

激光共聚焦显微技术在瓮安生物群中的应用*

吴若琳^{1,4)} 吴素萍³⁾ 殷宗军^{1,2)} **

1) 中国科学院南京地质古生物研究所, 现代古生物学和地层学国家重点实验室, 南京 210008, zjyin@nigpas.ac.cn;

2) 中国科学院生物演化与环境卓越创新中心, 南京 210008;

3) 中国科学院南京地质古生物研究所实验技术中心, 南京 210008;

4) 中国科学技术大学, 合肥 230026

摘要 激光共聚焦显微技术是一种以激光作为激发光源, 通过特殊装置“针孔”来过滤离焦光线以提高光学分辨率和对比度的光学成像技术。由于大部分化石不能自发荧光, 该技术在古生物学领域尚未实现大范围的应用。但若围岩能自发荧光而与化石之间具有一定衬度, 或化石因含特殊成分能在特定波段激光照射下自发荧光而产生结构衬度, 则可以运用激光共聚焦显微技术获得在普通光学显微镜及荧光显微镜下难以清晰观察到的信息。为推动激光共聚焦技术在古生物学领域中的应用, 文中系统介绍了该技术的原理与使用方法, 并以埃迪卡拉纪磷酸盐化特异埋藏的瓮安生物群微体化石为例, 展示了该技术在化石成像中的若干优势。实验结果表明, 瓮安生物群微体化石因富含磷灰石可自发荧光实现成像, 使用激光共聚焦显微成像技术观察瓮安生物群化石薄片不仅可以获得较好衬度, 而且还能提高成像的分辨率和清晰度。此外, 在化石薄片的厚度范围内还可以实现化石结构三维重建。

关键词 激光共聚焦 瓮安生物群 光学切片 自发荧光 磷酸盐化

1 前言

共聚焦显微技术的概念由 Marvin Minsky 于 20 世纪 50 年代提出 (Minsky, 1988), 目的是避免离焦光源对成像的干扰, 以获得更高的图像分辨率。该技术所用光源历经碳弧灯 (carbon arcs)、锆弧灯 (zirconium arcs), 后演变为现今使用的激光。首次生产的激光共聚焦显微镜可以追溯到 20 世纪 60 年代 (Davidovits and Egger, 1969), 发展至今, 激光共聚焦显微技术已在现代生物学、医学、植物学、能源及材料科学等各个领域发挥重要作用。例如, 使用免疫荧光技术标记感兴趣组分, 追踪该目标的分布和运移 (Leszczuk and Szczuka, 2018); 通过转基因表达荧光蛋白, 了解蛋白质在生物组织中分泌和分布情况 (Dobretsov *et al.*, 2019); 在植物中, 如叶绿素、生物碱、酚类和吡啶类化合物能够被激发出荧光 (García-Plazaola *et al.*, 2015), 可以使用该技术进行结构和物质的观察; 在油气地质学研究领域, 该技

术可以有效检测含油气黑色页岩的有机组分 (Nix and Burkhardt, 2003)。此外, 荧光染料的发明与应用也使得激光共聚焦显微观察和研究更便捷直观 (Hickey *et al.*, 2004)。

激光共聚焦技术 (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) 作为一种采集自发荧光进行成像的工具, 虽然在上述各领域的应用已十分普遍, 但在古生物学领域尚未得到大范围推广, 究其原因是由于研究对象的特殊性——化石不具有生命, 无法像现代生物学领域利用活性荧光蛋白标记特定的结构。激光照射下可以自发荧光的物质一般分为有机质的和矿物的 (无机的)。其中, 有机质的化学成分及成熟度影响其荧光性质 (Lin and Davis, 1988; Pradier *et al.*, 1991; 陈尚斌等, 2015), 其原因是在地质历史尺度下, 经过不同的成岩温度和压力等条件作用, 有机质中的各种化学键会发生不同程度的断裂。成熟度较低的有机质如琥珀可以在激光激发下产生自发荧光 (Huang *et al.*, 2016), 而成熟度较高的有机质, 比如甘洛根, 在激光照射下并不发荧

收稿日期: 2018-11-12

* 国家自然科学基金面上项目 (41672013) 和中科院青年创新促进会基金 (2017360) 联合资助。

** 通讯作者: 殷宗军, 副研究员, 主要从事动物起源和早期生命演化研究。

光。目前已知部分矿物在激光照射下可以产生较强的荧光。利用矿物的自发荧光特性,相关学者在研究富含方解石、磷灰石、黏土矿物的物质中都获得了较好的荧光成像效果(Birkmann and Lundin,1996; Chen *et al.*,2007; Jackson *et al.*,2010; Schopf *et al.*,2015)。因而将该技术应用于化石研究时,一般观察到的情况有三种:1)化石整体因含有特定的化学组分(能自发荧光的矿物或成熟度很低的有机质)能在激光光源的激发下自发荧光;2)化石和围岩的化学组成不同,围岩因含有特定的组分能在激光的激发下自发荧光从而在化石和围岩之间产生成像衬度;3)化石本身不同结构的化学组成不同,并且部分结构能够在激光的激发下自发荧光从而显示出不同结构之间的衬度。

前人在激光共聚焦显微技术对古生物学研究领域有过尝试,认为该技术在古生物学领域具有较大潜力(杨伟平等,1996)。比如在研究各类化石薄片和实体化石,包括疑源类(杨伟平等,1998; Talyzina, 1998; 王金星,2004)、孢粉(Scott and Hemsley, 1991; 王金星,2004; Hochuli and Feist-Burkhardt, 2004; 卓二军等,2006)、蓝细菌(Schopf *et al.*, 2006; Schopf *et al.*,2008; Guo *et al.*,2018)、腕足类(王金星,2004)、龟鳖壳壁及恐龙蛋壳壁(王金星,2004)、磷酸盐化栉水母胚胎(Chen *et al.*,2007)、藻类(尹磊明等,2003; Chi *et al.*,2006,2008)、植物化石(Schopf *et al.*,2010)、琥珀(杨伟平等,1996; Cai and Huang, 2014; Huang *et al.*,2016)、牙形石(王金星,2004)、小壳化石(杨伟平等,1996)等过程中,相关学者均使用过激光共聚焦成像技术。但囿于前面提到的成像条件,并非所有化石都能通过该技术实现高质量成像。正因为如此,前人采用该技术研究化石的实例也较为零星。迄今为止,系统介绍激光共聚焦技术在古生物学领域应用的相关文献依旧贫乏,已有的应用实例也往往局限在对化石成像的随机尝试,或者是单纯的化石生物学研究,缺乏技术层面的详细探讨以及与普通光学显微镜和荧光显微镜对比,足见激光共聚焦技术在古生物学领域的应用潜力尚未被充分挖掘。

本文将系统介绍激光共聚焦显微技术的工作原理、样品制备方法,并以瓮安生物群微体化石为例,对比激光共聚焦技术相较于普通光学显微镜和常规荧光显微镜成像的优势,以期为该技术在古生物学领域的应用提供有益参考。

2 激光共聚焦显微技术的基本原理及功能

激光共聚焦显微技术实现的设备称为激光共聚焦显微镜(Confocal Laser Scanning Microscope),它主要由荧光显微镜、扫描检测单元、光源、光电倍增管和图像处理工作站等部分组成。激光共聚焦显微镜作为一个系统,通常配备有三种光源:卤素灯透射光光源、金属卤化物灯荧光光源和激光光源。不同光源在成像观察中功用不同,初步观察时,实验人员可以在透射光光源下快速浏览样品,待找到标本的感兴趣区后,可以关闭透射光光源,打开金属卤化物荧光灯照射标本,激发标本感兴趣区,通过荧光显微镜的目镜观察是否有自发荧光产生的结构衬度,若有,则可对感兴趣区进行照相,此时关闭荧光光源并打开激光光源,照射成像区域,结构受激光激发产生的荧光信号通过物镜传入扫描检测单元完成收集、过滤离焦光、信号放大等流程后,再传入图像处理工作站,由使用者进行相关的图像处理。

激光共聚焦系统中荧光显微镜选用的金属卤化物灯是在汞蒸气放电时加入某些金属卤化物,与传统的荧光显微镜使用的高压汞灯相比,它具有更好的显色性、更高的发光效率和更长的使用寿命(陈育明、刘洋,2011)。由于化石自发荧光往往较弱,很多情况下常规的高压汞灯很难激发化石产生荧光,而金属卤化物灯因其更高的亮度和显色性,大大增强了化石自发荧光的强度,使得许多由弱荧光物质组成的化石在高压汞灯下无法观察到的结构可以清晰地观察到。

为了获得最佳成像效果,与肉眼通过目镜实时观察化石结构时采用的光源不同,对样品感兴趣区域照相时需要使用激光光源。激光具有相干性、单色性和准直性等特征,用于激发化石产生荧光时能有效避免被照射物体受不同波长光激发出不同波长的荧光产生的视觉干扰,而且效率更高。更为重要的是,激光的亮度极高,相较于高压汞灯和金属卤化物灯,可以激发出更强的荧光,使得一些本身自发荧光较弱的物质得以被更清晰地观察到,大大提高了成像信噪比。根据工作介质的不同,激光光源可分为固体激光器、气体激光器、液体激光器、半导体激光器和自由电子激光器等(安毓英,2002)。现今已研发出的激光器达上千种,可提供各种波长,其中在激光共聚焦系统中常用的波长有405 nm(半导体激光器)、457 nm、477 nm、488 nm、514 nm(氩离子激

光器)、543 nm、561 nm、633 nm(氦氖激光器)等,可根据实际需要配置。

在检测荧光信号时,系统内形成独特的光路(插图 1-B)。激光从激光器中导出,照射在观测者研究的感兴趣区域内,激发出样品的自发荧光。自发荧光的光信号通过物镜传导到扫描检测单元中,再进行一系列处理。其中最重要的一步是过滤离焦光线:所有接收到的由样本发出的光信号需要经过一个特制的可调节大小的“针孔”,使只有恰好在焦平面的光线才能通过该小孔,其余光线(即成像平面高于或低于焦平面的光线)则不能通过(插图 1-A)。这种只在焦平面

上成像的方法称之为“光学切片(optical sectioning)”。经过针孔这一特殊光学构造的过滤之后,剩下的光线均来自焦平面。由于没有离焦光的干扰,光学切片成像更加清晰,图像分辨率和信噪比均超越了透射光学显微镜和常规荧光显微镜。

目前新型的激光共聚焦显微镜配备了光电倍增管,这一电子器件在系统接收荧光信号时能将微弱的光信号有效转变为电信号,通过加速电子冲击电极刺激次级电子大量释放,并多次重复以放大信号强度,使得成像信噪比大大提升,以便于后期信号观测与处理。

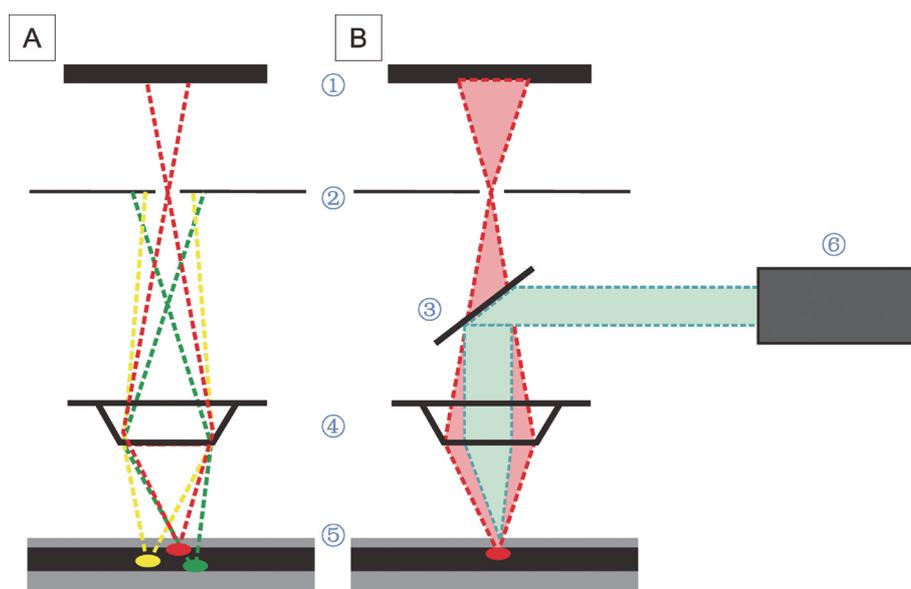


插图 1 激光共聚焦显微成像系统光路示意图

Diagram of the light path of confocal laser scanning microscopy system.

A. 激光共聚焦显微系统通过针孔过滤离焦光线的示意图,切片上红色点代表焦平面,红色虚线代表其被激发的自发荧光,黄色和绿色点代表焦平面附近,对应颜色虚线代表离焦的干扰光。B. 激光共聚焦显微系统工作时形成的光路,激光器发出指定波长激光光源(绿色光柱),激发物体的自发荧光(红色光柱)被探测器接收成像。① 检测器;② 针孔;③ 分光镜;④ 物镜;⑤ 切片;⑥ 激光器。

A. Only fluorescent photos (red) from focal plane are received by the detector, any photos above or below (yellow and green) the focal plane are largely blocked out by pinhole. B. Laser beam (green) scans across the slices and emits fluorescent light (red) from focal plane, which can go through the pinhole and finally reach the detector. ① Detector; ② Pinhole; ③ Spectroscope; ④ Objective lens; ⑤ Slices; ⑥ Laser.

综上所述,激光共聚焦显微技术是使用激光光源及基于针孔和光电倍增管的高分辨荧光成像,与其它光学成像技术不同,它利用高流明的单色激光避免多色光的干扰并激发更强荧光,利用针孔装置过滤离焦光线,实现清晰的焦平面成像,利用光电倍增管将收集到的光信号有效放大,可弥补一些化石样品因自发荧光微弱而导致成像信噪比低的缺陷。

3 样品制备

激光共聚焦显微成像技术在诸多研究领域应

用广泛,根据所观察的样品不同,样品制备方法也不同。在古生物学领域,使用该方法观察的样品多为化石薄片,少量为三维立体的实体化石。对于化石薄片而言,为更好地观察到目标化石的三维结构,在制作薄片的过程中应该保证合适的厚度,根据笔者的实验经验和前人文献,以 30—50 μm 为佳(Chi *et al.*, 2006)。该厚度比用于普通岩石学研究的薄片厚,有利于提高化石结构在透射光下成像的衬度并观察到一定的三维立体结构信息。但若岩石薄片透光性较差,激光则难以穿透表层到达需观察层位,或所观察层位被激发出的荧光难以穿透表层而不能被

观察和接收,所以制作岩石薄片过程中需要考虑标本的透光性,不能为了保留更多结构而一味增厚。因此,薄片最终厚度需要根据所观察标本的透光性等实际情况决定。若为经过碎样、酸洗等前处理获得的微体化石,如孢粉、硅藻等,也可采用先挑选后固定的方法,制作成薄片,以供观察。若为体积相对较大的实体标本,如琥珀、小壳化石和牙形刺等,可以选择适当的待观察面先简单固定或放置在干净清洁的平面上,方便观察时移动。为了更好地观察实体化石的细节,也可以对化石进行染色或表面镀层,获得更好的成像衬度。如在观察化石表面形态和高程起伏时,过往研究中有在化石表面使用少量氯化铵喷洒以增强成像效果的例子(Birkmann and Lundin,1996)。虽然对化石标本镀层和染色均不是激光共聚焦成像的必要条件,但这些前处理能为优化成像效果提供一些参考。

4 材料来源

本文以瓮安生物群磷酸盐化微体化石为研究对象,实例展示激光共聚焦显微技术在瓮安生物群中的应用。

埃迪卡拉纪瓮安生物群是发现于距今约 6.09 亿年前(Zhou *et al.*,2017)的磷酸盐化特异埋藏生物群,其中保存着大量精美、种类丰富的微体化石,包括动物成体(Chen *et al.*,2004; Yin *et al.*,2015)、多种卵裂方式的动物胚胎(Xiao *et al.*,1998; Chen *et al.*,2006,2009; Yin *et al.*,2013,2016)、藻类(陈孟莪、刘魁梧,1986; Zhang *et al.*,1998)、地衣(Yuan *et al.*,2005)、疑源类(Zhang *et al.*,1998; Xiao *et al.*,2014)及其它分类位置不明的化石类型(Xiao *et al.*,2014)等,为研究 6 亿年前海洋生物圈和真核多细胞生命多样性提供了精美的化石证据。更为重要的是,瓮安生物群中的动物胚胎和成体动物化石代表了迄今为止最古老的后生动物地质记录,为实证研究动物的起源,追溯寒武纪大爆发的源头打开了一个重要的窗口。此外,瓮安生物群是磷酸盐化特异埋藏化石群,化石均以三维立体形式保存了细胞甚至是亚细胞结构,为在细胞和亚细胞层面上开展化石生物学和比较组织学研究提供了难得的机会。

瓮安生物群丰富的化石种类和重要的研究价值使得新技术的使用和多元信息的挖掘成为必然。前人在研究过程中发现,瓮安地区埃迪卡拉系陡山沱

组按岩性自下而上可划分为下白云岩段、下磷矿段、中白云岩段、上磷矿段和条带状磷质白云岩段五段,赋存瓮安生物群化石的陡山沱组上磷矿段根据岩性和沉积环境又分为下部黑色磷块岩相和上部灰白色白云质磷块岩相(Zhu *et al.*,2007)。灰白色白云质磷块岩中的化石能通过 5%—10%的醋酸溶液侵蚀白云质围岩后得到三维立体保存的化石(陈均远,2004),而黑色磷块岩因富含磷质和硅质成分,醋酸溶液处理效果不佳,更多采用制作化石薄片的方法进行研究(袁训来等,2002)。虽然现今关于瓮安生物群的研究主要集中在三维立体保存的标本,但来自黑色磷块岩的薄片同样包含了海量生物学信息,而且黑色磷块岩中的化石因含硅质成分,其结构保存的精细程度比来自灰白色白云质磷块岩中的化石甚至更胜一筹,赋存的生物学信息更丰富。因此将激光共聚焦显微镜用于观察黑色磷块岩薄片中的瓮安生物群微体化石便是其中的一个研究新思路。

5 在瓮安生物群中的应用

前言中已经提到,在古生物学领域,激光共聚焦显微技术主要通过需成像对象所含成分之间自发荧光的强弱程度的差别来凸显不同结构之间的边界,只要成像对象部分或全部结构能在激光激发下自发荧光,就能区分出其与围岩之间的边界或化石内部结构之间的界限,获得比普通明场光学显微镜下更清晰锐利的结构图像。以磷酸盐化特异埋藏的瓮安生物群为例,采自黑色磷块岩中的化石含有较少的白云质,较多的磷质和少许硅质,其中磷质部分主要矿物为磷灰石,具有很好的自发荧光效果,白云质和硅质则在可见光激光的激发下无自发荧光。由于化石与围岩成分不同,且不同化石标本磷酸盐化程度也不同,激光共聚焦显微镜下瓮安生物群的微体化石能呈现多种不同的成像效果。下文将从化石轮廓形态成像、内部结构成像和三维结构重建等方面分别阐述激光共聚焦技术在瓮安生物群微体化石成像中的可行性和优点。

所有实例中激光共聚焦显微成像的图片均使用 Zeiss CLSM710 拍摄,激发光源波长为 488 nm。用于对比研究的明场光学显微照片和荧光显微照片使用 Nikon H550L 拍摄。其中,荧光光路激发光源为高压汞灯,提供全光谱的光,但在显微镜的光路中设置有三个滤光模块,通过过滤特定范围的波段分别使得蓝色、绿色、红色的光通过落射在样品上。

5.1 化石轮廓形态成像

当化石的磷酸盐化程度较弱,而围岩的主要成分为磷酸盐岩(即胶磷矿)时,有利于对化石整体轮廓形态进行高分辨成像。胶磷矿主要由纳米尺度的磷灰石晶体构成,在明场或偏光显微镜下均无法观察到晶体结构(前人认为是隐晶质或非晶质)。幸运的是,磷灰石会在适宜波段激光(比如 488 nm)激发下产生强烈的荧光,使得视野内围岩部分十分明亮。相较之下,化石主要被硅化或者碳酸盐化,磷酸盐含量较低,在相应的激光激发下不发荧光或荧光十分微弱,因而视野内化石部分较暗。此时,在化石与围岩之间有非常清晰的结构衬度,即两者的边界锐利可见。如插图 2 所示,A 图展示的是普通光学显微镜(A1)和激光共聚焦显微镜(A2)对同一个标本进行成像的差异:A2 中,化石与围岩的边界锐利,且内部多道波浪状内衬结构(lining)清晰可见;A1 中

的化石与围岩的边界不如图 A2 清晰,内部的波浪状内衬分辨不清,但有一亮色的环带,在激光共聚焦显微镜下只发微弱的荧光。所以使用不同的成像技术所得的两张图片可以互相结合以补充观察细节。插图 2-B 展示的是一枚疑源类化石,与插图 2-A 中的标本类似,因为化石与围岩所含成分差异,不仅可以清晰观察到围岩与化石之间的边界,而且可以观察到化石内部腐烂后被磷酸盐填充的中空部位(插图 2-B1 中方框标记的较亮区域)。该疑源类标本表面凸起的刺状结构磷酸盐化程度十分微弱,几乎不发荧光,在较强荧光的围岩对比下可以清晰地分辨出其形态和密度。标本刺状结构附着的囊包本身未被磷酸盐化,故在激光共聚焦显微镜下为一圈细窄的黑色不发光环带(插图 2-B2),之下则为一圈较宽的亮色环带,推测应为次生的磷灰石内衬结构。

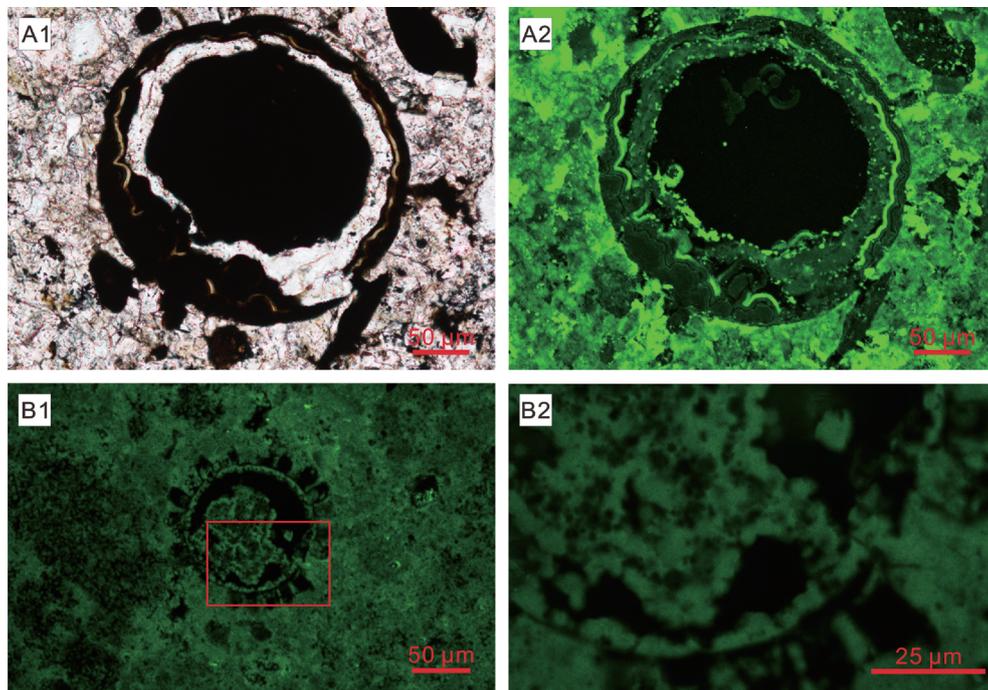


插图 2 瓮安生物群不明属性的微体化石和大型带刺疑源类

An unknown microfossil from the Weng'an biota and a large acanthomorphic acritarch from the Weng'an biota.

A. 瓮安生物群中不明属性的微体化石,A1. 为普通光学显微镜透射光下成像;A2. 为同一枚化石在激光共聚焦显微镜下成像。B. 大型带刺疑源类在激光共聚焦显微镜下不同放大倍率的成像,B1. 为该化石全貌;B2. 为 B1 所示红框中的局部放大。

A. An unknown microfossil from the Weng'an biota, A1. imaged by transmitted light under ordinary optical microscope; A2. the same fossil imaged by confocal laser scanning microscope. B. A large acanthomorphic acritarch imaged by confocal laser scanning microscope at different magnifications, B1. the entire appearance; B2. a close-up view of the framed area in B1.

5.2 化石内部结构成像

当化石整体磷酸盐化程度较高时,在激光激发下自发荧光较强,内部结构清晰可见。若此时的围岩主要由碳酸盐岩组成,在激光下几乎不发荧光,使

得视野内的背景黑暗,则可形成良好衬度,有助于对化石内部结构进行成像。

如插图 3-A 为一组具网状多细胞结构的藻类标本的两种显微成像的对比,其中图 3-A1 为普通

光学显微镜下拍摄的图像,图 3-A2 为激光共聚焦显微镜下拍摄的图像,两者对比不难发现该网状藻类的细胞结构在图 3-A2 中更为清晰,细胞之间的空间关系更为明确。插图 3-B 则展示了另一组多细胞藻类(可能的四分孢子球藻)的镜下成像,其中图 3-B1 为普通明场光学显微镜下图像,图 3-B2 为同一个标本在激光共聚焦显微镜下拍摄的图像,图 3-B3,3-B4,3-B5 分别是在传统荧光显微镜下蓝色、绿色和红色光的成像效果。由于荧光显微镜的激发光通量较低,故成像时单张照片的曝光时间是明场光学显微镜和激光共聚焦显微镜的数倍甚至数十倍。对比图中箭头所指三个区域,不难发现,普通明场显微镜成像(插图 3-B1)及传统荧光显微镜成像(插图 3-B3,3-B4,3-B5)细胞结构模糊不清。而使用激光共聚焦显微系统成像的图片(插图 3-B2),其四分孢子状细胞结构整体清晰,边界明确,可观察到的结构细节更多,由此可见该情况下激光共聚焦显

微成像比普通光学显微镜更具优势,而传统的荧光显微镜则不能满足成像需求。

若化石部分结构磷酸盐化,部分为有机质或碳酸盐化保存的情况,则会出现化石内磷酸盐化的部分区域明亮、不含磷酸盐的部分黑暗的现象,有利于呈现化石结构中细胞分化、定向等信息。如插图 4-A 中展示的多细胞组织中每个细胞的细胞壁部分磷酸盐化程度高,荧光信号强,呈现清晰的多细胞网状结构,但不同区域的细胞形态、尺寸和空间排列方式有明显差异:左侧区域细胞呈多角状平铺,无明显定向;中部细胞拉长,呈菱角状,弧形定向排列;右侧细胞尺寸较其它区域明显增大。这些特征表明该个体已经发生细胞分化。插图 4-B 为八细胞期动物胚胎化石切面,其中细胞质部分磷酸盐含量低,荧光信号十分微弱,整体呈暗色,但细胞边界部分磷酸盐化程度较高,荧光信号较强,使得细胞整体轮廓分明。

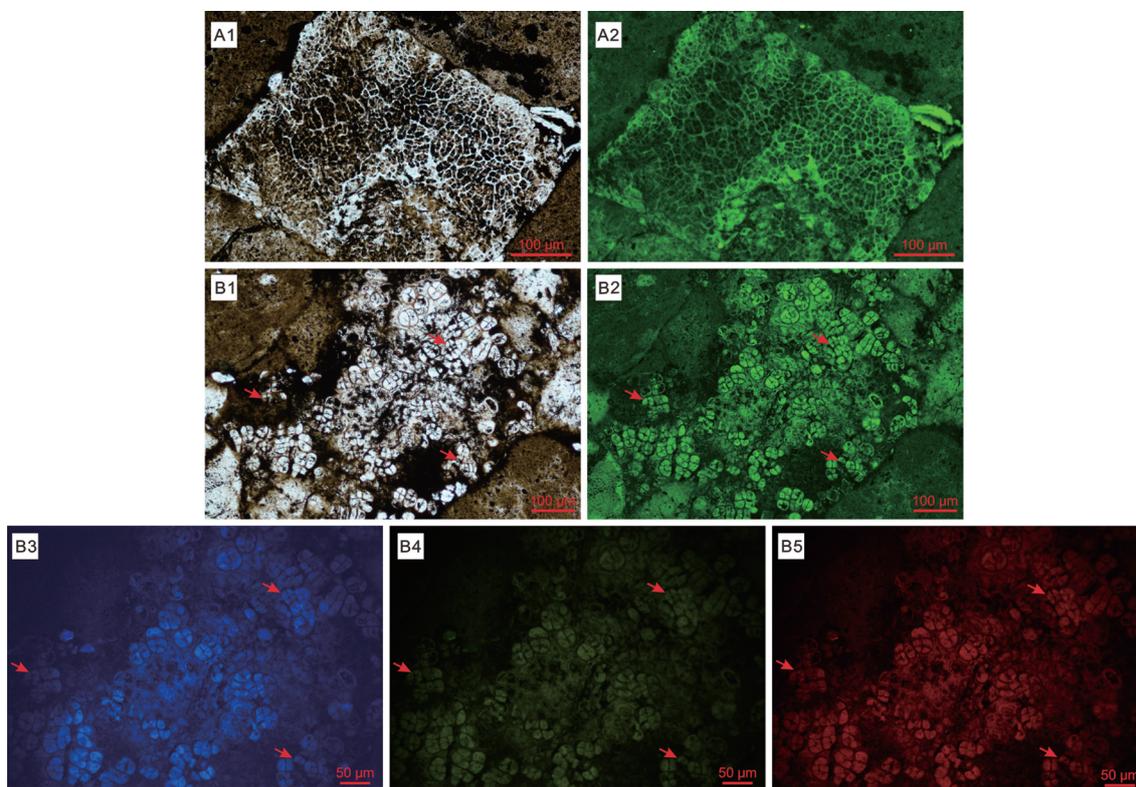


插图 3 三种成像技术(传统光学显微镜成像、传统荧光显微镜成像和激光共聚焦成像)对瓮安多细胞藻类化石成像效果对比

The comparisons of imaging qualities of conventional microscopy, epifluorescence microscopy and CLSM.

A. 一多细胞藻类的网状结构局部, A1. 普通光学显微镜成像; A2. 激光共聚焦显微镜成像。B. 可能的四分孢子球藻化石, B1. 普通光学显微镜成像; B2. 激光共聚焦显微镜成像; B3—B5. 同一标本分别使用传统荧光显微镜蓝色、绿色、红色光照射下的成像,红色箭头处指示不同光源下的几处成像差异对比。

A. A multicellular algae with network multicellular structure, A1. imaged by ordinary optical microscopy; A2. imaged by confocal laser scanning microscopy. B. A possible *Paratetraphycus*, B1. imaged by ordinary optical microscope; B2. imaged by confocal laser scanning microscope; B3—B5 are images captured by epifluorescence microscope. The blue, green and red light omitted by fluorescent mercury-vapour lamp, respectively. Red arrows indicate the contrasts among pictures.

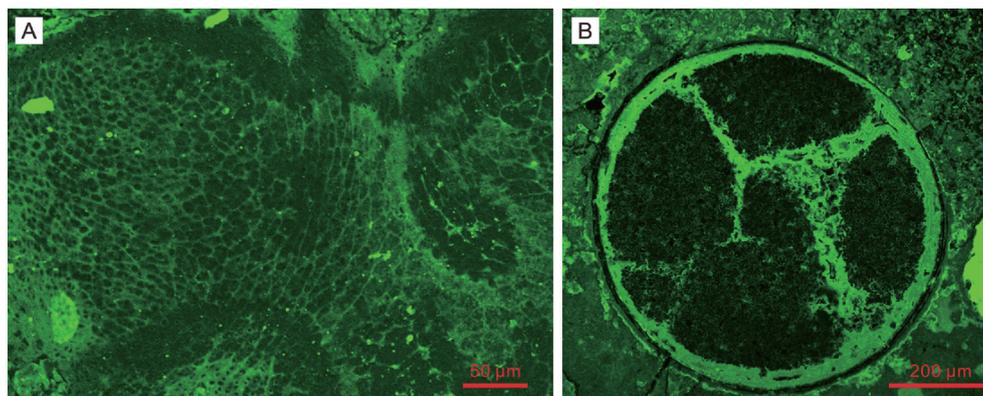


插图 4 具有细胞分化的多细胞藻类网状结构及八细胞期动物胚胎的激光共聚焦成像

CLSM images of a multicellular algae with cell differentiation and network structure and an animal embryo at 8-cell stage.

A. 多细胞藻类网状结构,具明显的大小分化和形态差异,且部分有明显定向性。B. 八细胞期动物分裂胚胎,细胞间隙明亮,内部可见颗粒状结构。

A. A multicellular algal specimen with obvious cell differentiation. B. An eight-cell stage animal embryo with bright intercellular space and dark granules inside.

5.3 化石三维结构重建

利用激光共聚焦显微技术中基于分层激发荧光扫描的三维立体重建功能,可观察黑色磷块岩切片中个体微小但具有一定厚度(30—50 μm)的微体化石的三维结构。三维立体重建功能通过设定合适的步径(通常为数微米),变换焦平面连续拍摄多张图像,并通过专业软件将来自不同焦平面的多图组合叠加成具有一定厚度的三维立体图像(体数据),能够揭示一定厚度内的细微变化。多图叠加是对多个层面的结构信息综合,保存了不同焦平面上清晰的化石信息的同时,不丢失焦平面的深度信息,这种称作“光学切片”叠加的功能在单一体数据中实现了化石立体结构信息的三维可视化,与常规明场光学显微镜的 Z 轴叠加功能具有本质区别。后者是将不同焦平面上的所有结构信息叠加到单张二维图像上,实际上将标本 Z 轴信息丢失了,造成化石结构的严重变形,比如一个球形化石通过 Z 轴叠加拍摄的图像则为一个平面的圆,而非一个球。

插图 5 为多细胞藻类网状结构在不同焦平面上的连续成像(插图 5-A—H)及其叠加(插图 5-I)。连续成像的 8 张图片可见结构上细微的差别,体现了不同焦平面上化石结构的变化。叠加后网状结构不同位置的疏密程度差异清晰。三维立体重建功能还可以制作不同动画特效,如不同方向旋转、切割等,对展示其三维结构、增强对化石各个角度的认知有所帮助。

6 结论与展望

与传统荧光显微镜及明场透射光学显微镜相

比,激光共聚焦显微技术有效过滤离焦光的成像方式使得每一张“光学切片”都只有该层面的成像信息,避免了上下焦平面虚影的干扰和合成中的多次重叠,提高了成像的信噪比和空间分辨率,为能自发荧光的特异埋藏化石(如磷酸盐化的瓮安生物群微体化石)提供更好的成像衬度。通过形成“光学切片”的方法叠加每一层焦平面所成图像,实现基于光学成像的三维重建,帮助我们恢复及提取化石的立体结构信息,也有别于传统光学显微镜多次成像再后期叠加合成的“伪三维”图像。上文中的研究实例显示,由于化石不同结构之间组成矿物成分差异导致的自发荧光有强弱之分,可以较好地识别化石内部结构和边界,为化石生物学和埋藏学研究提供了一些传统手段无法获取的新信息。

激光共聚焦作为众多成像技术手段之一,旨在提升显微观察的精确度。虽然激光共聚焦在化石成像中具有一定的特色和优势,但不存在万能的成像技术,每一种技术的应用范围均有明显的局限性,激光共聚焦技术也不例外,它的应用毫无疑问是对传统光学成像技术的提升和有益补充。

当前,在古生物学领域多种成像技术的联用,以在多尺度范围全方位获取化石结构和化学成分的信息是大势所趋。激光共聚焦显微术和传统光学显微术(光学显微镜)、X 射线显微术(显微 CT 技术)、电子显微术(扫描电镜、聚焦离子束-透射电镜等)以及显微谱学技术(比如 X 射线荧光光谱和拉曼光谱显微术)的联用将进一步挖掘该技术的潜力。例如瓮安生物群中的磷块岩经过酸洗、挑样后的化石使用扫描电镜可观察其表面结构,进行初步遴选;显微 CT

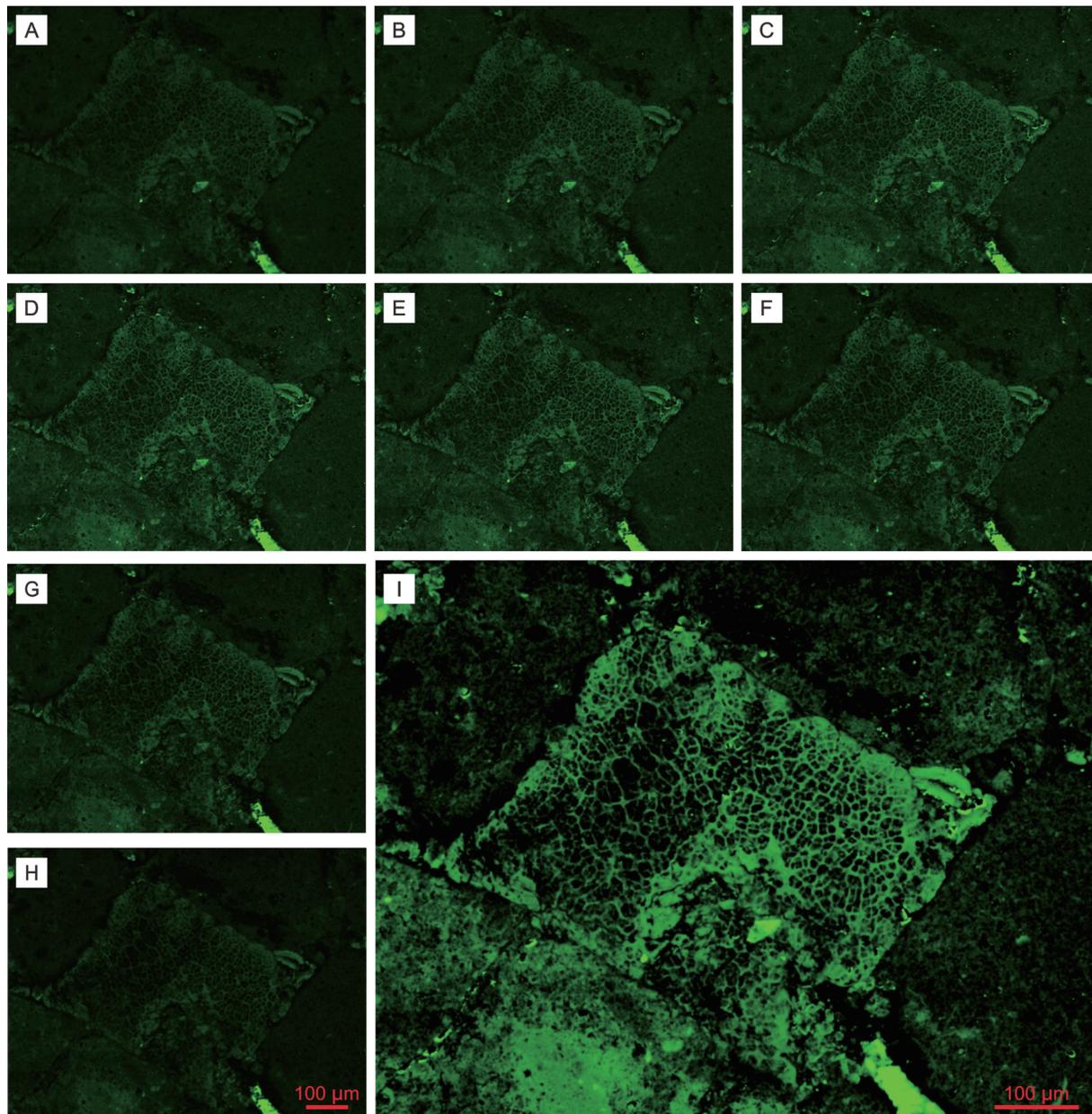


插图 5 多细胞藻类网状结构的激光共聚焦成像

CLSM images of a multicellular algae fossil with network-like cellular structure.

A—H. 同一多细胞藻类网状结构在不同焦平面上的连续成像,可见结构上细微的差别,其中明暗差异代表接收到的该化石在不同焦平面上自发荧光的强弱程度不一样。I. 为多张不同焦平面上连续成像的叠加。

A—H. A series of images of the same multicellular algae in different focal planes and some slight differences of its structure can be observed. The differences of the brightness in different images indicate the intensity of fluorescence at different focal planes. I. Three-dimensional reconstruction of the specimen based on the successive images of multiple focal planes.

能基于密度差异揭示化石内部三维信息,若具有研究价值的信息,可以采用定向包埋的方法制作切片,然后再使用激光共聚焦显微技术等手段详细研究;黑色磷块岩的岩石切片可以综合普通光学显微镜和激光共聚焦显微镜进行对比观察。而在上文所提及的成分研究方面,如插图 4-B 动物八细胞期分裂胚胎中可见的颗粒状物质,可以用扫描电镜-能谱或拉

曼光谱仪进行测定,了解具体的化学成分及含量,进一步探究其是否可能为细胞质中的特殊组成,如卵黄颗粒等。总之,多手段联用能尽可能降低信息缺失而导致的多解或误判,为科研人员更好地理解化石生物学和埋藏学提供更详实的证据。

致谢 评审专家提出宝贵修改意见,特此致谢。

参 考 文 献 (References)

- An Yu-ying (安毓英), 2002. Chapter two; Common laser. *Laser & Infrared (激光与红外)*, **32**(3): 201–205 (in Chinese).
- Birkmann H, Lundin R F, 1996. Confocal microscopy: Potential applications in micropaleontology. *Journal of Paleontology*, **70**(6): 1084–1087.
- Cai Chen-yang, Huang Di-ying, 2014. The oldest micropepline beetle from Cretaceous Burmese amber and its phylogenetic implications (Coleoptera: Staphylinidae). *Naturwissenschaften*, **101**: 813–817.
- Chen Jun-yuan (陈均远), 2004. *The Dawn of Animal World*. Nanjing: Jiangsu Science and Technology Publishing House. 1–366 (in Chinese).
- Chen Jun-yuan, Bottjer D J, Davidson E H, Dornbos S Q, Gao Xiang, Yang Yong-hua, Li Chia-wei, Li Gang, Wang Xiu-qiang, Xian Ding-chang, Wu Hung-jen, Hwu Yeu-kuang, Tafforeau P, 2006. Phosphatized polar lobe-forming embryos from the Precambrian of southwest China. *Science*, **312**(5780): 1644–1646.
- Chen Jun-yuan, Bottjer D J, Davidson E H, Li Gang, Gao Feng, Cameron R A, Hadfield M G, Xian Ding-chang, Tafforeau P, Jia Quan-jie, 2009. Phase contrast synchrotron X-ray microtomography of Ediacaran (Doushantuo) metazoan microfossils: Phylogenetic diversity and evolutionary implications. *Precambrian Research*, **173**: 191–200.
- Chen Jun-yuan, Bottjer D J, Oliveri P, Dornbos S Q, Gao Feng, Ruffins S, Chi Hui-mei, Li Chia-wei, Davidson E H, 2004. Small bilaterian fossils from 40 to 55 Million Years before the Cambrian. *Science*, **305**(5681): 218–222.
- Chen Jun-yuan, Schopf J W, Bottjer D J, Zhang Chen-yu, Kudryavtsev A B, Tripathi A B, Wang Xiu-qiang, Yang Yong-hua, Gao Xiang, Yang Ying, 2007. Raman spectra of a Lower Cambrian ctenophore embryo from southwestern Shaanxi, China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**(15): 6289–6292.
- Chen Meng-e (陈孟毅), Liu Kui-wu (刘魁梧), 1986. The geological significance of newly discovered microfossils from the Upper Sinian (Doushantuo Age) Phosphorites. *Scientia Geologica Sinica (地质科学)*, **21**(1): 46–53 (in Chinese with English abstract).
- Chen Shang-bin (陈尚斌), Zuo Zhao-xi (左兆喜), Zhu Yan-ming (朱炎铭), Fu Chang-qing (付常青), Zhang Han (张寒), 2015. Applicability of the testing method for the maturity of organic matter in shale gas reservoirs. *Natural Gas Geoscience (天然气地球科学)*, **26**(3): 564–574 (in Chinese with English abstract).
- Chen Yu-ming (陈育明), Liu Yang (刘洋), 2011. Status and research advances of metal halide lamp. *China Light & Lighting (中国照明电器)*, **2011**(4): 1–5 (in Chinese with English abstract).
- Chi Hui-mei, Feng Man, Xiao Zhong-dang, Lu Zu-hong, 2008. Preservation and fluorescence of the microfossils from Neoproterozoic Doushantuo Formation. *Microscopy Research and Technique*, **71**: 260–266.
- Chi Hui-mei, Xiao Zhong-dang, Fu De-gang, Lu Zu-hong, 2006. Analysis of fluorescence from algae fossils of the Neoproterozoic Doushantuo formation of China by confocal laser scanning microscope. *Microscopy Research and Technique*, **69**(4): 253–259.
- Davidovits P, Egger M D, 1969. Scanning Laser Microscope. *Nature*, **223**(5208): 831.
- Dobretsov M, Hayar A, Kockara N T, Kozhemyakin M, Light K E, Patyal P, Pierce D R, Wight P A, 2019. A transgenic mouse model to selectively identify $\alpha 3$ Na,K-ATPase expressing cells in the nervous system. *Neuroscience*, **398**: 274–294.
- García-Plazaola J I, Fernández-Marina B, Dukec S O, Hernández A, López-Arbeload F, Becerril J M, 2015. Autofluorescence: Biological functions and technical applications. *Plant Science*, **236**: 136–145.
- Guo Zi-xiao, Peng Xiao-tong, Czaja A D, Chen Shun, Ta Kai-wen, 2018. Cellular taphonomy of well-preserved Gaoyuzhuang microfossils: A window into the preservation of ancient cyanobacteria. *Precambrian Research*, **304**: 88–98.
- Hickey P C, Swift S R, Roca M G, Read N D, 2004. Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. *Methods in Microbiology*, **34**(4): 63–87.
- Hochuli P A, Feist-Burkhardt S, 2004. A boreal early cradle of Angiosperms? Angiosperm-like pollen from the Middle Triassic of the Barents Sea (Norway). *Journal of Micropalaeontology*, **23**: 97–104.
- Huang Di-ying, Bechly G, Nel P, Engel M S, Prokop J, Azar D, Cai Chen-yang, Kamp T, Staniczek A H, Garrouste R, Krogmann L, Rolo T S, Baumbach T, Ohlhoff R, Shmakov A S, Bourgoin T, Nel A, 2016. New fossil insect order Permopsocida elucidates major radiation and evolution of suction feeding in hemimetabolous insects (Hexapoda: Acercaria). *Scientific Reports*, **6**(6): 23004.
- Jackson F D, Horner J R, Varricchio D J, 2010. A study of a Troodon egg containing embryonic remains using epifluorescence microscopy and other techniques. *Cretaceous Research*, **31**: 255–262.
- Leszczuk A, Szczuka E, 2018. A study of a Troodon egg containing embryonic remains using epifluorescence microscopy and other techniques. *Plant Physiology and Biochemistry*, **123**: 24–33.
- Li Yong, Guo Jun-feng, Zhang Xing-liang, Zhang Wan-qian, Liu Yun-huan, Yang Wei-xian, Li Yuan-yuan, Liu Qian-qun, Shu De-gan, 2008. Vase-shaped microfossils from the Ediacaran Weng'an biota, Guizhou, South China. *Gondwana Research*, **14**(1): 263–268.
- Lin Rui, Davis A, 1988. A fluorogeochemical model for coal macerals. *Organic Geochemistry*, **12**(4): 363–374.
- Liu Peng-ju, Xiao Shu-hai, Yin Cong-yu, Zhou Chuan-ming, Gao

- Lin-zhi, Tang Feng, 2010. Systematic description and phylogenetic affinity of tubular microfossils from the Ediacaran Doushantuo Formation at Weng'an, South China. *Palaeontology*, **51**(2): 339–366.
- Minsky M, 1988. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*, **10**(4): 128–138.
- Nix T, Feist-Burkhardt S, 2003. New methods applied to the microstructure analysis of Messel oil shale: confocal laser scanning microscopy (CLSM) and environmental scanning electron microscopy (ESEM). *Geological Magazine*, **140**(4): 469–478.
- Pradier B, Bertrand P, Martinez L, Laggoun-Defagre F, 1991. Fluorescence of organic matter and thermal maturity assessment. *Organic Geochemistry*, **17**(4): 511–524.
- Schopf J W, Kudryavtsev A B, Tripathi A B, Czaja A D, 2010. Three-Dimensional Morphological (CLSM) and Chemical (Raman) Imagery of Cellularly Mineralized Fossils. *Taphonomy: process and bias through time*. In: Allison P A, Bottjer D J (ed.), *Aims & Scope Topics in Geobiology Book*. Springer: Heidelberg. Springer: Heidelberg. 457–486.
- Schopf J W, Sergeev V N, Kudryavtsev A B, 2015. A new approach to ancient microorganisms: Taxonomy, paleoecology, and biostratigraphy of the Lower Cambrian Berkuta and Chulaktau microbiotas of South Kazakhstan. *Journal of Paleontology*, **89**(5): 695–729.
- Schopf J W, Tewari V C, Kudryavtsev A B, 2008. Discovery of a new chert-permineralized microbiota in the Proterozoic Buxa Formation of the Ranjit Window, Sikkim, Northeast India, and its astrobiological implications. *Astrobiology*, **8**(4): 735–746.
- Schopf J W, Tripathi A B, Kudryavtsev A B, 2006. Three-dimensional confocal optical imagery of Precambrian Microscopic Organisms. *Astrobiology*, **6**(1): 1–16.
- Scott A C, Hemsley A R, 1991. A comparison of new microscopical techniques for the study of fossils spore wall ultrastructure. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **67**: 133–139.
- Talyzina N M, 1998. Fluorescence intensity in Early Cambrian acritarchs from Estonia. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **100**: 99–108.
- Wang Jin-xing (王金星), 2004. Applications of a new method of confocal microsystem to geological studies. *Geological Review (地质论评)*, **50**(2): 215–217 (in Chinese with English abstract).
- Xiao Shu-hai, Knoll A H, Yuan Xun-lai, Poeschel C M, 2004. Phosphatized multicellular algae in the Neoproterozoic Doushantuo Formation, China, and the early evolution of florideophyte red algae. *American Journal of Botany*, **91**(2): 214–227.
- Xiao Shu-hai, Zhang Yun, Knoll A H, 1998. Three-dimensional preservation of algae and animal embryos in a Neoproterozoic phosphorites. *Nature*, **391**(6667): 553–558.
- Yang Wei-ping (杨伟平), Zhang Hai-chun (张海春), Wang Bing (王冰), Xu Fang-ming (徐放鸣), 1996. A new technique for microfossil study by Laser Scanning Confocal Imaging System. *Acta Palaeontologica Sinica (古生物学报)*, **35**(6): 730–733 (in Chinese with English abstract).
- Yang Wei-ping (杨伟平), Zhang Hai-chun (张海春), Xu Fang-ming (徐放鸣), 1998. Advanced research of ultra micro-structure of Middle Permian Acritarch *Micrhystridium*, West of Yunnan Province. *Chinese Science Bulletin (科学通报)*, **43**(2): 206–208 (in Chinese).
- Yin Lei-ming (尹磊明), Bian Li-zeng (边立曾), Yuan Xun-lai (袁训来), 2003. The discovery of branched tubules and microcircular spiral thickened tubules of the Ruyang Group in Middle Proterozoic, Shanxi Province. *Scientia Sinica (中国科学)*, **33**(8): 769–774 (in Chinese).
- Yin Zong-jun, Zhu Mao-yan, Bottjer D J, Zhao Fang-chen, Tafforeau P, 2016. Meroblastic cleavage identifies some Ediacaran Doushantuo (China) embryo-like fossils as metazoans. *Geology*, **44**(9): 735–738.
- Yin Zong-jun, Zhu Mao-yan, Davidson E H, Bottjer D J, Zhao Fang-chen, Tafforeau P, 2015. Sponge grade body fossil with cellular resolution dating 60 Myr before the Cambrian. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**(12): E1453.
- Yin Zong-jun, Zhu Mao-yan, Tafforeau P, Chen Jun-yuan, Liu Peng-ju, Li Gang, 2013. Early embryogenesis of potential bilaterian animals with polar lobe formation from the Ediacaran Weng'an Biota, South China. *Precambrian Research*, **225**(1): 44–57.
- Yuan Xun-lai, Xiao Shu-hai, Taylor T N, 2005. Lichen-like symbiosis 600 million years ago. *Science*, **308**(5724): 1017–1020.
- Yuan Xun-lai (袁训来), Xiao Shu-hai (肖书海), Yin Lei-ming (尹磊明), Knoll A H, Zhou Chuan-ming (周传明), Mu Xi-nan (穆西南), 2002. Doushantuo Fossils: Life on the Eve of Animal Radiation. Hefei: University of Science and Technology of China Press. 1–93.
- Zhang Yun, Yuan Xun-lai, Yin Lei-ming, 1998. Interpreting Late Precambrian Microfossils. *Science*, **282**(5395): 1783.
- Zhou Chuan-ming, Li Xian-hua, Xiao Shu-hai, Lan Zhong-wu, Ouyang Qing, Guan Cheng-guo, Chen Zhe, 2017. A new SIMS zircon U – Pb date from the Ediacaran Doushantuo Formation: age constraint on the Weng'an biota. *Geological Magazine*, **154**(6): 1193–1207.
- Zhu Mao-yan, Zhang Jun-ming, Yang Ai-hua, 2007. Integrated Ediacaran (Sinian) chronostratigraphy of South China. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **254**: 7–61.
- Zhuo Er-jun (卓二军), Tang Ling-yu (唐领余), Zhang Hai-chun (张海春), 2006. Application of Laser Scanning Confocal Microscope in fossil spore pollen observation. *Acta Palaeontologica Sinica (古生物学报)*, **45**(3): 430–436 (in Chinese with English abstract).

IMAGING PHOSPHATIZED MICROFOSSILS FROM THE EDIACARAN WENG'AN BIOTA USING CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY

WU Ruo-lin^{1, 4)}, WU Su-ping³⁾ and YIN Zong-jun^{1, 2)}

1) *State Key Laboratory of Palaeobiology and Stratigraphy, Nanjing Institute of Geology and Palaeontology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China zjyin@nigpas.ac.cn;*

2) *Center for Excellence in Life and Palaeoenvironment, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China;*

3) *Centre of Experiment and Technology, Nanjing Institute of Geology and Palaeontology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China;*

4) *University of Science and Technology of China, Hefei 230026*

Key words Confocal Laser Scanning Microscopy, Weng'an Biota, optical sectioning, auto-fluorescence, phosphatized

Abstract

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) is a fluorescence imaging technique using laser and pinhole to obtain images with higher resolution and better contrast compared to conventional optical microscopy. Although CLSM is a powerful tool applied in many fields such as biology, it has not been widely used in palaeontology yet, because not all fossils are auto-fluorescent. However, if fossil matrix could fluoresce excited by laser beam, sharp

contrast between fossils and matrix, or between different parts of fossils may be observed. In these cases, researchers can image inside microstructures with CLSM which can't be clearly visualized by epifluorescent microscope. In this article, we introduced the principle and work flow of sample preparation and imaged phosphatized microfossils from the Ediacaran Weng'an biota with CLSM. Our results suggest that the CLSM can help to obtain images with higher spatial resolution and better contrast in several cases.