

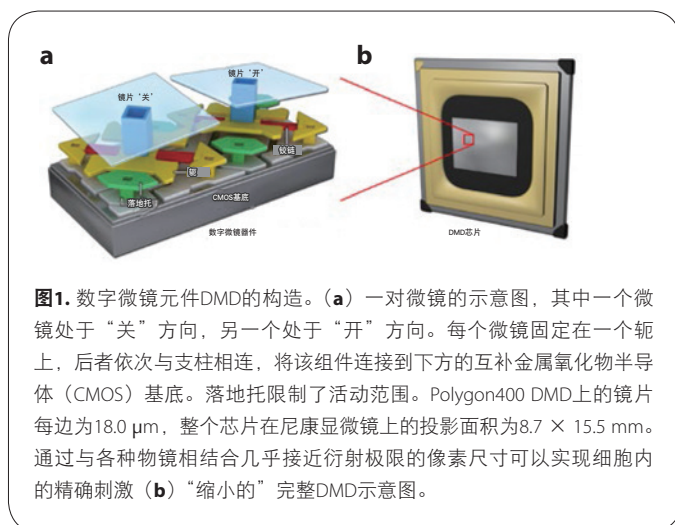


利用DMD作为图案化照明工具来探究光遗传学控制的信号传导

数字微镜器件（DMD）凭借其高时空分辨率的新颖照明图案而成为光刺激应用（包括光转换和光遗传学操作）的有力工具。本应用说明将展示近期的研究工作，以阐述集成在尼康系统中的DMD技术如何应用在光遗传学控制的细胞内信号传导的研究中。

DMD技术及其与成像实验的结合

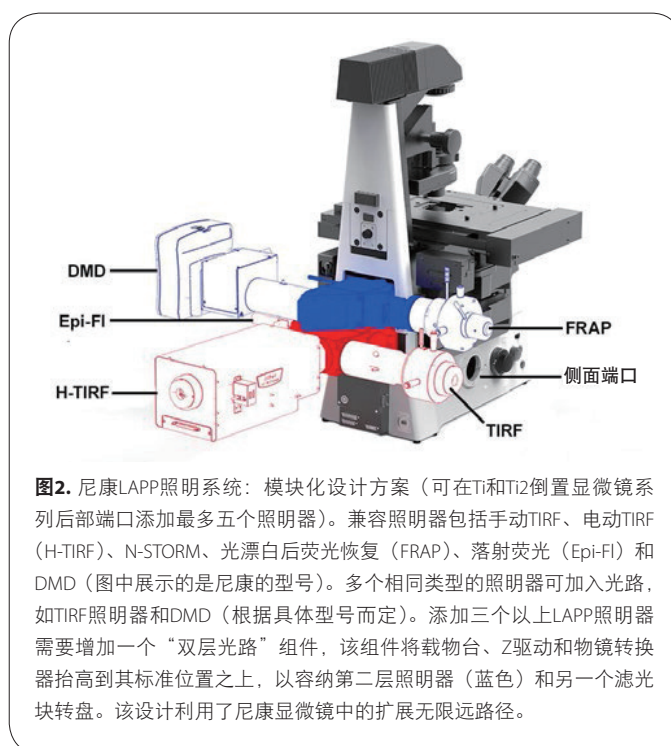
DMD由几千到数百万个矩形显微镜片阵列组成（图1），其中每个镜片都可以在相差约 12° 倾角的“开”位置与“关”位置之间转换。由于每个镜片都能单独控制，因此能够实现无以计数的可编程照明图案。此外，DMD还兼容LED光源，比其他基于激光的光刺激系统（如振镜扫描仪）更灵活、更节省成本。



利用尼康的激光应用（LAPP）照明系统，最多可以在显微镜光路中添加两个DMD器件（视具体型号而定），允许用户用两组具有不同波长和强度的特定图案同时进行刺激。此外，LAPP系统还允许在单个显微镜上最多安装五个照明模块，以便组合不同的成像模式，如DMD和全内反射荧光（TIRF）（图2）。由于LAPP照明器连接到显微镜的后部端口，用户可以通过侧面端口增加其他成像功能，包括共

John Allen

Nikon Instruments, Inc., Melville, New York, USA. Correspondence should be addressed to J.A. (jralen@nikon.net) or Lynne Chang (lchang@nikon.net).



聚焦扫描仪。LAPP系统还提供了一个内置升级路径。例如，用户可以仅从一个落射荧光模块开始，然后根据需要方便地添加其他功能。

通过将各种操作集成在尼康NIS-Elements软件中，最大程度地简化了DMD模块的使用。DMD镜片与相机像素之间的校准简单且自动完成，可以在相机捕捉的图像上轻松绘制DMD控制的空间图案。此外，NIS-Elements还支持通过Illumination Sequence（照明序列）模块实现DMD的硬件触发和自定义控制，在这里用户可以对最适合活细胞实验的超快硬件触发多波长成像序列进行编程。可快速完成在完全不同的DMD照明模式间切换——最高可达4000 Hz（具体与图案数量有关）——并支持来自触发LED光源的可变光输出。可以在实验中轻松产生一系列变化的照明图案。

用DMD实现光遗传学控制信号传导

DMD技术为许多基于光遗传学的实验带来了便利，包括最为人所知的刺激表达视蛋白的神经元细胞。这里我们将以Johnson等人¹为研究Ras-Erk信号传导通路在果蝇发育胚胎中的作用而开发的OptoSOS系统为例，探讨DMD在采用光门控制细胞质膜招募的实验中的应用。

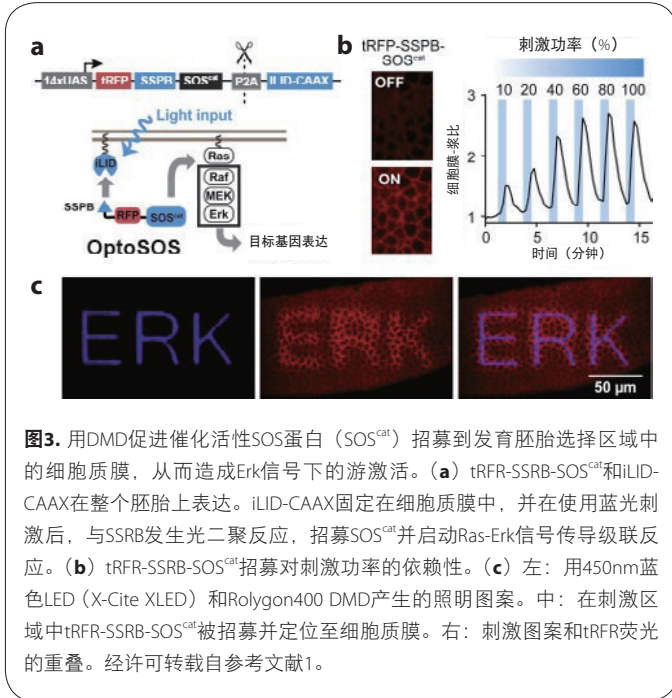


图3表示如何利用来自DMD的图案化照明控制果蝇发育胚胎中Erk信号传导的空间范围和量级。重要的是，这种通用的系统可以扩展到探索其他信号传导通路和/或其他模式生物的生理功能的实验中去。

过去，为研究信号传导通路在胚胎发育中的作用，靶向表达系统和条件突变是可选的方法。然而，功能获得型 (GOF) 通路突变可能存在问题，表现为增强信号的空间范围有限并且经常导致胚胎完全死亡。GOF突变普遍缺乏OptoSOS等系统的“开-关”切换能力，这意味着无法在发育过程中的指定时间点上刺激信号传导。

最近，Johnson等人的研究工作已经扩大到包括监测立早基因的转录和蛋白水平²。在这项研究中，应用了PHY-PIF系统对Ras进行光遗传学激活。PHY-PIF二聚反应用650nm光诱导并用750nm光关闭。本例中使用了两个DMD模块 (Nikon Instruments, Inc. 经销的Polygon400、Mightex系统)：一个用于650nm激活，另一个用于750nm灭活。该方法获取到了更加丰富的数据，能够真正实现信号传导与基因表达间精细平衡的定量评估，并在该研究领域开创了系列全新的实验方法。

1. Johnson, H.E. *et al. Dev. Cell* **40**, 185-192 (2017).

2. Wilson, M.Z., Ravindran, R.T., Lim, W.A. & Toettcher, J.E. *Mol. Cell* **67**, 757-769 (2017).