



第 1 章

激光扫描共聚焦显微镜观察荧光生物组织



常晓雪 编



激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM)是在荧光显微镜成像基础上加装了激光扫描装置,利用计算机进行图像处理,使用可见光激发荧光探针,从而得到细胞或组织内部微细结构的荧光图像的。激光扫描共聚焦显微镜可以在亚细胞水平上观察生理信号及细胞形态的变化,成为形态学、分子生物学、神经科学、药理学、遗传学等领域新一代强有力的研究工具。

本实验指导书包括 2 个实验的设计,结合了激光共聚焦理论基础讲解和基本实验操作训练两方面。为了增加同学们对荧光激发现象的了解和对生物样品的观察兴趣,学生可以用实物练习,从而掌握激光扫描共聚焦显微镜的基本构造、原理及操作方法,培养学生的动手能力、理论联系实际的能力、统筹思维能力、创新能力、独立分析解决实际问题的能力、查阅手册资料并运用其数据资料的能力,以及归纳总结的能力等。

1.1 根茎叶荧光组织观察实验

1.1.1 实验目的

- (1) 了解对植物各部分组织进行荧光染色的目的；
- (2) 了解激光扫描共聚焦显微镜的工作原理；
- (3) 了解染色对材料组织的影响；
- (4) 掌握亮度、对比度的调节方法。

1.1.2 实验原理

共聚焦是指光路(激发和发射)在两个位置上聚焦。在共聚焦显微镜中,激发光聚焦在样品点表面,而发射光聚焦在针孔上。激光扫描共聚焦显微镜是通过一个光源、一个样品和一个探测器进行聚焦的,当样品位于物镜焦平面处,反射到样品表面的激光聚焦到共聚焦孔中时,光探测器才会接收样品的信号。

在 CLSM 中,一束激光聚焦到一个样品上,整个样品视野中含有的荧光分子被激发。焦点上的这些荧光分子被激光激发出的光信号通过探测器上的针孔成像,而其他不在焦点处或者无法被特定激光激发出光信号的区域,则不能通过针孔聚焦。针孔确保只有来自焦平面的荧光被检测器采集,从焦平面上方或下方发出的荧光被阻挡,所以无法成像。“共聚焦”这个名字来源于显微镜光路中针孔的位置,它位于样品的共轭焦平面上。图 1-1 为激光扫描共聚焦显微镜主要部件及光路示意图。

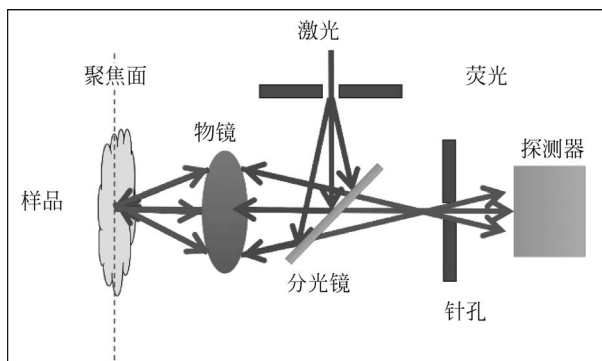


图 1-1 激光扫描共聚焦显微镜主要部件及光路示意图

本实验需要根据材料对不同激发波长的反应程度,设定不同的激光参数,使材料在拍摄过程中保持特征聚焦良好,尽可能将特征清晰地显示及区分。

1.1.3 实验基本要求

- (1) 切换不同激光时,观察样品在不同激发波长下形貌的变化；
- (2) 学习调节光强及背底,将目标区域聚焦调整到最佳,拍下组织形貌图并保存成全套数据格式；

(3) 了解激光扫描共聚焦显微镜使用过程中的基本步骤。

1.1.4 实验仪器和材料

FV1000 激光扫描共聚焦显微镜等、生物组织标本、一次性鞋套、一次性手套。

1.1.5 实验内容

- (1) 根茎叶组织材料的辨认观察；
- (2) 观察不同激光切换调节对形貌的影响；
- (3) 讲解适宜亮度大小的衡量和激光强度参数的调节方法。

1.1.6 实验步骤

实验主要包括样品明场形貌观察、样品荧光形貌观察以及调试、拍摄、保存等步骤。

1. 组织材料的明场形貌辨认观察

- (1) 打开标本盒,找到根茎叶组织对应的荧光标本,轻拿轻放,用酒精清洁玻片表面。
- (2) 打开激光扫描共聚焦显微镜的电源,依次打开扫描单元控制器、显微镜控制器和激光开关,激光使用前需预热 30 min。
- (3) 将标本放在显微镜下,打开照明光源,寻找目标位置并聚焦。
- (4) 切换显微镜镜头,从低倍到高倍观察目标区域;调节光强,聚焦样品区域,观察组织材料细节。

2. 根茎叶组织材料荧光形貌观察中不同激光切换调节对形貌的影响

- (1) 试用不同的激光光源,观察不同波长激光对荧光染料的激发作用,改变激光强度,调整图像对比度,得到对应样品最合适的激光波长。染料对应的激发波长也可以通过查资料获得。
- (2) 切换激光的方法:根据样品的特性选择激发波长的范围;根据样品的荧光发射选择“Lanmbda Scan”;点击“Light Path & Dyes”设置光路,在“Excitation DM”下拉菜单中选择包含已设置的激发波长的选项,如“DM405”;“LaserUnit1”需要勾选所有所用激光。通道 1 选择“Mirror”,接收范围与“Lanmbda Scan”中设置一致。软件操作页面如图 1-2 所示。

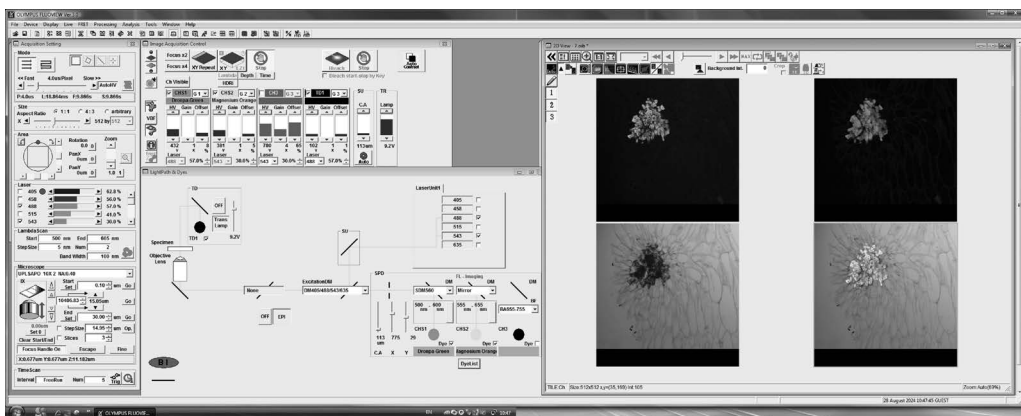


图 1-2 软件操作页面

3. 根茎叶组织材料荧光形貌观察中激光强度参数的调节方法

(1) 调节光强的办法有：①手动调节“Handle”聚焦，并用鼠标滚轮改变通道调节 HV 值；②调节激光输出调节中激发光的功率，从源头上改变光强。

(2) 点击 FV10-ASW3.0 软件中主界面左上角的“Trans Lamp”明场观察按钮。

(3) 点击显微镜下方绿色“Focus”按钮中的“▲”符号，将目镜调至离样品最近。再点击向下按钮“▼”找样，直至看到模糊的样品形貌；同时调节黑色“Handle”旋钮，得到理想且清晰的样品视野。

(4) 微调样品视野：再次点击“Trans Lamp”图标，关明场；点击“EPI Lamp”进行荧光观察，微调“Handle”，直到在目镜中看到明亮的样品。

(5) 预览扫描：再次点击“EPI Lamp”图标，关闭暗场→点击扫描栏图标“Focus×2”，得到图像→手动调节“Handle”聚焦并用鼠标滚轮改变通道调节 HV 值（一般小于 700），使屏幕图像样品最亮→调节曝光度，按“Ctrl+H”使图像由蓝色变为灰色，若曝光过度，则图像会呈现部分红色。通过降低 HV 值以及激光输出调节中激发光的功率，使图像恰好看不到红色，并且以能看到样品边缘为宜。相反，若看不到样品，则增大 HV 值和激发光功率。

(6) 点击软件操作页面右上角“Repeat Stop”图标，停止预览扫描。

4. 拍摄荧光照片和明场照片，处理结果并保存导出

(1) 待扫描完成，点击红色字“Series Done”，会自动出现“2D View-Image”窗口。

(2) 点击图像处理窗口左上角的双箭头，可以弹出更多调节选项。在出现的精细调节窗口中点击“L”，会出现扫描的一系列图片。

(3) 添加标尺：在图像处理窗口中左上角点击画线铅笔工具“Show/Hide the ROI Toolbar”，按下“Shift”平行拖放比例尺到图中，再点一次退出编辑→标尺 Division 和字体的设置：将鼠标转移到比例尺上变为十字状四分箭头时，点击鼠标右键，在“Scale”中可以设置是否有“Division”，这样可以在标尺上添加等分尺。在“Format Setting”功能栏里，可以改变标尺字体的种类、大小和颜色。把鼠标放在比例尺上，形成十字状图像，可以移动比例尺的位置。

(4) 不同区域的荧光信息：在“2D View-Image”窗口左侧功能栏左上方点击铅笔图标，在下拉菜单中点击椭圆按钮，拖动鼠标，选择目标区域→点击工具栏中“Measurement”按钮，在弹出的窗口中显示目标区域的发光信息。

(5) 波长扫描图像的保存：oib 源文件格式。右击鼠标选择“Save As”，保存为“. oib 格式”。右击鼠标，点“Export”，选择输出为“. tiff”格式，并选择所有“ROIs”，保存。（备注：oib 格式可在 FV10-ASW 软件中打开并进行编辑，而 tiff 格式可以通过图片软件查看，不能进行编辑。）

1.1.7 实验结果与数据处理

(1) 记录不同标本适合的激发波长；

(2) 拍摄清晰的明场及荧光照片，可叠加不同激发波长的荧光效果，如图 1-3 所示。

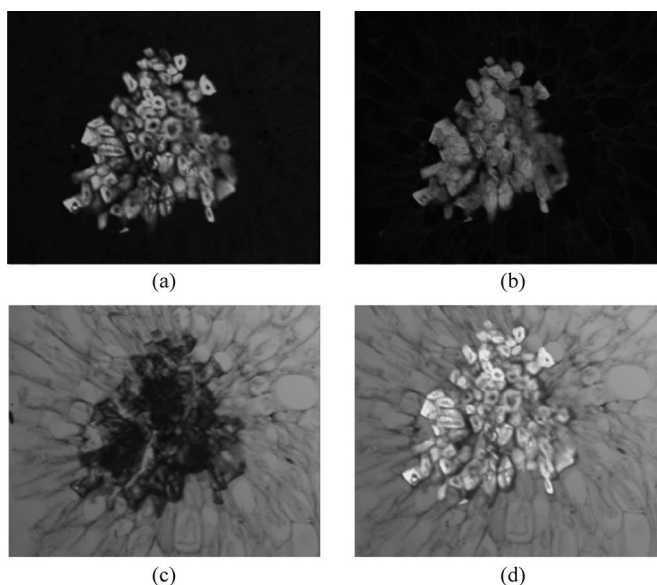


图 1-3 同一材料不同荧光及明场叠加照片

(a) 488 nm 激光荧光照片；(b) 543 nm 激光荧光照片；(c) 明场照片；(d) 明场激光叠加照片

1.1.8 实验注意事项

- (1) 在使用激光前,需要等待半小时,直至激光稳定;
- (2) 样品先在明场下调节完毕,然后进入荧光模式;
- (3) HV 值一般小于 700;
- (4) 与实验课无关的东西可放到准备间,进入实验室时穿鞋套,禁止在实验室吃东西、玩手机。

1.2 生物组织三维成像构建实验

1.2.1 实验目的

- (1) 了解三维(3D)成像的原理;
- (2) 了解三维重构的拍摄技巧;
- (3) 了解在三维重构后期数据处理过程中,针对植物各部分组织进行荧光染色的目的。

1.2.2 实验原理

显微镜可以通过不同高度的聚焦和移动,实现 Z 轴方向上的连续成像。不同的焦平面对应不同的荧光组织,因此可以通过人为操作而实现三维空间上的立体取图。借助计算机三维重构软件,这一系列的光学切片依据特征点或共轴叠放在一起,就形成样品的三维图像,如图 1-4 所示。

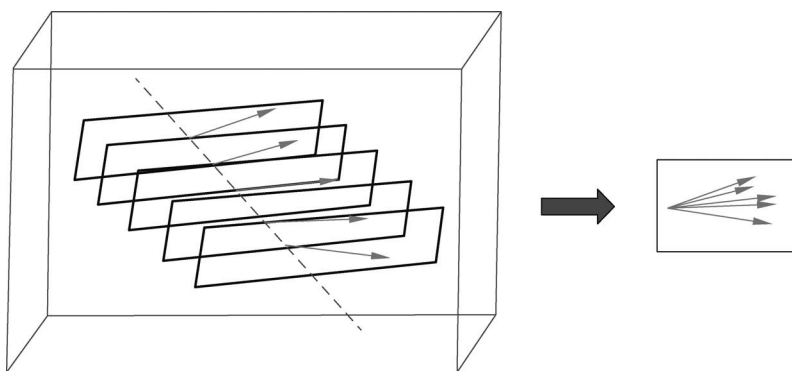


图 1-4 三维重构切片拍摄叠加原理示意图

1.2.3 实验基本要求

- (1) 采集目标区域一系列不同景深的二维图像；
- (2) 学习三维重构软件使用方法,为细胞构建合格的三维立体模型；
- (3) 变换不同激光时,观察样品在不同激发波长下形貌的变化。

1.2.4 实验仪器和材料

FV1000 激光扫描共聚焦显微镜等、生物组织标本、一次性鞋套、一次性手套。

1.2.5 实验内容

- (1) 生物组织不同景深二维图像的获取；
- (2) 三维重构软件的学习；
- (3) 构建生物组织的三维立体模型。

1.2.6 实验步骤

1. 生物组织不同景深二维图像的获取

- (1) 调节聚焦旋钮变动焦距,寻找从上到下均可以清晰拍照的目标区域。
- (2) 从顶部或底部开始设定拍照景深。将顶部和底部的聚焦参数输入空间序列拍照的上下极限高度值中,选择切片张数,选择拍摄时间及照片参数。
- (3) 点击系列拍照按钮,共聚焦显微镜软件会自动收集并保存已设定好的组织横截面切片照片。

2. 三维重构软件的学习

FV10-ASW3.0 是官方自带的软件,可以将一系列图片制作成为三维模型,采图流程如下:输入“Step Size”大小,点击“OP”按钮可以使用推荐值,勾选并应用→点击“XY Repeat”按钮开始扫描→点击向上箭头和加速箭头按钮上移焦点位置→当图像显示到达上限时,点击“set”按钮确定→点击向下箭头和加速箭头按钮下移焦点位置→当图像显示到达下限时,

点击“set”按钮确定→点击“stop”按钮停止扫描→选择“AutoHV”，并选择扫描速度(随着扫描速度变慢,在保持同等亮度的前提下,背景噪声就会消除)→选择“Depth”按钮→点击“XYZ”按钮取得图像→点击“Series Done”按钮,“2D View”二维界面出现→保存该幅图像:右击图像管理器中显示的图像图标,选择“另存为”,保存该幅图像(保存为 xml 类型,是 FV10-ASW 软件专用的图像格式)。

3. 构建生物组织的三维立体模型

打开保存的文件→点击按钮开始三维重构,选择 Z 方向重构→要保存此图像,右击此图像,选择“Save Display”并命名→点击“3D 建模”按钮,创建三维图像,并拖动鼠标进行图像平移、切片或旋转等观察动作。

1.2.7 实验结果与数据处理

拍摄并保存生物组织的双荧光激发三维模型叠加图如图 1-5 所示。

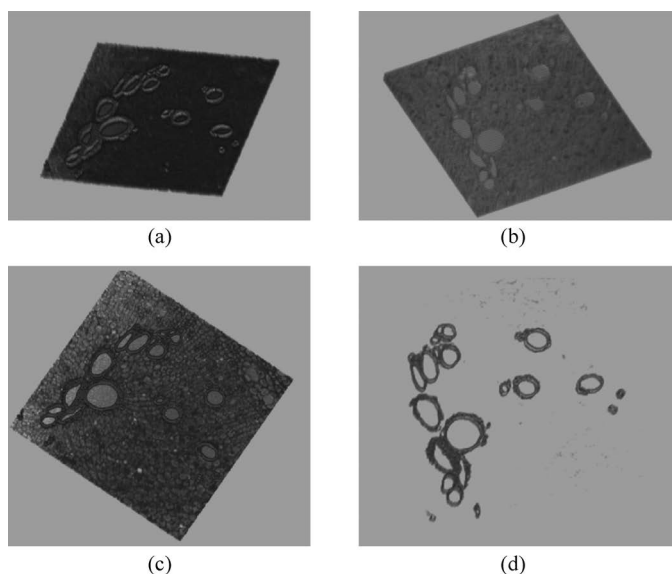


图 1-5 不同角度荧光生物组织三维模型图

(a) 不同激光叠加倾斜模型; (b) 488 nm 激光倾斜模型; (c) 543 nm 激光平铺模型; (d) 去除背底模型

1.2.8 实验注意事项

(1) 样品拍摄切片时,拍摄张数过少,会导致遗漏关键信息,无法完成重构;样品张数过多,则重构时间太长,任务量太重,会导致软件运行崩溃。

(2) 显微镜景深限制了重构的范围,超出范围则图片虚焦细节模糊,会造成重构失败。

第 2 章

扫描电子显微镜的操作及应用



陈寒元 编



扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)是观察材料显微结构的重要工具之一。显微结构包括组成材料的形貌(尺寸、分布、形状等)、元素分布、化学组成等。常见的 SEM 可观察非磁性材料和干燥的材料,如需观察具有强磁性材料和非干燥的材料,则需寻找专属功能的扫描电子显微镜。SEM 可提供微纳尺度的研究,分辨率通常在 0.5~3.0 nm。本实验指导书讲解 SEM 的基本构成和工作原理、样品制备的操作规范、多种工作模式及多探头测试技术,以及导电样品和不导电样品的微观形貌观察。

本实验指导书包括 3 个实验的设计,通过实验内容的实践,学生掌握 SEM 测试样品微观形貌的全过程,包括 SEM 的基本构造、工作原理、样品制备、测试软件参数设置、采集材料的微观形貌,并能解析实验结果。

2.1 样品制备

2.1.1 实验目的

- (1) 了解扫描电子显微镜的制样要求；
- (2) 制备扫描电子显微镜观察的样品。

2.1.2 实验原理

扫描电子显微镜的样品制备方法简单,在保持材料原始形状的情况下,可以直接观察和测试样品表面形貌及元素组分等。样品按是否导电分为两大类:导电的样品和不导电的样品。样品按形态分为四种:平整表面的样品(薄膜或块体)、粉末样品(微米纳米颗粒)、粗糙结构的样品和截面样品。

2.1.3 实验基本要求

- (1) 了解不同类型样品的制样要求；
- (2) 掌握制备不同类型样品的方法。

2.1.4 实验仪器和材料

电子显微镜(日本,Hitachi)样品台、样品托、液体导电胶、双面导电胶、镊子等。

2.1.5 实验内容

1. 制备平整表面的样品(薄膜或块体)

用剪刀将导电胶剪成需要的尺寸和形状,将导电胶粘在载样台上,用镊子夹取样品把样品固定在载样台。如图 2-1 所示为平整表面样品制备需要用到的工具。



图 2-1 平整表面样品制备需要用到的工具

2. 制备粉末样品(微米纳米颗粒)

粉末样品的制备步骤为“蘸—粘—吹”三项。用剪刀将导电胶剪成需要的尺寸和形状,将导电胶粘在载样台上,使用牙签的尖端,蘸取少量粉末样品,将牙签尖端粘贴在导电胶上并滚动半圈,让粉末样品粘铺在导电胶上,使用压缩空气吹枪,吹扫载样台,去除未粘牢固的粉末颗粒。如图 2-2 所示为粉末样品制备需要用到的工具。



图 2-2 粉末样品制备需要用到的工具

3. 制备粗糙结构的样品

取少量液体瓶装的碳涂胶或银涂胶,将碳涂胶或银涂胶粘在载样台上,将样品固定在载样台,等待 3~5 min,样品干燥后方可放入电子显微镜观察。如图 2-3 所示为粗糙结构样品制备需要用到的工具和示意图。



图 2-3 粗糙结构样品制备需要用到的工具和示意图

4. 制备截面样品

用剪刀将双面导电胶剪成需要的尺寸和形状,选择截面样品的载样台,将导电胶粘在载样台上,用镊子夹取样品并把样品固定在载样台。如图 2-4 所示为截面样品制备需要用到的工具和示意图。



图 2-4 截面样品制备需要用到的工具和示意图

2.1.6 实验步骤

根据自己的样品形态类型,选择样品制备的方法和需要的工具,并制备样品。

2.1.7 实验结果与数据处理

运用测试软件对样品的形貌、尺寸进行测定和记录,图 2-5 为氮化碳材料的微观结构图像。

2.1.8 实验注意事项

- (1) 粉末样品只需粘少量,牙签尖端 2 mm 的范围即可;
- (2) 粗糙结构样品需要选择液体导电胶,制备完后需要等待一段时间让液体导电胶干燥后方可放入扫描电子显微镜观察;