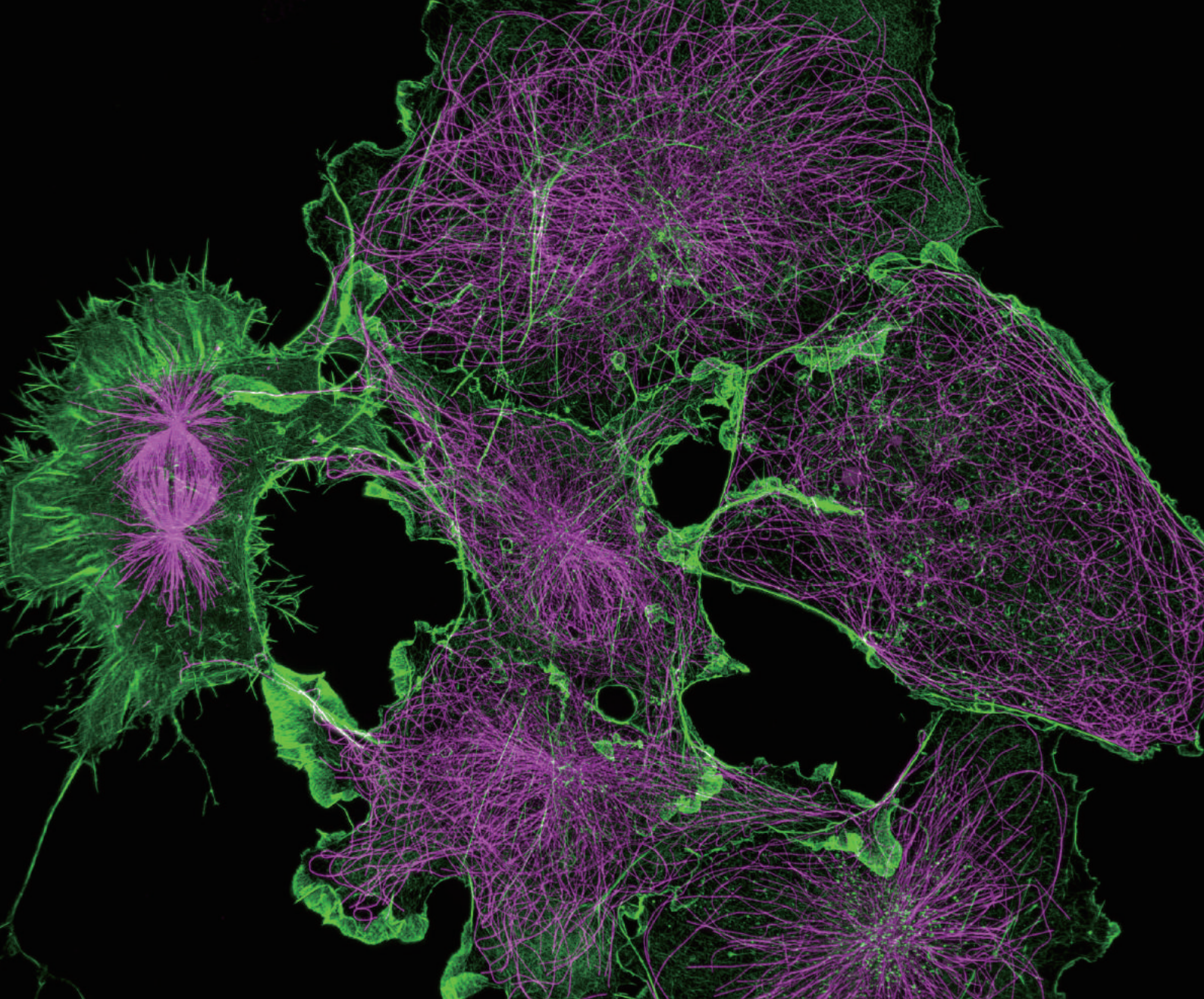




细胞生物学显微成像解决方案

版本 3.0



Seeing beyond

我们愿与您一起接受挑战，探索细胞的奥秘

蔡司，您值得信赖的合作伙伴

欢迎来到细胞的世界。细胞是生命结构和功能的基本单位，是生命活动的基本单元。一切生命研究都离不开细胞，任何宏观的生理病理变化，本质上都会反映在细胞层面的变化，细胞是各种生命科学研究的基础。

细胞的成像要求多种多样，复杂多变，大至细胞团完整成像，时间长至整个细胞周期长时间稳定观察，小至亚细胞微小结构精细成像，速度快至钙离子信号、膜蛋白运动快速追踪动态过程，对微弱易淬灭样本的高灵敏度低光毒性成像等等，如何满足不同细胞样本的不同观察目的，是研究人员所需面临的难题。在这本手册中，我们将带来蔡司在细胞生物学方面的全系列产品，以及前沿的解决方案，助您揭示细胞中的层层奥秘。

自1846年以来，蔡司在不断砥砺前行，开拓进取，致力于提供更好的科学工具和研究方法，一起推动人类的健康与发展。

肿瘤与药物研究	Page 6-8
干细胞研究	Page 9-11
钙离子成像	Page 12-15
细胞团研究	Page 16-17
细胞周期研究	Page 18-19
免疫细胞研究	Page 20
亚细胞结构	Page 21-25

蔡司全系列显微成像解决方案

实现不同样品状态、不同样品尺度、不同观察方式、不同时间和空间分辨率成像

Axioscan 7 全自动数字玻片扫描系统

高质量一键式快速自动扫描



CellDiscoverer 7 全自动活细胞成像平台

稳定、便捷、高通量的长时程成像



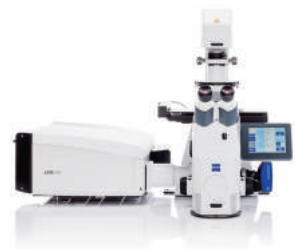
PALM MicroBeam 激光显微切割系统

分离纯化、精准收集，可升级配置光镊 MicroTweezers



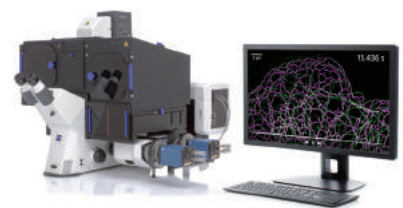
LSM 9 激光共聚焦显微成像系统

可升级配置 Airyscan 2 和双光子



Elyra 7 超高分辨率显微成像系统

兼容 Lattice SIM²、PALM、dSTORM、PAINT 等不同超高分辨率技术



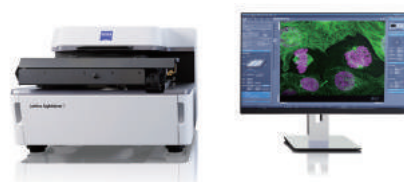
Lightsheet 7 激光片层扫描显微系统

活体和透明化样品快速多视角三维成像



Lattice Lightsheet 7 晶格层光显微成像系统

活细胞无损、高清、实时多维成像



电子显微镜

实现纳米尺度的二维及三维成像，多束扫描电镜大视野快速成像



X 射线显微镜

无损高分辨率三维成像



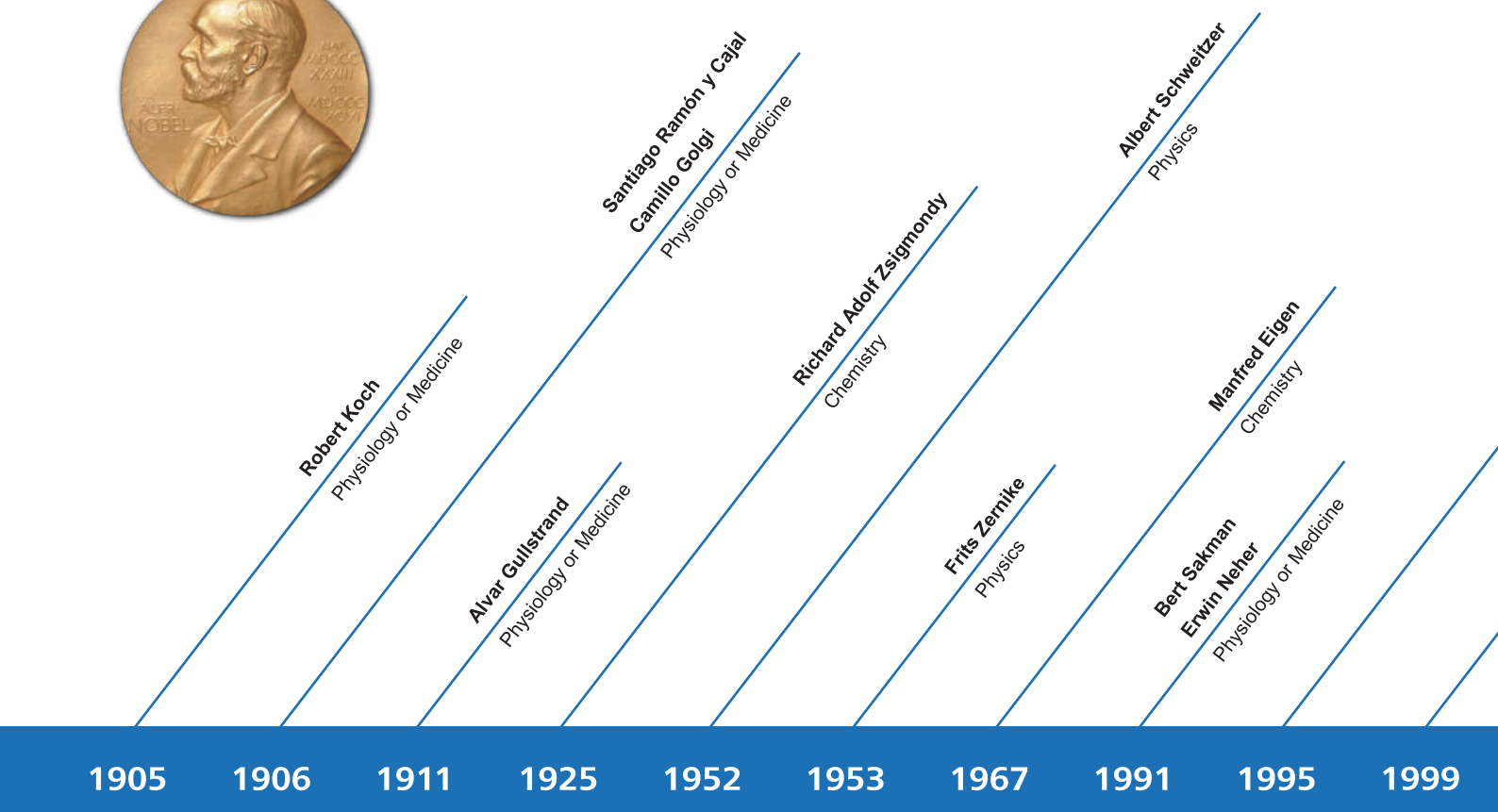
关联显微镜

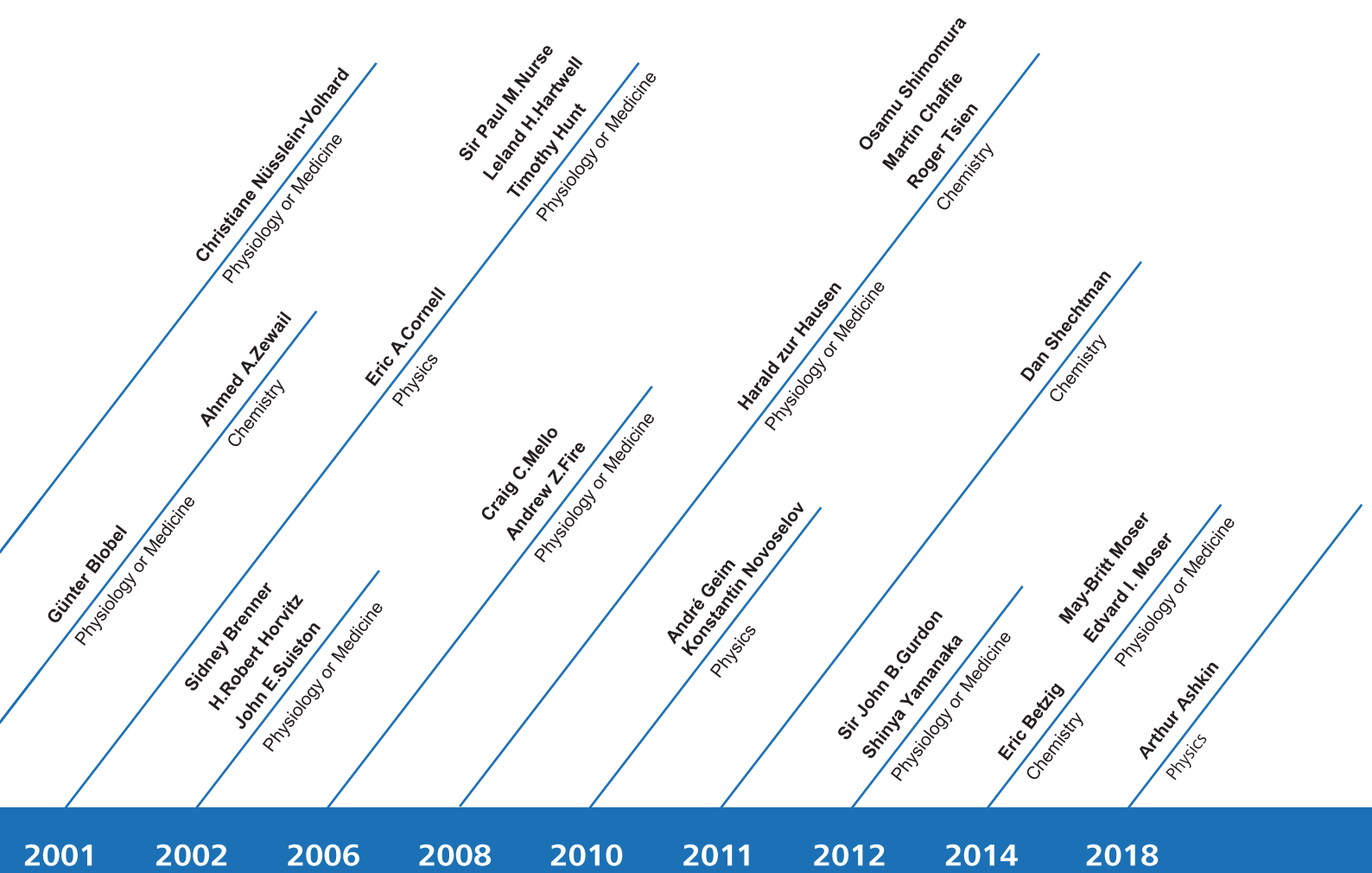
万镜互联，结合光镜与电镜优势，冷冻光电关联解决方案



Seeing beyond.

自 1901 年起，超过 35 位诺贝尔奖得主使用蔡司显微镜





肿瘤及药物研究

成像需求

- 高通量清晰成像
- 模拟内源生长环境
- 智能化数据分析
- 超高分辨率探索细节

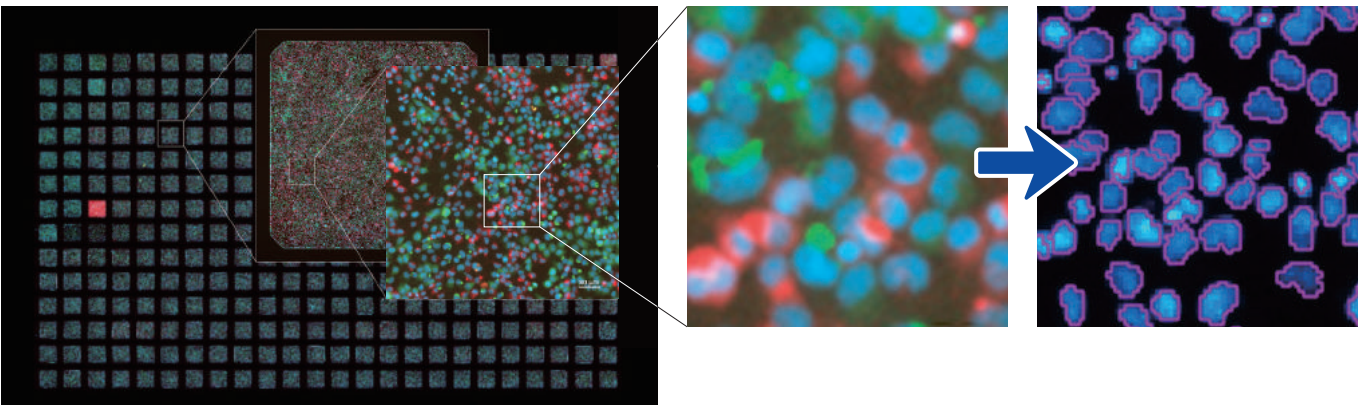
高通量筛选肿瘤特异性靶点及抗肿瘤药物分子

肿瘤及药物研究离不开高通量数据的采集，用于发现疾病模型中的特征分子或者筛选对应某一靶点的药物分子。高通量筛选中需要尽量快速地得到大数据量，并进行后续的定量分析，如细胞计数、荧光定量等，进而高效地分析肿瘤细胞表观特征及分子功能、找寻药物靶点及测试新药作用等。

方便智能的数据分析 —— ZEN Intellesis 智能分析模块

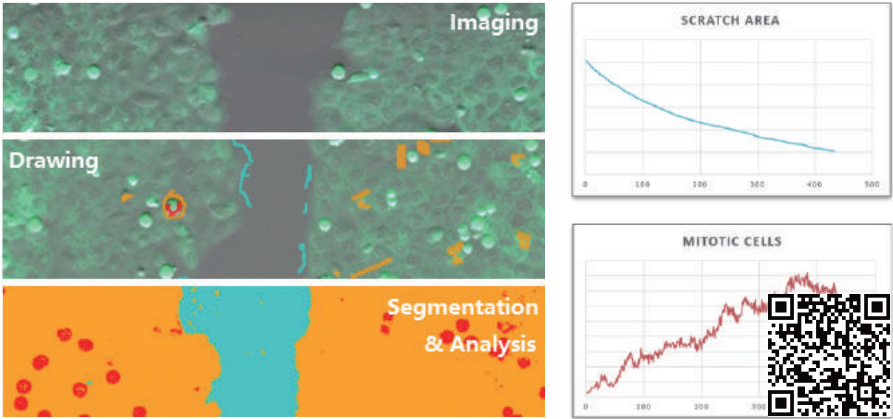
高通量成像获得的大量图像需要通过图像处理及分析获取其中的有效信息以进行统计分析。蔡司机器学习智能分析软件 ZEN Intellesis 通过机器学习的模式，只需简单地导入图像，定义图像类别，标记对象，建模培训并检查，再分割图像感兴趣区域。

- 高质量精细的图像分割
- 简单易用，用户只需定义图像中感兴趣的区域，软件会根据用户标记的区域自动提取特征，进行图像分割
- 对光镜、电镜、X 射线显微镜、氦离子显微镜图像都适用，图像分割流程可与后期图像处理及分析流程整合



使用 Celldiscoverer 7 对 348 孔板培养的细胞进行高通量扫描。SH-SY5Y 细胞，Plan-Apo 5x/0.25 物镜搭配 0.5x 变倍体（相当于 2.5x/0.12 物镜）进行大视野高分辨扫描。高效率成像，每孔一次性成像，无需拼图。成像分辨率高，放大图像可清晰分辨单个细胞。样品由德国波恩神经退行性疾病中心核心研究实验室 P.Denner 提供。

右图为表达 GFP 的 HeLa 细胞进行划痕实验。时间序列成像后使用 ZEN Intellesis 模块，用户只需分别标记部分划痕区域（湖蓝色）、细胞层（橙色）及正在分裂的细胞（红色），机器学习系统便可在整个图像自动分割出各成分，并方便后续的统计分析，如划痕面积及分裂细胞个数随时间变化曲线。扫描二维码了解更多信息。

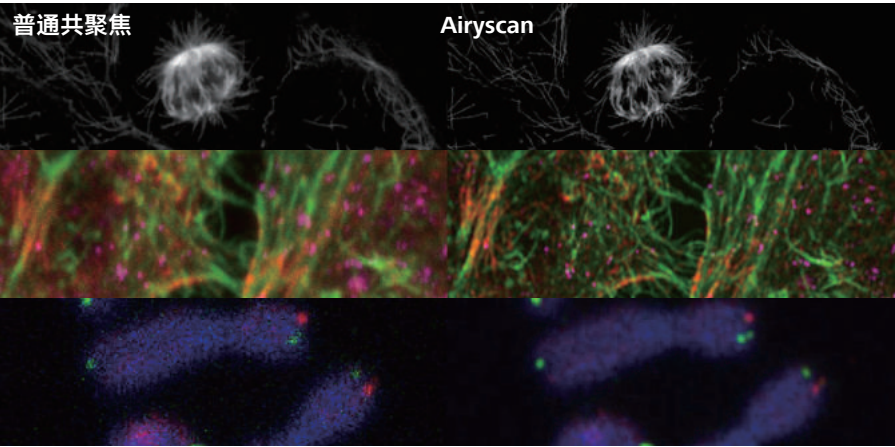


肿瘤发生发展及药物作用机理研究

为研究肿瘤细胞产生、增殖、迁移机理，以及药物作用机理，需要在接近内源的环境下对细胞样品进行观察，减少外界的干预（如环境条件波动、光毒性等）。同时，往往需要对更细微的结构，如亚细胞区域、细胞器、细胞骨架等进行细节成像，发现掩藏于细节中的微小变化。

活细胞超高分辨率成像 —— 基于共聚焦的 Airyscan 2 超高分辨率成像技术

分子机理往往隐藏于细胞内一些细节变化中，如一些分子在亚细胞结构上的分布变化，一些细胞器如线粒体、内质网、高尔基体、内噬体等的结构 / 大小 / 数量等变化；Airyscan 2 超高分辨率共聚焦成像，低光毒性便于在活细胞中捕捉细节变化。



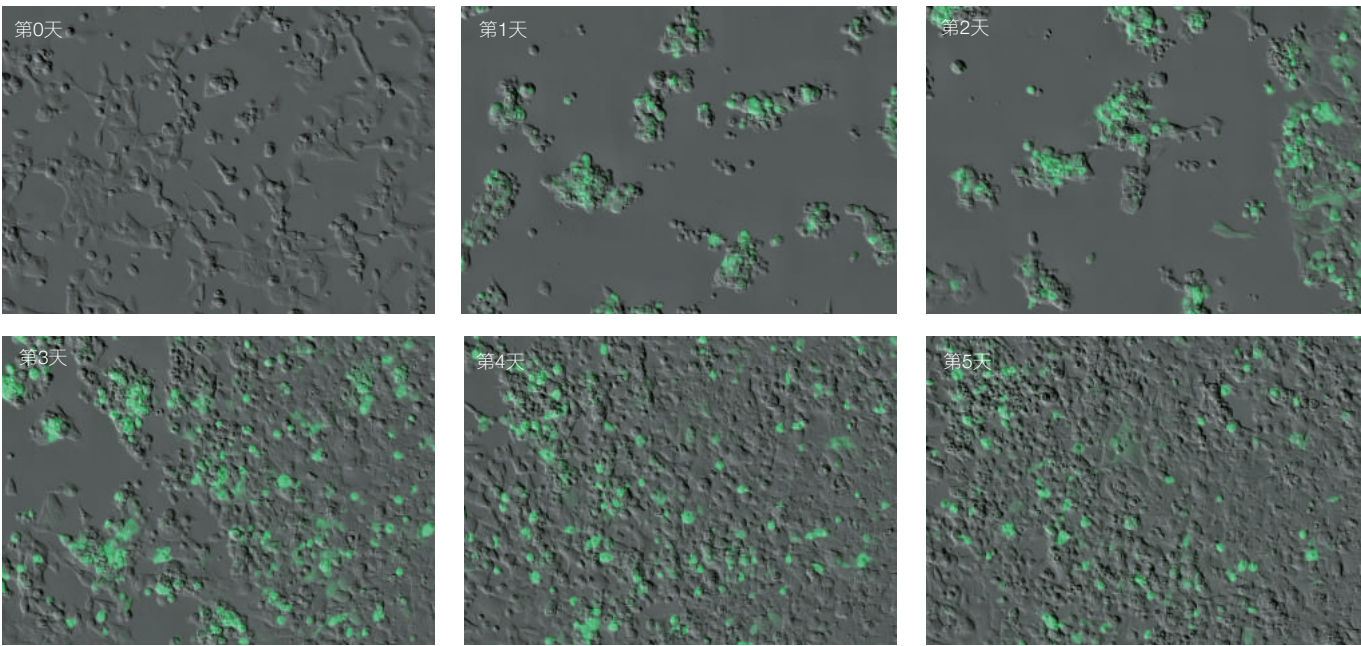
左图为对比共聚焦（左列），Airyscan（右列）可显著提高对各种细胞样品的成像分辨率和信噪比。
由上至下各样品依次为：
1、分裂中的肿瘤细胞，Alexa555 标记微管蛋白。样品来自英国约克大学的 P. O'Toole 及 P.Pryor；
2、免疫荧光染色的 HeLa 细胞，Alexa546 标记微丝（绿色），Alexa488 标记 AP3（红色），DAPI 标记 DNA（蓝色）。样品来自德国德勒斯登科技大学生物科技中心的 S. Traikov；
3、IMR90 成纤维细胞染色体 FISH 染色，DAPI（蓝色），Alexa488 标记的端粒 G 链（绿色）以及 Alexa546 标记的端粒 C 链（红色）。样品来自美国索尔克生物研究所的 J. Karlseder 和 J. Fitzpatrick。

肿瘤及药物研究

稳定、温和、高分辨率、全自动活细胞成像 —— Celdiscoverer 7 with LSM 900 全自动活细胞成像

活细胞长时间观察，需要保障成像系统内部的细胞培养及成像环境稳定，结合优异的光学设计及其高效的光效率，实现多通道、多点、时间序列等多维成像，同时模拟内源环境避免外界干扰及光损伤。此外，将 Celdiscoverer 7 与配有 Airyscan 2 的全新 LSM 900 结合使用，在高帧速下以超高分辨率对活样本的动态变化进行低光毒性成像。

- 大视野，高数值孔径，长工作距离物镜
- 箱体式设计，稳定、精确的活细胞培养系统
- 可长时间、高通量成像
- 灵敏、温和的 LED 多色荧光成像
- 红外明场 PGC 成像，对活细胞友好
- 兼容玻璃底、塑料底等不同规格培养皿
- 三维样品超高分辨率 Airyscan 2 成像



图片为转染 eGFP 的 HEK 细胞：1 天后，细胞开始表达 eGFP，由于瞬时转染和四环素处理出现了死细胞；2 天后，细胞逐渐恢复活力并且开始增殖；5 天后，细胞过满出现融合，同时有很多过表达 eGFP 的细胞出现。使用 Celdiscoverer 7 及 Plan-Apo 20x/0.75 autocorr 物镜拍摄，细胞培养于 1 mm 塑料孔板。样品由赛诺菲研发部门 (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, R&D IDD / in vitro Biology Frankfurt) 提供。扫描二维码观看视频。



干细胞研究

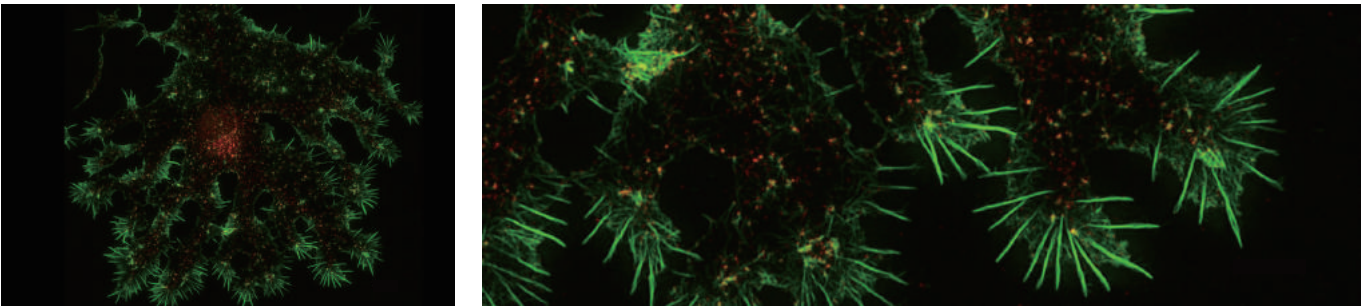
成像需求

- 亚细胞及大分子高分辨率成像
- 高速、低光毒性拍摄
- 精准无菌温和分离收集
- 长时程稳定活细胞培养

干细胞研究与应用是生命科学极其重要的组成部分，代表着未来医学发展的一大方向。干细胞研究除了探索发育、生长、进化、损伤及修复等一系列生命活动外，在细胞治疗、组织器官移植、基因治疗中也具有重要意义，还在新药开发与药效、毒性评估等领域产生了极其重要的影响。在干细胞研究中，涉及到亚细胞，单细胞，细胞群体，组织及活体等多个层面的研究，从而需要不同的解决方案来应对不同的成像需求。

亚细胞和大分子观察

通过荧光标记技术可以实现分子机制的进一步探索，但受限于光学衍射极限，共聚焦显微镜很难解析亚细胞乃至更小的生物结构。通过超高分辨率成像技术，可以突破光学衍射极限，从而实现对亚细胞和一些大分子精细结构的观察与分析。



上图为蔡司超高分辨率系统 Elyra 所拍摄的大鼠少突细胞前体 (OPCs) 分化, 借助晶格结构光照明技术 Lattice SIM², 可以达到 60 nm 分辨率。绿色标记 Phalloidin-Alexa 488, 红色标记 Arp2/3 (Alexa 594), 标尺为 2 μm。样品由斯坦福大学的 Brad Zuchero, Andrew Olson, Ben A. Barres 提供。

干细胞分化胚层的鉴定

干细胞(拟胚体)体内致瘤性能力的检测是干细胞功能研究中不可缺少的部分。研究者需要将肿瘤进行组织染色，连续切片后进行各胚层分化后的组织鉴定。蔡司 Axioscan 7 全自动玻片扫描系统可以对多达 100 张玻片进行高质量的一键式自动扫描和智能分析。

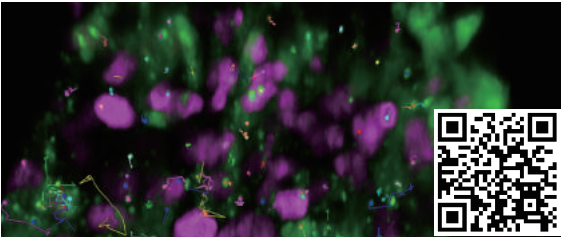


干细胞研究

干细胞的在体研究

未来干细胞治疗当中，很重要的一点就是干细胞能够归巢到特定特有的组织器官中，并分化成相应的功能细胞，但在活体中这一过程一直未能实现图像捕捉。利用蔡司共聚焦显微镜的高速，高灵敏度，低光毒性以及深度成像，我国科学家在国际上首次高清解析了斑马鱼体内造血干细胞归巢的完整动态过程，对干细胞研究及造血干细胞移植等具有重要意义。（来源 Li D, Xue W, Li M, et al. VCAM-1+ macrophages guide the homing of HSPCs to a vascular niche[J]. Nature, 2018, 564(7734): 119.）

借助蔡司晶格层光显微镜Lattice Lightsheet 7，您能够以亚细胞分辨率观察活体样本的动态过程，以研究微小结构随时间的变化。提供可自动适应敏感样本的晶格结构光，从而大大减少光漂白和光毒性，使您可以连续数小时、甚至数天观察样本。其提供可控的培养环境和集成的自动浸没机制，可以在无人值守的情况下长时间进行实验。

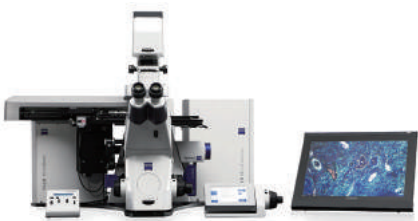


上图为斑马鱼胚胎的高速影片。运输 mRNA 分子的多维度成像（绿色）。细胞核显示为品红色。数据显示为高强度投影。每 2.5 秒采集 1 个体积 (86 x 80 x 12 μm³)。样本：由瑞士 EPFL 的 Andrew Oates 教授提供。

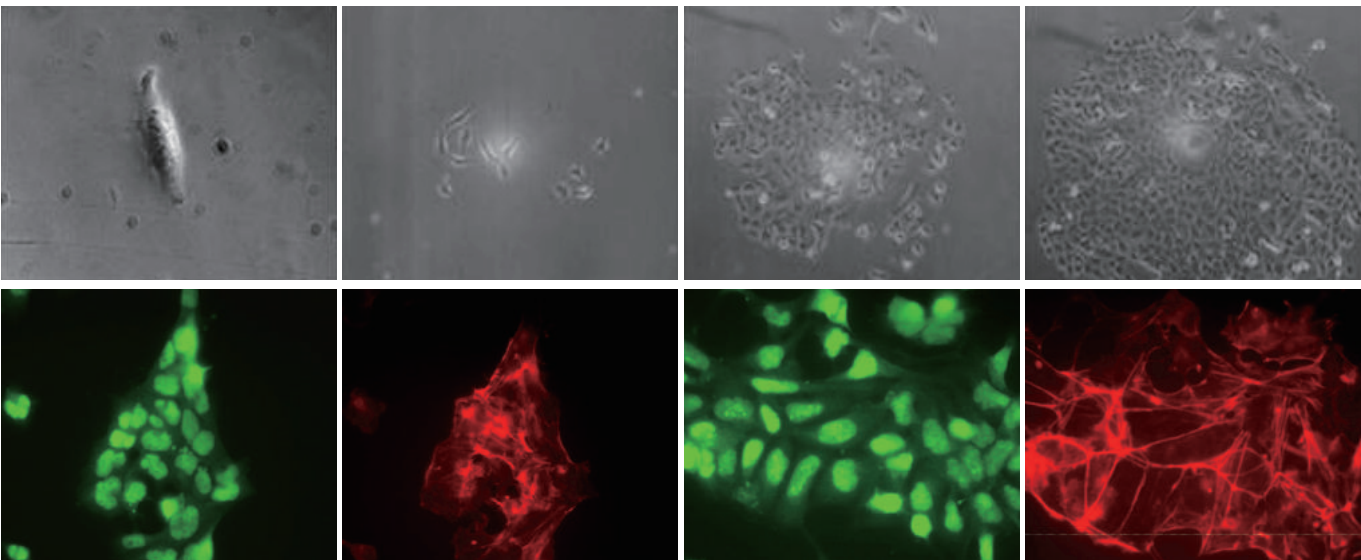
胚胎干细胞的分离再培养

将干细胞从活体，组织或细胞团中分离纯化是干细胞研究中最基础的工作，同时鉴于干细胞尤其是胚胎干细胞在体外极易受到各种环境因素的影响，那么如何在分离过程中完美的保持干细胞的活性和干性，则给干细胞研究工作带来了巨大的挑战。蔡司显微切割显微镜，通过激光对单细胞进行精准无菌温和的分离收集，同时保持细胞活性与各项干性，为干细胞的研究打下良好的基础。

- 蔡司专利逆重力激光弹射，稳定高效
- 组织切片到染色体，多尺度精准收集
- 封闭式活细胞无菌切割收集
- 无损，温和，细胞可以贴壁再培养



图为蔡司 PALM Microbeam 系统。



蔡司 PALM Microbeam 显微切割技术将单个干细胞从原代细胞中无菌分离，重贴壁进行克隆再生长。从单个人胚胎干细胞 (Day 1)，重新形成一个完整集落 (Day 13)，同时仍然阳性表达干性标志物 OCT-4。样品由德国慕尼黑 LMU 的 A. Buchstaller 博士提供。

干细胞群体行为研究

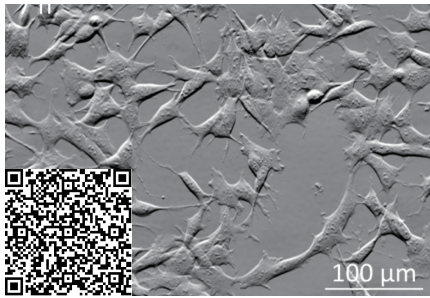
在干细胞群体行为（增殖和定向分化等）研究中，科学家们需要对干细胞进行长时间观察记录，为此蔡司提供了多种解决方案。

稳定、便捷、自动化 —— Celldiscoverer 7

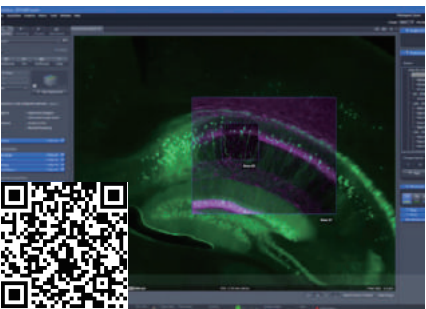
自动化活细胞成像平台 Celldiscoverer 7 可以提供封闭式稳定培养环境，同时独有的 PGC 透射光成像实现塑料孔板上的 3D 浮雕效果。除此以外，还可以选择搭配 LSM 900 with Airyscan 2，对干细胞进行三维高分辨成像。

更高效地利用您的活细胞工作站 —— ZEN Connect

通过蔡司 ZEN Connect 软件平台，实验人员可以锁定实验样品的拍摄区域，软件自动定位同一个视野位置，保证实验的延续性。而其它时间样品则在培养箱中保持最好的状态。



上图为 Brain Cell 长时间培养的 PGC 透射光成像。样品由德国波恩神经退行性疾病中心核心研究实验室 P. Denner 提供。扫描二维码观看视频。



上图为 Axio Observer 7 活细胞工作站 + ZEN Connect 长时程活细胞成像实验流程的示意图。能够全程锁定并自动聚焦到选定的 ROI 区域，以提供超长时程的活细胞观察解决方案，即保障高质量的图像质量，并能同时提供高效的机器利用率。

左图为 ZEN Connect 界面。扫描二维码了解 ZEN Connect 完整工作流程。

钙离子成像

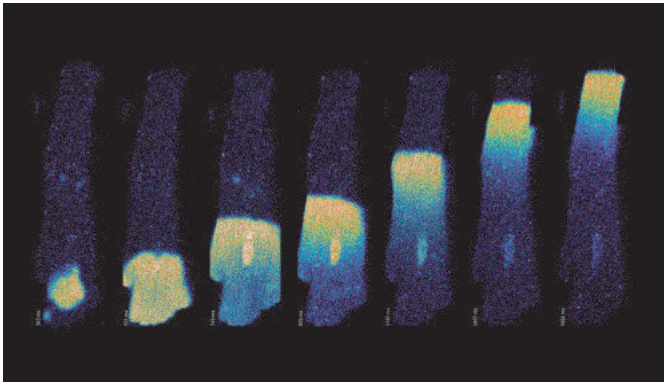
成像需求

- 快速成像
- 超高分辨率成像
- 活体成像

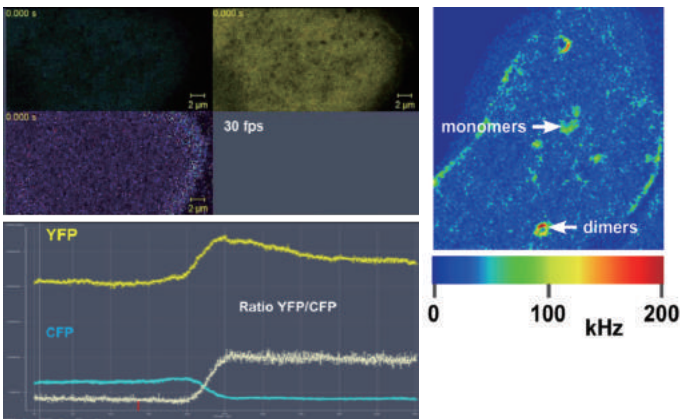
钙离子是细胞内的第二信使，在细胞的生命活动中起着重要作用，参与调节细胞功能，如肌肉收缩、细胞运动、信息传递、物质代谢等。钙离子在细胞中有两种存在状态：结合钙，胞内钙离子大部分为结合钙，主要贮存于肌浆网、内质网和线粒体等细胞器的钙库内；游离钙，在细胞质内的钙离子，浓度相对较低。

蛋白层面研究

许多钙离子通道门控蛋白是以多聚体的形式来发挥具体的生物学功能的，FRET（荧光能量共振转移）或光子计数可以帮助研究者来确定具有生物学功能蛋白多聚体的数量，蔡司共聚焦系统可以通过精准的线性扫描与高灵敏度的检测器，可以使定量分析的结果更加稳定可靠。扫描二维码观看视频。



上图为 Airyscan 2 超高分辨率共聚焦快速模式以每秒 50 幅的速度拍摄的 Fluo-4 染色的心肌细胞钙火花。图像由美国宾夕法尼亚大学 P. Robison, B. Prosser 提供。



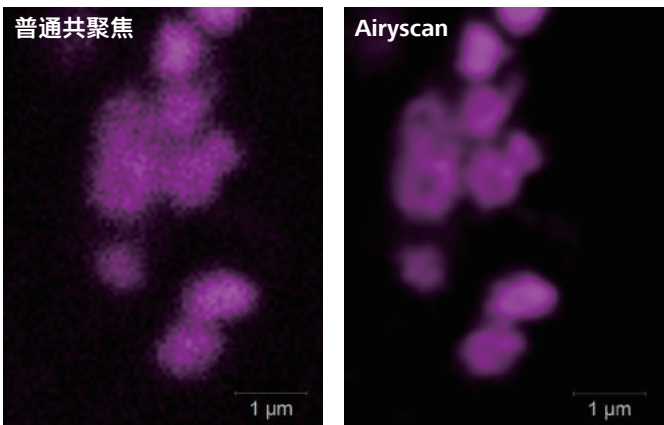
亚细胞层面研究

细胞内钙库——内质网、线粒体、肌质网，在对这些细胞器进行观测时，我们需要足够高的分辨率来保证不会遗漏目标细节，同时还要有足够快的拍摄速度和低光毒性来看到它们恒定条件下的动态变化。

内质网应激

内质网应激是细胞应对外界刺激的一种适应性反应，其主要目的是促进细胞内环境稳态的恢复，但过激的内质网应激可诱导细胞死亡。

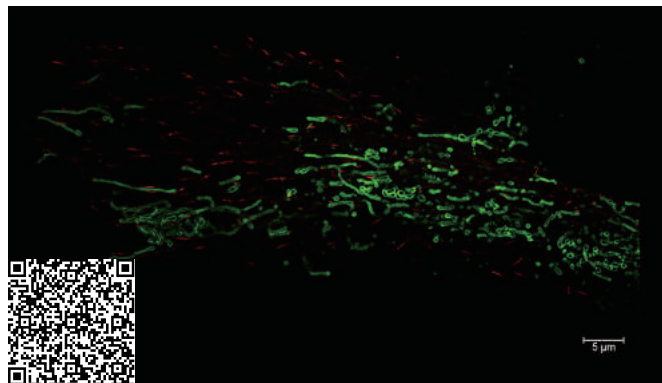
Airyscan 2 是基于共聚焦的超高分辨率成像系统，无需额外制样方法，即可同时提高 2 倍分辨率和 4-8 倍信噪比。



上图是分别使用普通共聚焦 (左) 和 Airyscan 2 (右) 所拍摄的拟南芥细胞高尔基体。图像由牛津布鲁克斯大学生物与医学科学学院 Chris Hawes 教授提供。

线粒体形态变化

线粒体是细胞内最大的钙池之一，可以有效地缓冲细胞内钙离子浓度变化。线粒体在生理状态下会不断分裂融合并维持在平衡状态，这对维持线粒体功能的稳态至关重要。Elyra 7 with Lattice SIM² 采用晶格结构光照明技术，可以减少重复照明，降低光毒性和光漂白，在提供 60 nm 分辨率的同时，速度最快可达 255 fps，以捕获线粒体快速生理动态变化。

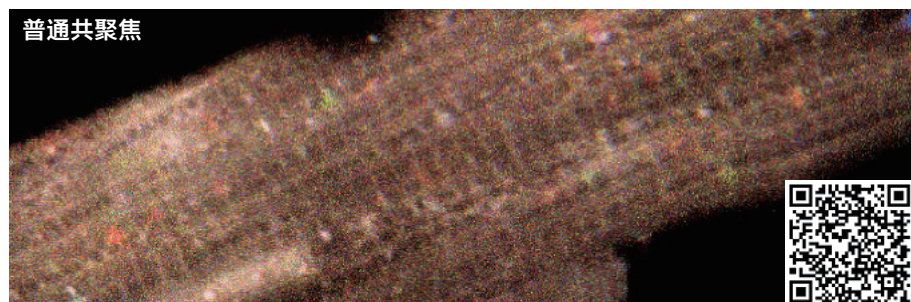


上图是在 U2OS 细胞中的 Tomm20-mEmerald 和 EB3-tdTomato 双通道同步成像。扫描二维码观看完整视频。

肌质网钙火花

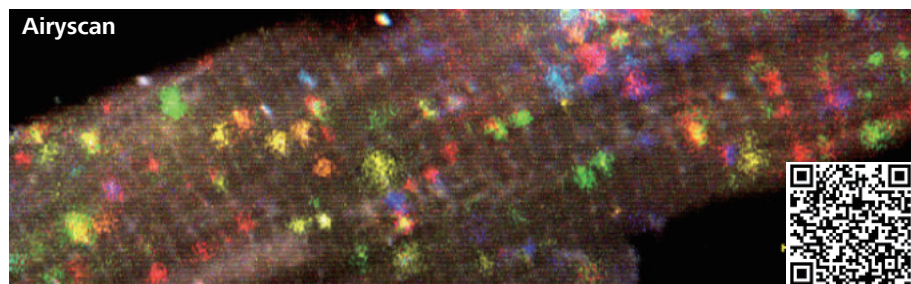
钙火花是指内质网（肌浆网）上单个或多个 RyRs 同时开放所引起的钙释放的基本单位，细胞内钙瞬变的发生是随机的钙火花发生的总和事件，因此钙火花对于总体的钙释放信号有着极其重要的作用。

Airyscan 2 的高信噪比成像，可以让我们用更低的激光功率去拍摄，以保护样品免受光毒性困扰。并且，Airyscan 2 的 Multiplex 模式，能够在达到更高分辨率的同时，实现 47 幅 / 秒 512x512 像素的采集速度，能更轻松地捕获快速、动态变化的信号。



左上图为普通共聚焦所拍摄，拍摄速度为 15 fps，像素驻留时间 pixel dwell 320 ns。

左下图为 Airyscan 2 快速模式所拍摄，拍摄速度为 30 fps，像素驻留时间 pixel dwell 580 ns。不同颜色代表不同的拍摄时间点，蓝色代表的时间点最早，红色代表的时间点最晚。扫描二维码观看完整视频。



钙离子成像

细胞层面研究

钙离子浓度检测

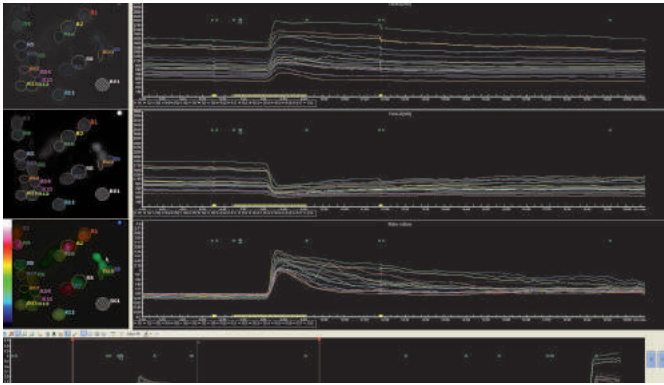
钙离子浓度检测主要是对胞浆内的游离钙进行检测，胞质内游离钙广泛参与、调节多种生理和病理过程。在 Fura-2 等染料用比例法测钙离子浓度时，需要迅速切换 340 nm 和 380 nm 的激发光，来保证最终检测结果有良好的时间分辨率。

Axio Observer 的双层快速滤片转轮可以达到激发光滤片转轮切换速度 70 ms，发射光滤片转轮切换速度 60 ms，可以确保捕获钙离子浓度快速变化。

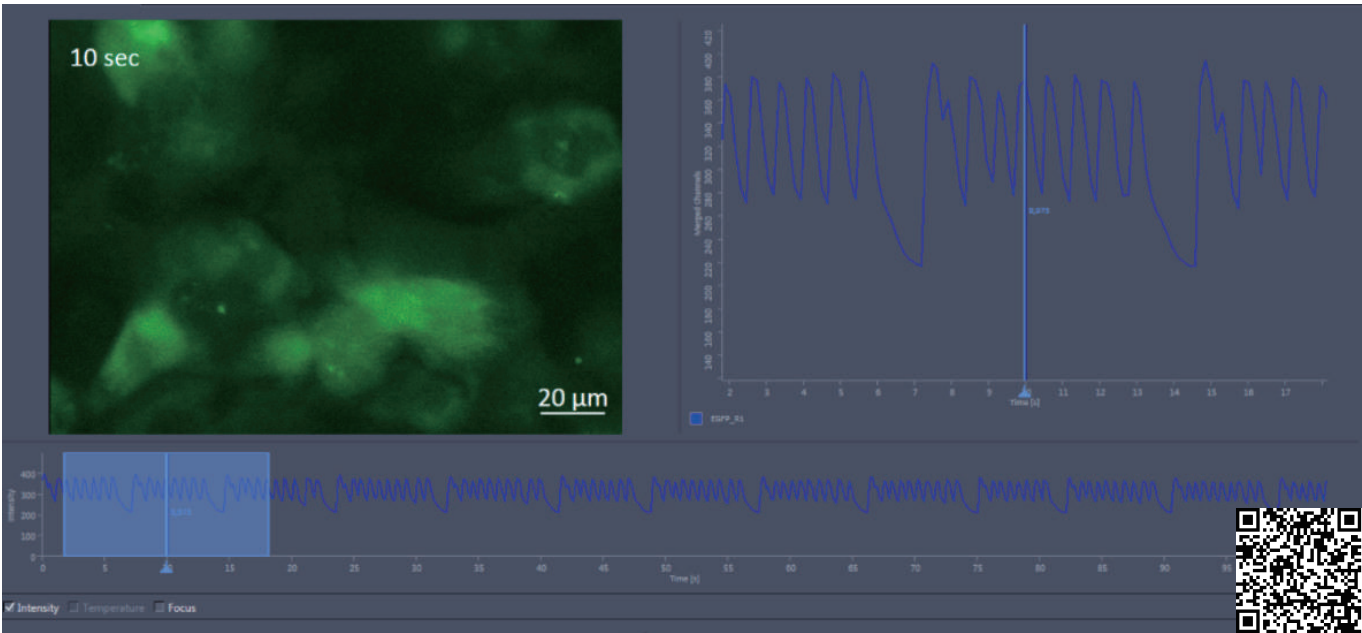
钙振荡

钙振荡是指细胞质内钙离子浓度周期性的增加或减少，并以特定的振幅和频率波动的现象，特定的钙振荡模式可以作用于下游相关效应器而激活不同的细胞生命过程。

在使用 Fluo-4 等染料用非比例法测钙离子浓度时，由于只需要 488 nm 进行激发，在减小光毒性的同时也可以获得更高的时间分辨率图像。AxioCam 702 mono 相机可以达到以 128 fps 的速度采集全分辨率 1920 x 1216 的图像。



上图为用 Fura-2 染色的小鼠 PC 12 神经母细胞瘤细胞，从中可以清楚的看到不同细胞钙离子浓度的变化情况。图像由美国纽约康奈尔 - 威尔大学 Randi Silver 博士实验室的 Roberto Levi 博士提供。



图为用 Fluo-4 染色的心肌细胞钙振荡图像。图像来自德国 Sanofi-Aventis Deutschland GmbH 公司。扫描二维码观看视频。

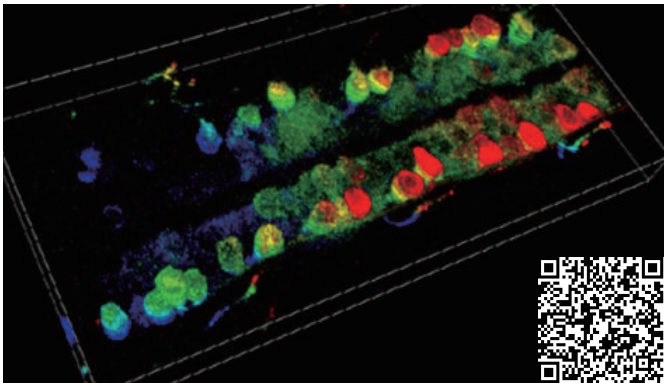
活体层面研究

活体钙离子成像的优势在于既能反映活体内单个细胞的功能活性，又能精确定位单个细胞和周围细胞的联系，是研究活体内神经元、肌细胞功能的理想技术手段。

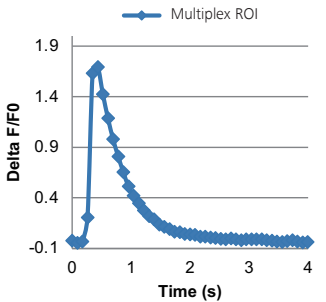
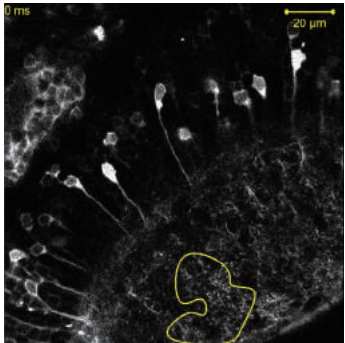
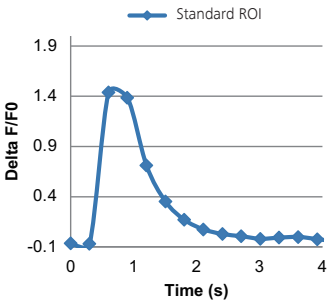
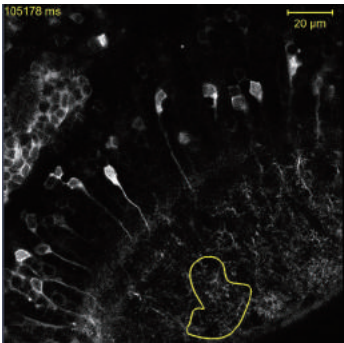
- Lightsheet 7 激光片层扫描显微系统可以在 1024x1024 像素以100 fps 的速度对多个活体样品进行多视角成像。
- LSM 980 NLO 使用的双光子显微技术可以对活体样品深层组织有良好的穿透能力。

借助双光子钙离子成像，我们可以观察到神经活动，以及内生光感受器。在这些早期阶段，由于脊髓呈弯曲状，因此很难在一个光学平面就捕获所有想要的细胞类型。

双光子的深度成像能力，可以帮助我们沿着背部 - 腹部轴线的不同位置观察。右侧视频的最后显示了钙离子信号释放的情形。而使用传统的显微技术是无法在同样速度、同样视野大小等拍摄条件下, 获得同等的图像质量。



上图为三维图像 (9 层 z-stack, 18 μm)，使用 920 nm 激光激发，40x/1.0 W Plan Apochromat 拍摄。样品由伯克利大学 Drew Friedmann 提供。扫描二维码观看视频。



上图使用双光子 Airyscan 2 快速模式观察斑马鱼胚胎中脊髓的钙离子信号变化，主要是研究早期的自发性活动和自有光敏感度。样品由加州大学伯克利分校 Claire Oldfield 提供。

细胞团研究

成像需求

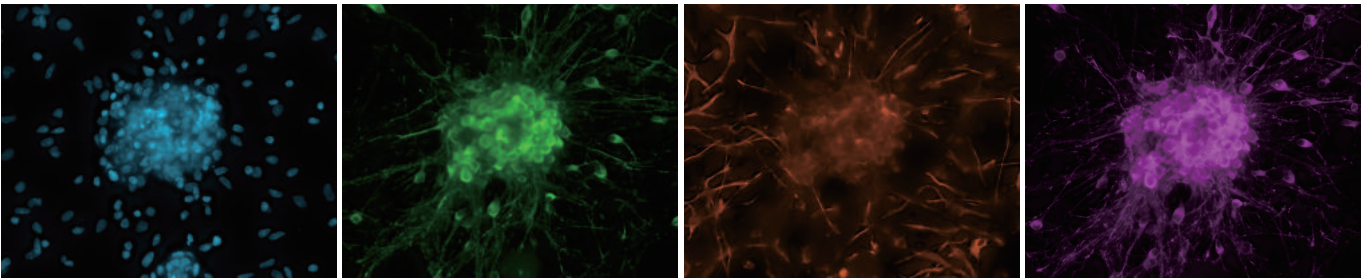
- 高通量
- 无标记样品
- 三维大尺寸
- 精细细节

高通量成像

细胞团研究常常需要观察不同位置的多个样品，并进行长时程的三维多通道成像，成像通量高。要求显微系统的成像速度快，灵敏度高，尽可能减少对样品的光毒性，还要保证长时程多位置下的聚焦稳定。灵活的实验设置则能够提高实验的可操作性，如对多个样品设定不同的 Z 轴成像范围，既可以提高实验效率又能避免不必要的样品漂白。

高通量、全自动 —— Celldiscoverer 7 with LSM 900 全自动活细胞工作站

荧光与透射光成像均使用 LED 光源，配合高灵敏度相机实现快速成像，对样品的光毒性极低。自动聚焦组件 Definite Focus 确保稳定聚焦。实验设计器模块可以灵活地设置多维实验。高度自动化的操作流程不仅大大节省人力提高效率，更提高了实验结果的可重复性。Celldiscoverer 7 配置 LSM 900 的全封闭式稳定自动化平台，可轻松记录从 2D 细胞生长到分化成 3D 细胞团的全过程，解决高分辨、长时程、大尺度活体样本的多维复杂实验。



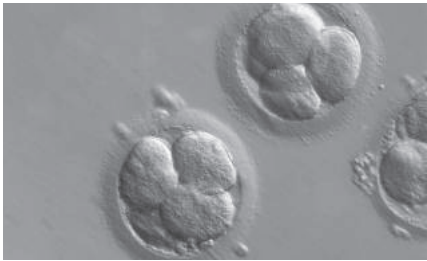
原代培养大鼠皮质神经细胞团，上图为单通道图像。样品由德国 LSM Bioanalytik 公司的 H.Braun 提供。

无标记样品成像

有时细胞团样品并没有标记荧光，同样需要进行观察记录，常用的观察方式如相差和微分干涉差 (DIC) 成像虽然能够为这类样品提供较高的对比度和立体感，却不能用于普通的塑料底培养皿和多孔板。

开放、灵活、多功能 —— Cell Observer 活细胞成像系统

开放灵活的活细胞成像平台，可以配置多种观察方式。蔡司独有的 PlasDIC 成像，为塑料底培养皿中的细胞提供清晰的浮雕效果。



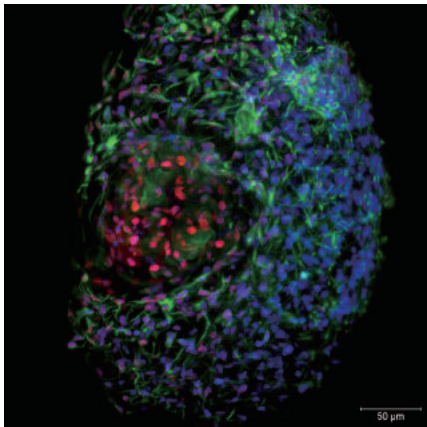
上图为 4 细胞时期的人胚胎 PlasDIC 图像。数据由德国哥廷根体外受精实验室的 S. Mittmann 提供。

三维大尺寸成像

较大尺寸的细胞团如类器官 (organoid)，常用于研究细胞间相互作用，这类样品成像的挑战主要在于要同时提供足够的成像深度和速度，还要在成像期间减少光漂白，这是传统的荧光显微镜和激光共聚焦难以做到的。

毫米级大样品观察 —— Lightsheet 7 激光片层扫描显微镜

使用片层光照明避免非焦平面激发，对样品光毒性低，同时实现天然的光切成像。全新样品仓和物镜适应折射率 1.33 到 1.58 的样品，无需更换样品仓和物镜。多角度成像进一步提升成像深度，提供更丰富的样品信息。高灵敏度相机快速成像，配合连续 z 轴移动，轻松实现三维大尺寸成像。



肝细胞团，z 轴序列最大强度投影图片。细胞核染色 HFN4a 或 HFN3b，细胞骨架染色 CK18。使用 Lightsheet 7 及 Plan-Apochromat 20x/1.0 物镜拍摄。图片由新加坡基因组研究所的 TMG Weiquan John 和 Ng Huck Hui 提供。

精细细节捕捉

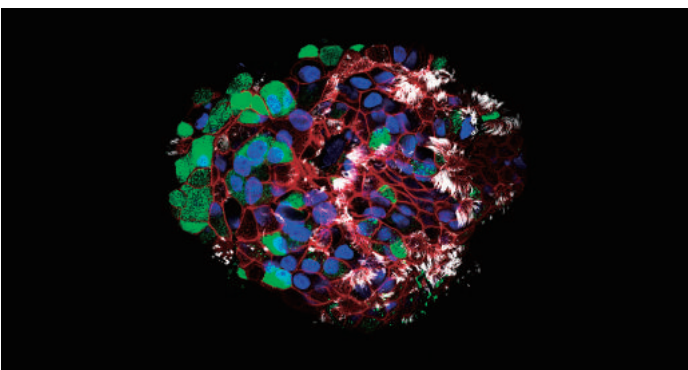
在细胞团研究中，同样需要探究细胞内部成分的调控与作用机理，进行亚细胞水平的观察，如细胞骨架的动态变化，这时就需要捕捉精细结构的细节信息。

样品细节观察 —— 基于共聚焦的 Airyscan 2 超高分辨率系统

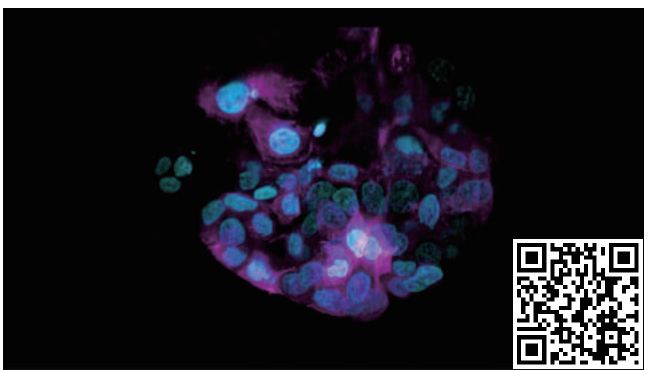
基于共聚焦的超高分辨率检测系统，在三维方向上同时提高 2 倍分辨率，达到侧向 120 nm，轴向 350 nm。同时提供高于常规共聚焦 4-8 倍的检测灵敏度，为弱荧光样品和细胞团内部信号提供优异图像质量。单光子和双光子激发均可使用。

实时 3D 细胞模型发育 —— Lattice Lightsheet 7 晶格层光显微镜

球状体和类器官是器官的体外模型——体积更小更简单，易于生产，因此对于发育生物学家来说是研究器官发育的宝贵工具。与通常仅由单层细胞组成的细胞培养不同，细胞团 / 类器官中的细胞形成三维结构，从而可以研究 3D 细胞模型内部的细胞迁移和分化。借助晶格层光显微镜，能够对类器官的发展和自组织进行成像。



上图为人类远端肺类器官，显示肺泡外分泌细胞和纤毛细胞，样品来自 Prof. C. Kuo, Department of Medicine, Hematology Division, Stanford University, USA.



上图为 3D 渲染的球状体，该球状体由表达 H2B-mCherry (品红色) 和 α -Tubulin-mEGFP (青色) 的细胞组成，不是每个细胞都有荧光标签。扫描二维码观看视频。

细胞周期研究

成像需求

- 长时间活细胞成像
- 超高分辨率成像
- 自动化数据分析

细胞从一次有丝分裂完成开始，到下一次有丝分裂完成结束，称为一个细胞周期。在这个过程中，细胞将其遗传物质进行复制，并均等的传递到它的子细胞中，完成细胞的增殖。细胞的分裂，需要染色体、细胞骨架、细胞器等组分的参与，并受到激素、cAMP、cGMP、抑素等多种因素的调节。研究细胞周期，对于理解发育缺陷以及癌症等疾病具有重要意义。

细胞层面研究

研究增殖的速度，追踪细胞谱系，绘制细胞增殖曲线。这需要通过长时间的细胞培养，实时获取大量图像，并对这些图像进行图像分割和数据分析。

便捷、高通量、长时间 —— Celldiscoverer 7 全自动活细胞成像平台

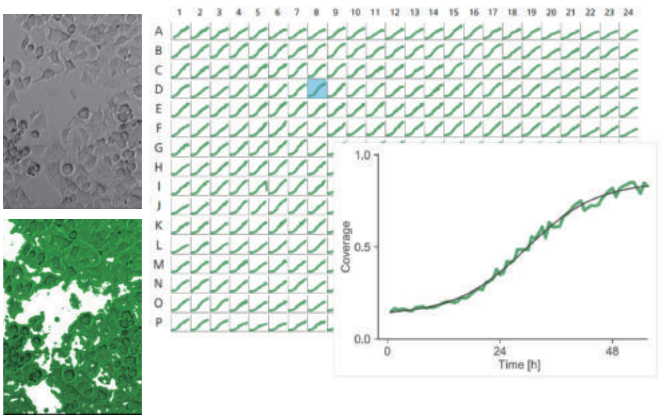
Celldiscoverer 7 是活细胞全自动化成像平台，可以高通量的实现长时间活细胞成像。通过明场 PGC 成像拍摄的细胞增殖数据，可以通过基于机器学习的图像识别和自动图像分割，自动计算细胞增殖速度，得到增殖曲线。

- 箱体式设计保证稳定的长时间活细胞成像
- 明场 PGC 成像兼容塑料底培养皿
- 自动识别样品容器

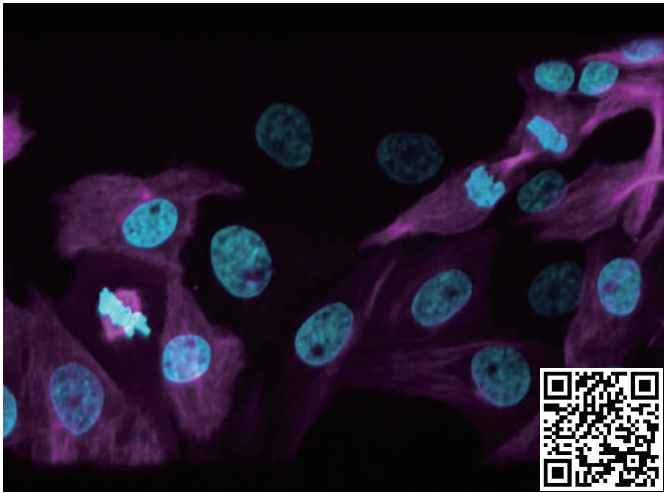
无损、高清、实时多维度成像 —— Lattice Lightsheet 7 晶格层光显微成像系统

在细胞周期的研究中，需要长时间记录细胞的分裂和增殖，以及分裂增殖过程中染色体的动态变化。染色体分离的过程相对于漫长的细胞分裂间期只是短暂的瞬间，如果想要捕捉染色体分裂过程的 3D 动态变化，传统的成像过程中会遇到：1) 3D 成像速度跟不上细胞动态变化；2) 荧光被漂白；3) 长时间成像引发的光毒性等挑战。快速低光毒性的 Lattice Lightsheet 7 可以解决这个痛点。

- 无损：低光漂白、低光毒性，保障快速、长时程成像
- 高清：更薄、更长光片，290 x 290 x 450 nm 分辨率
- 实时多维度：可实时解析 3D 动态过程，速度最快可达 3 Volume/秒 @300 x 50 x 20 μm^3 的快速大尺寸多维度成像



上图为 Celldiscoverer 7 拍摄 384 孔板中细胞增殖的过程，采用明场 PGC 成像，每 45 分钟拍摄一个时间点，总共拍摄 48h，总数据量超过 500GB。利用自动的图像分割，可以绘制每一个孔的细胞增殖曲线。通过加药处理组和对照组的对比，可以研究药物处理对细胞增殖速率的影响。图片来自于白皮书 Label-free Assays and Machine Learning Image Analysis.



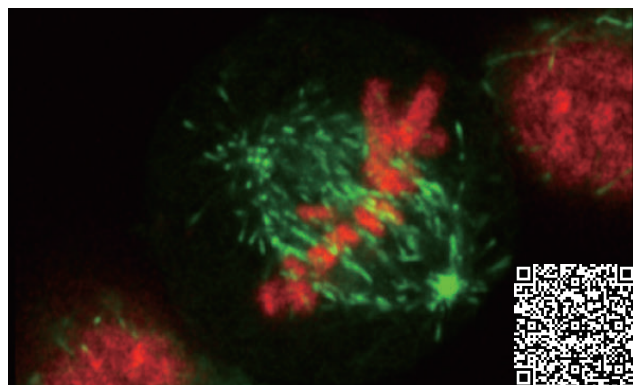
上图为 LLC-PK1 细胞有丝分裂过程；细胞表达 H2B-mCherry (品红色) 和 α -Tubulin-mEGFP (青色)，持续记录 25 小时。Lattice Lightsheet 7 拍摄。扫描二维码观看视频。

亚细胞层面研究 —— 细胞增殖与衰亡研究

研究各个细胞组分在细胞分裂的过程中的动态变化，如染色体的聚集，纺锤丝的牵引，细胞膜的缢裂，这些需要高分辨率的成像设备来实现。

纺锤体的动态变化 —— 共聚焦成像，优异的图像质量

细胞分裂的过程需要染色质、微管等多种细胞结构的共同参与，要研究这些细胞结构的动态变化，需要借助共聚焦显微镜去除非焦平面的信号，甚至借助 Airyscan 2 技术，获得超高分辨率的显微图像。



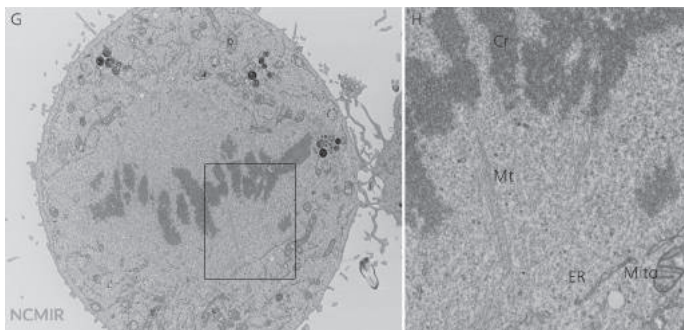
上图为 Airyscan 2 所拍摄 HeLa Kyoto 细胞的有丝分裂过程。绿色为 eGFP 标记微管结合蛋白 3 (EB3)，红色为 mCherry 标记 H2B。图片由 EMBL 的 Jan Ellenberg 提供。扫描二维码观看视频。

- 共聚焦显微镜通过针孔去除非焦平面信号，获得高信噪比图像。操作便捷，通用性强，可用于多维实验，如时间序列、三维重构、大面积拼图等，适用于组织形态及定量分析。
- Airyscan 2 基于共聚焦成像的超高分辨率系统，操作便捷、通用性强，分辨率在各个方向上同时提高 2 倍，适用于观察树突棘等微小结构。图像信噪比提高 4-8 倍，提供更优异的图像质量，尤其是弱荧光信号样品。
- Multiplex 模式：保证高分辨率、高信噪比的前提下，扫描速度提升 4-8 倍，最快可达 47 幅/秒，适用于观察活细胞和大组织样品。

纳米尺度亚细胞结构观察 —— 三维扫描电镜方案，大视野、高分辨

如果需要分辨纺锤丝和染色质的精细结构，可以采用场扫描电镜搭配 3View® 对样品进行快速的三维成像。凭借 3View®，您可以使用一个在扫描电镜 (SEM) 的样品仓里的超薄切片机对树脂包埋的细胞和组织样品进行切削，然后成像，并不断重复。

蔡司 Gemini 镜筒技术会带给你优异的图像，它可以在进行大视野成像的同时又保持纳米级别的分辨率。对于数百微米尺度样品的三维重构，切面成像一气呵成，大幅减少因图像区域重叠和拼接花费的时间。



上图为 GeminiSEM + 3View 对有丝分裂中的 HeLa 细胞进行成像。HeLa 细胞的 DNA 进行染色，并用 Durcupan 进行包埋。左图为某一层截面图像，右图为左图的放大，图中可清晰地看到染色体 (Cr)，微管 (Mt)，线粒体 (Mito) 和内质网 (ER)。图像以 2.5 keV 拍摄，扫描速度每个像素点 1 μ s，标尺：2 μ m。图像由 NCMIR 拍摄。

免疫细胞研究

成像需求

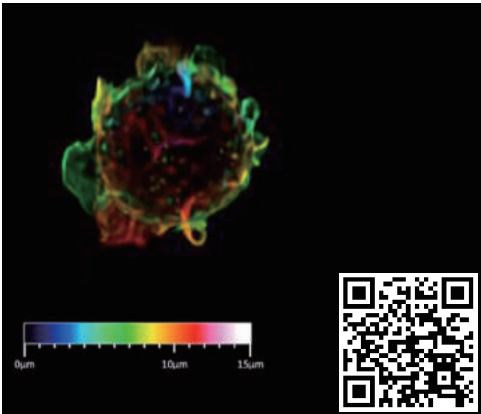
- 高通量筛选
- 纳米尺度成像

细胞层面研究

免疫细胞是免疫系统的基本成分之一，在生物体内分布广泛，参与特异性和非特异性免疫应答。其中，T 细胞高度运动，能在血液、组织和淋巴系统中穿梭。为了实现如此高水平的流动性，T 细胞有着高度动态、可塑性强的细胞骨架。低光毒性、高分辨率的快速活细胞成像是了解 T 细胞功能的关键。

无损、高清、实时多维度成像 —— Lattice Lightsheet 7

T 细胞骨架高度运动，高度可塑，正常生理状态下肌动蛋白会不断产生褶皱，过强的光照会导致褶皱不再形成。Lattice Lightsheet 7 超高的光效率和低光毒性保证了在成像过程中对 T 细胞的干扰几乎为零；近各向一致的空间分辨率完美还原了 T 细胞球型结构；快速成像让您不错过细胞的每一丝动态变化。



图为 Lattice Lightsheet 7 拍摄的表达 Lifeact-GFP 的 T 细胞。色彩编码成像深度投影。成像时长超过 1 小时，每 2.5 秒/体积。快速温和的高分辨率成像展现了 T 细胞骨架运动的所有细节。样品由牛津大学 M.Fritzsche 提供。扫描二维码观看视频。

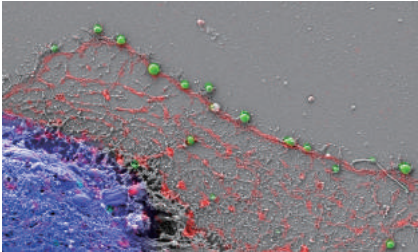
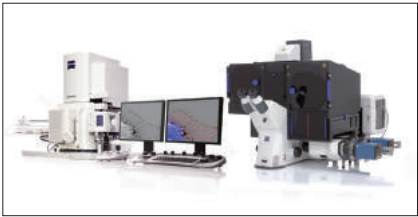
亚细胞层面研究

巨噬细胞能够吞噬和杀灭胞内寄生虫、细菌、肿瘤细胞、以及自身衰老和异常的细胞，在机体的免疫防御、免疫自稳和免疫监视中发挥重要作用。

提供更多细节信息 —— 超高分 辨率光镜与扫描电镜联用

光电联用系统可以将光镜采集的特定亚细胞结构荧光信号与电镜获取的超微结构精准结合。

右图为超高分辨率结构光照明 SIM 技术拍摄的荧光染料标记的细胞组份（红色：肌动蛋白丝，绿色：内体，蓝色：细胞核）和扫描电子显微镜（SEM）下对样品表面形貌成像的叠加图像。SIM 与 SEM 两者的结合能够为亚细胞结构的分析提供精确的信息。样品由特拉华生物技术研究所的 Kirk J. Czymmek 和 Jeffrey L. Caplan 提供。

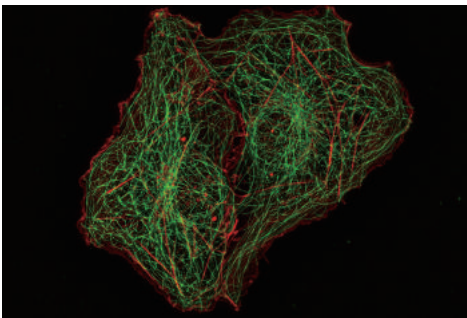


亚细胞结构

成像需求

- 细胞骨架的运动和装配
- 骨架单体蛋白
- 线粒体的运动和线粒体膜研究
- 内质网和高尔基体
- 核孔复合体的结构

细胞骨架不仅在维持细胞形态，承受外力、保持细胞内部结构的有序性方面起重要作用，而且还参与许多重要的生命活动，如：在细胞分裂中细胞骨架牵引染色体分离，在细胞物质运输中，各类小泡和细胞器可沿着细胞骨架定向转运；在肌肉细胞中，细胞骨架和它的结合蛋白组成动力系统；在白细胞（白血球）的迁移、精子的游动、神经细胞轴突和树突的伸展等方面都与细胞骨架有关。另外，在植物细胞中细胞骨架指导细胞壁的合成。



COS-7 细胞，Alexa 488（绿色）标记微管，Alexa 568（红色）标记肌动蛋白，Elyra 7 的 Apotome 模式双色同时采集，66 层 z-stack 最大强度投影。

细胞骨架

细胞骨架形态学变化

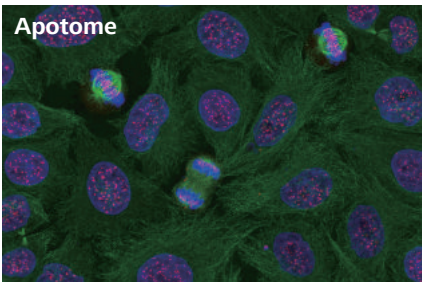
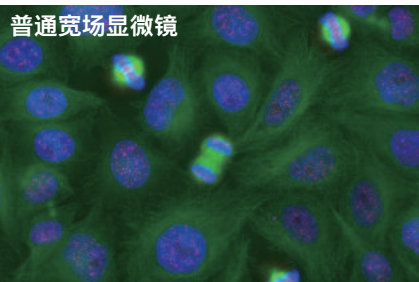
细胞在病理情况下常常会出现细胞骨架系统异常，因此研究细胞骨架的形态结构具有一定意义。细胞骨架染色在普通宽场显微镜下就可以观察到，但会因为非焦面信号的干扰而影响图像的成像质量。因此利用 Apotome 3 能够很好的解决这个问题。

Apotome 3 使用结构照明实现光学切片显微成像

- 去除普通荧光显微镜非焦面信号干扰，提供光切成像效果
- 自由选择光源和染料
- 提高轴向分辨率
- 可以在蔡司宽场荧光显微镜上轻松升级



右图分别是使用普通宽场显微镜（左）和 Apotome（右）所拍摄的 HeLa Kyoto 细胞。蓝色标记 DNA (Hoechst 33342)，绿色标记 Tubulin (Alexa 488)，红色标记 ACA (Alexa 568)。



亚细胞结构

细胞骨架的运动

细胞骨架除了赋予细胞形状和机械抗变能力，来稳定整个细胞形态外，细胞骨架也会收缩，从而使细胞和细胞的环境变形并使细胞迁移，而且细胞骨架也参与细胞分裂，物质运输等过程。

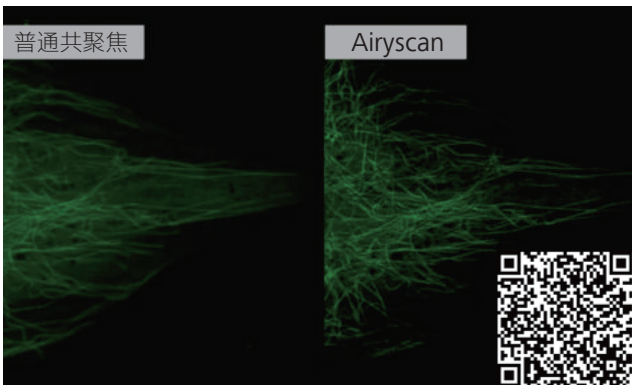
细胞骨架的运动装配

细胞骨架蛋白是由更小的单体蛋白装配而成，装配过程的变化会影响到细胞骨架的稳定和相应生物学作用的发生。此时我们可以使用 Elyra 7 with Lattice SIM² 成像，Lattice SIM² 具有高光效率，提高了快速超高分辨率采集的效率，将对样品的影响降到最低。

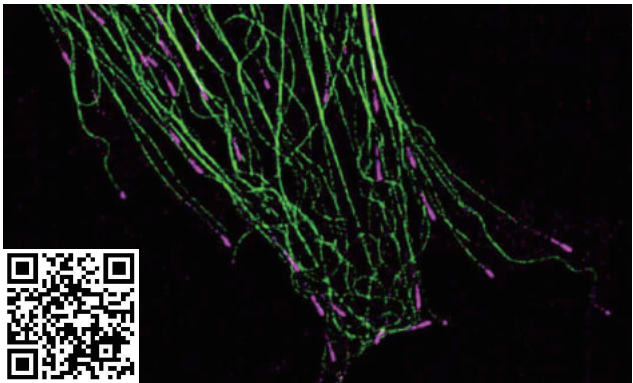
Lattice SIM² 可进行光学切片，获得 60 nm 分辨率，而且，双通道成像速度可以达到 255 幅/秒，在分辨率提高的同时，时间分辨率也极大的获得提升。

骨架单体蛋白

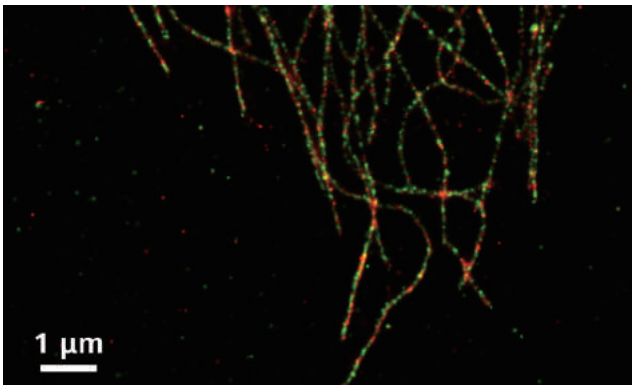
作为细胞骨架的重要组成部分的微管，其由 α 和 β 肌球蛋白构成，并形成中空的结构，构成微管的主要结构，两种蛋白在功能上既有共同点也有区别，所以为了研究两种组成蛋白在微管的构成和结构稳定的作用。Elyra 7 SMLM 单分子荧光定位成像能够观察到标记的两种不同的微管蛋白组成单体。而且利用 SMLM 能够适合拍摄 PALM，dSTORM，DNA-PAINT 等荧光样品，并可达 20 nm 分辨率，适合于对微管蛋白的组装和聚合解聚的研究分析。



上图为标记了细胞骨架微管蛋白的活细胞成像对比共聚焦和 Airyscan 2 活体成像效果。样本由佛罗里达州立大学 Michael W. Davidson 提供。扫描二维码观看视频。



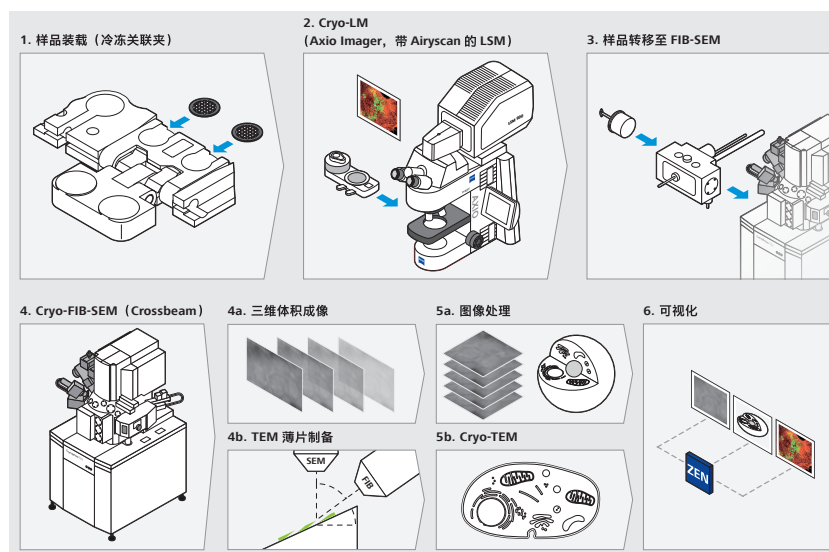
微管的动态运动，样品为表达 EMTB-3xGFP (绿色) 和 EB3-tdTomato (洋红色) 的 Cos-7 细胞。Elyra 7 with Lattice SIM² 成像。



上图是 α 微管蛋白 (红色) 和 β 微管蛋白 (绿色) 使用 Elyra 7 单分子定位显微技术，双通道同步成像。样品由美国佛罗里达州立大学 Michael W. Davidson 提供。

细胞骨架的运动装配

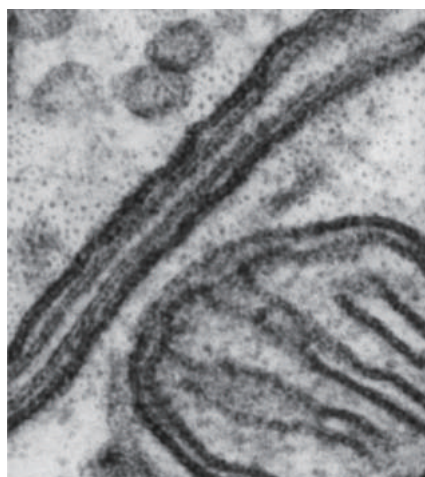
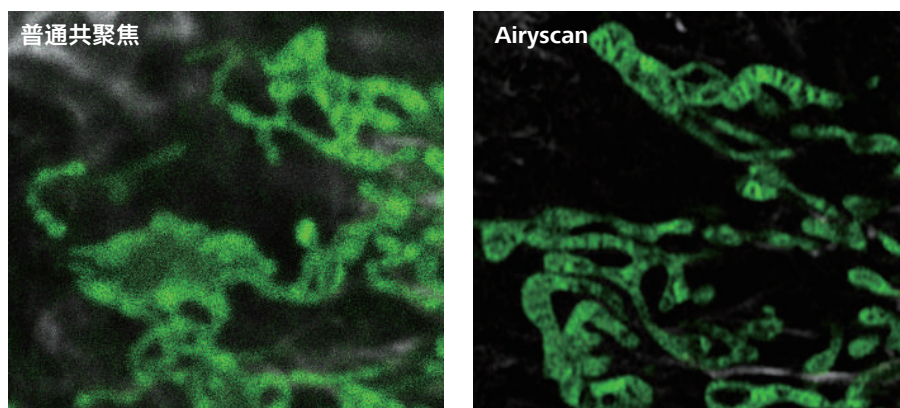
纺锤体极体难以在酵母细胞内定位，它们是微小且罕见的细胞结构。蔡司冷冻关联工作流程可以在接近自然的状态下精准识别此类结构并进行成像。配有 Airyscan 探测器的冷冻 LSM 可以更容易地识别这些结构，从而提供更多细节的成像。ZEN Connect 将图像进行关联，提供在冷冻 FIB-SEM 中重新定位这些细胞结构所需的所有数据。FIB-SEM 的优异成像质量可通过冷冻体积成像来定位和分析超微结构。根据 FIB 的切割方向，可以在高衬度图像中清楚观察到各个微管的方向，同时可以在三维体积中识别其他细胞腔室。右图为蔡司冷冻关联工作流程。



线粒体

线粒体的形态、大小、数目和分布在不同形态和类型的细胞中可塑性较大。因细胞数量和类型的不同而存在差异。而且线粒体再体内还会发生频繁的分裂与融合，这被认为是线粒体形态调控的基本方式。

对于活体细胞的观察我们仍然推荐使用 Airyscan 2 来成像，特别是在 Airyscan 2 Multiplex 模式下，分辨率几乎维持不变的情况下，速度获得 8 倍的提高。而使用 Elyra 7 with Lattice SIM² 不仅分辨率可以提升到 60 nm，同时速度可达到 255 幅/秒。右侧图片样品由日本东京大学的 Kohki Okabe 提供。



线粒体外膜不仅参与膜中磷脂的合成——因为它还包含参与诸如脂肪酸链延伸、肾上腺素氧化以及色氨酸生物降解等生化反应的酶类，线粒体外膜也能同时对那些将在线粒体基质中进行彻底氧化的物质先行初步分解。有研究发现，线粒体外膜中的分选和组装机件 (sorting and assembly machinery，缩写为“SAM”) 在外膜蛋白质的整合与组装中扮演了不可或缺的角色。

样品为小鼠脑，网格上的超薄切片，线粒体的双膜分解为脂质双层结构。使用蔡司扫描电镜的环形 STEM(aSTEM) 模式拍摄。STEM 图像在 SEM 中实现了最高分辨率 - 甚至脂质双层也可以得到解决。

线粒体内的钙离子对线粒体的 ATP 合成，和膜通透性等具有重要意义。线粒体的钙离子转运平衡和除合成 ATP 和诱导细胞凋亡意外的又一重要功能。具体内容请参考“钙离子成像”(第 12 页)。

亚细胞结构

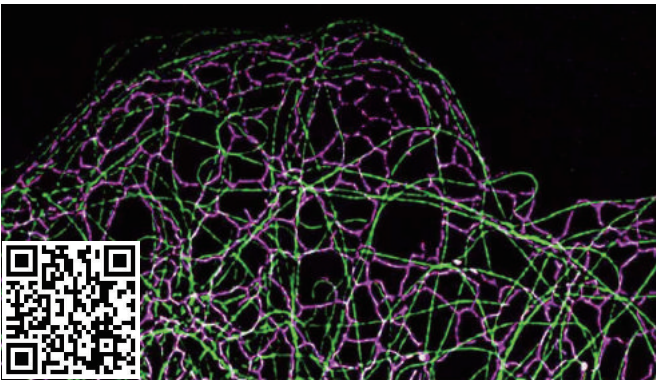
内质网和高尔基体

内质网

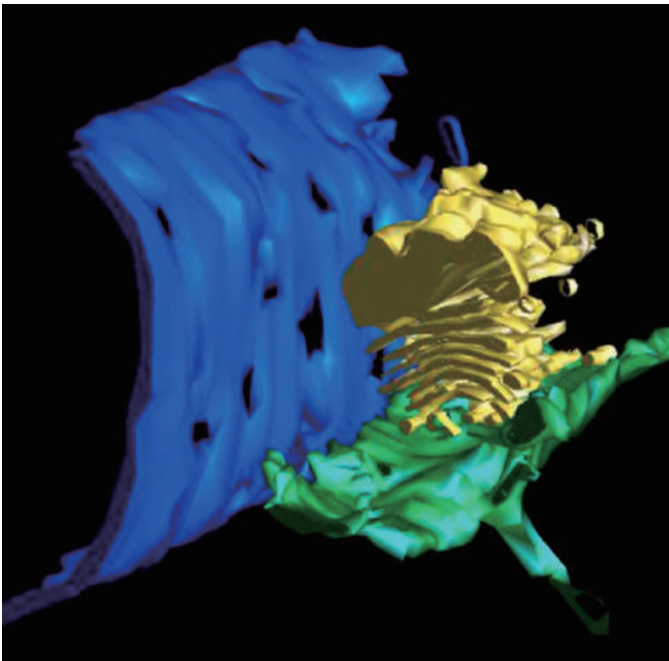
内质网分粗面内质网 (rER) 和光面内质网 (sER)，前者负责蛋白质合成，后者负责脂类的合成。为了合成蛋白质因此在粗面内质网上有很多核糖体附着，因此粗面内质网看起来有很多颗粒附着，这也是“粗面”的由来。

内质网内通过核糖体合成的蛋白质片段为多肽，这些蛋白质片段需要折叠后才能成为有功能的蛋白质分子，如果发生折叠错误，就会引起疾病，例如神经退行性疾病，阿尔茨海默，血管类疾病等。在人类动脉粥样硬化病变巨噬细胞中颗粒内质网 (ER) 不仅空腔发生增大，而且附着其上的核糖体也减少了。此外光面内质网还具有调节钙离子的能力。具体内容请参考“钙离子成像” (第 12 页)

当内质网内生理功能发生紊乱，钙稳态失衡，蛋白质折叠错误等，会引发内质网应激 (ERS)。这是一种自我保护机制，内质网应激可以调动应激反应蛋白减轻应急因素对细胞的损伤。因此研究内质网应激蛋白的功能表达也是内质网研究的另一个重要方向。



上图 为内质网和微管高度动态相互作用，Cos-7 中内质网 (Calreticulin-tdTomato, 品红色) 和微管 (EMTB-3xGFP, 绿色) 的双色同时成像。采用 Elyra 7 with Lattice SIM² 成像。



上图样品为藻类的高尔基体 (黄色) 与细胞核 (蓝色) 和内质网 (绿色) 的 3D 重建 (IMOD)。

高尔基体

高尔基体在细胞中脂质的运输以及在溶酶体、植物细胞壁形成的过程中也起重要作用。

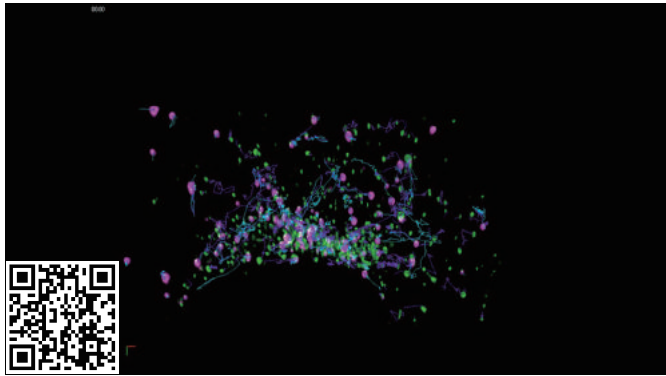
高尔基体被看作是细胞的中转站。进出细胞的脂类、蛋白质等在这里被检查和处理：来自内质网的囊泡与高尔基体顺面融合并将其内容物倾入高尔基体腔。在运向高尔基体反面的过程中这些蛋白质被修饰，这些加工包括糖基化或磷酸化。各类蛋白质会被就其目的地而被标上不同的分子。被处理后的蛋白质到达高尔基体的反面后就再被装在运输小泡里运到它们最终目的地。因此对高尔基体的研究首先是高尔基体的动力学研究。

无论内质网或高尔基体的完整膜结构是其发挥其生物学作用的重要结构基础，因此在损伤的细胞和病变组织中的内质网和高尔基体的结构都会发生不同程度的变化。为了观察细微的形态学变化，可以利用电子显微镜的超高分辨率来对其进行成像。

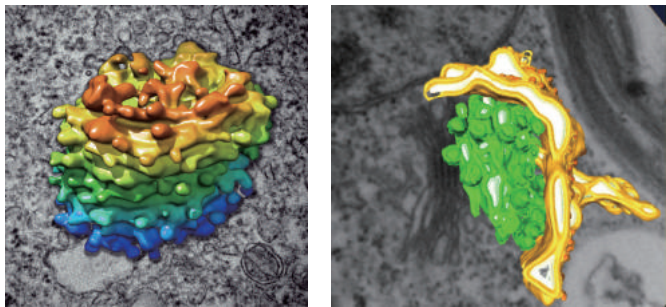
核孔复合物

核孔复合物是跨越核膜的大蛋白复合物。功能上，核孔复合体可以看做是一种特殊的跨膜运输蛋白复合体，并且是一个双功能、双向性的亲水性核质交换通道。

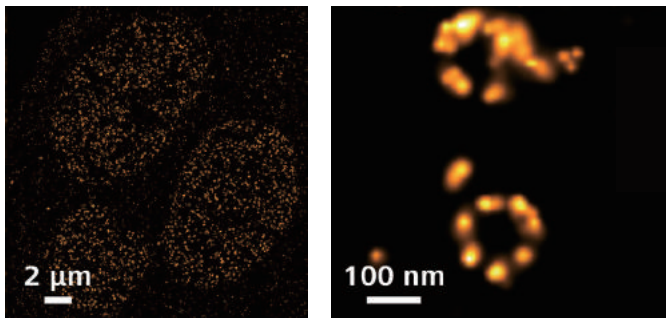
不同生物的核膜孔具有相同结构，并以核孔复合体的形式存在。它的内外口径约为 70-80 nm，通道的直径约为 9 nm。核膜孔内外口的周边均有对称排列的 8 个球状颗粒，其直径约 15 nm；中央尚有一个中心颗粒，直径约 30 nm。中心颗粒与球状颗粒之间有细丝相连。这些细丝具有核糖核蛋白的性质。核膜孔通道中还有一些无定形物质。核膜孔的数目、分布和密度与细胞代谢活性有关，核质与细胞质之间物质交换旺盛的部位核膜孔数目多。可见，核膜孔在调节核与细胞质的物质交换中有一定的作用。



用 mEmerald- Rab5a 和 Golgi 7-tdTomato 瞬时转染的 COS-7 细胞。Golgi 7 是与高尔基体和高尔基体囊泡有关的蛋白质。Rab5a 是早期的内体标记。以近各向同性分辨率在 3D 中进行跟踪囊泡。Lattice Lightsheet 7 拍摄。扫描二维码观看视频。

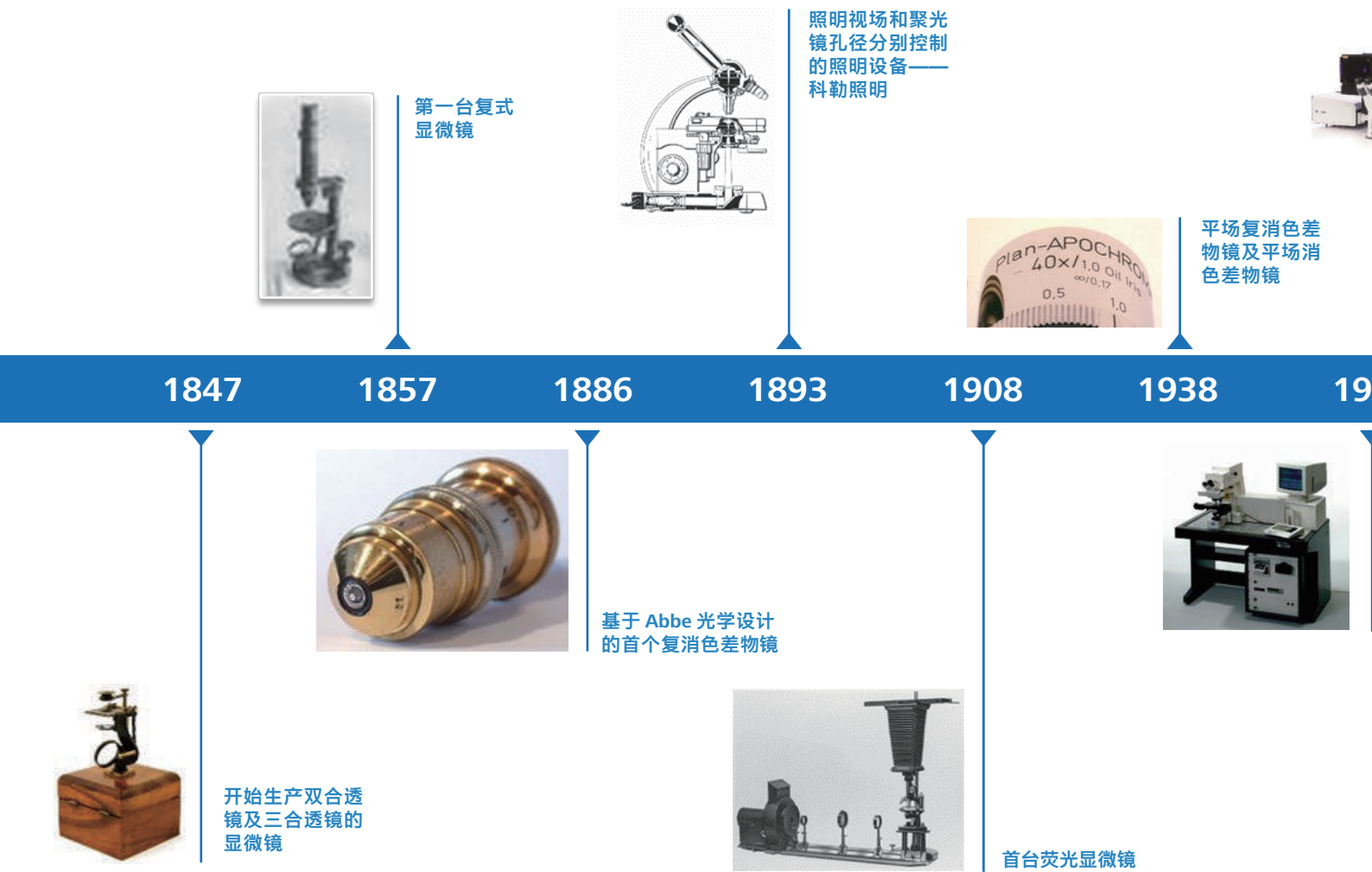


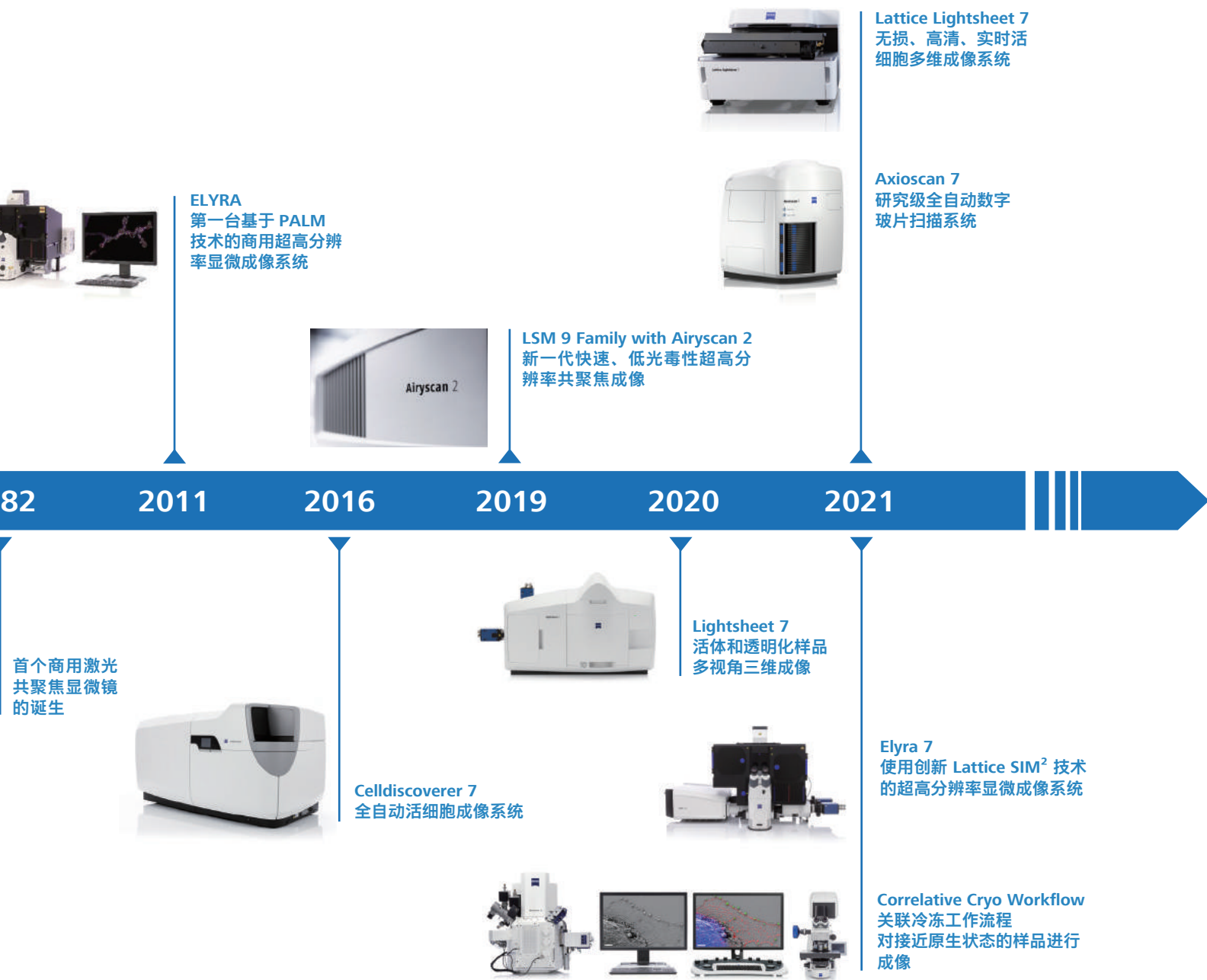
通过 FIB-SEM 对细胞器成像,可以观察到高尔基体的三维重建结构。(左图：蓝色/绿色为顺式高尔基，黄色/橙色为反式高尔基；右图黄色为内质网，绿色为高尔基体)。



单分子荧光定位（SMLM）超高分辨率技术拍摄的核孔复合物，左图为 SMLM 超高分辨率获得的图像。右图为区域放大后可见排列成环状的核孔符合蛋白 Gp210。

自1846年起，蔡司与您一路相伴





近年，蔡司在生命科学与医学研究领域：

- 2013 年，Lightsheet 技术获 R&D 100 设计大奖
- 2014 年，ELYRA P.1 with 3D-PALM 获 R&D 100 设计大奖
- 2015 年，Airyscan 被评为 R&D 最具市场影响力的创新产品
- 2015 年，MultiSEM 获得显微技术创新奖 (Microscopy Today Innovation Award)
- 2014, 2015 & 2016 年，LSM 880 with Airyscan 连续三年获美国神经科学学会年会“大众选择奖” (“#MyNeuroVote people's choice award ”)
- 2018 年，Crossbeam 550 荣获德国设计大奖
- 2019 年，Elyra 7 with Lattice SIM 摘得“分析 / 测试”类 R&D 100 大奖桂冠

我们将继续与您一起不断开拓进取、引领创新！



Carl Zeiss Microscopy GmbH
07745 Jena, Germany
microscopy@zeiss.com
www.zeiss.com

卡尔蔡司（上海）管理有限公司
200131 上海，中国
E-mail: info.microscopy.cn@zeiss.com
全国免费服务热线: 400 680 0720

上海办: (021) 2082 1188
北京办: (010) 8517 4188
广州办: (020) 3719 7558
成都办: (028) 6272 6777



Seeing beyond