

活体细胞内双光子激发的光漂白特性^{*}

陈同生 曾绍群 骆清铭^{**} 张智红 周 炜

(华中科技大学生物医学光子学教育部重点实验室, 武汉 430074)

摘要 长波长光的强穿透能力和对活体细胞和生物组织光毒性很小的特性, 使得双光子激发荧光显微术已经成为无损伤成像的重要工具. 可是双光子激发的高光子密度可能会产生高次光子相互作用, 从而产生更快的光漂白. 从实验上研究了离体和活体细胞内的若丹明 123 和若丹明 B 分别在单光子激发和双光子激发时的光漂白特性. 在体的实验结果与离体的实验结果一致. 正如期望的一样, 单光子激发时光漂白速率非常近似地随着激发功率的增加而线性增加. 可是, 双光子激发时光漂白速率并不是正比于激发功率的平方, 而是正比于激发功率的高次方 (> 3.5). 对绿色荧光蛋白 (GFP) 变异体 CFP 和 YFP 的实验也得到同样的结果, 这就表明高次光漂白可能是双 (多) 光子激发中的普遍现象. 因此多光子的应用可能会受到强光漂白的限制.

关键词 光漂白, 荧光基团, 单光子激发, 双光子激发

学科分类号 Q63

双光子激发 (TPE) 荧光显微镜已经成为活体细胞和生物组织无损伤成像研究的重要工具^[1~3]. TPE 主要有以下优点: a. 光毒性小: TPE 使用的可见光或近红外光对活体细胞和组织的光毒性很小, 因此适合于长时间的研究; b. 穿透能力强: 相对于紫外光、可见光或近红外光具有很强的穿透性, 因此可以对生物样品进行深层次的研究; c. 高分辨率: 由于双光子吸收截面很小^[4], 所以只有在焦平面很小的区域内可以激发出荧光; d. 漂白区域很小^[5]. 可是 TPE 的高光子密度可能会产生高次光子相互作用并产生比普通显微镜中更快的光漂白^[6], 因此限制了双 (多) 光子激发荧光技术在生物和化学领域的应用.

光漂白是荧光显微镜中荧光基团固有的一种性质, 它使得荧光显微镜中的数据处理和现象解释变得复杂. TPE 的荧光强度与激发光强度的平方成正比^[6], 所以也期望 TPE 的光漂白速率与激发光的强度的平方成正比. 为了定量研究光漂白速率与激发功率强度的关系, Patterson 等^[7]测量了荧光素等几种荧光染料在离体状态下的光漂白速率与激发功率对数的斜率, 单光子激发时斜率接近于 1, 而 TPE 时斜率大于 3 而不是 2. 这些结果表明单光子激发漂白速率非常接近于与激发功率成线性关系, TPE 光漂白速率并不是与激发光强度的平方成正比, 而是与激发光强度的高次方 (大于 3) 成正比^[7].

本文的目的就是研究活体细胞内荧光基团的光漂白速率与激发功率的关系. 由于活体细胞的差异

性很大, 不同细胞甚至同一个细胞不同部位的光漂白特性差异性也很大, 所以 Patterson^[7, 8]的方法无法适用于活体内荧光基团的光漂白速率的研究. 因此本文首先提出了一种研究活体细胞内荧光基团的光漂白速率与激发功率关系的方法, 并利用该方法研究了若丹明 123 和若丹明 B 分别在活体 HeLa 细胞内的单光子激发和 TPE 光漂白速率与激发功率对数图的斜率. 实验结果表明单光子激发时的斜率非常接近于 1, 而 TPE 时的斜率总是大于 3.5, 与若丹明 123 和若丹明 B 的离体实验结果完全一致. 对绿色荧光蛋白 (GFP) 变异体 CFP 和 YFP 的在体实验也得到了同样的结果^[9].

1 材料与方法

1.1 样品准备

1.1.1 离体样品准备: 离体实验样品采用 Patterson^[7, 8]的方法制备.

1.1.2 细胞培养: HeLa 细胞由同济医科大学免疫学教研室赠送. 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液, 于 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中培养. 实验前 2 d, 细胞用胰酶消化, 以 3×10^5 /ml 的浓度接种于 24 孔培养板中. DMEM、HEPES、小牛血清购

^{*} 国家杰出青年科学基金 (60025514), 国家自然科学基金 (39870205, 30070215, 30070261) 和高校博士点专项基金 (98048733) 等资助项目.

^{**} 通讯联系人.

Tel: 027-87544624, E-mail: qluo@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2001-07-16, 接受日期: 2001-08-28

于 GIBCO 公司.

1.1.3 荧光染料的标记: 吸去培养板中的培养液, 用 Hanks 液洗涤 3 次, 每孔细胞中加入 $3\mu\text{mol/L}$ 若丹明 123 或若丹明 B $300\mu\text{l}$, 置 28°C 孵育 45 min, 再用 Hanks 液洗涤 3 次, 加入 1 ml Hanks 液置于 37°C 孵育 30 min.

1.2 方法和仪器

1.2.1 显微镜: 单光子激发和多光子激发是在 Bio-Rad MRC1024 多光子显微镜上进行的, 该显微镜配有氩离子激光器 (488 nm 和 514 nm) 和 Ti:sapphire 飞秒激光器 (波长 $690 \sim 1050$ nm, Spectra Physics, America) 各一台, 物镜选用的数值孔径 (N. A.) 为 0.6 (Nikon2000, Japan), 单光子激发光滤波片为 A₁, 双光子激发滤波片为 TS1, 探测滤波片是 OG515 (Chroma, America).

1.2.2 光漂白: 光漂白过程用 Time-Course 记录, 然后采用双指数模型进行拟合, 并获得下降到初值 80% 的漂白时间. 荧光信号中应减去非荧光区域的背景值. 对同一个荧光区域分别用两种不同强度的光激发, 第一次用小功率 (激发功率为 P_{ex1}) 光激发, 而且当荧光强度下降到初值的 75% 左右时即停止激发, 并停留一段时间 (一般 30 s 左右) 等待漂白区域的恢复, 然后用高功率 (激发功率为

P_{ex2}) 光激发. 为了防止探测器的饱和, 在大功率激发时经常需要调整探测器的增益系数. 光漂白速率对激发功率对数的斜率 (slope) 由下式得到

$$\text{slope} = - \frac{\lg(t_2/t_1)}{\lg(P_{\text{ex2}}/P_{\text{ex1}})} \quad (1)$$

其中 t_1 和 t_2 分别是两种激发功率下荧光强度下降到初值 80% 所经历的时间. 激发功率的大小是通过中性滤光片调节的.

2 结果

2.1 若丹明 123 的离体实验结果

图 1 是没有明显光漂白时荧光强度与激发平均功率的对数图, 为了计算和作图的简洁, 荧光强度和激发平均功率 (P) 都取相对值, 这不会影响它们的对数斜率 (以下对数图相同). 单光子激发采用 488 nm 的连续激光, 输出功率为 25 mW, 通过调整激发衰减片 POWER 的值 (分别为 1%, 3%, 10%) 改变激发功率; TPE 光波长为 790 nm, 脉宽为 70 fs, 激发功率分别为 6.2、7.5、9.1、12、16、20、22 和 30 mW. 单光子激发的斜率为 1.02 ± 0.02 , TPE 的斜率为 2.00 ± 0.02 , 这与荧光激发的理论一致^[4, 5], 因而证明了离体实验中荧光强度测量方法的正确性.

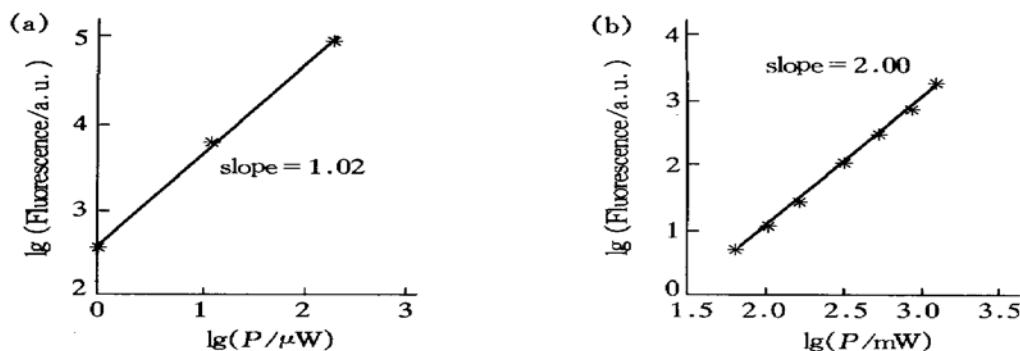
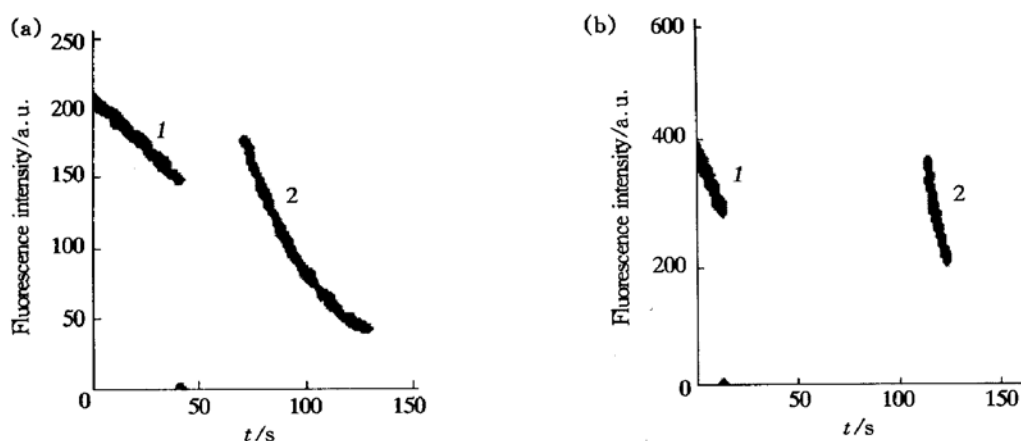


Fig. 1 The excitation dependence of rhodamine 123 fluorescence intensity and average excitation power *in vitro*

(a) single-photon excitation; (b) two-photon excitation.

图 2 是离体若丹明 123 典型的光漂白过程. 单光子激发光漂白分别选择激发衰减片 POWER 为 30% 和 100%, 两种状态下荧光强度下降到初值 80% 的时间分别为 34.55 s 和 9.25 s, 利用 (1) 式可得相应光漂白速率的斜率 (slope) 为 1.09. 选择不同的区域重复 4 次实验测量得到的对应平均斜

率 (slope) 为 1.03 ± 0.05 . TPE 功率分别为 12 mW 和 15.2 mW, 两种状态下荧光强度下降到初值 80% 的时间分别为 8.85 s 和 3.45 s, 利用 (1) 式可得相应的斜率 (slope) 为 3.98. 选择不同的区域重复 4 次实验测量得到光漂白速率的平均斜率 (slope) 为 3.80 ± 0.27 .

Fig. 2 The photobleaching of rhodamine 123 *in vitro*

(a) single-photon excitation; 1: 30%; 2: 100%. (b) two-photon excitation; 1: 12 mW; 2: 15.2 mW.

2.2 若丹明 123 的在体实验结果

若丹明 123 转染的 HeLa 细胞的 TPE 荧光图如图 3 所示, 核周围特别亮. 选择比较亮的区域作为

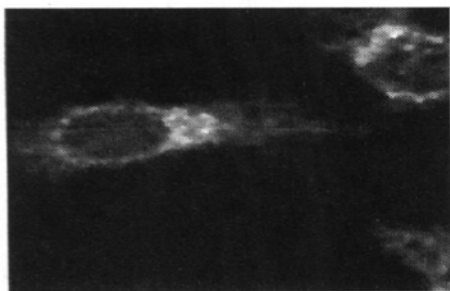


Fig. 3 The TPE fluorescence image of HeLa cell stained by rhodamine 123

研究对象, 为了选取研究区域的方便, 实验中将 ZOOM 设置为 10. 测量荧光强度时选择非荧光区域作为背景区域, 实验发现背景区的值不随激发功率的增加而增大, 而只由光电倍增管的 Blev. 值决定.

图 4 是荧光强度与激发功率的对数图. 单光子激发时 POWER 分别选定为 1%、3%、10% 和 30%, TPE 功率分别为 5.0、6.2、7.5 和 9.1 mW. 单光子激发相应的斜率为 1.03 ± 0.02 ; TPE 相应的斜率为 2.00 ± 0.04 , 这与荧光激发的理论一致^[4, 5], 因而证明了在体实验中荧光强度测量方法的正确性.

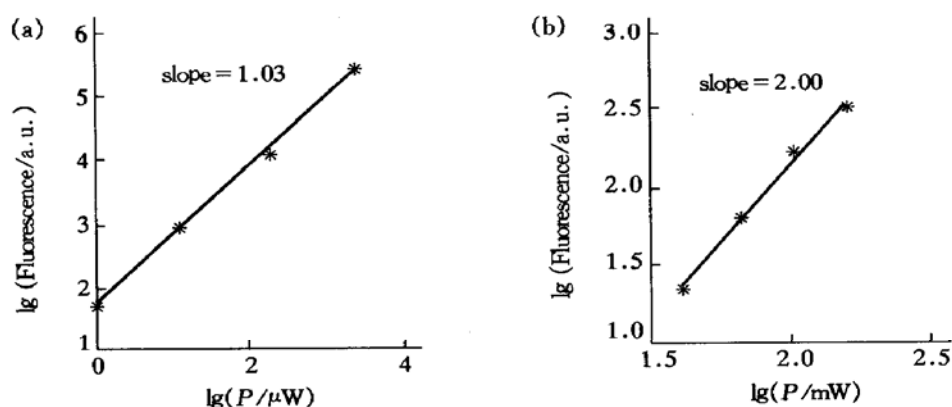


Fig. 4 The excitation dependence of rhodamine 123 fluorescence intensity and average excitation power *in vivo*

(a) single-photon excitation; (b) two-photon excitation.

图 5 是在体若丹明 123 光漂白的典型过程. 单光子激发光漂白实验分别选择激发衰减片的 POWER 为 30% 和 100%, 两种状态下荧光强度下降到初值 80% 的时间分别为 32.25 s 和 8.95 s, 利

用 (1) 式可得相应的斜率 (slope) 为 1.06. 分别选择不同的细胞和细胞区域重复 4 次实验测量得到的光漂白速率对激发功率对数的斜率 (slope) 为 1.05 ± 0.03 . TPE 功率分别为 32.5 mW 和

42 mW, 两种状态下荧光强度下降到初值 80% 的时间分别为 22.35 s 和 8.45 s, 利用 (1) 式可得相应的斜率 (slope) 为 3.81. 分别选择不同的细胞

和细胞区域重复 4 次实验测量得到的光漂白速率对激发功率对数的斜率 (slope) 为 3.72 ± 0.41 .

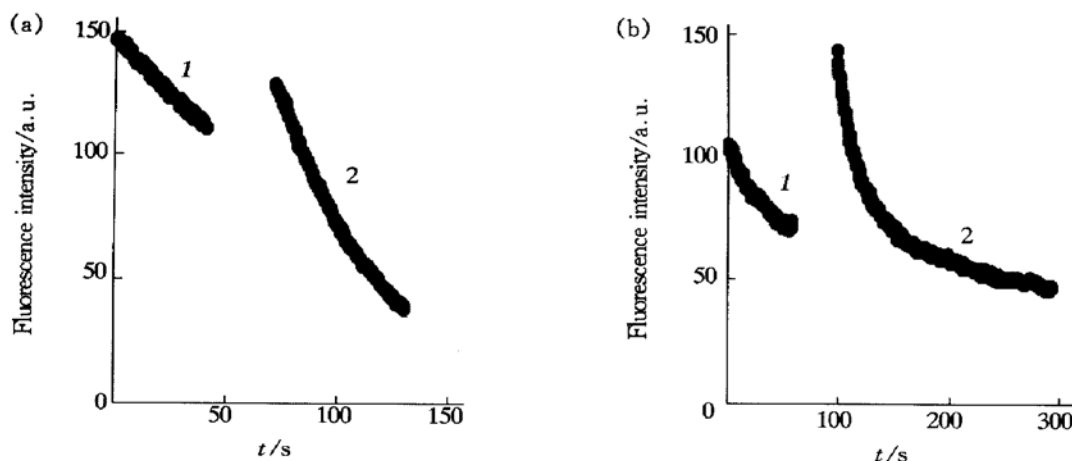


Fig. 5 The photobleaching of rhodamine 123 *in vivo*

(a) single-photon excitation; 1: 30%; 2: 100%. (b) two-photon excitation; 1: 32.5 mW; 2: 42 mW.

以上的实验结果表明若丹明 123 分别在离体和体状态下的光漂白速率与激发功率关系的结果是一致的. 单光子激发光漂白速率与激发功率对数图的斜率接近于 1, 而 TPE 光漂白速率与激发功率对数图的斜率皆大于 3, 这与 Patterson 等^[7]对荧光素等荧光染料的实验结果相同. 采用同样的方法对若丹明 B 的实验结果为: 单光子激发光漂白对应的斜率 (slope) 为 1.06 ± 0.04 ; TPE 光漂白对应的斜率 (slope) 为 3.80 ± 0.40 . 另外我们还研究了绿色荧光蛋白在体的光漂白速率^[9], 得到的结果是单光子激发时斜率 slope 为 1.02 ± 0.10 , TPE 时斜率 slope 为 3.92 ± 0.13 .

3 讨 论

单光子激发光漂白速率与激发功率对数图的斜率接近于 1, 表明其光漂白的速率正比于荧光基团激发态的分子数, 而 TPE 光漂白速率与激发功率对数的斜率大于 3, 说明 TPE 光漂白速率与激发态的分子数存在高次 (大于 3) 项. 双光子激发只限于焦平面内从而减少了光漂白的区域, 可是高次光漂白项的存在使局部的光漂白加快, 这就限制了多光子激发荧光显微技术的应用.

在体光漂白实验中, 前一次光漂白无疑会降低漂白区域的荧光基团浓度, 所以实验中第一次漂白时, 当荧光强度下降到初值 80% 即关闭激发光并停留一段时间等待漂白区域的恢复, 另外高功率光激发时漂白区域比低功率光激发时的大, 所以实际

上两次漂白区域的浓度差别并不大.

实验中重点考虑了扩散对光漂白测量的影响. 图 6 是仅仅只对图 3 中一个记录区域光漂白后的恢

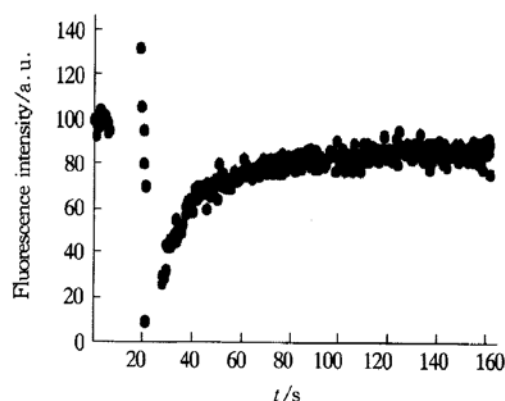


Fig. 6 The fluorescence recovery after photobleaching of rhodamine 123 in HeLa cell

复动态过程, 监测激发光功率为 2 mW, 快速漂白激发光功率为 42 mW. 由图 6 可见, 当漂白区域的荧光基团浓度很低时, 恢复过程非常快, 在 20 s 中内即可恢复到初始浓度的 70%, 这时扩散对光漂白的测量影响很大; 但是当漂白区域的浓度与非漂白区域的浓度相差不大时, 恢复过程却非常慢, 图 6 中荧光强度从初始值的 70% 恢复到初始值的 80% 所需要的时间约为 100 s, 这表明漂白区域和非漂白区域中荧光分子浓度相差不大时扩散对光漂白的测量影响很小. 而且本文在测量光漂白时为了减少扩散的影响, 实际的光漂白过程中是对整个细

胞进行光漂白, 即对记录区域和非记录区域同时进行光漂白, 所以荧光基团的扩散过程对光漂白速率测量的影响可以忽略, 离体和在体实验结果的一致性也证明了这一点.

本文中分别选择不同细胞和同一细胞不同区域 (包括细胞质内和细胞核内) 进行了多次实验, 虽然不同细胞和同一细胞的不同区域的光漂白过程都不相同, 但是测量得到的光漂白速率对激发功率对数的斜率 (*slope*) 却是一致的. 实验表明在体样品性能稳定, 每次实验只需选择一个或几个细胞即可, 而一个在体实验样品中通常含有成千上万的活细胞, 所以一个在体实验样品就可以进行长时间多次的光漂白实验研究.

尽管光漂白的准确机理并不清楚^[5], 但是基于光漂白测量能量共振转移效率 (pFRET)^[10] 和基于光漂白恢复 (FRAP) 测量扩散系数^[11] 等多种技术已经是生物医学研究中的重要技术. 本文的研究有助于对光漂白测量的定量修正处理和对研究问题的正确解释, 同时还可以作为研究光漂白机理的实验依据. 因为 pFRET 和 FRAP 技术主要用于活体生物样品的研究, 所以相对于 Patterson 等^[7] 离体的研究, 本文活体中荧光探针光漂白的研究更具有实际的意义.

4 结 论

本文首次研究了活体细胞内荧光基团的光漂白速率与激发功率的关系. 单光子激发光漂白速率对激发光强度对数的斜率接近于 1, 表明单光子激发光漂白过程中以线性项为主, 即荧光强度漂白下降速率正比于激发态的分子数量. TPE 光漂白速率对激发光强度的对数斜率大于 3, 而不是接近于 2, 表明 TPE 光漂白过程中存在高次项. TPE 光漂白中高次项的存在限制了多光子激发荧光显微术的应用.

在体和离体若丹明 123 和若丹明 B 的一致实验

结果表明, 本文提出的研究活体细胞内荧光基团的光漂白速率与激发光功率关系的实验方法是有效可行的, 而且在体实验样品性能稳定, 实验条件容易控制, 因此适合于光漂白的长时间重复研究.

TPE 光漂白过程中高次项存在的机理目前并不清楚, 激发光子是否与激发态荧光分子发生作用并产生光漂白, 以及激发态荧光分子间的作用机理都有待于进一步的研究.

参 考 文 献

- 1 Masters B R, So P T, Gratton E. Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of *in vivo* human skin. *Biophys J*, 1997, **72** (6): 2405~ 2412
- 2 Heinze K G, Koltermann A, Schwille P. Simultaneous two-photon excitation of distinct labels for dual-color fluorescence crosscorrelation analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (9): 10377~ 10382
- 3 Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R. Dynamic and quantitative Ca^{2+} measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (3): 2135~ 2140
- 4 Xu C. Multiphoton fluorescence excitation: New spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (10): 10763~ 10768
- 5 Denk W, Piston D W, Webb W W. Two-photon molecular excitation in laser scanning microscopy. In: Pawley B. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. New York: Plenum Press, 1995, 445~ 458
- 6 Sanchez E J, Novotny L, Holtom G R, *et al.* Room temperature fluorescence imaging and spectroscopy of single molecules by two-photon excitation. *J Phys Chem A*, 1997, **101** (38): 7019~ 7023
- 7 Patterson G H, Piston D W. Photobleaching in two-photon excitation microscopy. *Biophys J*, 2000, **78** (4): 2159~ 2162
- 8 Patterson G H, Knobel S M, Sharif W D, *et al.* Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J*, 1997, **73** (11): 2782~ 2790
- 9 Chen T S, Zeng S Q, Luo Q M, *et al.* A novel photobleaching model in living cells. *Proceedings of SPIE (The international society for optical engineering)*, 2001, **4427**: 17~ 23
- 10 Young R M, Arnette J K, Roses D A, *et al.* Quantitation of fluorescence energy transfer between cell surface proteins via fluorescence donor photobleaching kinetics. *Biophys J*, 1994, **67** (2): 881~ 888
- 11 Cole N B, Smith C L, Sciaky N, *et al.* Diffusion mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science*, 1996, **237** (9): 797~ 800

Photobleaching of Two-photon Excitation in Alive Cell*

CHEN Tong-Sheng, ZENG Shao-Qun, LUO Qing-Ming**, ZHANG Zhi-Hong, Zhou Wei

(The Key Laboratory of Biomedical Photonics of Ministry of Education of China,

Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract The two-photon excitation microscopy has become an important tool of noninvasive imaging due to the better penetration and relative harmlessness of the longer wavelength. However, the high photon flux in two-photon excitation can potentially lead to higher-order photobleaching within the focal volume. The relationship between the photobleaching rate and the excitation power for rhodamine 123 and rhodamine B *in vivo* and *in vitro* were measured. The coincidence of the results *in vivo* and *in vitro* demonstrated the correctness of the method. As expected, the photobleaching rate increased near-linearly with the excitation power for one-photon excitation. However, the two-photon photobleaching rate increased with high-order power (≥ 3.5) of excitation power, indicating the presence of high-order photon interaction in two-photon excitation microscopy. The same results are obtained by photobleaching experiments of the green fluorescence protein. As a consequence, the use of multi-photon excitation microscopy in the study may be limited by increased photobleaching.

Key words photobleaching, fluorophore, one-photon excitation, two-photon excitation

* This work was supported by grants from the National Natural Sciences Foundation of China for Distinguished Young Scholars (60025514), the National Nature Science Foundation of China (39870205, 3007025, 30070261) and the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (98048733).

** Corresponding author. Tel: 86-27-87544624, E-mail: qluo@mail.hust.edu.cn

Received: July 16, 2001 Accepted: August 28, 2001