

宗艾伦,周迎生. STORM 和 STED 显微成像技术特点的比较[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 115-118.

Zong AL, Zhou YS. Comparison of the characteristics of STORM and STED micro-imaging techniques [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(1): 115-118.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.01.019

STORM 和 STED 显微成像技术特点的比较

宗艾伦,周迎生*

(首都医科大学附属北京安贞医院内分泌代谢科,北京市心肺血管疾病研究所,北京 100029)

【摘要】 随机光学重建显微镜(stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)技术和受激发射损耗(stimulated emission depletion, STED)显微镜技术是近年来发展迅速的两种超分辨率荧光显微镜技术。这两种技术均提供超越传统荧光显微镜分辨率成像的功能,具有多色显像,三维成像以及活细胞内成像的潜力。在这篇综述中,我们关注两种技术荧光控制、激光强度等技术参数设定,同时结合样品制备、图像采集与处理等流程优化对比两者在分辨率、图像采集时间及具体应用中的优劣。STORM 可获得更高的三维分辨率,但可能需要更长的图像采集时间。STED 需要较高损耗光强度,却能在图像采集后立即生成超分辨率图像,不需要额外图像数据处理。最终,选择 STORM 和 STED 不仅取决于技术的具体应用,还取决于操作者优化各环节技术参数能力,从而决定图像质量。

【关键词】 超分辨率荧光显微镜技术;随机光学重建显微镜;受激发射损耗显微镜

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 01-0115-04

Comparison of the characteristics of STORM and STED micro-imaging techniques

ZONG Ailun, ZHOU Yingsheng*

(Department of Endocrinology and Metabolism, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing Institute of Heart Lung and Blood Vessel Diseases, Beijing 100029, China)

Corresponding author: ZHOU Yingsheng. E-mail: yszhou@ccmu.edu.cn

【Abstract】 Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) and stimulated emission depletion (STED) microscopy are two super-resolution fluorescence microscopic technologies developed in recent years. Both technologies can transcend traditional fluorescence microscopy image resolution, with the potential for multiple colors, three-dimensional imaging, and live-cell intracellular imaging. In this review, we focus on fluorescence control, laser intensity and other technical parameters, as well as sample preparation, image acquisition and processing optimization of the two processes, and compare their strengths and weaknesses in resolution, image acquisition time, and specific applications. Overall, STORM provides higher 3D-resolution, but may require longer image acquisition times. STED requires higher laser intensity, but can generate images immediately after image acquisition, without additional image data processing. Ultimately, choosing STORM or STED depends not only on the specific application of the technology, but also on the ability of the operator to optimize the technical parameters at each step.

【Keywords】 super-resolution microscopy; stochastic optical reconstruction microscopy; stimulated emission depletion

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

【基金项目】国家自然科学基金(81641027);北京市卫生系统高层次卫生技术人才项目(2013-2-006);北京市科委科研基金资助项目(Z131100004013044);北京市保健科研课题项目(京15-11号)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81641027), High-level Technical Talent Team in Beijing Health System (2013-2-006), Beijing Science and Technology Commission Research Fund Project (Z131100004013044), Beijing Health Research Project (Beijing 15-11).

【作者简介】宗艾伦(1993—),男,硕士研究生,研究方向:肥胖与2型糖尿病。Email: zongailun@gmail.com

【通信作者】周迎生(1965—),男,医学博士,主任医师,教授,博士生导师。Email: yszhou@ccmu.edu.cn

光学显微镜和电子显微镜,是研究亚细胞结构最常用的两大类显微镜技术。光学显微镜可根据光源不同分为普通光、荧光、红外光显微镜等。荧光光学显微镜以免疫荧光染色为技术基础,以荧光抗体为成像探针只选择与荧光抗体特异结合的结构进行成像。

光学显微镜分辨率定义为显微镜下可分辨两独立同亮度理想点光源间的最小距离。因存在衍射,成像为光斑而非理想光点。当两光点过于靠近,其像斑重叠时,无法将两点区分开,即光学系统中存在一分辨率极限。根据瑞利判据,光学衍射分辨率极限为 $\sim \lambda/2$ 。荧光光学显微镜受光学衍射限制,水平方向上区分两个同亮度理想点光源的最小距离 200 nm,即 ~ 200 nm 横向分辨率(488 nm 激发光下),垂直方向上为 500 nm,即 ~ 500 nm 纵向分辨率(488 nm 激发光下)。为了获得更高分辨率的纳米级图像,超分辨率荧光显微镜技术应运而生。

超分辨率荧光显微镜技术可以突破光学衍射极限,获得较传统荧光显微镜,如全内反射荧光显微镜(total internal reflection fluorescence microscope, TIRF)、共聚焦显微镜(confocal microscopy, Confocal)等更高的成像分辨率^[1]。其中,STORM 和 STED 作为两种最受关注的超分辨率荧光显微镜技术,均用于解析细胞纳米级图像,都取得了许多重大应用突破。例如,使用 STORM 显示细胞中肌动蛋白、细胞骨架的图像^[2]报道了横向 10 nm,纵向 20 nm 的分辨率;发现肌动蛋白和血管细胞在轴突中形成环状细胞骨架结构^[3];在 BS-C-1 活细胞中,STORM 可获得横向 30 nm,轴向 50 nm 的分辨率^[4];在多色显像方面,STORM 在 PtK2 细胞成像中已经可支持五种不同的颜色^[5]。STED 应用中,激发光需配合相应的损耗激光(STED beam)。在生物样品中,结合 4Pi 显微镜报道了约 40 nm 横向和纵向分辨率^[6];STED 使用于生物样品上的最高横向分辨率为 20 nm^[7];此外,STED 已经可以在活体小鼠大脑中进行成像,获得 70 nm 横向分辨率的长时间神经元图像^[8];使用 STED 显示 Hep G2 细胞分泌胞吐过程中,分泌泡外膜与细胞膜 Ω -型半融合结构,报道 60 nm 横向,150 nm 纵向分辨率^[9]。本文将讨论与实施相关的技术细节,重点介绍这些相似和差异对两种技术优缺点的影响。

1 荧光控制

STORM 随机地激活样品中部分荧光基团使之处于荧光态,未被激活的则处于暗态,而 STED 有目

标地特定激活样品某一区域。STORM 通常搭建于带全内反射荧光显微镜(TIRF)照明器的荧光显微镜,利用 TIRF 光路实现激发光均匀照明,激发整个照明视野。此外,TIRF 状态下的 STORM 可得到最高定位精度和信噪比。通常基于全内反射荧光显微镜平台,其技术原理大致可分为两部分:①在一帧图像里,根据 STORM 染料的闪烁特性,随机激发的荧光分子信号,拍摄到这些分子的荧光信号,通过高精度计算从每个荧光团信号的亮度中心为坐标确定该荧光信号团的定位。②重复采集多帧(约 5000~10 000 张)STORM 图像,结合图像重建算法对所有图片上的定位分子进行坐标位置筛选、重建出一张超高分辨率的 STORM 图形^[10-11]。STED 则基于激光扫描共聚焦显微镜平台,其成像原理有赖于共聚焦扫描和检测光路。激发光源既可使用脉冲光源也可选择连续光源,分辨率受到激发光束聚焦于样本上的光斑大小限制。STED 通过引入一束环形损耗光(STED beam,与发射光波长相近,相位相反)以减小样本有效荧光光斑面积。STED 技术原理大致可以分为两部分:①激发光激发样品荧光基团,使荧光基团处于荧光态,被照亮的荧光区域称为艾里斑(Airy disk)。②另外引入的损耗光则生成一个中空圆环抑制艾里斑周围荧光强度。使得仅可观察到艾里斑的中心荧光强度^[1],从而有效地将光斑面积减少,提高分辨率。

2 激光强度

选择较低功率的激光强度有利于保存样品生物活性免受光损伤。STORM 和 STED 使用的激光强度均高于传统荧光显微镜。STORM 所需的激光功率通常低于 STED,拥有更大的活细胞内成像潜能^[12-14]。激光强度设置对 STORM 至关重要。控制荧光团在荧光态和暗态切换,成像所需的激光强度必须足够高,以确保能将全部荧光态基团推回至暗态。通常在 STORM 图像采集过程中的激光强度约为 1 kW/cm^2 (647 nm)^[5]。合理设置激发光强度可提升 STORM 成像质量。STED 需要高强度损耗光达到最佳分辨率,分辨率随损耗光强度增加而增加,理论上不存在极限。在实践中,限制激光强度的两个主要因素:一是样品能承受的最大激光量;二是最大损耗激光强度可传递能量的大小。高激光强度不仅对样品本身产生影响,也加速荧光染料光漂白过程。在活细胞内应用时,更应特别注意激光强度的选择是否会对细胞活力及细胞正常功能产生影响。此外,还需要充分考虑样本和 STED 显微镜平台间的综合影响^[15-16]。

3 样品制备

样品制备对于显微镜技术至关重要,主要包括荧光染料选择及标记、成像缓冲液等。样品制备流程与常规免疫荧光染色流程并无差异,只是荧光二抗选择需符合技术要求。超分辨率显微镜所使用的二抗需更耐光漂白,即上百次反复开关后不出现明显衰减。尤其对于 STORM,选取有高光吸收效率及灵敏度,高亮度和高对比度,以及高光转换或光激活性质的染料,更有利于提高 STORM 成像质量^[17]。此外,样品制备也应遵循减少光漂白的原则,例如应用含有还原剂系统的缓冲液。

对于固定细胞,可使用传统免疫荧光染色一抗及荧光二抗。随着荧光技术发展,样品制备的选择也更丰富。例如,选择物理尺寸更小的 Fab 片段或纳米抗体等标记方式可进一步提高 STORM 定位精度^[18]。可开关荧光素染料^[19-20]等直接用于 STORM 成像^[21]。STED 荧光染料选择需考虑损耗光波长与荧光染料发射光谱限制。即损耗光波长必须同时满足既落在荧光染料激发光谱之外,又落在荧光染料发射光谱以内。除此之外,为使荧光尽可能多得通过检测器,损耗光波长不应与荧光染料发射峰值重叠,且向发射较弱、波长较长侧偏移为佳。适当将 STED 损耗光向波长较短侧移动可进一步提高分辨率,其原因与透镜间能量损耗相关^[22]。

4 图像处理

图像处理通常由内嵌函数的影像软件完成。STORM 在图像采集后需大量图像处理。图像处理涉及到荧光团鉴定、定位,最终图像重建。鉴定通常要求荧光团不相互重叠。定位方法最常使用高斯模型近似点扩散函数,每个荧光团的位置为高斯函数中心点。荧光团亮度越高,定位结果越准确。一张超高分辨率 STORM 图像可能需要 10 万到 1000 万个图像定位点。此外,越来越多算法被开发用于 STORM 图像处理,以减少成像滞后,缩短成像时间^[18,23]。

STED 在图像采集后,不再需要额外的图像数据处理。因此,STED 图像产量显著高于 STORM。这一优点也极大地提升了 STED 技术应用于细胞内成像的潜力。

5 图像采集

STORM 成像原理需要在定位 10 万至 1000 万个图像定位点基础上,重建超分辨率图像。在实际应用中,需要考虑样品定位漂移。产生样品定位漂

移的原因很多,如成像系统机械稳定性,样品与物镜间油膜稳定程度,温度等。最终图像分辨率与定位点数量正相关,因此,可以考虑牺牲一定分辨率换取更快的成像速度^[4]。例如,实时成像较大结构时,可使用压缩感应的方法^[24],或采用更亮荧光团结合更高激光强度^[4],所得 STORM 图像采集速度大幅提升,仅需几秒就可获得 30 nm 的空间分辨率,50 nm 的横向分辨率,而纵向成像时间更短,仅需 12 s 便可获得 50 nm 的纵向分辨率。STED 图像采集时间与所使用共聚焦显微镜基本一致,通常仅需几秒。实际图像采集时间可能因具有更高信噪比和更高空间分辨率而略长于共聚焦显微镜。STED 已成功报道应用于活体动物大脑 120 μm 深度切片成像,分辨率为 60 ~ 80 nm^[25]。结合双光子显微镜,小鼠脑深部组织切片成像^[8,26]。活体小鼠大脑中神经元长时间成像,并获得 70 nm 的分辨率^[8]。

虽然 STORM 和 STED 都具有活体内成像的应用潜力,但从图像采集时间来看,STED 明显优于 STORM。

6 解析度

STORM 和 STED 都可以实现超分辨率成像,最终图像解析度由多个因素共同决定。在 STORM 中,空间分辨率由探针大小、标记密度和定位精度决定。免疫染色抗体可提供 10 ~ 15 nm 探针大小。如前所述,STORM 已经实现了固定细胞内横向 10 nm,纵向 20 nm 的分辨率^[1-2]。更换更小物理尺寸的探针可进一步提升分辨率,如探针大小仅 4 ~ 6 nm 的纳米颗粒和 Fab 片段^[18]。此外,标记密度也会影响图像分辨率,STORM 图像是逐点重建生成,荧光越亮定位精确度越高,如果区域定位点数量不够多,最终重建的图像分辨率也会降低。STED 分辨率与损耗光强度正相关。在样品可耐受范围内,选择尽可能高的损耗激光强度有助于提高分辨率。

在纵向分辨率方面,STORM 和 STED 均已扩展至三维成像阶段。实现 3D 成像最简单且最具成本效益的方式是使用散光镜片,可获得 50 ~ 60 nm 的纵向分辨率^[27]。STED 通过两个不同的相位板将损耗光束分割,再通过相应相位板后重新组合,最终集中到样品上^[28-29]。不仅实现了横向检测光点的缩小,也实现了纵向检测光点尺寸的缩小,从而提高了纵向分辨率。但需要注意的是,因为光束分割的原因,纵向和横向分辨率是相关的,提高横向分辨率会降低纵向分辨率,反之亦然。所以需要根据实际拍摄样品及目的来调整。除此之外,为降低损耗光强度而引入时间门探测技术 (time gated

detection), 提出的 gSTED。根据不同荧光染料荧光寿命的不同,有效减小串色、降低图像背景,去除自发荧光等影响^[30-31]。

总之,STORM 拥有更高的分辨率,但图像采集时间更长的缺点限制了其在活体细胞中的应用。STED 生物分辨率虽不及 STORM,但对荧光染料兼容更好,采集过程更简单快速,更具活体成像潜力等特点使其在生物学的应用较 STORM 广泛。随着 STED 技术的快速发展,STED 已经使得在不损失图像分辨率的前提下减少所需激光强度成为可能。我们相信随着超分辨率显微镜技术的不断突破和进展,STORM 和 STED 都将成为我们揭秘纳米级世界的有利工具。

参 考 文 献(References)

- [1] Tam J, Merino D. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) in comparison with stimulated emission depletion (STED) and other imaging methods [J]. *J Neurochem*, 2015, 135(4): 643-658.
- [2] Xu K, Babcock HP, Zhuang X. Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton [J]. *Nat Methods*, 2012, 9(2): 185-188.
- [3] Xu K, Zhong G, Zhuang X. Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons [J]. *Science*, 2013, 339(6118): 452-456.
- [4] Jones SA, Shim SH, He J, et al. Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells [J]. *Nat Methods*, 2011, 8(6): 499-508.
- [5] Tam J, Cordier GA, Borbely JS, et al. Cross-talk-free multi-color STORM imaging using a single fluorophore [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101772.
- [6] Schmidt R, Wurm CA, Jakobs S, et al. Spherical nanosized focal spot unravels the interior of cells [J]. *Nat Methods*, 2008, 5(6): 539-544.
- [7] Donnert G, Keller J, Medda R, et al. Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(31): 11440-11445.
- [8] Berning S, Willig KI, Steffens H, et al. Nanoscopy in a living mouse brain [J]. *Science*, 2012, 335(6068): 551.
- [9] Zhao WD, Hamid E, Shin W, et al. Hemi-fused structure mediates and controls fusion and fission in live cells [J]. *Nature*, 2016, 534(7608): 548-552.
- [10] Patterson GH, Lippincott-Schwartz J. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells [J]. *Science*, 2002, 297(5588): 1873-1877.
- [11] Fernandez-Suarez M, Ting AY. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(12): 929-943.
- [12] Eggeling C, Willig KI, Barrantes FJ. STED microscopy of living cells - new frontiers in membrane and neurobiology [J]. *J Neurochem*, 2013, 126(2): 203-212.
- [13] Lakadamyali M. Super-resolution microscopy: going live and going fast [J]. *Chem Phys Chem*, 2014, 15(4): 630-636.
- [14] Neupane B, Ligler FS, Wang G. Review of recent developments in stimulated emission depletion microscopy: applications on cell imaging [J]. *J Biomed Opt*, 2014, 19(8): 080901.
- [15] Wildanger D, Buckers J, Westphal V, et al. A STED microscope aligned by design [J]. *Opt Express*, 2009, 17(18): 16100-16110.
- [16] Wildanger D, Medda R, Kastrup L, et al. A compact STED microscope providing 3D nanoscale resolution [J]. *J Microsc*, 2009, 236(1): 35-43.
- [17] Assmann M. Quantum-optimally enhanced STORM (QUEST) for multi-emitter localization [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 7829.
- [18] Ries J, Kaplan C, Platonova E, et al. A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies [J]. *Nat Methods*, 2012, 9(6): 582-584.
- [19] Dempsey GT, Vaughan JC, Chen KH, et al. Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging [J]. *Nat Methods*, 2011, 8(12): 1027-1036.
- [20] Oddone A, Vilanova IV, Tam J, et al. Super-resolution imaging with stochastic single-molecule localization: concepts, technical developments, and biological applications [J]. *Microsc Res Tech*, 2014: 502-509.
- [21] Shim SH, Xia C, Zhong G, et al. Super-resolution fluorescence imaging of organelles in live cells with photoswitchable membrane probes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(35): 13978-13983.
- [22] Vicidomini G, Moneron G, Eggeling C, et al. STED with wavelengths closer to the emission maximum [J]. *Opt Express*, 2012, 20(5): 5225-5236.
- [23] Sengupta P, Lippincott-Schwartz J. Quantitative analysis of photoactivated localization microscopy (PALM) datasets using pair-correlation analysis [J]. *Bioessays*, 2012, 34(5): 396-405.
- [24] Zhu L, Zhang W, Elnatan D, et al. Faster STORM using compressed sensing [J]. *Nat Methods*, 2012, 9(7): 721-723.
- [25] Urban NT, Willig KI, Hell SW, et al. STED nanoscopy of actin dynamics in synapses deep inside living brain slice s [J]. *Biophys J*, 2011, 101(5): 1277-1284.
- [26] Hell SW. Microscopy and its focal switch [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(1): 24-32.
- [27] Huang B, Wang W, Bates M, et al. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy [J]. *Science*, 2008, 319(5864): 810-813.
- [28] Harke B, Keller J, Ullal CK, et al. Resolution scaling in STED microscopy [J]. *Opt Express*, 2008, 16(6): 4154-4162.
- [29] Han KY, Willig KI, Rittweger E, et al. Three-dimensional stimulated emission depletion microscopy of nitrogen-vacancy centers in diamond using continuous-wave light [J]. *Nano Lett*, 2009, 9(9): 3323-3329.
- [30] Vicidomini G, Moneron G, Han KY, et al. Sharper low-power STED nanoscopy by time gating [J]. *Nat Methods*, 2011, 8(7): 571-573.
- [31] Moffitt JR, Osseforth C, Michaelis J. Time-gating improves the spatial resolution of STED microscopy [J]. *Opt Express*, 2011, 19(5): 4242-4254.