The background of the entire page is a complex, high-magnification microscopic image. It features a dense network of bright green, thread-like structures that appear to be filaments or fibers. These filaments are interconnected and form a complex, somewhat chaotic pattern. Scattered throughout this network are numerous small, bright red dots or granules. The overall appearance is reminiscent of a biological or chemical structure, possibly related to the research of the Wuhan Institute of Virology mentioned in the footer.

# 公共技术服务中心 平台技术快报

Technology Letters

中心平台简介  
大型设备简介

超高分辨率荧光显微镜

显微镜相关知识及技巧

中国科学院武汉病毒研究所

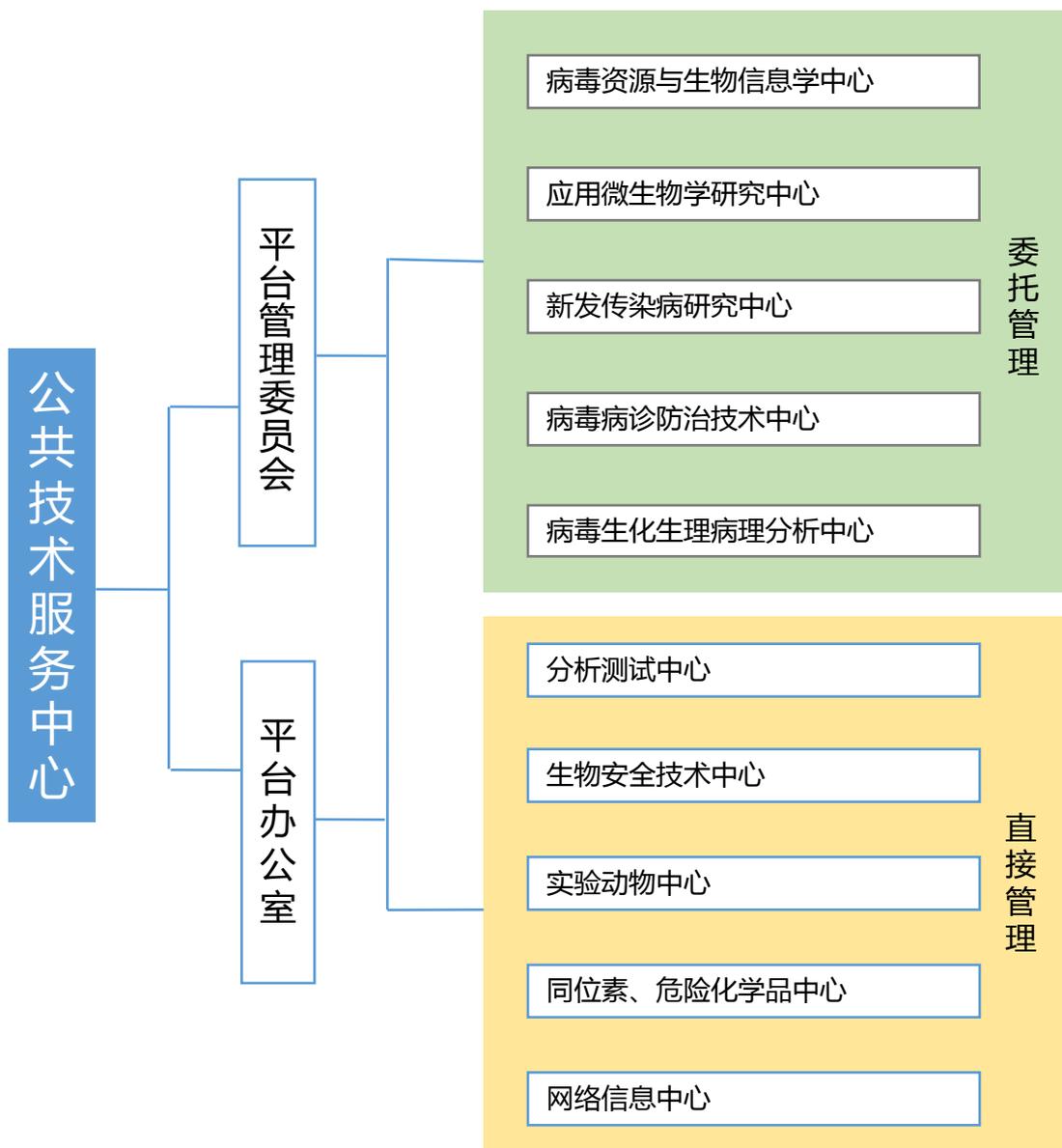
双月刊 第一期  
2013.10

# 目录.....

---

公共技术服务中心介绍.....	1
分析测试中心介绍.....	6
超高分辨率荧光显微镜.....	14
显微镜相关知识及技巧.....	20
本期结语.....	21

# 公共技术服务中心管理机制



# 中国科学院武汉病毒研究所公共技术服务平台管理办法（暂行）

## 第一章 总则

第一条 武汉病毒研究所公共技术服务平台（以下简称“平台”）是研究所创新体系建设的重要组成部分，对提高科研水平、促进学科交叉和融合、加强高层次创新人才的培养起着至关重要的作用。

第二条 为规范研究所平台管理，提升平台公共技术服务能力，加强所级科技资源条件的共建共享，根据《“十一五”国家科技基础条件平台建设实施意见》、《中国科学院技术支撑体系建设实施方案》、《中科院所级公共技术服务中心建设实施细则》等相关管理办法要求，按照研究所“十二五”科研条件发展规划，结合研究所现状和特点，特制定本暂行办法。

## 第二章 平台的目标和任务

第三条 平台的目标

平台的目标是全面提升研究所在学科建设和发展过程中的科技条件支撑能力；提升研究所共性技术、关键实验方法学创新能力；培养一支高素质、专业化的科技基础条件管理与技术支撑队伍；建立具备国内一流装备和管理水平的、跨学科的公共技术支撑服务体系。

第四条 平台的任务

平台负责统一管理研究所公用科研设施和仪器设备，确保这些设施设备在高度共享公用的机制下运行；开展有共性需求的实验方法学和实验技术创新研究，加强仪器设备的功能开发与技术提升；组织相关部门积极争取国家各部委科研装备研制等项目资源；参与制定研究所公用科研设施和仪器设备的发展规划、购置方案，负责平台设施设备的维修与改造；面向所内外开展各类实验技术培训；负责平台设备共享网站的运行与维护。

## 第三章 平台的机构设置及职责

第五条 平台下设平台管理委员会、平台管理办公室以及各专业技术实验室（中心）。

第六条 平台管理委员会（以下简称“管委会”）是平台管理工作的决策与监督机构，由主管所领导、研究所各研究单元以及平台的代表组成。

管委会负责平台发展规划、建设方案以及管理办法的制定、修订，并监督评价其具体执行情况；负责平台技术支撑岗位的设置、评估与考核；负责审核平台年度预决算执行情况；负责平台各项收费标准的审定。管委会的职能可由研究所“仪器设备管理委员会”代为行使。

第七条 平台管理办公室（以下简称“办公室”）是平台日常工作的管理、协调机构，由平台主任、副主任以及各专业技术实验室（中心）主任组成，在管委会指导和监督下开展工作。办公室挂靠在科研计划处。

第八条 专业技术实验室（中心）（以下简称“中心”）是平台科研设施设备运行管理和提供技术服务的基础单元，负责相关领域技术支撑和实验方法学、实验技术的创新研究。

第九条 平台岗位设置

一、平台主任。是平台运行与管理的总负责人，属于平台专职管理岗位，根据院所中层干部选拔聘用规定，通过公开招聘，由所长聘用。主要负责平台建设规划的实施与平台的运行管理，负责各中心岗位人员的聘用与考核，负责平台年度预决算的制定与实施。

二、平台副主任。是平台技术总负责人，属于平台专职或兼职管理岗位，根据院所中层干部选拔聘用规划，通过公开招聘，由所长聘用。主要负责平台整体建设方案的实施与平台技术的创新发展，审核平台各部门年度工作计划，协助平台主任开展各项工作。

三、专业技术实验室（中心）主任。是平台各中心日常管理的业务、行政负责人，一般由平台专职技术支撑岗位职工担任，由办公室推荐，管委会批准后担任。负责制定本部门年度工作计划；负责本部门年度财务预决算的制定与实施；负责本部门技术人员的聘用推荐与考核。是本部门的技术安全负责人，可以具体负责某一技术领域的实验技术以及相关科研装备的运行与维护。

四、各类技术岗位。包括平台首席技术专家、高级技术主管、技术主管、一般技术岗位，属于研究所专职技术支撑岗位，由各专业技术实验室（中心）根据研究所科技支撑岗位设置和实际需求提出聘用计划。

首席技术专家：是研究所公共技术支撑体系某一领域的技术带头人，一般按照院“百人计划”模式，通过研究所人才引进小组评审确定任用资格，或通过院“引进杰出技术人才”评审确定任用资格，由所长聘用。

高级技术主管：是中心各专业技术领域的负责人。由中心主任向办公室提出聘用申请，管委会负责组织遴选，经研究所审核批准后，由平台主任聘用。

技术主管：负责中心某类或某台仪器设备运行管理、维护或者某类公共技术工作。由中心主任向办公室提出聘用申请，办公室负责组织遴选，经管委会审核批准后，由平台主任聘用。

一般技术岗位：是各中心根据需要设置的运行管理辅助岗位，负责或参与某类或某台仪器设备的运行管理、维护或者从事某项公共技术工作。由办公室组织遴选，平台主任聘用。

岗位具体设置参照《中国科学院武汉病毒研究所科研和支撑系列岗位任职条件暂行办法》（科武病字[2012]46号）执行。

## 第四章 平台设施设备范围及管理方式

### 第十条 平台管理的设施设备范围

凡研究所可供公用共享的大型科研设施、装备和仪器设备，包括平台建设过程中购置、研制的全部设施设备；依托研究所建设的大科学工程，国家重点实验室，院、省（市）、所级重点实验室（中心），以及所内各研究单元等部门购置、研制的可供公用共享的设施设备，均纳入平台统一管理。

### 第十一条 平台设施设备的分类管理

根据科研设施、仪器设备的技术特征、用途以及具体情况，平台设施、设备的管理方式将分为直接管理和委托研究单元管理两类。

#### 一、直接管理

（一）凡研究所学科建设和发展需要的、具有广泛共性需求的科研设施设备，以及大型精密的仪器设备，根据技术特征纳入平台下属相应专业技术实验室（中心）直接管理。

（二）凡日常运行需要方法技术支持的专用设施设备均设置专门的仪器组，实行专人管理，并采取有条件的开放运行模式。其他通用设施设备采取完全开放的运行模式。

（三）根据科研设施、设备的经费来源，采用直接管理方式的设备包括：由院、研究所、修购专项、重点实验室等专项经费资助购置的仪器设备或科研设施，必须纳入平台直接管理；特殊情况可委托相关研究单元管理。

#### 二、委托研究单元管理

（一）凡属于研究所某一学科方向需求，或由于实验室条件限制于特定情况的科研设施设备，平台办公室（委托方）将委托相应研究单元（受托方）进行管理，或在所内实行公开招标委托管理，受托方必须与委托方签订《科研设备委托管理协议书》（见附件）。

（二）该管理方式依托于研究所技术平台，以研究单元为管理主体，其委托管理的设施设备所有权和使用权仍属于研究所。

（三）委托管理的设备包括由课题经费购置的单台件在20万元（含）以上大型仪器设备，以及由专项经费资助购置的其他科研设施设备，特殊情况除外。

（四）委托管理的科研设施设备必须实行内部共享，有条件的可对外共享。

## 第十二条 平台设施设备的管理原则

一、纳入平台管理范围的科研设施设备必须实行高度开放共享，并有足够的开放共享时间。按照国家和院大型设备共享管理相关要求，符合条件的大型科研设施设备，必须进入院或区域设备共享管理系统，并建立智能刷卡用户识别系统。

二、各中心或研究单元根据其管辖范围内的科研设施设备，必须制定科学、规范的操作手册和相关管理办法，保障设施设备正常运转和技术服务质量，并定期对设备进行检查和维护。对于违反操作规程的使用者或部门，平台有权取消其使用资格。

三、平台的设施设备使用实行预约制度，各中心或研究单元必须建立完整的设备使用档案记录。使用过程中一旦发生责任事故，应及时向平台办公室汇报，办公室根据事故调查结果，按研究所相关规定，追究相关人员责任。

四、各科研设施设备必须配有专职或兼职技术人员。各中心或研究单元可根据设备的共享率和实际需要，向平台申请专职技术支撑人员岗位。

五、平台及其委托管理研究单元必要时有义务向相关人员提供相应的技术培训，或组织其参加主管部门举办的培训学习班并取得相应的资质。

## 第五章 平台的运行管理

第十三条 平台的经费来源。指平台运行过程中各项经费收入，包括平台承担的项目经费；主管部门核拨的运行补贴、人员工资、津贴等运行费；提供技术服务、培训收取的费用；以及平台对外开展业务收取的其他费用。

### 第十四条 平台预决算管理

一、在明确收支项目的基础上，平台实行年度预决算管理制度。各中心根据上年度决算数据，制定本年度部门预算，由办公室汇总后形成平台年度总预算，经管委会审核通过后上报研究所，待研究所批复后方可按计划执行。

二、各中心年度决算结果是中心主任考核的重要指标，平台年度总决算结果是平台主任、副主任考核的重要指标。

三、平台运行不以盈利为目的，年度收支平衡是其经费管理的基本目标。

第十五条 为便于平台经费收支管理，平台将开设独立账号，下属各中心以及委托管理的研究单元设分账号。平台运行过程中发生的费用应全部纳入专用账号统一管理，各专用账号的收支须按照年度预决算管理制度和平台经费管理办法执行。

### 第十六条 平台收费标准的制定

平台管理范围内的科研设施设备对所内外研究机构和人员提供有偿使用、技术服务和培训，并收取相应的使用费和服务费。具体收费标准由各中心制定，经主管专业委员会审核论证后，报所务会审批并公示后方可实施。

### 第十七条 平台设施设备的购置、维修及更新

平台应根据研究所学科发展和自身运行情况，向管委会提出年度购置计划以及设施设备的维修与更新实施方案，以保证平台能正常和高效运行。管委会审核通过后，报主管所领导审批后方可实施。研究所在制订年度购置计划时，应优先考虑平台设施设备的运行与发展。

### 第十八条 平台技术服务的认可

平台用户获得平台提供的技术服务后，须在其研究成果中如实加以表述。凡使用平台设施设备进行实验或获取实验数据的，应在研究成果中明示；凡依靠平台获得关键技术支持的，应在研究成果中明示并予以致谢。

## 第六章 平台技术培训与交流

第十九条 平台应围绕研究所技术支撑体系建设目标，结合平台设施设备和技术服务特点，为用户提供各类技术培训，鼓励平台职工积极参加相关专业技术领域的培训与交流，进一步提升研究所整体科技支撑服务能力。

第二十条 常规技术培训，是指与平台设施设备相关的、有共性需求的实验技术培训。常规技术培训根据平台年度工作计划集中进行，由平台相关部门负责具体培训工作。

第二十一条 专项技术培训，是指由于科研工作的需求或新添置的高技术科研装备的需要，平台面向所内外用户开展的特殊实验技术和使用方法等专项技术的培训。为确保培训质量，该类技术培训将邀请国内外相关领域的高级技术专家现场授课。

第二十二条 各中心可以根据年度工作计划，结合专业技术特点，接受外单位人员来中心进修和学习。外单位人员进修和学习期间，应严格遵守研究所和平台的相关管理办法和规定。

第二十三条 为调动平台职工的积极性，提高整体专业技术水平，平台根据年度预算，将为内部职工提供参加国内外相关领域专业技术培训和学习交流的机会，培训结果将作为其年终考核的指标之一。

第二十四条 各类技术培训和学习交流的费用将按照平台经费管理办法以及年度计划执行。

## 第七章 平台的评价与考核机制

第二十五条 平台机构的评价与考核

平台各专业技术实验室（中心）评价与考核由平台管理委员会组织进行。平台考核的总成绩将在各中心评价的基础上，由平台管理委员会进行综合评价。评价成绩将是各部门负责人年终考核的重要指标之一。

第二十六条 平台职工的考核

平台主任、副主任以及各专业技术实验室（中心）主任的年度考核根据研究所的相关管理办法和要求，由平台管理委员会制定考核细则，报主管所领导审批通过后，由人事处与平台办公室共同组织进行。

各类技术岗位职工的年度考核应根据研究所的相关管理办法和要求，由各专业技术实验室（中心）主任结合本单位具体情况制定考核细则，报管委会审批通过后，由平台办公室组织进行，并报人事处备案。

第二十七条 为提高设备的使用效率，平台将定期对各中心和委托管理的研究单元进行综合评价和考核。对于考核结果优秀的研究单元和技术负责人给予一定的物质奖励。考核结果不合格的，平台将令其限期整改，整改后还不符合要求的，平台将取消其管理权限，其负责的设施设备收回所里统一调配。

第二十八条 考核结果的评定

平台各类考核结果经平台管理委员会审核后，上报研究所确认。确认批复后，按研究所相关规定和平台经费管理办法，结合平台年度决算结果给予一定物质奖励。

第二十九条 平台评价与考核实施细则将参照研究所相关管理办法另行制定。

## 第八章 附则

第三十条 本暂行办法未尽事宜，按照中科院和研究所有关规定执行。

第三十一条 本办法由科研处印发，平台办公室负责解释。

第三十二条 本办法自发布之日起实施。

# 分析测试中心设备体系

## 生物大分子分析系统



分子相互作用仪



圆二色谱仪



气相质谱联用仪



高效液相质谱联用仪



超速离心机



分析超速离心机



X晶体衍射仪



差示扫描量热仪

## 电子显微系统



200KV冷冻透射电镜



100KV透射电镜



扫描电镜



原子力显微镜

## 光学显微系统



超高分辨率荧光显微镜



膜片钳显微镜系统



活细胞共聚焦显微镜



分析流式细胞仪



点扫描共聚焦显微镜



分选流式细胞仪



细胞高内涵分析系统



活体成像仪

生物大分子

病毒

细胞器

细菌

细胞

组织

活体动物

1 nm

10 nm

100 nm

1  $\mu$ m

10  $\mu$ m

100  $\mu$ m

1 mm

# 大型仪器设备简介



- 中心直接管理大型设备15台/套，集中放置于保藏楼一楼分析测试中心。
- 委托管理设备102台/套，分布于各个课题组放置管理。
- 集中管理的大型仪器施行预约刷卡系统进行登记使用。
- 集中管理设备对所内施行季度结算收费，对所外施行先收费后使用方式。



设备名称：200KV透射（冷冻）电子显微镜

生产厂家：美国FEI

设备型号：Tecnai G20 TWIN

设备参数：

- 1、加速电压 20-200kV
- 2、放大倍数 25x - 1100kx
- 3、点分辨率 U-TWIN 0.19nm

设备功能：

- 1、观察病毒、生物大分子结构
- 2、观察细胞内部结构
- 3、观察纳米材料结构
- 4、对生物大分子、病毒进行冷冻电镜三维重构解析其三维结构。

# 大型仪器设备简介



设备名称：100KV透射电子显微镜

生产厂家：日本日立

设备型号：H-7000FA

设备参数：1、加速电压 20-120kV  
2、放大倍数 2kx - 1000kx  
3、点分辨率 1.4nm

设备功能：1、观察病毒、生物大分子结构  
2、观察细胞内部结构  
3、观察纳米材料结构

设备名称：场发射扫描电子显微镜

生产厂家：日本日立

设备型号：SU8010

设备参数：1、加速电压 0.1-30kV  
2、放大倍数 400 - 2000kx  
3、二次电子分辨率 1.3nm

设备功能：1、观察细胞表面结构  
2、观察材料表面结构  
3、鉴定材料元素成分



# 大型仪器设备简介



设备名称：双碟片活细胞荧光共聚焦显微镜

生产厂家：美国PerkinElmer

设备型号：UltraVIEW VoX

设备参数：1、六线激光器：405、445、488、514、561、640

2、物镜：20x、40x、60x、100x

3、速度：32fps

设备功能：1、长时间活细胞观察

2、6维x, y, z, t, w, p共聚焦荧光成像

3、可用于FRET、FRAP、共定位、去卷积、颗粒追踪、荧光比率实验

设备名称：活体（小动物）成像系统

生产厂家：美国GE（CRi）

设备型号：maestro

设备参数：1、光谱扫描范围：500-950nm

2、最小光谱分辨率：1nm

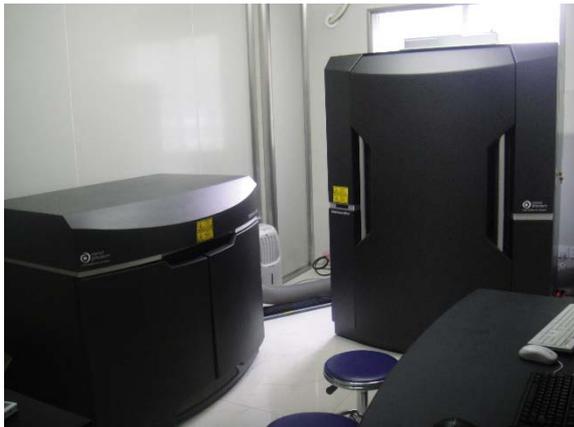
设备功能：1、成像小动物体内荧光

2、成像小动物体内生物发光

3、可对自发荧光和目的荧光进行光谱分离



# 大型仪器设备简介



设备名称：超高分辨率荧光显微系统

生产厂家：美国GE ( API )

设备型号：OMX V4

设备参数：1、空间XY分辨率：SIM模式90nm，  
STORM模式20nm

2、六线激光器、双sCMOS检测器、60x、100xTIRF物镜

设备功能：1、细胞超高分辨率荧光成像 ( SIM、STORM )

2、超快速双色同时宽场荧光成像

3、活细胞长时间观察

设备名称：分选流式细胞仪

生产厂家：美国BD

设备型号：FACS Aria III

设备参数：1、激光器：488、561、633

2、八色检测：HITC、PCPCY5.5、PE、PE-Texas、PE-CY5、PE-CY7、APC、APC-CY7

设备功能：1、细胞表型分析和分选

2、细胞增殖及细胞周期

3、细胞凋亡及凋亡信号传导

4、细胞特异性标记物的分析、药物研究，  
开发，药效评估、病原微生物学研究等



# 大型仪器设备简介



设备名称：生物分子相互作用仪

生产厂家：美国ForteBio

设备型号：Octet 96

设备参数：1、八通道同时检测  
2、基线噪音 $\leq 3\text{pm}$  ( RMS )

设备功能：1、生物分子相互作用动力学和亲和力分析  
2、小分子化合物的筛选分析  
3、粗制非纯化样品测定

设备名称：超高速冷冻（分析）离心机

生产厂家：美国贝克曼库尔特

设备型号：XL - 100K和Protomelzb XL- A

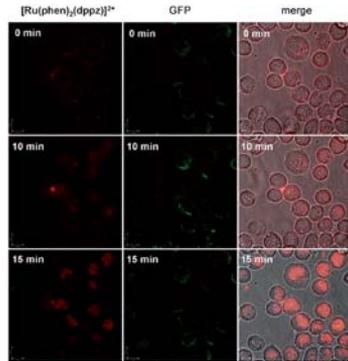
设备参数：1、最大转速：100000rpm  
2、最大离心力：802400g  
3、温度设定范围 $0 \sim 40^{\circ}\text{C}$

设备功能：1、病毒、生物大分子分离与制备  
2、生物分子的相互作用分析  
3、沉降系数和分子量计算

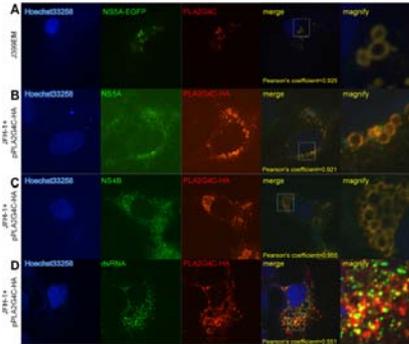


# 大型仪器支持部分发表文章

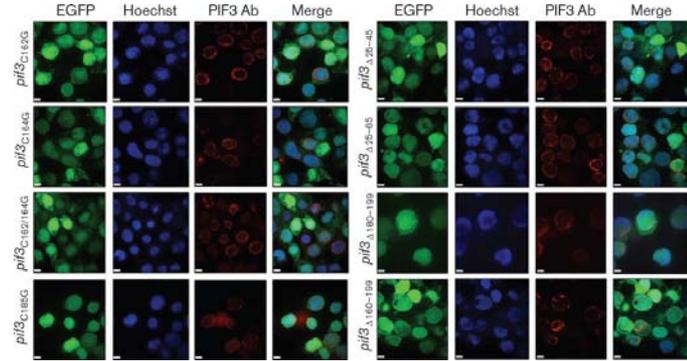
## 双碟片活细胞荧光共聚焦显微镜



Hanzhong Wang, *Angew.chem.Int.Ed.*, 2012

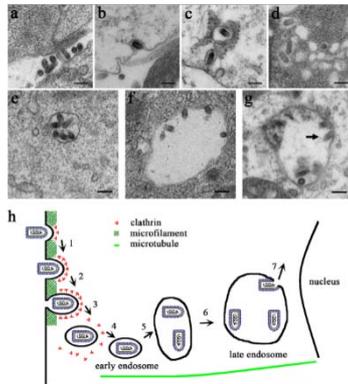


Xinwen Chen, *Journal Of Virology*, 2012

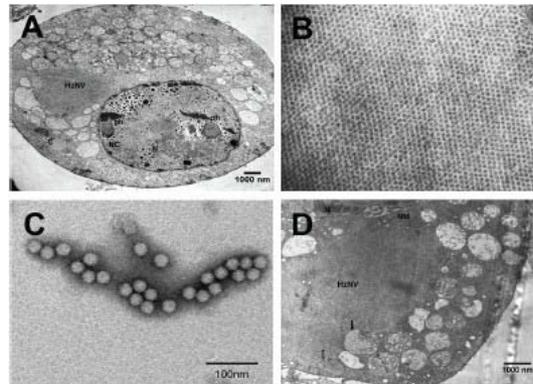


Zhihong Hu, *Journal of General Virology*, 2012

## 透射电子显微镜

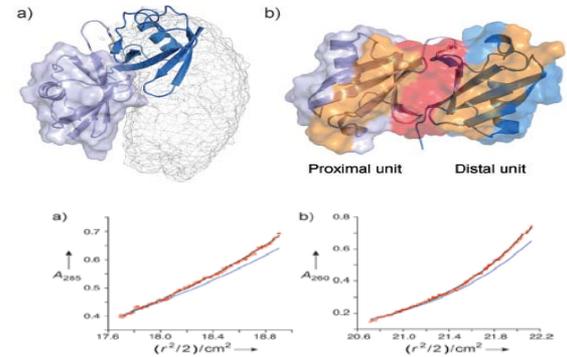


Gengfu Xiao, *Journal Of Virology*, 2011



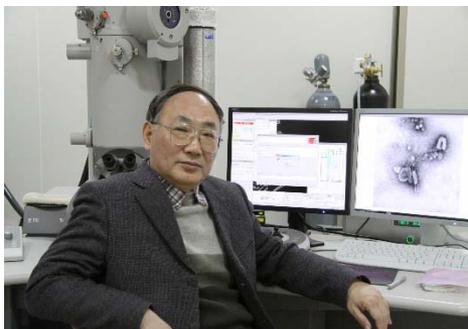
Xinwen Chen, *Virology Journal*, 2011

## 分析超高速冷冻离心机



Chun Tang, *Angew.chem.Int.Ed.*, 2011

# 分析测试中心人员简介



张治平 主任（研究员）

长期从事分析生物化学与分析生物技术相关领域研究及生物电子显微技术、微纳结构影像分析、常规大型生物仪器分析技术等，曾主持承担相关领域国家973、863、国家自然科学基金、国家攻关、中科院知识创新工程项目课题等若干项，作为通讯、第一或共同作者在SCI收录的Nano letter、Angew. Chem. Int. Ed.、JACS、Small、NAR、J. Virology、Virology、Biosensors & Bioelectronics等期刊上发表研究论文63篇，并有专利和成果。



邓红  
高级工程师

技术专长：电子专业学士。从事大型仪器分析技术工作多年，熟悉电子显微镜技术与生物影像分析技术等。



刘家欣  
高级工程师

技术专长：植物生理学硕士。长期从事大型生化仪器分析工作，熟悉组织细胞电子显微技术、共聚焦显微成像及生物分离等技术。



杜安娜  
工程师

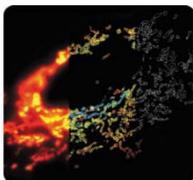
技术专长：动物医学硕士。主要从事大型生化仪器技术工作，熟悉电子显微生物制样、显微影像技术及微生物生化分析等专业技术。



高丁  
工程师

技术专长：分析病原微生物学博士。从事大型生化仪器分析工作，熟悉生物电子显微和光学显微分析技术等，特别在活细胞动态显微及超分辨影像方面有技术专长。

# 超高分辨率荧光显微镜



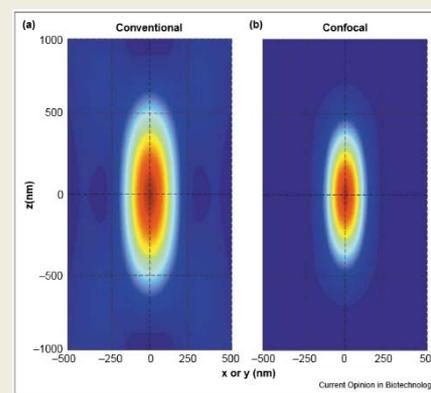
每年年底，《自然-方法》( *Nature Methods* ) 都会对过去一年中推动生物学发展的技术方法做出回顾与总结，由此评选出当年最受瞩目、影响力最大的技术。2008年，超高分辨率荧光显微镜成为评委们的一致选择。

**传** 统光学显微镜受限于光的波长，对于200nm以下的小东西只能摇头兴叹。虽然电子显微镜可以达到纳米级的分辨率，但通电的结果容易造成样品的破坏，因此能观测的样本也相当有限，并且很难标记目的蛋白和结构。分子生物学家虽然可以做到把若干想观察的蛋白质贴上荧光标签，但这些蛋白质还是经常挤在一块，在显微镜下很难分辨开来。

一度人们认为光学极限是理论物理极限，无法突破。但是随着对光学显微镜的不断改进和方法学的研究，超高分辨率显微镜的出现和发展为解决光学极限问题打开了新的窗口，将人们的认识带入了新的领域。

衍射就是指当波通过一个小孔，或者一个障碍物体，发生的波的弯曲、扩散和干涉的现象。当光波通过障碍物体时或视觉边缘，会发生弯曲，这个过程就是衍射。因此，由于衍射存在，我们很难把入射光线集中在一点上，衍射使最终形成一个圆盘或者在外圈形成一个圆环。这个圆盘就叫做爱里克斑。

因此显微镜空间分辨率极限大约是光波的半个波长，约为200nm（可见光范围400-750nm）。即使是很小的物体（如1nm直径），在显微镜下它的图像也将显著扩散。Abbe首先提出这种现象是光的衍射特性造成的，取决于光波长和显微镜物镜的有限尺寸。一个无限小物点在像平面处的光强分布函数称为点扩散函数（point spread function, PSF）。PSF通常在X-Y平面上呈径向对称分布，但沿Z光轴方向具有明显的延伸。



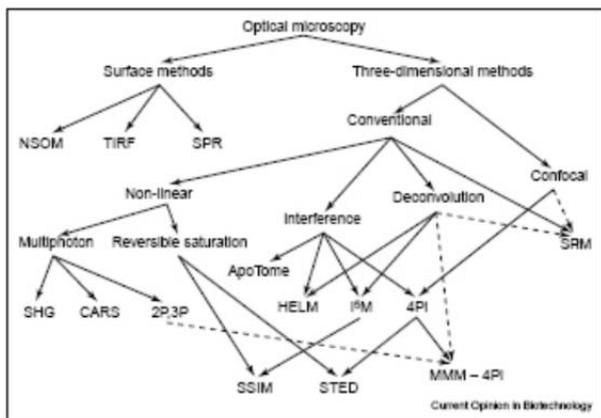
## 分辨率影响因素

左侧为宽场显微镜PSF，右侧为共聚焦显微镜PSF。根据瑞利准则，两点之间可分辨的最小距离相当于PSF的宽度。当发射波长越短，物镜NA（数值孔径）值越大时，图像分辨率越高。

# 超高分辨率荧光显微镜

## 超高分辨率显微技术背景

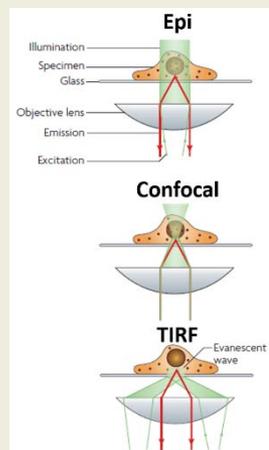
我们将现有的超高分辨率显微技术分为四类：1、传统显微镜和共聚焦显微镜；2、干涉方法；3、非线性方法；4、表面方法。以上分类方法没有明确的定义，但我们从概念上很容易理解这些方法的相似处和不同点。



光学显微镜分类关系

为了提高显微镜的分辨率，以宽场显微镜（Epi）为基础，发展出了全内反射显微镜（TIRF）和去卷积显微镜（Deconvolution）。前者通过只激发表面100-200 nm范围的荧光来提高分辨率，后者则通过计算点扩散函数来将散射光还原回发光点来提高分辨率。目前我们常用共聚焦显微镜则是利用小孔将非焦面的光挡住，

只留下焦点处的光，从而提高了空间分辨率。然而这几种方法都没有突破光学分辨率的极限，而只是相对以前更加接近分辨率极限而已。



## 常见光学显微镜照明方式

- 宽场显微镜的照明方式为面照明，面成像。
- 点扫描共聚焦的照明为点照明，点成像。因而需要一点一点的扫描，所以速度会慢。
- 碟片共聚焦则利用上万个小孔旋转来模拟面照明，面成像，所以速度比点扫描要快很多。
- 全内反射显微镜通过倾斜照明的全内反射消逝波效应，只激发玻璃底100-200nm的荧光，消除了其他层面的影响。

经过近几年超高分辨率技术的高速发展，出现了大量的超高分辨率显微技术，然而其中实用性较强、较好实现、使用广泛且效果较好的技术只有四种，并且他们都已经商业化生产销售，但是由于本身超高分辨技术刚刚起步，因此相对传统显微镜还有一些限制。相信随着技术的进步，这些限制终将解决，并且最终会被广泛应用。

# 超高分辨率荧光显微镜

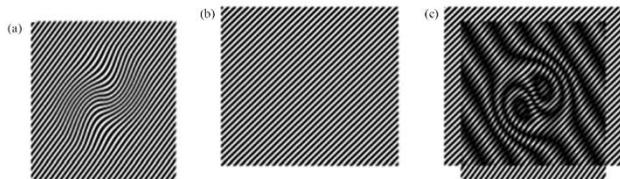
## 超高分辨率显微技术介绍

目前较为成熟的超高分辨率显微技术为以下四种：

- 1、结构照明显微技术 (SIM)
- 2、受激发射损耗显微技术 (STED)
- 3、光敏定位显微技术 (PALM)
- 4、随机光学重建显微技术 (STORM)

### 结构照明显微技术 (SIM)

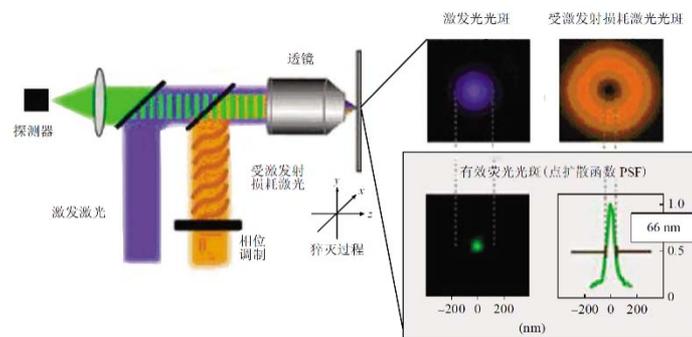
SIM是这四种方法中对样品要求最低，限制最小的超高分辨率技术。基本上能够在共聚焦显微镜下成像较好的样品（固定或活细胞）都可以用于SIM，并且兼容所有常用的荧光染料和荧光蛋白。其成像原理为，当一个未知结构的物体(a)被一个结构规则的照射模式(b)的光所照射时，会产生云纹条纹(c)。云纹条纹发生在采样物体的空间频率与照射光线的空间频率有差异的地方。显而易见，在显微镜下直接观察，就可以看到它放大了原先不能够分辨出来的样本结构。通过计算机进一步分析所有条纹中包含的信息，可以重组出样本的高分辨率图像。



然而由于其原理限制，仅仅能够将光学极限分辨率提高一倍，大约到100nm左右，Z轴为250nm。不过，由于其对样品和染料的要求较低，因此最容易被科研工作接受。最近发展出的饱和结构照明显微 (SSIM) 技术将分辨率提高到了50nm。

### 受激发射损耗显微技术 (STED)

STED是建立在点扫描共聚焦基础上的技术。成像原理为，通过将激光器改造，激光外圈为甜甜圈样受激发射损耗激光，中心为真实激发光，调节外圈激光大小，即可将中心激发光限制在很小的范围内。



STED可以将XY分辨率提高至50nm，然而Z轴分辨率没有任何提高，并且受激发射损耗过程荧光漂白严重，因此对荧光的亮度和抗漂白性有较高要求。

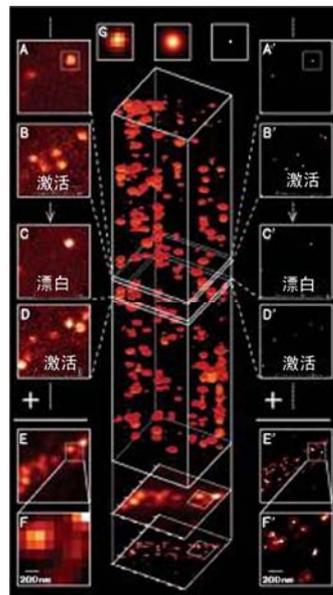
# 超高分辨率荧光显微镜

光敏定位显微技术 (PALM)

随机光学重建显微技术 (STORM)

PALM技术与STORM技术类似，都是光斑定位方法，通过牺牲时间分辨率来提高空间分辨率，一般得到一幅超高分辨率图像需要几分钟到10分钟，但这两种方法XY分辨率最高，达到了20nm左右。然而由于是建立在全内反射显微镜基础上的，所以无法拍摄三维图像。

PLAM基本原理：用PA-GFP来标记蛋白质，通过调节405nm激光器的能量，低能量照射细胞表面，一次仅激活出视野下稀疏分布的几个荧光分子，然后用488nm激光照射发光这几个分子，通过高斯拟合来精确定位这些荧光单分子。在确定这些分子的位置后，再长时间使用488nm 激光照射来漂白这些已经定位正确的荧光分子，使它们不能够被下一轮的激光再激活出来。之后，分别用405nm和488 nm激光来激活和漂白其他的荧光分子，进入下一次循环。这个循环持续上百次后，我们将得到细胞内所有荧光分子的精确定位。将这些分子的图像合成到一张图上，最后得到了一种比传统光学显微镜至少高10倍以上分辨率的显微技术。

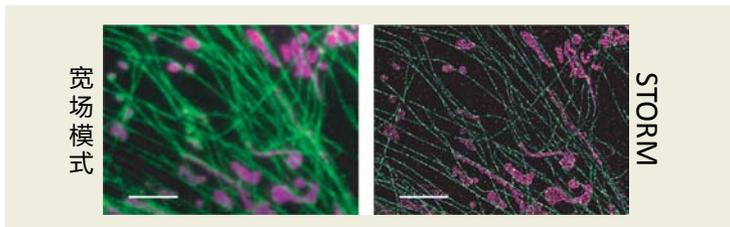


PALM的成像方法只能用来观察外源表达的蛋白，而对于分辨细胞的内源蛋白质的定位无能为力。2006年底，美国霍华德-休斯研究所的华裔科学家庄晓薇实验组开发出来一种类似于PALM的方法，可以用来研究细胞内源蛋白的超分辨率定位。他们发现不同的波长可以控制化学荧光分子Cy5在荧光激发态和暗态之间切换，例如红色561nm的激光可以激活Cy5发射荧光，同时长时间照射可以将Cy5分子转换成暗态不发光；之后用绿色的488nm激光照射Cy5分子时，可以将其从暗态转换成荧光态，当Cy3和Cy5交联成分子对时，具备了特定的激发光转换荧光分子发射波长的特性。将Cy3和Cy5分子对胶联到特异的蛋白质抗体上，就可以用抗体来标记细胞的内源蛋白质。应用特定波长的激光来激活探针，然后应用另一个波长激光来观察、精确定位以及漂白荧光分子，此过程循环上百次后就可以得到最后的

# 超高分辨率荧光显微镜

内源蛋白质的高分辨率影像，被他们命名为随机光学重构显微技术（stochastic optical reconstruction microscopy, STORM）。2007年，他们进一步改进STORM技术，发展了不同颜色的变色荧光分子对，可以同时记录两种甚至多种蛋白的空间相对定位，从而阐明笼形蛋白clathrin形成的内吞小泡与细胞骨架蛋白之间的精确空间位置关系，两种颜色的分辨率都可以达到20~30nm。但是，STORM方法也存在缺陷，由于用抗体来标记内源蛋白并非一对一的关系，所以STORM不能量化胞内蛋白分子的数量，同时也不能用于活细胞测量。

然而，近几年随着STORM技术的普及和庄晓薇团队的努力，已经发展出了可实现3D超高分辨率成像的3D-STORM，并且将其时间分辨率从几分钟提高到了0.5秒每帧，同时发展了多种适用于STORM的荧光蛋白和荧光探针，因此已经可以初步实现活细胞STORM成像。相信随着技术的不断进步，实用化的3D长时间活细胞超高分辨率成像技术将会出现。



超高分辨率（SR）荧光显微镜在生物学研究中的应用

## 1、通过观察蛋白质之间的组合关系来了解它们的作用，并能为后续的细胞功能试验打下基础。

结构生物学研究在这方面已经取得了很大的进展，目前已经发现了4-8纳米大小的分子间相互作用组装成细胞微管、肌丝、中间丝这些超过10微米大小聚合物的机制。不过对于核孔复合体、中心体、着丝点、中间体、粘着斑这些由许多不同蛋白经过复杂的三维组装方式组合起来的复合体，还需要更好的办法来进行研究。目标就是要达到分子水平的分辨率，这样就可以观察大复合体形成过程中的单个分子，也就能对这些分子的化学计量学有所了解。要得到更多的生物学信息就需要SR显微镜这样的三维成像技术，例如可以使用活体细胞SR成像捕捉细胞骨架的动态重构过程等等。

## 2、SR成像有助于更好地了解分子间的差异。

细胞膜蛋白组织方式的经典模型已经从随机分布的液态镶嵌模型转变成了脂筏模型、穴样内陷模型或特殊蛋白模型。这种差异与细胞不同功能相关，例如在高尔基体、cargo蛋白和高尔基体酶蛋白之间必须发生相互作用，但最终它们会按照各自的功能分开，发挥各自的作用。有很多试验手段，例如免疫电镜技术、荧光共振能量转移技术（FRET）等都被用来研究这种膜不均一性问题了。多色PALM技术（Multicolor PALM）为人们提供了一种新的手段用来观察膜蛋白集合、组织的过程，并且还能定量分析不同蛋白间的空间距离关系。因为有了PALM提供的单分子信息，人们就可以清楚地了解蛋白分子间的空间关系，甚至有可能计算出相隔某一距离的分子之间发生相互作用的可能性。这种方法除了用于研究膜蛋白之外，还能用于许多非随机分布的生物系统研究，例如研究微管上的马达蛋白。

# 超高分辨率荧光显微镜

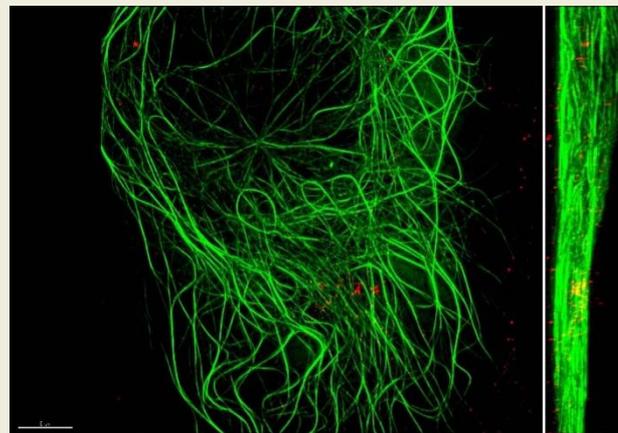
## 3、SR成像技术还能用于在单分子水平研究蛋白动态组装过程。

细胞对外界刺激信号的反应起始于胞膜，在胞膜上受体蛋白之间发生动态的集合，用来调节细胞的反应活性。像HIV这种有被膜病毒也是在细胞膜上完成病毒颗粒组装过程的病毒，也是利用了细胞的物质转运机制。尽管现在蛋白组装的物理模型还远远没有完成，但研究人员知道膜蛋白的动态组装过程是不均一的，所以通常使用荧光试验手段很难获得分子水平上的信息。同样，单分子测量技术(Single molecule measurements)也存在着类似的局限，因为单分子测量技术只能观察细胞内的几个分子，所以缺乏整体的信息。因此由于缺乏空间分辨率，很难动态地研究蛋白质组装过程。SR荧光成像技术与活细胞成像技术和单分子示踪技术(sptPALM)结合就能解决这一问题。我们可以借助分子密度准确地看出PALM图像中的蛋白质簇，蛋白质簇动态的统计数据 and 形态学数据能帮助我们了解蛋白质动态组装的机制。

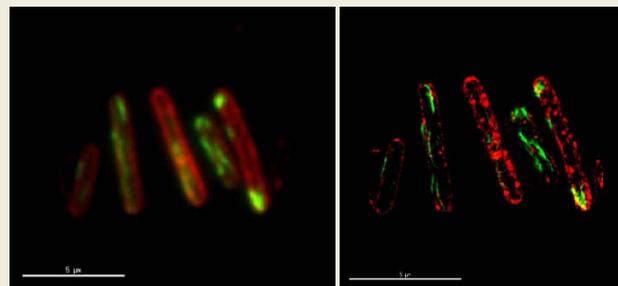
### 相关文献推荐

1. Super-Resolution Dissection of Coordinated Events during Malaria Parasite Invasion of the Human Erythrocyte. *Cell Host & Microbe*, Volume 9, Issue 1, 9, 2011
2. Identification and characterization of two novel primatespecific histone H3 variants, H3.X and H3.Y. *J. Cell Biol.* Vol. 190 No. 5 777-791
3. Subdiffraction Multicolor Imaging of the Nuclear Periphery with 3D Structured Illumination Microscopy. *Science* 6 June 2008: Vol. 320 no. 5881 pp. 1332-1336
4. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells. *Cell*. 2010 Dec 23;143(7):1047-58.
5. Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution. *Nat Methods*. 2008 Dec;5(12):1047-52.

目前我所已经购置了一台超高分辨率荧光显微系统，由分析测试中心管理。具有3D-SIM、PALM、STORM、TIRF等功能，可进行3D-SIM活细胞成像。希望大家能够积极使用，能够充分利用该设备提升文章水平。以下为实测成像效果：



MDCK细胞3D-SIM成像（绿色：微管；红色：流感病毒；左：XY；右：Z）



宽场模式与SIM模式对比，左侧为宽场，右侧为SIM  
(红色为细菌细胞膜，绿色为细菌骨架蛋白)

# 显微镜相关知识及技巧

## 1、显微镜的使用应该注意哪些事项？

显微镜是光学仪器，尤其科研实验室使用的进口显微镜更动不动数万至数十万元，甚至几百万，一支物镜可能比一辆汽车还要值钱。所以使用时必须小心，有以下一些方面尤其注意。

(1) 低倍镜到高倍镜观察：低倍镜头的工作距离较长，确定好视野后转动到高倍物镜时，一定要从侧面仔细察看，此时经常因为高倍镜头工作距离过小而使镜头与载物台或载玻片撞上，如果用力过猛，非常容易伤害到镜头。对于此种操作，一定先降低镜头座，让镜头和载物台分开足够的距离，转换物镜，再用调垂直距离调整焦距。

(2) 油镜观察：油镜的工作距离很短，一般在0.2mm以内，因此使用时要特别小心，一定要使用微调调焦，否则非常容易不小心将载玻片压碎，伤害到物镜。

(3) 非油镜观察：油镜因为在设计上考虑到油，所以密封都比较严密；但是对于不是油镜的物镜密闭程度就没那么好了。所以使用完油镜，切换到非油镜时，很容易碰到盖玻片上的油，如果非油镜进油后，就需要返厂，维修费用很高。所以切换镜头时一定要侧面观察，降低镜头，防止镜头与盖玻片的接触和碰撞。

(4) 油镜清洁：用脱脂棉签蘸乙醚酒精混合液(7:3)在镜头圆心从内到外划圈。棉花要缠好，千万不要让硬的签儿触到镜头，划伤镜头，棉签用过一次就换新的，防止小沙粒划破镜头。擦镜头的原则是，宁可擦不干净，也不要擦坏了。

## 2、照相时遇到的问题

显微镜观察时一切正常，但照相时视野里一半黑一半亮，不知道什么原因。

答：原因是因为整个光路系统中某个可移动的部件没有到位。包含照相转换，荧光防护屏，聚光镜转盘，中灰片的选择位置等等，沿着光路从上往下一个个检查可移动的部分。

## 3、荧光灯泡的寿命有多少？

汞灯使用注意事项：目前通常使用的为50W超高气压汞灯，灯管内通有对钨电极和液态汞(室温下附在管壁上)，未点燃时，管内气压很低，在灯管的两电极间施加电压角发点燃后，汞气化为汞蒸气形成汞弧而产生强光，温度升高，管内气压迅速升到10个大气压，由于是高气压的气体放电，必须了解其特性才能安全地使用汞灯。

(1) 汞灯接通电源后需要10—15min预热时间，汞才能充分汽化并形成汞弧，产生亮度高而稳定的激发光。因此，观察前要提早通电。

(2) 汞灯在使用过程中，不要随意开关汞灯的电源，至少在汞灯开启30分钟之后才能关闭。

(3) 关掉汞灯电源后，必须等待15—20min，待汞灯自然冷却后才可再次接通电源，违反这一操作规定时，将会造成严重后果！由于汞灯内的汞蒸气未完全液化，汞蒸气内阻很小，一旦通电在两电极间施加电压，汞灯内形成强大的电流，轻则烧断保险丝或烧毁汞灯电源中的扼流圈，重则汞灯爆炸，汞蒸气弥漫整个实验室，造成工作人员中毒。

(4) 汞灯的使用寿命般只有300h，使用得当可达600h，使用寿命和开关次数成反比，开关越频繁，寿命越低，因此如果能使用激光时，尽量不要开启汞灯，如果开启了汞灯，如果后面有人继续使用，请不要关闭汞灯。活细胞碟片共聚焦显微镜配备的汞灯为长寿命汞灯，寿命为1000h-2000h，十分昂贵，但也符合以上规则，如果使用不当会造成寿命缩短，影响大家实验。

## 4、倒置显微镜微分干涉(DIC)的影响因素

(1) 一般微分干涉明场照明方式只适用于玻璃介质，如果使用的小皿是塑料底，则无法得到最佳的DIC效果，且整个明场从上到下的光路都不能有塑料，因此小皿的塑料盖子也不能使用，如果需要请自己添加一个玻璃盖。

(2) 玻璃底需要厚度为0.14—0.17mm的盖玻片，朝向镜头。如果镜头是有correctionring的话，调到合适的位置也比较重要。

(3) DIC开始之前校准。起偏器和检偏器需要正交，插入光路；聚光镜上选对应物镜的位置，调整光强度，然后再调整起偏器获得最佳DIC效果。

# 本期结语

本期是武汉病毒研究所公共技术服务中心技术期刊的第一期，我们将把本期刊建立成为一个宣传、交流、互助、学习的平台，能够进一步提供更好的技术服务，能够将一些新技术和实验中的问题技巧与大家一起分享，建立更加紧密和顺畅的沟通渠道。因此希望各位老师同学们对本期刊提出您宝贵的意见和建议。我们会更加完善这个期刊交流平台，为各位的科研工作提供实质的帮助。

如果您有什么实验技术相关的问题，如果我们能够解决，会尽快回复您，并且对其中重要、典型、常见的问题添加在下一期读者提问环节里，以供大家交流和学习。以后的期刊将进行征稿，如果您有专业技术或科研工作技巧想与大家分享或推广，请与我们联系投稿，我们会为大家提供更加丰富有效的交流平台。

请各位老师将本期刊分享给更多的工作人员和学生，相信会更加提高科研实验工作的效率，在此表示诚挚的谢意！

联系方式

联系人：高丁

E-mail：[gaoding@wh.iov.cn](mailto:gaoding@wh.iov.cn)

QQ：76529989

电话：87199140

武汉病毒研究所公共技术服务中心

主 编：唐宏  
责任编辑：高丁



中国科学院武汉病毒研究所  
WUHAN INSTITUTE OF VIROLOGY, CAS

---

地址：武汉市武昌小洪山中区44号 邮编：430071  
Address: Xiao Hong Shan no. 44, Wuhan, P. R. China Postcode: 430071  
邮箱：wiv@wh.iov.cn 主页：www.whiov.ac.cn  
E-mail: wiv@wh.iov.cn Website: www.whiov.ac.cn