



## 使用尼康A1和N-SIM实现无标记结构的反射成像

反射成像是一种用来自样本的反向散射光形成强度图像的光学显微法。这使得反射成像可与荧光成像等方法一起进行，或者作为一种独立的方法研究各种有标记和无标记样本。

干涉反射式显微法（IRM）是反射光成像的初期应用<sup>1</sup>。IRM的过程涉及从信号形成图像，信号是通过光线在不同折射率（RI）的底物边界上相互作用而产生的。从这一原始应用开始，出现了各种根据细胞和组织样本上天然存在的折射率不匹配产生图像的配置。不过，与荧光标记相似，对比度也可以通过引入高折射率和高光学密度的材料人为产生。

尼康A1点扫描共聚焦系统和尼康N-SIM超分辨率结构化照明系统都能在反射模式下成像。在重要研究方面，这两种技术在反射底物上呈现的优缺点各有不同，如以前讨论过的纳米颗粒（NP）<sup>2,3</sup>。其他成像模式也可从反射配置的应用中受益，以提供结构信息，包括多光子体内研究<sup>4</sup>。

### 反射成像：简介

显微图像中的对比度是通过不同标本组分中光的相互作用而产生的。在传统荧光显微法中，该信号是通过从与关注分子偶联的激发荧光团发出的光线产生的。但荧光团不易固定，可能改变标记底物的理化性质和细胞处理，也可能在实验过程中脱离，并且易受光漂白作用影响<sup>5,6</sup>。

在透射和反射成像中，对比度是通过光线在样本内存在的边界上的相互作用而产生的。

这些边界存在于折射率不同的区域界面上。在透射光显微法中，收集的光线是经过这些边界透射的光线，而在反射显微法中，形成图像的光线是反向散射光线。反射在样本研究方面具有若干优势：

- 1) 与荧光成像不同，对样本内的各种组分进行可视化时不需要标记
- 2) 与荧光成像不同，不会发生光漂白
- 3) 与透射显微法相比，关注对象的信噪比（SNR）大大提高

因此，反射成像成为研究含有折射率或光学密度相对于其周围介质相差足够大的关注对象样本的不二之选——例如细胞内金属纳米颗粒的成像<sup>2,3,7,8</sup>。

### 使用尼康A1共聚焦系统进行反射成像

反射成像的初期局限之一是高度散射环境（如细胞）中存在的高水平背景信号。通过共轭针孔系统阻挡散焦光，与反射模式下的落射照明相比，共聚焦显微法提供了一种同时提高信噪比和分辨率的手段。它能够进行光学切片。共聚焦反射图像可以使用共聚焦显微镜获得，例如尼康A1，方法仅仅是将二向色镜改为透射/反射镜（BS20/80）并安装具有所选激光波长（如488 nm）的第四通道（图1）（Guggenheim等人，2016年）。

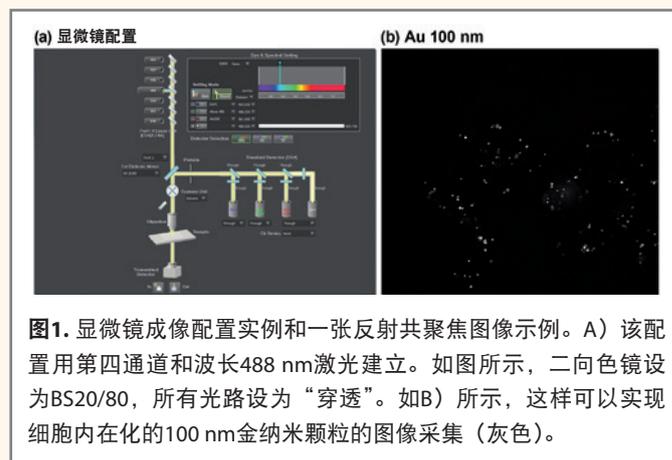


图1. 显微镜成像配置实例和一张反射共聚焦图像示例。A) 该配置用第四通道和波长488 nm激光建立。如图所示，二向色镜设为BS20/80，所有光路设为“穿透”。如B)所示，这样可以实现细胞内化的100 nm金纳米颗粒的图像采集（灰色）。

Dr. Emily J Guggenheim<sup>1</sup> and Dr. Joshua Z Rappoport<sup>2</sup>

1. School of Geography Earth and Environmental Sciences, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham, B15 2TT, UK

2. Center for Advanced Microscopy and Nikon Imaging Centre, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago IL, 60611, USA

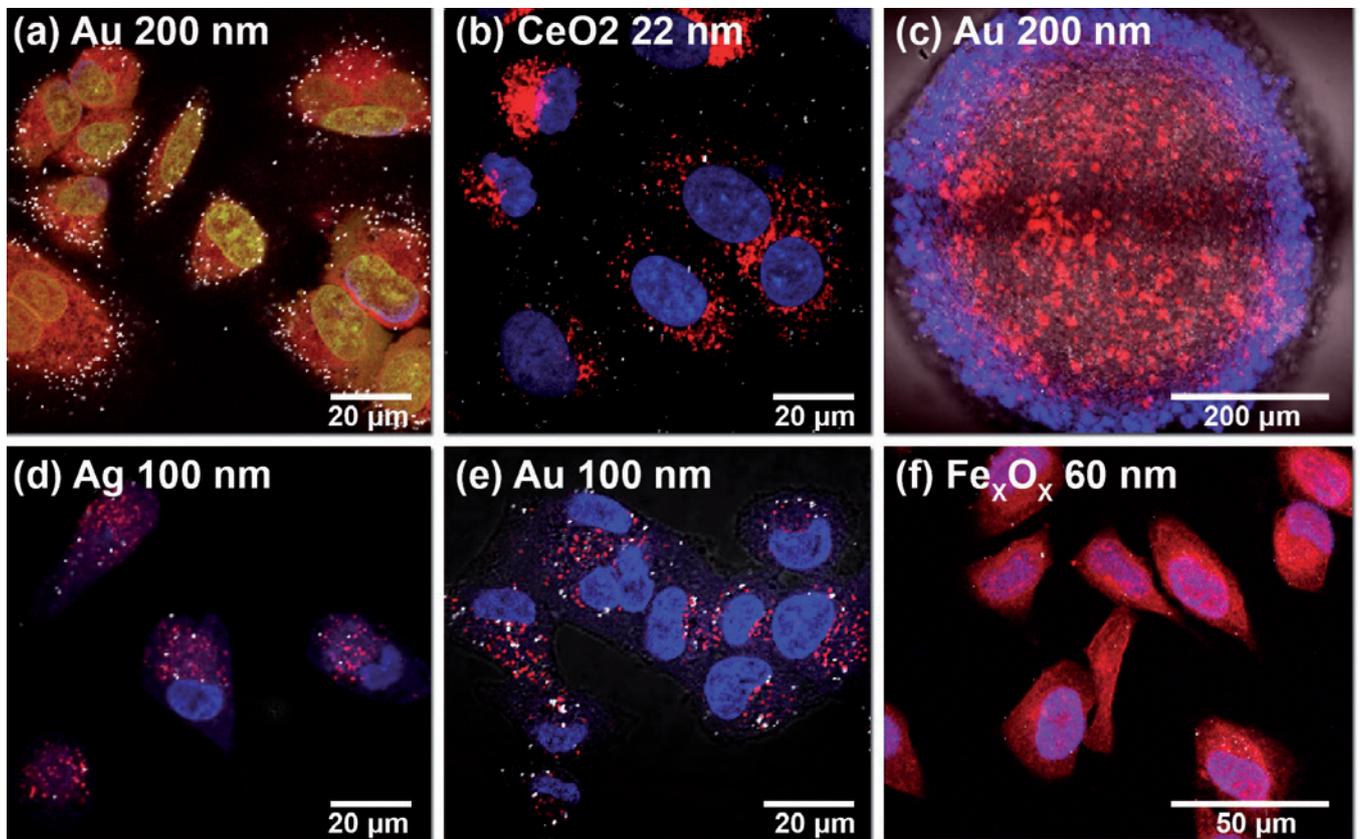


只要关注的结构相对于周围介质的折射率相差足够大，就有可能实现无标记样本的反射成像<sup>1,9</sup>。另外，和用荧光团标记亚细胞组分类似，可以将光反射探针（如图1-4中所示的纳米颗粒）应用在生物学标本上。这些试剂可以在样本内的特定位置上产生强烈对比<sup>2,8,10</sup>。

鉴于纳米颗粒在商业和生物医学应用中的使用不断增加，而可用的相关安全性和机理数据却寥寥无几，这类纳米颗粒可能经常成为生物医学研究的焦点。金属纳米颗粒利用反射成像创造明显的对比，而反射共聚焦显微法（RCM）非常适合深入研究这些纳米颗粒的特性。一部分原因归功于仪器的易用性，另一部分原因是有望将这些研究与荧光标记（例如内溶酶体染色）组合，以确定研究对象的移动

踪迹和最终结果（图2）<sup>3</sup>。因此，已经在细胞和动物模型中利用反射成像研究了纳米颗粒的细胞内定位、转运和毒性等。图2除给出了这些纳米颗粒的实例<sup>2,3,8,10,11</sup>外，还给出了一个示例，该示例说明了如何利用RCM对三维细胞结构（如球状体）进行成像，以确定和/或增加纳米颗粒的细胞摄取，这可能对将来的癌症治疗策略有益。

RCM可以提供半量化结果，当与自动化处理和分析相结合以提高研究吞吐量时，格外有益于纳米研究领域<sup>2,3</sup>。但为了获得绝对量化结果，已经将各种成像模式（例如透射电子显微法（TEM）和质谱分析法（MS））并入工作流程中进行了大量的比对实验<sup>2,11</sup>。



**图2.** 不同金属NP的共聚焦反射和荧光成像实例。这些图像表示摄入于细胞或细胞球状体的下列纳米颗粒：A) Au 200 nm, B) CeO<sub>2</sub> 22 nm, C) Au 200 nm, D) Ag 100 nm, E) Au 100 nm和F) 羧基右旋糖苷镀膜氧化铁（Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>和Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>）60 nm，全部用灰色表示。所有图像中细胞核均使用蓝色DAPI染色。（a、c、f）中细胞质用CTO（橙色/红色）染色。Lysotracker（红色）用于识别（b、d、e）中不同纳米颗粒的溶酶体定位。右上角图像表示用金纳米颗粒（灰色）处理（在悬浮液中）的500 μm直径球状体的大型图像。该视图是从盖玻片中捕获40 μm球体的Z轴3D图像的最大投影。

### 使用尼康N-SIM超分辨率系统进行反射成像

尽管共聚焦反射具有一定优势，但传统光学成像方式的基础分辨率限制依然存在。因此，为获取高分辨率（分辨率超过光线衍射极限）图像所作的努力从未停止，对于致力突破上述提到的衍射极限的技术，我们统称之为超分辨率技术。结构化照明显微法（SIM）能以相对较小的时间分辨率损失将空间分辨率提高两倍，十分有利于活细胞成像<sup>12</sup>。尽管SIM在荧光成像中使用广泛，但反射模式下使用SIM成像的文献记载并不多见。

在传统尼康N-SIM采集中，光路中存在一个由激发光滤光片、发射光（或遮光）滤光片和二向色镜组成的滤光块。从标本发射的光线可以经由该滤光块到达探测器，同时该滤光块还能阻止激发光线的检测。进行反射SIM(R-SIM)时，用一个半反射镜替换该滤光块，允许从样本反射的光线以和入射光相同的波长透过。在R-SIM中，样本的照射方式与荧光SIM相同，借此用一个格栅构造入射光，采集几张后来能在傅里叶域中重建的图像，从而形成超分辨率图像<sup>12</sup>。这种方法已经应用在使用定制和商用显微镜研究细胞内纳米颗粒的研究中<sup>2,7</sup>。

用无标记光学显微法拍摄分辨小于衍射极限的分离结构的能力在更精准地确定纳米颗粒聚合物定位上具有显著优势。尽管使用R-SIM的效率不同，但具有不同组成的纳米颗粒可以被检测到（图3）。例如，实验表明用RCM比用R-SIM能更好地检测超顺磁氧化铁纳米颗粒（SPION）（图4）<sup>2</sup>。R-SIM检出率低是因为使用宽场照明（因此本底散射水平较高）造成的。由于需要的样本制备最少，而且和共聚焦一样，可以方便地与荧光标记结合使用，因此R-SIM可在生物学研究中成为一种特别有用的额外分辨率和信息来源。基于此，使用尼康N-SIM仪器进行R-SIM可在研究中提供更大的确定性，如纳米颗粒和标记结构的共定位评估（图4）。如早先研究中所做的那样，可通过包括TEM在内的比对 workflow 确认反射方法的灵敏度和特异性<sup>2</sup>。

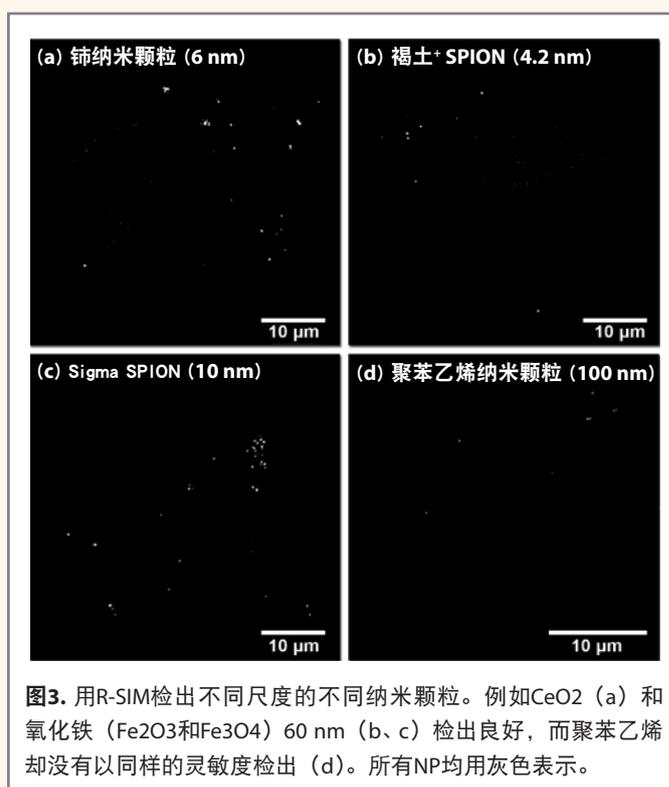
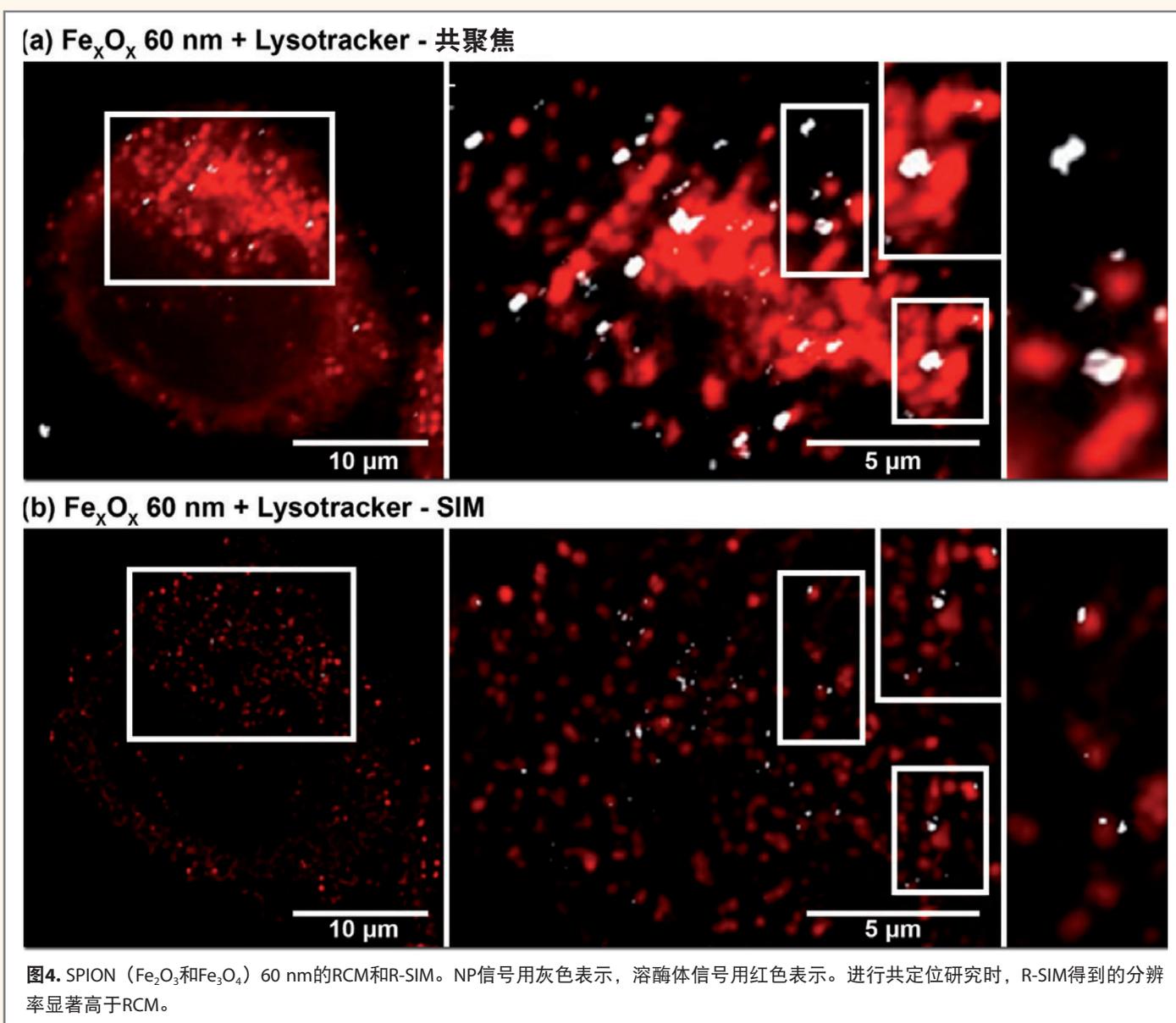


图3. 用R-SIM检出不同尺度的不同纳米颗粒。例如CeO<sub>2</sub> (a) 和氧化铁 (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>和Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) 60 nm (b、c) 检出良好，而聚苯乙烯却没有以同样的灵敏度检出 (d)。所有NP均用灰色表示。

### 结论

可以采用不同的照明和散射收集配置进行反射成像，包括干涉法、共聚焦、隐失波、结构化照明和斜角照明。这可以进行广泛的研究，尤其是在纳米研究领域，反射研究将在该领域中对确定纳米颗粒在各种应用中的安全性和功效方面发挥重要作用。由于细胞和组织的不同组分具有不同的折射率，反射成像对研究生物学样本的结构和组成可能十分有利。反射成像提供额外和补充结构信息的能力在体内成像领域中格外显著，有助于现有诊断和监测策略的脉络化发展。



## 参考文献

- Curtis, A. S. (1964) 'The Mechanism of Adhesion of Cells to Glass. a Study by Interference Reflection Microscopy', *The Journal of cell biology*. UNITED STATES, 20, pp. 199-215.
- Guggenheim, E. J. et al. (2016) 'Comparison of Confocal and Super-Resolution Reflectance Imaging of Metal Oxide Nanoparticles', *PLOS ONE*. Edited by V. E. Degtyar. Public Library of Science, 11(10), p. e0159980. doi: 10.1371/journal.pone.0159980.
- Guggenheim, E. J., Lynch, I. and Rappoport, J. Z. (2017) 'Imaging In focus: Reflected light imaging: Techniques and applications', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 83, pp. 65-70. doi: 10.1016/j.bio-cel.2016.12.008.
- Costantini, I. et al. (2016) 'Combination of two-photon fluorescence microscopy and label-free near-infrared reflectance: a new complementary approach for brain imaging', in *Biomedical Optics 2016*. Washington, D C.: OSA, p. JW3A.23. doi: 10.1364/CANCER.2016.JW3A.23.
- Sugden, J. K. (2004) 'Photochemistry of dyes and fluorochromes used in biology and medicine: some physicochemical background and current applications', *Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission*, 79(2), pp. 71-90. doi: 10.1080/10520290412331292400.
- Quinn, M. K. et al. (2015) 'How fluorescent labelling alters the solution behaviour of proteins.', *Physical chemistry chemical physics: PCCP. The Royal Society of Chemistry*, 17(46), pp. 31177-87. doi: 10.1039/c5cp04463d.
- Chang, B.-J. et al. (2011) 'Subdiffraction scattered light imaging of gold nanoparticles using structured illumination', *Optics Letters*. Optical Society of America, 36(24), pp. 4773-4775.
- Mazzolini, J. et al. (2016) 'Protein corona modulates uptake and toxicity of nanoceria via clathrin-mediated endocytosis e', *The Biological Bulletin*.
- Gáspár, I. and Szabad, J. (2009) 'In vivo analysis of MT-based vesicle transport by confocal reflection microscopy', *Cell motility and the cytoskeleton*, 66(2), pp. 68-79. doi: 10.1002/cm.20334.
- Stensberg, M. C. et al. (2014) 'Silver nanoparticle-specific mitotoxicity in *Daphnia magna*', *Nanotoxicology*, 8(8), pp. 833-42. doi: 10.3109/17435390.2013.832430.
- Kim, C. S. et al. (2015) 'Cellular imaging of endosome entrapped small gold nanoparticles', *MethodsX*, 2, pp. 306-315. doi: 10.1016/j.mex.2015.06.001.
- Gustafsson, M. G. (2000) 'Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy', *Journal of microscopy*, 198(Pt 2), pp. 82-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10810003> (Accessed: 3 May 2016).