

FV1000 共軛焦雷射掃描顯微鏡

初級課程：

- 一. 開機、關機程序
- 二. 快速共焦影像擷取要點
- 三. 系統硬體介紹
- 四. 基礎的螢光及共軛焦觀念
- 五. 雷射掃描共軛焦顯微鏡基本構成及成像關係
- 六. FV1000 雷射掃描共軛焦取圖技巧
- 七. FV1000 應用-1 time lapse
- 八. FV1000 應用-2 3D 成像

開機程序

1. 填寫使用紀錄簿 (Name, Lab, dye, laser to be used, Time)



2. 開啟適用雷射電源



3. 開啟PSU、汞燈電源、UCB box、電腦主機



4. 於 vista 畫面中鍵入密碼:fluoview
5. 點選 ASW2.1 進入 FV1000 軟體

關機程序

1. 關閉 ASW3.0 軟體畫面
2. 將電腦關機
3. 關閉 PSU 電源、汞燈電源、UCB box

警告:關閉汞燈電源後必須等待 15~20 分鐘才能再開啟電源

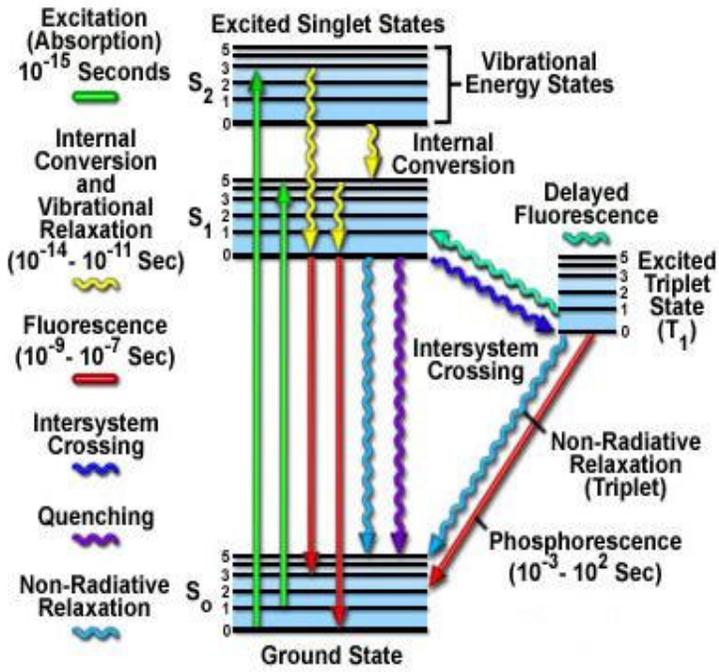
4. 關閉雷射電源

警告:Argon 氬離子雷射先關鑰匙，等待散熱風散停止運轉後再關電源按鈕

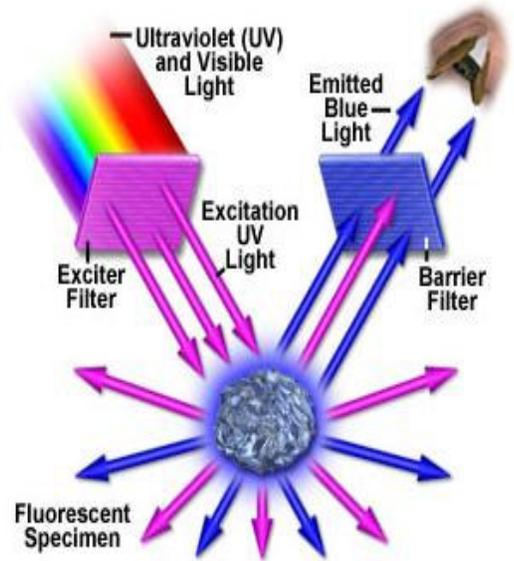
5. 填寫使用紀錄簿記錄使用時間
6. 將防塵套蓋上

警告:防塵套盡量不要掩蓋住汞燈,以免汞燈高溫融化防塵套

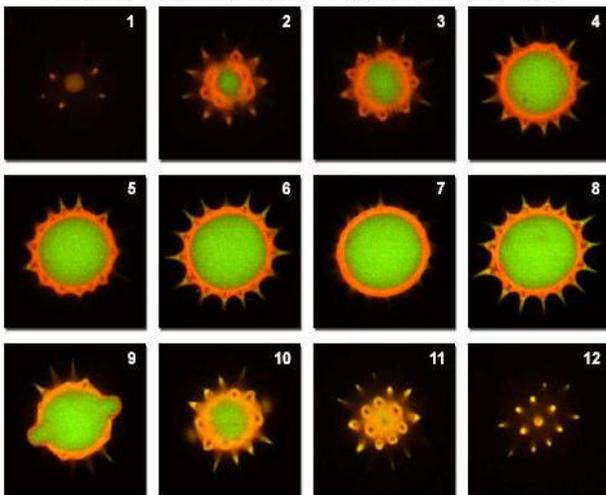
Jablonski Energy Diagram



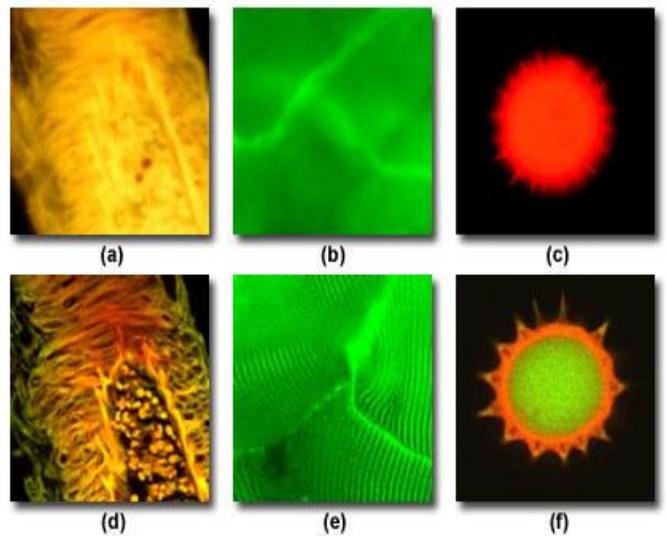
Principle of Excitation and Emission

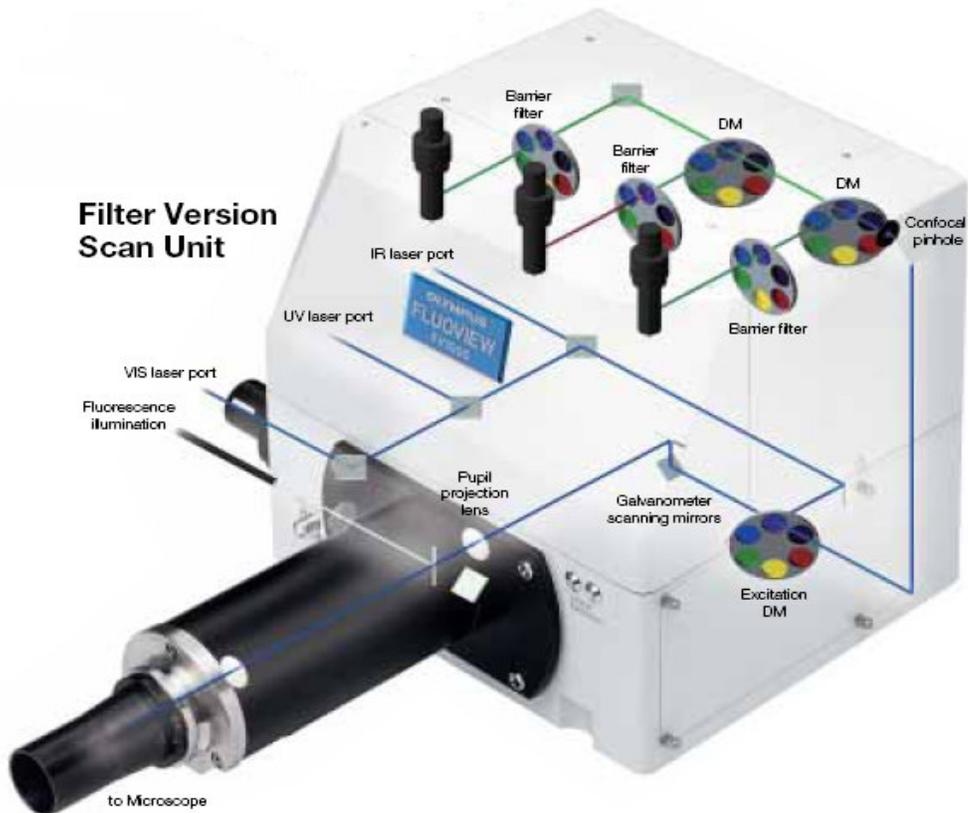
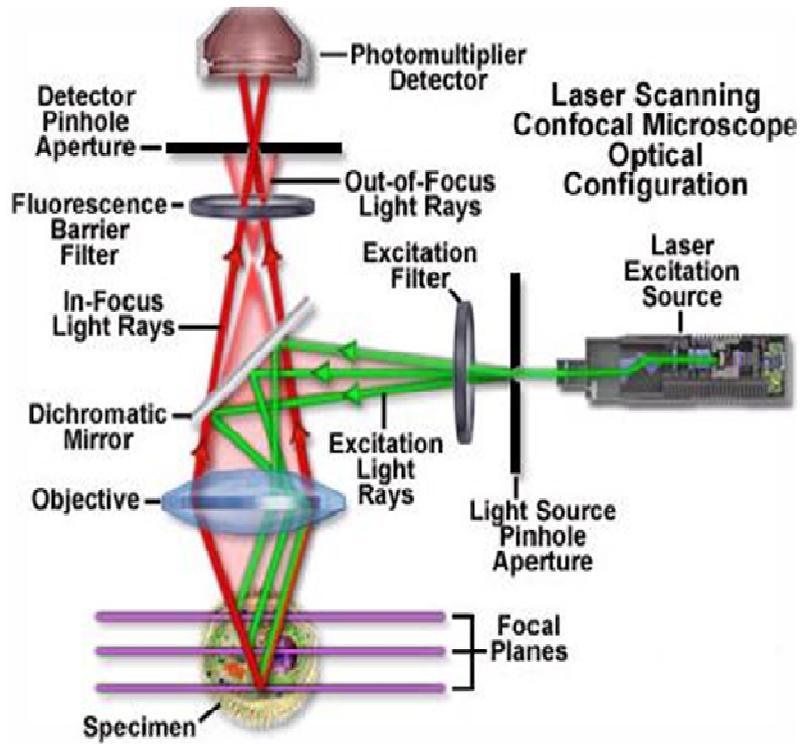


Pollen Grain Serial Optical Sections by Confocal Microscopy



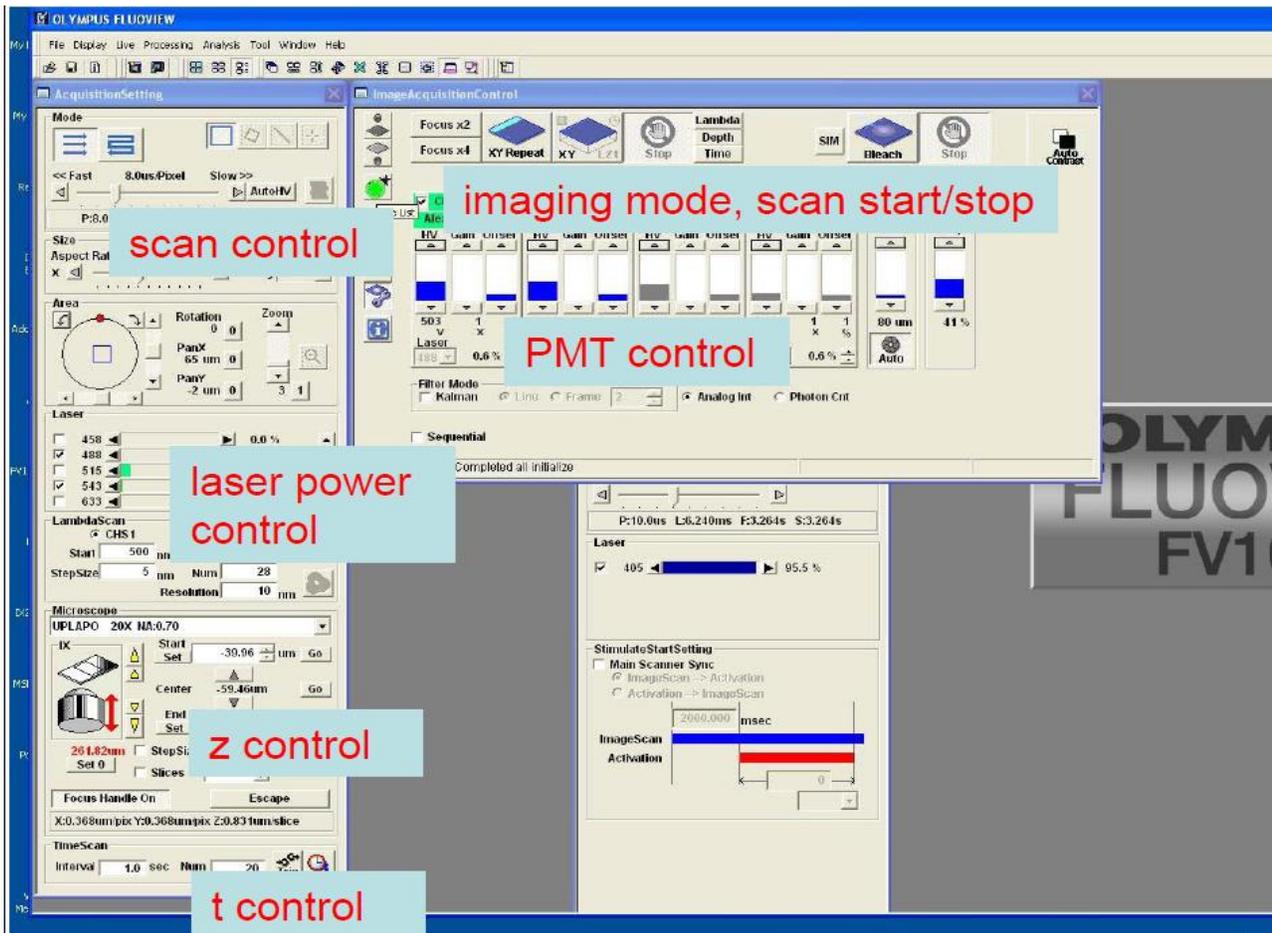
Confocal and Widefield Fluorescence Microscopy



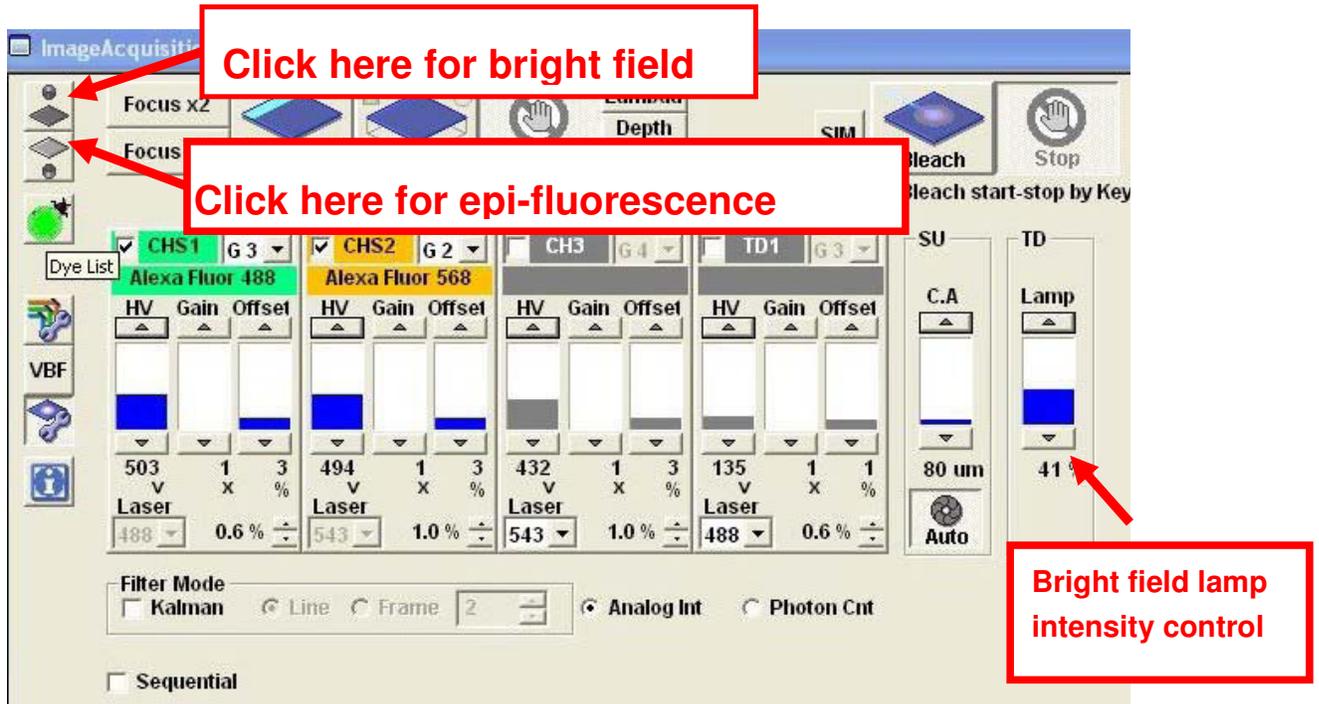


快速擷取共焦影像要點

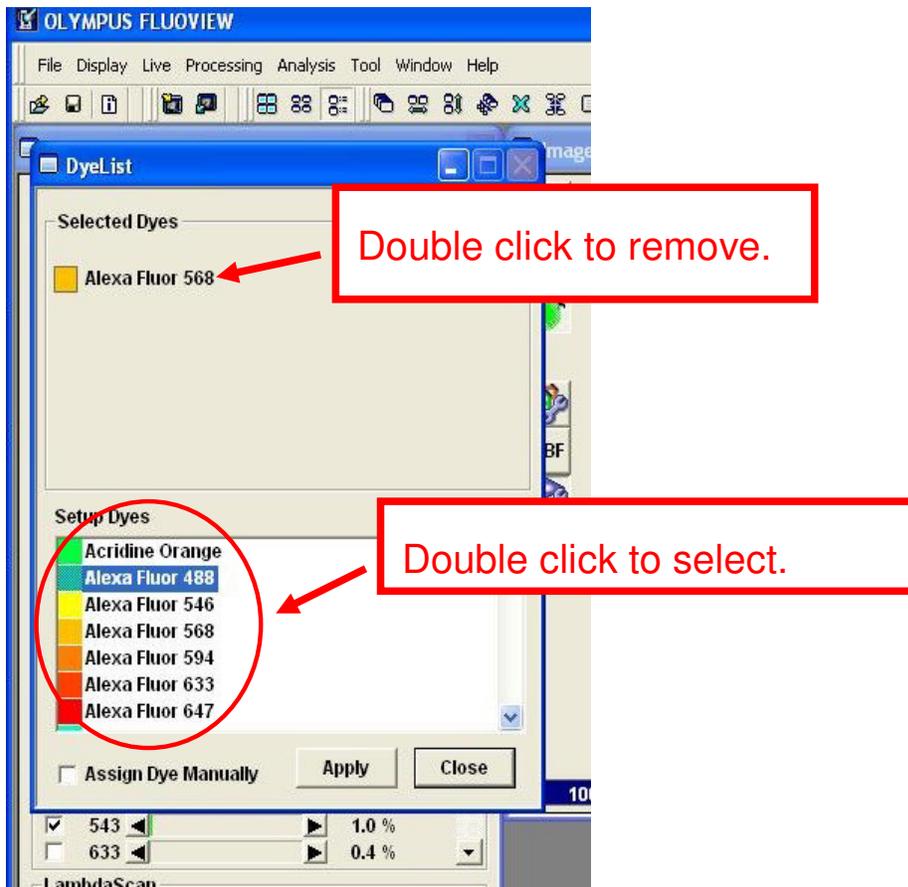
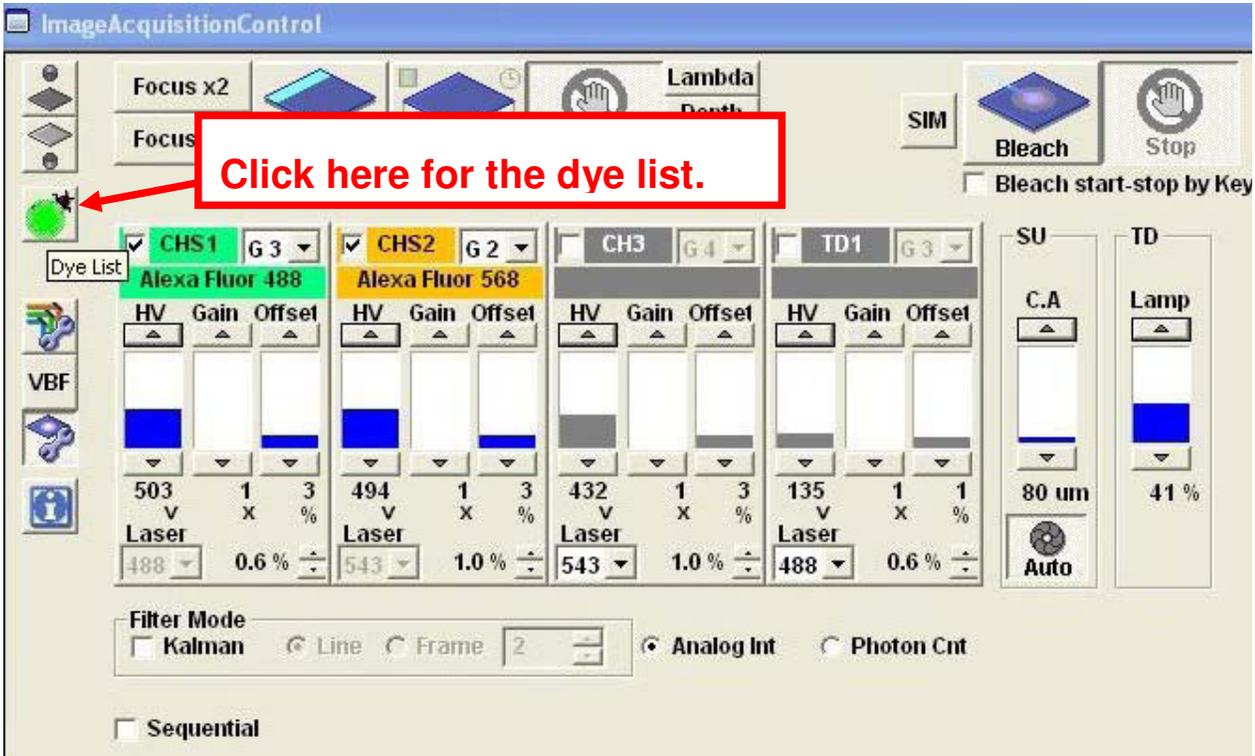
1. Run the fluoview software. (overview)



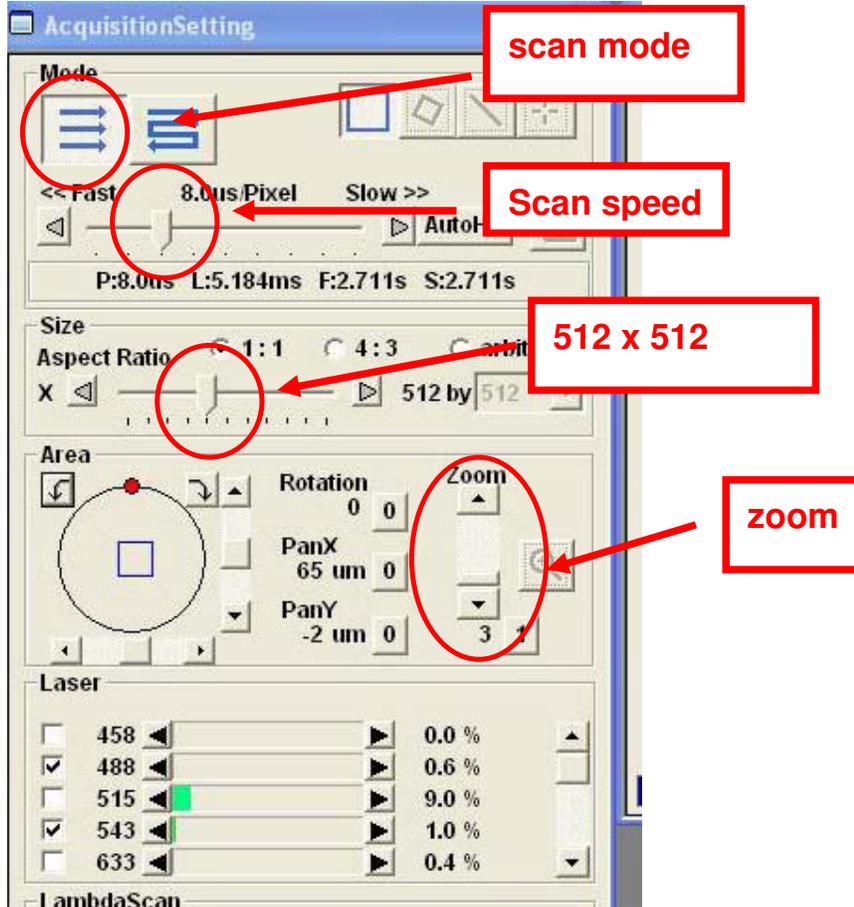
2. Check the sample with epi-fluorescence / bright field with eye-piece.



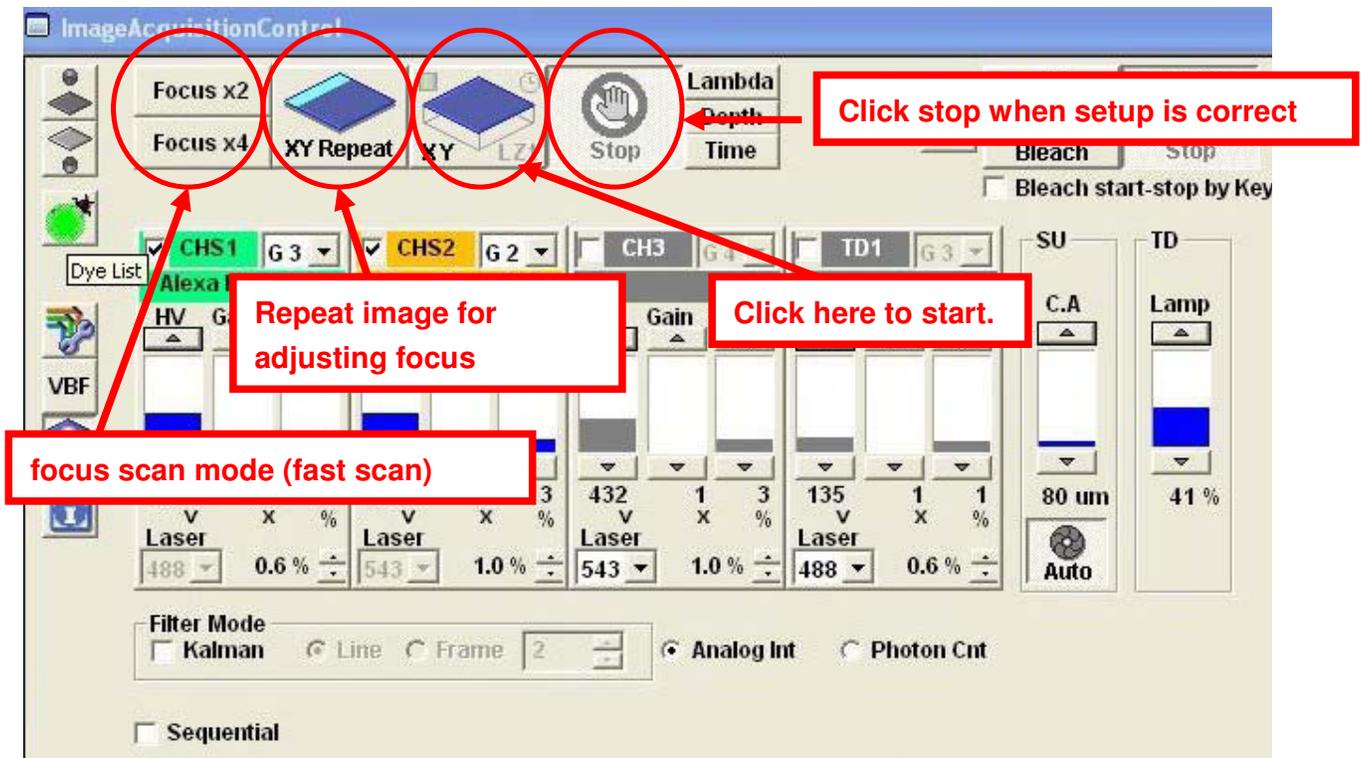
3. Select dyes from the list to setting up the optical configuration.



4. Check a default scan parameters



5. Check the focus, sample position, laser power, PMT voltage, offset, gain , color table, with focus scan mode (fast scan).



FV1000 雷射掃描共軛焦顯微鏡基本構成及成像關係

① 雷射：

激發樣品上的螢光物質，使其產生螢光

Laser		
<input type="checkbox"/>	458	21.0 %
<input checked="" type="checkbox"/>	488	63.0 %
<input type="checkbox"/>	515	51.2 %
<input type="checkbox"/>	543	49.0 %
<input type="checkbox"/>	633	49.0 %

雷射譜線和典型螢光染料（蛋白）的對應關係：

405nm： DAPI、Hoechst、BFP、CFP……

440/458nm： CFP……

488nm： FITC、GFP、Fluo-3/4、YOYO-1、Alexa488……

515nm： YFP……

543/559nm： Alexa546、TRITC、CY3、DsRed、PI、Alexa594……

633/635nm： CY5……

雷射強度利用：

可以用較強雷射光進行光漂白實驗；雷射越強圖像信噪比越好，但一定要慎重使用，否則會造成螢光漂白和光毒性

② 掃描：

利用 XY 掃描鏡，使會聚到標本上的雷射光束在標本平面水準移動

掃描速度：掃描速度越快取樣頻率越高但成像品質越差，單向掃描  圖像品質好，速度較慢。

雙向掃描  可以提高圖像速度，但圖像會有一定的圖元偏移，

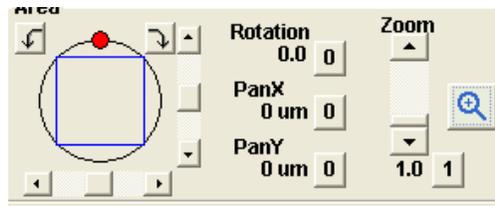
停留時間：雷射在每一點的停留時間，影響圖像信噪比。停留時間越長、可收集螢光越多、圖像噪音越低。但停留時間過長也會造成螢光漂白。



掃描解析度：一次成像雷射在標本上掃描的點數，從點掃描到 4Kx4K，掃描解析度越高圖像速度越慢。（但請注意掃描解析度 ≠ 共軛焦成像解析度，共軛焦成像解析度取決於物鏡解析度、掃描解析度和 ZOOM 功能的匹配情況）



ZOOM 放大功能：掃描鏡在更小的視野內掃描，使保證高掃描速度（低掃描解析度）情況下提高圖像解析度



③ Z 軸控制：

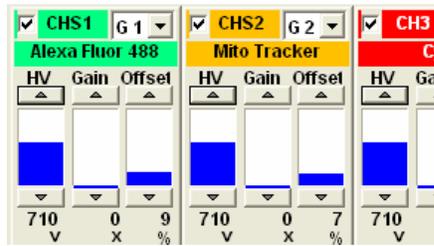
上下移動標本，聚焦感興趣平面，生成三維圖片

Step size：每一步移動的位移，最小步進 10nm。 StepSize

推薦 Z 軸步進 Op.：電腦會根據物鏡、針孔和螢光性質判斷光學切片的厚度，該 Optimum 為 Z 軸理論解析度的 1/2。但一般這個 Z 比較薄，可能需要做的光學切片較多。

④ 光電倍增管檢測器 (PMT)：

和雷射掃描匹配逐點採集螢光信號



HV = PMT 電壓，增加 HV 會提高檢測敏感度，但圖像噪音也會隨之增加

Gain = 後期信號放大，在圖像信號極低的情況下可以適當調節

Offset = 影像位準調整，Offset 越高，圖像背景變暗，但一些位準以下的螢光信號也可能被同時扣除

⑤ 共軛焦針孔 (Pinhole, Confocal Aperture) :

用於阻擋非焦平面光線進入偵測器，形成“共軛焦”效果。

直徑調節：選擇 Auto，電腦會計算出理論針孔值。針孔越小圖像光切效果越好，但光線弱。實際使用中可以適當調節共軛焦針孔以達到合理的光切效果。針孔越大，透過的光線越多，但光學切片效果下降，實際使用中如活細胞實驗中常常將針孔適當放開，以提高可檢測螢光強度，這樣可以在低的激發雷射下得到較強的螢光信號，有效的保護樣品。



⑥ 物鏡：

成像的決定性物件，對系統的解析度、偵測螢光強度等起決定作用。系統解析度(能夠檢測相互靠近兩點的最小距離)

物鏡的數值孔徑 (Numerical Aperture) : NA 越高，解析度越好

介質折射率：折射率越高，物鏡能夠達到的 NA 越高

色差校正：對可見光各波段的校對能力，使同一點發出的不同顏色的光能夠同時成像到同一平面的能力

FV1000 雷射掃描共軛焦取圖技巧

※取圖三步驟：

①觀察

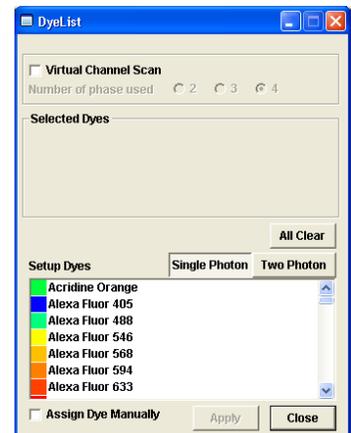
顯微鏡下觀察樣品，選擇合適的物鏡

點擊 ，選擇合適的螢光濾鏡，觀察標本螢光（倒置顯微鏡）

點擊  觀察透射光（倒置顯微鏡）

②選擇染料

點擊  跳出螢光染料選擇視窗，選擇對應螢光 >> Apply



③掃描圖像



Focus X2 以 2 倍速掃描圖像，適合快速預掃描聚焦（忽略 Kalman、慢速掃等功能）

Focus X4 以 4 倍速掃描圖像，適合快速預掃描聚焦（忽略 Kalman、慢速掃等功能）

XY Repeat 可進行較高品質掃描圖像，適合快速聚焦，但速度略慢（使用 Kalman、慢速掃等功能）

XY 適合快速預掃描後直接高品質掃描樣品，可以執行高級 Lamda/Z/Time 掃描（使用 Kalman、慢速掃等功能）

※提高圖像品質的方法：

獲取更多的信號

- 將掃描速度降低，同時使用  功能
- 使用 Kalman 功能，對圖像進行多張掃描取平均，以降低 PMT 隨機噪音



- 調節採集螢光的帶寬，寬>>螢光強，但如果多色螢光時會產生串色或引入自發光
- 放大共軛焦針孔，但會使光學切片變厚
- 增加激發光強度，但會造成漂白和光毒性，請慎重使用！！！！

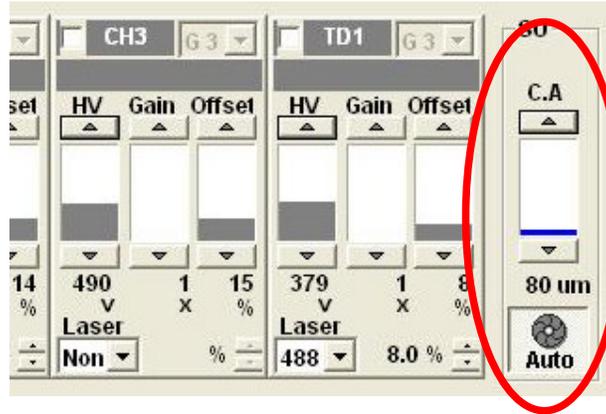
獲取更清晰的細節

- 使用更高數值孔徑的物鏡
- 使用 ZOOM 功能
- 在低 ZOOM (如 1X~ 3X) 情況下，使用高掃描解析度如 1024 x 1024 或 2048 x 2048

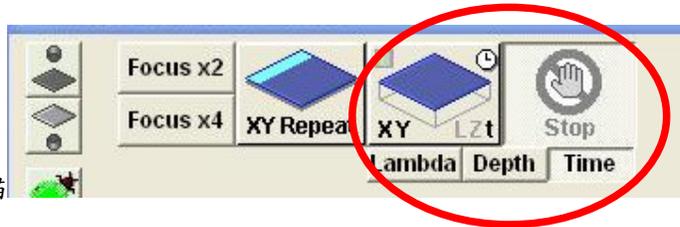
FV1000 應用-1 time lapse

1 預覽掃描找到適宜標本 (圖像信噪比較好)

2 適當開大針孔，降低雷射強度



3 選擇 Time 掃描



4 在時間掃描介面中設置合適的時間間隔和總的取圖數量



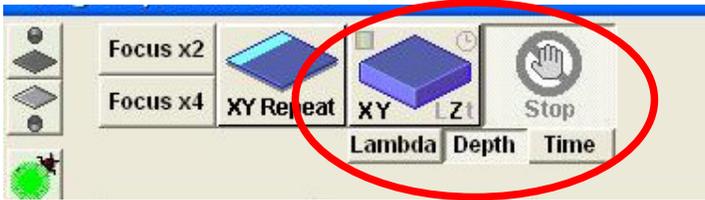
5 執行 XYT 掃描



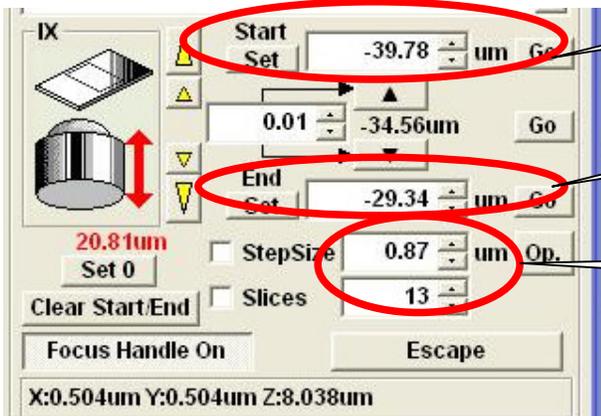
FV1000 應用-2 3D 成像

1 預覽掃描找到適宜樣品 (圖像信噪比較好)

2 選擇 Z 軸掃描



3 在 Z 掃描介面中設置合適的上平面、下平面和掃描間隔



找到上平面後按 set

找到下平面後按 set

設定掃描間隔或掃描張數

6 執行 XYZ 掃描



7 得到圖像後，在圖像點擊圖像展示模式按鈕
可以在下面選項中選擇三維展示模式看各層切面情況



8 也可以點擊3維重建按鈕來展示三維重建效果

pear.

