

技术与方法

全内角反射技术与转盘式共聚焦技术在细胞膜表面的成像比较

于文颖¹ 耿广峰¹ 张辰² 陈婷¹ 梁昊岳¹ 程雪莲¹ 白杨¹ 杨晚竹^{1*}¹中国医学科学院, 北京协和医学院血液病医院(血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020;²天津医科大学总医院神经外科, 天津 300052)

摘要 转盘式共聚焦成像是一种高速、高分辨率成像技术,可以在高时间分辨率和空间分辨率的水平观察固定细胞内目标蛋白的分布及活细胞内目标蛋白的动态变化。全内角反射成像是一种观察距离玻片表面某个限定区域内蛋白质的分布和变化的成像技术,常用于观察固定细胞以及活细胞表面的亚细胞结构。该文以中性粒细胞和神经胶质瘤细胞作为观察对象,通过观测固定细胞膜表面蛋白质的分布以及追踪膜标记活细胞的动态变化对两种成像方法进行了比较。结果发现,就目前技术水平而言,二者均可以采集到清晰的细胞边缘,但全内角反射可以拍摄到更清晰的细胞膜表面结构,它在动态拍摄过程中光漂白相对较低,在快速捕捉过程中能够更加全面的捕捉到一个完整的运动过程。

关键词 全内角反射; 转盘式共聚焦; 细胞成像

Comparison of TIRF and SDC on the Imaging of Cell Surface

Yu Wenying¹, Geng Guangfeng¹, Zhang Chen², Chen Ting¹, Liang Haoyue¹,Cheng Xuelian¹, Bai Yang¹, Yang Wanzhu^{1*}¹State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China;²Department of Neurosurgery, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China)

Abstract Spinning disk confocal microscopy (SDC) is an imaging technique of high speed and resolution, and is a method to observe interested protein distribution in fixed cells and intracellular interested protein dynamics at high spatial and temporal resolution. A total internal reflection fluorescence (TIRF) microscope allows us to observe localization and dynamics of proteins in a restricted region from the interface of the coverslip and has been widely used for optical imaging of subcellular structure at the cell surface in both fixed and living cells. In this study, neutrophils and glioma cells were taken as observation objects, and two optical imaging approaches were compared on cell surface or live cell imaging. The results indicate that, on the current technical level, both of them can be used to get high resolution images of cell edges, but TIRF can capture higher-resolution images of

收稿日期: 2015-10-23 接受日期: 2015-12-21

实验血液学国家重点实验室自由申请项目(批准号: ZZ13-05)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23509198, E-mail: yangwanzhu@hotmail.com

Received: October 23, 2015 Accepted: December 21, 2015

This work was supported by Free Foundation of State Key Laboratory of Experimental Hematology (Grant No.ZZ13-05)

*Corresponding author. Tel: +86-22-23509198, E-mail: yangwanzhu@hotmail.com

网络出版时间: 2016-01-08 14:53:38

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160108.1453.006.html>

cell surface and show lower photobleaching during Real-time imaging. Also, TIRF can help to observe an intact movement process better when capturing a rapid phenomenon.

Keywords TIRF; SDC; cell-imaging

近年来,随着细胞成像技术的快速发展,荧光显微镜在医学以及生物学研究领域的应用越来越广泛^[1-2]。其中,活细胞的荧光成像在研究细胞的动态变化过程中扮演了非常重要的角色,例如细胞骨架的动力学过程、细胞膜上的物质转运过程以及免疫应答的过程^[3-5]。通常在分析这些变化过程时,某一个短暂中间态的捕捉需要达到细胞器、膜泡甚至是单分子水平,这就要依赖于高时空分辨率、高灵敏度的成像方法^[6]。其中,转盘式共聚焦成像和全内角反射成像是应用较为广泛的两种成像方法。转盘式共聚焦成像通过上千个激光光束同时对样本进行扫描,图像采集速度很高,理论上可以达到2 000帧/秒,并且相对于点扫描共聚焦显微镜荧光来说更不易达到饱和,从而在一定程度上降低了光漂白,所以在活细胞的成像研究中越来越受到研究者的青睐^[7]。全内角反射成像通过隐失波来激发靠近玻片表面的样品,由于激发光呈指数衰减的特性,只有在极靠近全反射面的样本区域(小于200 nm)才会产生荧光反射,包括细胞膜(大约7~10 nm厚度)以及紧邻细胞膜的胞质区域,这一技术通过减小激发光在样品的照射降低了光漂白,并且最大程度地降低了背景光噪声干扰^[4],使得全内角反射成像也适用于观察活细胞的表面以及邻近的胞质区域。

选择合适的细胞学成像方法是科学研究中一个极为重要的环节,之前并没有在同一个显微镜系统下将两种成像技术进行比较的相关报道,并且也没有在光漂白方面对两种技术进行直接比较。本文通过半贴壁细胞(中性粒细胞)以及贴壁细胞(神经胶质瘤细胞)的成像,将全内角反射成像和转盘式共聚焦成像在静态拍摄以及动态拍摄中进行了比较,为全内角反射成像技术和转盘式共聚焦成像技术在细胞生物学领域的应用范围提供了参考,同时也为半贴壁细胞动态拍摄的前处理方面提供了有益的思路。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器

实验所用仪器有: UltraVIEW Vox转盘式激光

共聚焦显微镜(PerkinElmer)、TIRF物镜为60×(APO TIRF, NA 1.49)、全内角反射系统CCD为Hamamatsu C9100-13、双转盘系统物镜为60×(Plan Apo VC, NA 1.40)、CCD为Hamamatsu C9100-50。

1.2 实验方法。

1.2.1 共聚焦小皿包被 取数个待用共聚焦小皿,每个小皿中加入500 μL浓度为0.1 mg/mL的Fibronectin(Corning公司),均匀地完全覆盖住小皿底部,室温处理1 h或者4 °C处理过夜。将包被好的小皿用封口膜密封好后,置于4 °C冰箱保存备用。

1.2.2 神经胶质瘤细胞制备 取对数生长期的人U251胶质瘤细胞进行培养,待细胞贴壁于皿底部,PBS洗2次,4%多聚甲醛固定10 min,PBS洗3次。5%驴血清37 °C封闭30 min,加入1:400稀释的小鼠抗人Vinculin抗体(美国Abcam公司),4 °C过夜。PBS洗3次;加入1:1 000稀释的Alexa Fluor 488偶联驴抗小鼠荧光二抗(美国Life公司),37 °C孵育2 h。PBS洗3次。DAPI(北京索莱宝科技有限公司)染核5 min,PBS洗3次;甘油封片。

1.2.3 中性粒细胞制备 颈椎脱臼法处死C57BL/6J小鼠,取小鼠双后肢(带髌骨),剥离肌肉组织,用HBSS-EDTA-BSA溶液反复冲取骨髓细胞,经滤膜过滤得到细胞悬液,利用Percoll分离液(美国GE公司)密度梯度离心后收集得到中性粒细胞^[8]。取 2.0×10^6 细胞,加入PE-gr-1(eBioscience公司)进行标记,室温孵育30 min,PBS洗涤2次,加入1 mL RPMI1640(含10%胎牛血清)重悬,37 °C孵育1 h备用。

1.3 拍摄方法

1.3.1 全内角反射系统调试 将显微镜切换至全内角反射系统,物镜切换至TIRF专用物镜,取一样片置于载物台,通过不断调整临界角的角度找到最适合的位置,以呈现出最亮、最清晰的图像,同时背景噪声最低为最佳状态。

1.3.2 拍摄条件 取1 mL孵育好的中性粒细胞,置于已包被好的3 cm共聚焦小皿中,加入1 μL浓度为10 mmol/L的甲酰三肽(N-FORMYL-MET-LEU-PHE, fMLP)(Sigma公司)进行活化。拍摄时细胞培养环境为37 °C、5% CO₂。

1.3.3 参数设置 不同拍摄模式下设置不同激光通道的相应激光强度、曝光时间以及拍摄时间, 设置图像的分辨率双转盘系统为 $1\ 000\times 1\ 000$, 全内角反射系统为 512×512 。

1.4 数据分析

本实验运用Velocity 6.0.1软件进行数据分析。首先选取目标细胞, 将其截取出来, 通过设定荧光强度的阈值范围来保证每一帧图像都能够进行目标自动识别追踪, 并设定检测目标的面积下限, 以去除一些小面积的背景噪声干扰, 即可得到每一个时间点自动识别测量的荧光强度值。

2 结果

2.1 两种成像技术静态拍摄的比较

2.1.1 细胞膜表面拍摄的比较 先将显微镜调至全内角反射系统, 目镜下找到合适的细胞后, 通过调整临界角的角度以及Z轴的位置, 采集细胞膜表面最清晰的图像(图1)。然后, 在保持其他条件不改变的情况下, 将显微镜转换至双转盘系统, 在不同的Z轴位置, 对同一个细胞进行图像采集。通过全内角反射系统可以清楚地看到黏着斑蛋白在细胞膜表面形成的斑点状结构。而在双转盘系统中, 在不同的焦平面采集到的图像均无法获得如同在全内角反射系统下采集到的清晰斑点状结构, 且图像背景噪声相对较高(图2)。即相对于双转盘系统的拍摄, 全内角反射系统能够采集到更加完整的细胞膜表面的信息且图像拥有更高的信噪比。

2.1.2 细胞边缘拍摄的比较 首先在全内角反射系统, 调整至细胞边缘最清楚, 在明场和FITC通道

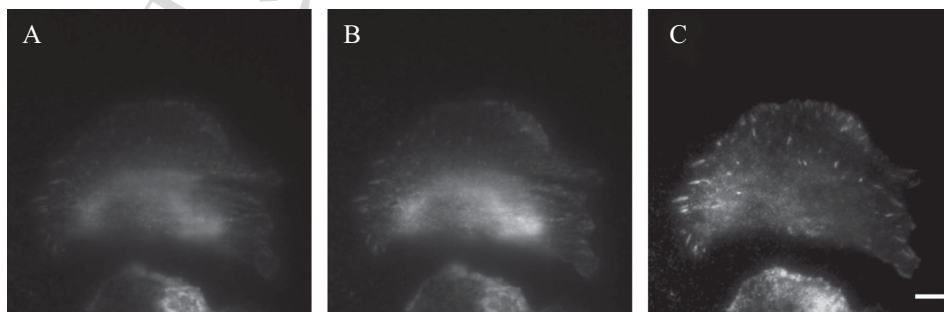
进行图像采集。然后切换至双转盘, 对同一个细胞进行焦平面的调整, 在边缘最清晰的一层进行明场和FITC通道的图像采集。因为两个系统中明场对于细胞边缘的识别是不存在差异的, 所以两个系统中FITC通道采集的图像与各自的明场采集图像进行比较发现, 在这两个系统中对于细胞边缘的拍摄并无明显差异, 均可以与明场识别的边缘较好的吻合(图3)。

2.2 两种成像技术动态拍摄的比较

将细胞置于载物台, 首先于全内角反射系统下进行活细胞图像采集, 拍摄参数为: 时间间隔为2 s, 激光强度为3%, 曝光时间为100 ms, 拍摄时间为160 s(图4A)。然后, 于双转盘系统下进行图像采集, 拍摄参数与全内角反射系统相同(图4B)。通过Velocity分析两个系统下拍摄过程中细胞荧光强度的变化, 发现在双转盘系统下140 s内荧光淬灭达到60%, 而在全内角反射系统下荧光淬灭仅为20%(图5)。

2.3 两种成像技术捕捉快速运动变化的比较

图像采集方法同上, 两个系统下的拍摄参数设置为: 时间间隔为100 ms, 激光强度为3%, 曝光时间为100 ms, 拍摄时间为140 s。结果发现, 双转盘系统下在拍摄进行到40 s的时候, 细胞的荧光淬灭已经达到约40%, 60 s时已经很难清晰的分辨出细胞结构(图6A), 这就意味着, 如果要快速捕捉细胞的动态变化, 那么在一个变化过程还没有结束之前, 细胞已经由于光漂白而失去了图像采集的条件。而在全内角反射系统中直到140 s拍摄结束, 荧光淬灭才达到约30%(图6B), 由此可见, 在捕捉快速运动变化方面,

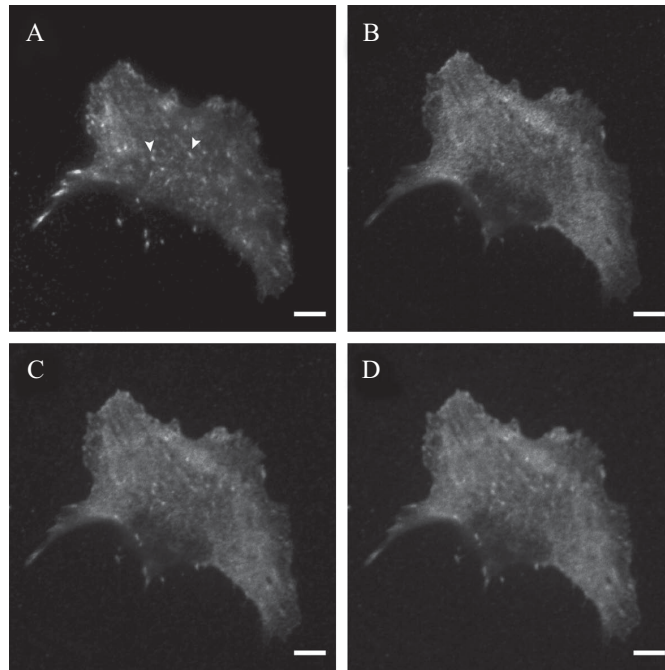


A: U251胶质瘤细胞表面, 图中标记为黏着斑蛋白, 全内角反射位置为 $942.8\ \mu\text{m}$; B: U251胶质瘤细胞表面, 全内角反射位置为 $937.8\ \mu\text{m}$; C: U251胶质瘤细胞表面, 全内角反射位置为 $917.8\ \mu\text{m}$, 此状态为调至到膜表面的最佳状态。标尺= $10\ \mu\text{m}$ 。

A: cell surface of U251 glioma cell, Vinculin labeled with fluorescence, the TIRF position is $942.8\ \mu\text{m}$; B: cell surface of U251 glioma cell, the TIRF position is $937.8\ \mu\text{m}$; C: cell surface of U251 glioma cell, the TIRF position is $917.8\ \mu\text{m}$, C shows the best state of cell surface. Scale bar= $10\ \mu\text{m}$.

图1 全内角反射系统成像条件优化过程

Fig.1 The optimization process of TIRF system imaging conditions

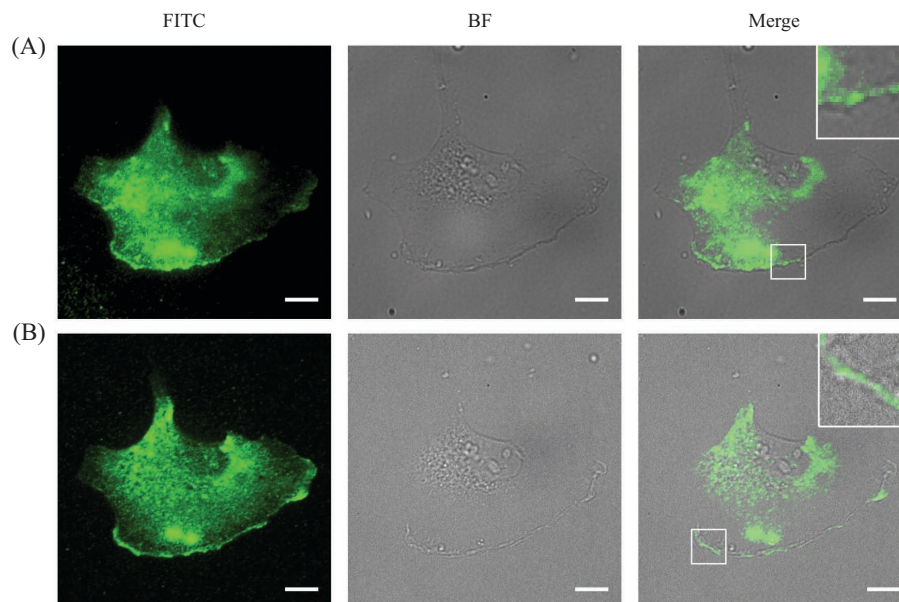


A: 全内角反射系统下U251胶质瘤细胞的细胞膜表面, 荧光标记为黏着斑蛋白, 箭头所示为黏着斑蛋白形成的斑点状结构; B: 双转盘系统下神经胶质瘤细胞的细胞膜表面, Z轴的位置为5563.850 μm ; C: 双转盘系统下神经胶质瘤细胞的细胞膜表面, Z轴的位置为5563.300 μm ; D: 双转盘系统下神经胶质瘤细胞的细胞膜表面(60 \times), Z轴的位置为5563.025 μm ; D为继续下调Z轴之后呈现出的虚焦图像。标尺=10 μm 。

A: cell surface of U251 glioma cell under TIRF system, Vinculin labeled with fluorescence, arrows show the spots that Vinculin formed; B: cell surface of glioma cell under SDC system, Z position is 5563.850 μm ; C: cell surface of glioma cell under SDC system, Z position is 5563.300 μm ; D: cell surface of glioma cell under SDC system, Z position is 5563.025 μm ; D shows an unclear image after downregulating Z position. Scale bars=10 μm .

图2 细胞膜表面成像

Fig.2 Imaging of cell surface

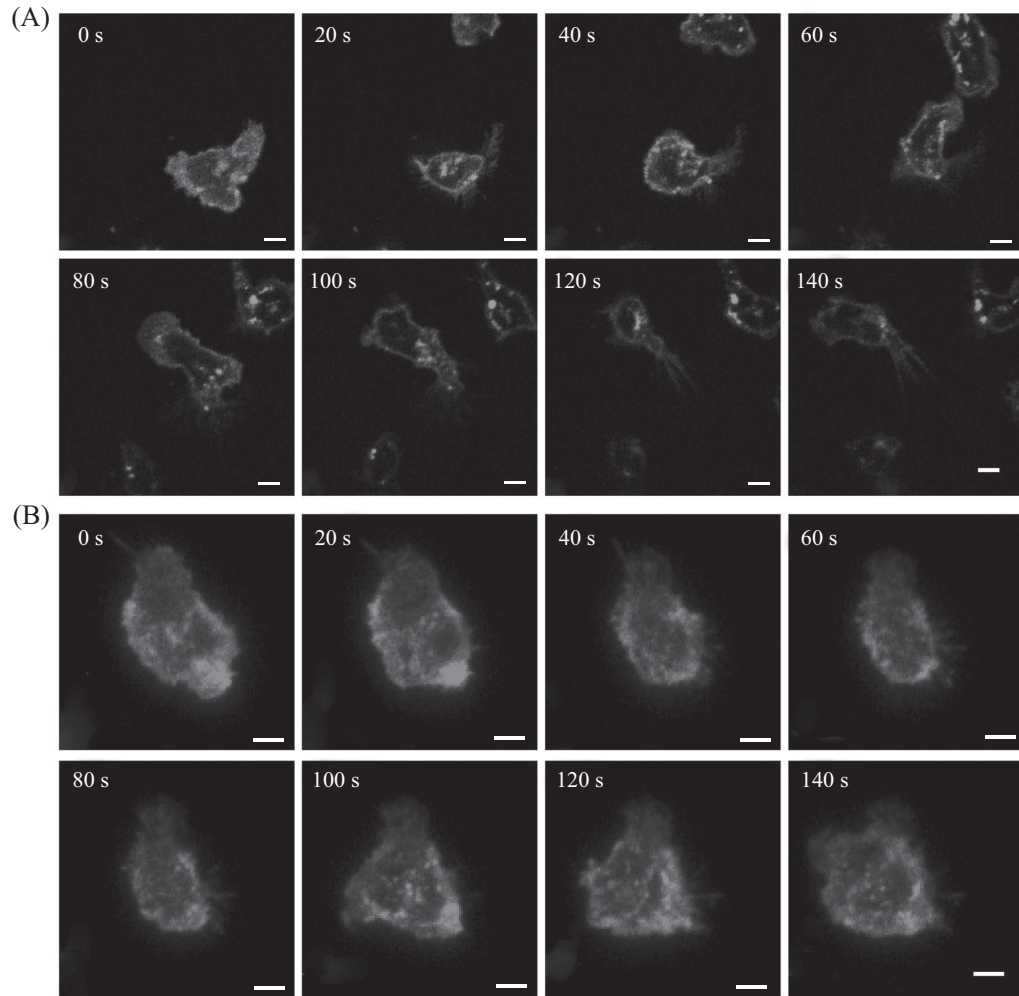


A: 全内角反射系统下U251胶质瘤细胞的细胞边缘, 依次为FITC通道、明场通道、双通道叠加; B: 双转盘系统下U251胶质瘤细胞的细胞边缘。方框中进行区域放大, 标尺=10 μm 。

A: cell edge of U251 glioma cell under TIRF system, the images are FITC channel, bright-field channel and merged channel in order; B: cell edge of U251 glioma cell under SDC system; insets represent higher magnification views of rectangle in (A) and (B). Scale bars=10 μm .

图3 细胞边缘成像

Fig.3 Imaging of cell edge



A: 双转盘系统下一典型中性粒细胞从0 s到140 s的动态变化; B: 全内角反射系统下中性粒细胞从0 s到140 s的动态变化。荧光标记为PE-gr-1。标尺=4 μm 。

A: motility of a typical neutrophil between 0 s and 140 s under SDC system; B: motility of a typical neutrophil between 0 s and 140 s under TIRF system. Fluorescence indicates PE-gr-1. Scale bars=4 μm .

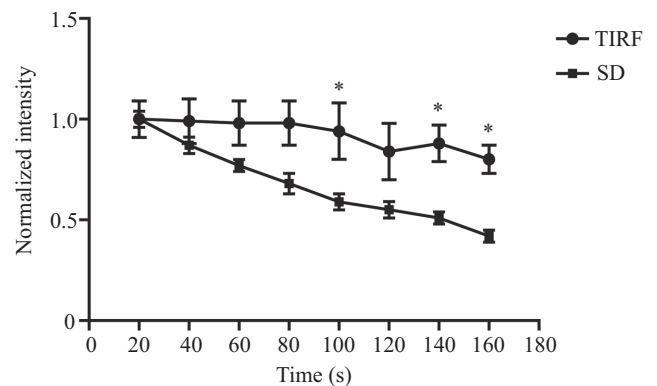
图4 2 s时间间隔的动态成像

Fig.4 Time-lapse imaging in a 2 s interval

全内角反射成像具有明显的优势(图7)。

3 讨论

在科学研究中, 高分辨率的成像技术有助于发现前人未发现的结构和现象, 而降低来自于非焦平面的杂光是提高采集图像分辨率的关键。共聚焦显微镜成像已经成为最常用的一种技术, 它通过针孔来滤除非焦平面杂光进而提升图像的分辨率。全内角反射成像通过隐失波来激发荧光基团, 激发范围仅仅从50 nm到150 nm, 这个距离小于物镜的焦点深度, 也使得其具有极少的非焦平面的杂光^[9]。实验结果显示, 全内角反射可以采集到细胞表面最佳状态的焦平面, 而转盘式共聚焦却受到限制, 无法采集

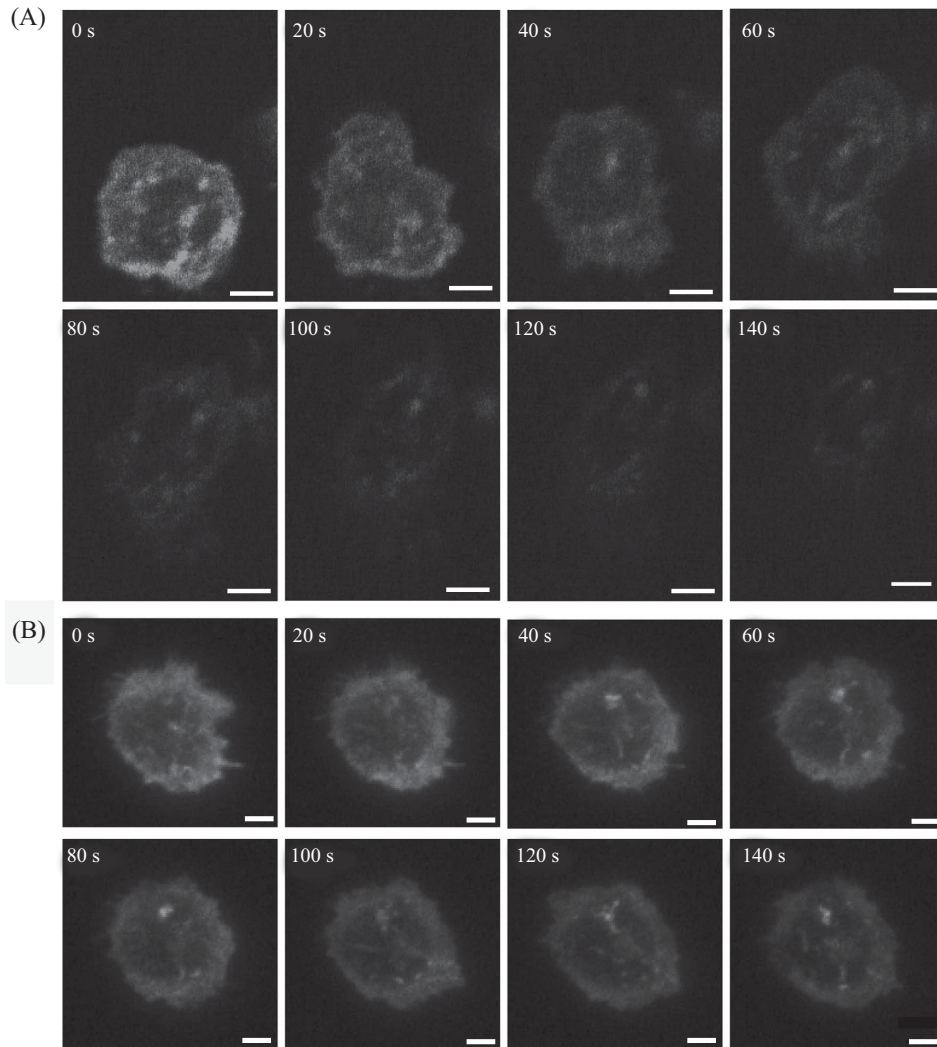


$n=5$, $*P<0.05$, 与双转盘系统拍摄组比较。

$n=5$, $*P<0.05$ vs SD group.

图5 两种成像技术动态拍摄荧光强度的变化

Fig.5 The intensity changes during time-lapse imaging using two different systems

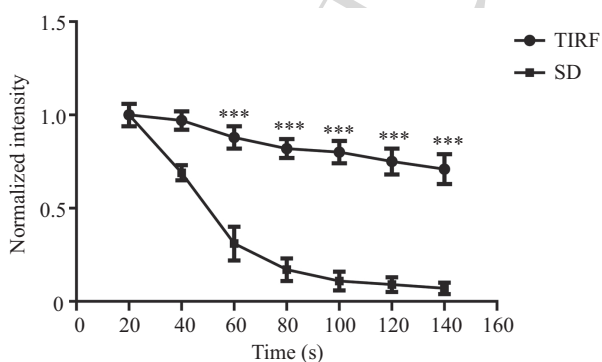


A: 双转盘系统下一典型中性粒细胞从0 s到140 s的动态变化; B: 全内角反射系统下中性粒细胞从0 s到140 s的动态变化。荧光标记为PE-gr-1。标尺=4 μm 。

A: motility of a typical neutrophil between 0 s and 140 s under SDC system; B: motility of a typical neutrophil between 0 s and 140 s under TIRF system. Fluorescence indicates PE-gr-1. Scale bars=4 μm .

图6 100 ms时间间隔的快速捕捉成像

Fig.6 Fast acquisition imaging in a 100 ms interval



$n=4$, $***P<0.001$, 与双转盘系统拍摄组比较。

$n=4$, $***P<0.001$ vs SD group.

图7 两种成像技术快速捕捉拍摄荧光强度的变化

Fig.7 The intensity changes during fast acquisition imaging using two different systems

紧贴玻片的焦平面。由于共聚焦显微镜是对样品进行层扫, 因此选择最佳的焦平面是实验成功的关键。为了证实其是否可以达到全内角反射的效果, 我们在Z轴的不同位置进行了扫描, 发现即使在保证图像清晰度的最低位置(即最靠近玻片的位置)也不能够完全拍摄到所有黏着斑蛋白的斑点状结构, 如果将Z轴位置继续下调, 那么图像将会变得模糊不清。被拍摄到的这些斑点可能是未紧密贴在玻片上的一部分结构, 处于略高的Z轴位置。有文献指出, 通过点扫描共聚焦显微镜也可以采集到较多的黏着斑蛋白的斑点状结构^[10], 这是因为点扫描共聚焦显微镜针孔可调, 可以扫描更薄的区域, 而转盘式共聚

焦针孔不可调, 这从一定程度上就增加了非焦平面杂光的影响, 影响了分辨细胞结构的精度。从成像原理上分析, 我们认为, 全内角反射在拍摄细胞边缘方面(用以分析细胞的伪足变化等方面)可能更加具有优势, 但转盘式共聚焦也可以达到同样的效果。但是, 由于转盘的转动, 转盘式共聚焦的明场成像会受到一定的影响, 产生相对较多的噪点, 这也是转盘式共聚焦的一个不足之处。所以, 在进行贴壁细胞膜表面的精确成像时, 尽量采用全内角反射或点扫描共聚焦显微镜进行实验。

活细胞成像已经成为现代细胞生物学研究领域不可分割的一部分, 对于活细胞成像最大的挑战在于在保证信噪比的前提下最大程度地降低光损伤以及光漂白, 尽可能的限制激发光的强度^[1]。我们对两种成像技术进行比较的前提是在同一套显微镜系统下, 即在转盘式共聚焦显微镜上同时搭载了全内角反射系统。在两个不同的系统下进行拍摄时采用相同的参数设置, 但由于在双转盘系统下, 激光会直接照射在细胞表面; 而在全内角反射系统下, 激光形成了全内角反射, 只是利用形成的隐失波的能量, 因此全内角反射表现出了更低的光漂白。在更短的时间间隔(100 ms)拍摄中, 这种优势表现得更加明显, 在激光开关的快速开启关闭过程中, 激光高频率的照射在样品表面, 在所需观察的运动过程还没有结束之前, 双转盘系统下的细胞已经由于严重光漂白而导致荧光淬灭。所以, 在长时间观察细胞运动或需要捕捉细胞在极短时间内的快速运动时, 尽可能利用全内角反射技术进行成像实验。

此外, 在拍摄过程中发现样品的前期处理也至关重要, 如果使用未经任何处理的共聚焦小皿, 那么对于中性粒这种半贴壁细胞而言, 在拍摄过程中会存在跑焦甚至是无法紧密贴在皿底运动的现象, 所以须将小皿用0.1 mg/mL的纤连蛋白进行包被后使

用。要观察细胞的动态变化, 前提是维持细胞的活性, 在拍摄之前, 应将分离出来的原代细胞进行孵育, 以保证细胞的最佳状态。

综上所述, 相对于转盘式共聚焦成像技术, 全内角反射技术在贴壁细胞表面分子的成像方面具有明显优势, 在标记细胞表面或明场拍摄的情况下, 要观察细胞的运动变化以及捕捉快速变化过程, 全内角反射成像将成为一个更好的选择。

参考文献 (References)

- 1 Vyas JM. Insights into dendritic cell function using advanced imaging modalities. *Virulence* 2012; 3(7): 690-4.
- 2 Winter PW, Shroff H. Faster fluorescence microscopy: Advances in high speed biological imaging. *Curr Opin Chem Biol* 2014; 20: 46-53.
- 3 Brodovitch A, Limozin L, Bongrand P, Pierres A. Use of TIRF to monitor T-lymphocyte membrane dynamics with submicrometer and subsecond resolution. *Cell Mol Bioeng* 2015; 8(1): 178-86.
- 4 Yamamura H, Suzuki Y, Imaizumi Y. New light on ion channel imaging by total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. *J Pharmacol Sci* 2015; 128(1): 1-7.
- 5 Belyy V, Yildiz A. Processive cytoskeletal motors studied with single-molecule fluorescence techniques. *FEBS Lett* 2014; 588(19): 3520-5.
- 6 Toomre D. Alignment and calibration of total internal reflection fluorescence microscopy systems. *Cold Spring Harb Protoc* 2012; 2012(4): 504-9.
- 7 Stehbens S, Pemble H, Murrow L, Wittmann T. Imaging intracellular protein dynamics by spinning disk confocal microscopy. *Methods Enzymol* 2012; 504: 293-313.
- 8 Dong X, Wu D. Methods for studying neutrophil chemotaxis. *Methods Enzymol* 2006; 406: 605-13.
- 9 Jaiswal JK, Simon SM. Imaging single events at the cell membrane. *Nat Chem Biol* 2007; 3(2): 92-8.
- 10 Lecointre C, Desrues L, Joubert JE, Perzo N, Guichet PO, Le Joncour V, *et al.* Signaling switch of the urotensin II vasosactive peptide GPCR: Prototypic chemotactic mechanism in glioma. *Oncogene* 2015; 34(39): 5080-94.
- 11 Ettinger A, Wittmann T. Fluorescence live cell imaging. *Methods Cell Biol* 2014; 123: 77-94.