器 (intensity detector) 前的成像平面上设置了一个小孔 (pinhole), 从而消除了焦平面外的荧光, 形成了光学切面 (optical sectioning) 能力。而且荧光的激发与检测也成了各自独立的两套系统。虽然在光线方向上的激发强度不算太强, 但是与激发强度的平方成正比的荧光发射强度 (fluorescence

emission intensity) 却没有打折扣, 而且在焦平面上的荧光强度达到最大。只有荧光强度检测方式采取了这种激发与检测分开设置的光学设备才具备这种光学切面能力和轴向分辨率 (axial resolution)。换句话说, 传统的宽视野共聚焦落射荧光显微镜是没有轴向分辨率的。

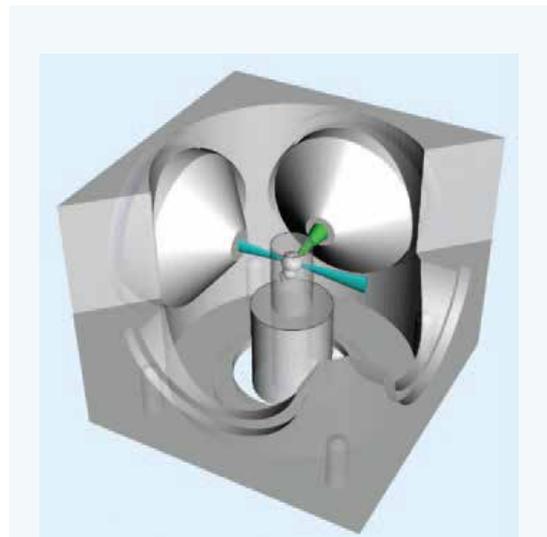


图1 LSFM显微镜的基本光学结构。与落射荧光显微镜不同, LSFM显微镜至少使用了两套完全独立的光学系统。激发系统与记录系统成直角垂直。被观察样品在焦平面上只有一个极薄的切面会被激发光照射。能够呈现出近乎真实状态下的样品3D立体图像。

荧光显微技术有以下几个非常明显的局限性。首先，不仅荧光基团可以吸收激发光，很多内源性的有机化合物也都能吸收荧光显微镜发射的激发光。这些内源性的有机化合物的降解途径与荧光基团类似，因此不会被至关重要的生理代谢进程利用。其次，在任何一个体积单元（volume element）和任何一个时间点内，荧光基团的数量都是有限的，而且荧光基团被激发之后还会被降解。因此，荧光标记样本发出的光子数也是有限的。最后一点，地球上的生物体都已经适应了太阳射线（solar flux）。虽然它的强度还不到 1.4 kW/m^2 ，不算一个非常严格的限制，但这也提示我们，在对活体生物标本进行观察时，荧光的强度不要超过 $1 \text{ nW}/\mu\text{m}^2 = 100 \text{ mW/cm}^2$ （背景知识框1）。

总而言之，只要我们使用落射荧光显微镜，就必须面对两大非常严峻的挑战。第一大挑战就是如何解决观察过程中荧光基团和样品的浪费问题。第二大难题就是如何解决在观察某一个平面时，样品里所有的荧光基团和大量内源性的有机化合物被激发的问题。显然，如果我们进行更加复杂的生物试验，比如在一段时间之内，立体地观察多个靶标的行为，那么将会面临更大的挑战。

在对活体生物样本进行观察时，这些问题都变成了绕不过去的问题，必须得到解决。LSFM显微镜可能是我们到目前为止所拥有的、能够解决这些问题的最佳技术手段。LSFM显微镜能够提供光学切面和可靠的轴向分辨率，从而有效减少了光学漂白和光毒性（表1），让科研人员能够同时记录数百万个像素，并且极大地提高了生物样品的存活率。

光片荧光显微镜里有两套主要的光学系统。检测系统包含一套物镜（objective lens）、一个能滤除激发光的光谱过滤器（spectral filter）、一个镜筒透镜（tube lens）和一个照相头。激发系统与检测系统垂

直，激发系统将光线引导到样品的一侧（图1），入射光线与检测系统焦平面重叠。我们也可以从另外一个角度来观察光片荧光显微镜，那就是在传统荧光显微镜的检测部件基础之上，至少再另外添加一套激发系统。

由于光片的厚度比低数值孔径（numerical apertures）检测光学系统的景深（depth of field）小，同时又比高数值孔径检测光学系统的景深大不了多少，所以这种光片只能够照亮焦平面周围的一小块区域。即只有在焦平面附近的荧光基团才会被激发，而焦平面以外的荧光基团都不会被激发。

这种改进带来了非常明显的效果，焦平面之外的区域，哪怕是非常靠近焦平面的区域里的荧光基团也不会被激发，发射荧光，所以图像就不会被干扰，不会变得模糊（图2），而且也不会产生光漂白效应。基于同样的原因，那些有可能会吸收激发光的内源有机分子也不会因此而降解，即大幅度降低了对样品的光毒性。

对于生物学家最感兴趣的3D成像工作，我们可以用让光片围绕样品移动，或者让样品围绕光片移动，然后记录多个平面的图像的方法，完成拍摄。研究发现，在获得同等质量图像的前提下，用光片荧光显微镜观察斑马鱼的照射剂量要比传统显微镜小300倍，比共聚焦荧光显微镜小5000倍。

此外，光片荧光显微镜能够使数据采集过程变成大规模并行的现代化工作，并且可以充分利用最近出现的（以及在不久的将来即将出现的）、最新式的摄像头，而其他没有采用独立激发系统的显微镜则不可能具备这项优势。比如，共聚焦荧光显微镜只能用一束衍射极限（diffraction-limited）光束激发样品，逐次进行拍摄。但是能够进行并行拍摄的改良版，比如旋转盘（spinning disk）共聚焦荧光显微镜却又牺牲了轴向分辨率。

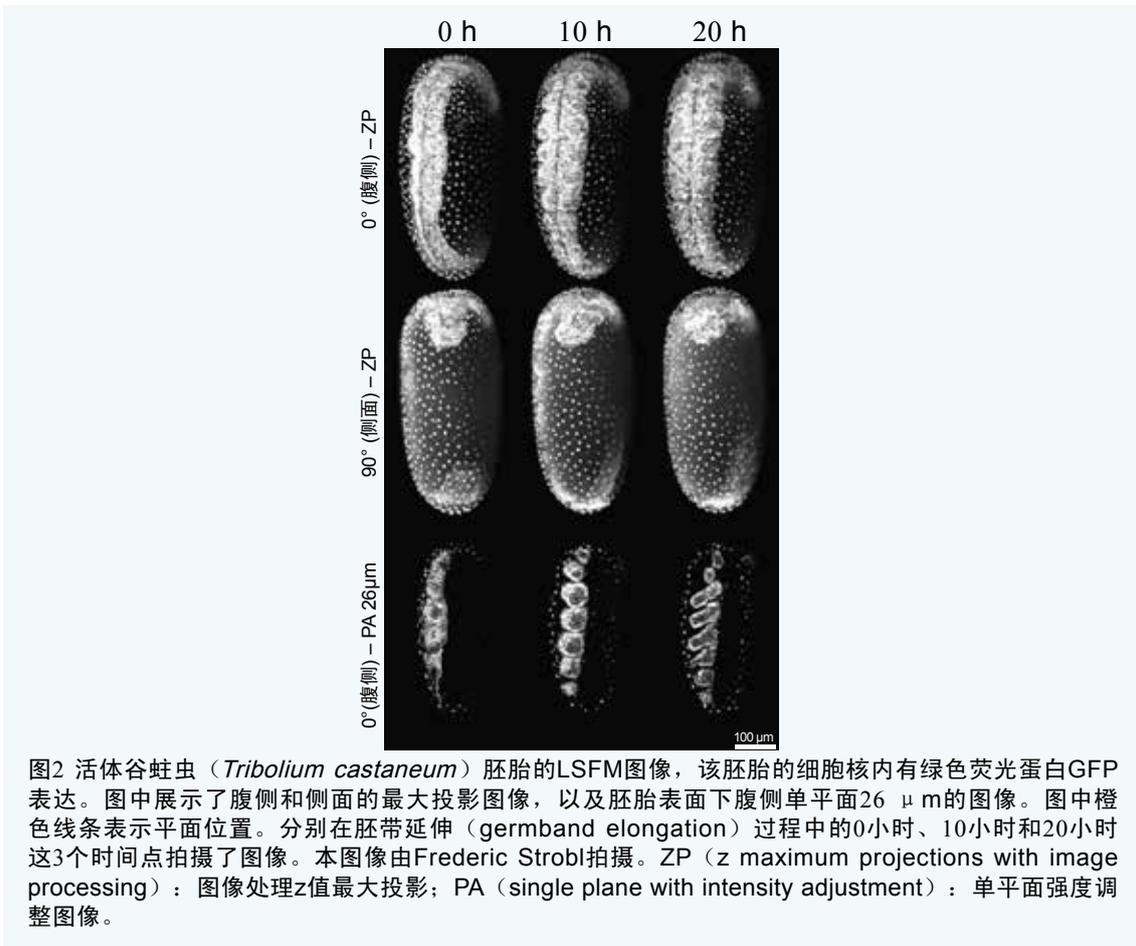


图2 活体谷蛀虫 (*Tribolium castaneum*) 胚胎的LSFM图像, 该胚胎的细胞核内有绿色荧光蛋白GFP表达。图中展示了腹侧和侧面的最大投影图像, 以及胚胎表面下腹侧单平面26 μm的图像。图中橙色线条表示平面位置。分别在胚带延伸 (germband elongation) 过程中的0小时、10小时和20小时这3个时间点拍摄了图像。本图像由Frederic Strobl拍摄。ZP (z maximum projections with image processing): 图像处理z值最大投影; PA (single plane with intensity adjustment): 单平面强度调整图像。

表1 LSFM与宽视野荧光显微技术及共聚焦荧光显微技术的对比

优势	改进	可量化的及 (或) 其他细节特点
只有被观察平面才会被照射	光学切面能力	达到传统荧光显微镜的最佳横向分辨率, 实现了真实的轴向分辨率
	低荧光漂白	只有1/300~1/5000的照射量
	低光毒性	提高了样品的存活力
拍摄记录 荧光强度	大规模并行检测	每帧高达数百万像素
	缩短曝光时间	每帧数微秒至数毫秒
	快速记录	每秒拍摄10~1000帧
	高动态范围	高达数千灰阶
	时间门控技术	SPIM-FLIM/FRET
	超高速	SPIM-FCS/FCCS可达数万帧

(接下表)

(续上表)

更低的荧光漂白能力	改进了z采样能力	轴向间距与像素间距相当
	更长的观测时间	长达数天乃至数周，而不仅仅是数小时
	提高了时间采样能力	获得更多图像和数据
	多角度成像能力	每个样品多达2-18个成像角度
每个像素光子数更高	更高的信噪比	图像处理能力得到进一步改善
	更优异的重叠合法	更多的灰阶得以保留
	更短的成像间期	每秒采集的数据量更多
	更高的分辨率	数值孔径决定分辨率
	更简化的3D图形处理流程	分节段更可靠
能量更低的激发光和更多的观察角度	可观察更厚的样品	穿透力更强
	轴向分辨率更高	等向性分辨率

SPIM (single/selective-plane illumination microscopy)：单(选定)平面照射显微技术；FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy)：荧光寿命成像显微技术；FRET (fluorescence resonance energy transfer)：荧光能量共振转移；FCS/FCCS (fluorescence (cross-) correlation spectroscopy)：荧光相关光谱学。

激发光片主要有两个来源。第一个来源是单平面(或选择平面)照明显微镜(single-plane illumination microscope, SPIM)。这种显微镜使用圆柱透镜(cylindrical len)产生光片。经校准的激光束沿与检测光轴方向平行的方向聚焦，而另外一个方向保持校准。这种光片是静态的，比较容易控制其强度，非常适合用于大规模并行检测，比如使用超高速照相机的设备。第二种方式则是数字扫描激光光片荧光显微镜(digital scanned laser light sheet-based fluorescence microscope, DSLM)。这种显微镜通过不断地调整一个位于共轭平面上的镜片，使聚焦光束在检测透镜的光平面上来回移动以产生光片。这完全依靠圆形对称的光学系统，而不需要使用圆柱透镜。与SPIM不同，DSLM的照明系统毫不连贯，所以产生的伪像也更少。光线的强度也是可调的，能够产生结构性照明(structured illumination)，或者与线性探测器(line

detector)同步的照明。这种显微镜的不足之处在于线性排列样品需要更多的时间，和有强度更高的激发光。

不久的将来，不论是SPIM还是DSLM，其发展势必会涉及照射部件。人们已经提出了Bessel光和Airy光这两种光子激发模式，以提高激发光的穿透力。Bessel光和Airy光技术都能够提供更远、更窄的视野，而且还能够提供与光活化定位显微技术(photoactivated localization microscopy)、随机光学重建显微技术(stochastic optical reconstruction microscopy)以及受激发射损耗显微技术(stimulated emission depletion microscopy)相当的超高分辨率。以上这些优势都已经在对固定的、较薄(清晰)的、或者较厚的样品观察实验中得到了验证。Betzig等人将LSFM技术与相关结构照明显微技术(coherent structured illumination microscopy)相结合，而开发的新技术尤为

引人注目。在这种新策略里，用几束Bessel光取代了传统的Gaussian光，进一步缩小了光片的厚度。这一改进，让LSFM显微镜更加适合观察较薄的样品：1至2个细胞层厚度的样品和较厚样品的浅层。其分辨率与共聚焦荧光显微镜相当，而拍摄速度、帧数和成像持续时间都有了较大幅度的提升。

科学家早在100多年以前就听说了光片显微镜，也都知道光点（light spots）显微镜。而直到上世纪60年代初，激光出现之后，光点和光片显微镜才都解决了衍射极限的问题。以受限衍射光点对样品进行顺序照射（sequential illumination）的共聚焦荧光显微镜离不开激光，激光也是真正实现光学切面（optical sectioning）的必备要素之一。目前人们已经建造了很多包括可变焦距放大观测器（macroscope）在内的各种激光光片设备（Laser light sheet-based devices），但是这些光学仪器的显微能力还一直没能得到很好的展现。直到2002年左右，我们在欧洲分子生物学实验室（European Molecular Biology Laboratory, EMBL）的课题组提出了一套衍射极限激光光片荧光显微镜（diffraction-limited laser light sheet-based fluorescence microscope）的新思路，并将其应用到对活体生物学样品的观测工作中，进行了多角度成像能力的评估。这项工作起始于上世纪90年代初，我们系统地评估了各种衍射极限显微镜（diffraction limited microscopes），包括从有2个镜片到有4个镜片的显微镜，从理论到实践进行了全方位的评估。

LSFM已经给荧光显微技术领域带来了革命性的改变，而且这种改变还将持续下去。这种显微镜采用了一种非常简单，但是又非常精巧的光学设计，能够在较大的视野里实现真正的光学切面。使用现代化的拍摄技术，LSFM显微技术每秒能够拍摄数千帧图像，且分辨率也与共聚焦荧光显微镜相当，但是信噪比却比共聚焦荧光显微技术高2个数量级。由于LSFM对样品的照射强度要低2至4个

数量级，因此光漂白和光毒性都有大幅度降低，这一点对于需要“挺过”数百万帧图像拍摄的胚胎、植物和组织切面等生物样品都非常重要。LSFM可以从多个不同的角度对样品进行观察，而且由于该技术能够与目前，乃至今后可能会出现各种照相器材搭配，所以可以以其无与伦比的速度、质量和工作时长应用于荧光相关光谱学（fluorescence correlation spectroscopy）显微镜、荧光共振能量转移（fluorescence resonance energy transfer）显微技术以及荧光长时成像显微技术（fluorescence lifetime imaging microscopy）等多种设备。

同时，LSFM已经给大规模图像处理（large-scale image processing）领域带来了革命性的变化，而且这种改变还将持续下去。为了满足对数小时、数天甚至数周内3D生物进程的了解需求，光片荧光显微镜的出现让我们得以通过多个不同的角度和多个通道展开记录，获取成千上万的图像信息。如果能够在较短的时间里记录数百万帧图像，那么数据量很快就会达到好几十个TB的数量级。这么大的数据需要存储、整理、归类和处理。高质量的图像和很高的时空分辨率均意味着我们必须将如此海量的图像数据整理成表格和索引，并且生成时间函数，这才是更加精准的信息处理方式。

LSFM同样已经影响了生物样品的制备流程，并且势必会改变我们对生物样品存活力的态度。传统的荧光显微技术对于生物样品的制备有着非常严格的要求，样品制备往往都需要在平整、坚实的表面上操作。LSFM能够做到以样品为中心，让光学检测为样品服务。我们能够以新的、前所未有的方式准备生物样品，充分保留样品的3D结构，开展迄今为止都不可能完成的试验。拥有复杂结构、较大的、多细胞的生物样品，也能够接近生理环境的条件下进行观察；胚胎甚至能够在被观察50个小时之后继续存活，并正常生长、发育成为成熟的个体。光片荧光显微镜应该成为所有定量

研究工作的研究手段之一，而且是用近乎生理条件的手段开展生命科学研究，获取试验数据的研究手段之一。

最后，我们也不应该忘记这一点，任何技术的进步都不是为了重复以往的试验，而是为了开展新的研究，寻找更新的答案，并且对过往的观点提出新的质疑。用新的方法，为光学（荧光）观察制备生物样品，这不应该被当作是一个问题，而应该被看作是一次机遇——让我们能够做得更好的机会。光片荧光显微镜生

成的大量数据也不应该被看作是一个让人头痛的问题，而应该看作是让我们有机会了解生物本质的好机会。当我们追踪观察正在发育中的胚胎里的细胞时，分处在不同时空的数据也不应该让我们感到束手无策，这些信息正好是检验各种新的、挑战机械呆板老观念的生物模型的好素材。光片荧光显微镜在生命科学研究工作中的应用虽然才刚刚起步，但是已经掀起了一股革新的浪潮。



背景知识框1

生物样品成像工作中的光毒性。

生物样品究竟能够接受多少光照？关于这个问题，并没有一个统一的答案，但是所有曾经接触过荧光显微技术，或者转移光显微技术（transmission light microscopy）的人都知道，光照与生物样品的存活力之间存在负相关的关系。大家都有以下几点共识：（i）照射光波长较短时光毒性效应较大，（ii）荧光的影响较大，（iii）照射光的强度越低、能量越低越好。假设有许多有机分子都能够吸收激发光（而不是荧光），但是依旧会降解，那么对任何活体标本进行观察就都应该尽可能地避免荧光漂白作用。

太阳常数（solar constant）也许可以给我们一点小提示，该常数在赤道的数值大约为 1.4 kW/m^2 ，在欧洲中部大约为 1 kW/m^2 。到了显微镜下，就大约相当于 $1 \text{ nW}/\mu\text{m}^2$ 或 100 mW/cm^2 左右。因此，我们大致可以推算出最大放射剂量应该在 $0.5 \mu\text{J}/\mu\text{m}^2$ 左右，而生物细胞或胚胎的最大承受剂量分别应该是数毫焦和数百毫焦左右。但很少有显微镜可以在如此低的照射剂量下（也被称作一个太阳下）正常工作。不过光片荧光显微镜是为数不多的例外中的一员。共聚焦荧光显微镜和超分辨率显微镜往往都需要“好几个太阳”。这对活体生物成像是一大挑战。

赤道处的太阳常数： $1,366 \text{ W/m}^2 = 1,366 \text{ J/s}\cdot\text{m}^2$

欧洲中部的太阳常数： $\approx 1 \text{ kW/m}^2$

显微技术相关单位（Microscopy relevant units）： $\approx 1 \text{ nW}/\mu\text{m}^2 = 100 \text{ mW/cm}^2$

600秒内的能量密度： $\approx 0.6 \mu\text{J}/\mu\text{m}^2$

细胞直径约为 $100 \mu\text{m} \times (0.3 \text{ s或} 10 \text{ min}) \approx 2.4 \mu\text{J或} 4.8 \text{ mJ}$

胚胎直径约为 $900 \mu\text{m} \times (0.3 \text{ s或} 10 \text{ min}) \approx 190 \mu\text{J或} 380 \text{ mJ}$

BioPh China 2015

2015生物制药与技术中国展



同期举办: CPH China 2105
十五周年华诞 荣耀呈现

2015年6月24-26日 上海新国际博览中心 (SNIEC)

www.biophchina.com

展示范围

抗体
生物燃料
生物制剂
生物制造
生物工艺
细胞生物学
临床试验

新药研发
基因组学/遗传学
个体化用药
干细胞研究
仿制药
疫苗

生物信息
生物制药科技
给药系统
纳米技术
平台技术

商业服务
云计算
知识产权
法规合规
技术转让

同期论坛: 第二届生物制药峰会

模块一: 法规更新与解读	
9:30-10:00	签到
10:00-10:05	开幕致辞 夏明德 资深总监 美国强生集团
10:05-10:35	中国生物类似药研发法规与策略 廖明阳 首席专家 国家北京药物安全评价研究中心
10:35-11:05	生物仿制药在中国的机遇与挑战 张海洲 医学与转化中心执行副主任 上海中德国际药业股份有限公司
11:05-11:15	茶歇与交流
11:15-11:30	问答环节
模块二: 市场分析展望	
13:00-13:30	生物仿制药市场预期 Rong Chen 医学总监 葛兰素史克
13:30-14:00	跨国药企并购态势分析与未来趋势预测 柯美廷 顾问董事 高盛(亚洲)有限责任公司
14:00-14:15	Tea break and Networking
模块三: 技术优化与创新	
14:15-14:45	质量源于设计(QoD) - FDA视角 董武格 FDA前任官员 蓝特咨询负责人
14:45-15:15	生物制药设施设计在中国的机遇与挑战 Scott M Wheelwright 首席顾问 苏州智真生物技术咨询有限公司
15:15-16:15	未来生物制药产业发展趋势探讨 夏明德 资深总监 强生集团 董武格 FDA前任官员 蓝特咨询负责人 吴辰冰 研究院院长 上海中德国际药业股份有限公司 Rong Chen 医学总监 葛兰素史克
16:15-16:20	闭幕致辞

部分参展企业



010-58036295/021-33392255



五、为具有探索精神的生物学家定制的光片显微技术应用指南

光片显微技术在经过十年的发展后，已经“华丽丽地”向世人展现了它的功能。这项技术能够帮助生物学家处理一系列科学问题，但是生物学家是否为此做好了充分的准备呢？下文我们讨论了光片显微技术为生物学家所带来的跨学科挑战，并且详细介绍了我们可以利用的所有资源。

光片显微技术的显著特点是它可以进行长时间的生物3D成像，同时不会对样品造成任何伤害。这主要因为光片显微镜的照明装置与观察轴相互独立，待检样品上只有被成像的那部分才会受到照射。此外，该技术采用广角观察装置，例如电荷耦合元件（charge-coupled device, CCD）摄影头来发出荧光信号，从而获得了令人惊叹的成像速度。上述所有优点结合在一起，光片显微镜以前所未有的时空规模打开了观察生物进程的一扇窗户。但是别高兴得太早，与往常一样，天下是没有免费的午餐的。想要充分利用光片显微镜这些令人“惊艳”的功能，是要付出代价的：它们需要生物学领域以前所未见的程度进行跨学科合作。

2014年8月，首届光片显微镜欧洲分子生物学组织（EMBO）培训课程在德国马普学会分子细胞生物学与遗传学研究所（MPI-CBG）召开（详情见：[http://openspim.org/EMBO_practical_course_Light_sheet_](http://openspim.org/EMBO_practical_course_Light_sheet_microscopy)

[microscopy](http://openspim.org/EMBO_practical_course_Light_sheet_microscopy)）。从培训课程中，我们可以看出跨学科合作的需求越发明显。两周密集地对各种不同的样品进行成像的课程，反映出如果要想进行一次成功的光片显微实验，必须要有强大的专业知识和技能。尽管这次课程侧重生物应用，但是它不得不覆盖各个学科，例如物理学、工程学、化学、计算机科学以及信息技术。事实证明，生物学家对采用光片显微镜来研究生物系统的欲望非常强烈，以至于他们不得不迈出自己熟悉的生物领域，走向跨学科合作。不过，值得庆幸的是，得益于过去10年来光片显微镜团体在商业与学术资源上的收集与整合，这种跨学科合作变得越发容易。下面我们将讨论现有的光片显微镜硬件、正在发生变革的样品制备技术、在多用户环境下运行光片显微镜面临的挑战、成像过程以及大规模数据的处理策略。目前正在逐步壮大的光片研究团体将会帮助生物学家开启下一个十年的探索之路。

1. 光片显微技术的硬件设施

生物学家可通过以下三种方式来获取光片显微技术，它们分别是购买商用系统、与“光片”实验室合作以及建立自己的显微镜系统。

目前市面上有三款光片显微技术商用设备，可以满足不同的需求。来自Carl

Zeiss Microscopy公司的Z.1光片显微镜（Lightsheet Z.1）（图1a）是一款经典的选择平面照明显微镜（selective-plane illumination microscope, SPIM），它可以从两边提供激发波长范围很宽的光来照射样

品。两个摄像头（CCD与科学级别的互补金属氧化物半导体（scientific complementary Metal-Oxide-Semiconductor, sCMOS））与精准的样品位置调节系统连接在一起，实现了长时间的、同步双色的、多角度的活体生物成像。这款显微镜水平放置，样品垂直放置在显微镜内部，同时，我们通过一个可以旋转的平台来移动光片，以实现样品多角度成像。这款Z.1光片显微镜是在Huisken和Stelzer两人独创的设备的基础上开发出来的，随后还获得了进一步的改良，即通过让光片绕轴旋转，来减少干涉条纹。这款显微镜主要用于对生物发育进程进行长时间的延时多角度荧光成像，但同时它还有其它多个用途，例如对固定的和较薄（清晰）的样品成像。下面我们来介绍另一款商用显微镜，即来自德国LaVision BioTec公司的超级显微镜（Ultramicroscope）（图1b）。这款显微镜的待检组织样品可达数厘米，并以薄片的形式被放置于水或有机溶液中。Ultramicroscope兼具大视野与规格统一的光片厚度（激发波长范围很宽），是对大型、较薄（清晰）的、荧光标记的组织样品进行高通量、多色成像的首选仪器，尤其适用于神经生物学方面的成像操作。这款显微镜是在Hans Ulrich Dodt发明的超级显微镜的设计的基础上开发的。在这种立式结构中，样品被浸泡在一个透明介质里，并且一起被放置在一个专用的平台上。该平台可以通过水平光片垂直移动。由于这个系统不能旋转，所以也就不能实现多角度成像，但这点其实并不是较薄（清晰）的样品所必须的。最后，与现有的光片几何构型（图1c）相比，Applied Scientific Instrumentation公司提供了一些部件，制备成放置在倒置的显微镜（携带倾斜结构）（图1d）上的、拥有一个单边或双边的光片装备（分别是iSPIM或diSPIM）。这个系统的样品同样是不能旋转的，但是却可以对放置在载玻片上的大面积的样品进行快速扫描。它是在Hari Shroff发表的论文中提到的仪器的基础上开发出来的。这款显微镜特别适用于组

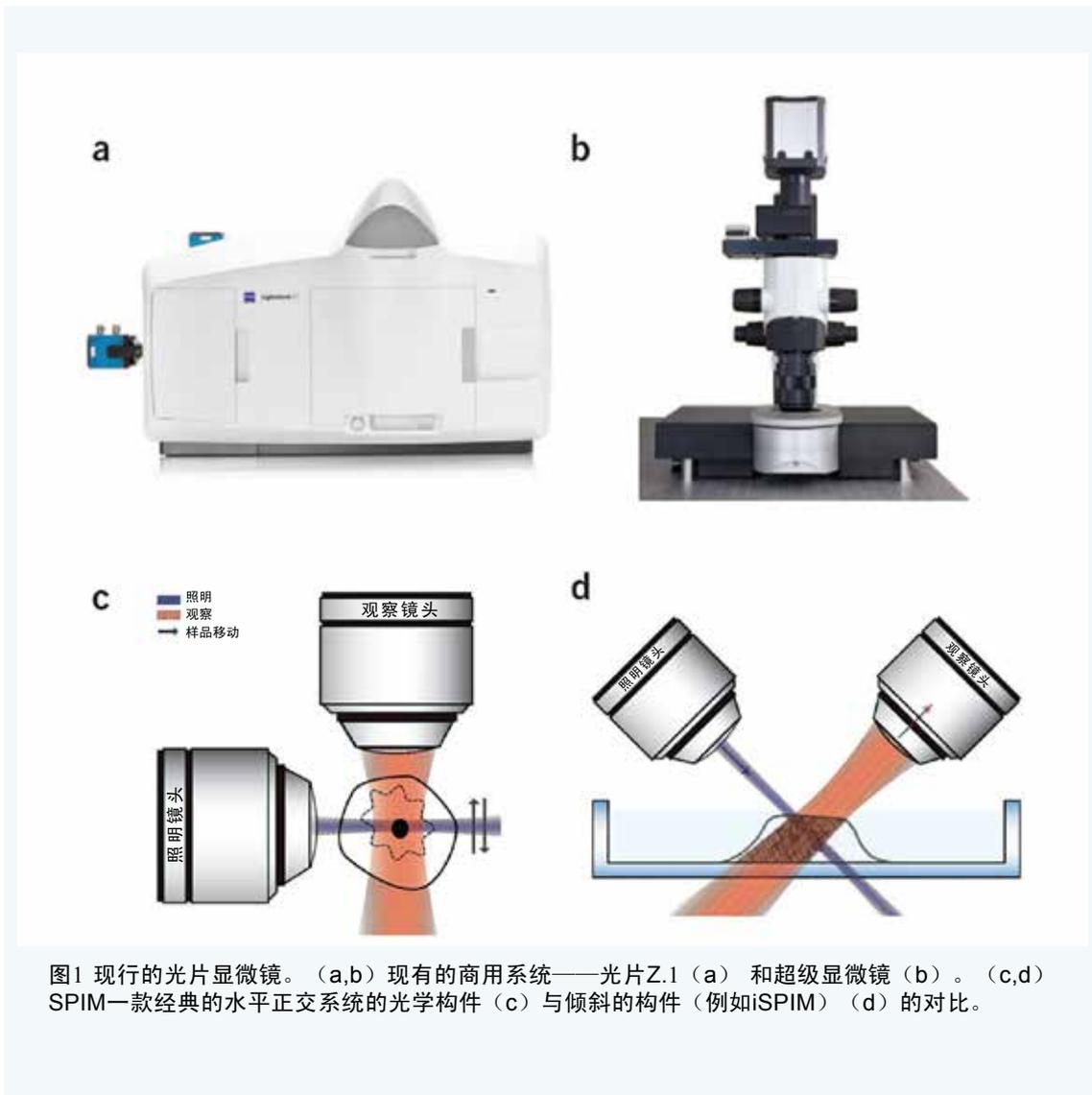
织培养细胞和其它在玻璃器皿上制备的样品的成像以及高通量筛选。虽然上述系统的应用范围比较广泛，但是如果改造它们，以适用于其他样品（例如新型模式器官和外来品种），或其他成像技术以及图片处理技术则并非一件容易的事。但是，光片技术可以“围绕样品来展开”——也就是说，必要的光学条件可以根据样品固定与其培养需要来调整——从而有望构建适用于特定用途的各种自制的系统（图2a）。

商用的显微系统都是最近才发展起来的，所以大部分已经推出的技术应用主要来自于开发显微镜的物理实验室，或出自于他们与生物学家合作成果。Eric Betzig近日发表的论文就充分证实了上述情况。论文里，他介绍了晶格光片显微镜（lattice-light-sheet）利用无衍射贝塞尔光束和结构性照明来减少散焦激发的技术。但是，对一位对显微技术感兴趣的生物学家而言，拜访光学技术开发者的实验室有时并不实际，因此，Betzig现在通过Janelia Farm（美国一个新型的科研机构）新建立的先进成像中心（Advanced Imaging Center），为生物学家提供了一个使用晶格光片显微镜的机会。这种情况让人联想起“大物理学（big physics）”方法，即科学家冲着仪器奔去，而不是相反。另一种选择就是，生物学家可以根据现有的设计图来建立晶格光片显微镜，但这种富有挑战性的行为需要一名真正的物理学家的参与，因为这种仪器的结构真的非常复杂。发育生物学需要实现多角度成像，因为它样品的大小从几百微米到几毫米不等，而四透镜光片显微镜是目前最先进的技术（图2b）。

最后，也是很重要的一点是，在过去10年里，在光片技术的婴儿期，许多生物实验室都选择亲自建立自己的基础光片显微镜。最近，两个平台——OpenSPIM和OpenSPINMicroscopy定制了DIY过程，并且非常详细地介绍了SPIM的装配步骤和操作步骤（图2a）。这些平台将会帮助研究人员构

建一个团体组织，从而集中各种人才来改进显微镜的设计，并促进该技术的进一步发展。目前全球大概有50个OpenSPIM装置正在构建中，但是在公开的OpenSPIM wiki中介绍这种活动的相关资料却很少。与开放源代码软件（open source software）不同，共享理念和解决方案的思维方式还没有在光学技术开发研究团体里面生根发芽。DIY的模式，虽然听

起来不那么吸引人，但却出奇地成功。我们在EMBO的课程中与那些从没接触过光学技术的研究人员一起构建了4台OpenSPIM。虽然这些显微镜无法与更为先进的装备匹敌，但是我们更在乎的是将各种零散的部件构建成像系统的趣味性和教育性。与其它更为复杂的显微技术相比，这种开放存取平台使这项技术非常“诚实”和容易复制。



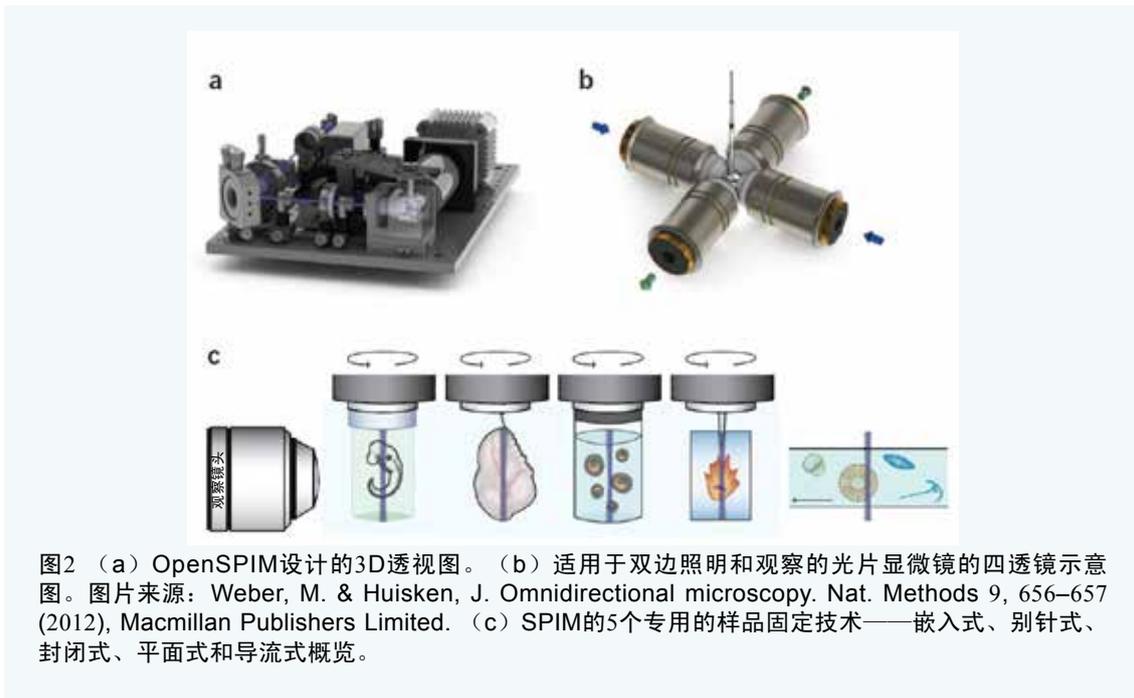


图2 (a) OpenSPIM设计的3D透视图。(b) 适用于双边照明和观察的光片显微镜的四透镜示意图。图片来源: Weber, M. & Huisken, J. Omnidirectional microscopy. Nat. Methods 9, 656–657 (2012), Macmillan Publishers Limited. (c) SPIM的5个专用的样品固定技术——嵌入式、别针式、封闭式、平面式和导流式概览。

2. 忘掉盖玻片

在生物成像中，关键环节是（或者应该是）样品。生物样品有各种大小，并且它们的光学特性各有不同。十多年来，显微镜决定着—份理想样品的模式：薄、平以及透明。而光片显微镜却可用于对特殊的、通常是3D的样品的成像，这就意味着它可以抛开盖玻片，并且有了这种显微镜，样品制备不再局限于—些方案。样品制备对于光片显微镜来说还是一个崭新的领域，所以对它的研究大有可为，同时学术界也在不断地发表着关于样品新型固定技术（例如聚全氟乙丙烯（FEP）管和3D打印室）的文章。Zeiss的Z.1光片用户手册里面详细描述了SPIM的5个专用的样品固定技术——嵌入式、别针式、封闭式、平面式和导流式（图2c）。

稳定性是光片显微技术的核心，这样样品的成像时间就可以长至数天。很明显，但经常会忽略的问题是显微镜的光学系统以及样品的呈现方式和观察方式。水平装置（例

如SPIM）会受到重力、横向和旋转活动的影响，所以样品必须稳妥地装配好，这样才可以从多角度进行观察。立式或倾斜的系统（例如超级显微镜或晶格光片显微镜）虽然拥有载玻片或平台，但其实这种系统不大适用于大型显色样品或多角度成像。载玻片和盖玻片相结合的夹层玻片模式更是不在考虑之列。

过去10年间，所有重要的模式生物，以及更为特殊的一些样品，例如浮游藻类、活体珊瑚、受到感染的蚊子和蚜虫都已经接受过光片显微成像。由于这种系统的光毒性很低，现在我们可以很容易地实现样品的数小时，甚至数天的长时间成像；但是有一点要注意，对样品固定的基本要求就是必须得为样品提供合适的生存环境。我们必须在成像前、中、后考虑怎样才能为样品提供最优的生理生存条件。因此，确保被成像的样品继续存活，并且成功繁殖下一代就成为了光片显微实验的一个重要的组成部分。在光片显微技术中，样品接受的曝

光量并不大（这与其它荧光显微镜的样品接受的曝光量差不多），对样品造成的可能伤害主要来自与不合适的样品固定方式。总的来说，在使用这种显微技术的过程中，生物学家需要

认真制备样品：他们了解自己的样品的特性，一旦他们懂得使用显微技术，就能为样品设计提供一个最优的条件。

3. 多用户环境的SPIM成像

光片显微镜正在慢慢地跻身于全球热门的成像设备之列。但是如果想要成为核心设置，不仅仅需要进行设备的简单升级，还需要对成像实验进行颠覆性的改变。来自MPI-CBG的光片显微镜机构（Light Microscopy Facility）的数据显示，与机构里装备的所有其它成像系统相比，商用Z.1光片系统（Lightsheet Z.1）被使用的时间是最多的——每年运行5000小时。但这主要集中在少数几位为果蝇和斑马鱼的发育过程成像的使用者身上，其他进行固定样品成像的使用者并没有获得足够的访问时间，所以他们需要购买第二套系统。

EMBO培训课程还证明了一件事，就是任何想要运行这种成像设备的研究人员如果想适应多重光片显微镜，那么就需要做出多个决定。此外，哪一种样品对应于哪一台显微镜，需要考虑的因素包括如何固定样品、成像时间需要多长、将会获得多少数据、获取的数据要转移存储在什么地方、数据转移的时间要多久，以及处理及分析这些数据的策略该如何选择。如果想成功地开展实验，那么就需要生物学家、成像专家、计算机科学家以及信息技术专家一起仔细地制定整个方案。

4. 借助SPIM数据制作皮克斯电影

获取数据只是万里长征的第一步，它仅仅是了解生物样品的相对简单的一个步骤。光片显微镜可以产生庞大的数据量（通常是千兆字节的范围），这些数据从数码相机流向电脑硬盘，需几个小时甚至数天。因为这些数据量远远超过可用的电脑内存，所以即便仅仅查看这些数据都是一个不小的挑战。另外，在进行多角度采集时，如果想高效地浏览或分析这些数据，还必须对这些图像进行预处理。

鉴于光片显微镜还是新生事物，商用的数据处理解决方案才刚刚起步。对于最普通的处理任务来说，开源生物成像分析平台渐渐成为了大部分光片显微镜的可行的解决方案。早些时期，在检查获取的数据前必须花费好几个星期来进行相关的处理。但现在，为Fiji平台开

发的插入程序可以将大量的延时、多角度数据集转换成实时的、动态的3D电影。这个过程可以在计算机集群上进行并行处理，从而进一步提速。开源模式的存在则使这种情况更为可行。然而，尽管这些技术能很好地处理文档，但插件程序始终是应用计算机科学的产物，如果要使用它们，生物学家必须懂得使用这些计算机工具。

由于每一台光片显微镜都是采用不同的方式来存储它们的数据的（数据格式不统一），因此要想把数据从创造它们的实验室或公司里输出是非常困难的一件事情。其中一个挑战就是要引进一个标准的数据格式，使其适用于所有的光片成像系统。然而，现在还不够条件采纳现有的标准模式，例如标签图像文

件格式 (TIFF)。储存光片图像的数据容器必须能够通过储存的多个维度的数据访问不同的薄片,以提高成像处理的效率。目前相关人员正在尝试借助大数据可视化 (BigData Viewer, BDV) 工具,在HDF5 “filesystem in a file” 的基础上开发这种容器。这种 Fiji 插件程序就像是加载在内存上一样,可以对大图像数据进行无缝导航定位。同样地,人们改造了适用于大规模图像数据的协作注释工具包 (Collaborative Annotation Toolkit for Massive Amounts of Image Data, CATMAID),使其能够在web浏览器中展示相似的功能,而随后通过浏览器还能实现众包协作注释功能 (collaborative crowdsourced annotation)。

用于分析光片数据的方式就像技术应用一样,多种多样,覆盖了从分子到有机物的各

种生物系统。但人们的关注焦点是从现有胚胎发育数据中提炼出发育谱系树。最近发布的自动分割及跟踪解决方案则在这个任务上取得了很好的成绩,但它们仍然需要借助BDV或CATMAID工具来手工处理一些数据。此外,这种应用远远不止适用于解决典型的发育生物学问题。对固定及较薄(清晰)的脑部进行高分辨率成像、以及对鱼跳动心脏或其他活体动物心脏的神经活动进行超高速录像都需要特定的软件解决方案。生物影像信息学团体提供了一个可以扩展的和可以升级的平台,而生物学家的终极作用就是将这些工具相互结合起来并互相匹配以开展工作,以解决图像分析中存在的问题。因此,对于光片技术的爱好者来说,有基本的编程知识,起码能编写脚本语言,并熟悉Linux命令行是非常必要的。

5. SPIM重新定义大数据

将光片显微技术与其它全部或大部分成像技术区分开来的决定因素,是常规实验中产生的原始数据的存储量。光片装置输出的数据比共聚焦显微镜多出多个数量级,而如果光片装置的最先进的技术潜力被全部开发,那么它的数据量将会令那些即便是由欧洲粒子物理研究所 (European Organization for Nuclear Research, CERN) 的物理学家所取得的数据量相形见绌 (图3.a)。不过,值得一提的是,即便是常规的应用,产生的数据量都会是一个不小的挑战。

这种挑战来自于显微镜装配的电脑,因为这种电脑的存储空间有限(意味着需要将数据从电脑中移除出来)。从显微镜电脑的硬盘驱动器的速度到网络连接的带宽的每一步都有一个瓶颈期 (图3.b)。这些问题必须由经验丰富的结构设计网络布线的物理拓扑结构 (centralized network architecture, CAN) 专

家来解决。我们在EMBO课程中意识到,简单的解决方案,例如给每一位学生一个4 TB的硬盘驱动器,然后让他们将数据带回家处理,是根本无法完成任务的。

光片显微技术就像是一款要求很高的、很先进的计算机游戏。生物学家很可能无法在他们现有的电脑上玩这款游戏。也许低配置的电脑也可以运行这款游戏,但如果想要享受玩游戏的乐趣,那么就需要更换高端的硬盘了 (图3c)。鉴于光片显微技术一直在以一个比较快的节奏向前迈步,所以我们需要定期升级电脑配置,以“玩转游戏”。

数据量问题的一个非常无趣的解决方案就是将“冷数据 (cold data)” (目前没人使用或访问的数据) 转移到一个备份磁盘里,但是代价就是无法立即访问。在这种情况下,从显微镜上获得的“暖数据 (warm data)” 就应该被存储在一个大的中心网络存储单元里,

同时，正在被积极处理中的“热数据（hot data）”应该被放在一个集群或处理能力强大的电脑上。上述这种数据分类处理的安排，很明显需要复杂的处理系统，并且应该达到大学或科研机构的水平。

另一个策略就是直到手头的数据被处理完成，否则不再接收新的数据。而且，处理后的原始数据也应该被删掉，因为重复试验的成本要比储存大规模原始数据低廉。然而，大部分生物学家往往不愿意采用这个方法，试问谁愿意盲目地相信目前离完美还有很远距离的处理系统，而删掉辛苦获取的大量数据？另一方面，还要考虑一些法律规定：例如在德国，法律规定原始数据必须存储10年。那么，是时候考虑对于光片显微技术来说，究竟什么是“原始数据”了。

“驯服”海量数据的最有希望的方法就是

运用巧妙的压缩策略。我们可以降低正在处理的数据的维度——例如，通过将3D数据转换成2D的制图学投影——不过这种方法通常很难推广出去。现有的压缩算法尽管能够大大地减少原始数据总量，但如果需要考虑相互间的数据访问情况，就需要一定的成本了。那么，这时采用时间维度来快速地将数据减少到其原始数量的一部分，则不失为一个理想的方案。尽管目前计算机科学实验室正在紧锣密鼓地开展对这种压缩算法的研究，但是生物学家还是不得不处理这些令人讨厌的光片显微技术数据。信息技术（IT）并不是大多数生物学院的常规课程，然而缺少IT专业人士的支持（经常是缺少的），处理这些数据的压力就会全部落在生物学家身上。幸运的是，IT公司，例如Acquifer看到了帮助生物学家处理光片成像数据的商业前景。

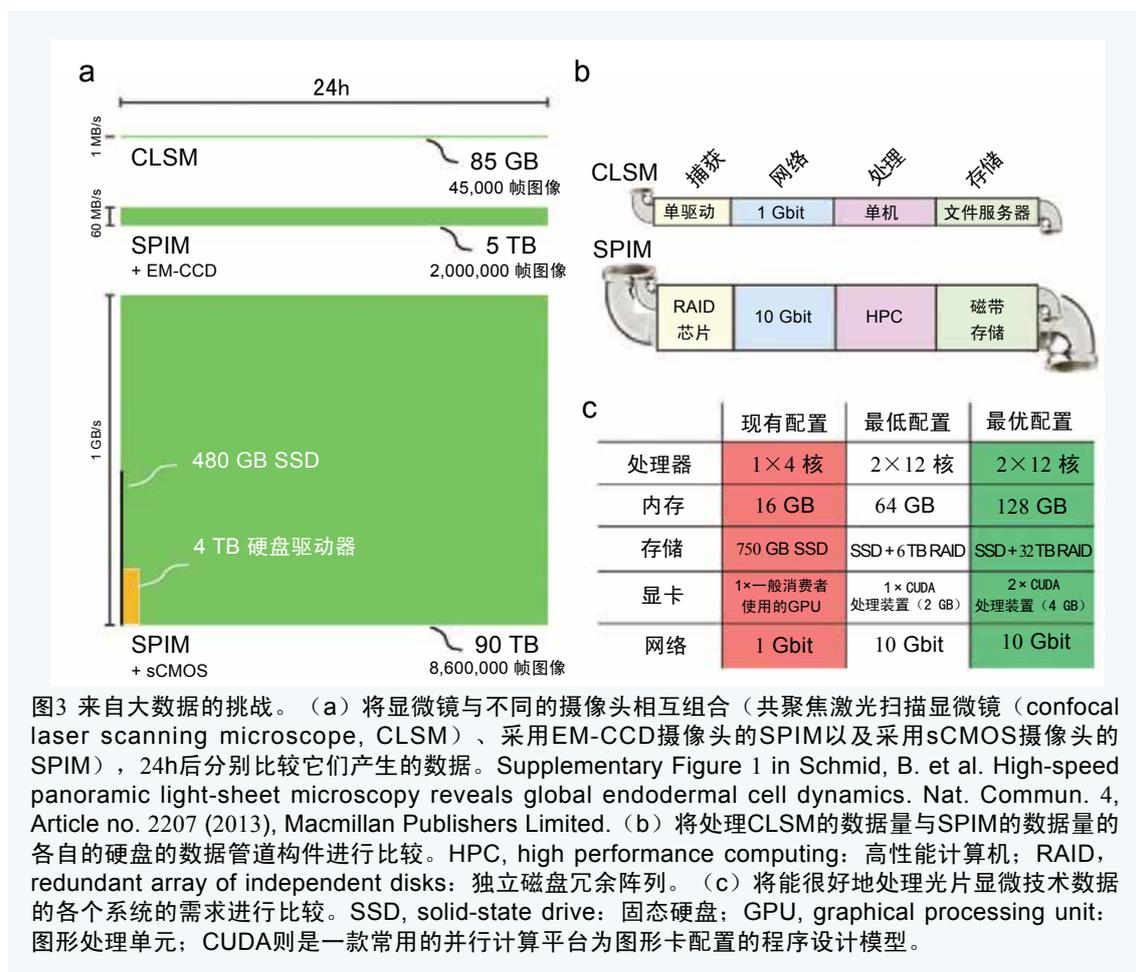


图3 来自大数据的挑战。(a) 将显微镜与不同的摄像头相互组合（共聚焦激光扫描显微镜（confocal laser scanning microscope, CLSM）、采用EM-CCD摄像头的SPIM以及采用sCMOS摄像头的SPIM），24h后分别比较它们产生的数据。Supplementary Figure 1 in Schmid, B. et al. High-speed panoramic light-sheet microscopy reveals global endodermal cell dynamics. Nat. Commun. 4, Article no. 2207 (2013), Macmillan Publishers Limited. (b) 将处理CLSM的数据量与SPIM的数据量的各自的硬盘的数据管道构件进行比较。HPC, high performance computing: 高性能计算机；RAID, redundant array of independent disks: 独立磁盘冗余阵列。(c) 将能很好地处理光片显微技术数据的各个系统的需求进行比较。SSD, solid-state drive: 固态硬盘；GPU, graphical processing unit: 图形处理单元；CUDA则是一款常用的并行计算平台为图形卡配置的程序设计模型。

6. 强大的光片显微技术团体

毫无疑问，生物学家需要技术开发者的帮助，从而将对光片技术的应用发挥到极致。幸运的是，光片研究团体具有良好的组织性与互动性。2009年在德累斯顿召开的光片荧光显微技术第一届研讨会强有力地将该领域的所有研究人员组织到一起。自此，这个研讨会每年召开一次。最开始，只有接到邀请的研究人员才能参加这个研讨会，但2014年，它便成为了一个开放性的会议。

在EMBO、冷泉港或伍兹霍尔组织的各种

成像使用课程中，人们详细介绍了光片显微镜系统。2014的EMBO课程的相关报告被记录下来，同时提供了教授光片技术操作的核心材料。除了在光片技术领域发表了越来越多的文章，几个开放存储的在线资源也已经被建立，用以收集光片技术所需样品的制备、仪器建设以及图像处理的有用的信息。我们鼓励那些开发或使用光片显微技术的研究人员有机会将他们获得的相关经验和知识共享到在线资源库里。

7. 这一切都是值得的

这10年间，光片显微镜给我们带来了什么？我们已经借助这种显微镜实时看到了跳动的心脏、胚胎从卵细胞到可繁殖的成人的各种完全的发育过程、细菌在无菌肠道的定植过程、正在生长的微管结构、生长时间长达数周的植物根部、活鱼脑部的神经活性以及以前无法镜检的组织内部的生长情况。光片显微技术让我们得以在接近生理环境的情况下成像任何器官，而不会破坏这些器官或丢失观察信号。这些显微镜为我们打开了一扇进入活体细

胞的窗户，从而让我们可以以高分辨率在空间和时间上揭示壮观的生物过程，或者让我们得以在揭示植物令人惊讶的生物多样性和动物生命的“海洋”里翱翔 (<http://oceans.taraexpeditions.org/>)。有一天，我们可能甚至可以成像人类的思想，就像它们在脑子里出现一样。尽管我们没有《星际迷航》里的飞行汽车、牵引波束、三录仪或传送器，但是我们有光片技术！

原文检索：

(2015) Pump up the volume. *Nature Methods*, 12(1):19-22.

Philipp J Keller, Misha B Ahrens & Jeremy Freeman. (2015) Light-sheet imaging for systems neuroscience. *Nature Methods*, 12(1): 27-29.

Ernst H K Stelzer. (2015) Light-sheet fluorescence microscopy for quantitative biology. *Nature Methods*, 12(1):23-27.

Emmanuel G Reynaud, Jan Peychl, Jan Huisken & Pavel Tomancak. (2015) Guide to light-sheet microscopy for adventurous Biologists. *Nature Methods*, 12(1):30-34.



Eason、Dee、悠然/编译



BIOTECH CHINA

中国(南京)国际生物医药产业博览会
The All China Biotech Conference & Exhibition

南京

NANJING

2015.09.03-05

国际博览中心

Nanjing International Expo Center



★ 规模盛大:

15000平米, 397参展商, 5733买家, 3000万美金交易额

★ 行业鼎力支持:

110余家协会、学会支持

★ 境外展商云集:

14个国家和地区的48家境外企业参展, 境外买家来自28个国家和地区

★ 媒体密集关注:

102家合作媒体, 卫视面向全国报道展前新闻发布会和展会现场盛况

★ 高端同期论坛:

主论坛外商参会比例突破60%, 同期举办近10场论坛、会议、沙龙、推介



请扫描二维码关注

我们敬候您光临展会/会议活动!



© 025-68273766

即刻登录

www.biotechchina-nj.com Go

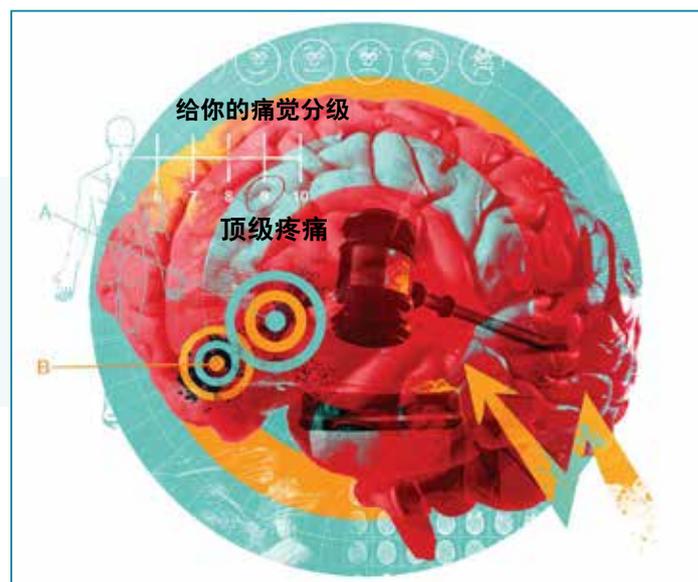
进行参观预登记, 与超过8000名行业精英共同参与生物医药行业盛会!

中国生物医药领域的
“五星级”品牌盛会!

热点

Hot Topics

疼痛的真相



大脑扫描技术（Brain-scanning techniques）让我们能够对疼痛进行一个客观的、可测量的评价，但是科研人员对这种技术是否能够应用于法庭还抱有疑问。

今年56岁的Annie（这个名字是她根据律师的建议改过之后的名字）现在只能躺着接电话，因为她刚刚才出过家门（她几乎很少出门），正在努力恢复之中。这次“长时间旅行”让她觉得包括肩膀在内的整个背部都异常酸痛。“真的是非常痛苦，让你一刻都不得安宁。”这是Annie的原话。

2011年，Annie在一家餐馆里摔倒了，伤到了她的背部和头部。自从那次摔伤之后，她就再也没好过，一直觉得疼，以至于她不得不因此而提前退休。

Annie将这家认为自己无过错的餐馆告上了法庭，要求他们赔偿数十万美元，用来支付她的医疗费和因此而导致的经济损失。为了说明Annie并不是在装病，而是真的非常痛苦，她的律师建议她去找美国康涅狄格州一家专门从事神经成像检测工作的、名为千年磁共振技术（Millennium Magnetic Technologies, MMT）的公司进行一次检测，该公司恰好在Annie所居住的伯明翰州的阿拉巴马市（Birmingham, Alabama）设立了一家检测服务中心。MMT公司表示，他们公司可以利用功能磁共振（functional magnetic resonance imaging, fMRI）技术检测到患者大脑里的疼痛信号。fMRI技术能够检测到大脑里的血流信号，并且对其进行大脑定位，以此来代表大脑里的神经活动。

这项检测并不便宜，一次检测的费用就高达4500美元，但是MMT的CEO Steven Levy却认为，这绝对是一项超值的投资。据他介绍，该公司自2013年推出这项检测服务以来，已经服务过十几个客户了，这些客户最终

全都达成了庭外和解。如果该检测也能够被应用到Annie的庭审（预计将于今年年初开庭）当中，将成为阿拉巴马州的第一例。

绝大部分的人伤案例（personal-injury cases）最终都达成了庭外和解，所以我们几乎不太可能统计出这种大脑疼痛扫描出现在民法实操中的实际频率。但是这种脑扫描在法庭上却似乎变得越来越常见，至少在美国的情况是这样的。因为美国并没有提供全民医保，而人伤案件却又频频发生。目前已经有好几家公司，并且至少有一家大学开始提供这类脑扫描服务了。

这种检测是以一种飞速发展的、非常客观的试验——fMRI在疼痛研究工作中的应用为基础开展起来的。科学家希望这种脑部扫描能够为疼痛检测提供一种客观的检测手段，而且也发现了这项技术在其他方面的应用潜力，比如用来筛选止痛药等。但是很多神经科学家却认为，该技术的准确性还远远达不到将其作为法庭证据的地步。批评者表示，开展这些检测服务的公司还没有对他们的检测项目进行验证，也并没有证明他们的检测服务毫无偏差，甚至不能证明他们的检测不是骗术。但还是有一些人认为这种检测技术具备一定的法律作用，也有一些人担心这种技术会被滥用。

加拿大多伦多大学（University of Toronto in Canada）的神经科学家Karen Davis表示，他们的确非常希望能够有一些比较客观的指标对疼痛进行衡量或者评价。但如果得到的是一个错误的结论，则会带来更大的灾难。

神经起源

医生在临床上用来评估疼痛的常用方法看起来都非常粗糙和简陋。患者往往被要求给自己的疼痛打分（从1至10逐渐递增），或者在

一系列的笑脸和哭脸的表情当中选出一张，来代表他们感受到的痛苦的程度。这种检测有助于我们了解疼痛的变化情况，比如术后恢复的

情况等。但是每个人的自我感受是不一样的，所以某个人的5分疼痛可能会等于另外一个人的7分疼痛，而9分的疼痛可能会让一个人完全丧失工作能力，当然也可能不会。

一个比较客观的评判指标可能就藏在我们的大脑里，因为只有在大脑里才能够形成痛觉。虽然每一种体验都不一样，但是痛觉还是有一些共性的元素的。美国科罗拉多大学博尔德分校（University of Colorado Boulder）的神经科学家Wager一直在尝试用fMRI方法了解人体大脑中的疼痛信号途径，他的试验方法是让志愿者摸一下火热的铁板，同时用fMRI扫描记录他们大脑里产生的相关信号。在试验过程中会调高或者调低铁板的温度，同时对大脑里的多个区域进行扫描，包括与试验手感相对应的大脑中枢区域。据Wager介绍，根据他们的研究，他们几乎可以通过大脑扫描图像准确地判断出志愿者感知到的铁板温度是有一点温热，还是非常烫手，准确性在90%以上。

但是该试验检测的是大脑对急性疼痛刺激的反应，更多的人还是像Annie那样在长期忍受慢性疼痛的折磨，这样的患者每年全世界大约有数亿人左右。虽然导致这些患者疼痛的原因都比较明确，但是却也不尽然。美国西北大学（Northwestern University in Chicago, Illinois）的Vania Apkarian对数十人进行过脑扫描检查，这些人全都是在背部受伤之后不久就接受了Apkarian的检查，然后又都在一年多之后接受了复查。结果发现，大约

有一半的人最终发展成了慢性疼痛。尽管根据这些人的自述发现，他们的疼痛历程都比较类似，但Apkarian还是发现，他们大脑里的疼痛信号出现了改变。这些患者大脑里的痛觉信号从与急性痛觉相关的脑岛（insula）部位转移到了负责处理认知行为（cognitive behaviour）的大脑内侧前额叶皮质（medial prefrontal cortex）和负责处理情绪的杏仁核（amygdala）等部位。Apkarian等人认为，痛觉变得更内化了（internalized）。

Apkarian等人开展的研究工作表明，慢性疼痛与急性疼痛有一个明显的区别，那就是慢性疼痛里还掺杂了情感的因素。慢性疼痛与抑郁症往往是相伴发生的，而且还会相互影响，相互强化。使用抗抑郁药物对某些慢性疼痛患者也能起到不错的治疗作用。但是Wager也警告说，太过在意这种关联是有一定风险的。这也提醒我们，虽然从技术层面上来看，疼痛是大脑里的事情，但这并不意味着它是我们凭空想象出来的，或者是虚构出来的。Wager表示，人们老是喜欢非黑即白式的判断。

在涉及到法律事务时，这条线的问题就显得更加突出了。美国哈佛大学法学院（Harvard Law School in Cambridge, Massachusetts）的法律专家Amanda Pustilnik表示，他们不能够因为某个人忍受了非常大的疼痛，就说他因此丧失了劳动能力，除非能够给出一个非常具体、明确的原因。

个例

美国每年都有数万起伤害诉讼，其中绝大部分案件里都会涉及无法缓解的疼痛。但美国的比例也高得太不正常了。据Davis介绍，像加拿大等同样拥有全国医疗系统的国家都没有美国这么高的疼痛诉讼比例。到目前为止，只有一例采用了脑扫描大脑成像技术的诉讼进行

到了审判阶段，该案件的原告是卡车司机Carl Koch，他曾经在2005年时被一勺融化的沥青烫伤了腰部。一年之后，他还是疼痛难忍，于是以身体伤害为由将他之前的雇主Western Emulsions公司告上了法庭。

美国纽约哥伦比亚大学fMRI研究中

心（fMRI Research Center at Columbia University in New York City）的神经学家Joy Hirsch为Koch进行了脑扫描检查。Hirsch开发了一套方法，并表示这套方法能够深入了解慢性疼痛。通过轻轻触碰Koch受伤的腰部，能够在他大脑里的感知区域，以及其它与疼痛相关的大脑部位刺激出相应的信号，但是触碰Koch腰部的其它部位就不会刺激出这些信号。所以Hirsch认为她的这套方法能够很好地区分痛觉超敏（allodynia）或者叫触诱发痛（即通常不能引起痛觉的刺激，如轻触所诱发的疼痛）与自己臆想出来的疼痛。

在庭审过程中，Western Emulsions公司找来了美国斯坦福大学（Stanford University in Redwood City, California）的神经学家Sean Mackey作为他们的专家证人。Mackey坚持认为，疼痛是一种非常主观的感受，难以用Hirsch的那套方法进行评价，而且他还指出，Hirsch的试验结果完全不能说明问题，因为如果Koch希望在他受伤的腰部感觉到疼痛，或者说他自己有意或无意地过分关注这个部位，那就会得到Hirsch得出的那种试验结果。Hirsch则辩称，在她们的扫描中并没有发现已知的、臆想疼痛的相关信号。

最终，法庭采纳了Hirsch的检测结果，判决Western Emulsions公司赔偿80万美元。据Koch的律师Roger Strassburg介绍，这要比该公司最开始提出的赔偿金额多出了十几倍。

不过Mackey也介绍了另外一种情况，即人们完全可以在这种检测中使诈。他曾经在2005年开展的一项研究中教志愿者如何欺骗fMRI，他当时并没有让这些志愿者真的摸滚烫的铁板，只是给他们看了看火红的铁板的图片，或者火苗的图片，结果也能够在脑扫描图像中观察到神经活动信号发生改变。志愿者完全可以利用这种视觉反馈，根据他们大脑里反应出的痛觉神经信号的强度（可能比实际疼痛的感觉更强或更弱）来“控制”图片中火焰的强度。Mackey正在研究是否可以利用这种技术来控制慢性疼痛，同时也在研究人们是否真

的能够欺骗脑扫描试验。

在Koch的案子判下来之后，这种脑扫描技术就在法庭上获得了越来越多的关注和应用。据目前在耶鲁大学（Yale University in New Haven, Connecticut）工作的Hirsch介绍，她当初还在哥伦比亚大学时，每个月都会进行2至3次脑扫描检测，其中大部分都与法律诉讼相关。她希望也能够在耶鲁大学开展同样的检测项目。

对于在法庭上使用的各种科学技术的最大争议就在于，目前还没有太多的文献能够证明这些检测手段的真实性和可靠性。Hirsch并没有就她的那套方法发表任何的论文，不过她自己声称，这主要是因为她觉得没有这个必要。Hirsch表示，我们大脑中的哪一个部分分别对应身体的哪一个部位，已经早有定论，而且她的大脑扫描检测也只是回答了受试者是否真的感受到了疼痛这样一个问题，并没有涉及并回答其它的任何问题。

MMT公司采取了另外一种稍微有点不同的方法，他们主要对受试者感受到疼痛前后的大脑扫描图像进行比对，由此得出自己的结论。比如会对Annie在行走一段时间之前及之后进行大脑扫描，通过前后图像比对的方法得出结论。该公司宣称，他们能够在第二次扫描时检测到非常明确的疼痛信号。但是该公司到目前为止也仅仅只发表了一篇论文（由Marks发表），而且该论文也还只是一个个例报道研究。当患者感受到疼痛之后，他的大脑扫描图像就会在脑岛部位显示出一个非常明确的、强烈的信号，该信号与人的意识及自我调控相关；在处理身体各个部位感知信息的躯体感觉皮质中枢（somatosensory cortex）里也会出现一个强烈的信号。

这些大脑中枢区域都与疼痛相关，但是他们也涉及机体内的其它很多机能。据Davis介绍，如果你去参加一次神经科学大会，随便走进哪个与疼痛主题无关的分会场，你都会发现大家讨论的其实都是大脑里的同一个部位。让Annie走一段路不仅会让她感到疼痛，同样

也会让她对自己的背部更加注意，这同样会刺激她的脑岛，产生神经信号。Davis并不赞成在法庭上使用大脑扫描试验结果，她表示，Marks的研究中引用了Davis本人对大脑不同部位的神经活动进行检测的工作，这让她感到非常困扰。Davis指出，这让她感到非常的吃惊，因为Marks等人引用的研究工作并不能支持他们的观点。

Wager也表示，除此之外，我们也无法仅仅根据一个人的检测结果就判定该研究方法是有效并可靠的。受检者的情绪、期望，乃至他们在检测时头部的轻微移动等任何因素都有可能使fMRI图像上呈现出混杂信号。如果要证明该方法有效，那就必须开展对照实验，明确指出在对照组中不存在的、疼痛所特有的信

号。而且有与该信号相应的生物学产生机制。“如果没有这些证据，那么这种扫描图像就和一堆茶叶末没什么区别。”Wager这样说道。

Marks则辩称，包括Wager之前的工作在内的研究都已经证明，fMRI扫描的确能够明确无误地区别不同的疼痛状态。他指出，他的工作只不过是之前的这些研究成果投入到一个个活生生的人的实际应用当中。Marks还表示，他们的检测方法绝不是为了鉴别受试者是否真的像他们自己宣称的那样，受到了疼痛的折磨。“我们只是让那些真的遭受了痛苦折磨的人亲眼看到，我们用图形的方式为他们展示出的他们体内的痛苦的样子。”Marks这样说道。

离市场越来越近了

使用各种不同技术的美国加利福尼亚州慢性疼痛诊断中心（Chronic Pain Diagnostics, CPD）正在计划为法律诉讼提供商业化检测服务。CPD将接受过电击（electric shock）之后的志愿者大脑扫描图像与数据库中30位存在或不存在慢性疼痛问题的志愿者的扫描图像进行了比对。结果发现，存在慢性疼痛问题的患者在接受刺激之后的大脑扫描图像与健康对照者的大脑扫描图像明显不同，他们据此开发出了一套疼痛识别软件，该软件的准确率高达92%。CPD的主席及合伙人Shaun England表示，他们的大脑扫描服务预售价在5000至6000美元之间。

Mackey也认为，这种大脑扫描商业化应用非常有意思，而且如果能够在更大范围的人群中得到更广泛的应用，其应用潜力将更加不可估量。但是Apkarian也表示，目前由于试验的样本量太小，所以还无法看到有意义的区别。就好像MMT公司使用的技术，就难以区分头部运动带来的伪像。他提醒，如果你不加

选择地盲目使用这项技术，那么你总是能够在疼痛和正常人之间找到不同之处的。

CPD的首席科学官Daniel Callan表示，他们已经找到了控制这些外界干扰因素的方法，比如对受检者的受检顺序进行随机排序，随机纳入不同年龄和不同性别的受试者等。不过Callan也承认，他们还需要进行更多的试验，才能够进一步验证他们这套软件的实际应用价值。据England介绍，他们很快就会启动另外一个研究项目。

Michael Flomenhaft是美国纽约的一名律师，他对慢性疼痛及大脑扫描成像都很有研究，据他介绍，对于法学教授和法官来说，科学家对疼痛大脑扫描可信度的关心似乎并不十分重要。“对于科学研究工作者在科学大会上作报告来说，这些科学证据也许还不够，但是对于我们法律工作者而言则已经足够了。”Flomenhaft介绍道。

也有证据表明，这些大脑扫描证据对于陪审团具有足够的说服力。研究表明，如果同时

能够提供神经科学方面的证据，公众则更加易于接受这一方的观点，哪怕他们的其它证据较差。Mackey就以Koch的案子举例道：“在庭审最后阶段提供的大脑扫描图像给了对方致命的一击。”

现如今在法庭上引入疼痛大脑扫描图像证据的努力与当年在测谎工作中使用fMRI时的情形一模一样。大部分科研工作者对于疼痛大脑扫描检测的可靠度都表示质疑。因为这些受试者与犯罪嫌疑人不同，他们各自的动机千奇百怪，所以很难对该检测技术的可靠度进行验证。但这也没有阻止众多公司尝试的步伐，虽然还不太成功，但他们也都在向美国法庭提供大脑扫描证据。随着研究的不断深入，疼痛大脑扫描技术也取得了越来越多的成功。《法律及生命科学杂志》（*Journal of Law and the Biosciences*）的分析指出，在民事案件中的使用成本要低于刑事案件，因此进入民事法庭的障碍也要小得多。

然而很多科学家及伦理学家都对这种疼痛大脑扫描检测未来的发展方向表示出了担心。Pustilnik担心这种检测会变成一种是非判断型的检测，未来也许诉讼当事人必须要提供疼

痛检测的证据，可能找医生开止疼药，或者找保险公司报销医药费也都需要提供这种证据。Pustilnik现在正在美国哈佛大学领导一个工作小组，他们正在为疼痛大脑扫描检测技术制定伦理及科学实践标准。

Levy和Marks坚持认为他们的技术还做不到这一点。Levy表示，从原理上来说，他们不能够证明某位患者不存在疼痛的问题，即他们不能够证伪。因为即使他存在疼痛的问题，我们也有可能没有检测到。

但是新加坡国立大学（National University of Singapore）的神经科学家Stuart Derbyshire认为，这种情况是无法避免的。他表示，如果我们承认大脑扫描能够发现问题，那么我们就必须接受所有的检测结果，哪怕是我们不愿意看到的检测结果。

即便如此，很多人都支持该项目继续发展，争取在包括法庭在内的更广阔的范围里开展应用。Wager表示，对于疼痛患者，我们已经有了太多的错误。比如在治疗方面，比如在法庭上，比如谁真的疼痛，比如谁该被相信。如果我们拥有更多、更新的信息，那么就能够更好地开展相应的工作。”

原文检索：

SARAR EARDON. (2015) THE PAINFUL TRUTH. *Nature*, 518:474-476.



Eason/编译

6折
免费试用

荧光染料 / 探针 / 抗体

活动时间：2015年3月10日 — 6月10日

免费试用

新型核酸荧光染料：安全无毒

6折

- 安全无毒，无致突变；
- 灵敏度高于EB和SYBR® Safe；适用于前染或后染；
- SafeGreen™、SafeRed™ 与6 × DNA loading buffer 预混，可直接使用；并且具有超高灵敏度。



图1. GreenView Plus的琼脂糖凝胶染色示意图。

货号	产品名称	激发/发射波长	灵敏度	目录价/规格	促销价
N100	GreenView™ DNA Gel Stain	488/530 nm	1~2 ng dsDNA	¥400 / 500 µL	¥240
N101	GreenView™ Plus DNA Gel Stain	488/530 nm	200 pg dsDNA	¥600 / 500 µL	¥360
N103	GreenView™ Ultra DNA Gel Stain	488/530 nm	50 pg dsDNA	¥800 / 500 µL	¥480
N102	RedView™ DNA Gel Stain	300/600 nm	1~2 ng dsDNA	¥600 / 500 µL	¥360
D012	SafeGreen™ Loading Dye	488/530 nm	50 pg dsDNA	¥300 / 1 mL	¥180
D013	SafeRed™ Loading Dye	300/600 nm	200 pg dsDNA	¥300 / 1 mL	¥180

免费试用

eLuminol™ 蛋白荧光染料

6折

eLuminol™ 蛋白荧光染料是GeneCopoeia公司最新研发的总蛋白荧光染色液。

- 极高灵敏度（0.25 — 1ng），且宽广的线性范围；
- 染色操作简单，耗时短；
- 与标准仪器兼容性好；
- 产品质优价廉，性价比高；
- 非常稳定，可常温保存。

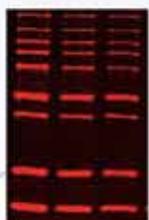


图2. eLuminol蛋白胶荧光染色示意图。

货号	产品名称	规格	目录价	促销价
P003A	eLuminol™ 蛋白胶荧光染色液	0.5 mL	¥600	¥360
P003B	(1,000 ×)	1 mL	¥1,000	¥600

免费试用

细胞结构和细胞器荧光探针

6折

探针种类齐全，选择多样，性能卓越，价格实惠！

- 细胞核、细胞质、细胞膜、细胞骨架、溶酶体、线粒体、内质网、高尔基体荧光探针；
- 与不同仪器兼容的探针；
- 膜通透性和膜不通透性荧光探针。

了解详细产品目录与信息、申请试用装等，您可以
咨询当地经销商，

或拨打4006-020-200，

或登录官网：<http://www.igenebio.com/category/product/fluorescent-labeling-and-detection/>

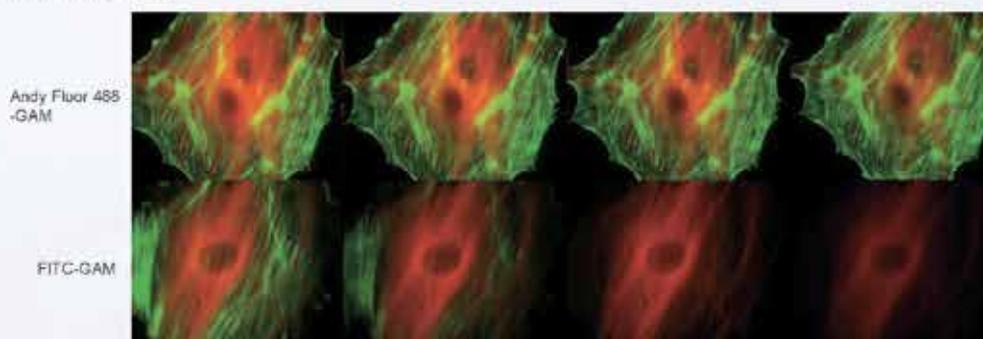
免费试用

荧光标记二抗

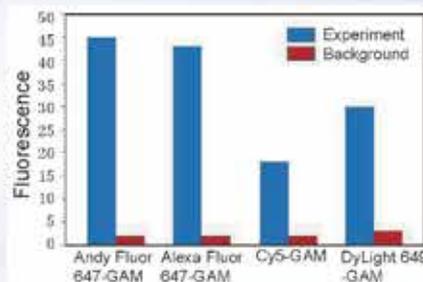
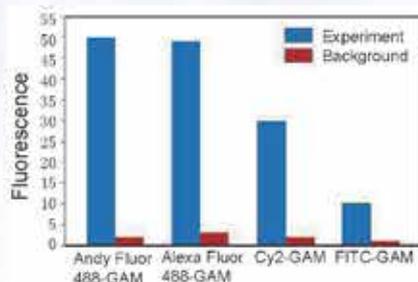
6折

Andy Fluor标记的二抗或Streptavidin（链霉亲和素），信号强、稳定性好、背景信号弱。

- 荧光稳定性好



- 荧光信号强、背景信号弱



了解详细产品目录与信息、申请试用装等，您可以
咨询当地经销商，

或拨打4006-020-200，

或登录官网：<http://www.igenebio.com/product/labeled-secondary-antibodies/>

GeneCopoeia, Inc.

Tel: 4006-020-200 020-32068595

Email: sales@igenebio.com

Web: www.genecopoeia.com

www.igenebio.com



百态

Amazing Lives

鸟类的辨色力低于人们的期望值



家鸡的辨色力测试。照片由Peter Olsson提供。

很少有动物如同鸟类一样拥有一套走秀般的装备。想想看，动物若能炫耀自己光彩照人的美丽羽毛，没有人会不被那绚丽多姿的颜色所打动吧；再配上鸟类的大眼睛和进化成熟的视网膜，使得人们相信：它们必定也拥有这

个星球上的某种最佳视觉。对此，瑞典隆德大学（Lund University）的Peter Olsson表示，他们发现，鸟类具有最高的空间敏锐度，能够察觉出极为精细的物体类型。于是，问题就来了。Olsson、Olle Lind和Almut Kelber提出，

若是鸟类拥有令人瞩目的视力，那么它们的辨色力又能好到什么程度呢？原来，鸟类拥有4种可感知色彩的光感受器（视锥细胞，配有可滤光的油腺），而我们人类只有3种，因此理论上鸟类的辨色力应该更胜一筹。那么，小鸟的辨色力到底有多强？当光线不足时，它又会受到怎样的影响呢？这就是Olsson研究小组打算探究的问题。

所幸，家鸡的训练相对容易——它们能为一啄口粮做任何事情。于是，Olsson首先对新生48小时的小鸡进行训练，首先让它们能够识别涂有橙色方格的种籽粮袋，然后给它们另一个涂有橙或黄色调（与前者相异）的空粮袋，测试它们是否能够区分出两者。此外，他还测试这些小鸡是否能从蓝/绿色调中分辨出绿色。Olsson表示，实验的主要目的就是测试完全不同的色彩类型，来确保实验结果具有更强的普遍性。最后，他在黯淡的光线条件下（光度范围从模拟的阴天（ 250cd m^{-2} ）至月光情景（ 0.01cd m^{-2} ））进行测试，观察小鸡辨别不同颜色粮袋的能力可达到何等程度。

在与小鸡耐心相处数周之后，研究小组发现：在白日的光度条件下，除了极其接近的配色之外，小鸡几乎能分辨出所有不同的色调。

但随着光度的减弱，它们开始难以分辨最深的颜色和最接近的颜色。而当研究人员将小鸡的行为与人类志愿者相对照时，却惊讶地发现：尽管小鸡标配的光感受器类型比人类的多（鸟类除了拥有人类所有的视杆细胞和感知色彩的视锥细胞之外，还有双锥细胞），它们的辨色力并不比我们更优良。当然，Olsson指出，它们所看见的色谱范围可能比人类的更广。

对于小鸡差强人意的辨色力表现，研究小组也感到很不解。于是，他们开始研究暗光下可能限制小鸡分辨相似色调的因素。Olsson说，他们相信小鸡的色觉受到了噪声限制。他进一步补充说，在低光度的条件下，可能有两种噪声起主导作用：一是光子散粒噪声，即光子在视网膜中随机出现导致噪声产生；二是暗噪声，即光感受器在没有接收到光子的情况下有时仍会出现冲动。于是，研究小组将这两种类型的噪声加入已有的计算机模拟鸟类视觉系统中，从而成功再现鸟类在暗光条件下的辨色表现。结果表明，在低光度条件下，光子散粒噪声和暗噪声均限制了鸟类分辨色彩的能力。对此，Olsson表示，要解释鸟类辨色强度的限定值，就需要考虑暗噪声的影响。据他所知，此前未曾有人提出类似的发现。

原文检索：

Olsson, P., Lind, O. and Kelber, A. (2015). Bird colour vision: behavioural thresholds reveal receptor noise. *J. Exp. Biol.* 218, 184–193.



文佳/编译

红边束带蛇释放的外激素源自体内的荷尔蒙竞争

在动物界，成功完成繁殖大业并不是一蹴而就的事情，而是有步骤的。首先，得从合适的种群中挑出其中一个；其次，挑对的性别来配对，当然，若能挑一名颇有魅力的对象，那就锦上添花了。对某些动物而言，这并非难事，因为它们的雌雄一看就有区别，后者通常比前者体型大，外表也更漂亮些。但另一些则不同，它们的雌雄性外表相似，如非使用别样的方法，那真是“安能辨我是雄雌”了。红边束带蛇（red-sided garter snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*）就是如此。鉴于其雌雄性的外表几乎一模一样，它们只好使用外激素（甲基酮）来解决区分雌雄的难题。当然，它们的外激素也毫不客气地承担了多功能的任务——帮助它们与蛇群交流、辨识性别，甚至还能成为个体的魅力值。

可是，到底是什么原因使一条红边束带蛇拥有迷人的雌性味道呢？美国华盛顿和李大学（Washington and Lee University）的Rockwell Parker、俄勒冈州立大学（Oregon State University）的Robert Mason对此极为关注。他们决定对这种外激素进行更深入的探索，研究其信号调控机制。在初始研究中，他们得知：若将雌激素（一种与雌性有特定关联的激素）注入雄蛇体内，能诱导它们产生雌性外激素。可见，雌激素对于促进雌性外激素的生成具有重要的作用。自然地，研究者就会思考：睾酮（一种与雄性有特定关联的激素）是否也有类似的作用呢？如果蛇的体内缺乏睾酮，那么单在此条件下是否足以激活蛇产生雌性外激素的表达呢？

为了研究这个问题，两位学者对部分雄性

红边束带蛇进行了假手术（未摘除雄蛇的睾丸），比较它们与去势雄蛇（摘除睾丸）产生的外激素。然后，给予部分去势蛇和正常雄蛇外源性睾酮（植入长效类固醇激素（睾酮）移植体），再与上述两组蛇（未给予外源性睾酮的假手术组和去势蛇组）进行比较，测量它们产生的全部外激素，并评估其组分。同时，对抛下雌蛇而直奔经过处理的雄蛇以求配对的野生雄蛇进行计数，以此测量经过处理的雄蛇对野生雄蛇的吸引力有多大。

经过实验，两位科学家首先确定了一个结论：与控制组相比，去势能降低雄蛇的循环睾酮总量。而当去势雄蛇与正常雄蛇同时被给予外源性睾酮之后，它们的睾酮水平平均比控制组的略高，但仍处于该种群的合理范围内。不过，与未经处理的正常雄蛇相比，去势雄蛇能产生全能性更高的外激素，且外激素的组分与一条具有吸引力的雌蛇非常相似。有意思的是，被给予外源性睾酮的去势雄蛇自动清除了这种效应，由它们释放出来的外激素组分又重新恢复成典型的雄蛇类型。最后，野生雄蛇可被去势蛇吸引，频繁地试图与它们“结交”；但对假手术组兴趣不大，对给予外源性睾酮的去势雄蛇的兴致也不高。

研究结果表明，由于去势蛇没有雄性特有的激素成分，却产生了雌性外激素，因此暗示了红边束带蛇分泌的默认信号是雌性外激素，而雄性外激素的组分仅仅在睾酮对雌性激素信号起抑制作用的情况下才会产生。因此，上述结果提示，红边束带蛇的外激素信号并非由其体内的激素所调控，而是由不同激素之间的激活竞争而导致。

原文检索:

Parker, M. R. and Mason, R. T. (2014). A novel mechanism regulating a sexual signal: The testosterone-based inhibition of female sex pheromone expression in garter snakes. *Horm. Behav.* 66, 509-516.

Correction: The hormone battle behind 'eau de snake'. *The Journal of Experimental Biology* (2015). 218, 333.



文佳/编译



百态 · 频道

www.LifeOmic.com

当qPCR试剂 遇见 表达克隆



它们降价了!

活动时间: 2015年3月10日-2015年6月10日

miRNA 定量检测 **20% OFF**

产品名称	货号	目录价	促销价
RNAzol® RT RNA Isolation Reagent	E01010A	¥800	¥640
All-in-One™ miRNA First Strand cDNA Synthesis Kit	AMRT-0020	¥1,380	¥1,104
	AMRT-0050	¥3,105	¥2,484
All-in-One™ miRNA PCR Kit	AMPR-0200	¥1,100	¥880
	AMPR-0600	¥3,135	¥2,508
	AMPR-1200	¥5,940	¥4,752
All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit	AOMD-Q020	¥2,380	¥1,904
	AOMD-Q050	¥5,680	¥4,544
miRNA Universal Adaptor PCR Primer	P01011A	¥660	¥528
miRNA qPCR Primers	上游特异引物	¥200	¥160
	内参引物	¥200	(一次购满5条)

备注: 一次性购满5条miRNA qPCR引物才可享受促销价(160元/条)。

mRNA 定量检测 **40% OFF**

产品名称	货号	目录价	促销价
All-in-One™ qPCR mix	AOPR-0200	¥555	¥333
	AOPR-0600	¥1,580	¥948
	AOPR-1200	¥2,997	¥1,800
All-in-One™ First Strand cDNA Synthesis Kit	AORT-0020	¥360	¥216
	AORT-0050	¥810	¥486
	AORT-0100	¥1,440	¥864
mRNA qPCR Primers	基因上下游引物	¥200	¥120
	内参引物	¥200	¥120

购 表达克隆，就为了 **省**！

40,000个人/小鼠基因、**150+** 种载体可选，保证序列！

GeneCopoeia专注于基因功能研究领域10多年，是NCBI推荐的克隆供应商。

全球累计引用克隆产品

1000+ 篇SCI
20分以上 40+ 篇

畅销克隆 **特惠！即日送货！**

克隆类型	载体	标签	促销价	
			< 500 bp	> 500 bp
哺乳动物载体表达克隆	M02	Native	¥980	询价
	M13	c-Flag	¥980	
	M98	c-eGFP (monomeric)	¥980	
慢病毒载体表达克隆	LV105	Native	¥980	
	LX304	C-V5	¥980	
穿梭克隆	Entry克隆 attL位点与ORF间含MCS	和Gateway®克隆技术兼容	¥980	
ORFome	Entry克隆	和Gateway®克隆技术兼容	¥480	¥980



扫一扫，关注官方微信号：**易锦生物**

GeneCopoeia, Inc.

Tel: 4006-020-200 / 020-32068595
Email: sales@igenebio.com
Web: www.genecopoeia.com
www.igenebio.com

A group of people are performing a human pyramid against a cloudy sky with a bright sun. The pyramid consists of several layers of people standing on each other's shoulders. The text is overlaid on the center of the image.

合办专题专刊
网站广告合作
邮件群发推广

请致电 (020) 32051255

www.LifeOmic.com

www.LifeOmic.com