

激光扫描共聚焦显微镜对一串红花粉粒的三维重建

丁 亮 沈明山 邵寒娟 陈睦传*

(厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 厦门 361005)

摘 要 应用激光扫描共聚焦显微镜对一串红花粉粒进行连续“光学切片”扫描,利用 Laser-Sharp 图像处理软件重建其三维立体空间结构。结果显示,重建的图像为高分辨率的三维原色图像,并可沿 X、Y、Z 轴旋转或任意角度显示。叙述了激光扫描共聚焦显微镜成像原理、特点以及在植物孢粉学研究中的应用前景。

关键词 LSCM 一串红 花粉粒 三维重建

植物孢粉学研究通过传统的生物显微镜观察,基本上是在二维形态上进行,但实际的植物花粉粒是三维立体结构,为了更精确地定位、定量描述花粉粒组织结构,进一步研究其发生、发育及生理生化变化,应用近年来发展起来的激光扫描共聚焦显微镜,对花粉粒进行连续切片,利用计算机图像处理软件,重建其原始的三维结构,这对于孢粉学研究的深入有重要的价值。

八十年代发展起来的激光扫描共聚焦显微镜(Laser Scanning Confocal Microscope, LSCM)是在荧光显微镜成像的基础上加上激光扫描装置,使用紫外或可见光激发荧光探针,利用计算机进行图像处理,从而得到组织或细胞内部的荧光图像。LSCM 正逐步广泛应用于生物学领域的显微结构研究^[1-4],成为新一代形态学研究的工具。

1 材料与方法

1.1 **材料** 一串红(*Salvia splendens* Ker-Gawl) 属唇形科(Labiatae) 鼠尾草属(*Salvia* L.) 采自厦门大学植物园。

1.2 方法

1.2.1 **样品制备** 采集即将开放的新鲜花朵,剥取花药少许,将花粉粒固定于载玻片上,置于 LSCM 载物台上观察。

1.2.2 激光扫描共聚焦显微镜观察

激光扫描共聚焦显微镜型号为 Bio-Rad MRC-1024ES,装有 Nikon TE-300 倒置显微镜。先进行预扫描,确定最佳扫描参数,再聚焦至花粉粒底部,由计算机通过微量步进马达沿标本 Z 轴方向作连续逐层扫描,获得各个层面的荧光图像,即“光学切片”。获得的一系列横截面图像存储到计算机硬盘中,待进一步处理。

实验参数:激光器为 15mW Kr⁺/Ar⁺混合离子激光器,显微镜物镜为 Plan Fluor×100 oil NA 1.30,图像尺寸 512×512 像素类型(93.8μm×93.8μm),像素大小 0.183μm,激光扫描

* 联系人

强度 30%，扫描速度 slow，激发波长 488nm，发射滤片 522nm，滤光片阻 T1, T2A, PMT 检测，Z 轴步距 1.5 μm ，沿 Z 轴连续光切片数 26。

2 结果

附图 1 为激光扫描共聚焦显微镜扫描一串红花粉粒所获得的连续光切片荧光图像中的 24 帧。附图 2 为 26 帧连续光切片垂直叠加后荧光图像。利用 LaserSharp 图像处理软件，将标本沿水平方向旋转，同时沿垂直方向旋转，可得到其动态显示图像。附图 3 显示一串红花粉粒在不同视角下的三维重建结构。其中，图 3A (Tilt 20, Rot 20, Z str 7.1, Fill 1)，图 3B (Tilt 45, Rot 24, Z str 5.4, Fill 2)，图 3C (Tilt 5, Rot 13, Z str 8.1, Fill 7)，图 3D (Tilt 5, Rot -10, Z str 5.0, Fill 1)，图 3E (Tilt -13, Rot -19, Z str 6.6, Fill 1)。附图 4A、4B 为单帧荧光图像及其透射光图像。

图像显示一串红花粉粒呈扁球形，极轴长 56-60 μm ，赤轴长 38-42 μm ，极面观椭圆形，具 6 条萌发沟，分两侧相对等距排列，间距约 10-11 μm ，每侧 3 条，有长条形沟界极区，沟呈梭形，沟长约 51-54 μm ，沟宽 3.0 μm ，具网状雕纹，网脊线细小。

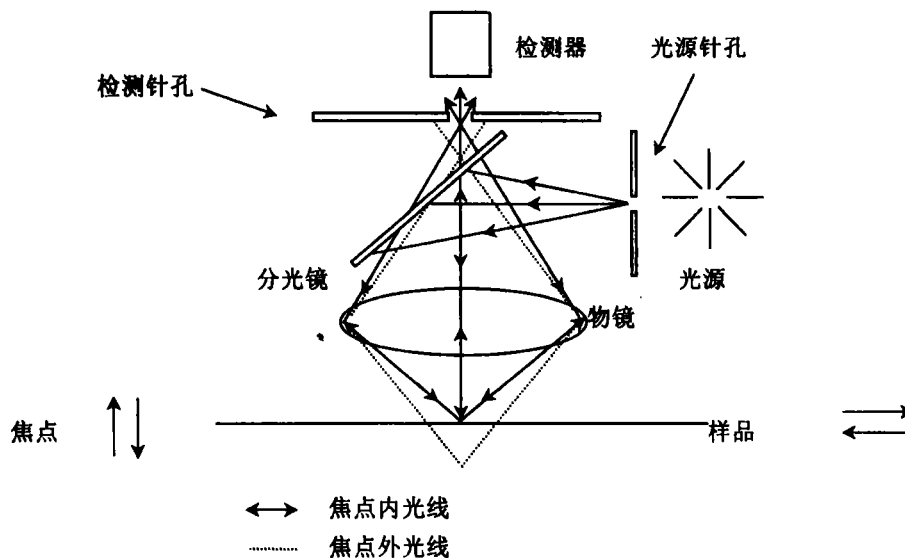


图 1 激光扫描共聚焦显微镜光学原理

Fig 1. The optical principle of laser scanning confocal microscope

3 讨论

传统的光学显微镜使用的是场光源，由于光散射，标本上每一点的图像都会受到邻近点衍射光或散射光的干扰，从而降低了信噪比，影响了图像的清晰度和分辨率。另外，一般光学显微镜只能对局部厚度作平面成像；激光扫描共聚焦显微镜利用激光扫描束经照明针孔形成点光源对标本内焦平面上的每一点扫描，标本上的被照点在探测针孔处成像，由探测针孔后的光电倍增管 (PMT) 或电感耦合器 (CCD) 逐点或逐线接受，迅速在计算机监视器屏幕上形成荧光图像^[5] (图 1)。由于照明针孔和探测针孔相对于物镜焦平面是共轭的这一独特结

构,从而有效抑制同一焦平面上非测量点的杂散荧光,并且来自标本非焦平面的荧光也被抑制,得到的共聚焦图像克服了普通显微镜图像模糊的弱点。此外,通过微量步进马达,控制载物台升降,使焦平面沿标本 Z 轴方向依次位于不同层面上,可以逐层获得标本相应光学横断面的 X-Y 平面图像。即“光学切片”。因此,激光扫描共聚焦显微镜具有深度识别能力,使其具备纵向分辨率,从而可以获得生物标本高反差、高分辨率、高灵敏度的二维图像。标本每个断层的图像信息,经 A/O 转换后存入计算机,通过相应的三维重建软件,进行一系列数据处理和重组运算,可以原位地、直观地、精确地显示标本的三维立体空间形态,并能够对标本的空间结构关系,如距离、面积、体积、荧光强度等参数进行定量分析。得到的三维原色图像可以沿 X、Y、Z 轴或任意角度旋转显示(见附图 3A-3E)。此外,激光扫描共聚焦显微镜通过不同的检测器,可以同时进行荧光共聚焦成像和透射光成像,两者重叠可显示荧光在标本上的精确定位(见附图 4A, 4B)。

应用光学和电子显微镜进行植物孢粉学研究已有较长的历史,也取得了相当的成果^[6-7],但由于图像分辨率、观察成本或样品处理方法等方面的局限性。其应用广度和深度受到一定的限制。植物花粉粒外壁含有胼胝质和孢粉素,孢粉素是类胡萝卜素和类胡萝卜酯的氧化多聚物,因此,花粉粒具有较强的自发荧光,不需特别处理就可直接进行激光扫描共聚焦显微镜下的活体观察,简便易行。如果用特异的荧光染料标记,选择合适的激发波长和发射波长,可以从花粉粒的表面到内部结构、从平面到立体、从静态到动态的不同方面进行研究,因此,激光扫描共聚焦显微镜的应用为孢粉学的进一步发展提供了新的研究工具和途径。

参 考 文 献

- 1 Mongan L C. Confocal microscopy: theory and applications. *Methods Mol Biol.* 1999, 114 : 51-74
- 2 Langeland JA. Imaging immunolabel *Drosophila* embryos by confocal microscopy. *Methods Mol Biol.* 1999, 122 : 167-172
- 3 John J, Lemasters, Ting Qian, et al. Negative contrast imaging of mitochondria by confocal microscopy. *Biophys J.* 1999, 77 : 1747-1748
- 4 孙建和,姜泗长,李兴启等. 图像分析技术在耳形态学研究中的应用. *中国体视学与图像分析*, 1998, 3 (4) : 250-252
- 5 李楠,尹岭,苏振伦等. 激光扫描共聚焦显微术. 北京:人民军医出版社,1997,1-8
- 6 王开发,王宪曾. 孢粉学概论. 北京:北京大学出版社,1983,49-58 170-172
- 7 蓝盛银,徐珍秀. 植物花粉剥离观察扫描电镜图解. 北京:科学出版社,1-42

Three-dimensional Reconstruction of the Pollen Grain of *Salvia splendens* Ker-Gawl Using LSCM

Ding Liang Shen Mingshan Shao Hanjuan Chen Muchuan

(The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell

Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract Laser scanning confocal microscopy was used to acquire sequential "optical sections" of the pollen of *Salvia splendens* Ker-Gawl. The three-dimensional structure of the pollen was then reconstructed by means of LaserSharp software. The result demonstrated that the reconstructed 3-dimensional images were of primary color images with high resolution power, and could be rotated and observed from any angle in the 3D space. The optical principle and characteristics of LSCM with the prospect in applications of LSCM in palynology research were also described in the paper.

Key words LSCM, *Salvia splendens* Ker-Gawl, pollen grain, 3-dimensional reconstruction

