

双光子激发荧光各向异性度的成像*

汪雪峰¹⁾ 王毅¹⁾ 蒋艳³⁾ 马辉^{1,2)**}

(¹⁾清华大学物理系, 原子分子纳米科学教育部重点实验室, 北京 100084;

(²)清华大学深圳研究生院, 深圳 518057; (³)北京中医药大学病理室, 北京 100029)

摘要 荧光各向异性度 (fluorescence anisotropy) 测量可以获得荧光分子的转动速度信息, 进而了解分子质量、结构、以及与周边环境的相互作用情况. 围绕一台双光子激发扫描荧光成像系统, 通过改变外光路和图像记录与处理程序, 从而实现了双光子激发荧光各向异性度成像, 并针对一些典型样品和体系, 展示了该方法的应用. 实验中观察了 FITC 荧光分子、FITC 结合的 CD44 抗体分子及与肿瘤细胞表面受体结合的 FITC-CD44 抗体分子. 测量结果表明, 不同分子质量、不同微观环境状态下的荧光分子, 其各向异性度大小不同, 在各向异性度图中能够被明显区分. 荧光各向异性度成像能够定量测量样品微区的各向异性度值, 并以二维图像的形式直观表达, 是各向异性度测量与成像技术的良好结合.

关键词 荧光各向异性度, 双光子扫描成像, 细胞膜流动性, 小檗碱, 肿瘤细胞

学科分类号 O43, O439, Q241, R730.52

激光扫描荧光显微镜, 是研究组织和细胞内特定分子和特定结构动态变化的有力工具^[1,2]. 然而常用的扫描荧光显微镜系列中, 不论共聚焦荧光成像还是双光子激发荧光成像, 人们一般只记录荧光光强信号, 其他的光学信息并未充分利用, 例如荧光各向异性度信息.

在偏振光激发下, 很多样品所发射的荧光在不同的方向上偏振分量不同. 对于一个包含大量各向同性取向荧光分子的体系, 一般在激发光的偏振方向上分量最大, 这种现象称为荧光的各向异性. 可以定义各向异性度值 r 来定量表征荧光各向异性的程度^[3]:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (1)$$

等式中 $I_{\parallel}$ 和 $I_{\perp}$ 分别为平行与垂直于激发光偏振方向的荧光分量. 各向异性值 r 大小主要决定因素为激发态荧光分子的寿命和它们的转动速度. 通过测量 r , 可以获得衡量荧光分子转动快慢的量——转动相关时间, 并从转动相关时间中进一步分析分子质量大小、微环境的流动性与环境温度等信息^[3]:

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau}{\delta} = 1 + \frac{RT\tau}{\eta V} \quad (2)$$

(2)式称为 Perrin 公式, 其中, r_0 表示均匀取向荧光介质中, 荧光分子完全不转动时对应的各向异性值, 即各向异性度的最大值, r 为样品荧光各向异性度的实际测量值, τ 为荧光寿命, η 为微环境

黏滞系数, δ 为荧光分子转动一周的平均所需时间, V 为分子体积, R 为气体常数, T 为环境温度.

r_0 的大小与激发模式有关. 对应于 n 光子激发模式, 荧光分子受激发几率正比于 $\cos^{2n}\theta$, 其中 θ 为荧光分子偶极矩与激发光偏振方向的夹角^[3]. 那么在均匀取向荧光介质中, 有如下关系:

$$\begin{aligned} \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} &= \frac{I_0 \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} \cos^{2n+2}\theta \sin\theta d\theta d\varphi}{I_0 \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} \cos^{2n}\theta \sin^3\theta d\theta \cos^2\varphi d\varphi} \\ &= \frac{2}{\frac{1}{2n+1} - \frac{1}{2n+3}} = 2n+1 \end{aligned}$$

故 n 光子激发模式下, 最大荧光各向异性度为:

$$r_0 = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} = \frac{2n}{2n+3} \quad (3)$$

采用单光子激发时 $r_0=0.4$, 而采用双光子激发时 $r_0=0.57$. 因此, 多光子激发有利于提高荧光各向异性度测量的动态范围.

通过测量 r 可以了解荧光分子转动速度的变

*国家自然科学基金海外青年学者合作基金(19928408), 国家自然科学基金重点基金(60138010)和面上基金(10274039)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-62783136-164, Fax: 010-62781598

E-mail: mahui@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2004-09-22, 接受日期: 2004-10-22

化, 从而得到生物膜的流动性、蛋白质变性、蛋白质与其他物质结合、抗原抗体结合等信息^[4-7]. 例如使用荧光分光光度计, 可以通过测量 r 获得生物膜表面流动性^[8]. 但荧光分光光度计测量方式为点测量, 所得到的结果为溶液中各种荧光物质各向异性度的平均值, 观测不到样品不同部位 r 值的分布.

目前各向异性度成像方面工作很少, 已经报道的工作中只有一篇^[9]演示了基于单光子激发共焦系统的工作. 本文介绍了一种基于双光子激发的荧光各向异性度测量方法. 通过对一台双光子荧光显微镜外光路进行改造, 并采用新的实验和计算方法, 我们在保留原有系统所有测量功能的基础上, 实现了荧光各向异性度成像, 并利用此系统对生物与非

生物样品进行测试, 显示了该方法在生命科学领域的潜在应用.

1 材料和方法

1.1 方法

1.1.1 适用于双光子激发荧光成像系统的荧光各向异性度测量方法.

荧光各向异性度测量通常有两种方法, 即 L-方式单通道和 T-方式双通道法^[10]. 但在双光子激发荧光成像系统光路中, 背向荧光测量方式要求激发光与样品荧光共享显微镜头, 以上两种方法都不适用. 为此, 我们设计了新的光路, 如图 1 所示.

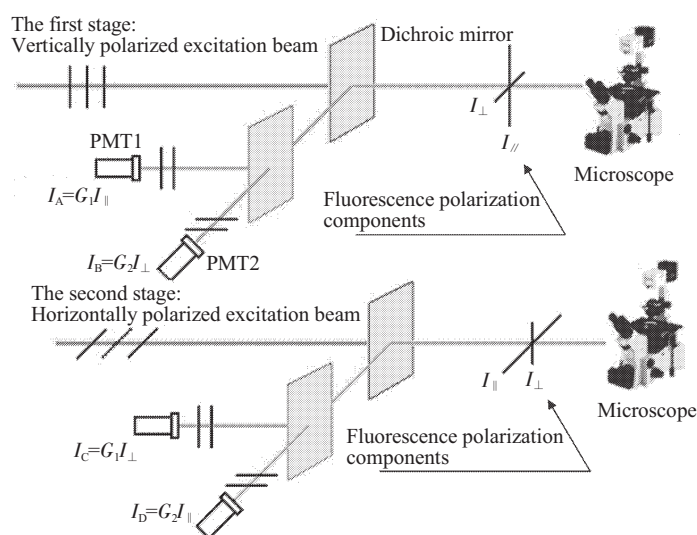


Fig.1 Fluorescence anisotropy detection method suitable for two-photon imaging system

The fluorescence reflected by a dichroic mirror is divided into two orthogonally polarized components that are detected with corresponding photomultipliers. After switching the polarization direction of the excitation beam to orthogonal direction, we can detect two other components in the same way. With computing these four components, we will acquire the value of fluorescence anisotropy.

图 1 中 $I_{||}$ 表示沿激发光偏振方向的荧光分量光强大小, $I_{\perp}$ 则表示垂直于激发光偏振方向的荧光分量光强大小; I_A , I_B 为光电倍增管记录的荧光光强值. 由于光路中有多个镀膜界面, 包括一个直角放置的二色镜, 对应不同偏振方向荧光的传输效率可以有比较大的差别. 在此引入两个参数: G_1 为 $I_{||}$ 荧光分量的衰减系数, G_2 为 $I_{\perp}$ 荧光分量的衰减系数. 即 $I_A = G_1 I_{||}$, $I_B = G_2 I_{\perp}$. G_1 和 G_2 与光束角度有比较密切的关系, 在实验中定量测量比较困难. 因此, 我们采用一种四通道测量方式, 记录不同激发偏振方向和荧光偏振的荧光图像, 最后通过计算, 在 r

的表达式中消去 G_1 和 G_2 . 具体过程如下:

首先, 激发光偏振方向为与偏振分光棱镜 (polarization beam splitter, PBS) 光轴平行 (这个方向刚好垂直于光学平台, 为了便于描述, 本文称之为垂直偏振方向). 样品发射的荧光由倒置荧光显微镜收集, 沿入射光方向返回, 被二色镜反射. 通过 PBS 后, 偏振方向与 PBS 光轴平行的荧光分量透射, 与之垂直的荧光分量则反射. 这两个分量分别由对应的光电倍增管接收探测. 得到测量值 I_A , I_B ; 考虑光路对荧光分量的衰减, 可以得到 $I_A = G_1 I_{||}$; $I_B = G_2 I_{\perp}$. 设 $I_{||}/I_{\perp} = R$, 那么 $I_A/I_B = RG_1/G_2$.

改变激发光的偏振方向, 使之与原方向互为垂直, 再次记录两个偏振通道荧光光强分量 I_C , I_D , 并同理推出 $I_C/I_D = G_1/(RG_2)$.

最后得到:

$$\begin{aligned} \therefore \frac{I_A}{I_B} &= \frac{G_1 R}{G_2}, \quad \frac{I_C}{I_D} = \frac{G_1}{G_2 R} \\ \therefore R &= \sqrt{\frac{I_A I_D}{I_B I_C}} \\ \therefore r &= \frac{\sqrt{I_A I_D} - \sqrt{I_B I_C}}{\sqrt{I_A I_D} + 2\sqrt{I_B I_C}} \end{aligned}$$

该方法满足了荧光成像装置中的背向荧光收集的要求. 同时, 通过比例测量, 可以消除杂散光和

激光光强涨落对成像结果的影响, 特别是消除了反射镜对于不同偏振光的不同反射率的影响.

1.1.2 在双光子荧光成像系统上实现各向异性度的成像.

图 2 为本实验采用的荧光各向异性度成像装置的示意图. 实验装置围绕一台双光子激发扫描荧光显微镜 (Bio-Rad MRC 1024MP) 改装而成. 光源为超快锁模激光器 (Tsunami, Spectra Physics, USA), 激发光中心波长 λ 选为 800 nm. 实验中利用半波片改变激光的偏振方向, 使之能够在互相垂直的两个方向进行切换.

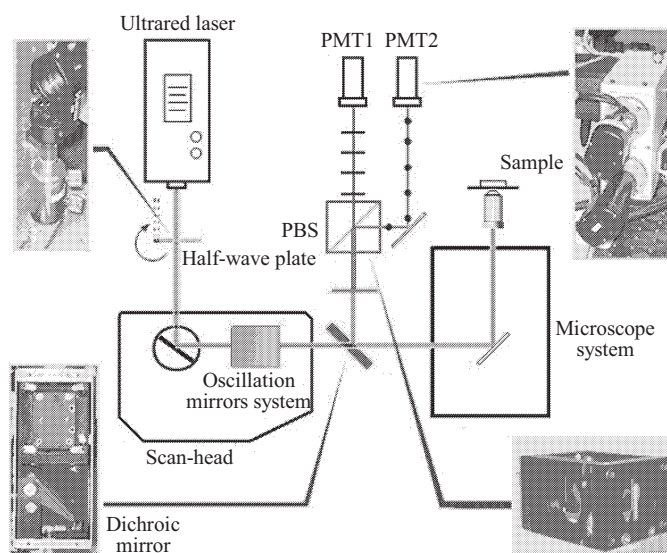


Fig.2 Two photon fluorescence anisotropy imaging system

The method discussed in 1.1.1 section has been realized upon a two-photon imaging system. We exploited half-wave plate to switch the polarization of exciting beam, and added a dichroic mirror to reflect fluorescence to exterior channel where a polarization beam splitter will decompose fluorescence to two orthogonal components.

Then, these components are detected with two photomultipliers.

首先选择激光偏振方向与偏振分光棱镜 (polarization beam splitter, PBS) 光轴平行. 荧光通过显微镜镜头收集, 沿原光路返回, 由二色镜反射进入外通道, 经过 PBS 后分成偏振方向正交的两个分量, 并由一对光电倍增管接收探测, 得到两个相互垂直荧光偏振光分量的双光子图像.

切换半波片, 改变激光的偏振为垂直方向, 再次得到荧光两个分量的双光子图像, 最后得到分别对应两对正交激发偏振和正交荧光偏振的四幅荧光图像.

最后, 对四幅荧光分量的双光子图像进行处

理, 从中提取出荧光各向异性度信息, 得到荧光各向异性度图. 处理方法见 1.1.3.

1.1.3 图像处理软件.

依照前面介绍的各向异性度测量方法及给出的测量公式, 我们利用自编软件, 针对四幅双光子荧光图像, 逐个像素点地计算出相应各向异性度值. 由于双光子激发荧光对应的最大各向异性度 r_0 值为 0.57, 成像系统数字动态范围为 0~255, 计算出的 r 值须转换成 0~255 之间的亮度值 (乘以 256 除以最大各向异性度值), 亮度越大表示该点的荧光各向异性度越大. 最终, 荧光各向异性度图, 各

象素点亮度对应该点的各向异性度。

当信号强度很弱时, 双光子图背景的微小亮度涨落能够在各向异性度图上产生严重影响. 考虑到这个因素, 我们在软件中设置亮度阈值以改善成像效果. 如果某像素点的亮度值小于此阈值, 即荧光信号很微弱, 那么不计算此像素点的各向异性度. 这种设计能够将荧光样品与背景有效区分开来, 而且在一定程度上可以改善各向异性度成像的纵向分辨率.

为了方便观察, 可以使用伪彩色处理各向异性度图. 如图 3e 所示. 与图 3e 左方彩色长条比色, 可以直观得到各向异性度图的 r 值.

图 3 为对 FITC-CD44 标记的肿瘤细胞四通道成像, 获得各向异性度图的实例.

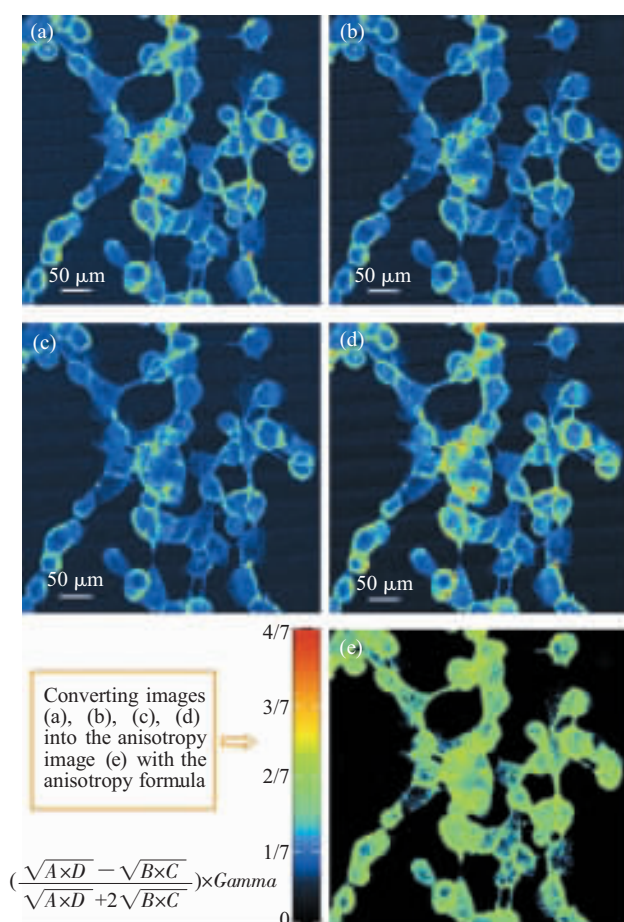


Fig.3 The procedure of fluorescence anisotropy imaging

(a)~(d) are two photon images corresponding to four polarization components of fluorescence. Using the formula deduced in section 1.1.1, we compute out the fluorescence anisotropy image as (e). Fluorescence anisotropy can be easily acquired by comparing the color of images with the chromatic bar.

1.2 实验样品及准备

1.2.1 酚红溶液中的荧光试纸各向异性度成像.将拭镜纸纤维 (1 cm×1 cm) 浸入盛 100 mg/L 酚红溶液的培养皿中, 对浸在溶液中的纤维进行双光子荧光与各向异性度成像, 激发光源为 800 nm 红外超快锁模激光, 通过 460LP 滤光片探测.

1.2.2 FITC 与 FITC-CD44Ab 溶液荧光各向异性度成像.异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC, Sigma 公司) 是一种激发光吸收峰值为 488 nm 的荧光物质, 但以 800 nm 中心波长的脉冲激光激发也具有较大的双光子激发率. FITC 常用来标记生物大分子. 使用时先用 DMSO 溶解, 再用蒸馏水稀释至 40 mg/L. FITC 标记的鼠抗人 CD44 抗体分子 (FITC-CD44 antibody, FITC-CD44Ab Bio legend), 能够与细胞膜上 CD44 分子结合, 从而可以用来作细胞膜探针. 用 PBS (磷酸缓冲液) 将 FITC-CD44Ab 配制成为与 FITC 相同浓度的溶液, 分别进行各向异性度成像. 激发光源为 800 nm 红外超快锁模激光, 通过 460LP 滤光片探测.

1.2.3 不同浓度小檗碱作用下的肿瘤细胞膜荧光各向异性度成像.取对数生长期 PG 细胞 (human pulmonary giant cell carcinoma), 用完全 RPMI1640 培养液 (Gibco 公司) 调整细胞浓度为 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 加入 96 孔细胞培养板中, 100 μl /孔, 加入不同浓度的小檗碱 (中国生物样品检定研究所) 溶液, 共分 3 个浓度 (2.5, 5, 10 mg/L), 同时设阴性对照组, 放培养箱中培养 12 h 后, 每孔加入 1 μl 浓度为 400 mg/L 的 FITC-CD44Ab 标染细胞膜, 温育 25 min 后进行各向异性度成像观察. 激发光源为 800 nm 红外超快锁模激光, 通过 460LP 滤光片探测.

2 实验结果与分析

2.1 酚红溶液中的纤维荧光各向异性度成像

图 4a 为酚红与纤维的双光子激发成像图, 图 4b 则为酚红与纤维的各向异性度成像. 成像效果显示: 荧光各向异性度图像, 即图 4b 的对比度有明显提高. 由于在荧光各向异性度成像中, 对比度的产生与荧光强度没有直接关系, 因此有利于从强荧光背景环境中区分具有不同转动自由度的荧光分子构成的结构. 但进一步观察发现: 图 4b 中显示的结果与预期有比较大的差别. 纤维上的酚红分子与溶液中的酚红分子化学结构应当相同. 由于纤维的吸附作用, 纤维上的酚红分子运动自由度下降, 转动速度下降, 因此我们预计纤维上荧光各向异性度应

当大于溶液中. 实测结果显示, 溶液中荧光各向异性度的确比较低, 但纤维上荧光各向异性与纤维的取向有密切关系, 对角方向排列的纤维束其荧光各向异性度低于垂直或水平方向排列的纤维束.

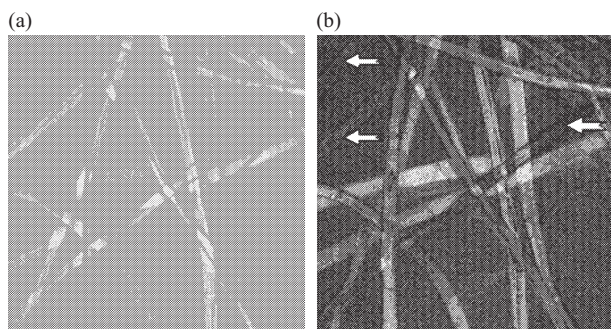


Fig.4 Two-photon fluorescence imaging and fluorescence anisotropy imaging of fibers immersed in phenolphthalein solution

(a) is a two-photon fluorescence image of fibers immersed in phenolphthalein solution. (b) is a fluorescence anisotropy image of the same sample.

进一步分析表明, (1)式定义的荧光各向异性度仅适用于荧光分子方向均匀分布的样品, 如溶液, 细胞膜, 细胞质等. 如果激发前荧光分子排布已有一定的方向性, 那么这种方法得到的 r 值并不能真实反应荧光分子的转动自由度. 例如: 如果体系中所有分子的取向固定在对角方向上, 转动自由度为零. 这时无无论利用垂直或水平方向偏振光激发, 都有 $I_{||}=I_{\perp}$. 采用(1)式可得: $r=0$, 即分子的转动自由度很大, 与实际情况不符. 因此, 本工作中所报道的荧光各向异性成像方法, 只适用于荧光分子各向同性分布的样品, 即分子的排列方向在空间立体角中等几率分布, 如细胞膜、细胞质、溶液等. 图 4b 中, 对角方向排列的纤维束其荧光各向异性度显示偏低. 我们推测, 这可能是由于荧光分子在纤维表面排列并非空间等几率分布, 从而导致了观测误差. 针对分子取向非均匀分布的体系如何实现荧光各向异性成像, 我们将另文详细论述.

2.2 FITC 与 FITC-CD44Ab 溶液荧光各向异性度成像结果

从图 5a 和图 5b 可以看出, 相同激发条件下, FITC 与 FITC-CD44Ab 的荧光亮度几乎完全相同. 这是因为 CD44Ab 标记对 FITC 的荧光特征影响很小, 2 种样品所发荧光强度差别不大.

FITC 与 CD44 抗体分子结合产物 FITC-CD44Ab 的分子体积要大于 FITC. 参考 Perrin

公式, 相同周边环境, FITC 由于体积小, 转动速度快, 分子转动相关时间较 FITC-CD44Ab 要短, 因此荧光各向异性度较小 (图 5a), 而 FITC-CD44Ab 的分子体积大, 荧光各向异性大, 图像亮度增高 (图 5b). 这一实验结果显示, 利用各向异性度成像, 能够区分荧光分子体积的差异. 这种效应亦有可能应用于活细胞环境中, 直接观测荧光标记的生物大分子结构变化或结合、断裂等牵涉到分子质量变化的生物化学过程, 为普通双光子激发扫描成像增加新的探测指标.

图 5 中 $\overline{FA}$ 即各向异性度图的平均荧光各向异性度, 由全图的平均亮度换算出.

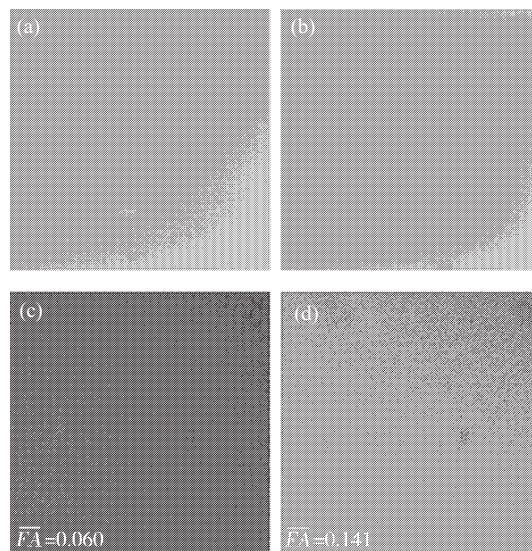


Fig.5 Fluorescence anisotropy imaging of FITC and FITC-CD44Ab solution with the same concentration

(a) and (b) are respectively two photon images of FITC, FITC-CD44Ab solution. (c) and (d) are corresponding FA images of FITC, FITC-CD44Ab solution.

2.3 不同浓度小檗碱作用下的肿瘤细胞膜表面 CD44 分子各向异性度成像

细胞膜的流动性在细胞生理病理过程中具有重要意义. 对正常细胞而言, 膜的流动性越大, 表示细胞的活力越强, 而转化细胞 (肿瘤细胞模型) 膜流动性增大则表示转化细胞活力增强, 易于繁殖.

细胞表面 CD44 是细胞表面的黏附分子, 具有多种功能及结构形态, 主要负责细胞-细胞, 细胞-基质之间的黏附, 在肿瘤转移过程中起重要作用. CD44 分子主要由三部分构成: 胞外区, 跨膜区和胞内区, 其胞内末端锚定于细胞骨架蛋白上^[10]. 目

前还没有关于细胞表面 CD44 分子荧光各向异性度测量的工作报告, 但根据其构成特点, 可推断其流动性与细胞膜及细胞骨架蛋白的运动有关。

在本实验中, 我们采用具有高转移性的 PG 细胞 (人肺癌高转移巨细胞) 作为实验样本. 用 2.5、5、10 mg/L 的小檗碱分别作用 PG 细胞 24 h 后, 加入 FITC-CD44Ab 标染细胞表面 CD44, 观察不同浓度的小檗碱对 PG 细胞表面 CD44 荧光各向异性度的影响. 成像后, 发现不同浓度药物作用的细胞, 其细胞膜各向异性度有差别, 且随着浓度的升高各向异性度增强, 表明细胞膜的流动性呈减小趋势(图 6).

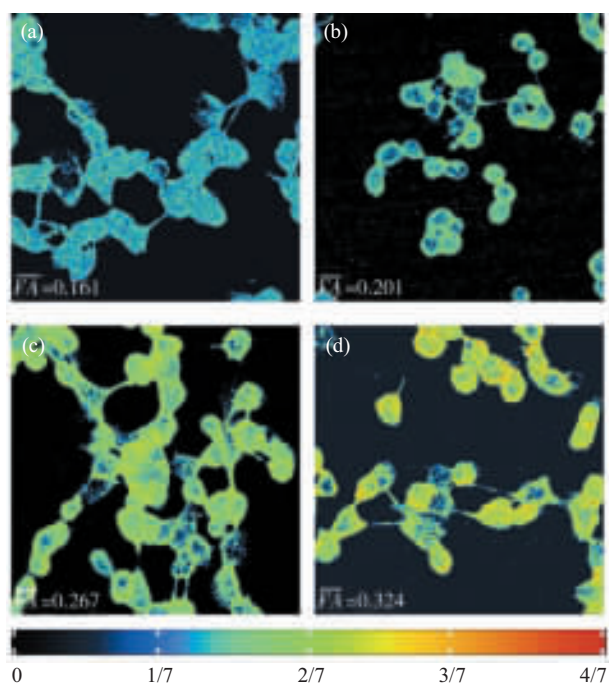


Fig.6 Fluorescence anisotropy imaging of tumor cell membranes stimulated by berberine in different concentration

These tumor cells were treated by 2.5 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L berberine respectively(b,c,d), (a) is the control sample for 24 h. Then dye cell membrane with FITC-CD44Ab and perform fluorescence anisotropy imaging. We found that anisotropy is regularly increasing when concentration of berberine increases.

有研究表明^[12], 小檗碱对 S180 细胞不论是体外还是体内都具明显的抑制作用, 同时我们前期的实验结果也表明, 小檗碱对 PG 细胞的增殖抑制作用呈时间及剂量的依赖性 (数据未列出). 因此可推断, 小檗碱可能是通过抑制 PG 细胞膜的流动性而间接抑制其表面 CD44 分子的流动性, 进而影响肿

瘤细胞的移行及细胞活力。

值得注意的是, 按照(1)式计算的荧光各向异性度, 其分子为正交方向上两个荧光偏振分量强度之差, 分母与二者强度之和有关, 荧光各向异性度与荧光的强弱没有必然联系. 因此, 即使某像素点处的荧光强度很低, 该处的荧光各向异性度值仍然可能较强. 对照图 3 和图 6 的实验结果可以发现, 荧光各向异性度成像的纵向分辨率较双光子荧光成像结果差. 产生这种结果的原因是: 双光子荧光测量中, 焦点以外区域分子的双光子荧光强度急剧下降, 对图像对比度的贡献也急剧下降, 因而空间纵向分辨能力较强. 但在荧光各向异性度成像中, 对比度与荧光强度没有直接关系, 离焦区发出的微弱荧光与焦点产生的强烈荧光都反应相应部位分子荧光的各向异性度, 在对比度上有同等贡献. 事实上, 由于离焦区荧光强度很低, 噪声和涨落在(1)式中对分子部分影响很大, 从而对荧光各向异性度的贡献往往比焦点区域荧光的贡献更大. 另外, 由于离焦区横向分辨率急剧下降, 荧光各向异性度成像结果的横向分辨率也受到影响。

3 结 论

荧光各向异性度是样品所发射荧光的重要指标之一, 通过测量各向异性度值能够获得很多荧光分子所处微观环境的信息. 传统的各向异性度测量方法均为点测量方式, 不能获得各向异性度在空间的分布信息。

本文介绍了荧光各向异性度成像测量系统的设计与实现. 与双光子成像有机结合, 在不影响双光子成像的情形下, 此系统能够进一步获得荧光图像各像素点所对应的荧光各向异性度, 实现荧光各向异性度的成像测量. 利用此系统, 我们进行了一系列成像实验, 以探索该成像系统的运行状况与潜在应用。

我们选用双光子激发荧光方式来进行各向异性度成像. 由于双光子激发对应的最大荧光各向异性度为 0.57, 大于单光子激发时的 0.4, 使得 r 值测量的动态范围更大, 故能有效提高各向异性度的测量精度. 另外, 采用双光子激发模式还保留了双光子荧光成像固有的一系列优点^[1,13], 如对生物样品光损伤小、穿透深度深和荧光收集率高等特点。

实验中采用比例测量的探测方法, 利用四通道测量方式, 消除了由于光路的偏振光传输特征不确定为实验造成的困难. 图形处理方法中则引入域值

概念, 比较好地排除了背景光对各向异性度测量的影响。

我们演示了荧光各向异性度成像在生物研究中的潜在应用, 并讨论了现有方法的缺陷。荧光各向异性度成像可以获得更加丰富的生物学信息, 如探测荧光分子所处微观环境的流动性, 荧光标记的生物大分子体积、形状、质量的变化等等。这些信息对了解生命过程, 特别是为在活细胞层次动态观测蛋白质-蛋白质相互作用, 免疫抗体抗原结合过程提供一种新的实验研究手段。实验结果表明, 我们所设计装配的荧光各向异性度成像系统, 能够有效地应用于细胞膜流动性的观测。不过, 本文中根据(1)式定义的荧光各向异性度进行测量, 只适用于荧光分子取向各向同性的体系。另外, 荧光各向异性度成像的空间分辨率低于双光子荧光成像。

参 考 文 献

- Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 1990, **248** (4591): 73~76
- Rigby P J, Goldie R G. Confocal microscopy in biomedical research. *Croatian Medical Journal*, 1999, **40** (3): 346~352
- Lakowicz J R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2nd. New York: Kluwer, 1999. 291~319
- Heyduk T, Ma Y, Tang H, *et al.* Fluorescence anisotropy: Rapid, quantitative assay for protein-DNA and protein-protein interaction. *Methods in Enzymology*, 1996, **274**: 492~503
- Galletto R, Bujalowski W. Kinetics of the *E.coli* replication factor DnaC protein-nucleotide interactions. II. Fluorescence anisotropy and transient, dynamic quenching stopped-flow studies of the reaction intermediates. *Biochemistry*, 2002, **41**(28): 8921~8934
- 梁华平, 王正国, 田丰群, 等. 创伤后淋巴细胞膜流动性的变化及其与脂质过氧化作用的关系. *基础医学与临床*, 1995, **15** (5): 379~382
Liang H P, Wang Z G, Tian F Q, *et al.* *Basic Medical Sciences and Clinics*, 1995, **15** (5): 379~382
- 梁华平, 王正国, 田丰群, 等. 创伤小鼠淋巴细胞膜脂流动性的变化. *中国病理生理杂志*, 1995, **11** (4): 425~428
Liang H P, Wang Z G, Tian F Q, *et al.* *Chin J Pathophys*, 1995, **11** (4): 425~428
- 张亚历, 李永强, 周 丹, 等. 自由基诱变剂对大肠癌细胞脂质过氧化、膜脂流动性及 DNA 含量的影响. *中国病理生理杂志*, 1995, **2**: 179~182
Zhang Y L, Li Y Q, Zhou D, *et al.* *Chin J Pathophys*, 1995, **2**: 179~182
- Bigelow C E, Conover D L, Foster T H. Confocal fluorescence spectroscopy and anisotropy imaging system. *Optics letters*, 2003, **28** (9): 695~697
- Lakowicz J R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2nd. New York: Kluwer, 1999. 298~330
- Kajita M, Itoh Y, Chiba T, *et al.* Membrane-type 1 Matrix Metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol*, 2001, **153** (5): 893~904
- 黄林清, 徐传福, 周世文, 等. 小檗碱抗肿瘤作用实验研究. *中国药理学通报*, 1997, **13** (2): 189
Huang L Q, Xue C F, Zhou S W, *et al.* *Chin Pharmacol Bull*, 1997, **13** (2): 189
- Denk W, Piston D W, Webb W W. Two-photon molecular excitation in laser-scanning microscopy. In: pawley J B, ed. *Handbook of Biology Confocal Microscopy*. New York: Plenum Press, 1995. 445

Two-photon Fluorescence Anisotropy Imaging *

WANG Xue-Feng¹⁾, WANG Yi¹⁾, JIANG Yan³⁾, MA Hui^{1,2)**}

¹⁾The Key Laboratory of Atomic and Molecular Nanosciences, Ministry of Education, Department of Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

²⁾Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518057, China;

³⁾Department of Pathology, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract A new method is developed for two-photon fluorescence anisotropy imaging. Its biological applications are tested. This system is based on a two-photon laser scanning fluorescence microscope. A polarization beam splitter was inserted into the optical path to separated fluorescence into components of orthogonal polarization. By rotating the polarization of the excitation beam by 90°, four images were collected for each sample. These images were then processed pixel-by-pixel to generate a new fluorescence anisotropy image. The capability of this method is tested for different samples, including FITC, FITC-CD44 in solution and FITC-CD44 attached to the membranes of tumor cells. The results show that fluorescence images can distinguish fluorescence molecules of different molecular mass, or detect changes in microenvironment.

Key words fluorescence anisotropy, two-photon scanning microscopy, fluidity of membrane, berberine, tumor cell

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China through the Outstanding Young Overseas Scientists Program (19928408), Major Program (60138010) and Free Application Program (10274039).

**Corresponding author. Tel: 86-10-62783136-164, Fax: 86-10-62781598, E-mail: mahui@mail.tsinghua.edu.cn

Received: September 22, 2004 Accepted: October 22, 2004