

HeLa 细胞突起中微丝束的纳米分辨荧光成像*

陈丹妮¹⁾²⁾ 刘 磊²⁾ 于 斌²⁾ 牛憨笨^{2)†}

1)(华中科技大学光电子科学与工程学院,武汉 430074)

2)(深圳大学光电工程学院,光电子器件与系统(教育部/广东省)重点实验室,深圳 518060)

(2010 年 7 月 15 日收到;2010 年 8 月 14 日收到修改稿)

在 Matlab 编程环境下模拟了单分子定位显微的纳米分辨成像,在传统实验参数条件下,对不同间隔分子带模型进行了模拟成像.模拟结果表明,单分子定位显微方法可以区分中心相隔 20 nm 的两个分子带.同时,也分析了不同像元大小对单分子定位精度的影响.此外,通过单分子定位显微方法在 IX71 倒置荧光显微镜上实现了纳米分辨,系统极限分辨率,即半高全宽为 48 nm.在该系统上,获得了 HeLa 细胞突起中微丝束结构的纳米分辨图像.从重构获得的图像中可以看到微丝束的直径为 75—200 nm.

关键词: 纳米分辨, 单分子定位, HeLa 细胞, 微丝束, 细胞突起

PACC: 3250F, 4230

1. 引 言

荧光显微成像是一种外缘性标记的光学显微成像方法^[1,2].它借助透镜实现显微,受衍射极限的限制,空间分辨率只能达到横向约 200 nm,轴向约 600 nm.这几年,陆续出现了一些突破衍射极限的手段和方法^[3-6].目前较为有效的方法有两种^[7].一种是利用环形光在荧光点扩展函数形成前将其周边处于激发态的荧光分子实现等效淬灭.理论上可无限地压缩有效荧光发射区域,获得纳米分辨的荧光图像,例如受激辐射耗尽(stimulated emission depletion,简记为 STED)^[3]等方法.但在这一类方法中,有效点扩展函数与环形光强度有关,要对大小为几个纳米左右的单分子成像需要很高的环形光强.另一种是以光敏定位显微(photoactivated localization microscopy,简记为 PALM)^[4]和随机光学重建显微(stochastic optical reconstruction microscopy,简记为 STORM)^[5]等为代表的单分子定位(single molecule localization,简记为 SML)显微成像方法.SML 方法实现纳米分辨的理论基础是:虽然单个荧光分子弥散斑图像的大小是由显微光学系统的 Airy 斑确定,但是该荧光分子的实际空间

位置可由该弥散斑荧光强度的质心确定,其定位精度可达纳米级.故可以利用已获取的单个荧光分子的图像,通过质心定位算法,对每个荧光分子进行纳米精度的定位,最后重构出包含所有荧光分子空间位置信息的纳米分辨图像.关键问题是,在用于重构的系列荧光源图像中,显微系统每一可分辨的单元中最多只能包含一个发光荧光分子.因此用于标记的荧光分子需具有荧光开关效应,这样才可以控制分子的开关速率常数,控制分子处于荧光态的概率.SML 实现纳米分辨的基本思想都是一致的:即利用具有开关效应的荧光分子标记样品,对这些荧光分子进行稀疏激发、分时成像和质心定位,然后将不同时刻获得的分子定位信息叠加,最终获得纳米分辨图像.从实验的角度看,关键问题是如何实现高效的稀疏激发.例如,从 STORM 演变而来的 dSTORM(direct STORM,简记为 dSTORM)方法^[8].dSTORM 利用开关速率常数与激活光和去激活光强度成正比特性,通过激活光及去激活光强度调整分子处于荧光态的概率,即可获得所需的稀疏激发.

SML 的分辨率与荧光分子标记密度和分子定位精度有关.SML 的理论极限分辨能力则取决于后者.单分子定位精度受到多个因素的限制,例如在

* 国家自然科学基金(批准号:60878053)、广东省高等学校科技创新团队项目(批准号:06CXTD009)和深圳市科技计划基础研究计划(批准号:JC200903130329A)资助的课题.

† 通讯联系人. E-mail:hbniu@szu.edu.cn

一定的曝光时间内探测到的由单个荧光分子产生的荧光光子数 N 、背景噪声 b 、探测器的有效像元大小 a (即像元尺寸/成像光路放大倍率), 光学系统本身的分辨率 s (标准差), 表示为^[9]

$$\delta x^2 = (s^2 + a^2/12)/N + 8\pi s^4 b^2 / (a^2 N^2) \quad (1)$$

本文模拟了单荧光分子和不同间距荧光分子带的分子定位成像. 同时分析了探测器有效像元大小对成像质量的影响. 在此基础上, 利用实验室现有的商用倒置荧光显微镜 (Olympus 公司生产的型号为 IX71) 采用波长为 640 nm 的激光光源同时作为激活光和去激活光, 用 SML 方法实现了纳米分辨成像, 实验证明分辨率可以达到 48 nm, 并获得了 Alexa647 荧光标记的 HeLa 细胞突起中微丝束的纳米分辨荧光图像.

2. 方法与实验系统

2.1. 计算机模拟方法

所有模拟计算均在 Matlab 编程环境下实现. 模拟采用的样品大小为 $5.12 \mu\text{m} \times 5.12 \mu\text{m}$, 包含沿 y 方向排列的 6 对分子带, 如图 1 所示. 设分子大小 10 nm, 产生的荧光波长 670 nm (为 Alexa647 的发射峰波长). 第 i 对分子带的中心间隔为 $(2^{i-1} + 1) \times 10 \text{ nm}$ ($i = 1-6$).

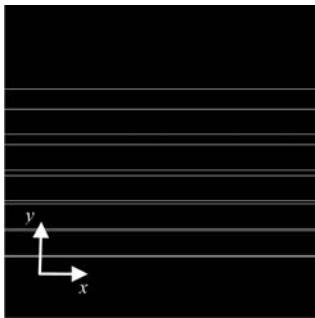


图 1 用于计算机模拟的样品结构, 沿 y 方向分布 6 对中心间距分别为 20, 30, 50, 90, 170, 330 nm 的分子带

探测过程中, 分子处于荧光态的概率为 $p = 0.001$, 模拟采用的光学系统参数如下: 物镜放大倍率 100, 数值孔径 $NA = 1.4$, 探测器像元大小为 8, 12 或 $16 \mu\text{m}$. 探测到的单荧光分子发出的光子数假设为 2000. 叠加的噪声分为 Poisson 分布的信号噪声和 Gauss 分布的背景噪声. 用于重构的源图像为 2000 幅. 用于重构的源图像生成方法流程如图 2 所示. 首先, 根据概率统计随机采样, 然后经光学系统

后获得由成像光路点扩散函数导致的模糊图像; 根据像元大小对上述图像进行像素化采样; 最后加上 Poisson 分布的光子计数噪声和 Gauss 分布的背景噪声. 背景噪声均值为 $20e^-$, 标准差为 $10e^-$, 相当于目前使用的 EMCCD 参数.

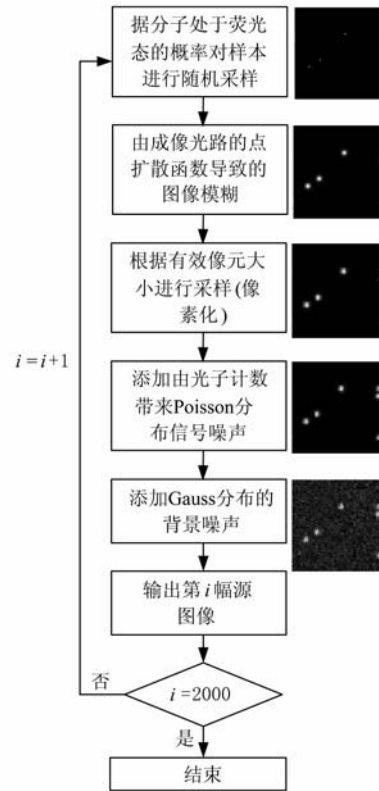


图 2 用于重构的源图像生成

2.2. 实验生物样品的纳米分辨成像实验装置

实验采用的样品为 HeLa 细胞为一种子宫颈癌细胞. 用 Alexa647 耦连的鬼笔环肽 (phalloidin) (美国 Invitrogen 公司提供) 对细胞中的微丝进行标记. 具体标记过程分为细胞固定、破膜、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 封闭和微丝标记 4 个步骤. HeLa 细胞经 4% 的多聚甲醛固定 (10 min), 接着以 0.2% 的 Triton X-100 破膜 (10 min), 再用 2% BSA 封闭 (30 min), 最后用 Alexa647-phalloidin (以 $1:10^4$ 稀释于 1% BSA) 孵育 (4 °C 过夜). 以上每个步骤结束后均用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, 简记为 PBS) 洗 1—2 遍. 在 SLM 成像前, 将 PBS 换成成像 PBS, 后者由普通 PBS 和 1M 的 β -巯基乙醇 (β -Mercatoethanol, MEA) 按 8:1 的比例混合而成, 并加入抗荧光漂白的氧萃取系统: 葡萄糖 (50%)、葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶.

用于系统稳定性测试的样品的制作过程为:将 Alexa647-phalloidin 稀释至 10^{-9} M 量级浓度;然后取 10 μl 滴在盖玻片上;甩胶机以每秒 1000 转的速度使 Alexa647-phalloidin 稀释液均匀分布在盖玻片上;在盖玻片上滴加 50 μl 的成像 PBS,封片。

实验样品的纳米分辨成像在基于荧光显微镜的成像系统上进行.系统以 IX71 倒置荧光显微镜为基础;物镜放大倍率 100, $NA = 1.4$;640 nm 的激光同时作为激活光和去激活光;采用电子倍增 CCD (EMCCD, DU897D, Andor) 作为探测器,探测器有效像元大小为 16 μm ,制冷温度 -80 $^{\circ}\text{C}$.源图像采集时,单幅曝光时间为 20 ms,图像采集频率约为 46 Hz.

3. 结果与讨论

3.1. 模拟分析

图像重构步骤如图 3 所示.

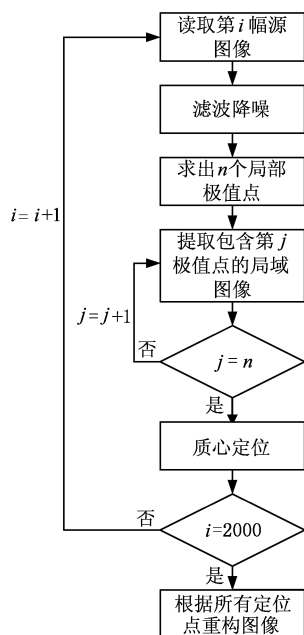


图 3 图像重构流程

首先对单个分子进行模拟定位分析.这里采用的像元尺寸为 16 μm .对位于坐标零点 $(0,0)$ 的单个分子进行重复成像(2000 幅),再用重构软件进行定位,获得 2000 个定位点,如图 4(a)所示,分析这些定位点的坐标分布.由于图像的中心对称,这里只给出 y 坐标分布(图 4(b)中竖条表示),并用

Gauss 函数拟合(图 4(b)中实线表示),可以确定定位点坐标分布的标准差分别为 3.73 nm,相应的半高全宽(FWHM)为 8.79 nm.根据定位精度公式,即(1)式,在上述参数条件($s = (0.61\lambda/NA)/\sqrt{8\ln 2} = 123.97$ nm, $a = 16 \mu\text{m}/100 = 160$ nm, $b = 10 e^-$, 光子数 $N = 2000$)下,理论极限定位标准差为 3.81 nm,对应 FWHM 为 8.98 nm.计算机模拟分辨率和理论极限分辨率几乎一致.

当像元大小不同(分别为 8, 12 和 16 μm)时,得到的定位点的坐标分布的 FWHM 不同,如图 5(a)所示.这个模拟的结果和理论上定位误差(FWHM)随像元大小的变化(图 5(b))规律是一致的.在模拟参数下,当像元大小为 16 μm 时,定位精度最高.

像元尺寸为 16 μm 时,对模拟的样品(图 1)进行成像并重构,得到的图像如图 6(a)所示.放大 6(a)内方框所示的局部区域(图 6(b)),可以看到对于中心间隔为 20 nm 的第一对分子带,可以分辨.分析中心间隔为 20 nm 的第一对分子带的重构图像,沿 y 方向的强度分布如图 6(c)中的竖条所示.按两个 Gauss 函数之和进行拟合(如图 6(c)中的实线所示),可以得到两条分子带的中心位置的坐标分别为 1502 和 1521 nm,和模型中分子带的实际位置 1505 和 1525 nm 几乎一致.

3.2. 系统稳定性测试

系统的稳定性可以通过下面的方法加以验证,即对单分子(如图 7(a)中箭头所示)重复定位,再根据定位点坐标的分布确定系统的稳定性.这样得到的系统稳定性已经包含了软件定位误差的影响.

为了确保在实验中是单分子成像,从它的荧光强度随时间的变化曲线(图 7(b)),即闪烁特性可以加以判断它的荧光强度只有 2 个等级(对应荧光态和非荧光态),具有单分子所特有的闪烁特性,因此可确认其为单分子.根据单个 Alexa647 分子 1500 次定位得到的质心点的 x, y 坐标分布(图 7(c)和 7(d)中竖条表示)及 Gauss 函数拟合的结果(图 7(c)和(d)中的曲线),可以看出,在现有系统的成像条件下,质心定位的 x 和 y 方向的定位精度(FWHM)近似相等,约为 48 nm.系统定位精度和图 4(b)所描述的定位精度之间的差异,可能来自样品台在成像过程中的微小漂移.

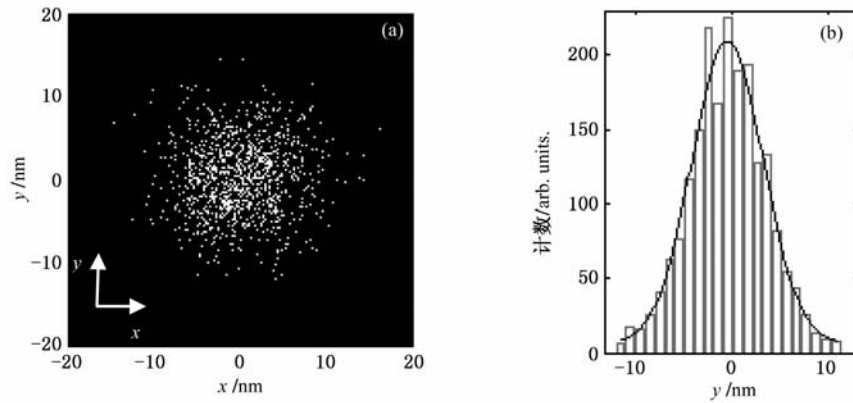


图 4 单个分子进行模拟定位分析 (a)2000 个定位点的分布,(b)定位点的坐标分布

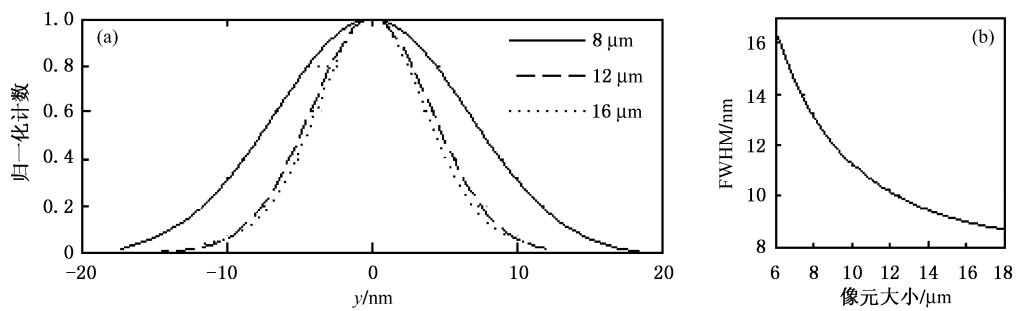


图 5 像元大小对定位精度的影响 (a)不同像元时定位点的坐标分布,(b)理论上定位误差随像元大小的变化

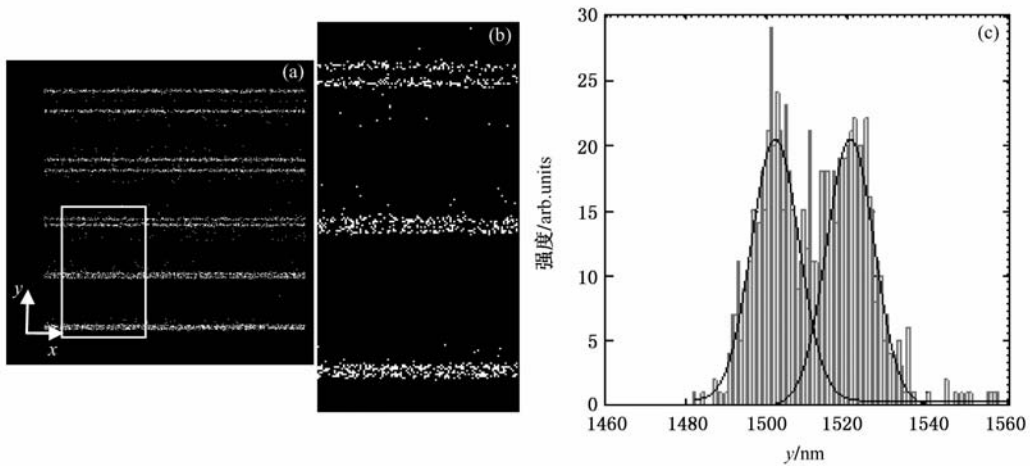


图 6 样品模型的图像重构 (a)重构的荧光图像,(b)局部放大,(c)第一对分子带沿 y 方向的荧光强度分布

3.3. 实际生物样品的纳米分辨成像

利用该系统和图像重构方法,对 HeLa 细胞突起中的微丝束进行了成像.图 8(a)为荧光图像,其中白色方框内的荧光图像如图 8(b)所示.通过对 40,000 幅源图像重构,得到如图 8(c)所示的荧光重构图像,选取其中两条细胞突起结构(图 8(c)中

箭头 1、箭头 2 标示的位置),沿着垂直于细胞突起结构走向的方向分析它们的强度分布(图 9(a)和(b)),并 Gauss 函数拟合,得到这两条细胞突起结构的直径分别为 93 和 89 nm(FWHM),根据系统稳定性测试中得到的系统分辨率进行校正,这两条细胞突起结构的直径分别为 78.53 和 74.56 nm.分析图 8(c)中多条突起结构直径,均处于 75—200 nm

的范围. 这一结果和文献[10]中电镜测量结果是吻合的.

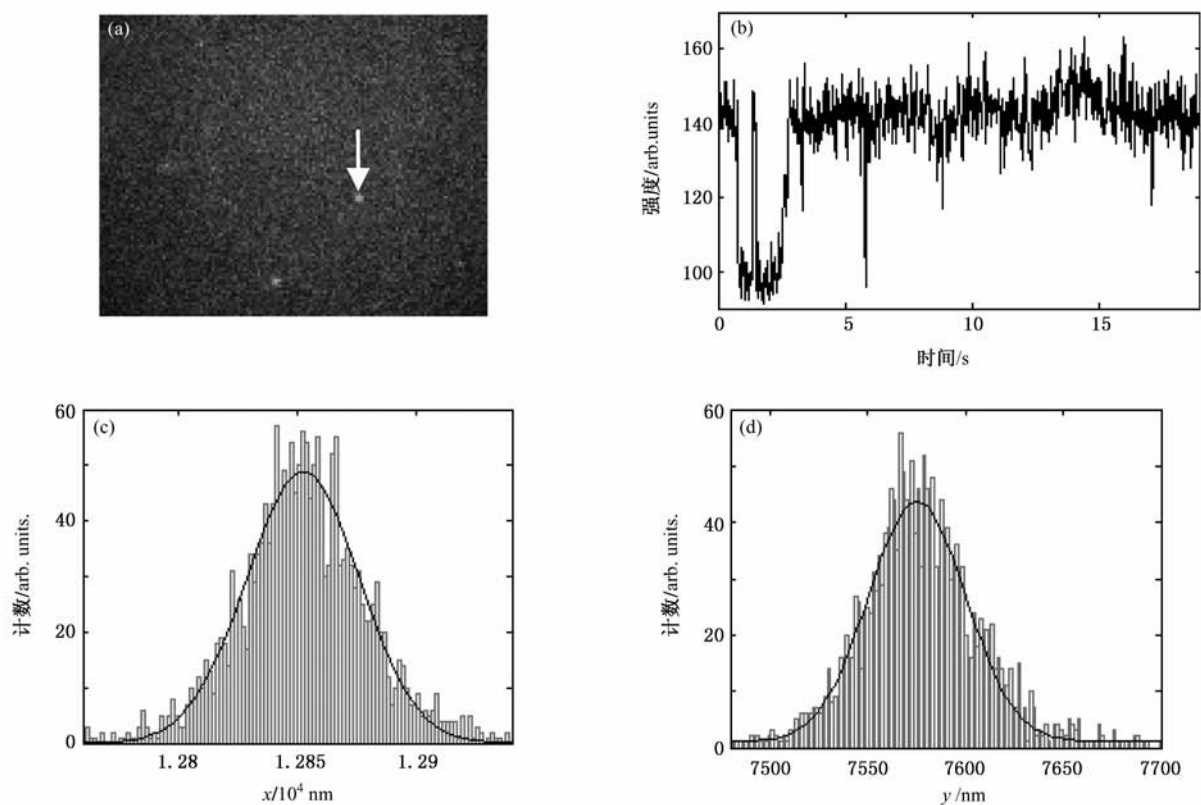


图7 单个 Alexa647 分子的 1500 次定位得到的质心分布图

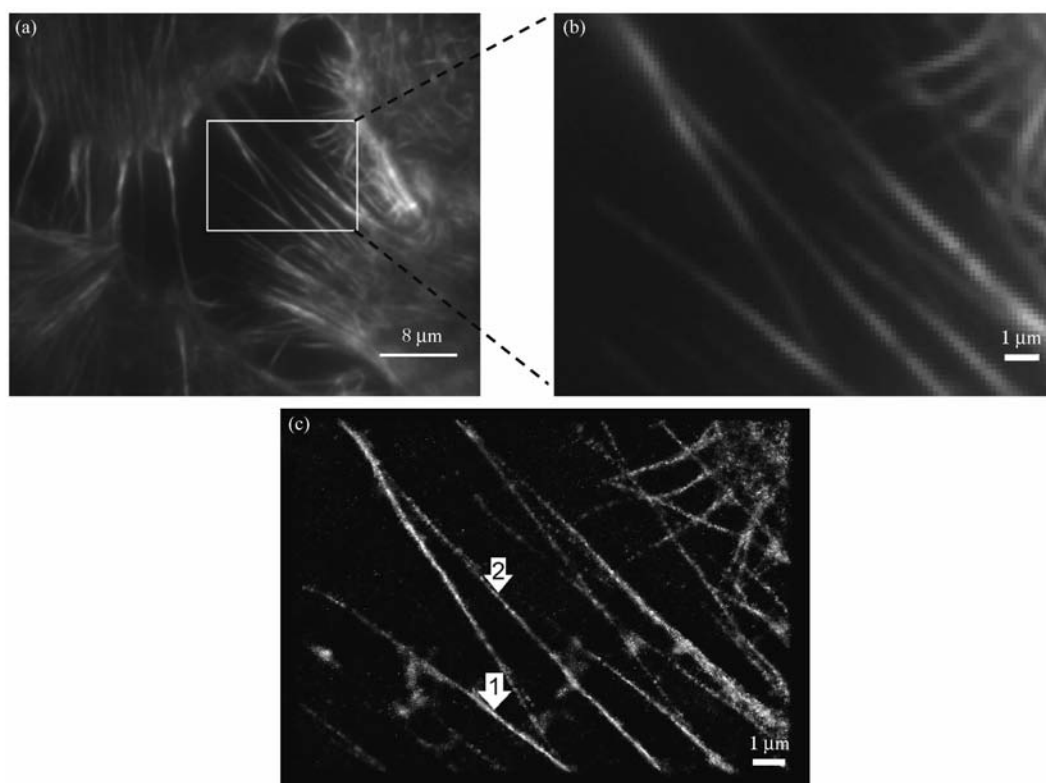


图8 HeLa 细胞突起结构的微丝束纳米分辨图像

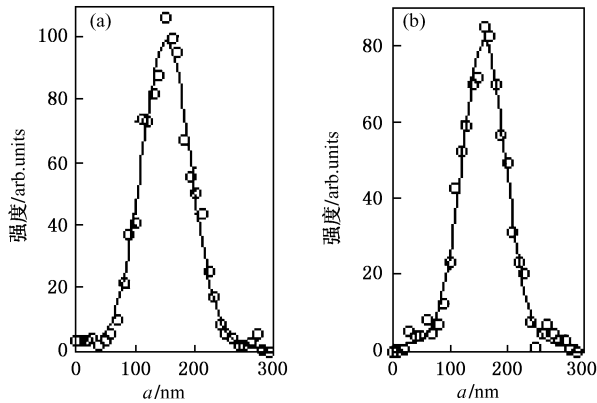


图9 图8(c)中箭头1与2标示位置沿垂直于细胞突起结构走向方向的强度分布 (a)箭头1处,(b)箭头2处

4. 结论及展望

在 IX71 倒置荧光显微镜上实现了单分子定位纳米分辨成像,分辨率可以达到 48 nm. 在源图像重构程序验证和系统稳定性验证的基础上,实现了对 HeLa 细胞突起中微丝束结构的纳米分辨成像.

不过,我们在实际成像过程中发现,对于细胞内的成像来说,来自非焦平面的荧光分子产生的背景噪声对成像的影响非常大,严重时甚至无法提取有用信息. 因此,对于全细胞这类厚样品成像来说,降低非焦平面分子处于荧光态的概率就显得十分重要. 而这正是本课题组正在研究的内容^[11].

- [1] Wang C, Wang G Y, Xu Z M 2004 *Acta Phys. Sin.* **53** 1325 (in Chinese) [王琛、王桂英、徐至展 2007 物理学报 **53** 1325]
- [2] Liu L X, Qu J L, Lin Z Y, Chen D N, Xu G X, Hu T, Guo B P, Niu H B 2006 *Acta Phys. Sin.* **55** 6281 (in Chinese) [刘立新、屈军乐、林子扬、陈丹妮、许改霞、胡涛、郭宝平、牛憨笨 2006 物理学报 **55** 6281]
- [3] Dyba M, Jakobs S, Hell S W 2003 *Nat. Biotechnol.* **21** 1303
- [4] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, Lindwasser O W, Olenych S, Bonifacino J S, Davidson M W, Lippincott-Schwartz J, Hess H F 2006 *Science* **313** 1642
- [5] Rust M J, Bates M, Zhuang X 2006 *Nat. Methods* **3** 793
- [6] Cheng Y, Chen J F 2009 *Laser Optoelectron. Prog.* **46** 35 (in Chinese) [程亚、陈建芳 2009 激光与光电子学进展 **46** 35]
- [7] Zemer Gitai 2009 *Curr. Opin. Microbio.* **12** 341
- [8] Heilemann M, van de Linde S, Schüttelpelz M, Kasper R, Seefeldt B, Mukherjee A, Tinnefeld P, Sauer M 2008 *Angew. Chem. Int. Ed.* **47** 6172
- [9] Thompson R E, Larson D R, Webb W W 2002 *Biophys. J.* **82** 2775
- [10] Yang C S, Czech L, Gerboth S, Kojima S, Scita G, Svitkina T 2007 *PLoS Bio.* **5** 2624
- [11] Chen D, Yu B, Qu J, Niu H 2010 *Opt. Lett.* **35** 886

Nano-resolution imaging of filopodia in HeLa cells *

Chen Dan-Ni¹⁾²⁾ Liu Lei²⁾ Yu Bin²⁾ Niu Han-Ben^{2)†}

1) (*Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, College of Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China*)

2) (*College of Optoelectronic Science and Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China*)

(Received 15 July 2010; revised manuscript received 14 August 2010)

Abstract

Nano-resolution imaging based on single molecule localization is simulated with Matlab. A sample consisted of several lines of molecules are simulated imaged. The results demonstrate that two lines of molecules separated by 20 nm can be resolved. Effect of pixel size on the localization accuracy is also discussed here. Nano-resolution imaging is realized on an IX71 inverted fluorescent microscope with the resolution (FWHM) of 48 nm. Nano-resolution images of filopodias are reconstructed, in which filopodias with diameter of 75 nm are resolved.

Keywords: nano-resolution, single molecule localization, HeLa cell, microtubule, filopodia

PACC: 3250F, 4230

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 60878053), the Science and Technology Innovation Research Team Program of Institution of Higher Education of Guangdong Province, China (Grant No. 06CXTD009), and the Science and Technology Plan of Shenzhen, China (Grant No. JC200903130329A).

† Corresponding author. E-mail: hbniu@szu.edu.cn