述评与讨论

激光扫描共聚焦显微镜用于生物膜研究

王荣昌， 文湘华， 钱 易
(清华大学 环境科学与工程系，北京 100084)

摘 要： 介绍了激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)成像系统的构成和工作原理，并对应用其研究生物膜的微生物群落结构和空间构型的一些实例进行了综述，同时指出了其应用于生物膜研究的优、缺点及今后的发展前景。

关键词： 激光扫描共聚焦显微镜； 生物膜； 空间构型； 微生物群落结构
中图分类号： X703.1 **文献标识码**： B **文章编号**： 1000 - 4602(2003)12 - 0023 - 03

目前，对生物膜空间结构的探测主要有两个方向：一个是通过微型传感器或者基因探针来了解生物膜内部的生理、生化特性；另一个是直接通过显微镜进行观察分析和成像。可以观察生物膜的技术很多，按照生物膜被分析时的状态可以分为三类：脱水观察、半脱水观察和不脱水观察。一般来说，进行电子显微镜(如透视电镜和扫描电镜)观察都要预先对生物膜进行脱水，这样生物膜中的大部分水分都会丧失，使得整个生物膜的框架收缩，因而很难得到生物膜原有的三维结构信息。当采用原子力显微镜(AFM)进行观察时生物膜处于半脱水状态，故只能观察到生物膜的外在轮廓，而对其内部的结构无法进行观察。使用激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)则可以观察到生物膜原有的、不脱水状态下的三维结构。

1 CLSM 的工作原理

1.1 CLSM 的历史

CLSM 是由美国麻省理工学院(MIT)的 Minski 于 1957 年发明的，他在其美国专利中首次阐明了 CLSM 技术的某些基本原理。由于当时没有合适的光源，仪器所产生的图像质量较差，因此当时 CLSM 并未引起人们的重视。直到 1977 年，牛津大学的 Sheppard 和 Wilson 研究小组才对 CLSM 工作的原理有了较清楚的认识，他们将一种新型的共聚焦显微镜与构成共聚焦成像的几何学基础理论结合起来，首次描述了光与被照明物体的原子之间的非线性关系和激光扫描的拉曼光谱学[1]。10 年后(1987 年)，第一台商业生产的 CLSM 问世。起初，CLSM 主要应用于医学领域，Lawrence 及其同事于 1991 年首次将 CLSM 应用于生物膜的研究。

1.2 CLSM 的主要构件

共聚焦的含义就是将聚焦区域以外的成像信息过滤，使其不在最终的成像结果中显示。首先，将光线聚焦于一点或者一线，然后对所要观察的平面进行扫描。聚焦区以外的光线通过检测针孔来隔除。一个完整的 CLSM 系统由几个主要的硬件和一些成像分析软件组成(如表 1 所示)。

表 1 CLSM 系统的组成

分 类	名 称
硬件	表面荧光显微镜
	激光光源及冷却系统
	定位扫描装置
	分辨系统
	计算机控制系统
	显示器(2 个)
	图像输出打印设备
软件	三维图像分析系统
	三维图像文件管理系统

基金项目： 国家科技部重点专项专题(2003 - 03)； 清华大学 985 基金资助项目

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3　CLSM 的成像原理

激光扫描共聚集显微镜以激光作为光源[2],其成像基本原理如图 1 所示。

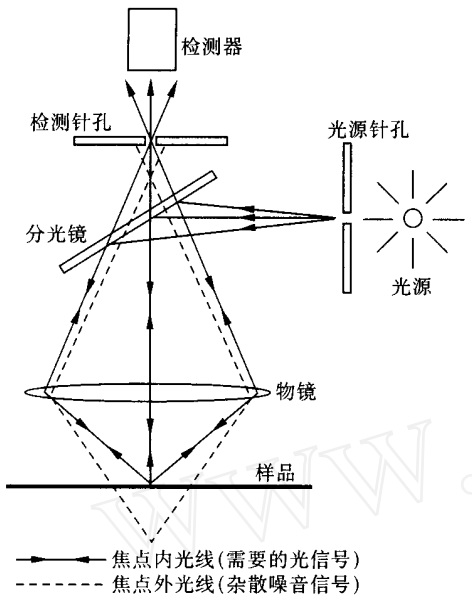

图 1　CLSM 成像基本原理

光源发出的光通过光源针孔并经分光镜和物镜反(透)射后将聚焦为一点(形成一个点光源),这样在物镜的聚焦平面上将只有一个点被光源照射。该点处的反射光或被激发出来的荧光将会沿着原光路通过物镜反射上去,再通过分光镜的折射照射在检测针孔中,这样就保证了只有这一点的光信号穿过针孔而被针孔后的光倍增管接收,其他非聚集光所产生的杂散噪音信号则均被针孔挡住,从而克服了传统光学显微镜有大量杂散光信号干扰的缺点。而后,再通过一个分光镜和计算机控制,将这一点光源在物镜的焦平面上来回扫描,便可按照指定的分辨率得到这个焦平面的图像,再利用载物台在垂直方向上的移动就可以得到一系列的三维图像。

在检测针孔后面有一系列分光滤色片或一个三棱镜,其作用是让某一特定波长以上的光通过,而这一波长以下的光则被反射到相应的光倍增管上,从而在计算机显示器上形成这一点的像。每个这样的光倍增管称为一个通道,在扫描头中装上足够多的光电倍增管后就可以得到所需要看到的所有颜色的光。计算机根据扫描程序在显示器上画出相应的图像,这就是样品的真实图像。

由于激光的穿透力极强,因而可以得到用传统光源看不到的样品深部的图像,也得以看到样品真实的三维结构图像,同时也能对活体细胞和组织细胞进行实时观测。用 CLSM 得到的图像分辨率基本上达到了光学显微镜的极限,图像的对比率也大大增强。

2　CLSM 在生物膜研究中的应用

Lawrence 及其同事率先将 CLSM 应用于生物膜研究,通过对未脱水的、纯培养的生物膜进行观察,发现生物膜是由胞外聚合物(构成框架)和其间的孔道构成的立体结构[3]。他们还对微生物细胞的负染色进行了具体研究,结果发现载体表面附着的和在生物膜形成初期,游动型和非游动型的 *Pseudomonas fluorescens*(假单胞菌)细胞具有不同的行为。他们将光漂白荧光恢复技术(FRAP)与 CLSM 联用,对生物膜内扩散系数进行了测定。而后,又对由六种微生物组成的降解氯代有机物的生物膜群落进行了研究,发现生物膜群落的各成员之间具有密切的相互联系,且 EPS(胞外聚合物)对有机污染物具有吸附和富集作用。他们还对天然河流中的生物膜群落进行了调查,结果发现天然环境中的生物膜具有一些独特的性质。在将活体正负染色技术与 CLSM 联用时发现, *Thiobacillus spp*(产硫酸杆菌)选择性地聚集在含有硫化物的矿石表面,如细胞优先聚集在电化学活性较高的磁黄铁矿石上[4]。最近,他们实现了对生物膜的细胞间信号、多糖信号以及光合细菌的自荧光信号的三通道同时或者依次记录[5],并对多菌种生物膜中的胞外聚合物进行了原位定位,发现氯代有机物的存在可促使微生物分泌出某些特定的胞外聚合物。

将荧光原位杂交技术(FISH)应用到生物膜研究中时也会用到 CLSM。该技术特别适用于记录复杂微生物群落中单个细胞的行为信号。通过 FISH 与 CLSM 联用,可以考察生物膜系统中不同微生物群体之间的空间关系。通过微生物染色体染色(对遗传物质进行显微镜定位)不仅能得到不同微生物、不同种群之间的演化关系,而且还可得到有关微生物代谢和遗传方面的信息[6]。然而,FISH 技术应用于生物膜研究中也有其局限性,这主要是由于在进行原位杂交之前,必须用乙醇或者多聚甲醛对样品进行固定,以增强基因探针对微生物细胞的渗透性。在固定过程中生物膜将缩水,从而会丢失某些关于生物膜立体结构的信息。所以,在增强基因探针对微生物细胞渗透性的同时,不损坏生物膜的空

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

间结构仍然是目前生物膜结构研究的一个热点。有些学者尝试在进行荧光染色之前用琼脂来固定生物膜,但该方法尚不成熟。

扩散系数是研究生物膜传质过程的一个重要参数。Beer 等人[7]首先采用微量注射技术将荧光染料注射到生物膜表面,然后采用 CLSM 跟踪定量染料的传质扩散过程,最后计算出扩散系数。

Stewart 等人[8]通过 CLSM 观察和检测实验室中培养的两种微生物共存形成的生物膜,认为生物膜中微观的非均匀性以及两菌种附着和脱落能力的不同,是造成两者共存形成生物膜的主要原因。

Jayaraman 等人[9]利用 CLSM 对抑制好氧生物膜腐蚀钢铁的方法进行了机理探讨,他们认为是生物膜的代谢和更新给其中的微生物(如 *Pseudomonas fragi* 或者 *E. Coli*)提供了保护作用,使其能够长期停留在钢铁表面上,进而造成对钢铁的腐蚀。

3 CLSM 用于生物膜研究的优点和不足

CLSM 用于生物膜研究的一个显著优点就在于可以对较厚的生物膜进行分层聚焦成像而不受聚焦区域外光线的干扰。用 CLSM 研究生物膜的主要优点如下:

① 可以对几百微米厚的、无水分损失的、活的微生物群落进行观察;

② 不受聚焦区域外光线的干扰;

③ 可以进行三维及时间序列成像;

④ 可用的荧光或者非荧光探针较多;

⑤ 可以同时应用多个探针,并能同时记录多方面的图像数字信息;

⑥ 可以对有机大分子、单个细胞或者微型菌落的三维结构进行静态的或者动态的量化分析;

⑦ 可进行三维断层摄影,形成彩色立体图像及计算机动画演示。

然而,CLSM 用于生物膜分析也存在一些不足之处:①CLSM 系统的价格比较昂贵。②扫描过程耗时较长,而且只能扫描不动的微生物,许多活动的大型微生物(原生动物等)因运动比较剧烈而会对成像造成一定的影响。③某些荧光染料可能会对某些活体细胞的活性造成一定的负面影响。因而,许多研究者正努力通过采取一些措施来避免这些不利的因素。例如通过选择一些合适的荧光染料来减少对微生物活性的影响,同时适当地调整激光的光强,用最弱的光对样品进行照射扫描等[10]。

4 应用前景展望

虽然 CLSM 可以获得未脱水生物膜的三维信息,在生物膜结构的研究过程中发挥着很重要的作用,但是该技术仍有许多不足之处有待进一步改进,如非毒性荧光染料的开发、新型物镜的研制、三维图像处理软件的优化以及与光漂白荧光恢复技术(FRAP)、荧光催化(PAF)、拉曼光谱等技术的联用等。随着显微成像技术的不断完善,人们对生物膜结构及其功能的研究也将不断地深入。

参考文献:

[1] 李楠,王凤翔,周春喜. 荧光探针应用技术[M]. 北京:军事医学科学出版社,1998.

[2] 杨勇骥. 实用生物医学电子显微镜技术[M]. 上海:第二军医大学出版社,2003.

[3] Lawrence J R, Korber D R, Hoyle B D, *et al*. Optical sectioning of microbial biofilms[J]. J Bacteriol, 1991, 173: 6558 - 6567.

[4] Lawrence J R, Kwong Y T J, Swerhone G D W. Colonization and weathering of natural sulfide mineral assemblages by thiobacillus ferrooxidans[J]. Can J Microbial, 1997, 43:178 - 188.

[5] Lawrence J R, Neu T R, Swerhone G D W. Application of multiple parameter imaging for the quantification of algal, bacterial and exopolymer components of microbial biofilm[J]. J Microbiol Methods, 1998, 32:253 - 261.

[6] Lanoil B D, Giovannoni S J. Identification of bacteria cells by chromosomal painting[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63:1118 - 1123.

[7] Beer D, Stoodley P, Lewandowski Z. Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy[J]. Biotechnol Bioeng, 1997, 53:151 - 158.

[8] Stewart P S, Camper A K, Handran S D, *et al*. Spatial distribution and coexistence of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms[J]. Microbiol Ecol, 1997, 33:2 - 10.

[9] Jayaramann A, Earthman J C, Wood T K. Corrosion inhibition by aerobic biofilms on SAE 1018 steel[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1997, 47:62 - 68.

[10] Laurent M, Johanin G, Gilbert N, *et al*. Power and limits of laser scanning confocal microscopy[J]. Biol Cell, 1994, 80:229 - 240.

电话:(010) 62778943

收稿日期:2003 - 07 - 16

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net