

尼康转盘共聚焦理论考试安全须知和简答题

第一部分 安全须知

一、仪器关机问题

1. 当天最后一位使用者必须软件硬件全关，刷卡下机。若失约或其他个人因素造成仪器未关常开过夜，则取消独立操作资格，降为普通用户资格，且三个月内不予考核。
2. 实验结束，请务必查看终端有无下一位使用者。遵循开关机规则。

二、数据拷贝问题

1. 数据上传网站服务器或平台专用移动硬盘（使用前后格式化）。
2. 不得擅自删除其他人数据，如果硬盘数据已满，请联系仪器管理员。

三、成像分平台环境问题：

1. 所有显微镜禁止戴手套操作。
2. 每个成像房间内空调常开且制冷 22℃不变，湿度 45%-60%，勿因个人冷暖随意更改温度。
3. 每个成像房间内除湿机请勿随意开关。
4. 实验结束，带走自己的样本试剂等，清理桌面，保持干净。
5. 禁止在成像分平台内饮食。
6. 成像房间最后一位离开，需关好门窗和灯，不关空调和除湿机。

四、其他注意事项

1. 镜油不同，请勿混用。
2. 独立操作资格不能借给别人使用，一旦发现严肃处理。

以上问题未遵守者，给予警告处罚，情节严重者禁用仪器。

详细请参考 《成像分平台独立操作资格管理规定（试行）》

第二部分 简答题及参考答案

1) 荧光显微镜如何利用荧光分子进行成像？

参考答案：

荧光显微镜的激发光光源将处于基态的荧光分子从基态激发至激发态，处于激发态的荧光分子不稳定，可以通过释放光子的方式回到基态，这些释放的光子作为发射光可以被荧光显微镜的检测器捕获，从而获知样品中荧光分子的数量和位置。

2) 相比宽场显微镜，共聚焦显微镜如何实现了何种优势？

参考答案：

共聚焦(confocal)的含义是焦平面和像平面共轭，也有说法是光源和两个针孔同时被聚焦。共聚焦显微镜在相机之前布置了针孔，不同焦平面的荧光信号经过物镜后的焦距不同，因此固定位置的针孔可以阻挡非焦平面荧光，减小了通过针孔进入相机成像的非焦平面荧光信号，使得接收到的荧光信号基本来自焦平面，从而提高成像对比度。

3) 本台尼康转盘共聚焦有哪些物镜，哪些是空气镜或油镜，切换镜头有什么注意事项

参考答案：

现有 10 倍和 20 倍空气镜，60 倍和 100 倍油镜。

建议先将物镜高度降到最低之后再切换物镜；若切换前使用的是油镜，切换镜头前应先将油镜和样品擦干净后再切换，不可以直接带着镜油从油镜切换到空气镜。

4) 在使用高倍镜时发现找不到物象，有哪些可能的原因以及解决措施

参考答案：

1. 焦平面没找对，解决措施是调节物镜高度直到找到物象，但是调节时要注意防止物镜直接顶到玻片（或者各种 chamber）。
2. 玻片放反，高倍镜工作距仅有数百微米，载玻片过厚，所以无论如何高倍镜的焦平面都无法对准样品本身。
3. 其他答案合理即可，如果解决不了需要第一时间联系仪器管理员

5) 物镜镜头上的不同数值都代表着什么，比如：60X/1.42; Oil; WD 0.15

参考答案：

60X 是物镜的放大倍数, 1.42 是镜头开口率即 NA 值, Oil 是指该物镜是油浸物镜, WD 0.15 是指 working distance 为 0.15mm。

6) 本台尼康转盘共聚焦有什么主要功能模块可以勾选?

关键词:

多波长拍摄, Z 轴扫描, 多位点拍摄, time-lapse, FRAP 等

7) 请简述如何在开机后使用本台尼康转盘共聚焦完成单张荧光图片的拍摄

参考答案:

1. 确定保存文件的目录并命名即将被拍摄的照片
2. 选择需要被拍摄的波长通道, 点亮激光等
3. 打开 DIC 模式并调节载物台 XYZ 找到物象
4. 选择荧光通道找到需要被拍摄的焦面
5. 设置好曝光时间和激光强度, 点击 acquire

8) 请简述如何在开机后使用本台尼康转盘共聚焦完成 Z-stack 的拍摄

参考答案:

1. 确定保存文件的目录并命名即将被拍摄的照片
2. 勾选 Z-stack
3. 选择需要被拍摄的波长通道, 点亮激光等
4. 打开 DIC 模式并调节载物台 XYZ 找到物象
5. 选择荧光通道找到需要被拍摄的 Z-stack 图像的最顶部和最底部并输入 Z-stack 模块
6. 设置好曝光时间和激光强度, 点击 acquire

9) 相比低倍镜成像, 高倍镜成像对培养皿和玻片有何特殊要求又为何有此要求?

参考答案:

特殊要求主要是培养皿底部要很薄, 一般用于高倍镜成像的培养皿底为 0.17mm 左右。这主要是因为高倍镜工作距往往只有一二百微米, 培养皿或者玻片太厚的话物镜工作距不够, 焦平面升不到样品处。

10) 请罗列使用本台尼康转盘共聚焦硬件方面的各种注意事项

参考答案:

1. 开机时注意电脑主机和硬件的开关顺序，等相机初始化好后再开电脑主机。
2. PIEZO 不可以受压，需要保持 PIEZO 附近的干燥，及时擦干洒的东西。
3. incubator 的盖子不可以受竖直重压，只能横向推开。
4. 切换物镜前降低镜头和擦镜油等。
5. 不要压气浮防震台。
6. 不要单独开关除了两个插排总开关、电脑主机开关和 incubator 以外的任何硬件开关。
7. 其他答案合理即可。如果不确定是否涉及不规范操作，第一时间联系仪器管理员咨询。

11) 请简述本台尼康转盘共聚焦搭载的 SIM 超分辨模块的光学原理

参考答案：

SIM 的实现需要硬件和软件的支持。

硬件方面，Live-SR 系统将照明光调制为具有空间结构的高频（精细）结构光，当这些高频结构光照射到样品上后，可以将样品中原先超过物镜分辨极限的高频信息以低频（没那么精细）信息的方式带出，并最终被 sCMOS 采集，有些低频信息处于物镜分辨极限内，并最终依靠软件的算法加持还原出样本原先的高频信息实现超分辨。这个过程逻辑是： $A \times B = C$ ，已知 A 和 C，求 B 的大小。

12) 请简述 DIC 成像的光学原理

参考答案：

微分干涉是先微分后干涉，即先用偏振片将光源发出的自然光调制为 45° 偏振光，偏振光通过 DIC 棱镜后被分束为 0° 和 90° 偏振的两束光，这两束偏振光经聚光镜汇集到样品上，如果它们穿过介质不同的样品，那么它们的光程差变化会有差异，即相位差变化不同，这是微分。

这两束光再经过透镜汇集到 DIC 棱镜上，DIC 棱镜会将这两束光重新合束为 135° 偏振的一束偏振光，被合束的两束光会发生干涉，此时刚才的相位差被转换为振幅变化，这束带有样品信息的光再经过 135° 偏振片过滤杂散光后就可以被检测器读出数据。

13) 请根据瑞利判据粗略计算本台尼康转盘共聚焦搭载的 60X/1.42 Oil lens 分别在 405nm 和 488nm 波长的激发光下的横向理论极限分辨率是多少？

参考答案

$$\sigma = \frac{\lambda}{2 \times Na} = \frac{488nm}{2 \times 1.42} \approx 172nm$$

同理，405nm 激光作为激发光时，分辨率约为 143nm。

14) 相比单点扫描式共聚焦（比如 LSM880），本台尼康转盘共聚焦为何能实现更快速地获取图像？为了速度，转盘共聚焦又牺牲了什么性能？

参考答案：

转盘共聚焦的转盘上有多个孔可以同时投射多点物象到面阵相机，因此转盘可以实现多点成像，而点扫描相机需要逐点扫描，所以转盘共聚焦有更快的成像速度。

同时，因为 sCMOS 相比光电倍增管量子效率高，不需要很长的曝光时间，这也提高了转盘共聚焦的采样速度。不过这是以牺牲极限条件下的分辨率为代价的，本台转盘共聚焦的针孔大小不可调整，而 LSM880 的 pinhole 大小可以调到很小从而更好地规避来自非焦平面的光。

15) 什么是光漂白(photobleaching)以及如何减轻光漂白对成像的影响？

参考答案：

光漂白是由于处于激发态的荧光分子与周围(生物)分子的反应而被破坏或被不可逆的共价修饰导致其丧失再次进入激发/发射荧光循环的能力的一个光化学过程。

为了减少光漂白对样品的影响可以着眼于缩短持续用荧光光源照射样品的时间，比如用 DIC 模式找样品和减小激光强度等。

16) 转盘共聚焦如果曝光时间设定得过小，成像会出现什么问题，原因是？

参考答案：

如果曝光时间过小，图像中的部分区域会因为未被扫描到而出现黑线。原因是转盘共聚焦的 Nipkow 转盘需要旋转 30°才能扫描整个视野，但是如果曝光时间小到 Nipkow 转盘来不及旋转 30°，那么样品中就会有部分区域没有被扫描到，相机没有接收到信号，所以会在照片里出现黑色弧线。

17) 相比 LED 光源，激光作为共聚焦显微镜的光源有什么优势？

参考答案：

LED 为自发辐射发光，而激光是受激辐射发光，所以激光的相干性比 LED 强。具体地，共聚焦显微镜因为只激发很薄一层样品，所以收到的光子也少，图片暗，因此要求光源在特定波段的光强要够大，而激光恰好具有光源单色亮度高和线宽窄（时间相干性强）的特点。另外，理想的共聚焦显微镜需要点光源才能获得均匀的光场分布，激光发散角小（空间相干性强），聚集光斑比 LED 小得多，更接近点光

源。总结地说，从实用角度看，激光作为光源比 LED 更明亮而且光斑小，更适合作为共聚焦显微镜的光源。

18) 请简述本台尼康转盘共聚焦 PFS (perfect focusing system) 的原理以及何时会用到 PFS

参考答案：

PFS 系统基本是一条独立的光路，LED 光源会发射近红外光至样品处，因为空气和镜油的折射率往往和盖玻片不一样，所以光在盖玻片表面处会发生反射，PFS 系统通过接受反射光信号来分辨盖玻片的位置，从而减小由温度变化和机械振动引起的焦点漂移。

PFS 可自动校正由温度变化和机械振动引起的焦点漂移，这可能是由多种因素引起的，包括向样品中添加试剂和多位置成像。