

中华人民共和国教育行业标准

JY/T 0586—2020

激光扫描共聚焦显微镜分析方法通则

General rules of analytical methods for confocal laser scanning microscope



2020-09-29 发布

2020-12-01 实施

中华人民共和国教育部 发布



目 次

前言	Ⅲ
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 分析方法原理	3
5 分析环境要求	3
6 试剂和材料	3
7 仪器	4
8 样品	6
9 分析测试	6
10 结果报告	9
11 安全注意事项	9
附录 A (资料性附录) 物镜盖玻片矫正环的调节方法	10
参考文献	11





前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国教育部提出。

本标准由全国教育装备标准化技术委员会化学分技术委员会(SAC/TC 125/SC 5)归口。

本标准起草单位:华东理工大学、北京大学、山东理工大学、陆军军医大学。

本标准主要起草人:吴婷、于博昊、关妍、刘东武、孙玮。





激光扫描共聚焦显微镜分析方法通则

1 范围

本标准规定了激光扫描共聚焦显微镜分析方法的原理、分析环境要求、试剂和材料、仪器、样品、分析测试、结果报告和安全注意事项。

本标准适用于使用激光扫描共聚焦显微镜进行常规的图像分析。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 2609 显微镜 物镜

GB/T 2985 生物显微镜

GB/T 9246 显微镜 目镜

JB/T 8230.1—1999 光学显微镜 术语

BS ISO 8255-1:2017 显微镜 盖玻片 第1部分:尺寸公差、厚度和光学性能(Microscopes—Cover glasses—Part 1:Dimensional tolerances,thickness and optical properties)

3 术语和定义

JB/T 8230.1—1999 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

波长 wavelength

波列上两相邻同相位点之间的距离。

[JB/T 8230.1—1999,定义 2.186]

3.2

微分干涉 differential interference contrast; DIC

平面偏振光经棱镜折射后分成两束,穿过样品的相邻部位,再经过另一棱镜将这两束光汇聚,从而将样品厚度上的微小差别转化成明暗区别,增加样品反差和立体感。

3.3

数值孔径 numerical aperture; NA

被检物体与物镜之间介质的折射率(n)与物镜孔径角半角($\alpha/2$)正弦值的乘积,简称 NA,用公式表示为:

$$NA = n \cdot \sin(\alpha/2) \dots\dots\dots(1)$$

式中:

NA ——数值孔径;

n ——被检物体与物镜之间介质的折射率;

α ——物镜孔径角。

3.4

分辨率 resolution

物面上能分开的最短距离,用以下公式计算:

$$d = 0.61\lambda/NA \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中：

- σ ——分辨率；
- λ ——光线的波长；
- NA ——物镜的数值孔径。

3.5

显微镜放大率 magnifying power of microscope

目视显微镜形成虚像的角放大率。该放大率是物镜放大率、目镜放大率和镜筒系数的乘积。
[JB/T 8230.1—1999,定义 2.134]

3.6

视场 visual field

可被显微镜成像的物面或其共轭面的大小。用线值表示。
[JB/T 8230.1—1999,定义 2.92]

3.7

爱里斑 Airydisc

点光源衍射图样的中心亮斑。
[JB/T 8230.1—1999,定义 2.178]

3.8

柯勒照明 Kohler illumination

光源被照明系统成像在物镜入瞳上的一种照明物体方法。
[JB/T 8230.1—1999,定义 2.144]

3.9

扫描速度 scanning speed

单位时间内激光扫描样品像素点的数量。

3.10

检测针孔 detection pinhole

放置在检测器前的针孔,起到空间滤波器的作用,阻碍非聚焦平面散射光和聚焦平面上非焦点斑以外的散射光,以保证检测器所接收的光线全部来自于样品焦点光斑。

3.11

检测器 detector

接收来源于检测针孔的光信号,通过模数(A/D)转换将光信号转变为电信号的器件。
注:如光电倍增管、电荷耦合元件和超高灵敏度检测器等。

3.12

共聚焦 confocal

照射在标本焦面上的光点与检测针孔是共焦点的现象。

3.13

明场 bright field

光束透过标本后直接进入物镜,视场是明亮的模式。

3.14

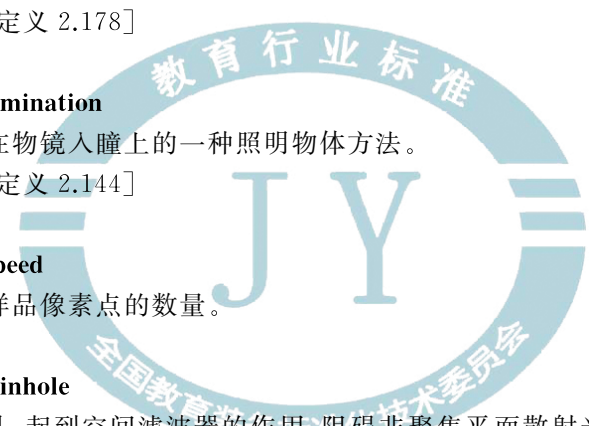
荧光观察 fluorescent view

以特定波长的激发光照射标本内的荧光物质,使之发出荧光,并在显微镜下观察荧光物体的形状及其所在位置。

3.15

荧光漂白后恢复 fluorescence recovery after photobleaching;FRAP

对样品的确定区域进行光漂白,检测漂白后该区域中的荧光恢复情况。



3.16

荧光共振能量转移 fluorescence resonance energy transfer; FRET

如果一个荧光分子(又称为供体分子)的荧光光谱与另一个荧光分子(又称为受体分子)的激发光谱发生重叠,当这两个荧光基团间的距离合适时(一般小于 100 \AA),供体荧光分子的激发能诱发受体分子发出荧光,同时供体荧光分子自身的荧光强度衰减。

4 分析方法原理

仪器成像原理见图 1。激光器发射一定波长的激发光,经光学镜组聚焦于样品某一断层平面上。样品被激发光激发产生发射光信号,发射光经检测针孔到达检测器,光信号经模数(A/D)转换变为电信号并传输至计算机系统,焦平面上每个样品点的荧光信号组成一幅完整的共焦图像。由于激光扫描点与检测针孔是共焦的,激光扫描过程中,只有样品焦平面被扫描产生的荧光才能通过检测针孔,并被检测器记录。对于来自非焦平面的荧光,均被检测针孔光阑阻挡。

连续光学切片可用于样品立体结构观察和图像的三维重建。若间歇或连续扫描样品某一层面(或一条线),并对其荧光进行定位、定性及定量分析,则可实现对该样品的实时监测。

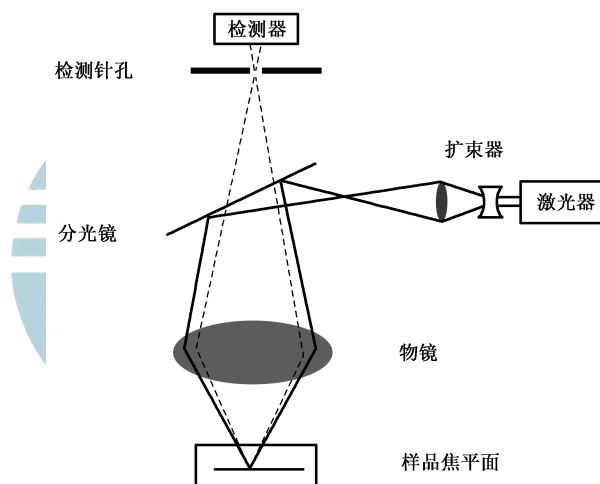


图 1 激光扫描共聚焦显微镜成像原理图

5 分析环境要求

应符合如下要求:

- a) 远离电磁辐射源,有稳定的电源电压;
- b) 清洁、干燥、无震动,周围无粉尘、无腐蚀性介质;
- c) 具有遮光系统,避免荧光样品被外源光漂白;
- d) 控制工作温度 $20 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$,湿度 $\leq 75\%$ 。

6 试剂和材料

6.1 试剂

6.1.1 浸油

使用厂商提供的专用浸油。应按照物镜镜体上的标识规范使用浸油。应注意新鲜的浸油和放置较

长时间的浸油不可混用,以免形成暗线并影响成像质量。

6.1.2 水

水浸系物镜前透镜与盖玻片之间以水为介质,宜使用蒸馏水或超纯水。

6.1.3 物镜清洗剂

使用厂商推荐的物镜清洗配方。可使用乙醚/无水乙醇=70/30(V/V)的混和溶液或石油醚等有机溶剂。

6.2 材料

6.2.1 擦镜纸

应使用光学擦镜纸。

6.2.2 盖玻片

应符合 BS ISO 8255-1:2017 规定,玻璃材质,厚度 0.17 mm。

6.2.3 激光共聚焦培养皿

应采用底部为 6.2.2 所述盖玻片的培养皿。

6.2.4 激光共聚焦培养板

应采用底部为 6.2.2 所述盖玻片的培养板。

7 仪器

7.1 仪器组成

激光扫描共聚焦显微镜主要由以下几部分组成:激光光源、扫描器(内装有扫描振镜或转盘、针孔、分光镜、色散元件)、荧光显微镜系统、检测器、计算机图像处理及控制系统。由计算机控制系统控制激光光源、扫描器、检测器及荧光显微镜系统,仪器各部分相互关系如图 2 所示。

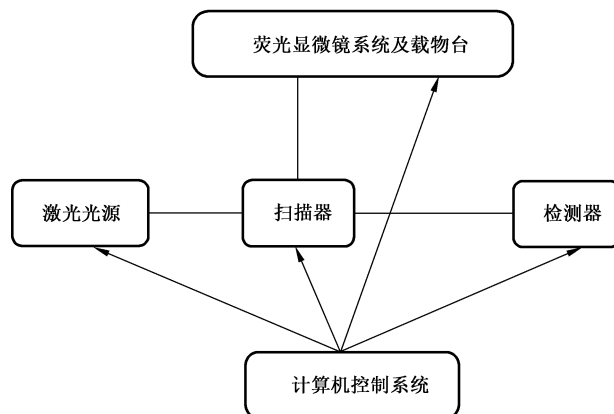


图 2 激光扫描共聚焦显微镜各部分相互关系示意图

7.1.1 照明光源

由激光器和其他光源(如卤素灯、汞灯或金属卤化物灯、发光二极管等)组成。

7.1.2 常用激光器

常用激光器主要包括如下几种：

- a) 固体激光器：405 nm、440/445/448 nm、473/488 nm、514 nm、532/543 nm、552/561 nm、638/639/640 nm 等；
- b) 氩离子激光器：457 nm、477 nm、488 nm、496 nm、514 nm 等；
- c) 氦氖激光器：594 nm、633 nm 等。

7.1.3 荧光显微镜

荧光显微镜基本性能应符合 GB/T 2985 的规定。配置有全自动荧光显微镜, 荧光照明部件(如长寿命汞灯), 多种荧光滤片, Z 轴聚焦控制单元, 精密 XY 载物台, 物镜转盘, 微分干涉部件等。

7.1.4 扫描器

应配置图像获取所需的标准扫描器。

7.1.5 物镜

应符合 GB/T 2609 规定, 应由一组低倍和高倍的平场复消色差物镜组成以获得合适的显微镜放大率, 应考虑干镜、油镜和水镜的配比。倍率如 10×、20×、40×(或 50×)、60×(或 63×)、100×等。

7.1.6 目镜

应符合 GB/T 9246 规定, 双目镜倍率一般为 10×, 视场大小一般不低于 23 mm。

7.1.7 检测器

应根据需要配置 1 至多个荧光检测器(光电倍增管、电荷耦合元件或超高灵敏度检测器)和 1 个透射光检测器。

7.1.8 照明方式

采用点光源或转盘式照明。

7.2 仪器性能

仪器性能应符合表 1 的规定。

表 1 激光扫描共聚焦显微镜的主要性能和技术指标

部件或参数	性能
针孔	具有可调或固定的针孔
标准检测器	≥1 个荧光检测器+1 个透射光检测器
扫描速度	在 512×512 图像分辨率下, 速度不小于 1 帧/秒
扫描尺寸	应至少包含 512×512 和 1 024×1 024

7.3 检定或校准

设备在投入使用前, 应采用检定或校准等方式, 对显著影响检测结果的准确性或有效性的设备(包括用于测量环境条件等的辅助测量设备)有计划地实施检定或校准, 以确认其是否满足检测的要求。检定

或校准应按有关检定规程、校准规范或校准方法进行。

8 样品

8.1 样品种类

培养细胞、固定标本、液体样品和其他固体样品。

8.2 样品制备

8.2.1 培养细胞

培养细胞应使用共聚焦观察专用培养皿进行培养,荧光标记后直接用于共聚焦观察。

8.2.2 固定标本

固定标本样品(如组织切片、固定细胞等)荧光标记后,选择盖玻片并使用无荧光封固剂来封片,然后进行共聚焦观察。

8.2.3 液体样品

液体样品可使用涂片的方法进行样品制备,直接用于共聚焦观察。

8.2.4 其他固体样品

块状固体、粉末和固体薄膜样品的荧光观察可将样品直接放置于盖玻片上进行共聚焦观察。

8.3 样品保存

根据样品需要低温避光保存。

9 分析测试

9.1 前期准备

根据所要观察样品的性质、观察目的以及样品的荧光参数,选择合适的制样方法和分析步骤。根据测试要求按 8.2 的方法进行样品的制备。

9.2 实施步骤

9.2.1 开机

依次开启显微镜、激光器、总控制器、电脑和软件。

9.2.2 拍摄前准备

9.2.2.1 调节柯勒照明

调节柯勒照明步骤如下:

- a) 选择 10×物镜;
- b) 调焦,使标本清晰成像;
- c) 将视场光阑缩至最小;

- d) 上下调节聚光器,调至视场光阑边界清晰;
- e) 调节聚光器对中旋钮,使其居中;
- f) 放大视场光阑,使其刚刚外切于视野;
- g) 取下一侧目镜,调节孔径光阑使大小为整个视野的 2/3。

9.2.2.2 检查激光

使用多色荧光片逐一检查各激光器的出光情况,查看样品上是否有该激光的照射斑点。

9.2.2.3 选择物镜

根据放大倍数的要求选择合适的物镜或者根据清晰度的要求选择不同数值孔径(NA)物镜。使用带有盖玻片矫正环的物镜时,应按照附录 A 的方法进行调节。

9.2.2.4 选择激光器

根据样品荧光标记物的激发波长选择合适的激光器。

9.2.3 光路调节

9.2.3.1 明场透射光路调节

明场透射光路调节步骤如下:

- a) 打开显微镜透射光卤素灯电源开关;
- b) 滤光镜组块或分光镜转盘移到空位;
- c) 起偏器和检偏器移出光路;
- d) 聚光器模块切换到明场模式;
- e) 检查柯勒照明(柯勒照明调节方法参照 9.2.2.1);
- f) 检查出光端口。

9.2.3.2 荧光场光路调节

荧光场光路调节步骤如下:

- a) 打开荧光电源,稍等片刻至光源指示灯稳定(若关闭光源,15 min 后才可再次启动);
- b) 确认透射光开关处于关闭状态;
- c) 检查出光端口;
- d) 选择合适的波段;
- e) 打开光闸,调节激发光强度,进行观察;
- f) 不观察时,应把激发光光闸关掉,避免荧光淬灭。

9.2.3.3 微分干涉光路调节

微分干涉光路调节步骤如下:

- a) 按照明场透射光的操作方法调节显微镜;
- b) 将起偏器和检偏器移入光路;
- c) 按照物镜规格相应地插入物镜棱镜和聚光镜棱镜;
- d) 检查出光端口;
- e) 旋转起偏器,选择最佳显示效果。

9.2.4 参数设定

9.2.4.1 设定光路

打开控制软件进入光路配置窗口。选择好扫描模式后,在光路配置窗口进行光路配置。根据荧光标记物的激发及发射光谱,为各个通道选择被观察的染料,选择所需激光器、分光镜、荧光检测范围及伪彩,选择是否使用透射探测器,最后确认光路设置。

9.2.4.2 设定针孔大小、激光功率和检测器增益

针孔大小根据需求从小到大进行调节或选择。激光功率和检测器增益不宜过大,以减少荧光淬灭和背景噪点。

9.2.4.3 设定扫描方式

点扫描共聚焦选择单向或双向扫描,一般在预览时采用双向扫描以提高扫描速度避免荧光淬灭,采集图像时则采用单向扫描以避免图像错位。转盘式共聚焦选择多点同时扫描,同步照射样品,同步激发,同步采集。

9.2.4.4 设定扫描尺寸

根据实际需求及后期图像处理的需要,建议预览时采用 512×512 或更小尺寸,采集时采用 1024×1024 或更大尺寸。当条件不满足时(如发生光漂白或拍摄时间过长时),适当减少图像像素数。

9.2.4.5 优化图像亮度和分辨率

可通过增大激光功率/增大检测器增益/增加针孔直径/放慢扫描速度/图像叠加等方法来增加图像亮度;如需提高图像信噪比可采用平均模式。扫描尺寸、扫描速度、激光功率、针孔直径及检测器增益都会影响扫描分辨率,且最优的分析条件是对以上这些参数综合考虑的结果。

9.2.5 图像拍摄

9.2.5.1 实时图像的获取

通过预览获取实时图像,调节每个通道的参数(激光功率、检测器增益、光谱检测范围等)来调整该通道图像的亮度。利用选择工具可以进行扫描区域的设定,在所选择区域中同样通过预览获取实时图像,并调节各个通道的参数来调整各个通道图像的亮度。

9.2.5.2 二维(XY)图像拍摄

在实时图像亮度和扫描方式均已设定的基础上,选择二维(XY)拍摄,即可获得所需的二维图像。

9.2.5.3 三维(XYZ)图像拍摄和三维重建

在实时图像亮度和扫描方式均已设定的基础上,调出三维(XYZ)设定窗口,设定 Z 轴的拍摄范围(选取顶面和底面、对称范围、不对称范围等)和步进,逐层扫描进行三维图像的拍摄。将逐层扫描获得的一组荧光图片通过软件中的三维重建功能获得样品的三维立体可视图像。

9.2.5.4 时间序列(XYT)图像拍摄

在实时图像亮度和扫描方式均已设定的基础上,调出 XYT 设定窗口,设定拍摄的总时长和间隔时长进行拍摄,获得样品随时间变化的动态信息。

9.2.5.5 荧光漂白后恢复(FRAP)图像拍摄

选定样品上很小的区域(直径约几个微米),调节荧光团所对应的通道参数,在漂白前用低强度的激光去激发荧光团获取二维荧光图像。再将激光能量设定为最大值对选定区域进行强照明,将所选择区域荧光团进行完全的光漂白。在光漂白后,采用低强度的激光进行一组时间序列(XYT)图像的拍摄,监测被漂白区域荧光强度恢复的速率与程度,获得荧光团重新进入的信息以及恢复动力学的信息。

9.2.5.6 荧光共振能量转移(FRET)图像拍摄

利用与供体荧光团匹配的激光作为激发光源,通过二色分光镜后照射样品。选择与荧光团匹配的滤镜组,通过高灵敏度的检测器分时或同时获取供体、受体的荧光图像,再经过软件处理,获得荧光共振能量转移结果图像。

9.2.5.7 其他图像拍摄

根据仪器的配置和分析需求,在图像获取窗口选择相应的其他拍摄模式(如三维时间序列(XYZT)、拼大图和超高分辨成像等)进行图像的拍摄。

9.2.6 拍摄后工作

9.2.6.1 显微镜的调节

取下样品,将载物台或物镜降至最低,物镜转盘转到低倍物镜或空位。

9.2.6.2 镜头的清洗

物镜镜头使用后需采用专用的擦镜纸和专用的物镜清洗剂(见 6.1.3)进行清洗。

9.2.7 关机

依次关闭软件、电脑、总控制器、激光器和显微镜。

10 结果报告

10.1 基本信息

结果报告中可包括:委托单位信息、样品信息、仪器设备信息、环境条件、制样方法、检测方法(依据标准)、检测结果、检测人、校核人、批准人、检测日期等。

10.2 结果信息

根据需提供单色或者伪彩、单通道或者多通道叠加的清晰二维图片,样品连续观察的视频或者借助三维重建软件获得的样品三维立体图像。

11 安全注意事项

11.1 避免激光直接射入眼睛,严格执行安全规则。

11.2 样品应符合生物安全要求。分析人员应穿着实验服,佩戴口罩、手套等安全防护用品,避免肢体直接接触生物样品。

附 录 A

(资料性附录)

物镜盖玻片矫正环的调节方法

物镜盖玻片矫正环的调节方法步骤如下：

- a) 调焦,使图像相对最清楚;
- b) 把矫正环向一个方向转动一定角度,此时图像变模糊,调焦,使图像相对更清楚;
- c) 判断此时的图像质量是否有所改善。如有改善,则继续朝该方向旋转矫正环至一定角度;如质量下降,则反方向旋转;
- d) 重复前两个步骤,直到图像质量改善之后又有所下降;
- e) 反方向旋转,回到倒数第二次的位置即可。



参 考 文 献

- [1] 王春梅.激光扫描共聚焦显微镜技术.第四军医大学出版社,2004.
 - [2] 袁兰.激光扫描共聚焦显微镜技术教程.北京大学医学出版社,2004.
 - [3] 张雷.光学显微镜技术.人民卫生音像出版社,2006.
 - [4] 康恩.共聚焦显微镜技术.科学出版社,2012.
 - [5] 杜一平.现代仪器分析方法.华东理工大学出版社,2015.
-

