

· 研究进展 ·

活细胞超灵敏结构光超高分辨率显微镜

黄小帅¹ 李柳菊¹ 范俊超² 刘彦梅¹ 谭山² 陈良怡^{1*}

(1. 膜生物学国家重点实验室 北京大学分子医学研究所, 北京 100871;
2. 教育部图像处理和智能控制实验室 华中科技大学自动化学院, 武汉 430074)

[摘要] 由于超分辨率显微镜需要额外的照明来换取更高的空间分辨率, 导致了现在的超分辨率显微镜存在时间分辨率低和记录时间短两个问题。虽然结构光照明显微镜在获得超分辨率图像和所需要光子数方面有一个更好的平衡, 相比其他超分辨率技术更有优势, 但是传统的结构光照明显微镜的重构方式在信噪比较低的时候会明显存在伪影。在本文中, 我们利用生物样本在 xyt 三维空间的连续性作为先验知识, 发展出了基于海森范数的正则化方式, 并用来重构出伪影更少的结构光照明显微镜的超分辨率图像。与维纳反卷积这个经典的重构算法相比, 海森反卷积只需要在成像时百分之十的光子数就可以达到同样的超分辨图像的重建效果。在激光强度为 $8\text{--}250\text{ W/cm}^2$ 的情况下, 海森结构光照明显微镜在活细胞中对快速分泌的囊泡、内质网等进行空间分辨率达到 88 nm , 时间分辨率达到 188 Hz 的超分辨率图像重建。全新的时间分辨率和空间分辨率使得我们可以在囊泡分泌过程中观测到新的中间态, 观察到了囊泡靠近细胞膜的过程, 以及之后的分泌小孔进一步扩大的过程这两个囊泡分泌过程中中间状态。使用基于海森正则项的结构光照明显微镜, 我们可以在活细胞中观测到清晰的线粒体嵴。以及嵴结构在线粒体融合, 线粒体分裂过程中的动态活动, 甚至是单个没有发生融合或者分裂的线粒体内的嵴的融合的过程。

[关键词] 海森结构光照明显微镜; 时间分辨率; 成像时长; 光漂白

与数学以及物理等理科学科不同, 生物医学研究是以实验科学为主。“眼见为实”, 实时观察生物体内活细胞的精细结构及其动态变化, 一直以来都是生物医学研究的重要内容。自从 1665 年罗伯特·胡克发明显微镜以来, 显微镜一直是生物医学工作者最重要的工具之一。三个多世纪以来, 尽管光学显微成像技术从普通的宽场显微镜发展到荧光显微镜以及进一步发展的激光共聚焦显微镜、双光子显微镜等不同模式, 日新月异, 稳步发展, 但是其分辨率始终局限于 200 nm 左右的衍射极限^[1]。21 世纪的第一个 10 年见证了荧光成像领域的迅猛发展和深刻革命, 不同领域的科学家努力协作, 发展出新型光学分子探针和崭新的光学成像模式, 将光学显微镜的分辨率推进到纳米水平, 出现了超分辨率显微镜^[2-7]。对超分辨率显微镜有重要贡献的

埃里克·贝齐格、斯特凡·黑尔和威廉·莫纳也于 2014 年共同获得诺贝尔化学奖。

根据原理可以将超高分辨率显微镜主要分为以下三大类: 基于光激活/光转换荧光分子的单分子定位超分辨率显微镜^[2, 3]; 基于抑制点扩散函数中心点之外的地方发出荧光从而提高分辨率的受激辐射超分辨率显微镜^[5]; 以及基于结构光照明的结构光照明显微镜^[6, 8]。

1 超高分辨率显微镜主要分类

1.1 单分子定位超高分辨率荧光显微镜

几纳米大小的单个荧光分子通过荧光显微镜成像, 由于衍射极限, 在检测器平面上形成直径几百纳米的光斑, 其荧光强度可以近似地用荧光分子中心为山峰峰顶的二维高斯函数拟合。也就是说单个很

收稿日期: 2018-05-14; 修回日期: 2018-05-24

* 通讯作者, Email: lychen@pku.edu.cn

小的光点经显微镜成像后放大成光斑,所以也叫做显微镜的点扩散函数,其大小与物镜的数值孔径有关。

荧光显微镜分辨率的定义是当两个相同亮度的荧光分子相邻时,仍然能够分辨出来是两个分子时的最小距离。分辨率与显微镜的点扩散函数(半高宽)大小有关,极限在 200 nm 左右。单分子定位超分辨率荧光显微镜的原则在于如果通过调制荧光分子的特性,每次光照射样本时只选择激发其中的一部分稀疏分布的荧光分子。这些彼此之间的距离超出了显微镜点扩散函数的荧光分子在成像之后,形成相当于许多个独立的点扩散函数大小的光斑,对每个光斑用二维高斯函数拟合,可以定位出每个光斑的中心位置,定位精度可以达到二十纳米甚至几纳米,远远优于显微镜的衍射极限。在时间尺度上重复这个过程,最后定位样本中所有荧光分子,这就是单分子定位超高分辨率显微成像。

埃里克·贝齐格于 1995 年推断如果荧光分子可以开关就可以利用这个特性来打破分辨率的衍射极限^[9],由于特定的荧光激活打开的绿色荧光蛋白 PA-GFP 的出现 2006 年第一次真正实现这个原理的超高分辨率成像,命名为 PhotoActivated Localization Microscopy (PALM)^[2]。同年,哈佛大学的庄小威博士以及缅因州大学的 Hess 博士也提出类似概念并加以实现,分别命名为 STochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM)^[3] 以及 fluorescence PhotoActivation Localization Microscopy (fPALM)^[4]。因此,PALM/STORM 等方法的主要原理是利用荧光分子的光激活/光转换特性,通过弱激光随机激发稀疏的光激活/光转换荧光分子发光,观察并拟合确定它们的位置,然后再漂白它们并激发出来新的分子,如此激发一定位一漂白一重新激发的循环成千上万次后,就可以得到所有分子的精细位置信息了。由此可见,单分子定位显微镜的基本原理就是荧光分子的开关不断切换过程,不管是 PALM 使用的光转换荧光蛋白^[2];还是 STORM 使用的 cy3-cy5 荧光染料对^[3],或者直接利用其染料的闪烁特点。

同样是 2006 年,化学家 Robin M. Hochstrasser 发现了一种荧光分子结合脂质导致的荧光开关过程^[10],其基本原理是尼罗红(Nile Red)染料游离于水溶液的时候不会发光,一旦和脂质结合便可以发红光。利用这个特性,根据染料与脂质结合和解离的速度,计算出所需荧光染料的浓度,使用相应的浓

度的荧光染料来处理细胞,保证在每次曝光时间内一个点扩散函数大小范围内只有一个荧光分子亮起,这样连续拍几千张原始图像,对每个亮起来的荧光分子定位,并把所有的定位结果综合起来,也可以得到一幅超分辨率图像^[10],这种方法被称为 Points Accumulation for Imaging in Nanoscale and Topography(PAINT)。

1.2 受激辐射超高分辨率显微镜

斯特凡·黑尔博士于 1994 年提出受激辐射超高分辨率显微镜(STED)的原理^[5],但是也是到 2000 年才真正实现成像过程^[11]。它的基本原理是给予处于激发态的荧光分子泵浦足够能量,通过“受激辐射”过程将它们强制回到不发荧光的基态或者发出与荧光波长不同的光。强制荧光分子回到基态的光就叫做淬灭光,它与荧光蛋白发出光波长相同。将激发光和淬灭光耦合在一起照明样本,其中淬灭光经过相位板后可以形成围绕激发光的环。这样虽然激发光仍然激发点扩散函数范围内所有的荧光分子,但周围的荧光分子由于淬灭光的存在处于受激辐射不发光的状态。只有在点扩散函数最中间的地方,由于淬灭光光强极弱或者为零,荧光分子才会仍然处于激发态上从而发出荧光。本质上,STED 可以理解为在激发光照明样本的同时,用另外一束擦除光来缩小激发光的激发分子范围,通过缩小激发的点扩散函数来提高成像的分辨率。

1.3 结构光超高分辨率显微镜

2000 年,Mats Gustafsson 博士提出通过结构光照明来提高显微镜分辨率的概念^[6],但他直到 2008 年才将三维结构光显微镜真正集大成优化到可以在生物样本较好应用的程度^[12]。

理解结构光超高分辨率显微镜的前提是理解空间结构变化程度与频域空间的频率高低之间的对应。精细的空间结构对应于频域空间的高频信号,因为显微镜的点扩散函数对应于频域空间的光学传输函数,因此显微镜只能传输在光学传输函数频率内的信息。本质上来说,显微镜就像是一个低通滤波器,将高频空间信息滤除,成像结果分辨率的大小取决于光学传输函数的大小。

普通的显微镜在照明荧光样本的时候,一般会使用照明光在空间上均匀分布,从而便于量化荧光强度。结构光超高分辨率成像的原理在于将均匀的照明光变成具有特定空间结构的结构光(包括明暗相间的正弦波模式),在空间频域上对样本进行调制,将本来处于光学传输函数范围外的样本高频信

息移动到光学传输函数范围内,通过特定算法还原出来高频信息。能够得到多少超出光学传输函数范围外的高频信息取决于照明光结构的精细程度,同样受衍射极限的限制。因此,线性结构光超高分辨率显微镜最高能够将光学传输函数截止频率两倍内的高频信号移入光学传输函数截止频率内,也就是实现两倍分辨率的提升。

通过饱和激发耗竭或者应用光开关蛋白的方法,还可以实现非线性激发结构光显微镜成像,分辨率可进一步提高到 50 nm 左右的成像分辨水平^[13]。饱和吸收的方法原理为一个空间上正弦分布的激光激发出来的荧光在激光照明强度比较弱的时候,在空间上是正弦分布的。随着激光照明强度进一步增强,正弦波峰值位置荧光分子发光开始趋近于饱和,正弦分布的荧光开始趋近于矩形分布。这时候空间频域上不仅仅叠加了照明光的周期,还包含了照明光周期的高频谐波分量。把所有的高阶项分别求解出来之后,像线性结构光照明显微镜的处理方式一样,把所有的高阶项放在其对应的位置,再对所得到的频域图像做傅里叶逆变换,便可以得到一幅更高分辨率的图像。因为饱和激发结构光照明显微镜的频域含有无数个高阶项,所以,饱和激发结构光照明显微镜没有理论分辨率极限。

2 目前超高分辨率显微镜存在的问题

尽管超高分辨率成像技术已经获得诺贝尔化学奖,所有的显微镜公司也都有相应的商业超高分辨率显微镜系统,实际上生物医学研究应用超高分辨率显微镜解决的科学问题仍然有限。主要的原因是更高的空间分辨率意味着需要荧光探针发出更多的光子。由于活细胞实验中最常用的遗传编码的荧光蛋白被漂白前发出的总光子数有限,因此限制了它们在超高分辨率显微成像中的应用。绝大多数的超高分辨率成像实验应用抗体和化学分子探针和量子点,只能应用在死的细胞样本中。因此,应用这些超高分辨率显微镜,一方面不能够得到活细胞信息,另一方面又并不能得到比同样是应用在死细胞上的电子显微镜更高的分辨率,故其应用范围有限。

有一些实验室发展了特殊的超高分辨率显微镜设备,实现活细胞成像。但是,即使是可以在活细胞上成像,由于需要很强的激发光来得到尽量多的激发光子,而荧光分子单位时间内发出的光子数有限,因此活细胞成像的时间分辨率很低。另一方面,强激发光的强度也会进一步增加荧光蛋白的光漂白,

产生光毒性,使得细胞凋亡^[14]。因此,在活细胞上长时间连续超高分辨率成像似乎是不可能实现的任务。例如,有报道表明基于单分子定位的超高分辨率显微镜以及受激辐射超高分辨率显微镜可以在活细胞内达到 32—125 Hz 的时间分辨率^[15,16],但是这些方法由于使用的激光功率高达 kW-MW/cm² 量级而存在较大的光毒性和光损伤^[17],因此连续成像的张数不超过一百张,高速成像时无法连续记录 10 秒以上,几乎没有太大的意义。

相比与 PALM/STORM 等方法需要特定的光开关探针、STED 需要极其光稳定的探针,结构光超高分辨率显微镜与常用的荧光探针兼容,是应用更加广泛的技术^[6,12,18]。但是,随着 2011 年 Mats Gustafsson 博士的逝世和他在霍华德·休斯医学研究所的珍利亚农场研究园区研究组的解散,结构光超高分辨率显微镜的研发进入低谷。2015 年,埃里克·贝齐格研究组的李栋博士展示了他们重新开始研发改进结构光超高分辨率显微镜的结果,证明它比其他的超高分辨率更加节约光子,并展示了活细胞上观察到如肌丝蛋白网络等许多结构的精细动态过程^[18]。但是,由于结构光照明显微镜仍然是比正常宽场成像的光照度要高一到几个数量级,所以漂白依然严重,最多的采集帧数被限制在大概 200—300 个时间点,限制了它在观察细胞内长时程事件的应用。另外,这个工作发表在 Science 上之后,马普生物物理化学研究所的 Stefan Jacob 组在 Science 上撰文指出发表的数据中存在重构伪迹,并且这些伪迹很难与真实结构截然分开^[19]。实际上,由于结构光照明显微镜的重构过程是一个病态反问题求解过程,所以一直以来图像重构过程中容易出现重构伪影是领域内公认的难题^[20]。尽管埃里克·贝齐格他们之后在 Science 又展示可以通过在频域上滤波的方法去除这些伪迹^[21],但是结构光超高分辨率显微镜重构伪迹的来源以及如何系统消除它们的方法仍不清楚。最后,由于重构过程中引入去噪的正则化参数,重构后的图像荧光强度是否仍然与原始图像有一样的定量关系也不清楚,因此能否应用结构光超高分辨率显微镜来量化地研究细胞内过程也存疑。

如上所述,超高分辨率成像领域内最重要的问题是如何实现活细胞上长时间、高速的超高分辨率成像。如上分析发现,结构光超高分辨率成像是最可能实现这个目标的技术。

首先我们需要解决的问题是结构光超高分辨率

图像重构中的伪迹来源。系统分析了整个重构过程,我们发现除了硬件光路之外,伪迹主要来源于三个方面,第一个来源是在原始图像中信噪比很低的时候(较弱的荧光信号标记,较短的曝光时间,较强的漂白等情况下),图像重构的参数求解的不准确会带来极大的重构误差。例如求解正弦波结构激发光的波矢量有 0.5% 的误差时,在视场两侧的荧光小球可以被重构成环状小孔的结构,也就是有最大的误差和重构伪迹。领域内通用的算法在图像中噪声波动与荧光信号幅值大约是 1:1 时,求解出来的波矢量就已经有 2% 的误差,表明这是一个主要的重构伪迹来源。我们发展了一套多张平均再加上幅值归一化的互相关算法,可以保证在噪声波动与荧光信号幅值在 3:1 的时候,求解出来的波矢量与真实值之间的差别仍然小于 0.1%。伪迹的第二个来源是成像物体本身的运动造成的运动伪迹。由于结构光超高分辨率成像是通过 9 张(二维)或者是 15 张(三维)原始图像合成一张超高分辨率图像,如果成像的结构本身在拍摄总体时间内运动的距离超出超高分辨率显微镜本身的点扩散函数范围时,重组图像就会出现运动伪迹,而解决这种伪迹的唯一方法就是加快采样的速度。我们发现当物体运动的速度大于超高分辨率显微镜分辨率(点扩散函数的半高宽大小)与超高分辨率重组后的采样率的乘积时,对于这个物体的成像就会出现伪迹。例如,当显微镜分辨率为 90 nm 时,超高分辨率成像的帧频达到 97 Hz 时,物体运动速度超过每秒 $8.7 \mu\text{m}$ 时($90 \times 97/1000$)会产生伪迹。解决运动伪迹的出现方法是尽量降低每帧原始图像的曝光,提高成像帧频。第三个伪迹来源与超高分辨率图像的重构反解过程密切相关。理论上说,不考虑图像本身噪声时,在频谱空间拼接后的图像结果经过傅里叶逆变化可以得到分辨率增强的超分辨率图像;但是当图像信噪比很低,大量的随机噪声在傅里叶逆变化求解时就会被放大成为很高的随机伪迹。这是结构光超高分辨率成像本身内在的问题。

3 超灵敏海森结构光超高分辨率显微镜的设计、改进与应用

找到根本问题之后,我们从两个方面来改进现有的结构光超高分辨率显微镜。一个是提高显微镜收集光子数和快速拍摄的能力。在这个方面,我们应用高数值孔径物镜(NA 1.7),设计特定的 1.788 折射率的玻片,实现最大限度的接收荧光探针发射

出来的光子;设计新偏振旋转玻片阵列和高精度的时序控制程序,实现最快速度切换结构照明光的方向,并保证结构光明暗之间的对比度最大(图 1)。硬件上,我们实现每秒钟拍摄 1 692 帧原始图像,相应的超高分辨率成像速度为 188 Hz。另一方面,我们设计全新的超高分辨率反卷积算法。借鉴了人眼区分信号和噪声的机制,我们首次提出将“生物样本在多维时空上连续、而噪声是完全随机分布”的先验知识用于构建海森矩阵,指导超高分辨率荧光图像的重建(海森反卷积),彻底解决了这个问题(图 2)。

3.1 海森结构光照明显微镜优于其他反卷积方法

为了验证我们海森结构光照明显微镜的重构效果,我们先后用了仿真数据和活细胞数据,并比较了海森反卷积算法和目前领域内最流行的算法(包括我们写的维纳算法、fairSIM 中的维纳反卷积^[22]、fairSIM 中的 Richardson-Lucy 反卷积^[22]、TV 重构^[23]以及用前后三张图像做移动平均)等所得到结果间的差别。

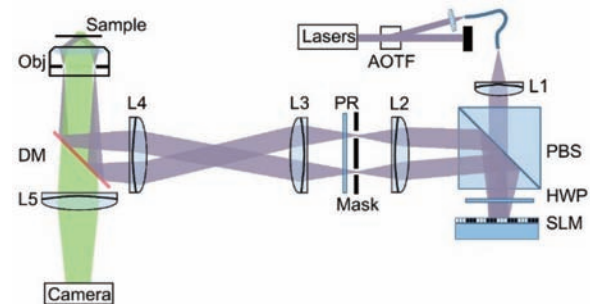


图 1 结构光照明显微镜系统图

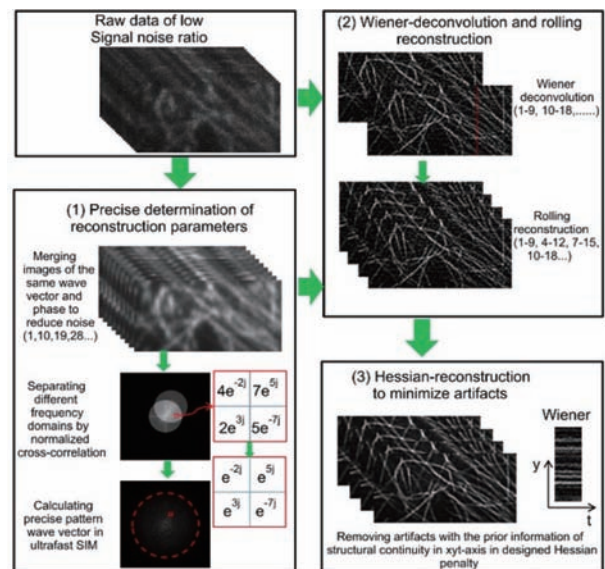


图 2 海森结构光照明显微镜算法部分

在含有不同形状和空间频率的仿真图像上叠加了噪声,我们构建了真实图像已知的标准集。图 3a 包含了标准图像、宽场采集图像、含有噪声的结构光照明所采集到的图像、标准图像的结构光照明显微镜的重构结果、维纳反卷积重构含有噪声的结构光照明所采集到的图像,以及海森结构光照明显微镜重构含有噪声的结构光照明所采集到的图像。我们对子区域 g 进行放大(图 3b),从上到下分别是标准图像、维纳反卷积重构含有噪声的结构光照明所采集到的图像,以及海森结构光照明显微镜重构含有噪声的结构光照明所采集到的图像。我们可以看到海森重构出的图像明显优于维纳反卷积重构出的图像。维纳反卷积重构出的图像的荧光曲线抖动明显较大,会使得真实图像断开的地方连起来或者使得真实图像连起来的地方断开,而海森反卷积所重构出来的图像保真度会更高。因此,在知道真实图像的模拟数据中,我们证明当图像中噪声很高的时候,传统的反卷积和其他的迭代算法都会将真实的、连续的线条结构断开,只有海森反卷积算法才能得到连续的线条结构,整体来说海森反卷积所重构出来图像保真度更高,更加接近于真实图像结构。

我们应用海森结构光照明显微镜成像活细胞样本,即通过表达 lifeact-EGFP 荧光标记细胞内微丝结构的人脐静脉内皮细胞。7 ms 曝光时(10 Hz 超

高分辨率成像)采集到的原始图像信噪比足够高,伪迹很少;但是,0.5 ms 曝光时(97 Hz 超高分辨率成像)采集到的原始图像信噪比很低,微丝结构变得断续,微丝周围也出现伪影结构(图 4b)。由于实际实验中并不知道真实图像应该是怎么样的,所以我们发明用垂直于微丝(V_{\perp})或者沿着微丝(V_{\parallel})的荧光强度的变化量来表征伪迹的大小,是一个新评价标准。应用此标准,维纳逆滤波反卷积重构 0.5 ms 曝光图像得到的超高分辨率微丝图中的 V_{\perp} 和 V_{\parallel} 比 7 ms 曝光时分别增加了 7 倍和 2 倍。当使用海森反卷积时,0.5 ms 曝光图像中微丝的 V_{\perp} 和 V_{\parallel} 分别降低到维纳反卷积的 1/11 和 1/2。也就是说,相比于传统的结构光照明超高分辨率显微镜,海森结构光照明显微镜只需要它的 1/14 曝光时间,仍然能够得到同样分辨率、对比度和保真度的超高分辨率图像。相较于 fairSIM 中的维纳反卷积、fairSIM 中的 Richardson-Lucy 反卷积、TV 重构以及用前后三张图像做移动平均等其他方法来说,海森反卷积方法也可以显著提高重组超高分辨率图像质量(图 4b, e)。综上所述,和其他方法比起来,海森结构光照明显微镜能够以更光子数重构出更高保真度的超高分辨率图像。

3.2 海森结构光超高分辨率显微镜应用:活细胞超快成像

内质网是细胞内非常重要的细胞器。经典细胞生物学教科书上认为内质网是由长管状结构(tubules)和片层状结构(sheets)组成。应用 188 Hz 的超快海森结构光超高分辨率成像,观察 HEK293 细胞中 KDEL-EGFP 标记的内质网发现,其实内质网片层状结构并不存在,它们实际上是由许多大小在 100~200 nm 的、同时在高速运动的小孔组成。当显微镜的空间分辨率不够或者时间分辨率不够时这些小孔就被平均从而呈现出片层状的结构,与近期应用类似显微镜得到的发现相同^[24]。我们进一步追踪这些小孔的运动发现,它们的运动速度最高可以达到 7 $\mu\text{m}/\text{s}$,需要成像速度达到 78 Hz 才能消除运动伪影的影响(图 5)。这表明即使是用 40 Hz 的超高分辨率结构光成像,仍然有可能低估了这些小孔的运动速度以及高估了小孔的大小^[24]。

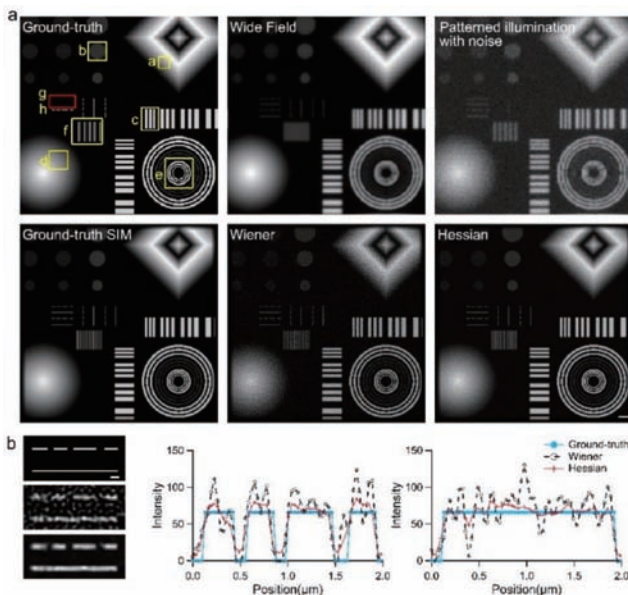


图 3 海森结构光照明显微镜与其他算法在重构仿真图像上的比较。标尺:1 μm for (a) and 0.2 μm for (b)

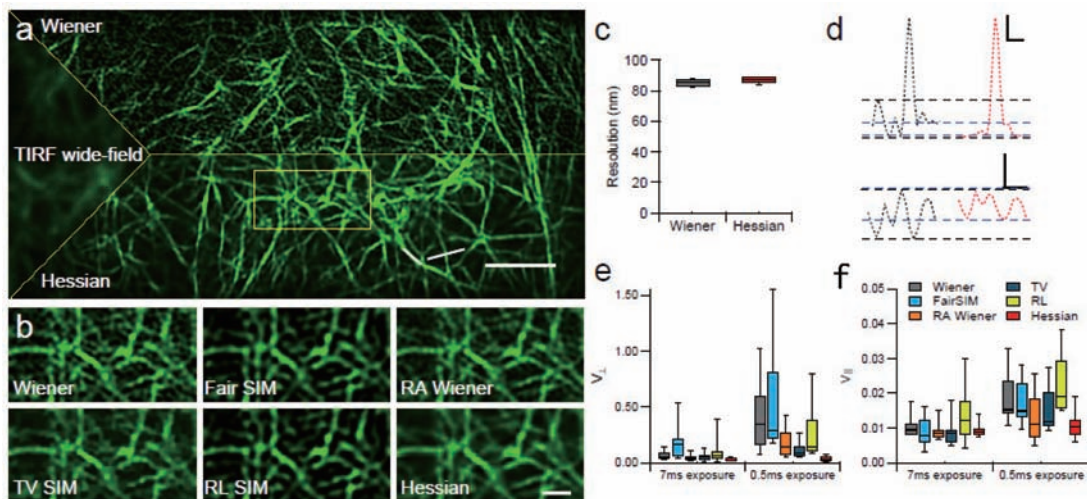


图4 海森结构光照明显微镜与其他算法在重构合成图像上的比较。
 标尺：(a) 2 μm；(b, f) 0.5 μm；(d) axial:0.2 arbitrary units (a. u.)；lateral:0.2 μm

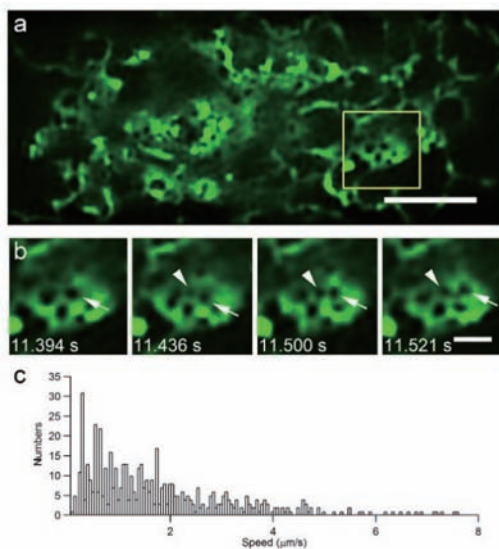


图5 超快结构光照明显微镜观测快速变化的内质网。
 标尺：(a) 2 μm, (b) 0.5 μm

另一个活细胞内高速发生的过程是神经递质和激素等通过囊泡分泌的过程^[25]。囊泡与细胞质膜融合过程中涉及脂质双分子层变形形成融合小孔，发生在纳米尺度和毫秒空间内^[26, 27]，对现有的活细胞超分辨率成像技术是一个挑战。通过在 INS-1 细胞上表达 VAMP2-pHluorin 来标记胰岛素囊泡^[28]，我们实现长时间（10 min）超高速（97 Hz 帧频，291 Hz 滚动重组帧频）的观察细胞的分泌过程。

海森结构光显微镜与 STED 显微镜（分辨率 60 nm，每秒 5 幅左右；巫凌刚实验室 2018 年 3 月 Cell 上线的文章）都可以观察到囊泡融合形成的孔道；但是，由于海森结构光显微镜的超高速特性，我们还额外解析出囊泡融合时四个不同中间态，包括

囊泡打开 3 纳米小孔、囊泡塌陷、融合孔道维持和最后的囊泡与细胞质膜完全融合的过程，真正可视化膜孔道形成的全过程(图 6)。

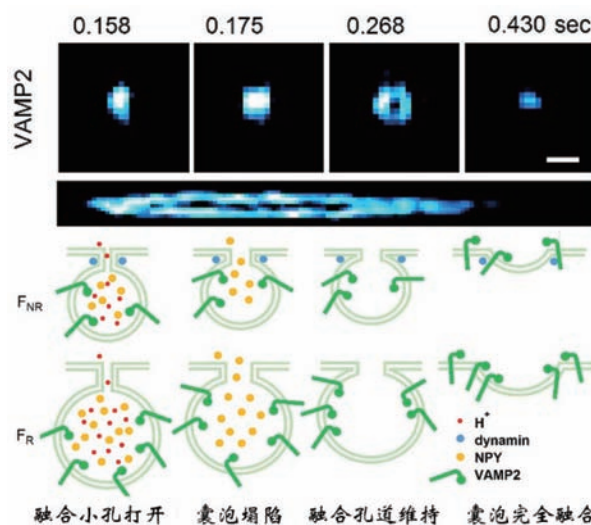


图6 海森结构光显微镜解析囊泡融合孔道形成全过程。
 上图：实际的动态过程解析；下图：囊泡融合
 的四个中间态。标尺：0.2 μm

3.3 海森结构光超高分辨率显微镜应用：活细胞超长时间无漂白成像

许多的细胞内亚结构运动速度并不是很快，例如微丝网络结构，在超高速成像时多张之间几乎不动。对于研究这样的结构，虽然并不需要超高速成像，但是超短曝光仍然对长时间成像和降低成像的光毒性有重要意义。我们同样观察表达 lifeact-EGFP 的人脐静脉内皮细胞，比较在 1 Hz 成像速度模式下传统 7 ms 曝光以及维纳反卷积模式和 0.2 ms 曝光以及海森反卷积模式。我们发现，虽然同样是

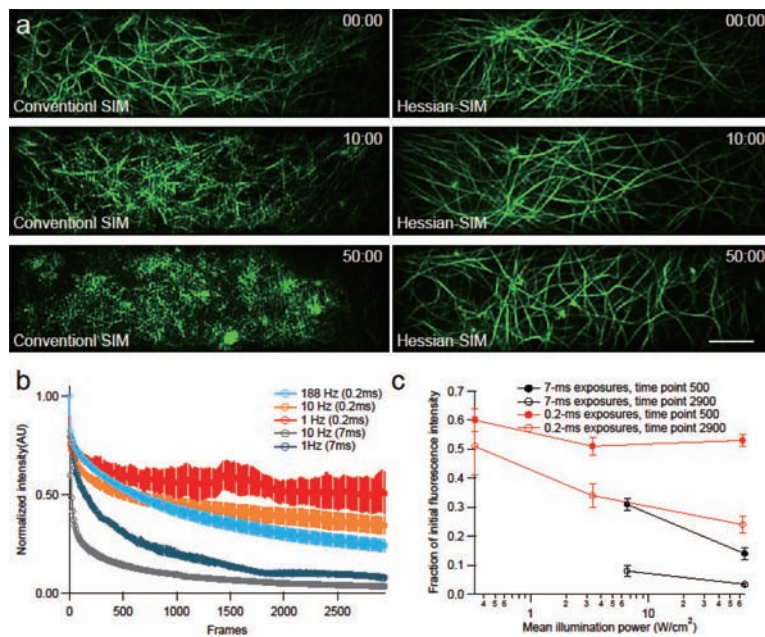


图 7 应用海森结构光显微镜记录的长时间微丝网络的变化。标尺: $2 \mu\text{m}$

1 Hz 成像, 传统的结构光成像大约 50 张后漂白就非常严重, 重组出来的超高分辨率图像就全是伪迹; 而超短曝光的海森结构光成像一小时, 仍然有非常强的 lifeact-EGFP 信号, 重组出来的超高分辨率图像与实验开始时无明显差别。进一步量化发现, 超短曝光的海森结构光成像的第 500 帧到 3000 帧中 lifeact-EGFP 基本不变化, 暗示光漂白几乎可以忽略。这个结果表明, 应用超短曝光的海森结构光显微镜, 我们首次实现在活细胞上长时程、光毒性极小的超高分辨率成像, 有着广泛的应用前景。

3.4 海森结构光超高分辨率显微镜应用: 光敏感的细胞器如线粒体成像

线粒体是细胞内的“能量工厂”, 其内嵴结构复杂, 运动快速, 对光的敏感性非常高, 因此一直是超高分辨显微成像的重大挑战^[29]。使用海森二维结构光照明显微镜, 首次在活细胞中解析线粒体融合、分裂时内嵴的活动, 以及线粒体内嵴自身的重组过程, 也能够观察活细胞内内质网与线粒体发生相互作用时的动态变化(图 8)。这是之前领域内无论是使用 STED 还是 PALM/STORM 超分辨率显微镜都无法观察到的现象^[29, 30], 也凸显出超灵敏海森结构光显微镜对于观察光毒性敏感的细胞器如线粒体动态结构方面的独特优势。

4 展 望

综上所述, 在每秒钟得到 188 张超高分辨率图像时, 海森结构光显微镜的空间分辨率可以达到

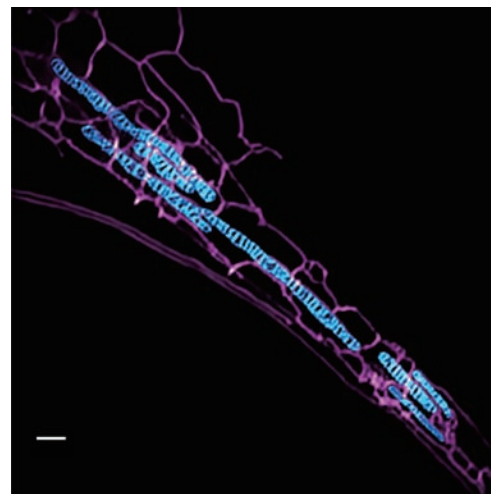


图 8 海森结构光显微镜下观察到的 COS-7 细胞中的内质网和线粒体相互作用的动态过程, 蓝色的线粒体用 MitoTracker Green 标记, 可以清楚辨识内嵴结构; 品红色的是用 SEC61-mCherry 标记的内质网结构。

标尺: $1 \mu\text{m}$

85 nm, 能够分辨单根头发的 $1/600$ 到 $1/800$ 大小结构, 而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, 实现了 100 Hz 超高分辨率成像下连续采样 10 min 得到 18 万张超高分辨率图像, 或者是在 1 Hz 超高分辨率成像下连续 1 h 超高分辨率成像基本无光漂白。因此, 超灵敏海森结构光显微镜是目前成像时间最长、时间分辨率最高的超高分辨率显微镜, 适用于各种细胞、不同探针的荧光成像。可以说, 所

有应用点扫描共聚焦显微镜的场景都可以使用海森结构光显微镜,因而其具有广泛的应用前景。

海森结构光照明显微镜的原理是一种可以提高时间分辨率和延长成像时间的普适性超分辨率方法。将来,我们还将把它与其他类型的结构光照明显微镜如晶格光片结构光照明显微镜、三维结构光照明显微镜、以及非线性结构光照明显微镜结合,进一步提高三维成像上的时空分辨率,减少光损伤,看到细胞、组织、器官内更多精细的过程。未来,我们将探寻将海森结构光原理与微型化显微镜结合的方法,力图实现动物在体超快超高分辨率显微成像,为生物医学研究者在原位描绘生命的精细过程提供更好的工具。

致谢 本工作得到国家自然科学基金委项目(项目批准号:31327901, 31521062, 31570839, 31428004, 61375018, 61672253, 91750203),国家重点研发计划基金(批准号:2016YFA0500400),国家重点基础研究发展计划(批准号:2013CB531200)和北京市自然科学基金-海淀原始创新联合基金项目(批准号:L172003)资助。

参 考 文 献

- [1] Abbe E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 1873, 9(1): 413—418.
- [2] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 2006, 313(5793): 1642—1645.
- [3] Rust MJ, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature methods*, 2006, 3(10): 793—796.
- [4] Hess ST, Girirajan TPK, Mason MD. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical journal*, 2006, 91(11): 4258—4272.
- [5] Hell SW, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters*, 1994, 19(11): 780—782.
- [6] Gustafsson MGL. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of microscopy*, 2000, 198(2): 82—87.
- [7] Heintzmann R, & Cremer, C. G. in *Optical Biopsies and Microscopic Techniques III*, Vol. 3568 185—197 (International Society for Optics and Photonics, 1999).
- [8] Heintzmann R, Jovin TM, Cremer C. Saturated patterned excitation microscopy—a concept for optical resolution improvement. *JOSA A*, 2002, 19(8): 1599—1609.
- [9] Betzig E. Proposed method for molecular optical imaging. *Optics letters*, 1995, 20(3): 237—239.
- [10] Sharonov A, Hochstrasser RM. Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(50): 18911—18916.
- [11] Klar TA, Jakobs S, Dyba M, et al. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(15): 8206—8210.
- [12] Gustafsson MGL, Shao L, Carlton PM, et al. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophysical journal*, 2008, 94(12): 4957—4970.
- [13] Gustafsson MGL. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(37): 13081—13086.
- [14] Dean KM, Lubbeck JL, Binder JK, et al. Analysis of red-fluorescent proteins provides insight into dark-state conversion and photodegradation. *Biophysical journal*, 2011, 101(4): 961—969.
- [15] Huang F, Hartwich TMP, Rivera-Molina FE, et al. Video-rate nanoscopy using sCMOS camera-specific single-molecule localization algorithms. *Nature methods*, 2013, 10(7): 653—658.
- [16] Schneider J, Zahn J, Maglione M, et al. Ultrafast, temporally stochastic STED nanoscopy of millisecond dynamics. *Nature methods*, 2015, 12(9): 827—830.
- [17] Carlton PM, Boulanger J, Kervrann C, et al. Fast live simultaneous multiwavelength four-dimensional optical microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(37): 16016—16022.
- [18] Li D, Shao L, Chen BC, et al. Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics. *Science*, 2015, 349(6251): aab3500.
- [19] Sahl, S. J. et al. Comment on “Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics”. *Science*, 2016, 352(6285): 527.
- [20] Schaefer L H, Schuster D, Schaffer J. Structured illumination microscopy: artefact analysis and reduction utilizing a parameter optimization approach. *Journal of microscopy*, 2004, 216(2): 165—174.
- [21] Li D, Betzig E. Response to comment on “Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics”. *Science*, 2016, 352(6285): 527.
- [22] Müller M, Mönkemöller V, Hennig S, et al. Open-source image reconstruction of super-resolution structured illumination microscopy data in ImageJ. *Nature communications*, 2016, 7: 10980.
- [23] Chu K, McMillan PJ, Smith ZJ, et al. Image reconstruction for structured-illumination microscopy with low signal level. *Optics express*, 2014, 22(7): 8687—8702.

- [24] Nixon-Abell J, Obara CJ, Weigel AV, et al. Increased spatiotemporal resolution reveals highly dynamic dense tubular matrices in the peripheral ER. *Science*, 2016, 354(6311): aaf3928.
- [25] Südhof TC. Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2011; a011353.
- [26] Zhou Z, Mislser S. Amperometric detection of quantal secretion from patch-clamped rat pancreatic-cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(1): 270—277.
- [27] MacDonald PE, Braun M, Galvanovskis J, et al. Release of small transmitters through kiss-and-run fusion pores in rat pancreatic β cells. *Cell metabolism*, 2006, 4(4): 283—290.
- [28] Yuan T, Liu L, Zhang Y, et al. Diacylglycerol guides the hopping of clathrin-coated pits along microtubules for exocytosis coupling. *Developmental cell*, 2015, 35(1): 120—130.
- [29] Jakobs S, Wurm CA. Super-resolution microscopy of mitochondria. *Current opinion in chemical biology*, 2014, 20: 9—15.
- [30] Shim S H, Xia C, Zhong G, et al. Super-resolution fluorescence imaging of organelles in live cells with photoswitchable membrane probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(35): 13978—13983.

Ultra-sensitive super resolution imaging with Hessian Structured illumination microscopy in live cells

Huang Xiaoshuai¹ Li Liuju¹ Fan Juanchao² Liu Yanmei¹ Tan Shan² Chen Liangyi¹

(1. *State Key Laboratory of Membrane Biology, Beijing Key Laboratory of Cardiometabolic Molecular Medicine, Institute of Molecular Medicine, Peking University, Beijing 100871, China;*

2. *Key Laboratory of Image Processing and Intelligent Control of Ministry of Education of China, School of Automation, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)*

Abstract Current super-resolution (SR) microscopy is limited in both its temporal resolution and its recording length due to the extensive illumination required to obtain a sufficient amount of photons for achieving the desired spatial resolution. Although structured illumination microscopy (SIM) excels in attaining a high spatial resolution with a low amount of photons, the conventional post-processing approaches often produce artifacts during the reconstruction of raw images with a poor signal-to-noise ratio. Here, we developed a Hessian regularization approach that uses the continuity of biological structures in the xyt dimensions as a priori knowledge to constrain the Wiener deconvolution (Hessian-SIM), which outperforms the current state-of-the-art algorithms in attaining artifact-minimized SR images with a photon dose less than 10% of that required in conventional SIM. Under a modest illumination intensity of approximately 8—250 W/cm², Hessian-SIM enables 88 nm and 188 Hz live SR imaging of rapidly moving secretory vesicles and endoplasmic reticulum structures without motion artifacts. This approach allows the identification of novel vesicle fusion intermediates, as demonstrated by the first visualization of the collapsing of a vesicle to the plasma membrane followed by constriction of an enlarged pore. Using Hessian-SIM, we have visualized dynamics of mitochondrial cristae structures during mitochondria fusion, fission and inter-cristae remodeling in single mitochondria.

Key words Hessian-SIM; temporal resolution; recording length; photobleaching