



激光扫描共聚焦显微成像技术与应用

李成辉, 田云飞, 闫曙光

(四川大学 分析测试中心, 成都 610064)

摘要: 激光扫描共聚焦显微镜已成为生物及医学等领域重要的研究手段。为了更充分、灵活地运用共聚焦显微镜的功能, 提高仪器应用效果, 拓展仪器使用需求, 该文以尼康 A1⁺ 共聚焦显微镜为例, 介绍了共聚焦显微镜的基本原理、仪器配置和技术参数, 样品制备要求, 图像采集操作规程及技巧, 日常维护和管理等方面信息。旨在为科研工作者获取高质量共聚焦图像提供有力的技术支持, 提高工作效率, 更好地服务于教学和科学研究。

关键词: 激光共聚焦显微镜; 原理; 操作; 荧光成像

中图分类号: O657

文献标志码: A

DOI: 10.12179/1672-4550.20190257

Laser Scanning Confocal Microscopy and Its Application

LI Chenghui, TIAN Yunfei, YAN Shuguang

(Analytical & Testing Center, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Laser scanning confocal microscopy has become crucial to biological and medical research. To fully and flexibly use the function, improve the application and performance, and boost the potential demand of confocal microscope, this article introduces the fundamental principle, instrument configuration and technical parameters, sample preparation requirements, image acquisition procedures and techniques, as well as daily maintenance and management information of Nikon A1⁺ laser scanning confocal microscope. The aim is to provide a powerful technical reference for scientific researchers to obtain high-quality confocal images, improve work efficiency, and better assist teaching and scientific research.

Key words: laser scanning confocal microscope; principle; operation; fluorescence imaging

激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)通过一种或多种荧光探针标记研究对象, 在荧光显微镜基础上配置激光扫描装置, 采用共轭聚焦方式, 对观察样品进行逐点扫描, 实现高分辨的共聚焦图像, 同时能够通过控制 Z 轴焦平面, 实现三维成像。随着生命科学研究的不断深入和荧光探针技术的迅猛发展, 激光扫描共聚焦显微技术在生物及医学等研究领域的应用受到越来越多的关注。LSCM 的主要原理是激光束经照明针孔形成点光源被二向色镜反射, 再通过物镜聚焦于样品, 对样品焦平面上的点进行逐点扫描。由于样品发射的荧光波长比入射光长, 可直接通过二向色镜并到达探测针孔处, 经光电倍增管采集, 输入计算机得到荧光图像。而

非焦平面的光线则被探测针孔阻挡, 不能到达探测器。LSCM 高分辨的荧光成像能力也正是来源于这种双共轭的成像方式, 即照明针孔与探测针孔相对于物镜焦平面是共轭的, 焦平面上的点同时聚焦于照明针孔和探测针孔, 以此屏蔽焦平面外点的荧光信号。因此, 共焦探测针孔相当于一个空间滤波器, 可极大地提高成像的信噪比和清晰度^[1]。LSCM 主要用于荧光标记活细胞、生物组织切片、活体、荧光材料等的观察、成像、三维图像重建分析以及细胞生物物质、离子的定性、定量、定时和定位分布检测等^[2]。该技术的出现革新了分子及细胞水平的研究方式, 为监测药物、材料靶向分布以及监控疾病的整体发展过程等相关研究提供了更有效的测量方式^[3-4]。

收稿日期: 2019-06-27; 修回日期: 2019-09-13

基金项目: 国家自然科学基金(21705114); 四川大学研究生教育教学改革研究项目(YJSJG027); 四川大学基础研究培育专项(2019)。

作者简介: 李成辉(1988-), 女, 博士, 实验师, 主要从事光谱分析方法方面的研究。

目前, LSCM 技术已发展活细胞共聚焦显微镜、双光子显微镜^[5-6]、超分辨显微镜^[7]等多种显微成像技术, 以满足不同的功能需求, 为生物及医学等研究领域提供了更加全面的信息和更加有效的检测方法。细胞中很多重要生命活动的研究, 如细胞分裂、分化, 细胞迁移, 蛋白质的运输等过程, 都必须通过显微镜进行活细胞成像才可以观察并记录到。活细胞共聚焦成像系统是在 LSCM 基础上增加一个活细胞培养装置, 进行细胞培养。因而可长时间、动态、实时的观测活细胞复杂的生理活动。双光子显微镜将 LSCM 和双光子激发技术相结合, 利用数个低能光子同时释放的能量代替单个高能光子的作用, 从而达到长波激发短波发射的效果。与 LSCM 相比, 双光子激发只发生在物镜的焦点上, 成像时不需要共聚焦针孔, 提高了荧光的收集率。双光子显微镜有很多优点, 如穿透力强, 能对样品进行深度成像(成像深度可达 1 000 μm), 同时焦平面以外的信号不会被激发, 不会产生自发荧光, 成像信噪比高, 细胞光毒性小, 能够对活体组织进行在体成像, 可实现样品内部超深动态变化的可视化高分辨率成像。近年来, 超分辨显微成像技术的迅猛发展使其突破了光学显微镜分辨率极限(200 nm), 实现了 10~100 nm 的超高分辨成像, 能够清楚的观察到活细胞及固定的纳米结构和功能, 可以从分子簇乃至单分子水平上对亚细胞结构直接观察, 如 DNA 和蛋白质分子的结构和运动, 为蛋白质的功能和基因的调控提供最直接的图像支持。活细胞共聚焦、双光子显微系统与超分辨显微系统弥补了单一 LSCM 的不足, 为生命科学提供了有效的检测工具。

四川大学分析测试中心配置的倒置激光共聚焦显微镜(A1⁺+N-SIM, Nikon)是一台集共聚焦、活细胞培养和 N-SIM 超分辨成像为一体的共聚焦显微镜。本文以此为例, 主要介绍了激光扫描共聚焦显微镜的样品制备要求、操作技巧及在生物学领域的应用和日常管理与维护, 旨在为相关科研教学人员提供快速有效的制样参考, 获取高质量的共聚焦图像, 为相关科研与教学提供强有力的技术支持。

1 仪器介绍

1.1 仪器型号

A1⁺+N-SIM, Nikon

1.2 技术参数

1) 光源系统: 包括 4 个独立激光器, 可提供 6 个不同波长, 即 405 nm 固体紫外激光器(100 mW); 蓝色 Ar 激光器, 谱线含 458 nm、488 nm、514 nm (65 mW); 561 nm 固体激光器(100 mW); 640 nm 固体激光器(100 mW)。激光波长选择和激光能量控制均由 8 通道 AOTF 超快激光控制系统完成, 激光输出模式为单线/多线混合, 输出功率 0~100% 连续可调, 激光强度调节精度为 0.01%, 可实现激光纳秒级切换。

2) 扫描探测系统: 采用双检流计式振镜扫描, 内置 4 个光电倍增管(PMT)荧光探测通道和 1 个透射光 DIC 通道。通过软件控制可实现多种扫描模式。

3) 显微镜: 全自动倒置显微镜, 兼具 TIRF 和 SIM 超分辨成像模式。高速电动组件可实现对图像的快速、协调、无缝拍摄。适合玻片、活细胞样品的观察。配备 10X、20X、40X、60X 水镜及油镜, 100X TIRF 6 个物镜。

4) 活细胞培养装置: 适合活细胞在培养室内长期培养, 可实现 CO₂ 浓度、温度和湿度的全面控制, 保证活细胞的长时程、实时成像。

2 样品制备要求

LSCM 主要用于荧光样品的观察测定。对于无自发荧光的样品, 需先对样品进行荧光标记, 再进行检测。对于多重荧光标记, 荧光标记物的选择不仅需要考虑所配激光器的波长, 还需尽量选择不同种属来源的抗体进行染色, 同时选择反应特异性强、荧光定位准确、强度适宜、光稳定性好的染料进行染色, 尽量避免出现荧光光谱重叠等问题^[8-10]。共聚焦常用的荧光标记物激发波长如表 1 所示。LSCM 样品可以是固定的组织或细胞; 也可以是活体标本或活细胞。活体标本和活细胞只需荧光免疫标记即可, 不需要固定、封片等操作。细胞应培养在共聚焦专用玻底培养皿(33 mm)或盖玻片(0.17 mm)上, 载玻片(0.8~1.2 mm)应厚度均一, 表面光洁, 无明显自发荧光。封片时可选用含抗荧光淬灭的封片剂, 以减少荧光信号损失。制备好的样品可收集于载玻片盒中于 4℃ 条件下保存。制备共聚焦样品时, 要根据实验目的、样品种类及形态、激光器配置、物镜的工作距离及所

用显微镜的载物台设置等条件确定样品的制备方式。

表1 激光共聚焦常用荧光标记物激发波长

激光波长/nm	常用荧光标记物
405	DAPI, Hoechst, Cascade blue, BFP, VCFP
440/457	CFP, Fura red, Lucifer yellow, Cerulean
488	GFP, Alexa 488, FITC, Dio
514	YFP, TOTO-1, Calcium green
543/561	DS red, Cy3, Tritc, Dil
594	Alexa 594, Texas red, mRFP
640	Cy5, Alexa 647, TOPRO-3, DRAQ-5

3 激光共聚焦成像参数设置

LSCM 在进行图像采集时,显微镜的参数选择和设置直接影响着成像质量。因此,除了要考虑所观察的样品特征、检测目的外,还要综合考虑显微镜各个参数之间的关系获得高分辨的共聚焦成像。

3.1 物镜的选择

根据样品大小及放大倍数,选择合适物镜,以使成像更清晰。通常情况下,物镜放大倍数越高,成像视野越小。选择高数值孔径(NA)的物镜,采集的共聚焦图像分辨率会更高。有矫正环的物镜,应调节矫正环,改善图像质量。

3.2 显微镜目视观察

采集样品的共聚焦图像时,首先通过目视荧光或者明场透射观察来确定拍摄位点和调节焦平面。其次,在做相应观察时,应将对应光闸打开,不用的光闸关闭,调节焦平面进行观察;样本漂白严重时,需减弱激发光以进行观察。不观察时,关闭光闸,避免样本荧光漂白。

3.3 光路设置

根据样品所标记的荧光探针激发波长选择相应的激光器。多荧光通道同时采集光谱时,可能会出现光谱重叠(串色)现象。因此,在设置扫描顺序时,推选顺序激发各荧光通道,即一种激光扫描时,只有对应的通道接收发射光,可有效避免串色现象。

3.4 图像采集参数设置^[11-12]

1) 激光强度:激光强度直接影响着样品荧光信号的强弱。激光强度越大,荧光信号就越强,但荧光也越容易漂白。随着激光使用时间的增加,激光强度会有所下降。所以在保证成像质量的前提下,激光功率通常要尽可能小。

2) 光电倍增管的增益(HV):增益大小可通过调节 PMT 的电压值,直接影响检测器的灵敏度。HV 值越大,荧光信号越强,图像亮度越高,同时背景噪音也提高;HV 越小,如要提高图像亮度,则需使用更高的激光强度。

3) 检测针孔(Pinhole):检测针孔直径的大小决定了采集荧光信号的多少及光学切片的厚度。针孔越大,采集的荧光信号越多,切片的厚度越大,同时获得的非焦平面的杂散光也越多,信噪比越低。因此,要获得高分辨的图像,针孔直径需根据样品实际情况调节。对于一些弱荧光信号材料的成像,则必须适当地增大检测针孔直径;对于光漂白严重的样品,则需适当降低针孔直径。

4) 扫描速度及扫描次数:通常情况下,要获取高清图像,不仅可以通过提高扫描像素的方法,还可以采用增加扫描次数、降低扫描速度的模式,更好地降低背景噪音,提高图像信噪比。但扫描次数越多、扫描速度越慢,越容易造成荧光漂白和弱信号丢失。因此,要根据荧光染料及检测量变化的快慢选择重复扫描次数和扫描速度。

5) 扫描分辨率:即图像的分辨率。实际上是像素点多少的选择。图像的像素点越多,分辨率越高,细节越丰富。图像采集时,通常选用 1 024 的扫描分辨率。当像素点从 512 增加到 1 024 时,在相同扫描速度下平均每个像素点上的曝光时间缩短,图像亮度降低。要提高图像亮度,必须提高扫描速度或调节激光强度和增益。

6) 平均和积分模式:平均模式是将多张图像合并后进行亮度平均,可降低随机信号,减少噪音;积分模式是将多张图像合并后进行亮度积分,可提高弱荧光样品的信号,但背景噪音随之增加。

3.5 图像优化

图像采集完成后,可使用共聚焦软件完成图像的后期优化处理。通过 LUTs 界面对图像荧光亮度进行调节,降低图像噪音,增加图像亮度,使画质清晰。荧光图像背景过重会影响图片质量,可通过中值滤波、平滑、去噪声等操作降低背景噪音。

4 激光共聚焦显微镜应用

4.1 多通道荧光和透射图像扫描

LSCM 可进行多通道荧光及透射图像的扫描及叠加,如图 1 所示。选用不同的颜色来区分不同的荧光探针,可得到细胞水平的实时分布、定

位、定性等信息,为药物或材料与细胞的相互作用提供更加直观的理论依据。通过多通道荧光叠加图像,可将检测到的两个或多个荧光信号进行共定位分析,获得两个或多个不同分子在细胞中的同一细胞结构的分布情况。

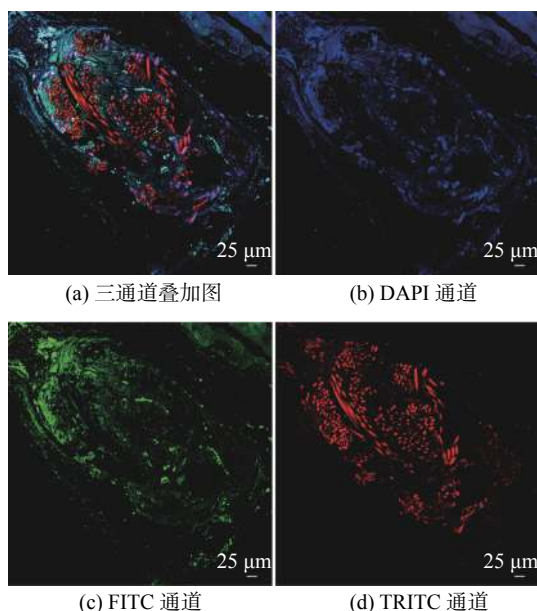


图 1 小鼠组织切片三通道荧光拍摄

4.2 多维拍摄

LSCM 可为细胞、组织和较小的生物体提供从 2 维到 6 维(x, y, z, t , 波长, 位置)的多维成像,实现从宏观到微观的精准、快速、高分辨的光学成像,完整展现真实生命过程。

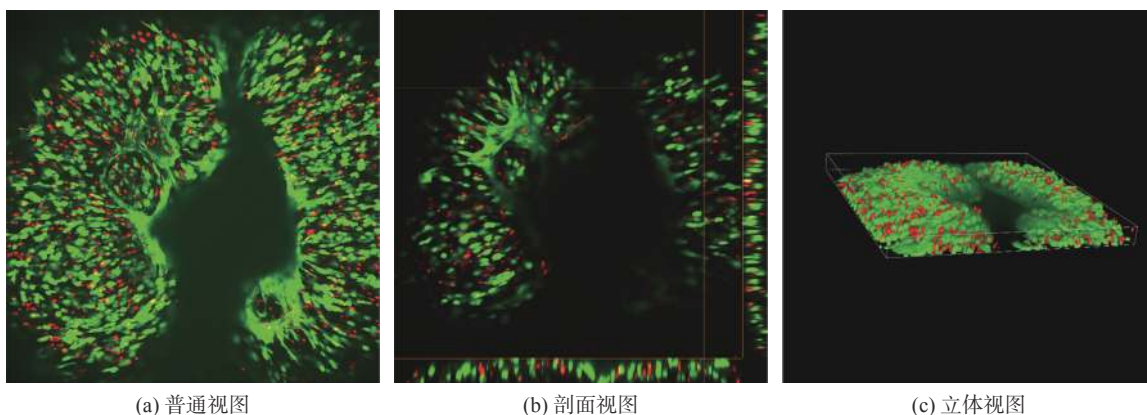


图 2 植入兔软骨细胞的水凝胶微球三维重构图像

4.4 光谱拆分

对荧光标记的样品,在获得各通道荧光图像后,通过对不同荧光标记所发出的重叠光谱进行拆分,包括光谱接近,大范围重叠的荧光信号(如 CFP, RFP, YFP 和 Alexa488),可有效避免多色

1) XYZ 三维图像拍摄: LSCM 又称“显微 CT”,可对较厚样品进行多层扫描及三维重构,如图 2 所示。通过聚焦样品不同的焦平面,得到样品不同层面的连续光学切片图像,经计算机三维重构,可得到样品的立体结构信息,实现了样品的无损层析。根据实验需求,可调节 Z 轴的步进值、扫描层数等参数实现轴向的高分辨观测。

2) XYT 时间序列拍摄:用于样品荧光强度或分布随时间变化的图像拍摄,可实现对活细胞实时动态观测,记录细胞生理变化。在单次实验中,可以有效地分析细胞内的物质随着时间的推移而发生的变化,并采集到大量的数据,从而提高了实验效率。

4.3 全光谱扫描

标准探测模式采用四通道探测器,可进行四色标记的样品成像,主要用于已知发射光谱的荧光探针成像。对于采用未知发射光谱荧光探针标记的生物样品成像,通常采用光谱扫描模式。光谱扫描模式采用阵列检测器,可在可见波段(400~650 nm)实现一次性全光谱扫描,获得光谱特征曲线,减少拍摄时间,实现对全光谱的实时观察,如图 3 所示。在实际样品测试过程中,根据样品的具体情况,可将几个接收波长相近的 PMT 探测通道合并为一个通道,减少扫描图像的数量、缩短扫描时间,并获得更高的图像亮度;也可在已选定的光谱波长范围中跳过某些波段的接收,得到不连续的光谱图像。

荧光串色的问题,显著改善样品的成像质量,更易于获取详细、精确的数据。在观察多重荧光染色来定位蛋白分子、FRET 实验时,光谱拆分功能保障了检测的准确性。同时通过光谱拆分,还可以清除掉样品自发荧光的信号。

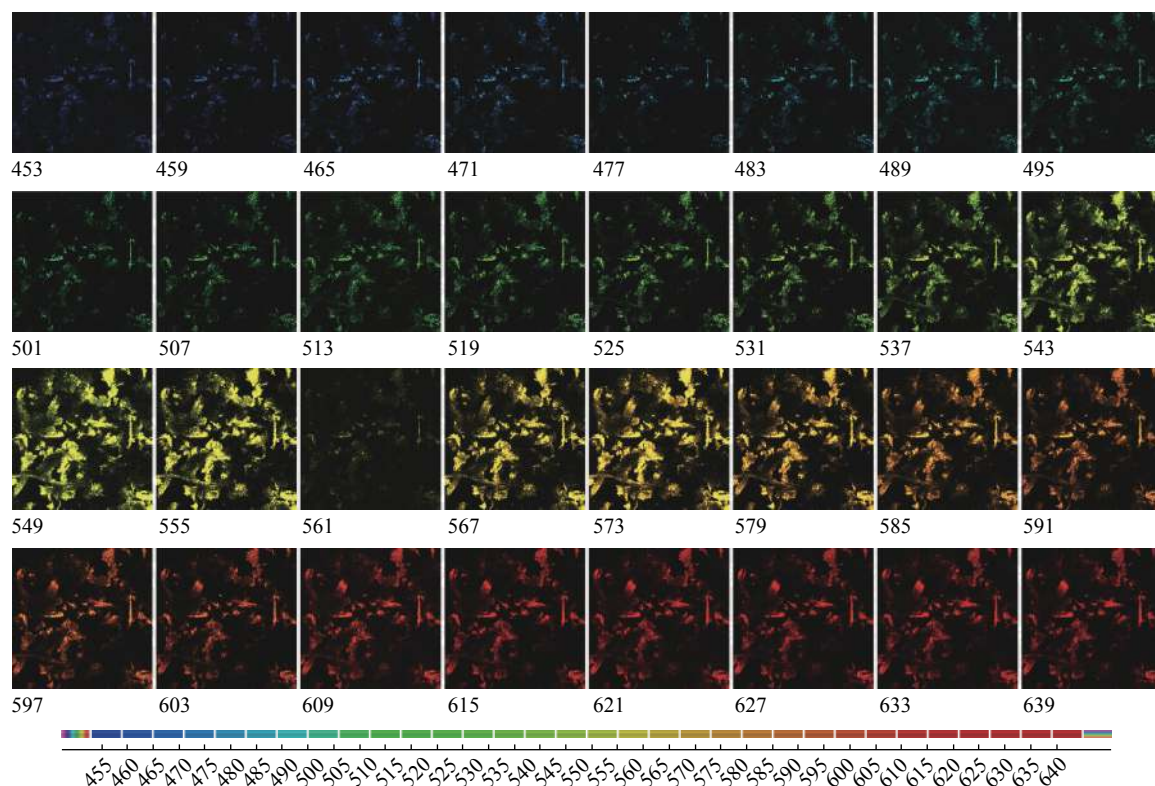


图3 纳米材料全光谱扫描成像图谱

4.5 大图拍摄

当样品的大小超出了显微镜的成像范围,在不改变物镜放大倍数的情况下,需要得到完整的样品图像时,可采用大图拼接的拍摄模式。通过设定扫描范围或扫描张数可实现图像的自动拼接,从而得到样品的整体结构如图4所示。

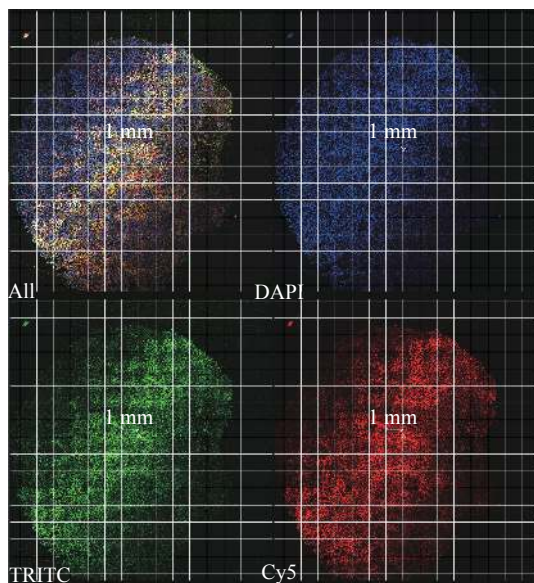


图4 小鼠脑切片大图拍摄整体成像

4.6 光活化序列拍摄

光活化即借助高强度脉冲式激光扫描样品特定区域,使该区域荧光分子被漂白或发生淬灭,观察周围非漂白区荧光分子向光漂白区的迁移和荧光恢复,对新药开发、细胞的分化增殖等生化代谢过程的调控等具有重要意义。光活化序列拍摄主要用于光漂白荧光恢复(FRAP)技术和光漂白中的荧光损失(FLIP)技术。LSCM用于光活化的最大优势是在刺激样品的同时,获取样品的瞬态变化图像,为光刺激研究提供了最佳的解决方案^[13]。

4.7 活细胞成像

在用LSCM进行活细胞延时成像时,要使用活细胞培养装置,以保证细胞在正常的生长环境下,进行成像拍摄。显微镜上需要配备专用的加热系统,用于载物台、水浴、物镜和气体的加热,还可控制CO₂浓度、湿度和温度等。活细胞成像过程中难免会出现热漂移,尤其是长时程的拍摄过程中,会严重影响成像质量。因此,在活细胞成像过程中应打开锁焦系统,尤其是在做加药实验的过程中,可防止加药扰动细胞成像。尽量降低激发光强度,避免标本荧光信号漂白。只

有满足了上述条件,才可能采集到高质量的荧光图像。活细胞成像一般使用专用的共聚焦培养皿。通常情况下,活细胞成像实验不能保证在无菌条件下进行,因此细胞在成像后即被丢弃。

5 激光共聚焦显微镜的维护

- 1) 仪器周围要远离电磁辐射源。
- 2) 仪器安装在防震台上,且保持环境无震动,无强烈的空气扰动。
- 3) 工作间要安装空调及除湿机,温度控制在 5~25℃。
- 4) 室内具有遮光系统,保证荧光样品不会被外源光漂白^[14]。
- 5) 不要直视激光,以免损伤眼睛,同时需避免激光外泄。
- 6) 关于镜头:在转动镜头前首先要保证镜头处于 Z 轴最低点,以防在转动时刮损镜头;实验完毕后,请把镜头转回到 Z 轴最低处。如需使用水镜或油镜,水、油不要滴太多,以免从镜头边缘流入物镜内部污染镜头。更换样品时不要反复擦拭镜头,擦拭过多容易磨花镜头,降低透过率,一般两三个样本后再追加一滴水或油即可。实验结束后先用擦镜纸将油擦尽,再用无水乙醇清洁。非油镜禁止浸油。
- 7) 关于汞灯:汞灯关闭后,如果需要重新开机,需等待 30 min 汞灯冷却后,再打开汞灯电源。
- 8) 仪器清洁:仪器使用完毕后,应对载物台、物镜、目镜等易污染部件进行擦拭,保持仪器的清洁^[15]。

6 结束语

由于荧光探针技术的飞速发展以及生物成像在生命科学研究中的重要作用,LSCM 已成为生物、医学、材料等领域重要的研究手段,广泛应用于各个实验室。对显微镜基础知识的深入理解、常规使用方法的熟练掌握和仪器设备的妥善维护,不仅可以提高仪器利用率、数据的准确度,还可促进各学科的不断交叉融合,为科学研究提供更有力的技术支持和保障。

参考文献

- [1] FOLDES P Z, DEMEL U, TILZ G P. Laser scanning confocal fluorescence microscopy: an overview [J]. *International Immunopharmacol.* 2003, 3(13-14): 1715-1729.
- [2] ZHANG Z, IRAHIM M, FU Y, WU X, et al. Application of laser scanning confocal microscopy in the soft tissue exquisite structure for 3D scan [J]. *International Journal of Burns and Trauma*, 2018, 8(2): 17-25.
- [3] ILIE M, CARUNTU C, LUPU M, et al. Current and future applications of confocal laser scanning microscopy imaging in skin oncology [J]. *Oncology letters*, 2019, 17(5): 4102-4111.
- [4] ULRICH M. Confocal laser scanning microscopy [J]. *Hautarzt*, 2015, 66(7): 504-510.
- [5] LEFORT C. A review of biomedical multiphoton microscopy and its laser sources [J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2017, 50(42): 423001.
- [6] 管利萍,赵阳,彭亮. 双光子共聚焦显微镜在植物学研究中获取高质量图像的应用 [J]. *实验技术与管理*, 2015, 32(4): 44-46.
- [7] NEHME E, WEISS L E, MICHAELI T, et al. Deep-STORM: super-resolution single-molecule microscopy by deep learning [J]. *Optica*, 2018, 5(4): 458-464.
- [8] 余礼厚. 激光共聚焦显微镜样品制备方法(一)——细胞培养样品 [J]. *电子显微学报*, 2010, 29(2): 185-188.
- [9] 边玮. 激光共聚焦显微镜样品制备方法(二)——组织切片样品 [J]. *电子显微学报*, 2010, 29(4): 399-402.
- [10] 孙学俊,闫喜中,郝赤. 激光共聚焦扫描显微镜技术简介及其应用 [J]. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(1): 1-9.
- [11] 岳磊,张垚,马卓. 激光扫描共聚焦显微镜实验技术与应用 [J]. *哈尔滨商业大学学报(自然科学版)*, 2015, 31(3): 263-266.
- [12] 韩景田,马玉珍,王中军. 激光扫描共聚焦显微镜的功能及质量控制 [J]. *医疗卫生装备*, 2008(5): 104-105.
- [13] 尹伟,肖桂凤,刘双双,等. 倒置激光共聚焦显微镜的共享使用与维护 [J]. *生命科学仪器*, 2015, 13(3): 46-49.
- [14] 许佳玲,王晓红,罗剑文,等. 蔡司 LSM 7DUO NLO 激光共聚焦显微镜的应用和管理 [J]. *实验室研究与探索*, 2017, 36(6): 281-285.
- [15] 刘振国,华子义. Zeiss LSM710 激光扫描共聚焦显微镜的管理和维护 [J]. *实验室科学*, 2017, 20(3): 193-195.

编辑 钟晓