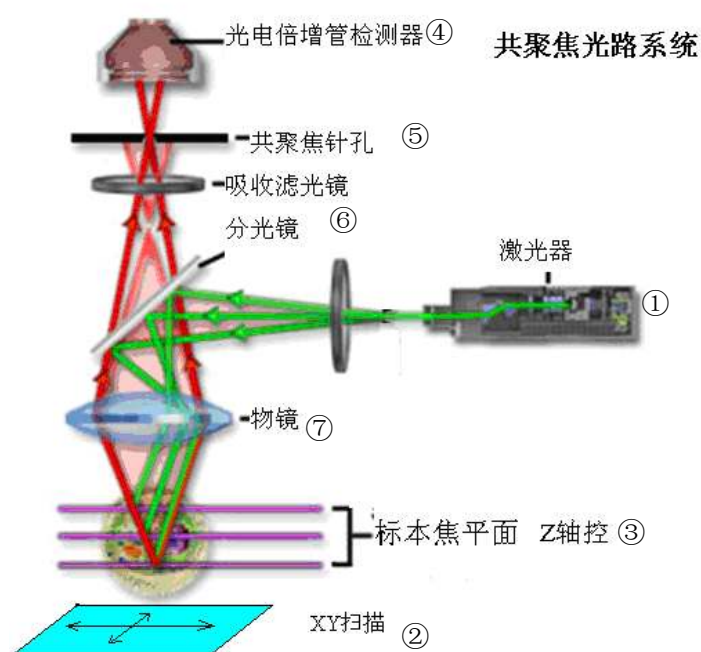


典型 FV 应用操作简介

FV1000 激光扫描共聚焦显微镜基本构成及成像关系	2
①激光:	2
② 扫描:	3
③ Z 轴控制:	4
④光电倍增管检测器 (PMT):	4
⑤共聚焦针孔 (Pinhole, Confocal Aperture):	4
⑥分色镜和吸收滤色镜: 用于选择光路和	5
⑦物镜:	5
FV1000 激光扫描共聚焦取图技巧	6
三步骤获取图像	6
提高图像质量的方法:	7
FV1000 离线软件 FV10-Viewer 的功能简介	8
FV 应用-1 time lapse (离子浓度、长时间细胞培养等)	11
FV 应用-2 3 维成像等	13
FV 应用-3 光谱扫描等	15
FV 应用-4 Colocalization (多色荧光等)	17
FV 应用-5 Calcium spark.....	19
FV 应用-6 FRET	21
FV 应用-7 主扫描 FRAP (光刺激、光漂白等)	25
FV 应用-8 SIM 等	27

FV1000 激光扫描共聚焦显微镜基本构成及成像关系



① 激光:

激发标本上的荧光物质，使其产生荧光

激光强度 (Laser power): 通过 AOTF (声光调制滤光器) 进行快速和 0.1% 的强度调节

Laser				
☐	458		☐	21.0 %
☒	488		☐	63.0 %
☐	515		☐	51.2 %
☐	543		☐	49.0 %
☐	633		☐	49.0 %

激光谱线和典型荧光染料 (蛋白) 的对应关系:

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……

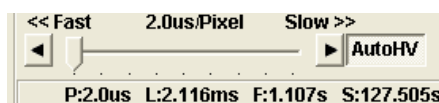
没有列入上表中的荧光可以选择接近的激发光激发

激光强度利用:

可以用强激光执行光漂白实验; 激光越强图像信噪比越好, 但一定要慎重使用, 否则会造成荧光漂白和光毒性

② 扫描:

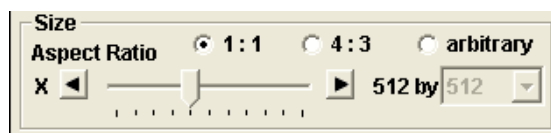
利用 XY 扫描振镜, 使会聚到标本上的激光光束在标本平面水平移动



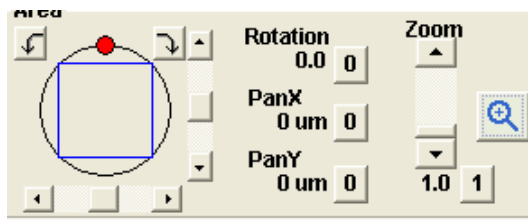
扫描速度: 扫描速度越快取样频率越高但成像质量越差, 单向扫描  图像质量好,

速度较慢。双向扫描  可以提高图像速度, 但图像会有一些的像素偏移,

停留时间: 激光在每一点的停留时间, 影响图像信噪比。停留时间越长、可收集荧光越多、图像噪音越低。但停留时间过长也会造成荧光漂白。



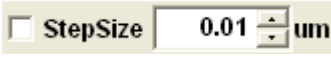
扫描分辨率: 一次成像激光在标本上扫描的点数, 从点扫描到 4Kx4K, 扫描分辨率越高图像速度越慢。(但请注意扫描分辨率≠共聚焦成像分辨率, 共聚焦成像分辨率取决于物镜分辨率、扫描分辨率和 ZOOM 功能的匹配情况)



ZOOM 放大功能: 驱动扫描振镜在更小的视野内扫描, 使保证高扫描速度(低扫描分辨率)情况下提高图像分辨率

③ Z 轴控制:

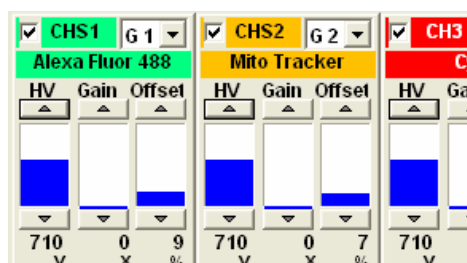
上下移动标本，聚焦感兴趣平面，生成三维图片

Step size: 每一步移动的位移，最小步进 10nm。 

推荐 Z 轴步进 : 计算机将根据物镜、针孔和荧光性质判断光学切片的厚度，该 Optimum 为 Z 轴理论分辨率的 1/2。但一般这个 Z 比较薄，可能需要做的光学切片较多。

④光电倍增管检测器 (PMT):

和激光扫描匹配逐点采集荧光信号



HV = PMT 检测电压，增加 HV 会提高检测敏感度，但图像噪音也会随之增加

Gain = 后期信号放大，在图像信号极低的情况下可以适当调节

Offset = 基线调整，Offset 越高，图像背底约暗，但一些阳性信号也可能被同时扣除

扫描图像时尽量是感兴趣的图像信号处于 PMT 的有效检测范围内，即不要过量（曝光过度、过饱和），也不要过低（曝光不足）。可以使用快捷键 **Ctrl+H** 切换到 **Hi-Lo** 模式协助调整采集图像亮度，在 Hi-Lo 模式中，红色出现为过 Hi，蓝色出现为过 Low。多数情况下使感兴趣位置细节信息处于 Hi 和 Lo 之间，充分利用 PMT 的采集效率，并使图像后期处理保留更大的空间。

⑤共聚焦针孔 (Pinhole, Confocal Aperture):

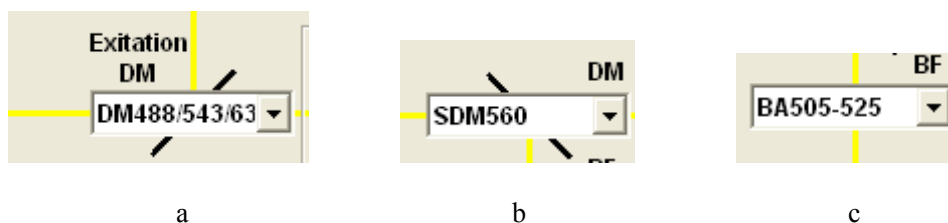
用于阻挡非焦平面光线进入检测器，形成“共聚焦”效果。

直径调节: 默认选中 Auto，计算机会计算出理论针孔值。针孔越小图像光切效果越好，但光线弱。实际使用中可以适当调节共聚焦针孔以达到合理的光切效果。针孔越大，透过的光线越多，但光切效果下降，实际使用中如活细胞实验中常常将针孔适当放开，以提高可检测荧光强度，这样可以在低的激发激光下得到较强的荧光信号，有效的保护标本。



⑥分色镜和吸收滤色镜：用于选择光路和

分色镜（Dichroic mirror）将光根据波长不同而分开的玻片，通常为反射某类波段光线，同时其它波段光线。



激发分色镜（图 a）：标识数字为反射的激光波段，其余波段荧光通过。

荧光反射镜（图 b）：标识数字为分界波段，如图表示为<560nm 波段反射，>560nm 波段将透过该镜片。

吸收滤色镜（barrier filter）（图 c）：用于过滤特异波段的荧光，在光谱系统中该部分可以通过狭缝和光栅随意调节。标识一般表示为“带通”，如图表示 505nm-525nm 波段的荧光可以通过此滤色片。

⑦物镜：

成像的决定性部件，对系统的分辨率、检测荧光强度等起决定作用。系统分辨率(能够检测相互靠近两点的最小距离) $R = k \times NA / \lambda$

物镜的数值孔径（Numerical Aperture）：NA 越高，分辨率越好

介质折射率：折射率越高，物镜能够达到的 NA 越高

色差校正：对可见光各波段的校对能力，使同一点发出的不同颜色的光能够同时成像到同一平面的能力

FV1000 激光扫描共聚焦取图技巧

1 三步骤获取图像

①观察

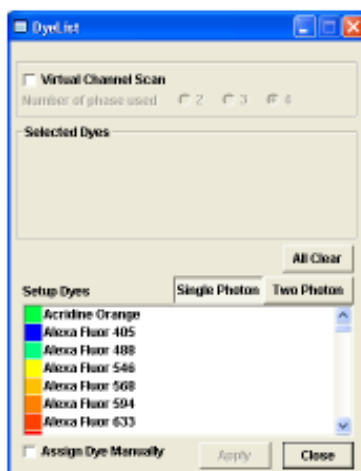
显微镜下观察标本，选择合适的物镜

点击, 选择合适的荧光滤镜，观察标本荧光（倒置显微镜）

点击, 观察透射光（倒置显微镜）

②选择染料

点击, 跳出荧光染料选择窗口，选择对应荧光 >> Apply



③扫描图像



Focus X2 以 2 倍速扫描图像, 适合低扫描分辨率图像的快速聚焦(忽略 Kalman、慢速扫等功能)

Focus X4 以 4 倍速扫描图像, 适合高扫描分辨率图像的快速聚焦(忽略 Kalman、慢速扫等功能)

XY Repeat 可以直接高质量扫描图像, 但速度略慢(使用 Kalman、慢速扫等功

能)

XY 适合快速预扫描后直接高质量出图，可以执行高级 lamda/Z/Time 扫描（使用 Kalman、慢速扫等功能）

提高图像质量的方法：

获取更多的信号

- 将扫描速度降低，同时使用  功能
- 使用 Kalman 功能，对图像进行多张扫描取平均，以降低 PMT 随机噪音



- 调节采集荧光的带宽，宽>>荧光强，但如果多色荧光时会产生串色或引入自发光
- 放大共聚焦针孔，但会使光学切片变厚
- 增加激发光强度，但会造成漂白和光毒性，请慎重使用!!!

获取更清晰的细节

- 使用更高数值孔径的物镜
- 使用 ZOOM 功能
- 在低 ZOOM(如 1X~3X)情况下，使用高扫描分辨率如 1024 x 1024 或 2048 x 2048
- 使要求细节部分图像一定不能 Hi，也不能 Low

更可信的结果

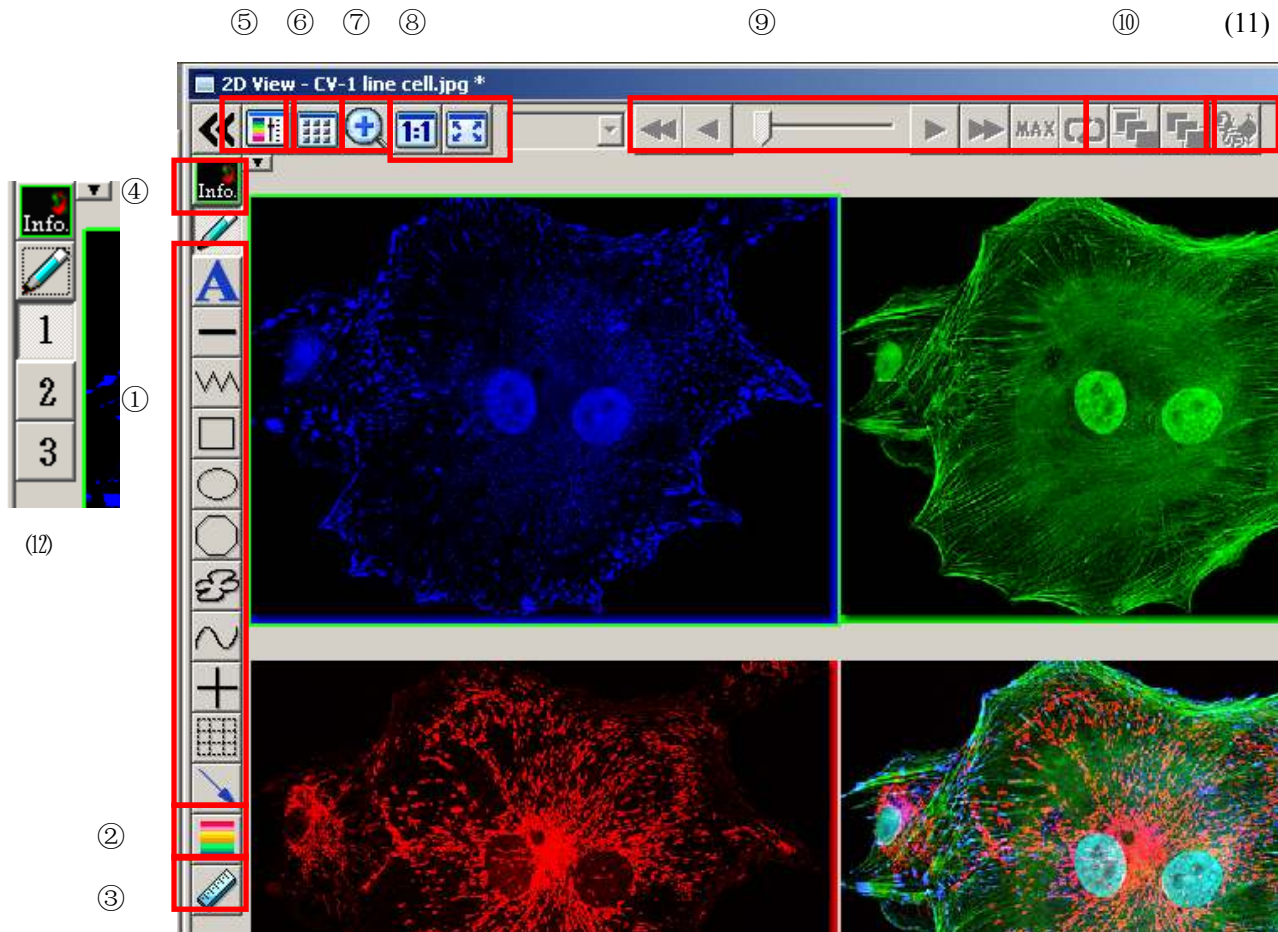
- 多色荧光时使用顺序扫描  Sequential，避免串色

Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
Alexa Fluor 488	Mito Tracker	TD1		
Cy5				

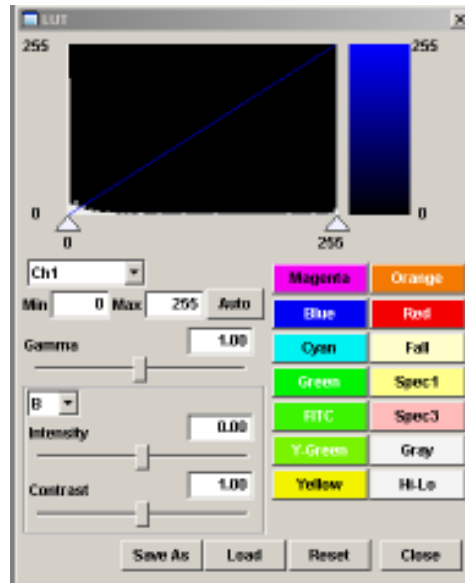
FV1000 离线软件 FV10-Viewer 的功能简介

建议：在用共聚焦获取图像后，将文件存储为共聚焦专有格式 Oib 或 Oif，这些格式中包括绝大多数获取该图像的硬件信息，方便后期检查。

下面将 FV10-Viewer 的较常用功能做简单介绍



- ① 图像上添加标识或选择区域
- ② 图像上加色标
- ③ 图像上加标尺
- ④ 在图像上显示最基本信息（如时间、Z 轴位置等）
- ⑤ LUT 调节



可以调节更荧光通道的展示范围、gama、亮度、对比度和颜色等

⑥窗口显示方式：多通道显示、单通道合成显示、Z 或 T 图像 XYZ 各切面展示

⑦放大

⑧图像显示比例：1:1 显示，适应窗口显示

⑨Z 或 T 图像播放

⑩播放或叠加图像时的起始点和终止点设置

(1)Z 或时间轴的单层显示和叠加显示

(2)当选中任何一个图像窗口时，选择通道按钮，可以随意选择任何通道相互叠加

除了上述直接展示的内容外，右击图像时还会展示出更多的信息，其中几个功能比较实用：

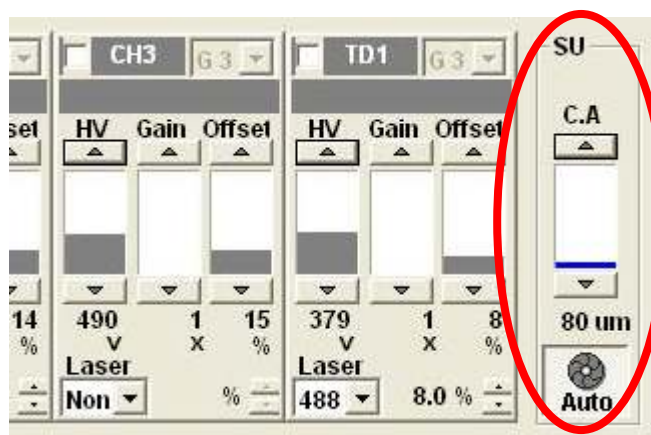
- ① Save / Save as 存储为 Oib / Oif 格式
- ② Export 可以将图像导出为 TIFF/BMP/JPE/AVI 等常用格式，而且还可以选择是否将图片上加的标识同时存储等
- ③ Save display 可以将当前展示的图像直接抓取
- ④ ROIs (Region Of Interested)相关设置，即对所选择区域进行相关操作
- ⑤ show profile 可以显示 X 或 Y 线的强度
- ⑥ show overlay 可以显示或清除图片上的 ROI、标尺等信息
- ⑦ add a view 可以在窗口中增加一个显示通道，remove selected view 为相反操作



FV 应用-1 time lapse（离子浓度、长时间细胞培养等）

1 预扫描找到适宜标本（图像信噪比较好）

2 适当开大针孔，降低激光强度



3 选择 Time 扫描

4 在时间扫描界面中设置合适的时间间隔和总的取图数量



5 如果长时间 Z 轴会有一定漂移，可以使用 XYZT 模式，在最终成像后选择各时间点上较好的图像组成时间序列，如果有 ZDC 可以执行 ZDC 功能

6 执行 XYT 扫描



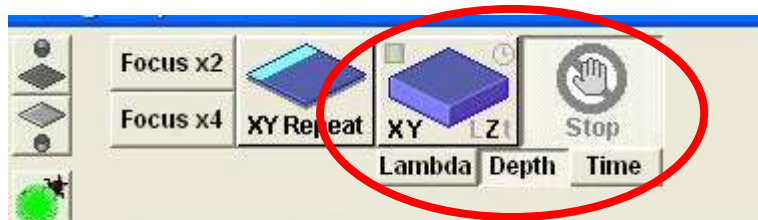
6 得到图像后，选择合适的区域，点击 series analysis 进行动态分析



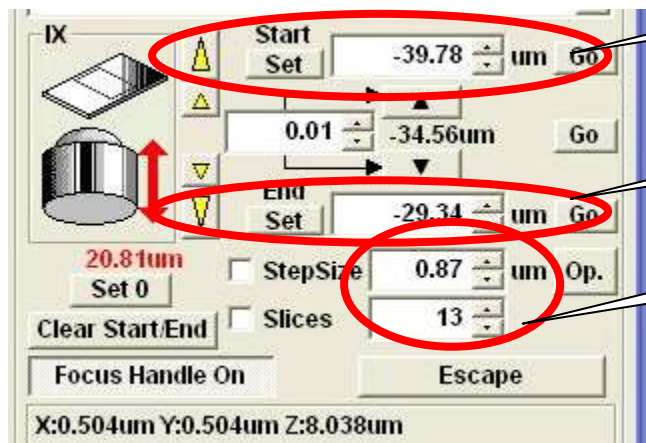
FV 应用-2 3 维成像等

1 预扫描找到适宜标本（图像信噪比较好）

2 选择 Z 轴扫描



3 在 Z 扫描界面中设置合适的上平面、下平面和扫描间隔



找到上平面后点击 set，设定

找到下平面后点击 set，设定

设定扫描间隔或扫描张数

6 执行 XYZ 扫描

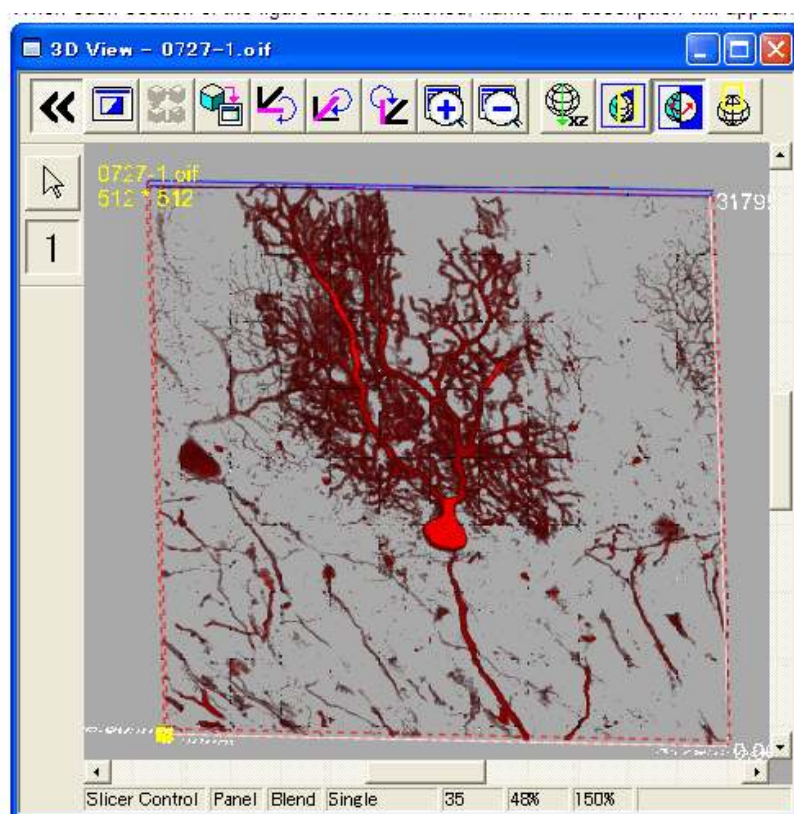
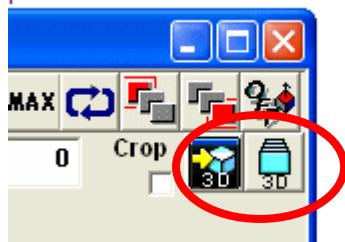


7 得到图像后，在图像点击图像展示模式按钮
可以在下面选项中选择三维展示模式看各层切面情况



8 也可以点击 3 维重建按钮来展示三维重建效果

pear.



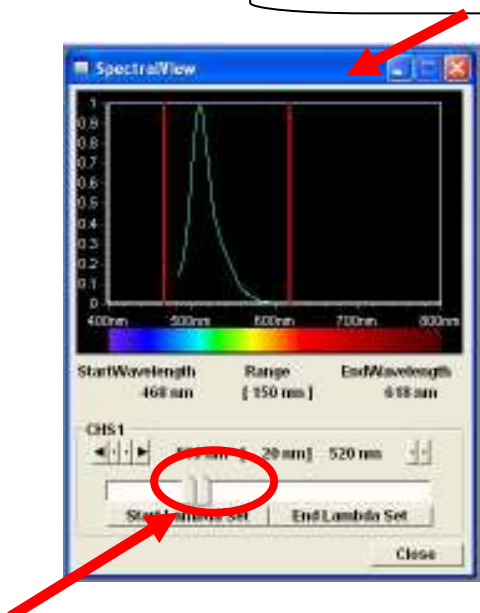
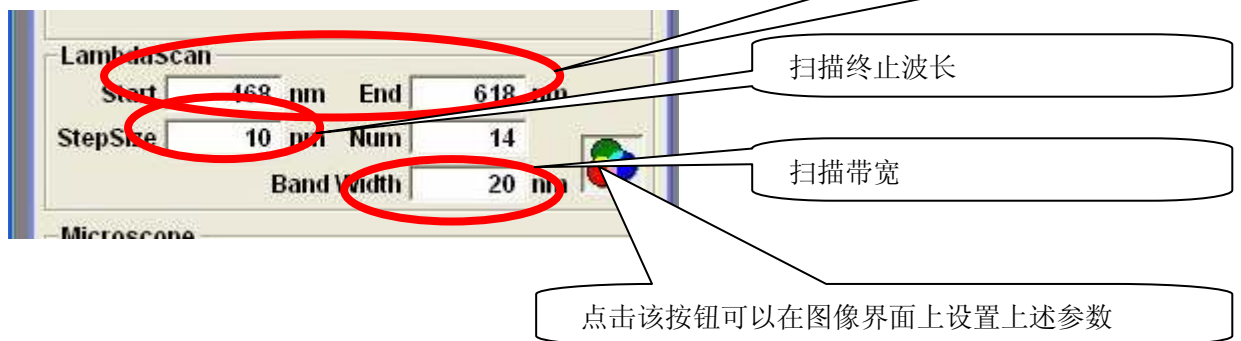
FV 应用-3 光谱扫描等

1 预扫描找到适宜标本（图像信噪比较好）

2 选择波长扫描



3 在波长扫描界面中设置合适的上平面、下平面和扫描间隔



6 边预扫描，边用鼠标来回拖动波长选择检查各波长范围内的荧光情况，使各波段的荧光不至于相差太多



7 执行波长扫描

8 得到图像后，在图像点击 series analysis 分析各波段荧光情况



FV 应用-4 Colocalization（多色荧光等）

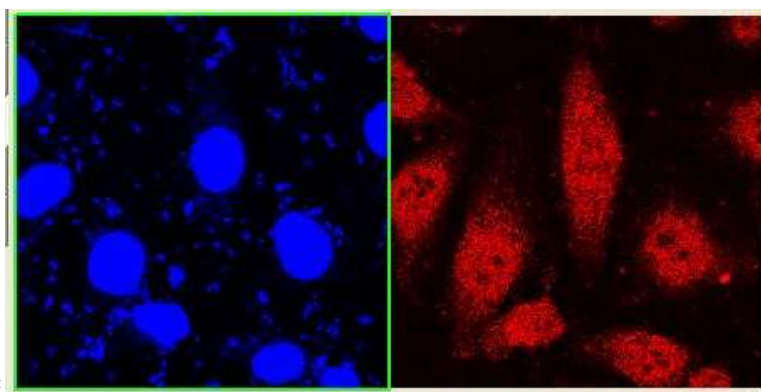
1 选择两种染料 

2 扫描过程中需要先确认是否存在荧光串色，如果存在需要使用序列扫描

☐ Sequential

等方式以减少或避免串色

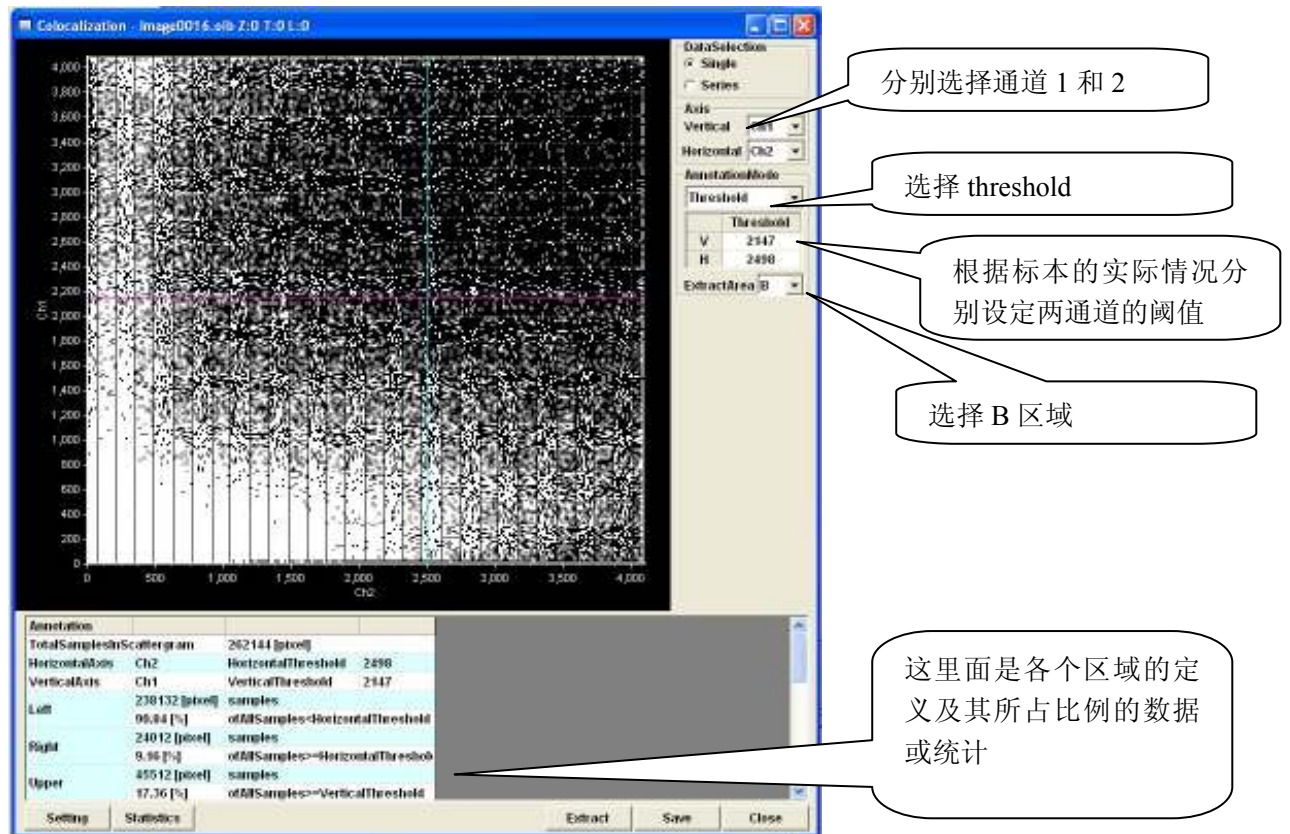
3 成双通道象



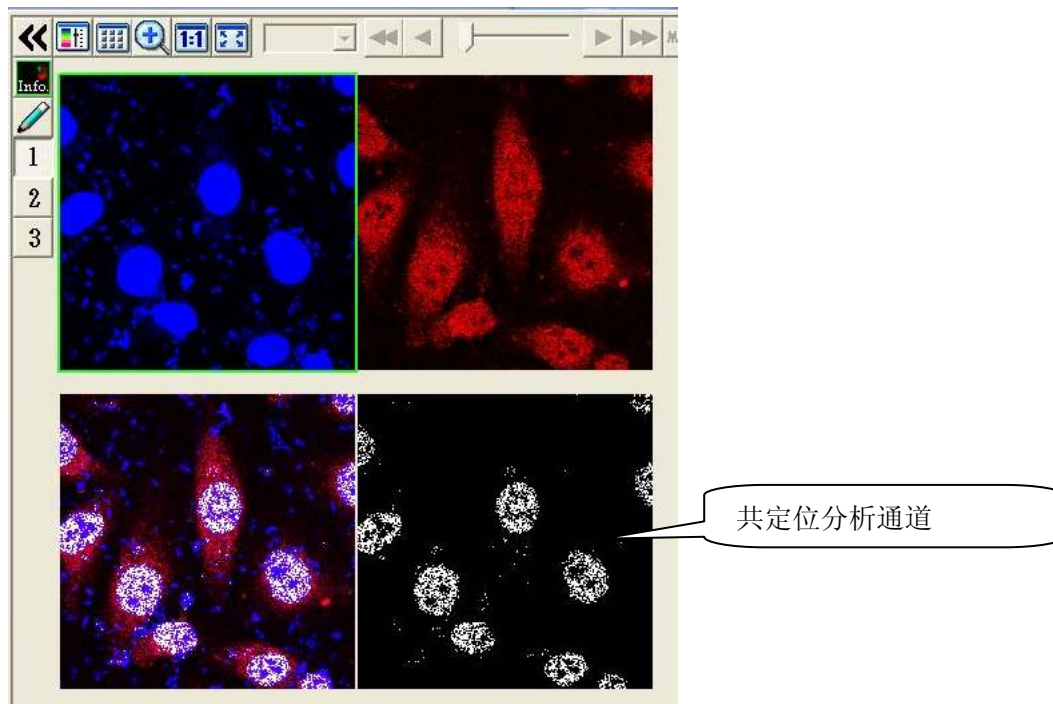
4 点击共定位分析按钮



5 出现共定位界面，在界面中按照指导选择



6 最后会得到如下图像，图像中第三通道为共定位分析通道，可以看到共定位的位置，该通道还可以和其它通道合成在一起

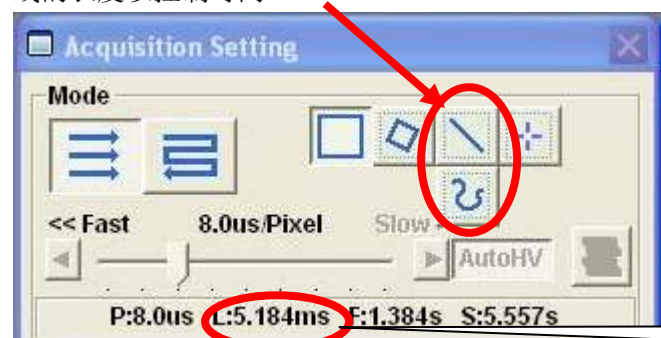


FV 应用-5 Calcium spark

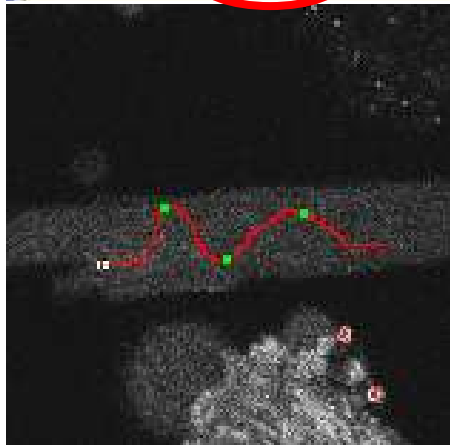
1 镜下选择合适的细胞：细胞收缩不明显，用肉眼能够看到有明显的闪动的钙信号

2 根据实验选择  合适的荧光染料如 fluo-3 等，预成像

3 选择合适的细胞，并用点击线扫描，在细胞出现火花几率较高的位置划线，注意控制每条线的长度以控制时间

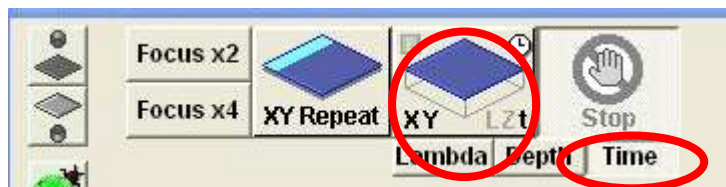


可以看到每条线扫描的时间

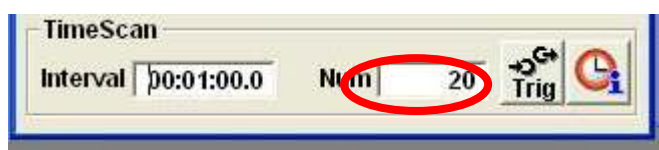


(推荐选择直线，速度快，而且比较方便控制时间)

4 此时系统会自动设定为 XYT 扫描

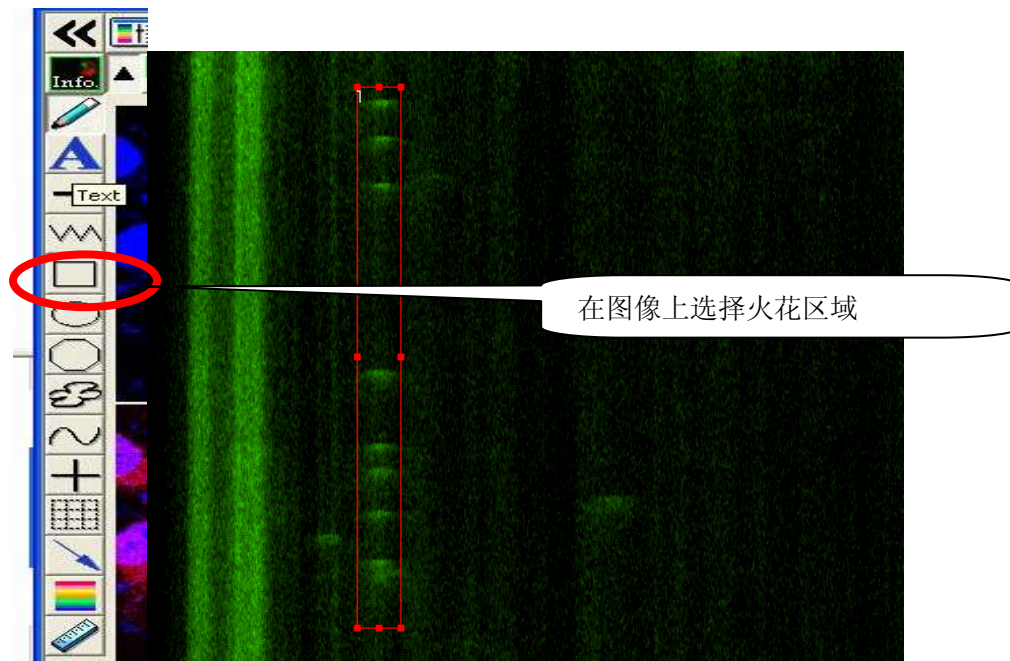


7 在时间扫描上设定扫描的次数如 1000 次

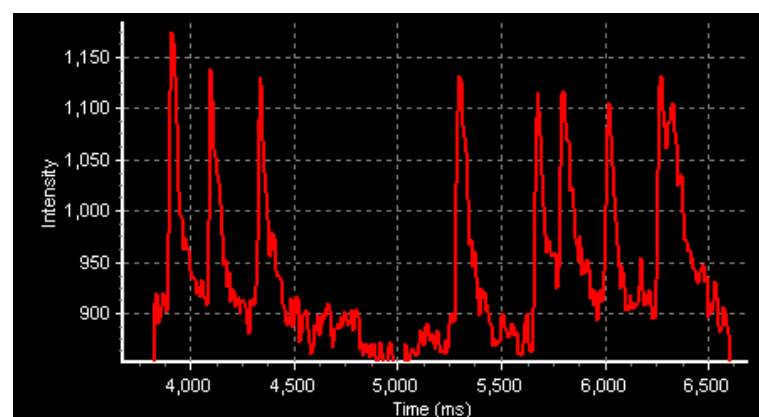




9 在最终图像上选择出现火花区域



10 点击”series analysis”分析曲线



FV 应用-6 FRET

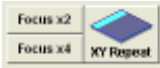
1. 了解 FRET 对（以 CFP/YFP 为例）所标记蛋白的特性。

	标记的蛋白	根据分布特点选择 FRET 可能性较大的细胞
供体（CFP）	预计定位	CFP 荧光较弱
受体（YFP）	预计定位	YFP 荧光较强

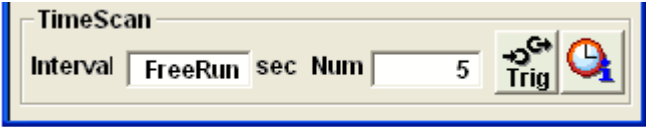
2. 点击图像获取窗口中的, 使其处于按下状态并自动打开荧光，在荧光显微镜下，寻找有荧光标记的细胞，并初步选择比较明亮的细胞置于视野中央。
3. 扫描参数的调节。

1). 点击使其处于弹起状态以关闭汞灯光闸。

2). 点击按钮，并从染料列表中选择相应的染料（如 CFP和YFP），然后点击Apply按钮确认。

- 3). 点击 Focus x2 或 XY Repeat 进行扫描。
- 4). 调节两个通道的（如 CFP 和 YFP）HV、Gain、Offset

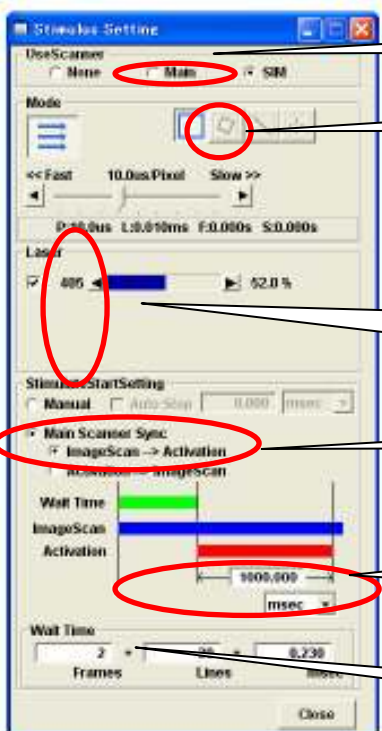
4. 编制受体漂白 FRET 实验流程



- 1) 选择 XYT 扫描方式
- 2) 在上图所示时间扫描中，扫描数量设定为 2 即可

5 设定漂白

- 1) 选择按钮，跳出漂白界面，按指导操作



选中 MAIN

选中 ROI 选择键，在图像上选择需要漂白的区域

选中用于受体漂白的激光器，如 515 等，并根据漂白情况选择漂白激光强度

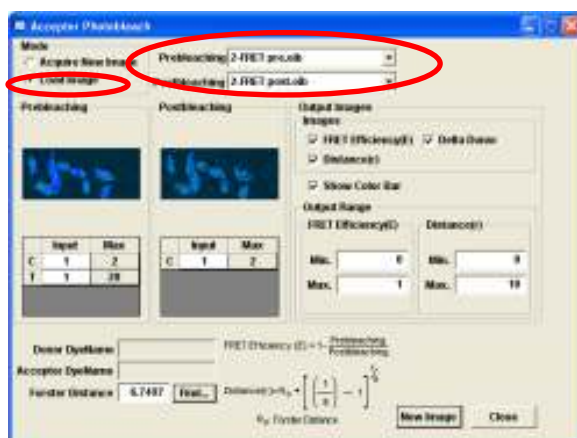
按图选择

输入需要漂白的的时间或幅数，根据实际漂白效果，如果很快漂白则输入值低一些，如果漂白慢则输入值大一些

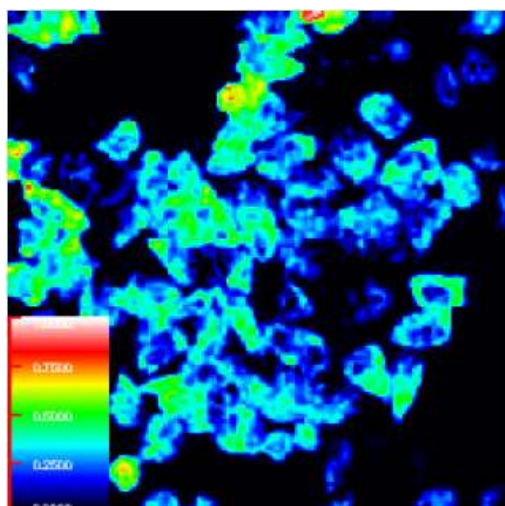
输入等待 FRAM 数，输入 1Frame

6 执行 XYT 扫描

7. FRET 图像的计算



1. 点击快捷键 ，打开受体漂白 FRET 计算窗口。
2. 将第 6 步获得的时间序列图像选入，并选择相应通道，点击 New Image 按钮，就会生成 FRET 计算后的图像。



3. 从获得的 FRET 计算结果中可以得出 FRET 在细胞内发生的位置和 FRET 对中供体和受体的距离值。

当然上述实验也可以通过点击

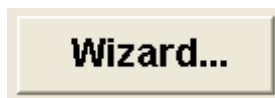


后选择 “acquire new image

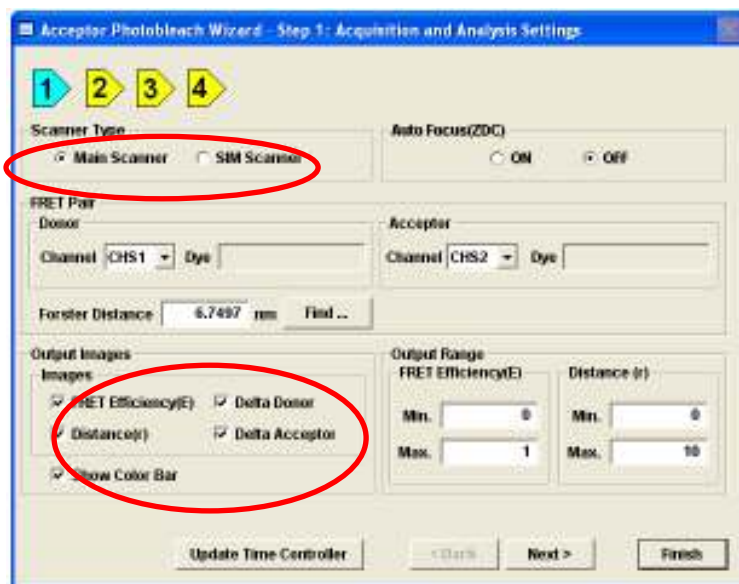


” 然后按

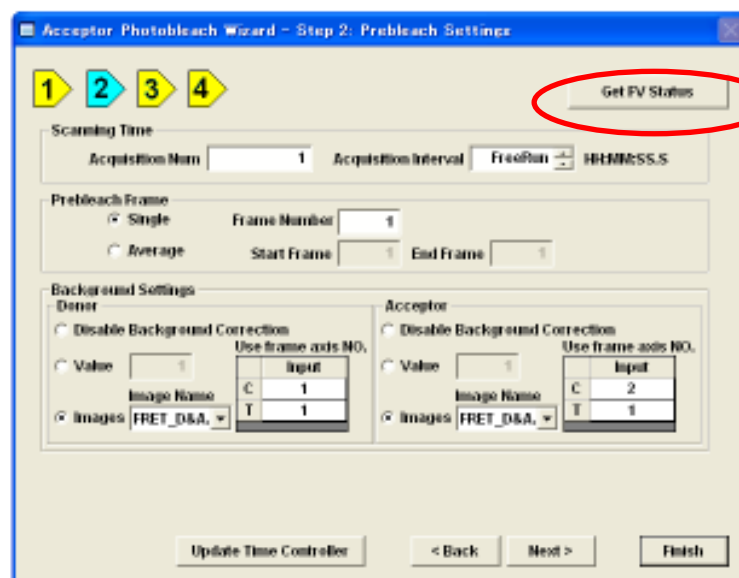
照



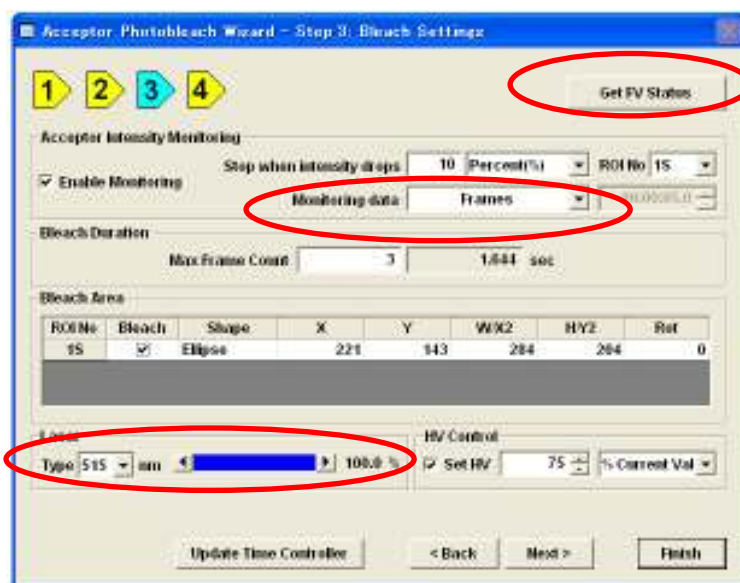
1,2,3,4 执行即可



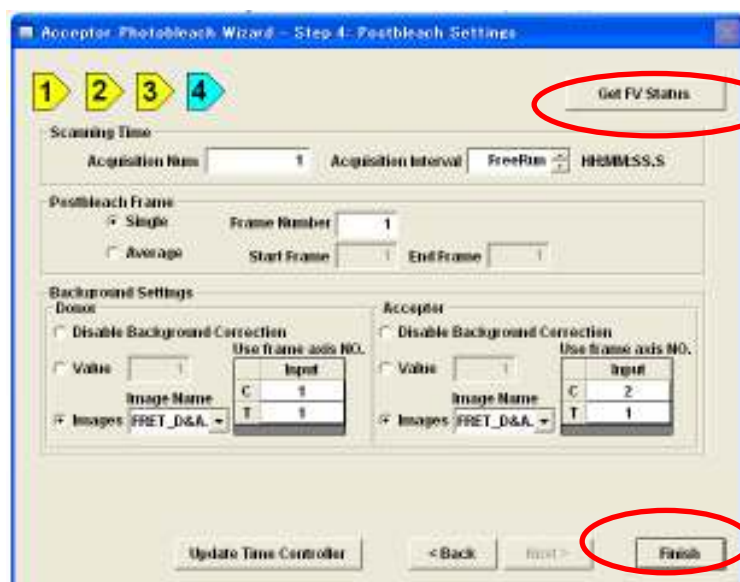
这一步设定 FRET 对
输出图像
和漂白方式



这一步设定漂白前的设置
可以用共聚焦直接预扫描后用
“get FV Status” 直接调取 FV
设置



这一步设定漂白的设置
注意设定漂白激光、漂白次数
和漂白 ROI 等
可以用共聚焦直接预扫描后用
“get FV Status” 直接调取 FV
设置



这一步设定漂白后的成像设置
可以用共聚焦直接预扫描后用
“get FV Status” 直接调取 FV
设置

当上述工作完成后，点击 FINISH，执行即可，最后图像结果和计算结果会一同得出

FV 应用-7 主扫描 FRAP（光刺激、光漂白等）

1 细胞膜要用荧光标记，可以选用一些膜特异性染料，要求这些荧光染料对细胞活性影响尽量小，最好使用蓝光激发发绿光的荧光染料，比较容易漂白。详细情况可以咨询荧光染料公司如分子探针等

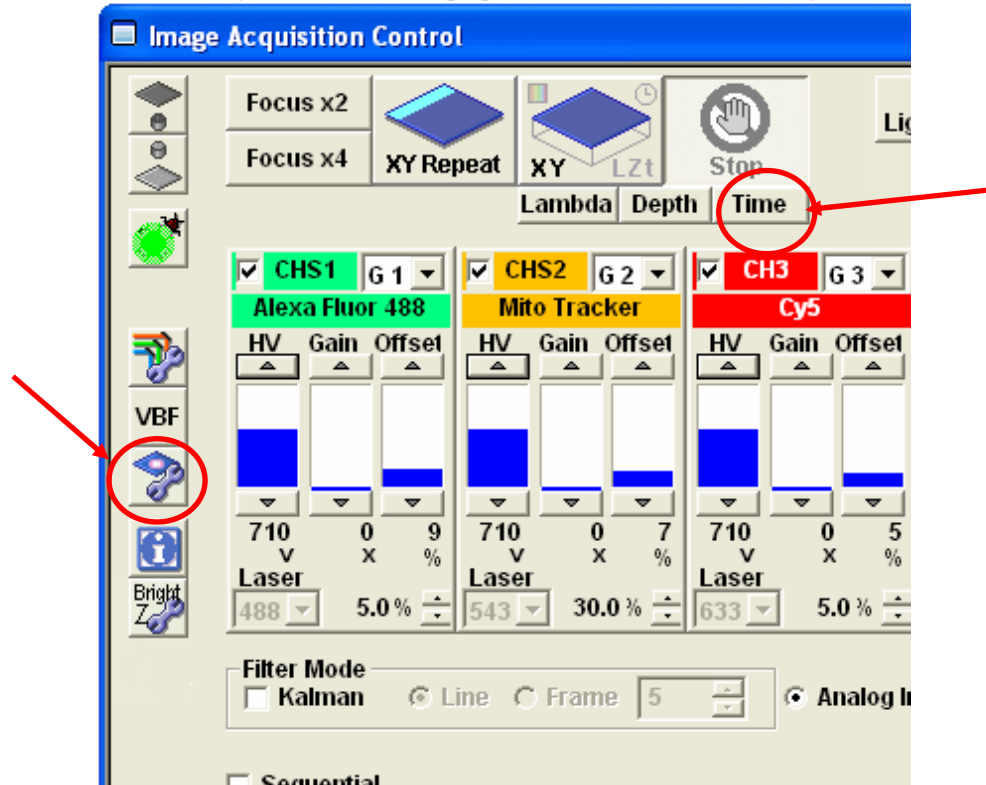
操作步骤：

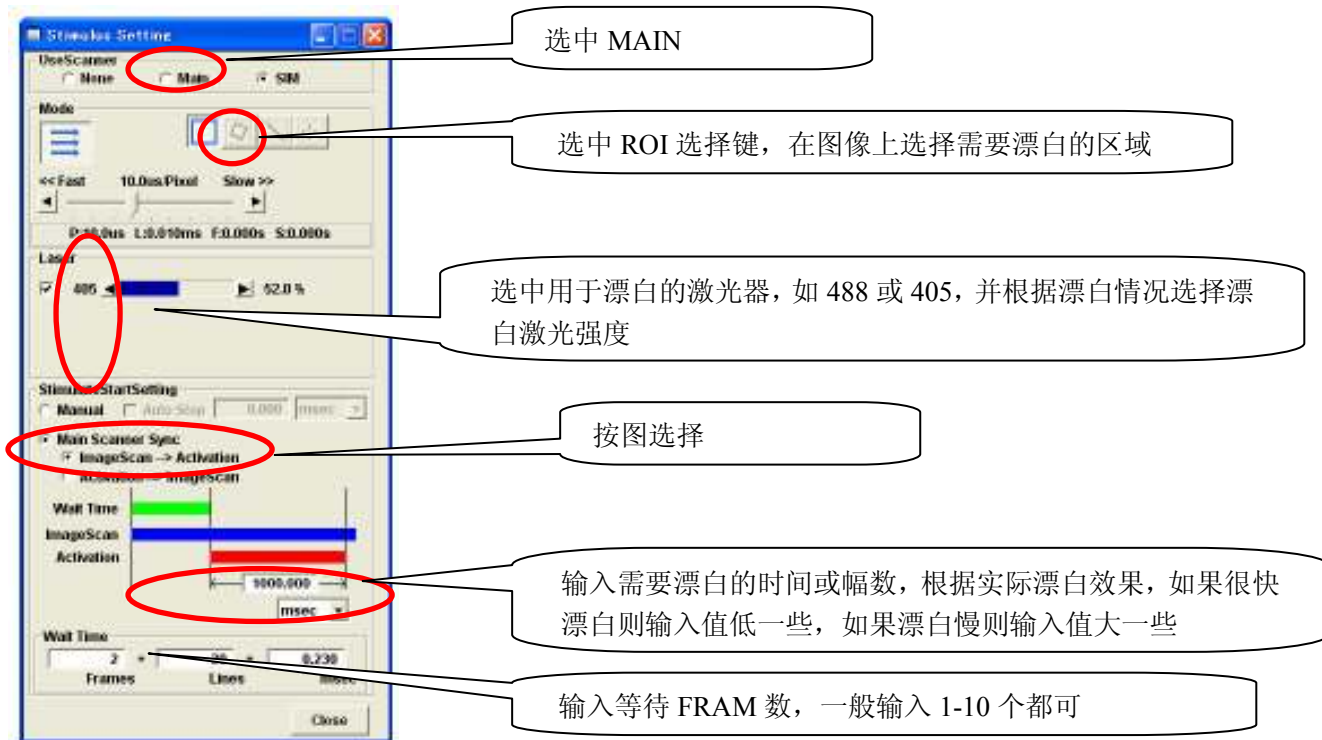
1 选择合适的细胞，细胞最好要不动的，最好在高倍如 60X,100X 物镜上，通过 ZOOM 方法在视野中选好合适的一个或几个细胞

2 根据实验需要设定 XYT 时间扫描，如果恢复快速则时间间隔小一点，如果恢复慢则时间间隔长一些

3 按光刺激按钮

When each part of the following figure is clicked, name and explanation

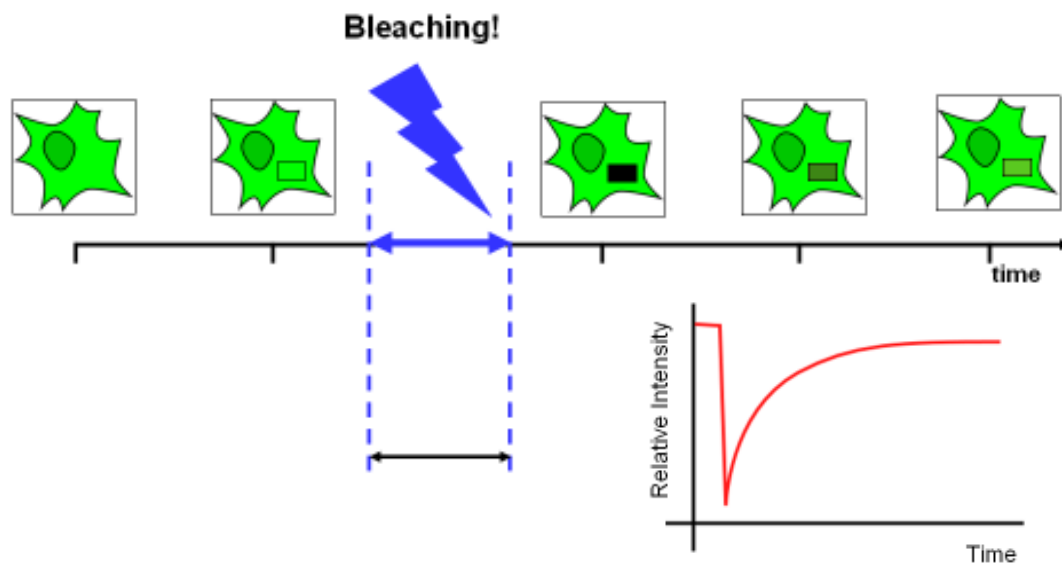




5 执行 XYT 扫描，并在扫描后不断的反复修正漂白时间和漂白激光强度等值

6 最后对漂白区域进行测量，得出漂白恢复曲线

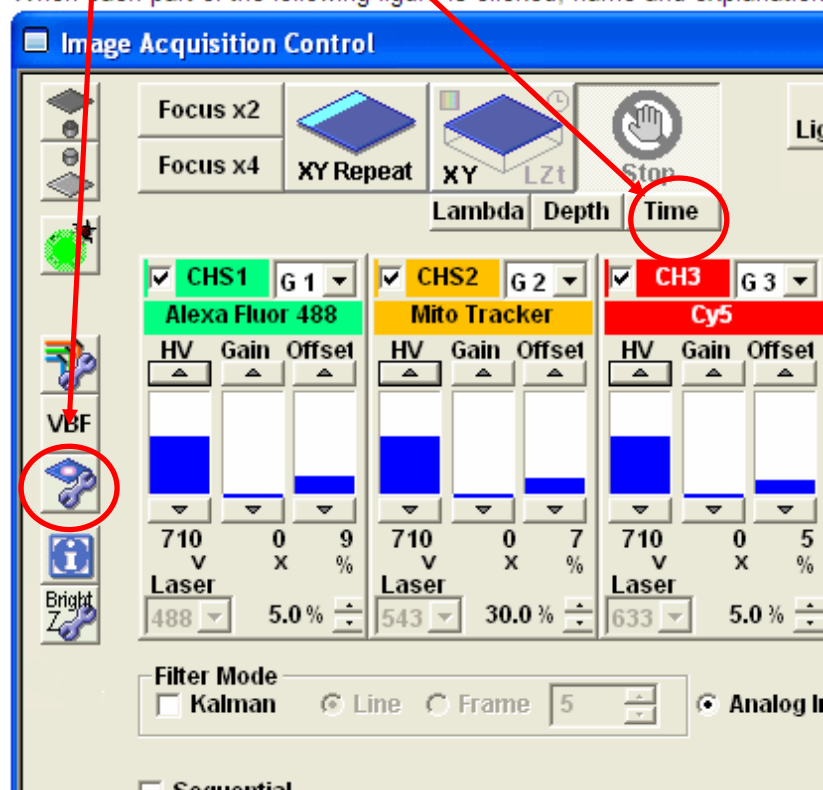
整个过程如下图流程所示：



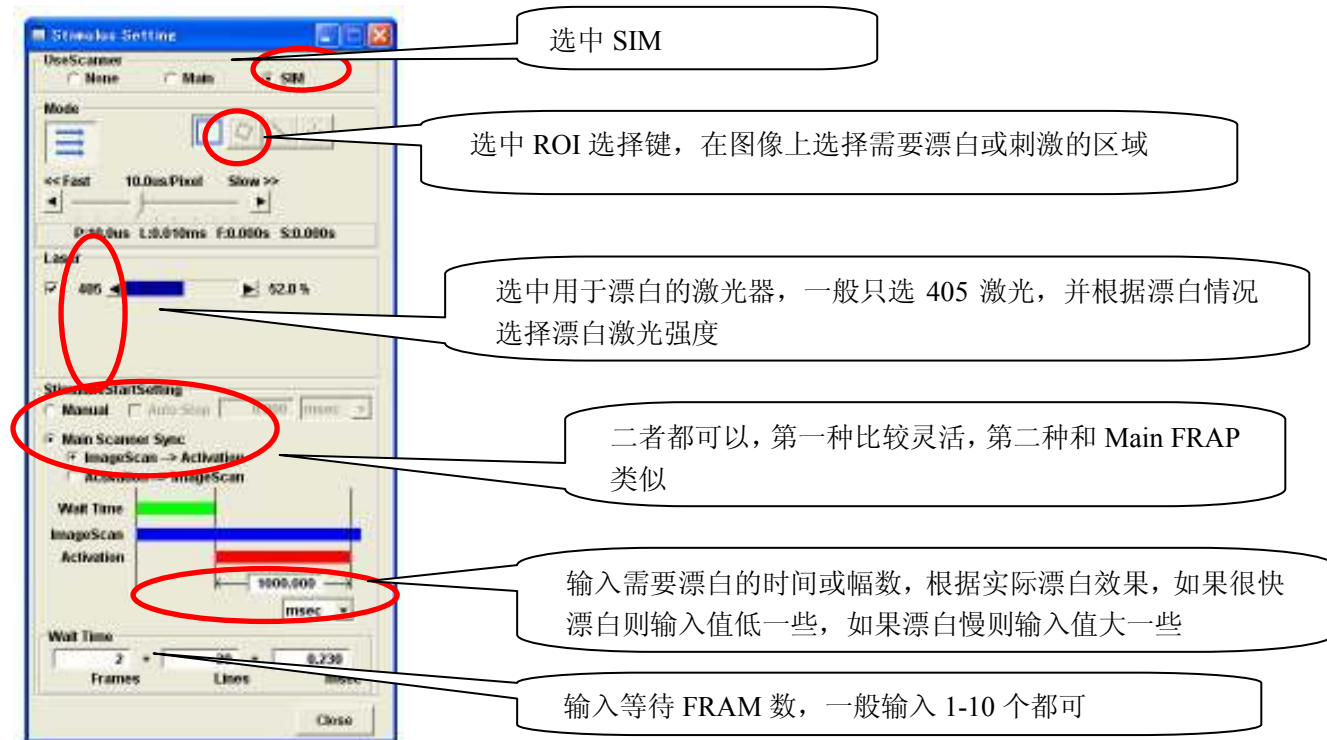
FV 应用-8 SIM 等

- 1 选择合适的细胞，细胞最好要不动的，最好在高倍如 60X,100X 物镜上，通过 ZOOM 方法在视野中选好合适的一个或几个细胞
- 2 根据实验需要设定 XYT 时间扫描，如果恢复快速则时间间隔小一点，如果恢复慢则时间间隔长一些
- 3 按光刺激按钮

When each part of the following figure is clicked, name and explanation



- 4 按下述指导操作



5 执行 XYT 扫描，SIM 扫描的好处在于，可以一边执行 XYT 扫描，一边进行光刺激，在 XYT 扫描的过程中还可以调节光刺激的位置和强度等，而且可以不间断的成像