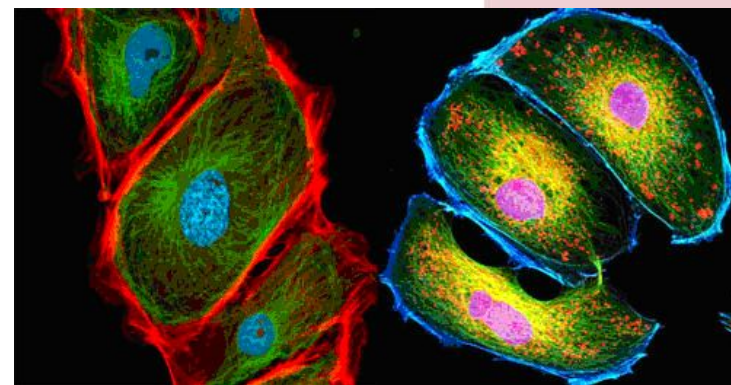
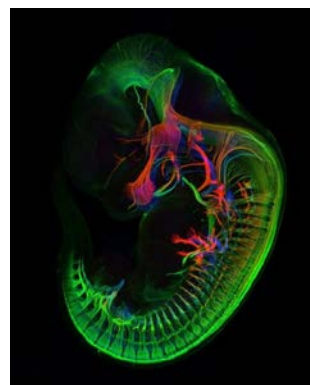
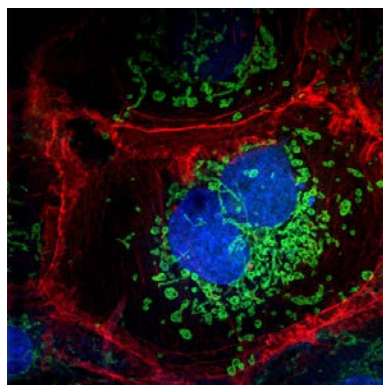
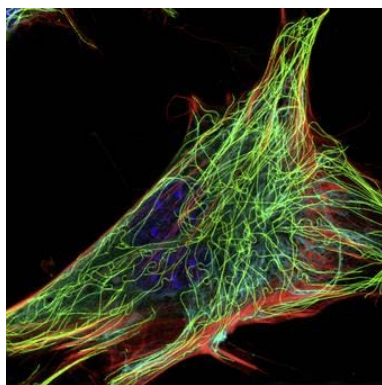




福建医科大学附属协和医院

Fujian Medical University Union Hospital

多彩微世界—— 激光扫描共焦显微镜技术及应用

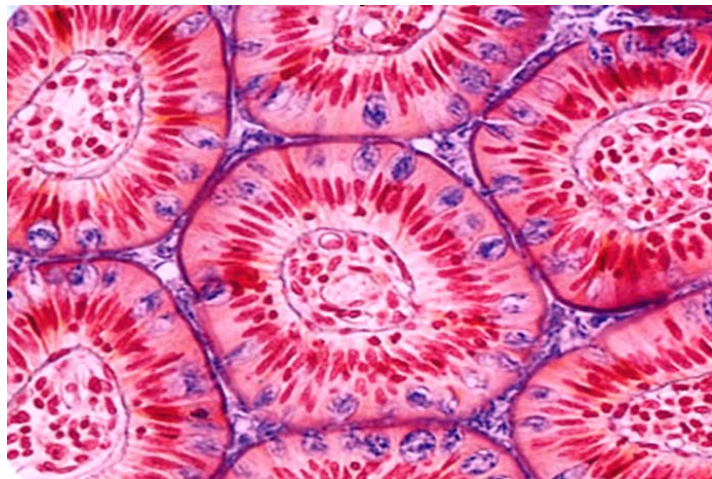


侯迪玉

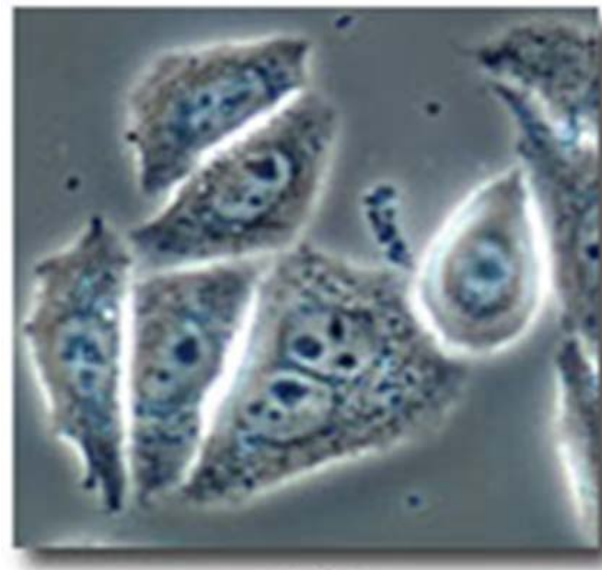


显微镜的不同观察方式

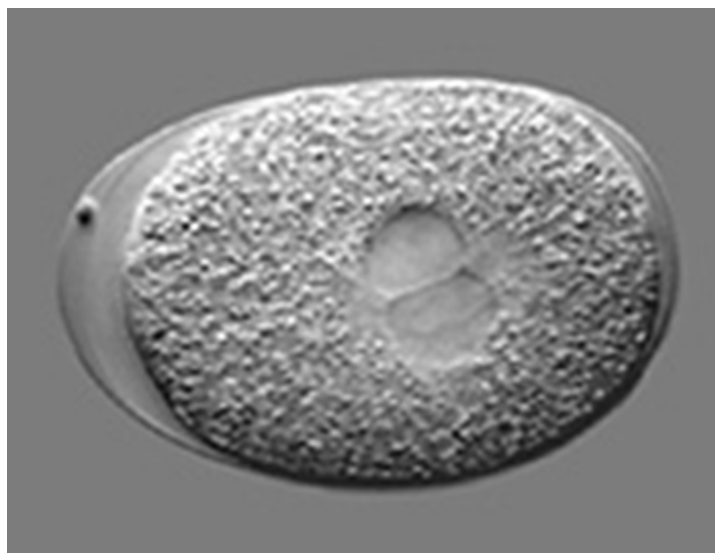
明场



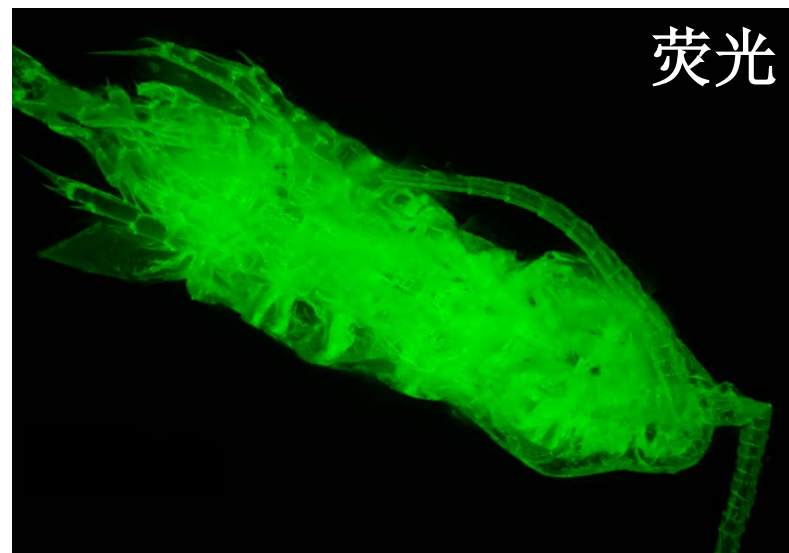
相差



DIC



荧光



中心实验室现有显微镜

01

正置光学显微镜

普通病理切片、
免疫组化片



Leica DM500

02

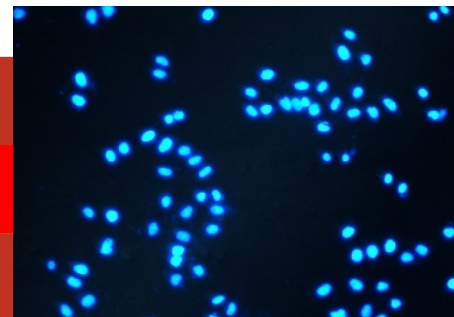
倒置相差显微镜

活细胞



Nikon TS100

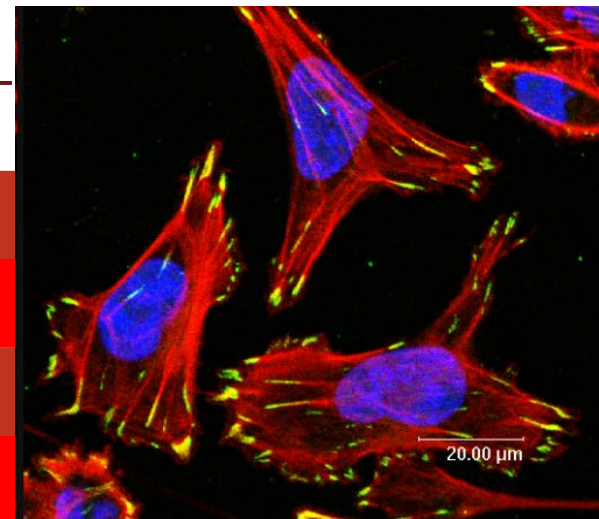
03



荧光显微镜

普通病理切片、
免疫组化片、活
细胞等的普通光
源、相差及荧光
观察，数字图像
摄取及图像处理
等

04



激光共聚焦显微镜

主要用于观察活细
胞结构及特定分子、
离子的生物学变化，
定量分析，以及实
时定量测定等。



激光扫描共焦显微镜技术 (Laser scanning confocal microscope, 简称LSCM)

分辨率

- 人眼分辨率: 0.2mm
- 光学显微镜分辨率: 0.25mm
- 电子显微镜分辨率: 0.2nm
- 共焦显微镜分辨率: **0.18 μ m**

原理

- 利用**激光**作为光源
- 采用**共轭聚焦**的原理和装置
- 通过**针孔**的选择和**PMT**的收集
- 分析处理数字图像的**系统软件**

激光扫描共聚焦显微镜主要组成部分

01 显微镜光学系统

02 扫描装置

03 激光光源

04 检测系统



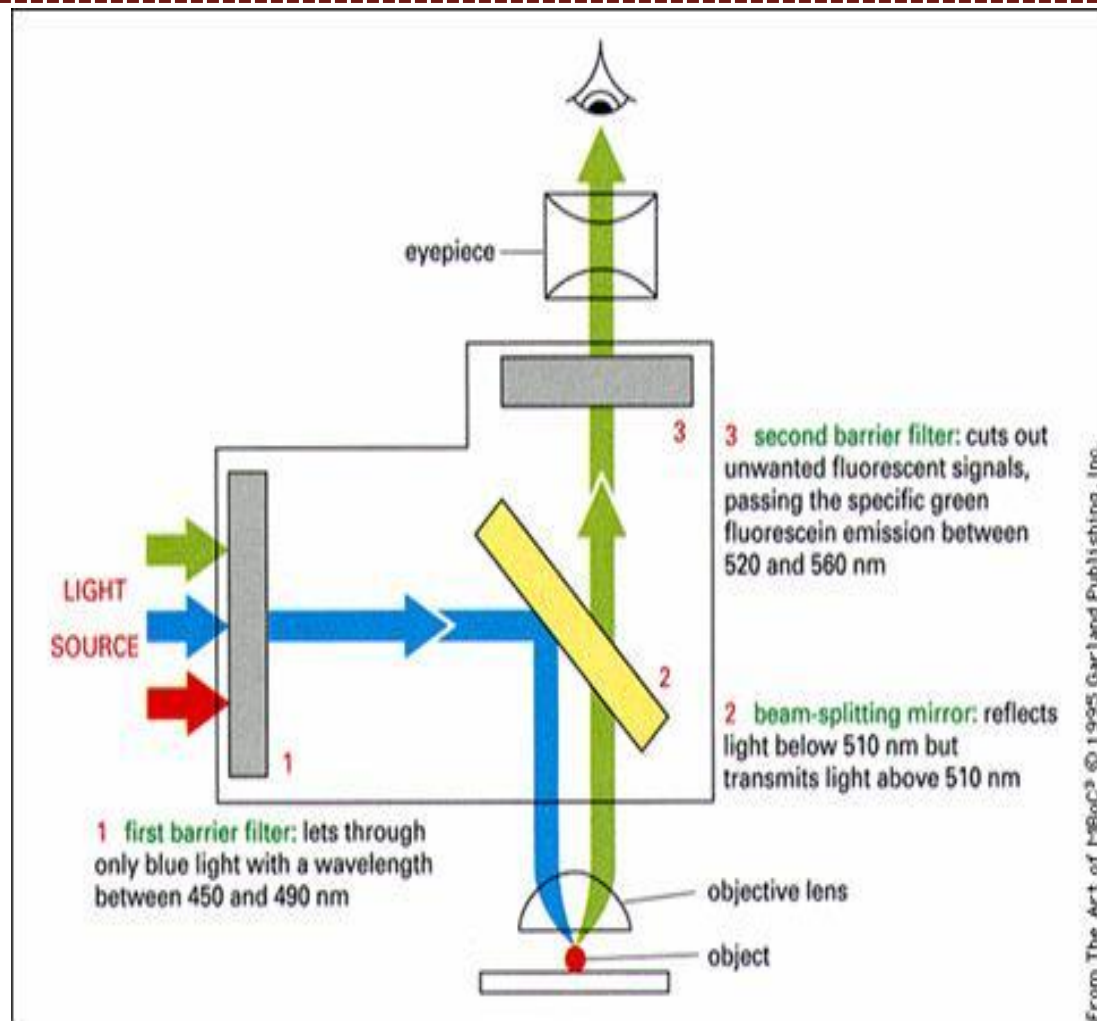
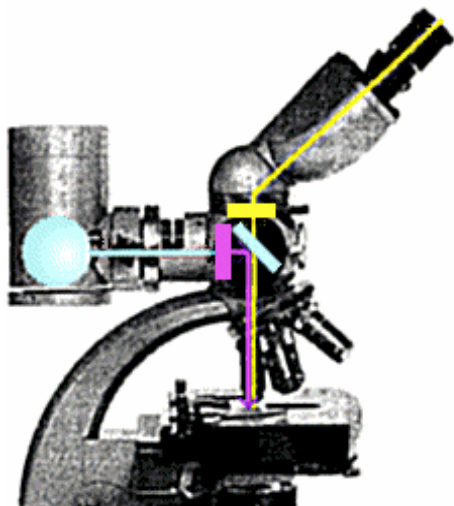
仪器型号: Leica TS SP8



宽场荧光显微镜

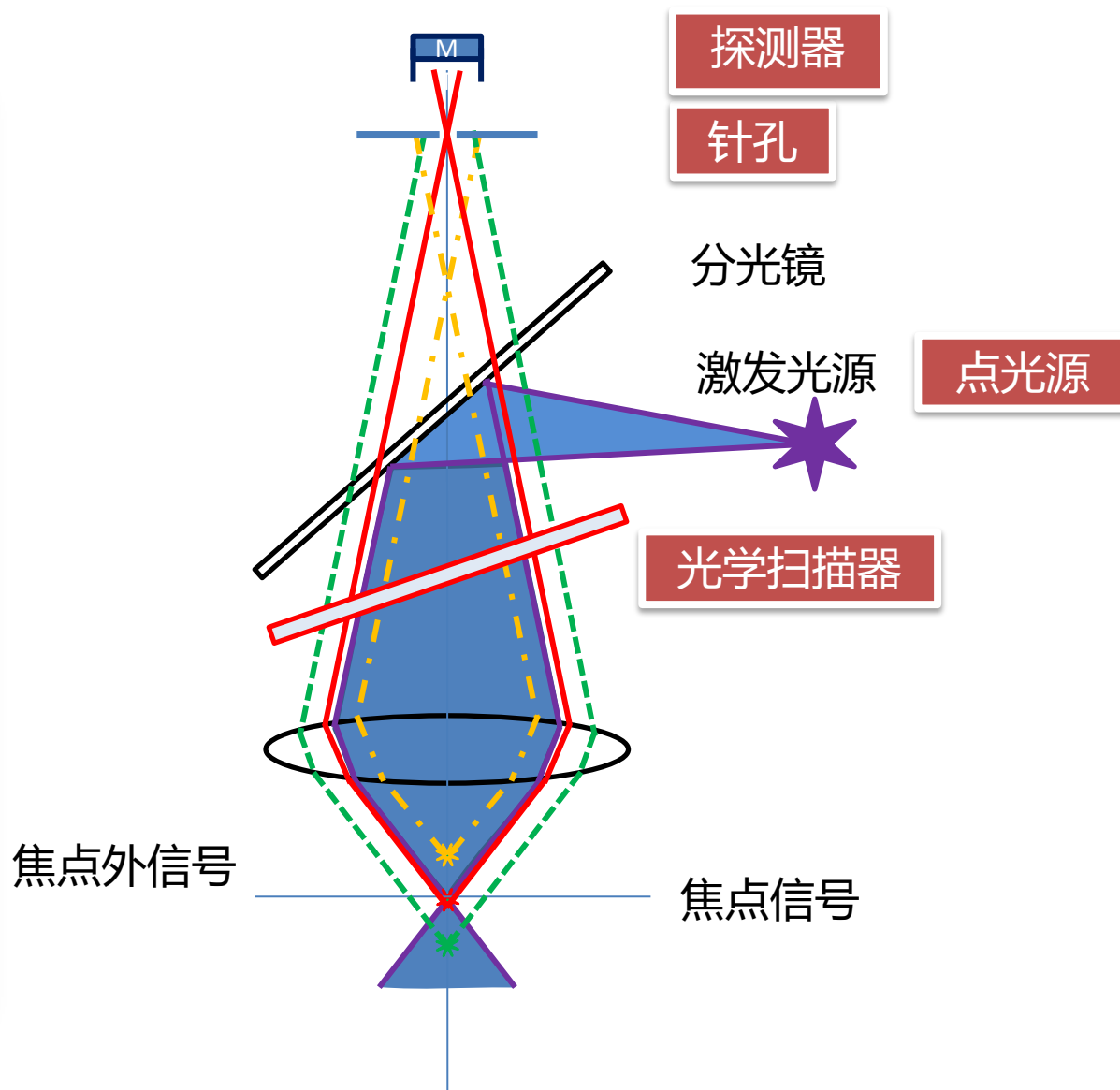
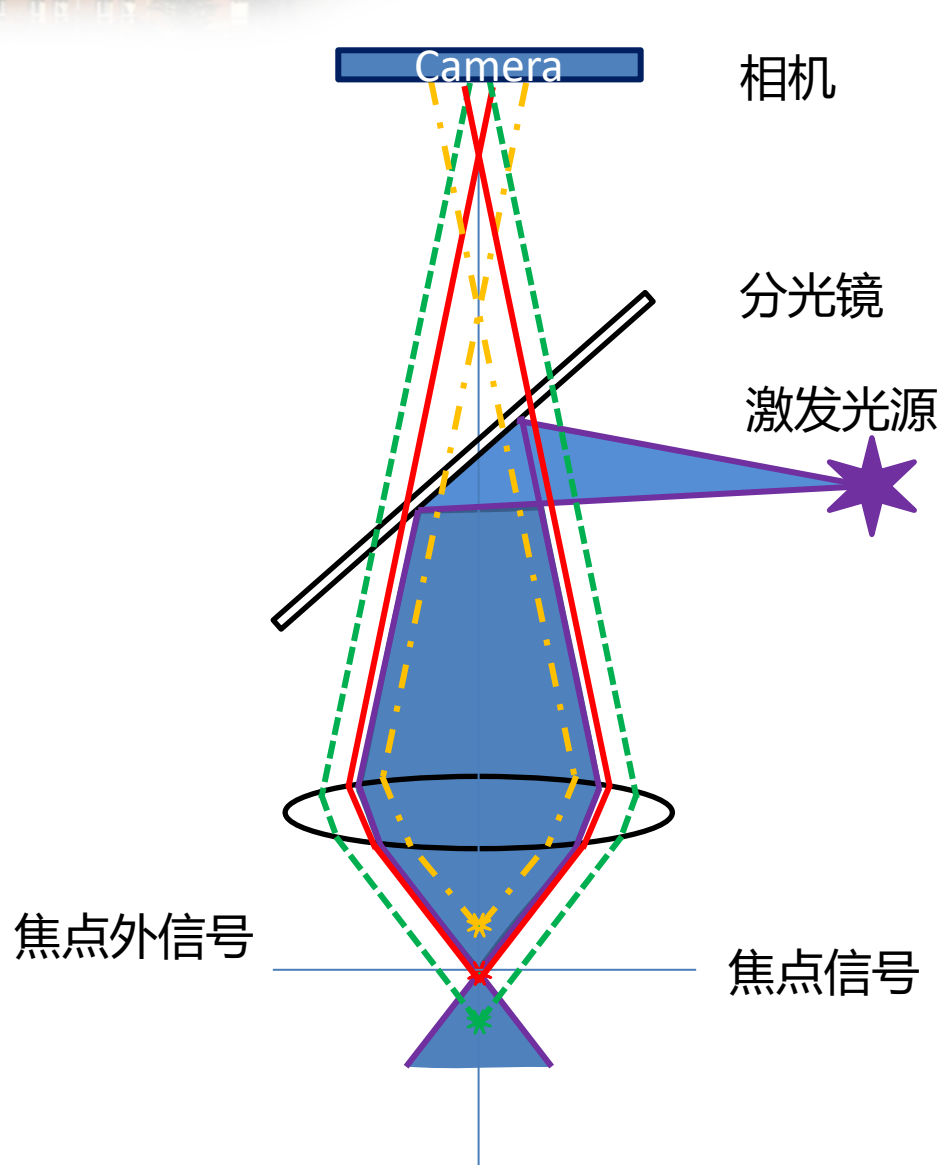


荧光滤块转轮



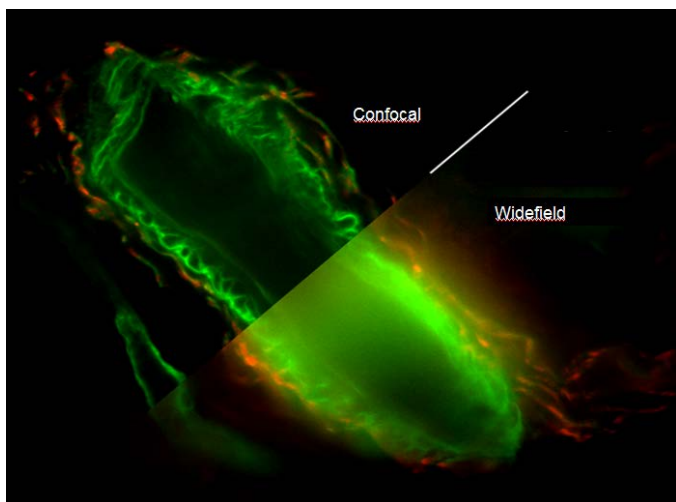
荧光显微镜光路图

激光扫描共焦显微镜与普通荧光显微镜的区别

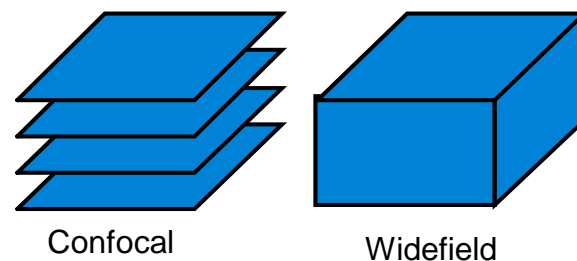


共聚焦显微镜与宽场荧光显微镜的区别

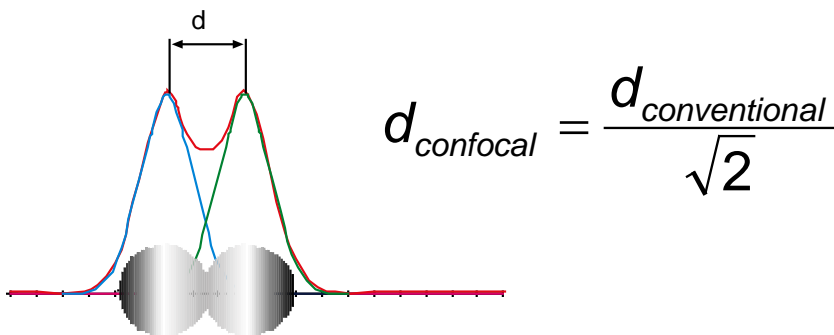
1. 获得清晰的图像



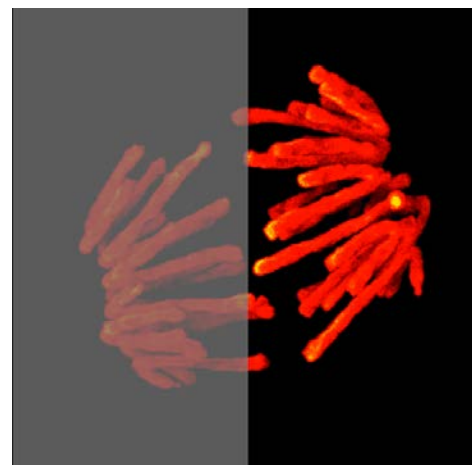
2. 具有更高的轴向分辨率，并可获取连续光学切片



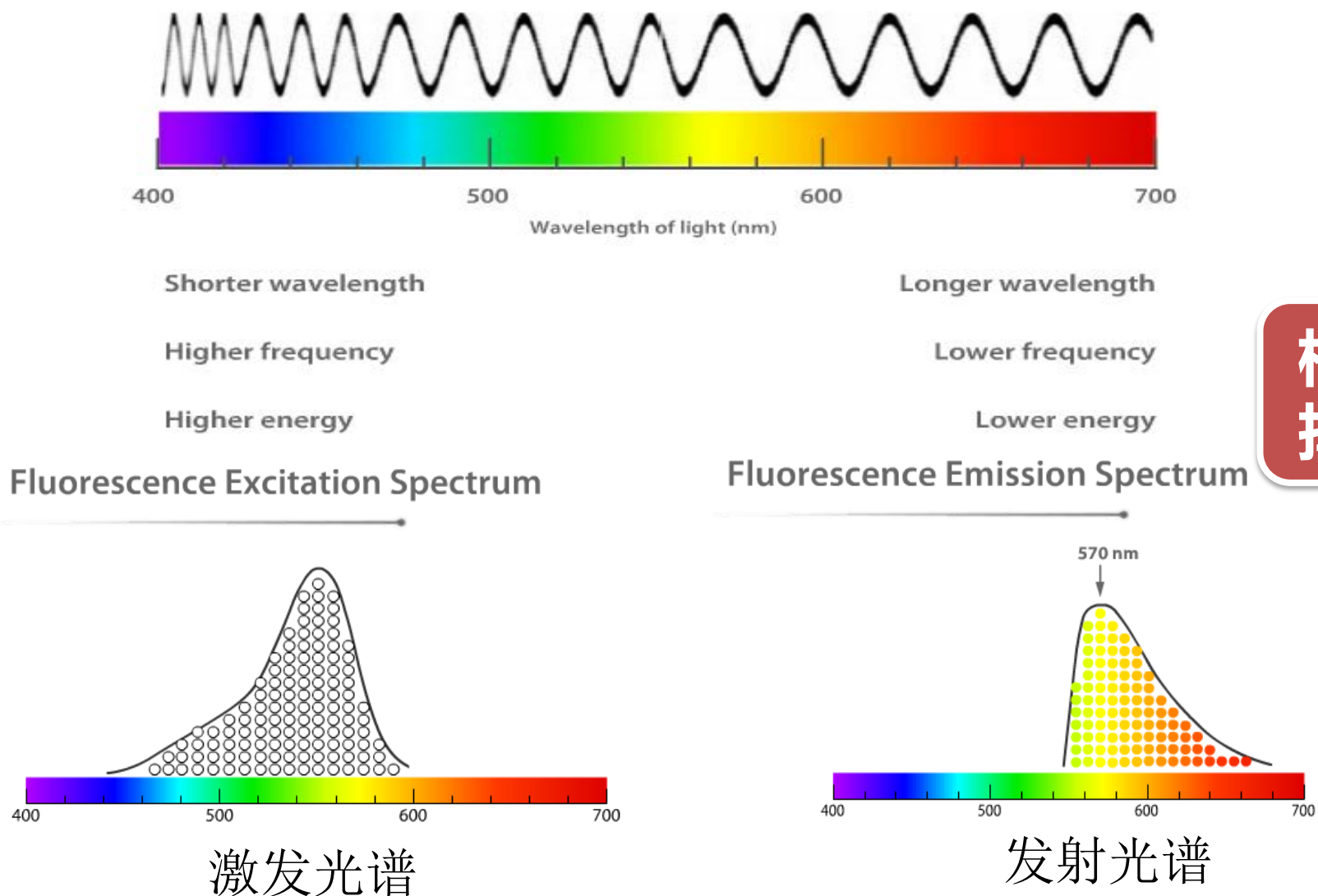
3. 增加侧向分辨率



4. 由于点对点扫描去除了杂散光的影响



荧光染料激发光谱和发射光谱



根据仪器配置选择适当的染料



固体激光器

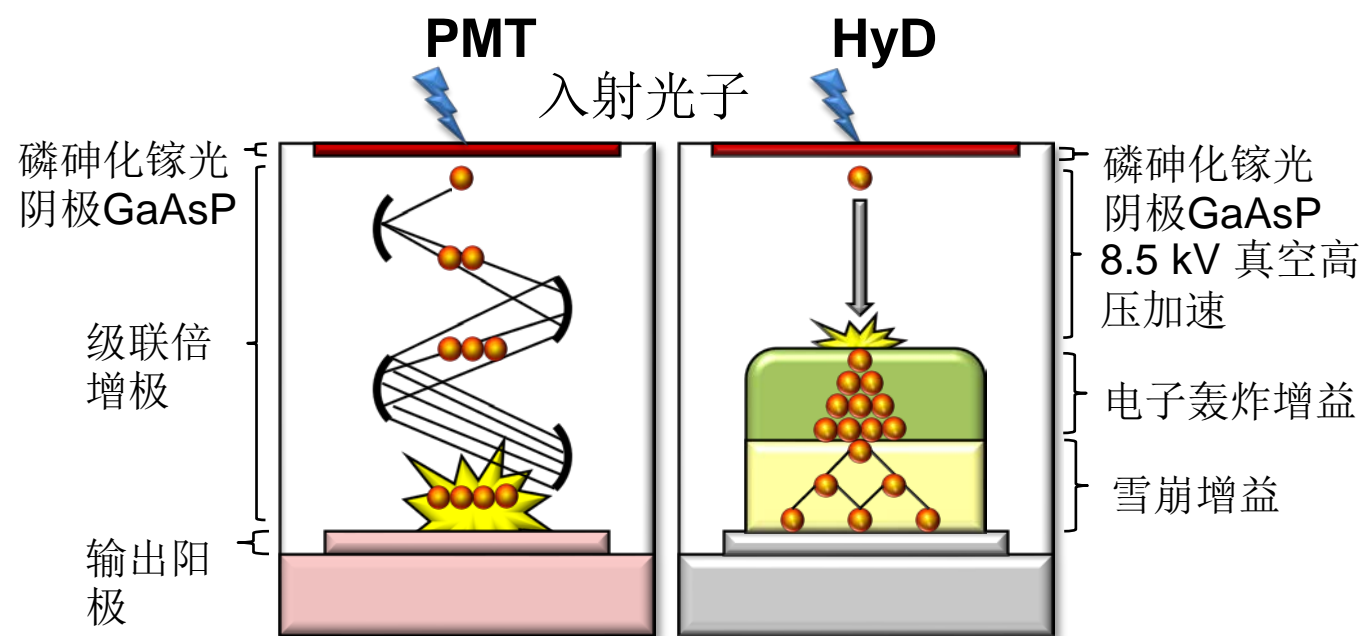
- 405nm 激光器50mW : DAPI, Hoechst 33342蓝色荧光
- 488nm 激光器20mW: FITC, GFP, Alexa 488等绿色荧光
- 552nm 激光器20mW: RFP, mCherry, Cy3, Alexa 555等红色荧光
- 638nm 激光器30mW: Cy5, Alexa 647等近红外荧光

固体激光器具有能量高、寿命长、发热低、无噪音、使用方便、免维护等优点。

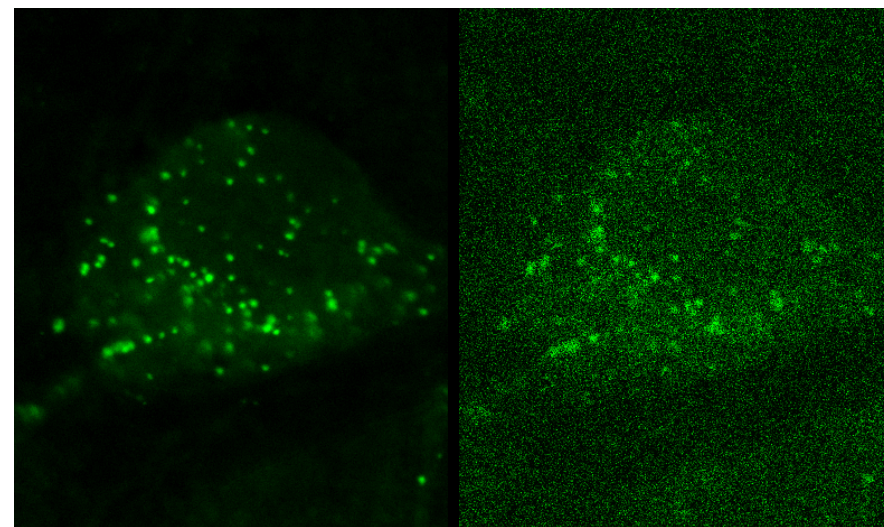
检测器

配有两种检测器：

- 常规PMT检测器: 动态范围大，但是灵敏度较低，背景噪音较高
- HyD检测器: 光子计数模式，高灵敏度，低噪音和大动态范围。



HyD适用于内源表达弱荧光成像

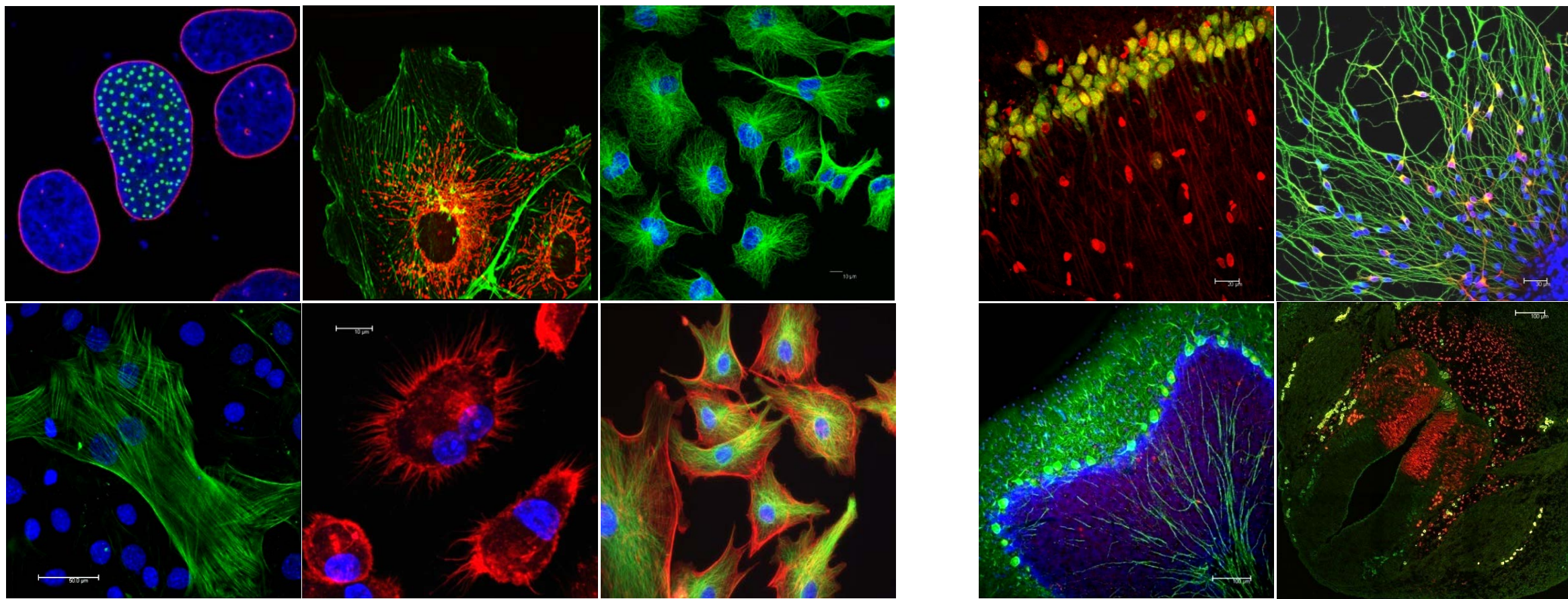


HyD

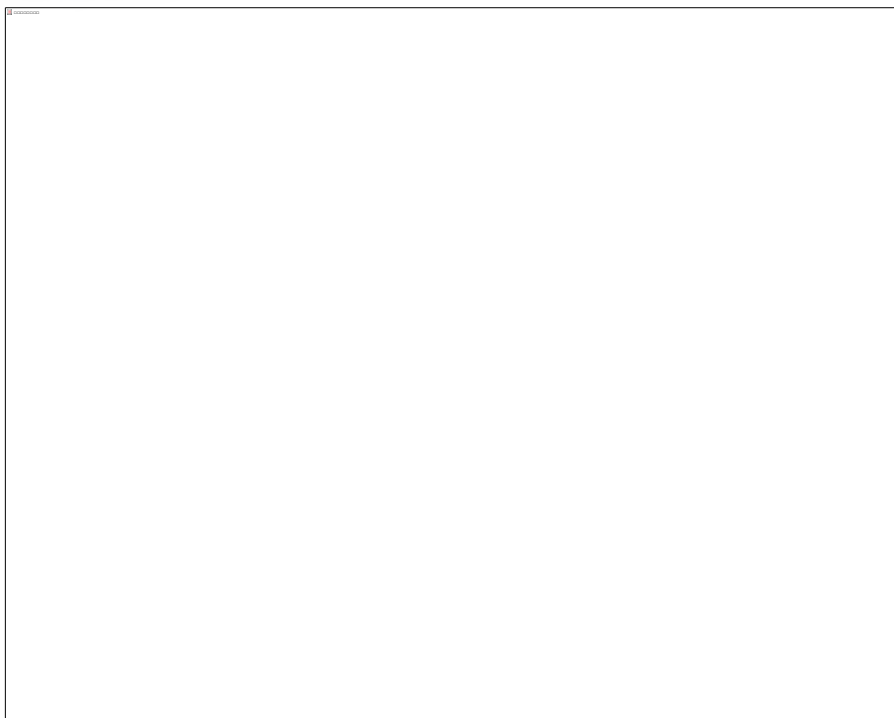
PMT



多色荧光成像

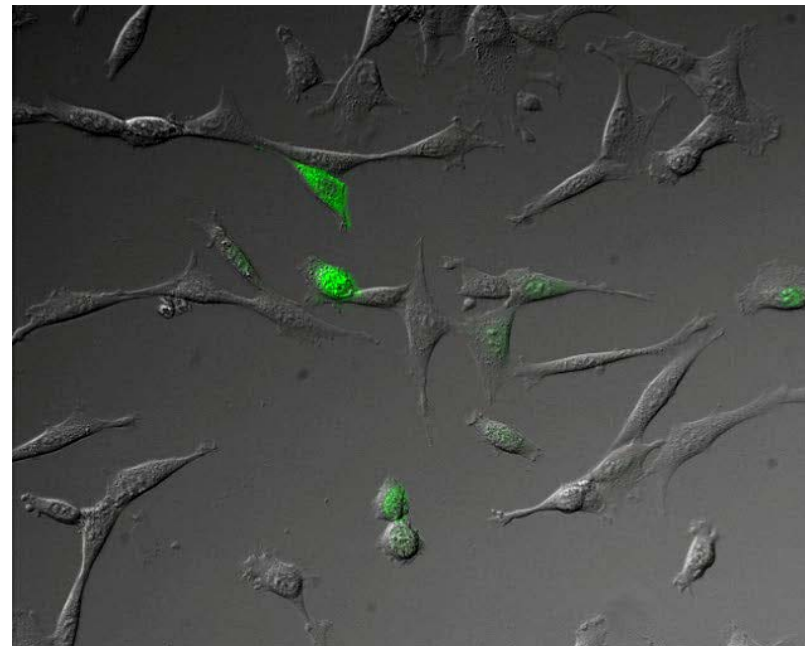


时间序列扫描：活细胞成像



小鼠胚胎异染色质的形成需要关键的组蛋白变体H3.3.

Courtesy of ME Torres-Padilla (Team L. Tora) & Marc Koch (Imaging Centre IGBMC).



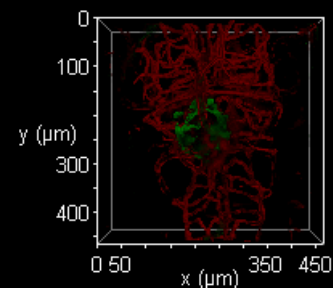
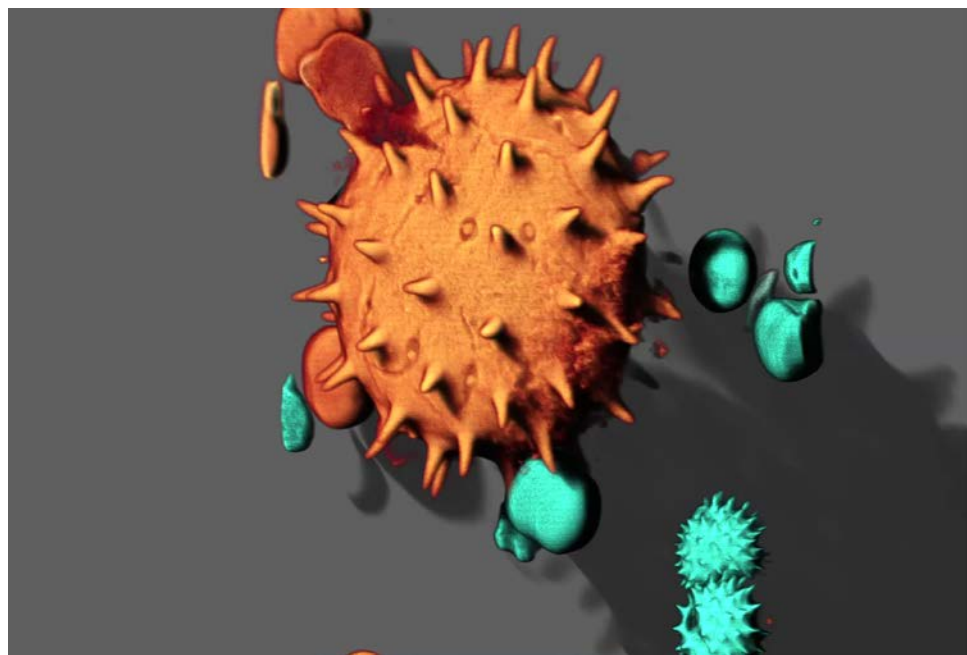
显微注射oregon green后
细胞的生存实验

Courtesy of Adrien
Eberlin (Team L Tora) &
Marc Koch (Imaging
Centre IGBMC).

小型孵育箱



xyz扫描： 三维重构



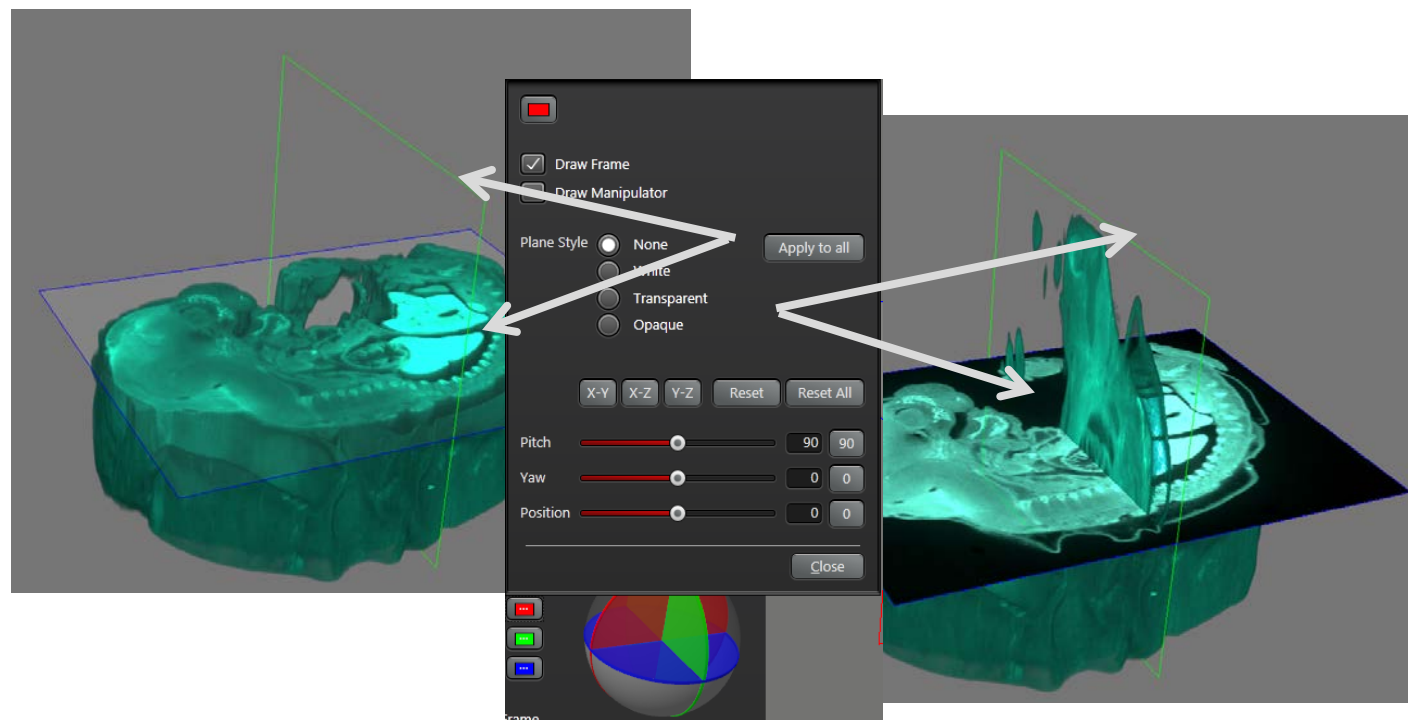
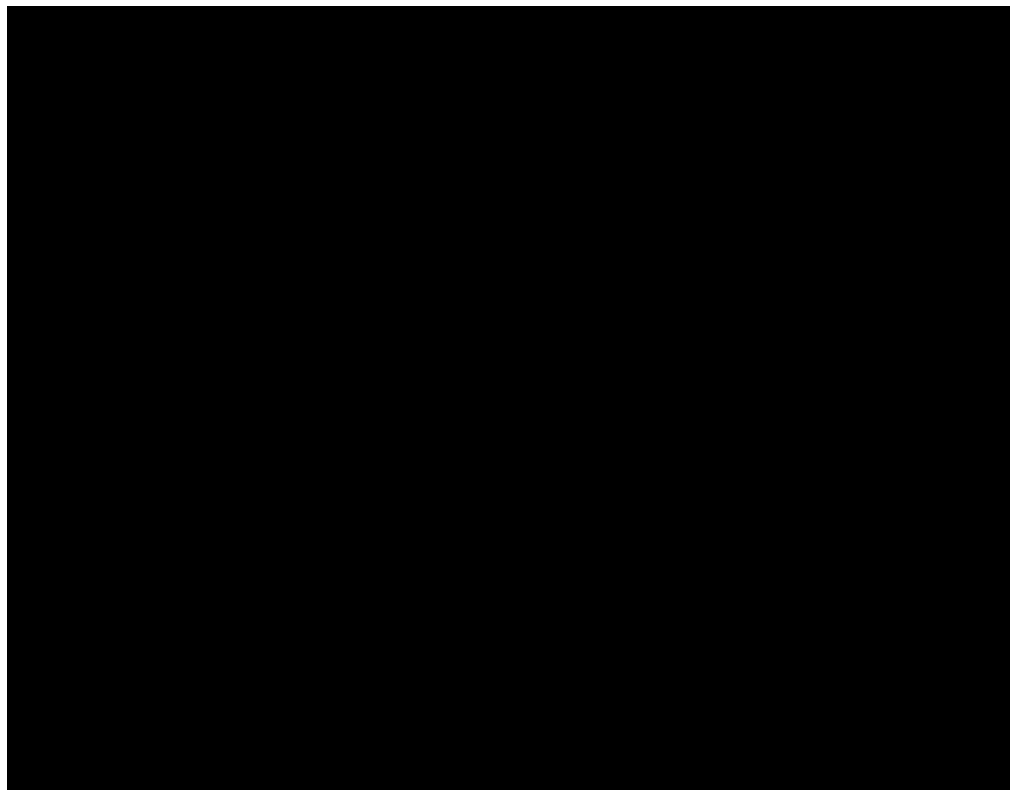
斑马鱼头部

GFP标记肿瘤细胞

mCherry标记血管



xyz扫描：显微CT

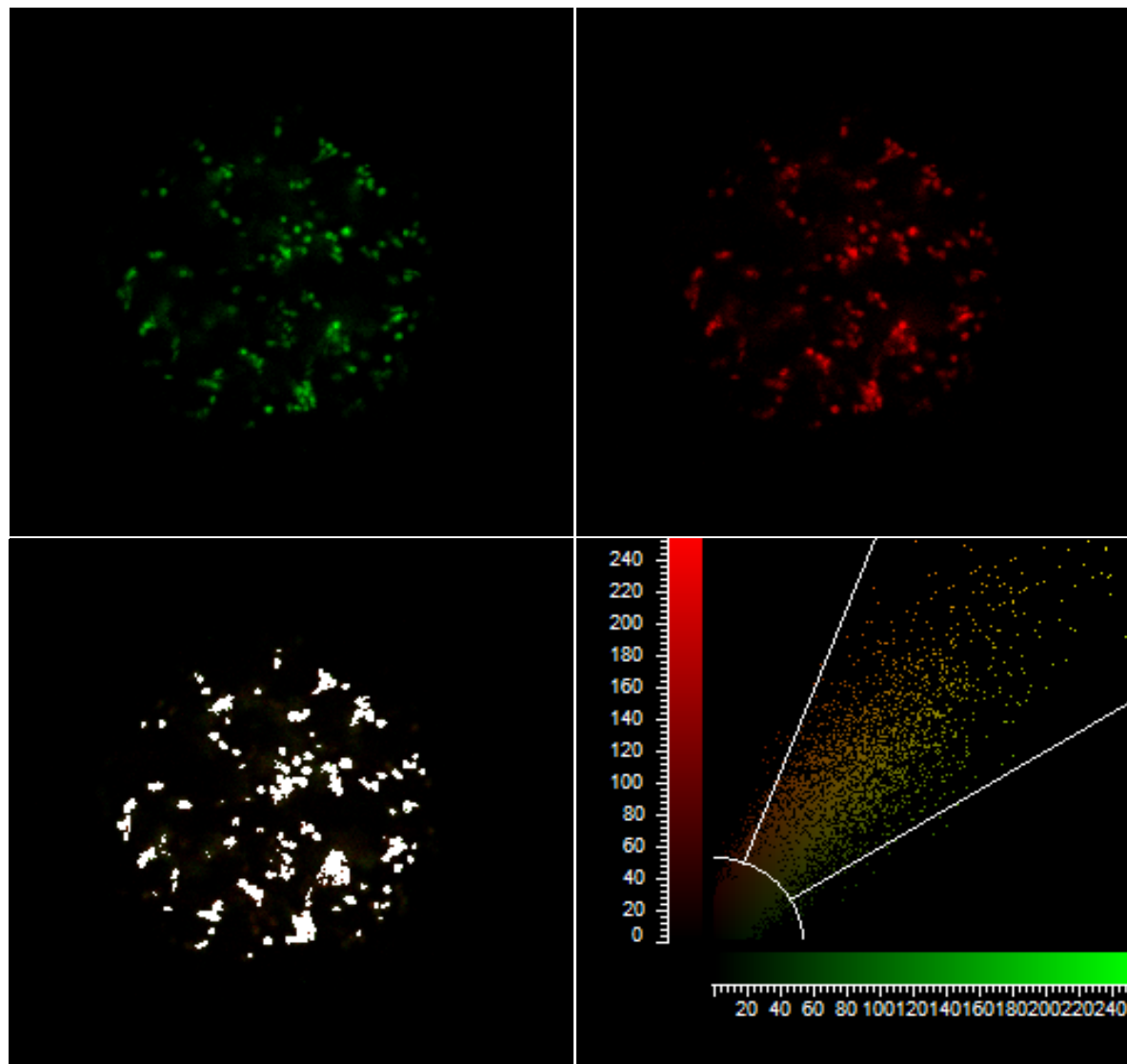


Colocalization共定位分析

应用:

- 蛋白定位分析
- 蛋白与蛋白相互作用
- 重叠比率

	Colocalization	
Pearson's Correlation	0.9405	
Overlap Coefficient	0.9435	
Colocalization Rate	94.92 %	
Colocalization Area	65.25 μm^2	
Area Image	2421.26 μm^2	
Area Foreground	68.74 μm^2	
Area Background	2352.52 μm^2	
	Channel 1	Channel 2
Mean Intensity Image	3.01	4.27
Mean Intensity Colocalization	68.94	87.66
Intensity Sum Image	790274	1119142
Intensity Sum Colocalization	487006	619201

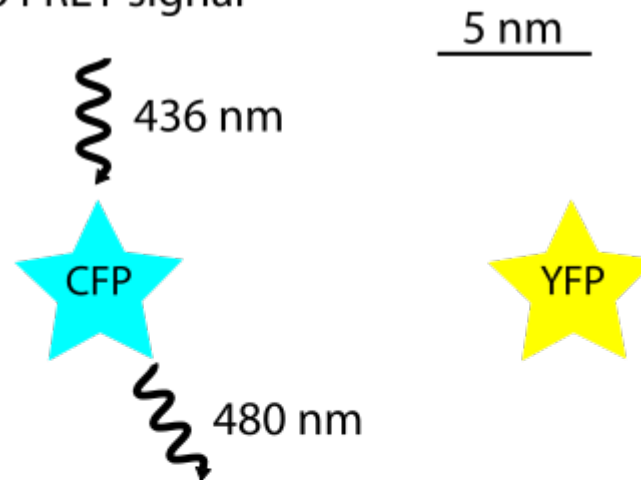


荧光共振能量转移 FRET

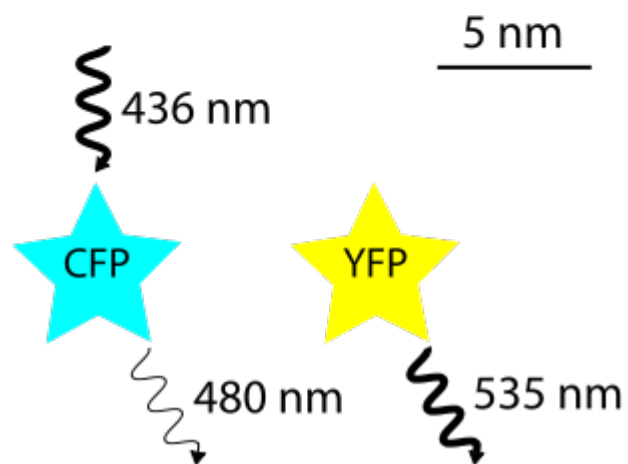
应用:

- ◆ 蛋白与蛋白相互作用
- ◆ 蛋白构象变化
- ◆ Cameleon测钙

No FRET signal

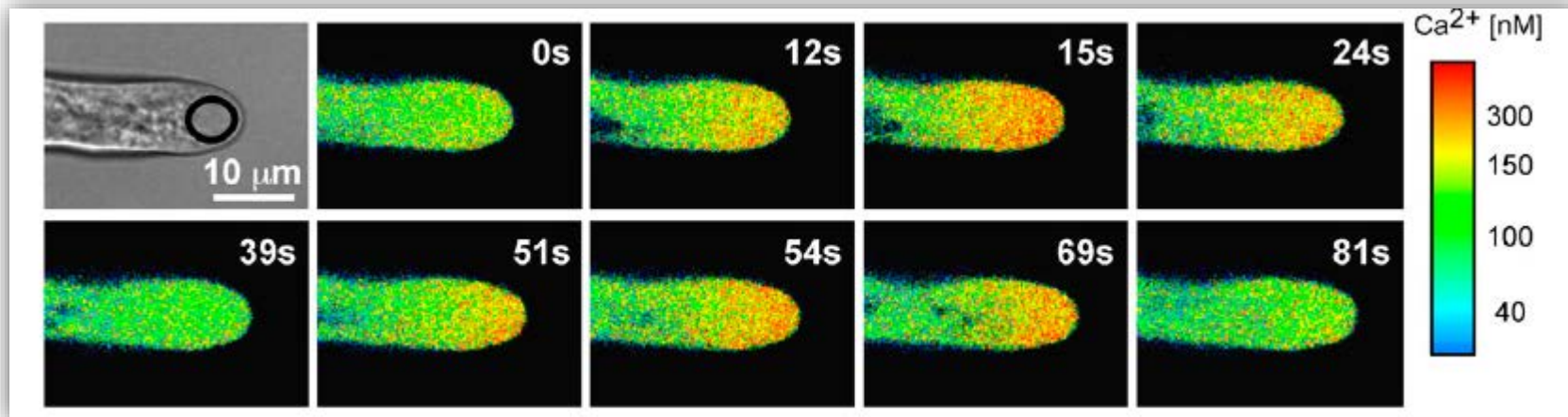


FRET signal



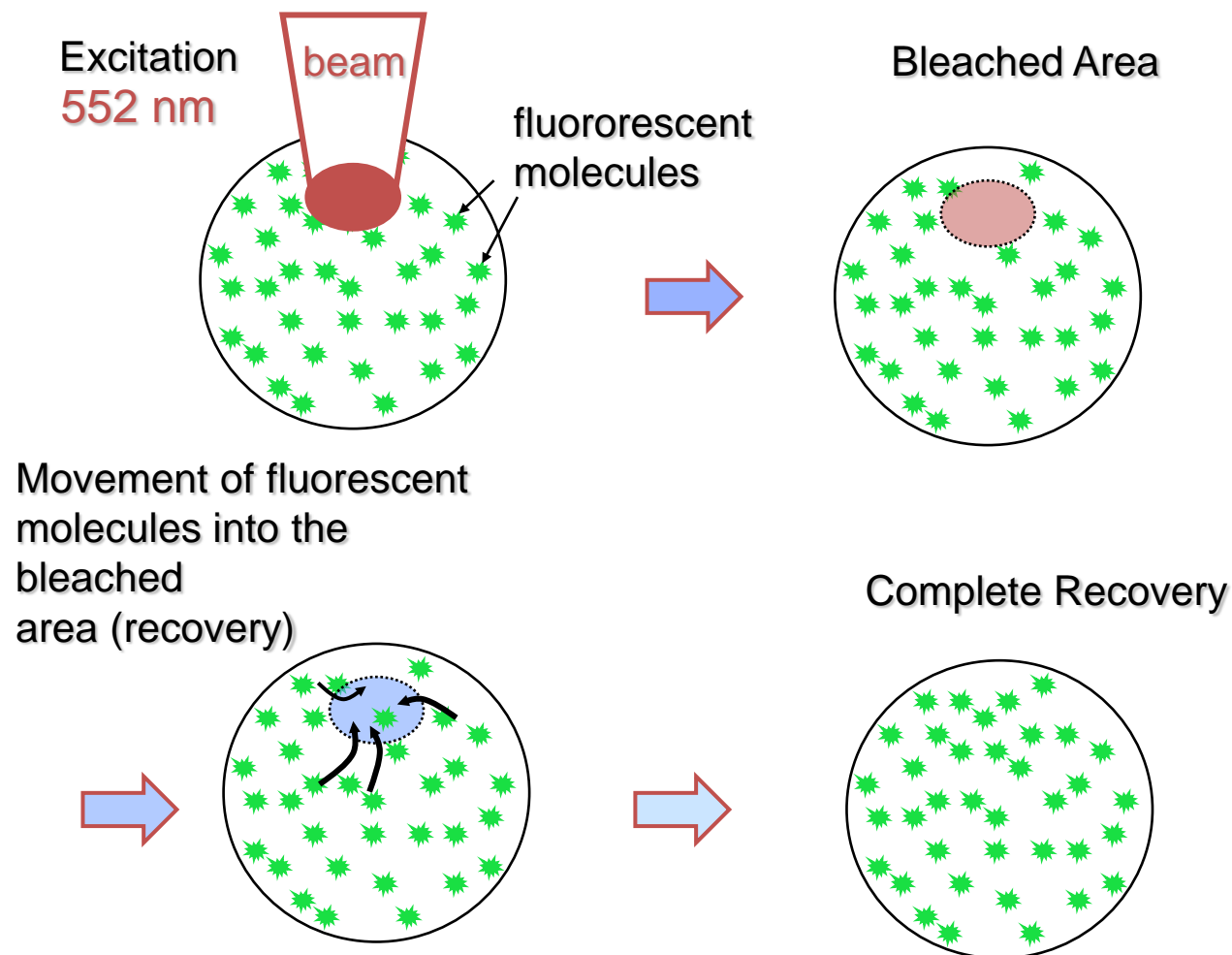
FRET应用：细胞内钙浓度测定

- 将CFP和YFP分别与钙调蛋白和钙调蛋白结合肽融合表达于同一个细胞内。
- 当细胞内具有高的 Ca^{2+} 浓度时，钙调蛋白和钙调蛋白结合肽结合，可诱发FRET，使受体蛋白YFP发出黄色荧光，因此细胞呈黄色。
- 当细胞内 Ca^{2+} 浓度低时，FRET几乎不发生，因此检测时CFP被激发，发出绿色荧光，细胞呈绿色。

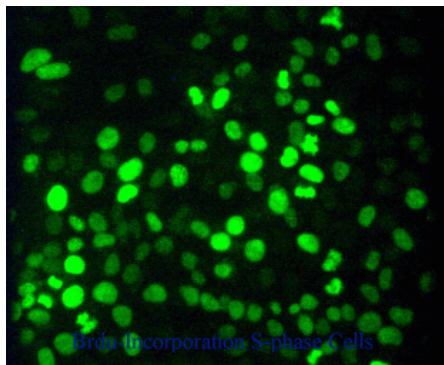


荧光漂白恢复技术 FRAP

荧光漂白后的恢复技术是使用亲脂性或亲水性的荧光分子，如荧光素、绿色荧光蛋白等与蛋白或脂质耦联，用于检测所标记分子在活体细胞表面或细胞内部运动及其迁移速率。



共聚焦前期流程



免疫化学染色

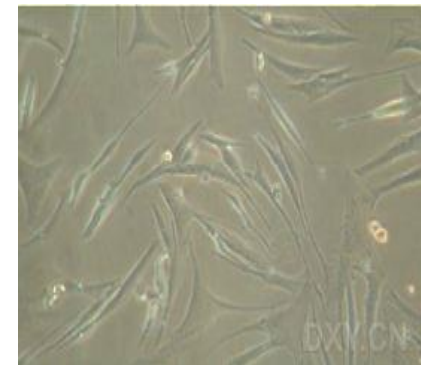
- ◆ 免疫细胞化学
- ◆ 免疫组织化学

申请预约仪器

- ◆ 每周三、五下午2点-5点

准备样品

- ◆ 活细胞
- ◆ 细胞爬片
- ◆ 组织切片



普通荧光显微镜

- ◆ 判断结果好坏
- ◆ 做好标记



共聚焦观察

拍摄及处理得到好的图像



样品材质要求

底部厚度**0.170mm**玻璃底方可用于共聚焦观察



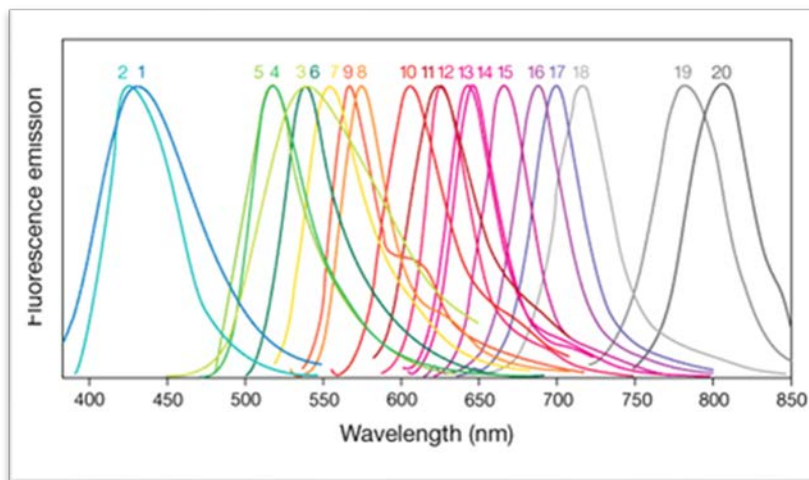
Chambered Coverglass



盖玻片底35mm培养皿
(共聚焦成像专用小皿)

染料的选择

根据已有激光器选择荧光蛋白和染料
(405nm, 488nm, 552nm, 638nm)





预约使用注意事项

1

填写预约申请

- 导师签字

2

联系仪器管理员

- 提前一周预约
- 告知荧光染料激发、发射光谱
- 实验目的(附上参考文献图片)

3

拍照

提前5min到场，
超过15min未到自动取消预约

4

注意

- 取消预约需至少提前2天告知管理员
- 使用格式化光盘拷贝实验数据，并做好登记工作。

