

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.19.043

· 技术与方法 ·

利用转盘共聚焦显微镜进行快速实验的新方法

张彦丽^{1,2} 代亚丽^{1,2} 陈亚兰^{1,2} 靳 娇³ 潘 勋³ 王文娟^{1,2,Δ}

(1 清华大学 生命科学学院 北京 100084; 2 清华大学 蛋白质研究技术中心 北京 100084;

3 清华大学 生物医学测试中心 北京 100084)

摘要: 转盘共聚焦显微镜是快速激光共聚焦显微镜的一种,与传统的激光共聚焦显微镜相比具有一些相同点,也有其特有的优势。本文主要介绍转盘共聚焦显微镜的基本原理及如何利用转盘共聚焦显微镜进行快速实验及应用实例,并与传统激光共聚焦显微镜进行比较。转盘共聚焦显微镜具有速度快、灵敏度高、对样品光损伤和光淬灭程度低、操作灵活简单,是随着实验技术发展使用越来越广泛的实验仪器。

关键词: 激光共聚焦显微镜;转盘共聚焦显微镜;快速成像

中图分类号: TH742.64 **文献标识码:** A **文章编号:** 6273-6273(2019)19-3784-05

New Methods for Rapid Experiment using Spinning Disk Confocal Microscope

ZHANG Yan-li^{1,2}, DAI Ya-li^{1,2}, CHEN Ya-lan^{1,2}, JIN Jiao³, PAN Xun³, WANG Wen-juan^{1,2,Δ}

(1 School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China;

2 Technology Center For Protein Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China;

3 Center of Beijing Biomedical Analysis, Tsinghua University, Beijing, 100084, China)

ABSTRACT: Spinning disk confocal microscope is a kind of fast laser confocal microscope. Compared with traditional point Laser scanning confocal microscope, spinning disk confocal microscope has some common points and unique advantages. This paper mainly introduces the basic principle of spinning disk confocal microscope and how to use spinning disk confocal microscope to take out rapid experiments and application examples, and compares it with common point scanning confocal microscope. It is concluded that the spinning disk confocal microscope has the advantages of fast speed, high sensitivity, low degree of light damage and low bleaching to the sample, flexible and simple operation, and is an experimental instrument that is more and more widely used with the development of experimental technology.

Key words: Laser scanning confocal microscopy; Spinning disk confocal microscopy; Fast images

Chinese Library Classification(CLC): TH742.64 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)19-3784-05

前言

普通荧光显微镜在拍摄图像时,除了可以获取焦平面的信息,同时也获取了焦点平面上下的信息,使得拍出的图像清晰度不够,分辨率降低。由于激光共聚焦显微镜在样本焦平面的共轭焦平面上安装了一个微小的光栏(即针孔),以保证获得的图像仅来自样品聚焦处的信息,去除了非焦平面的杂散光的干扰,从而可以拍摄分辨率更高的图像。共聚焦技术依据扫描方式的不同可以分为线扫描共聚焦、点扫描式共聚焦和转盘式共

聚焦三类。线扫描共聚焦显微镜由于只在一个轴向上屏蔽光信号,造成图像质量不佳,已经逐渐被淘汰,而点扫描和转盘式激光扫描激光共聚焦显微镜是当前的主流共聚焦成像方式。点扫描激光共聚焦显微镜由于其分辨率高且应用范围广,已被广泛用来拍摄静态的组织、细胞等样品图像,但随着科学研究的进步和拍摄活细胞动态变化过程的需求日益增长,不仅要求仪器分辨率要高,对仪器的拍摄速度及光漂白、光毒性等方面也提出了更高的要求。转盘式共聚焦显微镜由于其独特的高速、高灵敏度、高分辨的特点,不仅可以拍摄静态的组织、细胞样品的图像,而且为科研工作者研究和拍摄活细胞动态变化过程提供了更多可能。本文介绍转盘式共聚焦显微镜的基本原理、特点和应用实例,并提出利用转盘式共聚焦显微镜进行快速实验的新方法,最后总结和展望其应用和发展前景。

1 转盘式激光共聚焦显微镜

作者简介:张彦丽(1987-),硕士,工程师,主要从事细胞影像相关大型仪器的使用与管理,电话:010-62772736,

E-mail: huihui78600@mail.tsinghua.edu.cn

Δ 通讯作者:王文娟,博士,高级工程师,主要从事仪器平台大型仪器开发研究与管理,E-mail: wenjuan@mail.tsinghua.edu.cn

(收稿日期:2019-02-28 接受日期:2019-03-23)

激光共聚焦显微镜 (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM) 是 20 世纪 80 年代中期发展起来的细胞生物医学分析仪器^[1-4]。转盘式激光共聚焦显微镜 (Spinning Disk Confocal Microscopy, SDCM) 是随着激光共聚焦显微镜的发展而逐步发展起来的^[5-8]。激光共聚焦显微镜 (LSCM) 是采用激光作为光源, 在传统光学显微镜基础上采用共轭聚焦原理和装置, 并利用计算机对所观察的对象进行数字图像处理的一套观察分析和输出系统^[9]。激光共聚焦显微镜技术利用激光点光源, 有效地排除焦点以外的荧光信号干扰, 有利于对标本深层结构的探测, 实现高分辨率的二维光学断层成像, 使标本结构得以完整显示, 对于待测样品三维立体图像重建有着重要的意义^[10]。同时 LSCM 也是多重免疫荧光标记和离子荧光标记观察的有力工具^[11]。但是由于活细胞样品运动比较快, 利用传统激光共聚焦显微镜不能捕捉到样品快速运动的过程信息^[12-16]。

相对于经典的激光共聚焦显微镜, 转盘式激光共聚焦显微镜 (Spinning Disk) 是随着活细胞技术的兴起而逐渐发展起来的^[17,18]。激光共聚焦显微镜在样本焦平面的共轭焦平面上安装了一个微小的光栏, 即针孔。针孔仅允许样本焦平面的光通过, 因而只有焦平面上的信号被检测到, 而非焦平面的信号被屏蔽。转盘式共聚焦显微镜通过多点同步扫描的方式, 大大提高了扫描效率, 延长了单点滞留时间, 借助微弱的激发光照射就可以实现高灵敏度的成像效果^[19-23]。转盘共聚焦系统采用双转盘共聚焦系统, 该系统有一个微透镜转盘和一个针孔转盘组成, 转盘上分布有 20000 个螺旋排列的针孔, 每一个针孔微透镜和转盘都是一一对应的, 激光通过透镜系统会形成一个圆斑, 这个圆斑可以覆盖大约 1000 个微透镜的范围 (即扫描区域), 当光线通过微透镜聚光后, 会穿过每一个小孔, 形成一个 1000 个微光束, 这 1000 个微光束再经过显微镜光路照射到样品上, 会同步激发 1000 个光信号, 这些信号会沿着显微镜光路返回, 当他们再次穿过小孔就会实现共聚焦过滤, 所得到的焦平面的信号再通过两个转盘之间的二向色镜转移到 EMCCD 上, 由于微透镜和小孔在转盘上以螺旋状分布, 随着转盘的转动 (针孔位置随之改变), 实现对样品不同区域的完整扫描^[24]。转盘共聚焦显微镜原理图见图 1。因此, 所得的图像不是通过单点扫描, 而是通过一个平行的扫描 / 检测系统得到一个面的更高速度的成像^[25,26]。

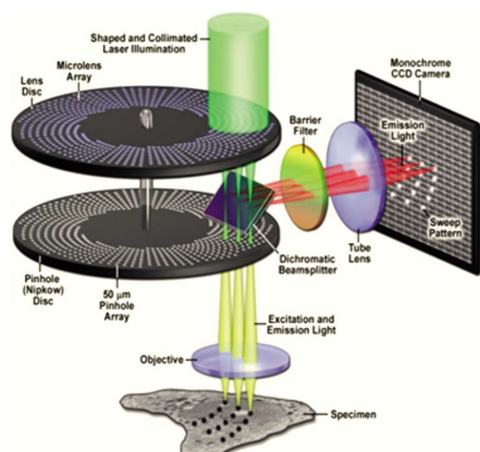


图 1 转盘共聚焦显微镜原理图

Fig.1 Schematic diagram of spinning disk confocal microscope

2 转盘激光共聚焦显微镜在生物学研究中的实例介绍

通过多通道快速扫描、多通道 Z 轴扫描、多通道大图拼接及多通道多点快速扫描等应用实例对转盘共聚焦显微镜进行功能介绍, 同时比较转盘共聚焦显微镜与传统激光共聚焦显微镜的不同。所用实验材料为植物花粉样片 (AS651d Bell's) 和植物根样片, 所用仪器为 PerkinElmer 的转盘式共聚焦显微镜, Yokogawa 微透镜增强型双转盘扫描头 CSU, 配有高灵敏度 EMCCD 相机。显微镜主机为 Olympus IX83 倒置全电动显微镜, 并有焦点防漂移系统, 操作和分析软件 Volocity 6.3.1; 点扫描激光共聚焦显微镜采用 Olympus FV1200 激光共聚焦显微镜。

2.1 多通道快速扫描

转盘共聚焦显微镜可对固定样品、免疫荧光样品及活细胞样品进行快速多通道采集, 得到清晰的高分辨率图像, 图 2 为转盘共聚焦显微镜快速扫描 (a-d) 与普通激光共聚焦显微镜 (e-h) 对植物样片在 405 nm, 488 nm, 561 nm 三个通道下进行拍摄, 其中转盘共聚焦显微镜拍摄参数为: 40x 物镜, 405 nm (曝光时间: 45 ms, 激光强度: 15%, Sensitivity 值: 140); 488 nm (曝光时间: 30 ms, 激光强度: 10%, Sensitivity 值: 144); 561 nm (曝光时间: 30 ms, 激光强度: 8%, Sensitivity 值: 148) 三通道同时进行扫描, 并进行通道叠加, 用时 5.41 s。激光共聚焦显微镜拍摄参数为: 40x 物镜, 405 nm (激光强度: 15% HV 值: 634), 488 nm (激光强度: 23%, HV 值: 545), 561 nm (激光强度: 20%, HV 值: 512), 扫描速度: 8 us/pix 分辨率: 512 × 512, kalman 2, 用 Line 的方式, 三通道同时进行扫描, 并进行通道叠加 d, 用时 16.26 s。从图中可以看出, 转盘共聚焦显微镜与激光共聚焦显微镜拍摄图像分辨率相同, 但是从速度上转盘共聚焦显微镜要比激光共聚焦显微镜快 3 倍以上, 如果各个通道曝光时间短的话, 时间差距会更大。

2.2 多通道 Z 轴扫描

转盘共聚焦显微镜能够对组织切片或细胞样品进行快速三维层扫, 将整个三维结构拍摄完整, 同时对所拍摄的样品进行三维重构, 展示不同角度的三维效果见图 3。图为转盘共聚焦显微镜下, 对于植物样片在 40x 物镜, 488 nm, 561 nm, 647 nm 三个通道进行 Z (Z=29) 轴扫描, 用时 13.91 s。并进行的最大密度投影 (图 a-d), 同时做三维重构 (图 e) 的结果。而同样的样品和区域, 同样的拍摄条件, 激光共聚焦显微镜需要用时 476.95 s, 而且点扫描激光共聚焦显微镜三维重构不是特别方便。

2.3 多通道大图拼接

在目标样品大小超出成像视野时, 可以使用多视野拼接功能, 实现采集高分辨率大图的目的。首先在 XY Stage 预览下, 根据左下角小图预览选择合适的视野焦面, 然后用 ROI 工具设置一个成像范围 (如不满意, 直接再画一个即可)。首先进行大视野预览, 再根据预览区域选择要采集的区域, 设置好参数进行大图拼接。图 4 为植物样品利用转盘共聚焦显微镜在 20x 物镜下在 405 nm, 488 nm, 561 nm 三通道选择的 25 张图像的拼接及 Merge 图像, 用时 76 s, 而传统激光共聚焦显微镜进行大图拼接时一方面寻找区域比较麻烦, 需要在目镜视野下分别找到要拍摄的样品的各个角的位置 (eg. 左上、右下等), 如果样品不规则的话经常会找不全, 也不能把找到的区域进行快速预览然后再根据预览效果选择目标区域, 同时拍摄速度比较慢。

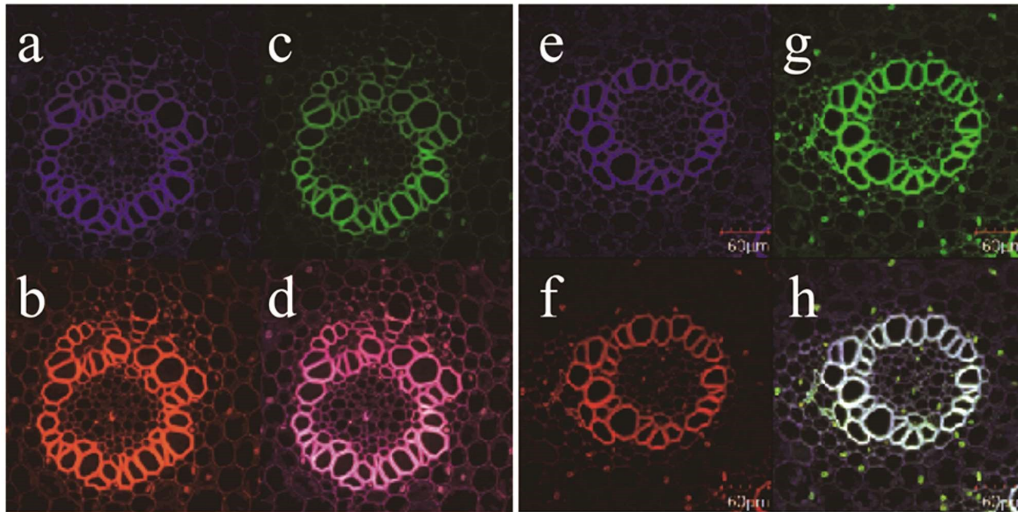


图2 转盘共聚焦显微镜(a-d)与点扫描共聚焦显微镜(e-h)拍摄植物自发荧光样品

图 a-d 为转盘共聚焦显微镜分别在 405 nm(a),561 nm(b),488 nm(c)激光通道下对植物样品进行拍摄,并进行通道叠加(d);图 e-h 为点扫描共聚焦显微镜分别在 405 nm(e),561 nm(f),488 nm(g)激光通道下对同一样品进行拍摄,并进行通道叠加(h)

Fig.2 Auto fluorescence samples were taken by Spinning disk confocal microscopy (a-d) and point-scanning confocal microscopy (e-h)

a-d shows the scanning of plant samples at 405 nm(a), 561 nm(b), and 488 nm(c) under the laser channel under the spinning disc confocal microscope, respectively, and merge the channels (d). e-h shows the scanning confocal microscope scanning the same sample at 405 nm(e), 561 nm(f) and 488 nm(g), respectively, and merge the channels (h)

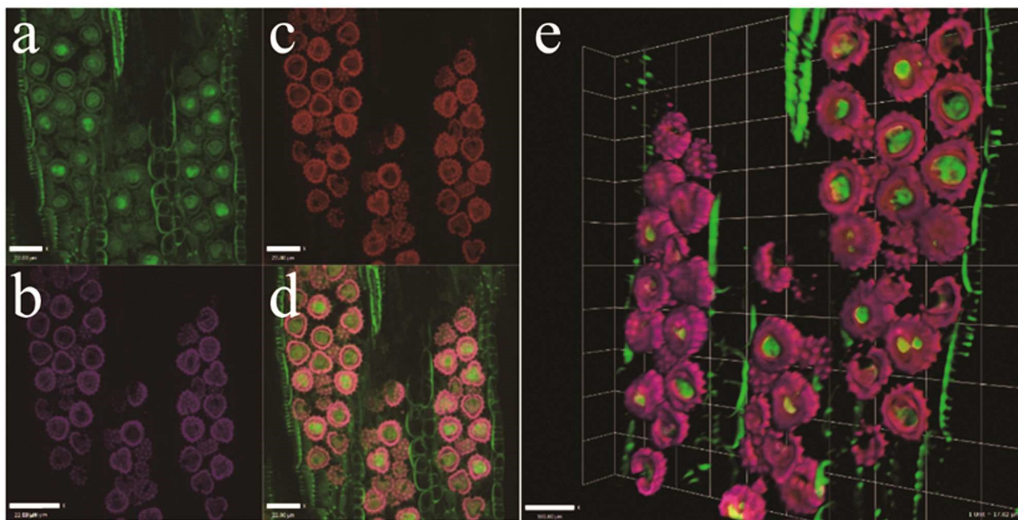


图3 转盘共聚焦显微镜的三维扫描及重构

对植物花粉 488nm(a), 647nm(b), 561nm(c)下进行三维扫描并进行最大密度投影(d)及三维重构(e)

Fig.3 Three-dimensional scanning and reconstruction of Spinning disk confocal microscopy

3D scanning and maximum density projection (d) and 3d reconstruction (e) of plant pollen at 488 nm (a), 647 nm (b) and 561 nm (c) were performed.

2.4 多通道多点快速扫描

如果进行大量统计或者进行长时间多点样品拍摄时,传统的点扫描激光共聚焦显微镜需要逐点进行选择,而且每选择一个要拍摄的点都需要在目镜和电脑界面来回切换来确定目标点位置,而且受限于拍摄速度,一次不能同时拍摄太多时间点,并且如果拍摄时间过长会对样品淬灭比较严重。而转盘共聚焦显微镜具有拍摄速度快、对样品的光损伤小的特点,可以进行活细胞长时间快速拍摄。并且方便快捷的同时选择多个时间点进行长时间快速多点拍摄。首先进行大视野预览,方法同 2.3,在预览区域筛选自己的目标点将该点做一标记,然后再设置多通道多点拍摄参数,如果是活细胞拍摄,则可以加上长时间防

漂移系统,进行快速多点快速稳定拍摄。图 5 为对植物样片,在 10× 物镜下,在 405 nm 通道下,先进行大视野预览,然后再在预览区域选择自己关注的点做上标记(图中红色圈点标注的点)进行拍摄,也可以在圈点的位置直接切换高倍物镜,进行目标区域高分辨快速成像,这样可以直观的拍摄目标区域,节约大量时间。

3 转盘共聚焦显微镜新实验功能的开发

利用转盘共聚焦的特点,结合与传统激光共聚焦显微镜功能及应用的的不同及转盘共聚焦显微镜的功能及特点,根据不同的实验内容和目的,开发了一些新的实验方法,大大提高了实

验的过程及实验的成功率,节约大量时间及机时成本,与传统

激光共聚焦显微镜相比极大的提高了实验的效率。

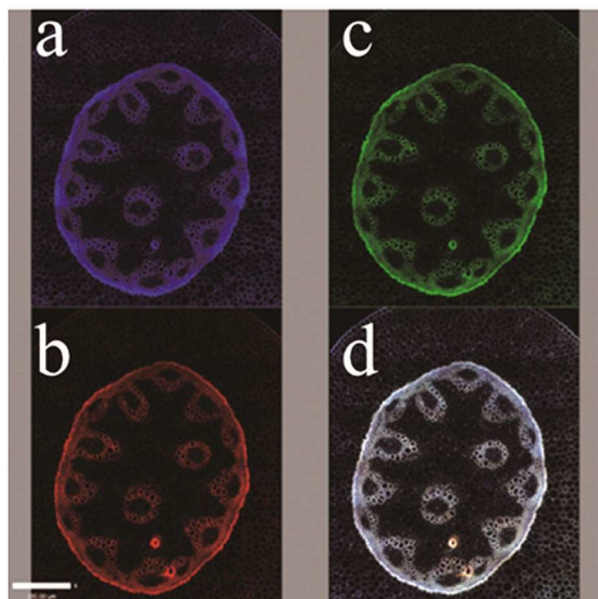


图4 转盘共聚焦显微镜快速大图拼接

植物样品利用转盘共聚焦显微镜在 20× 物镜下在 405 nm(a),488 nm (c),561 nm(b)三通道选择的 25 张图像的拼接及叠加图像(d)

Fig.4 Rapid large image Mosaic of spinning disk confocal microscope
Stitch and merge images (d) of 25 selected images at 405nm (a),488nm (c) and 561nm (b) under a 20× objective microscope using spinning disc confocal microscope

3.1 多通道多视野快速高通量实验研究开发

传统光学显微镜找样品操作都是在黑暗的环境中,先在汞灯下找到样品,然后再切换到激光下拍摄,寻找下一个样品时会再切换到汞灯下找样品,再切换到激光下激发,这样不停的反复进行来回切换寻找。这个方法的问题是:(i)汞灯特别是常用 DAPI 激发的紫外光对眼睛损伤较大;(ii)汞灯和激光来回切换耗时较长,并对仪器损耗更大。利用转盘共聚焦显微镜快速预览和多点拍摄的功能,建立细胞或者组织快速高通量筛选的方法。一个样品在目镜下用明场下找到焦面之后,可以直接切换到软件中来,利用仪器在 XY-Stage 模式下快速预览,选择一个大的区域可以先在低倍镜下快速预览整个细胞或者组织,然后再直接切换到高倍镜直接双击鼠标到自己选择的目标区域中,直接进行选择目标拍摄。这样的优势在于:(i)节约了大量的时间;(ii)减少了长时间找视野区域对眼睛的伤害;(iii)减少了汞灯以及汞灯和激光切换开关的损耗;(iv)能够给出一个大视野的样品状况,可以快速了解拍摄的样品概况。采用这个方法,显著提高了寻找样品的成功率,节约了寻找样品的时间,并且节约了大量的时间,并能在转盘共聚焦显微镜系统上快速完成传统激光共聚焦显微镜系统上不能实现的实验。例如根据实验目的,在转盘共聚焦显微镜系统上建立了酵母细胞快速高通量筛选的方法。完成了两个月内 6000 多个样品的筛选,将本来需要在传统激光共聚焦显微镜上至少一年内完成的实验缩减到两个月内完成,极大的提高了工作效率。

3.2 活体脑神经分化长时程跟踪开发研究

神经分化领域一个大的挑战是如何保证在最小光损伤和

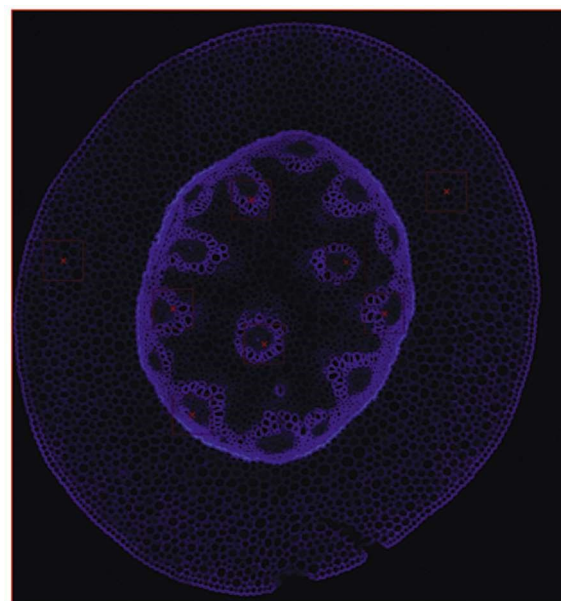


图5 转盘共聚焦显微镜快速大视野预览与定位

10× 物镜下对植物样品,在 405 nm 通道下进行快速大视野预览,然后选定目标区域进行标定(红色十字)

Fig.5 Fast wide field preview and positioning of confocal microscope with rotary table

Plant samples were previewed at 405 nm under 10× objective lens, then the target area was selected (red cross)

光漂白下进行长时间稳定追踪。利用传统激光共聚焦显微镜进行样品拍摄时遇到的难点是:(i)组织样品比较大,长时间贴壁效果不好;(ii)拍摄速度比较慢,不能把样品快速变化的过程捕捉到;(iii)长时间拍摄过程中神经会不断分化,甚至会超出一个视野范围;(iv)长时间拍摄对样品淬灭比较严重。这样会给实验结果造成极大的困扰。结合转盘共聚焦显微镜长时程、多点和大图拼接的功能,设定了多点同时每个点设定 2×2 的大图范围的快速拍摄,实现了对脑组织神经分化长达一个星期的稳定追踪,并且所拍摄的信息都在看见的视野范围内。这个方法有三个方面的优势:(i)样品光损伤较小,能够保证在长时间内细胞能够正常的分化与生长;(ii)保证样品的稳定追焦,这也是能够保证进行长时间成像的根本,(iii)设定 2×2 的大视野拍摄区域,能够保证即使生长比较快,也能够拍摄到生长每个区域的信息。

4 小结与展望

本文介绍了传统点扫描激光共聚焦显微镜及转盘共聚焦显微镜的基本原理及应用,并比较两种不同仪器在使用及样品拍摄所用时间的不同。转盘共聚焦显微镜具有拍摄速度快、灵敏度高、分辨率高、对样品损伤小,并且可以长时间快速稳定拍摄的特点,为研究和拍摄活细胞动态变化过程提供了更多可能。同时,基于转盘共聚焦显微镜的特点我们根据不同实验目的,开发了快速高通量及活细胞长时间稳定拍摄的方法,节约了大量的实验时间,得到快速便捷的实验方法。转盘共聚焦系统具有扫描速度快,时间分辨率高,可以进行 3D-6D 快速扫

描;灵敏度高,光毒性小,光漂白小;同时具有更高的精确性与再现性等特点。主要应用于活细胞快速高分辨率长时间快速稳定成像及大样品快速拼接成像。适用于细胞生物学(细胞增殖和快速迁移等)、生物医学(建立细胞生理或病理模型)、发育生物学(长时间高通量快速实验)、神经生物学(神经元的生长迁移)、植物科学(植物的快速生长迁移等)、病毒学(病毒侵染)、药理学(药物筛选)等多学科研究中的各种需求^[27-32]。转盘共聚焦显微镜在生物医学领域得到越来越多的应用,特别随着实验技术的发展,科学家们对快速动态实验的要求越来越高,并且随着科学技术的发展,转盘共聚焦技术也在不断提升,特别在拍摄速度和成像分辨率方面的技术也不断更新,相信不久的将来转盘共聚焦显微镜会得到越来越广泛的应用。

参考文献(References)

- [1] White J G, Amos W B. Confocal microscopy comes of age[J]. *Nature*, 1987, 328(6126): 183-184
- [2] White J G. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy[J]. *J. Cell Biol*, 1987, 105(1): 41-48
- [3] Truernit E, Haseloff J. A simple way to identify non-viable cells within living plant tissue using confocal microscopy [J]. *Plant Methods*, 2008, 4(1): 15
- [4] Nguyen S T T, Mccurdy D W. High-resolution confocal imaging of wall ingrowth deposition in plant transfer cells: Semi-quantitative analysis of phloem parenchyma transfer cell development in leaf minor veins of *Arabidopsis*[J]. *BMC Plant Biology*, 2015, 15(1): 109
- [5] 杨晚竹, 高亚男, 梁昱岳, 等. 显微成像分析技术在中性粒细胞运动及吞噬功能研究中的应用 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2015, 23(3): 832-837
- [6] Periasamy A. Fluorescence resonance energy transfer microscopy: a mini review[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2001, 6(3): 287-291
- [7] Knight M M, Roberts S R, Lee D A, et al. Live cell imaging using confocal microscopy induces intracellular calcium transients and cell death[J]. *AJP: Cell Physiology*, 2003, 284(4): C1083-C1089
- [8] 孙亚薇, 公海艳, 曹善楠, 等. 靶向肿瘤坏死因子 β 小分子抑制剂的筛选及其功能鉴定[J]. *天津医药*, 2015, 43(9)
- [9] 林丹樱, 马万云. 活细胞内的单分子荧光成像方法 [J]. *物理*, 2007, 36(10): 783-790
- [10] Telser A. Fundamentals Of Light Microscopy And Electronic Imaging[J]. *Shock*, 2002, 17(5)
- [11] 朱珊珊, 黄志江. 激光扫描共聚焦显微镜在生命科学研究中的应用[J]. *国外医学:麻醉学与复苏分册*, 2005, 26: 118-119
- [12] Wang C, Du W, Su Q P, et al. Dynamic tubulation of mitochondria drives mitochondrial network formation[J]. *Cell Research*, 2015
- [13] 林路遥, 介明沙, 陈凤明, 等. PDMS-琼脂糖凝胶芯片上形状可控的细胞共培养药物刺激模型[C]. *中国化学会第十一届全国生物医药色谱及相关技术学术交流会(大会特邀报告及墙报)论文摘要集*, 2016
- [14] Zhang J, Jiang Z, Liu X, et al. Eph/ephrin signaling maintains the boundary of dorsal forerunner cell cluster during morphogenesis of the zebrafish embryonic left-right organizer [J]. *Development*, 2016, 143(14): 2603-2615
- [15] Mi N, Chen Y, Wang S, et al. CapZ regulates autophagosomal membrane shaping by promoting actin assembly inside the isolation membrane[J]. *Nature Cell Biology*, 2015, 17(9): 1112
- [16] 高鹏, 金帆. 分散方法对油水界面上胶体粒子之间相互作用的影响[J]. *中国科技论文*, 2017, 12(18)
- [17] Mcallister R, Sisan D R, Urbach J S. Design and optimization of a high-speed, high-sensitivity, spinning disk confocal microscopy system[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2008, 13(5): 054058
- [18] 于文颖, 耿广峰, 张辰, 等. 全内角反射技术与转盘式共聚焦技术在细胞膜表面的成像比较 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2016, (1): 65-71
- [19] M C Adams, W C Salmon, S L Gupton, et al. A high-speed multispectral spinning-disk confocal microscope system for fluorescent speckle microscopy of living cells[J]. *Methods*, 2003, 29: 29-41
- [20] P S Maddux, B Moree, J C Canman, et al. Spinningdisk confocal microscope system for rapid high-resolution, multimode, fluorescence speckle microscopy and green fluorescent protein imaging in living cells[J]. *Methods Enzymol*, 2003, 360: 597-617
- [21] T Tanaami, S Otsuki, N Tomosada, et al. High speed 1-frame/ms scanning confocal microscope with amicrolens and Nipkow disks[J]. *Appl Opt*, 2002, 41: 4704-4708
- [22] A Egner, V Andresen, S W Hell. Comparison of the axial resolution of practical Nipkow-disk confocal fluorescence microscopy with that of multifocal multiphoton microscopy: Theory and experiment [J]. *J Microsc*, 2001, 206: 24-32
- [23] Shinya Inoué, Ted Inoué. Direct-view high-speed confocal scanner: the CSU-10[J]. *Methods in Cell Biology*, 2002, 70(70): 87
- [24] 陈木旺. 浅谈共聚焦显微技术[J]. *光学仪器*, 2013, 35(1): 44-47
- [25] Wang E, Babbey CM, Dunn KW. Performance comparison between the high-speed Yokogawa spinning disc confocal system and single-point scanning confocal systems[J]. *Journal of Microscopy*, 2005, 218(part 2): 148-159
- [26] Vyas J M. Insights into dendritic cell function using advanced imaging modalities[J]. *Virulence*, 2012, 3(7): 5
- [27] Shen Z, Zhang X, Chai Y, et al. Conditional Knockouts Generated by Engineered CRISPR-Cas9 Endonuclease Reveal the Roles of Coronin in *C. elegans* Neural Development [J]. *Developmental Cell*, 2014, 30(5): 625-636
- [28] Zhang J, Jiang Z, Liu X, et al. Eph/ephrin signaling maintains the boundary of dorsal forerunner cell cluster during morphogenesis of the zebrafish embryonic left-right organizer [J]. *Development*, 2016, 143(14): 2603-2615
- [29] Zhao D, Zhang X, Guan H, et al. The BAH domain of BAHD1 is a histone H3K27me3 reader[J]. *Protein & Cell*, 2016, 7(3): 222-226
- [30] Su Q P, Du W, Ji Q, et al. Vesicle Size Regulates Nanotube Formation in the Cell[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24002
- [31] Du W, Su Q, Chen Y, et al. Kinesin 1 Drives Autolysosome Tubulation[J]. *Developmental Cell*, 2016, 37(4): 326-336
- [32] Sun D, Wu R, Zheng J, et al. Polyubiquitin chain-induced p62 phase separation drives autophagic cargo segregation [J]. *Cell Research*, 2018, 28(4): 405-415