# 时间确定性低温光学显微镜

作者：writer 来源：科学网

本文原地址：https://www.iikx.com/news/progress/37498.html

*本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！*

**时间确定性低温光学显微镜**。 导读

在光学成像与生物动态观测领域，高信噪比成像与快速动态捕捉的技术融合始终是关键挑战。近日，日本大阪大学Katsumasa Fujita联合众多研究团队，开发了时间确定性低温光学显微技术，通过结合毫秒级快速冷冻与低温成像，实现生物细胞动态过程的精准捕获与高分辨率可视化。该技术在保持细胞原生形态与离子分布的同时，解决了传统成像中快速采集与高信噪比的矛盾，为细胞动态研究提供了全新技术范式。该研究成果发表于国际顶级学术期刊《Light: Science Applications》上，题为Time-deterministic cryo-optical microscopy，日本大阪大学的Kosuke Tsuji和Masahito Yamanaka为论文共同第一作者，同时Masahito Yamanaka与Katsumasa Fujita为论文共同通讯作者。

研究背景

在光学显微成像与生物动态解析领域，荧光显微技术虽已实现细胞形态、分子分布及离子动态的可视化，但在快速捕捉与高信噪比成像的兼容性上面临关键挑战。传统方法中，提升信号信噪比（SNR）往往依赖延长曝光时间，与生物动态过程所需的毫秒级快速采集形成矛盾。如何在不牺牲时间分辨率的前提下获取高SNR的动态快照，成为制约细胞动态精准解析的核心问题之一。

化学固定作为传统样本制备手段，难以保留瞬时化学状态（如离子分布、分子构象），且可能引入形态学伪影。相比之下，冷冻固定技术虽能更好地保存原生状态，但现有方法在光学显微场景下存在时间控制精度不足、多模态成像兼容性差等问题。

此外，现有低温光学显微技术的另一个关键瓶颈在于冷冻过程的光学兼容性与样本损伤控制。一方面，冰晶形成会显著干扰成像质量，且可能改变细胞内环境；另一方面，冷冻腔室设计难以兼容电刺激、化学调控等外部干预，限制了动态过程的触发与调控。并且，荧光探针在低温条件下的光学性质变化（如光稳定性、量子产率波动）缺乏系统研究，导致定量分析存在不确定性，这些未解决的问题严重制约了低温光学显微技术在生物医学领域的深度应用。

创新研究

研究团队创新性地开发了时间确定性低温光学显微技术，设计出可放置在倒置光学显微镜上的样品冷冻腔室（如图1A）。该腔室采用由丙烷和异戊烷组成的液态制冷剂，通过制冷剂与样品之间的热交换来冷冻活细胞，将细胞周围缓冲液的残留高度控制在6.7±2.5 μm，确保快速冷冻。此设计实现了在光学显微镜观察过程中对生物细胞的毫秒级快速冷冻，结合荧光和拉曼显微镜，

在低温条件下实现了高空间分辨率和定量分析。

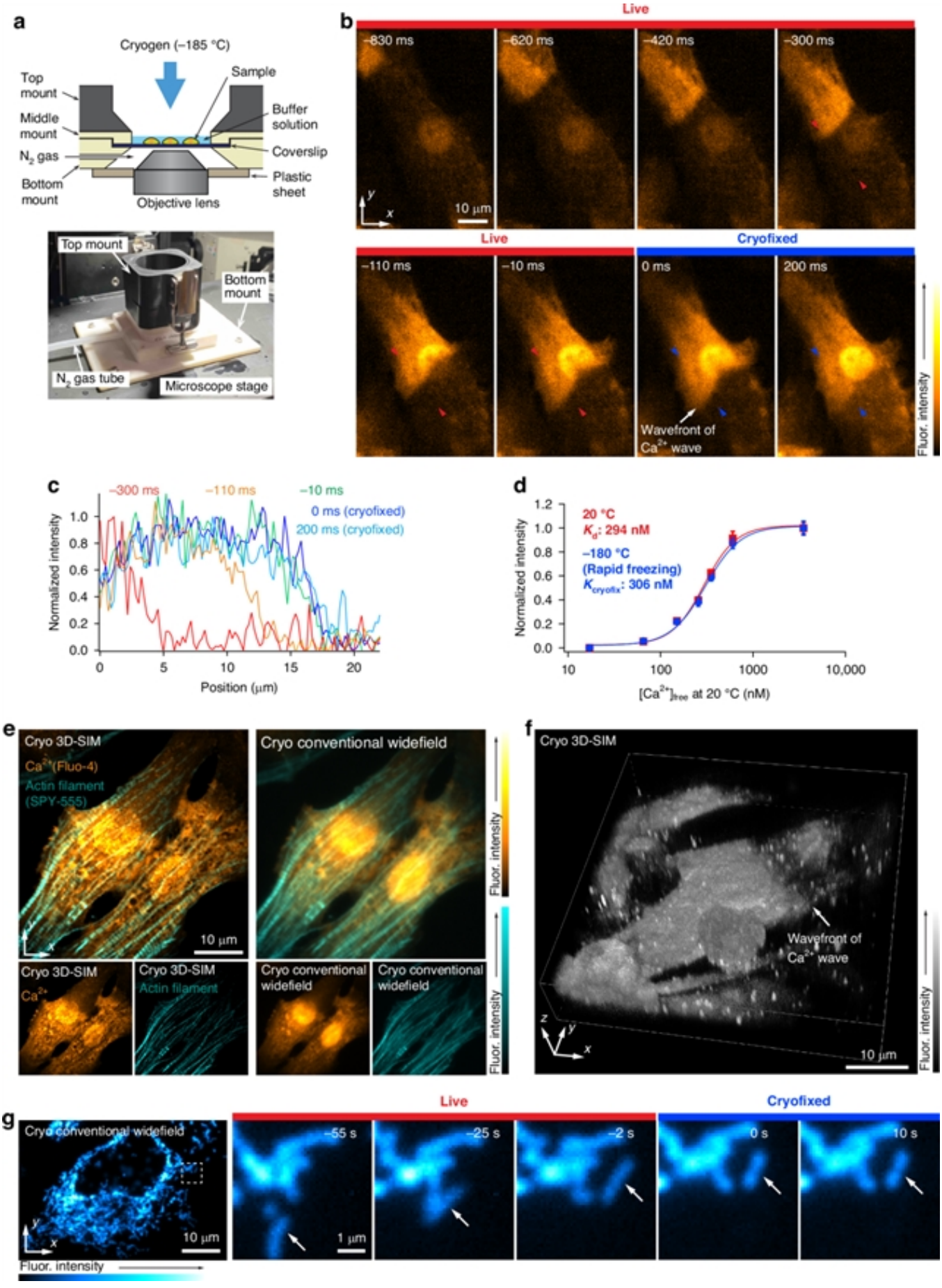

a
Cryogen (−185 °C)
Top mount
Middle mount
$N_2$ gas
Bottom mount
Sample
Buffer solution
Coverslip
Plastic sheet
Objective lens
Top mount
Bottom mount
$N_2$ gas tube
Microscope stage
b
Live
−830 ms
−620 ms
−420 ms
−300 ms
10 μm
Live
Cryofixed
−110 ms
−10 ms
0 ms
200 ms
Wavefront of $Ca^{2+}$ wave
Fluor. intensity
c
−300 ms
−110 ms
−10 ms
0 ms (cryofixed)
200 ms (cryofixed)
Normalized intensity
Position (μm)
d
20 °C
$K_d$: 294 nM
−180 °C
(Rapid freezing)
$K_{cryofix}$: 306 nM
Normalized intensity
$[Ca^{2+}]_{free}$ at 20 °C (nM)
e
Cryo 3D-SIM
$Ca^{2+}$(Fluo-4)
Actin filament
(SPY-555)
Cryo conventional widefield
10 μm
Cryo 3D-SIM
$Ca^{2+}$
Cryo 3D-SIM
Actin filament
Cryo conventional widefield
Cryo conventional widefield
Fluor. intensity
f
Cryo 3D-SIM
Wavefront of $Ca^{2+}$ wave
10 μm
Fluor. intensity
g
Cryo conventional widefield
10 μm
Fluor. intensity
Live
Cryofixed
−55 s
−25 s
−2 s
0 s
10 s
1 μm

图1：载物台冷冻腔室、显微观察下的细胞动态低温固定及低温超分辨成像。

研究团队还开发了一种时间精度为±10 ms的冷冻固定时间控制方法，将精确的冷冻固定时间控制与光学刺激技术相结合，准确地确定了光学显微镜观察期间生物事件开始和冷冻固定之间的时间间隔（如图2A）。以光触发钙释放为例，在紫外激光照射120 ms后冻结细胞内钙的传播（如图2B），还能选择性地在心肌细胞收缩或松弛阶段施加制冷剂，冻结心跳运动（如图2C、D）。

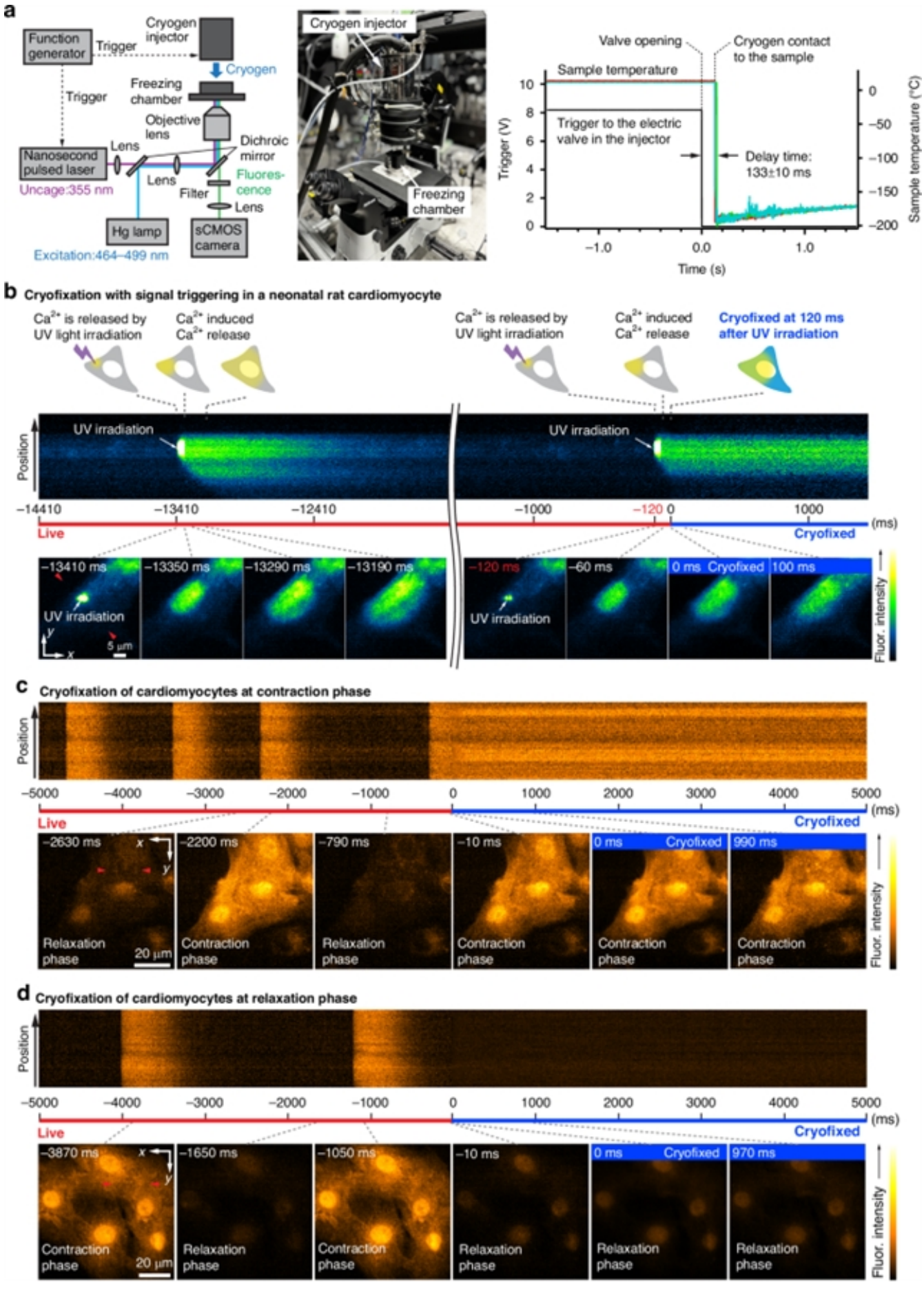

a
Function generator
Trigger
Cryogen injector
Cryogen
Freezing chamber
Objective lens
Dichroic mirror
Nanosecond pulsed laser
Lens
Uncage:355 nm
Filter
Fluores-cence
Hg lamp
sCMOS camera
Excitation:464–499 nm
Cryogen injector
Freezing chamber
Valve opening
Cryogen contact to the sample
Sample temperature
Trigger to the electric valve in the injector
Delay time: 133±10 ms
Trigger (V)
Sample temperature (°C)
Time (s)
b
Cryofixation with signal triggering in a neonatal rat cardiomyocyte
Ca2+ is released by UV light irradiation
Ca2+ induced Ca2+ release
Cryofixed at 120 ms after UV irradiation
UV irradiation
Position
Live
Cryofixed
(ms)
Fluor. intensity
c
Cryofixation of cardiomyocytes at contraction phase
Relaxation phase
Contraction phase
20 μm
d
Cryofixation of cardiomyocytes at relaxation phase

图2：钙动态的时间确定性低温固定。

研究团队进一步实现了低温条件下的高信噪比定量测量和多模态成像（如图3、4）。对于负载Fluo-4的新生大鼠心肌细胞，通过延长曝光时间，将信噪比从8.9提高到340，Ca2+测量精度达到0.2 nM。利用光谱共焦拉曼显微镜，对冷冻固定后的HeLa细胞进行自发拉曼成像，结合荧光3D-SIM，实现了肌动蛋白丝的超分辨荧光成像与细胞色素、蛋白质和脂质分布的高分辨率拉曼成像。

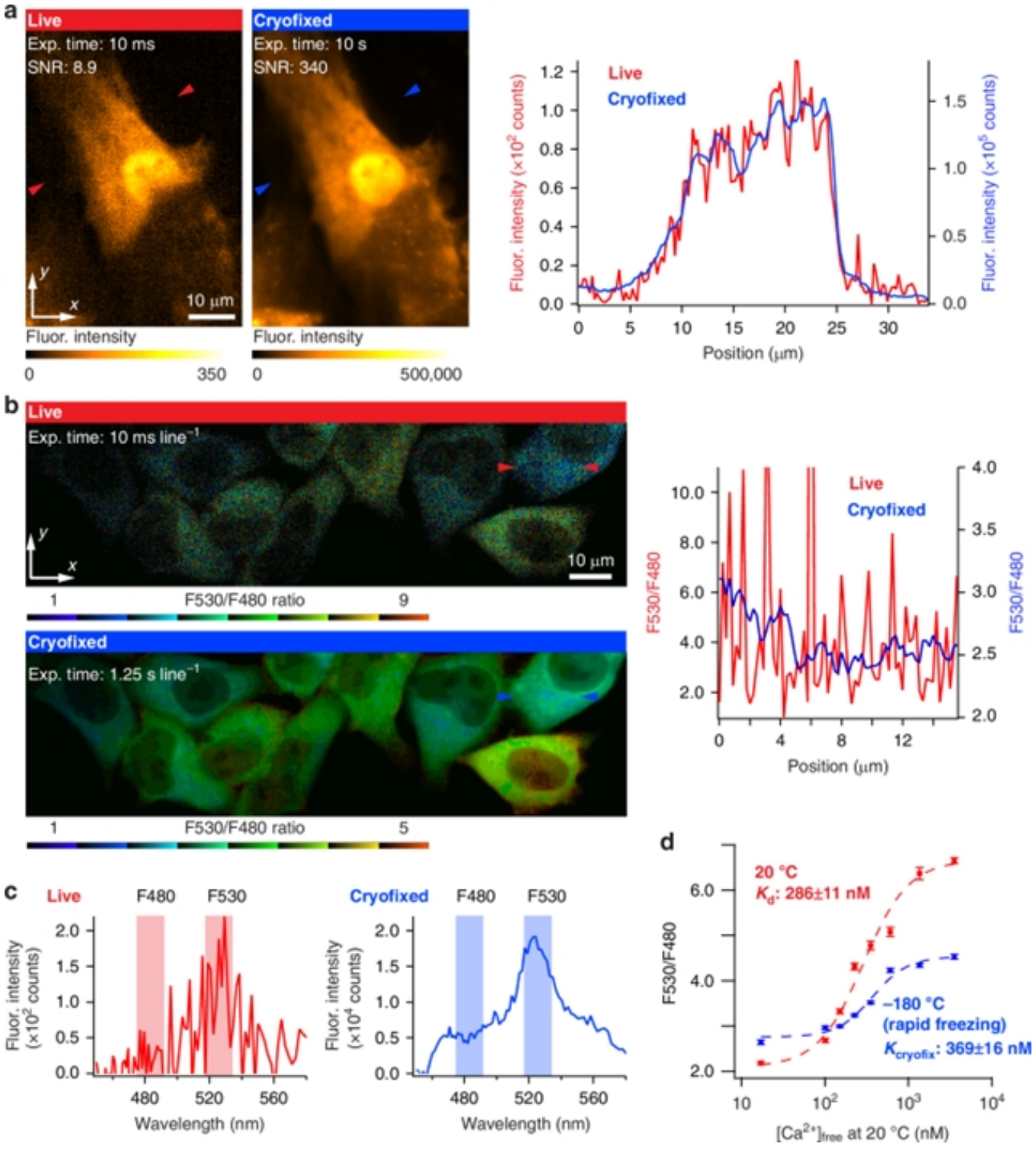



图3：超快速固定和低温成像提高了图像定量能力。

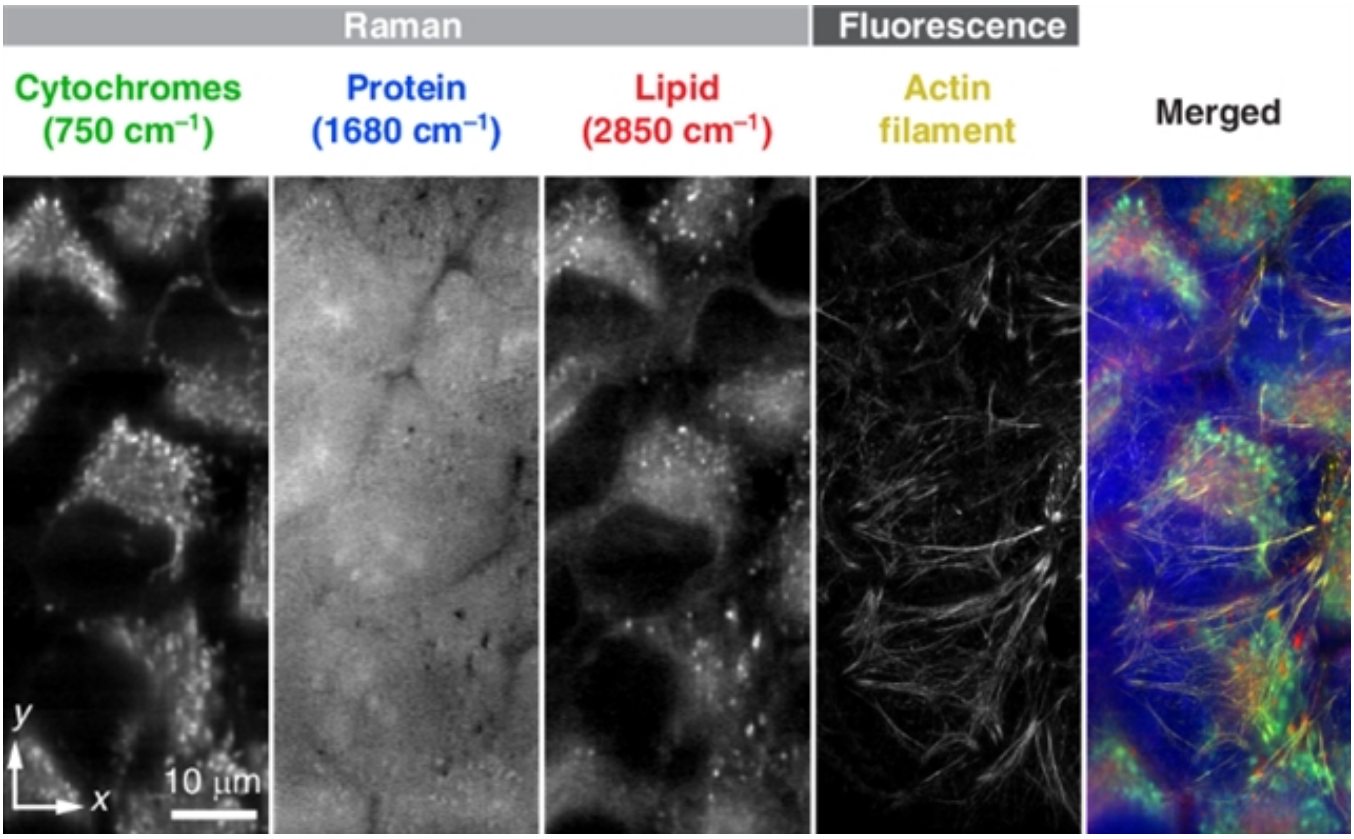



图4：HeLa 细胞的低温自发拉曼和超分辨荧光成像。

总结与展望

在光学成像与生物动态观测领域，该研究开发了时间确定性低温光学显微技术，实现了对生物细胞的毫秒级快速冷冻及高分辨率可视化。该技术结合了活细胞显微和低温固定的优势，能在低温条件下通过荧光和拉曼显微镜进行高空间分辨率和定量分析，还可精确控制冷冻固定时间，为研究细胞动态过程提供了新方法。

展望未来，该技术有望在超分辨成像、与冷冻电镜结合实现跨尺度解析等方面取得进一步发展，同时可通过优化设计拓展多模态成像兼容性，为深入研究细胞功能和分子动态等提供更强大的技术支持。（来源：LightScienceApplications微信公众号）

相关论文信息：https://doi.org/10.1038/s41377-025-01941-8

特别声明：本文转载仅仅是出于传播信息的需要，并不意味着代表本网站观点或证实其内容的真实性；如其他媒体、网站或个人从本网站转载使用，须保留本网站注明的“来源”，并自负版权等法律责任；作者如果不希望被转载或者联系转载稿费等事宜，请与我们接洽。
作者：Masahito Yamanaka 来源：《光：科学与应用》

更多 科学进展 请访问 https://www.iikx.com/news/progress/

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，爱科学iikx.com转发