
01 激光共聚焦显微镜的应用范围

02 激光共聚焦显微镜的原理

03 激光共聚焦显微镜的光路部件

04 如何获取一张高质量的图像

05 样本制备建议

01 激光共聚焦显微镜的应用范围

02 激光共聚焦显微镜的原理

03 激光共聚焦显微镜的光路部件

04 如何获取一张高质量的图像

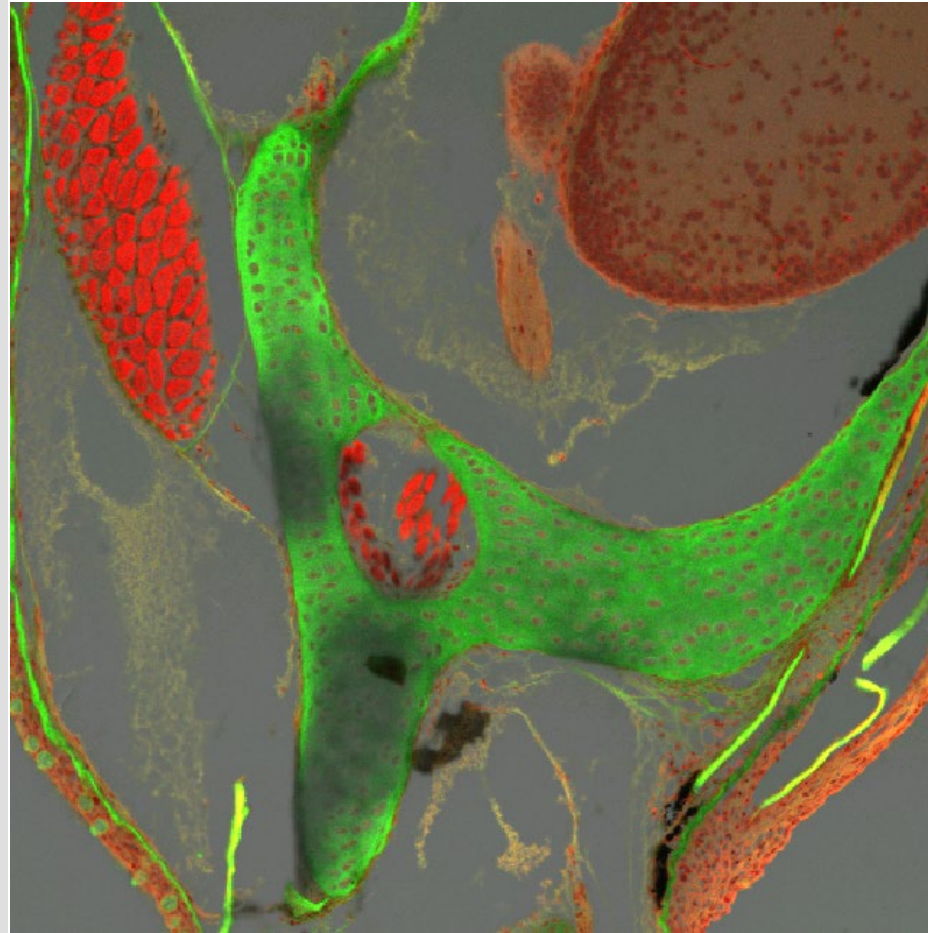
05 样本制备建议

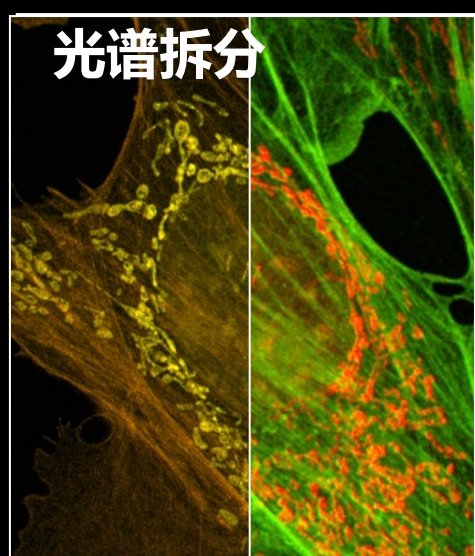
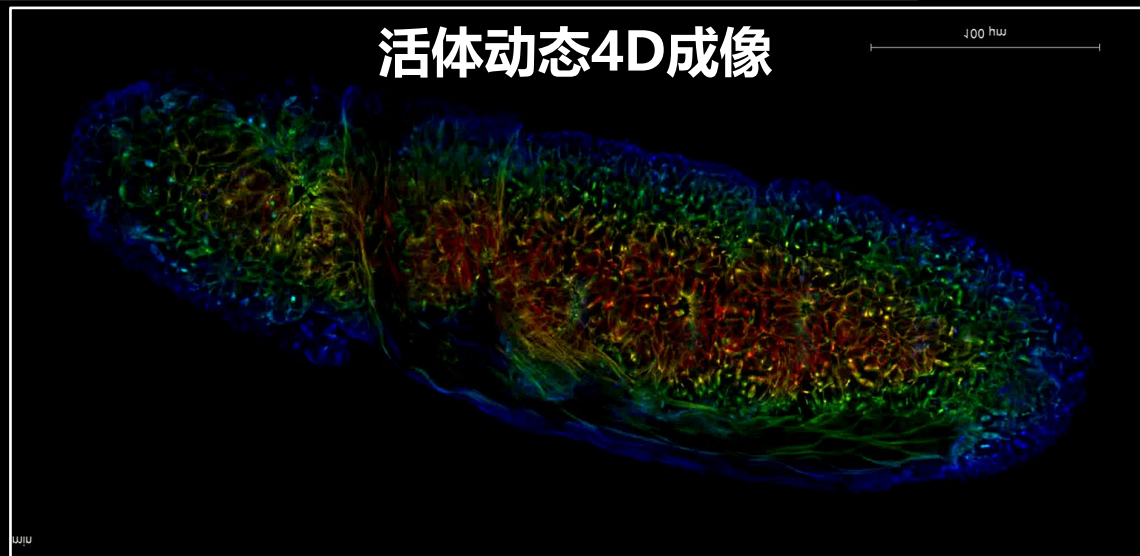
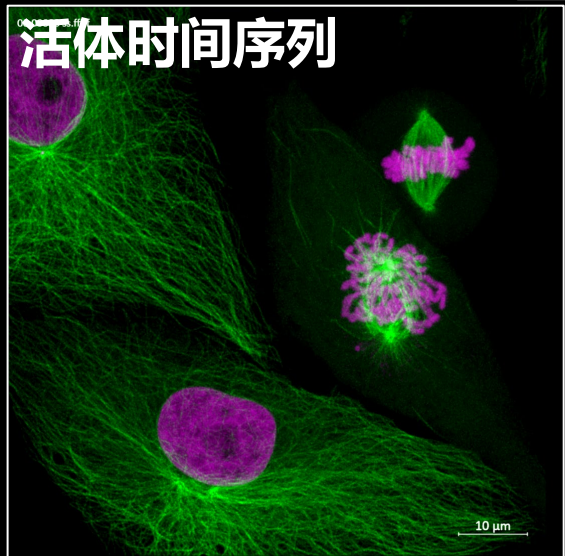
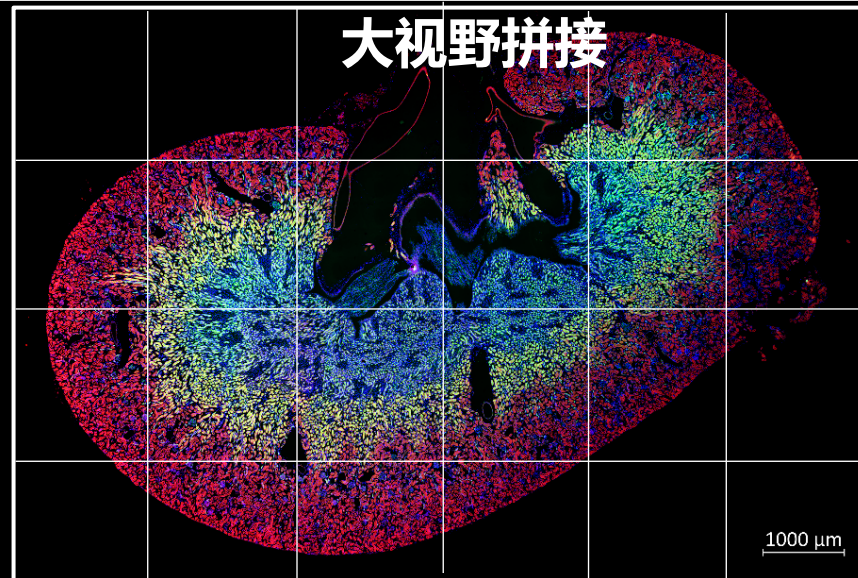
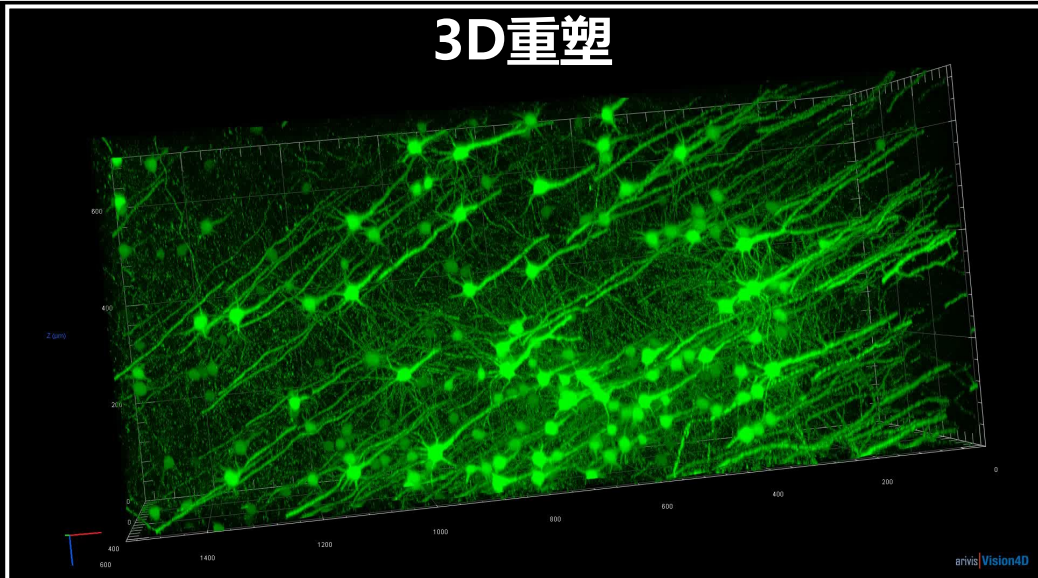
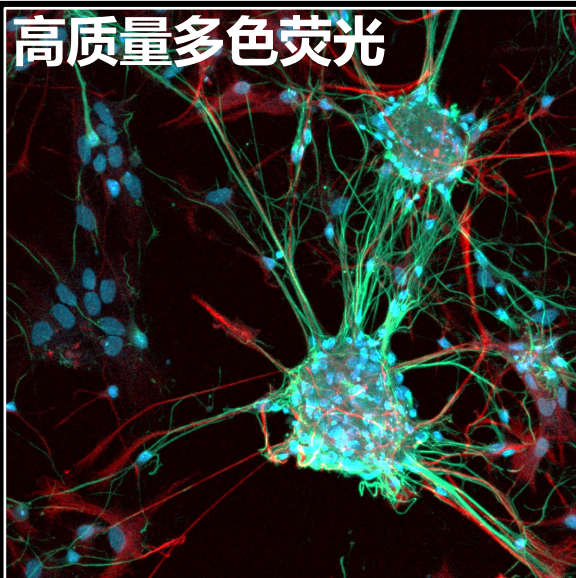
共聚焦显微镜：广泛应用于 生物、医学 各个领域



Nearly all fields of Science...

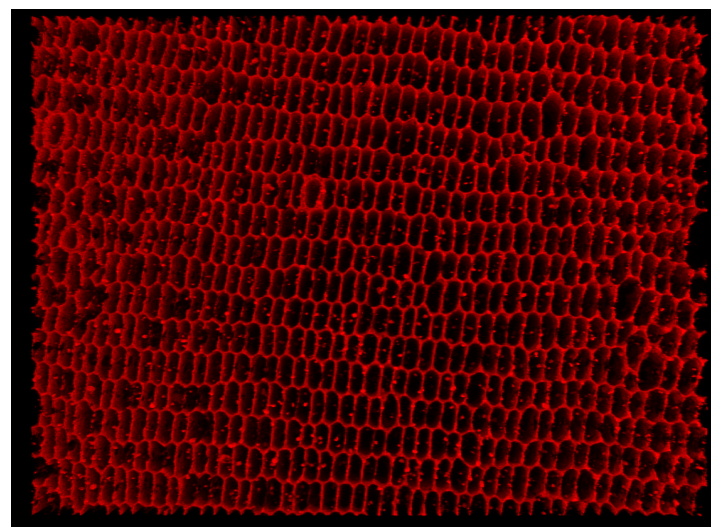
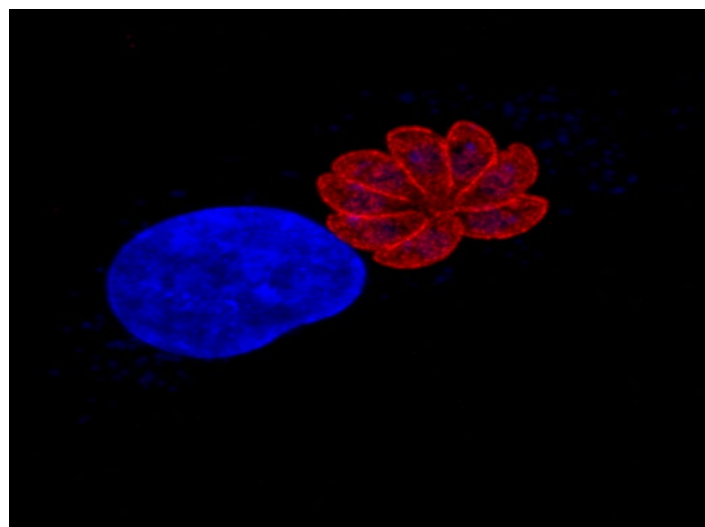
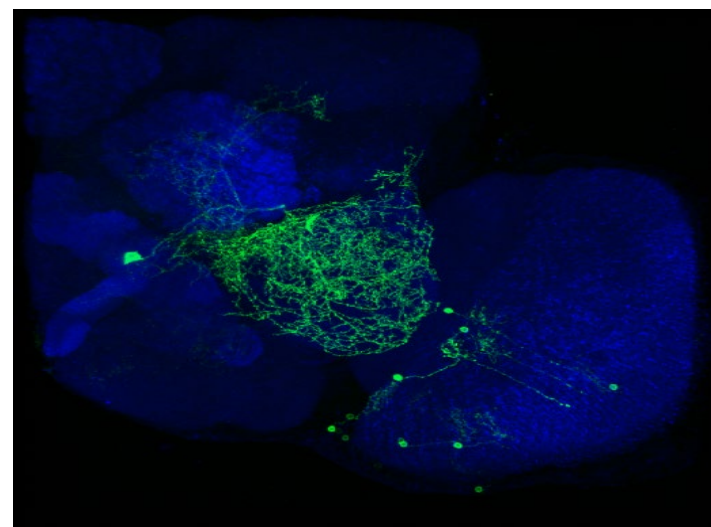
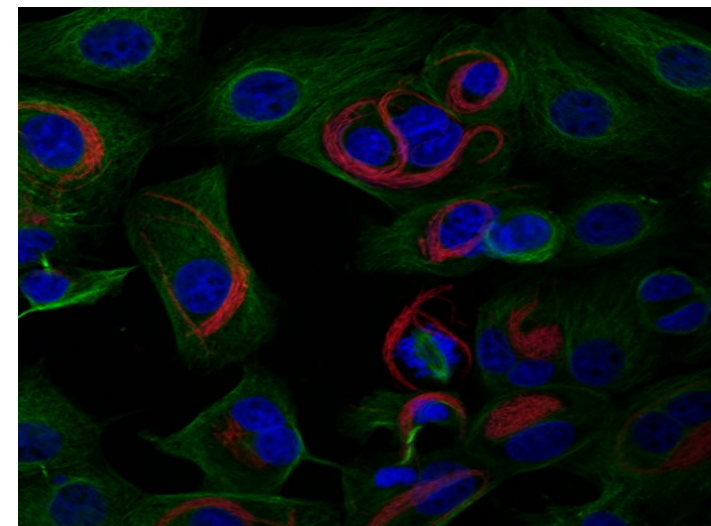
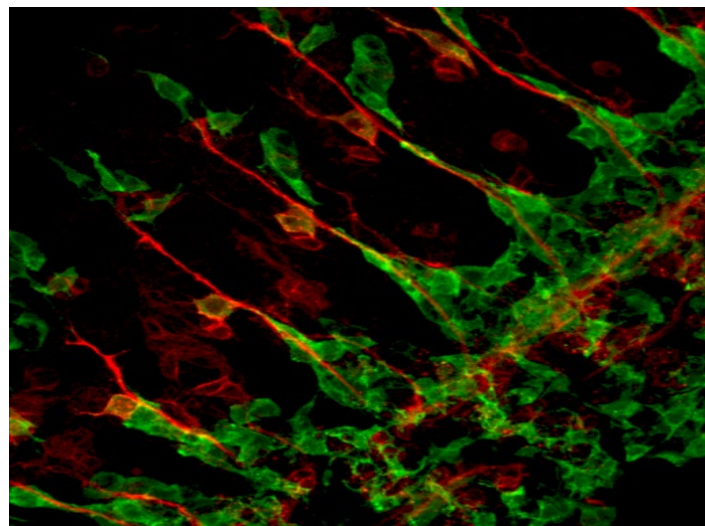
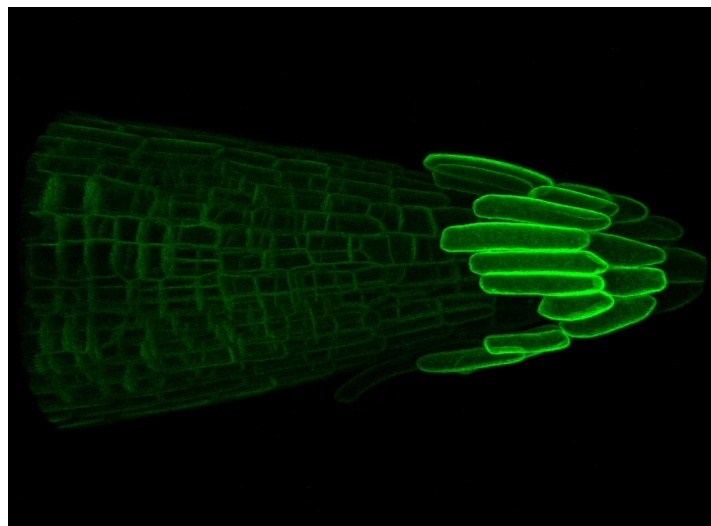
*Agricultural Research,
Alzheimer, Cancer,
Cell Science, Biochemistry,
Botany, Immunology,
Developmental Biology, Ecology,
Epidemiological Diseases,
Evolutionary Biology,
Food design, Genetics, HIV,
Material Quality Control,
Material Sciences, Medicine,
Membrane Research,
Neurobiology, Parasitology,
Pharmacology, Physics,
Plant Biology, Proteomics,
Signal Transduction, Virology...*





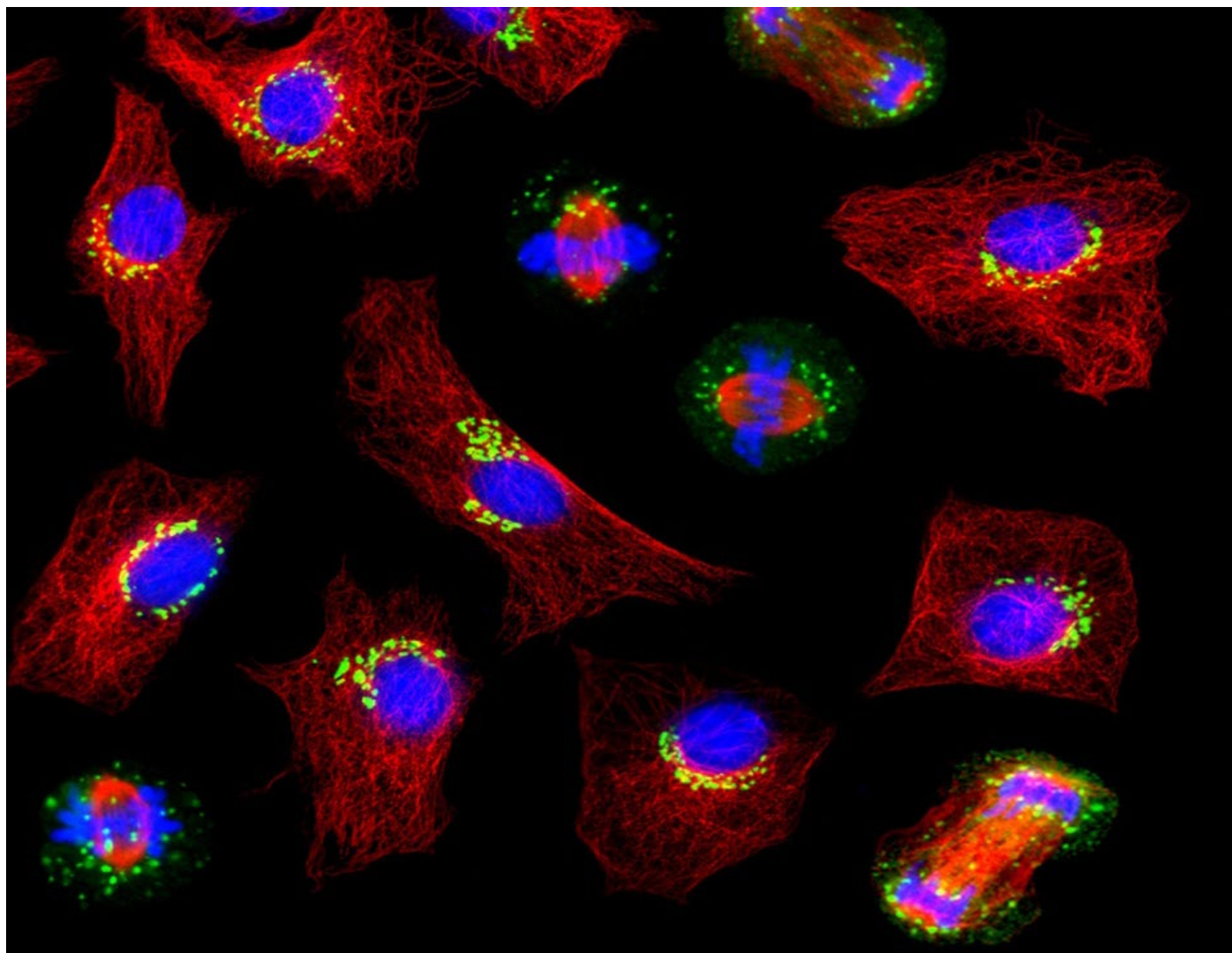
基本功能：二维荧光图像采集

拍摄高质量的单通道或多通道荧光照片



基本功能：二维荧光图像采集

拍摄高质量的单通道或多通道荧光照片



大鼠肾细胞

Green: GFP融合蛋白, 高尔基体

Red: 抗体, 微管

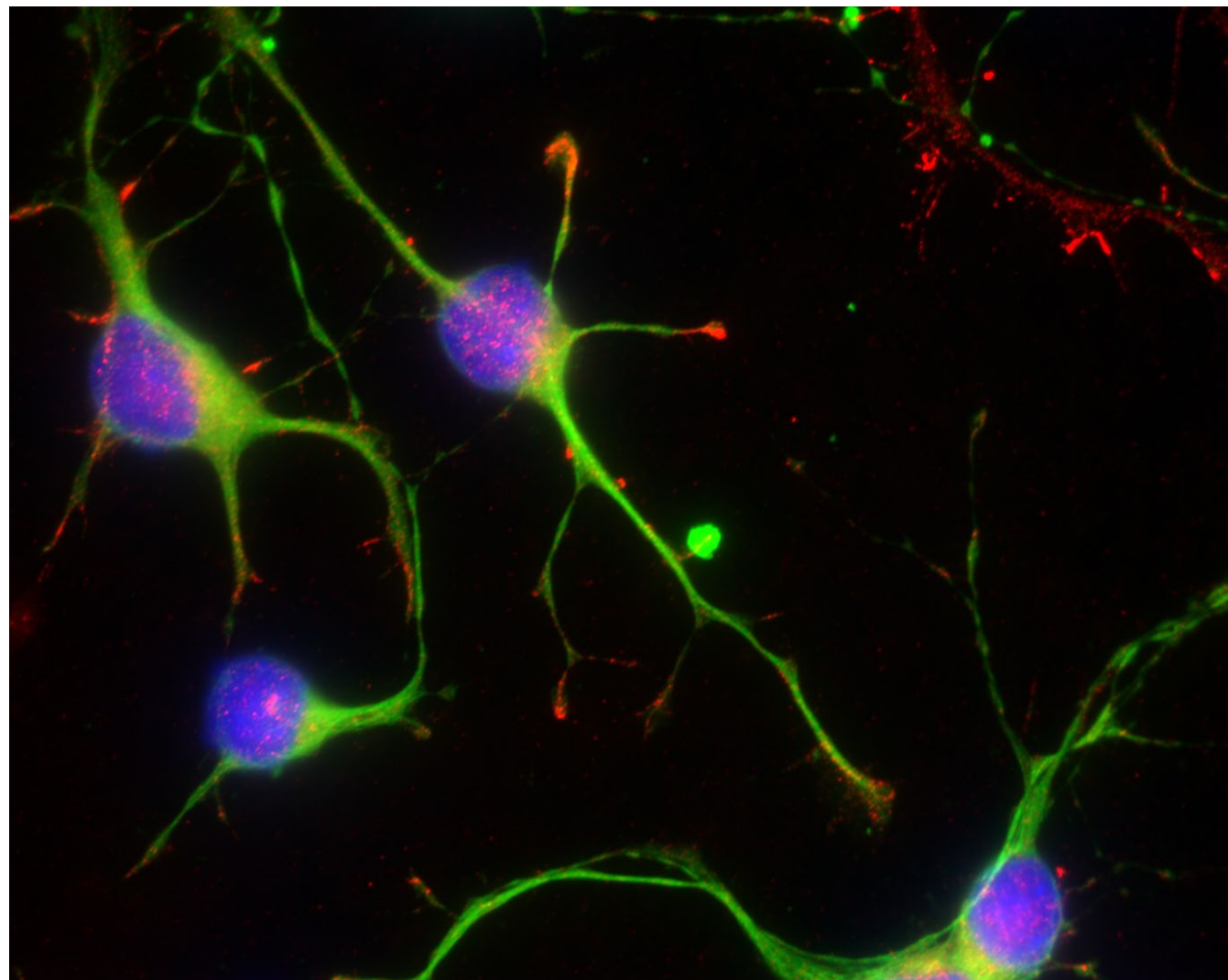
Blue: DAPI, 细胞核

基本功能：二维荧光图像采集

拍摄高质量的单通道或多通道荧光照片



Rat forebrain neurons
Blue: DAPI
Green: anti-beta-tubulin
Red: anti-ActR11



基本功能：二维荧光图像采集

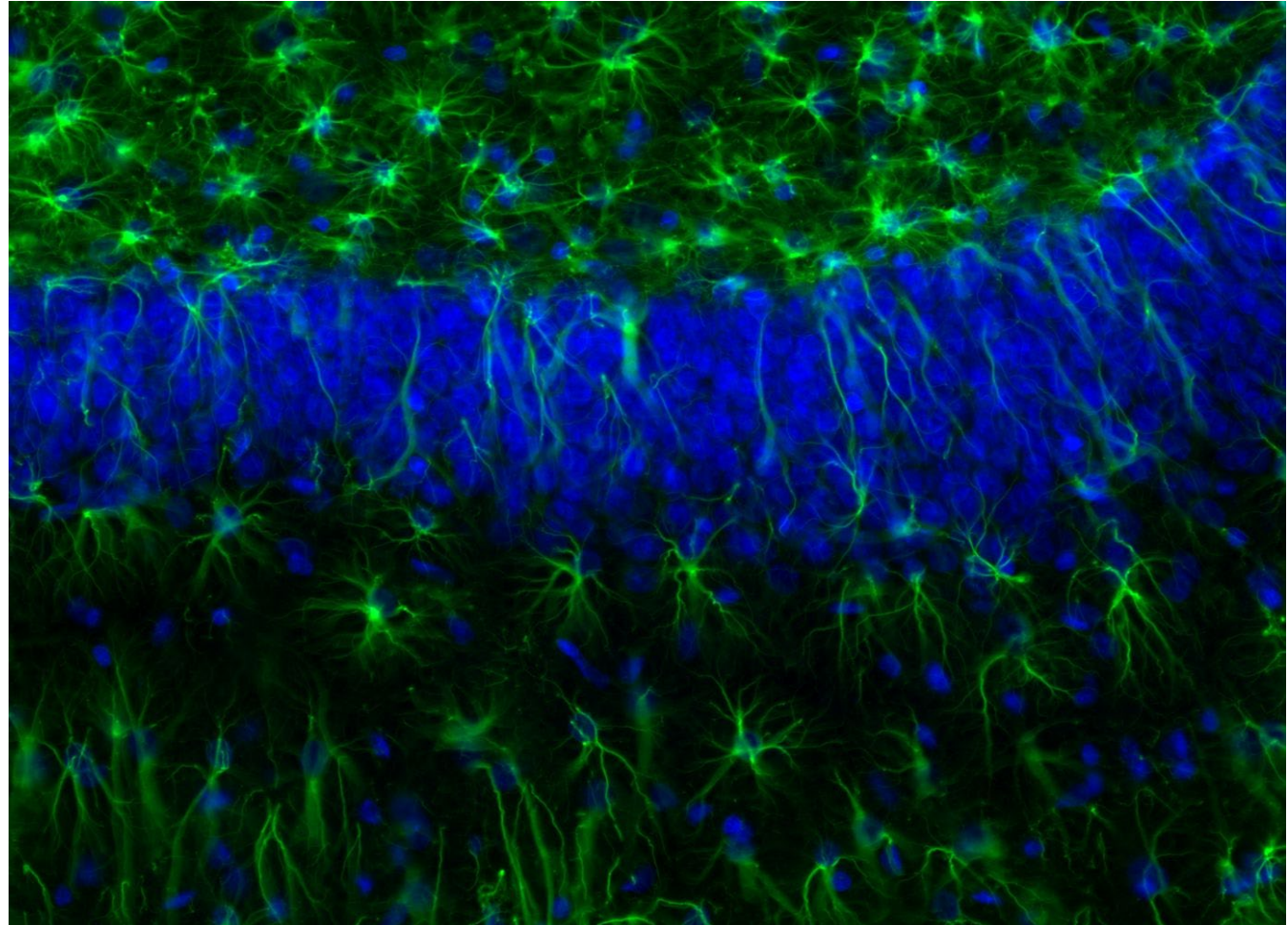
拍摄高质量的单通道或多通道荧光照片

大鼠大脑固定切片，海马区

Blue: DAPI

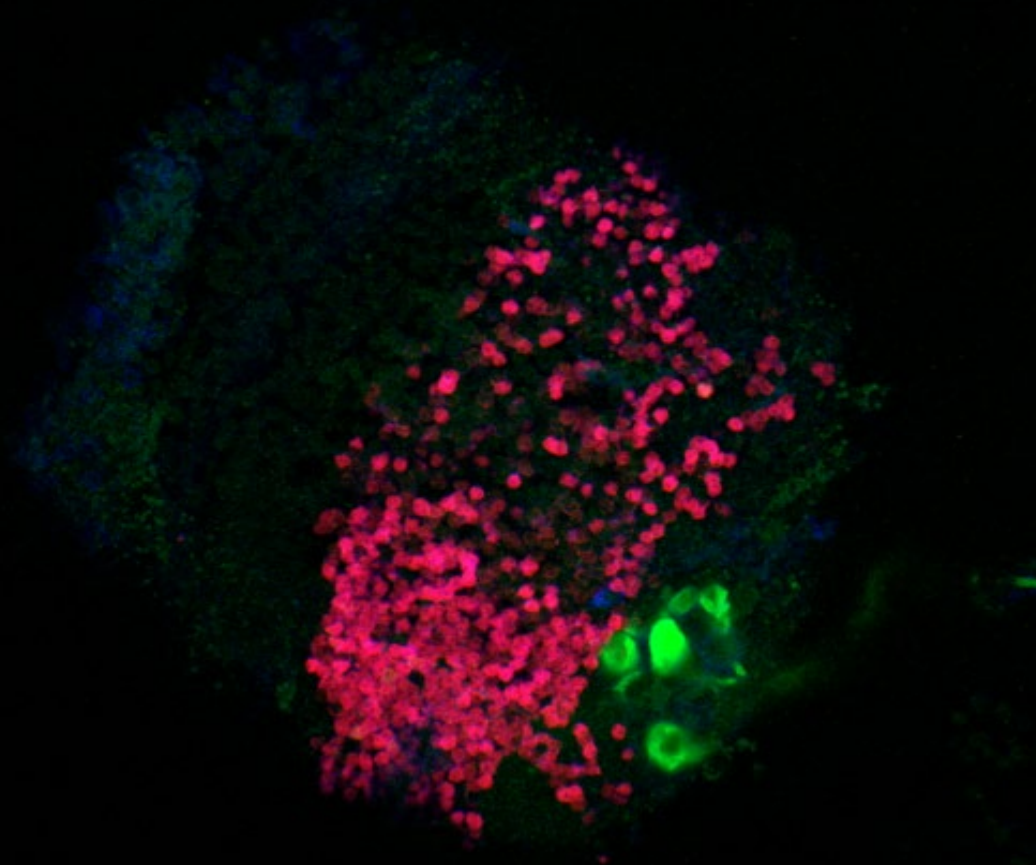
Green: GFAP (astrocytes)

Red: Phalloidin (F-actin)



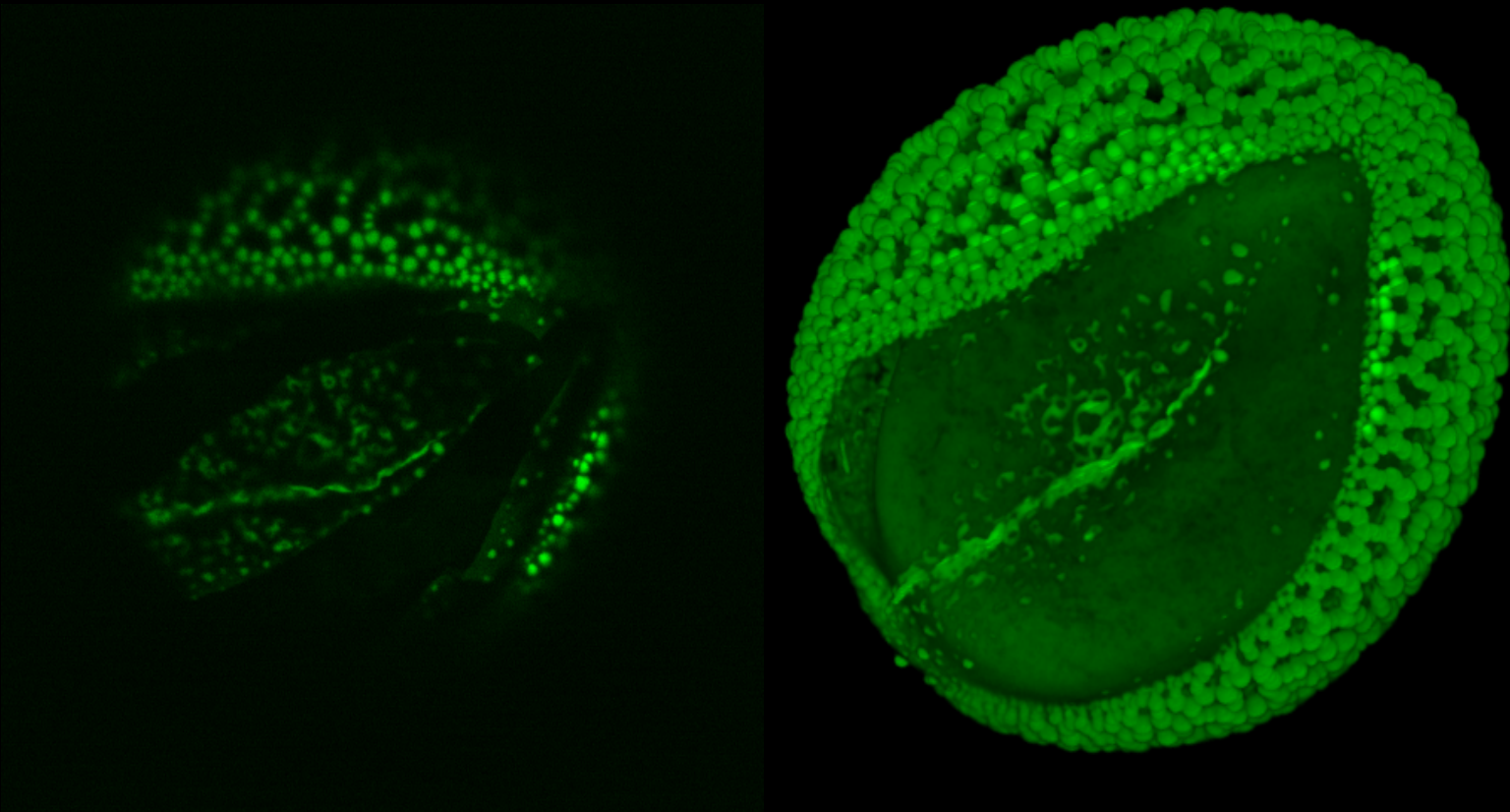
基本功能: Z 轴采集 (Z-Stack)

果蝇脑 - 不同神经元群体

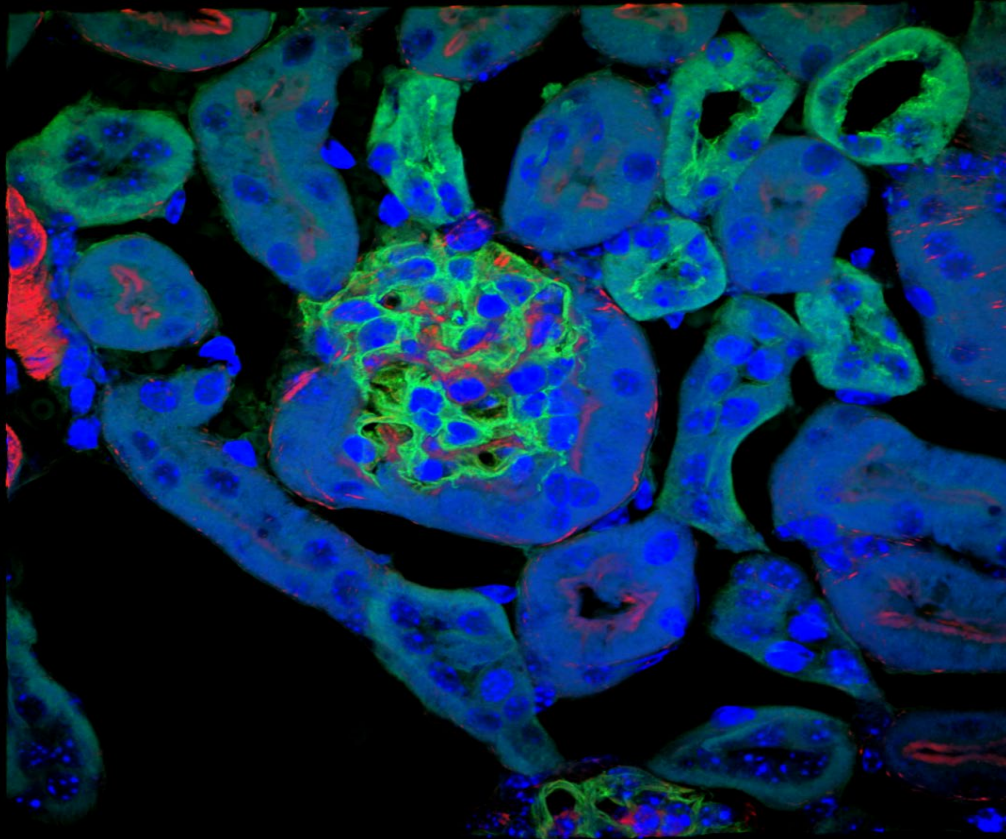
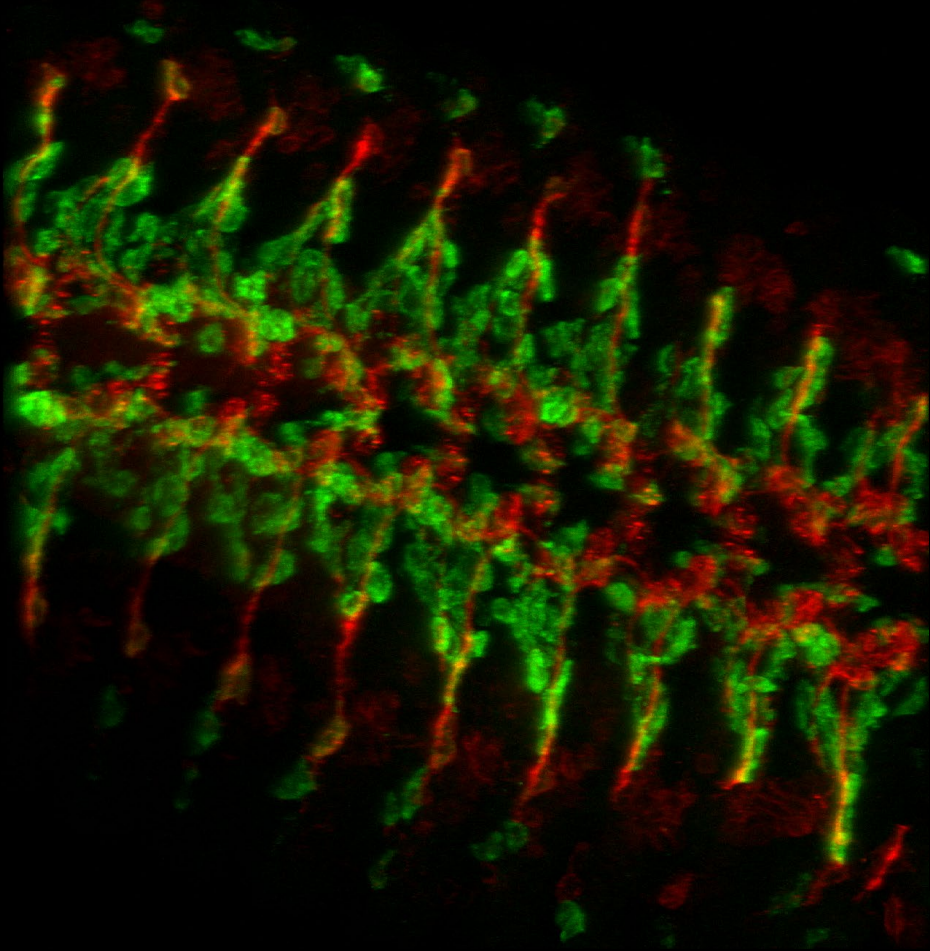


基本功能：Z 轴采集

三维重构

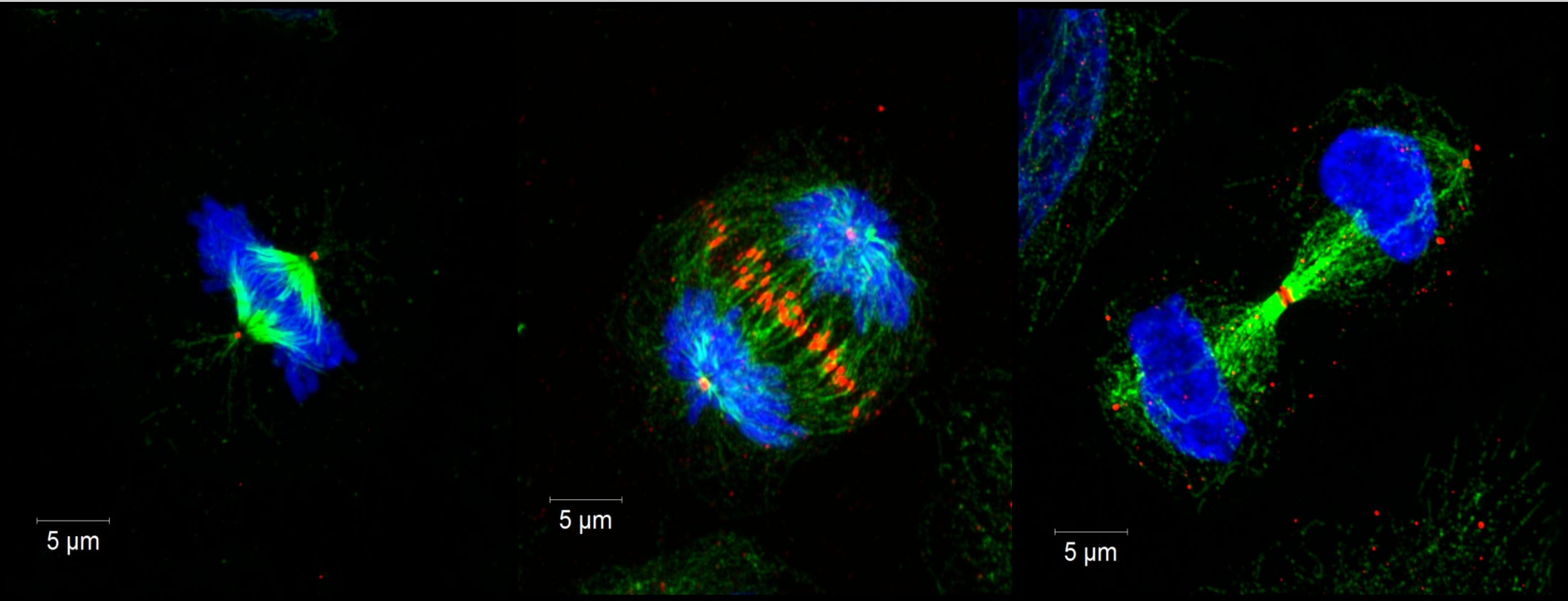


基本功能：Z 轴采集 三维重构



基本功能: Z 轴采集

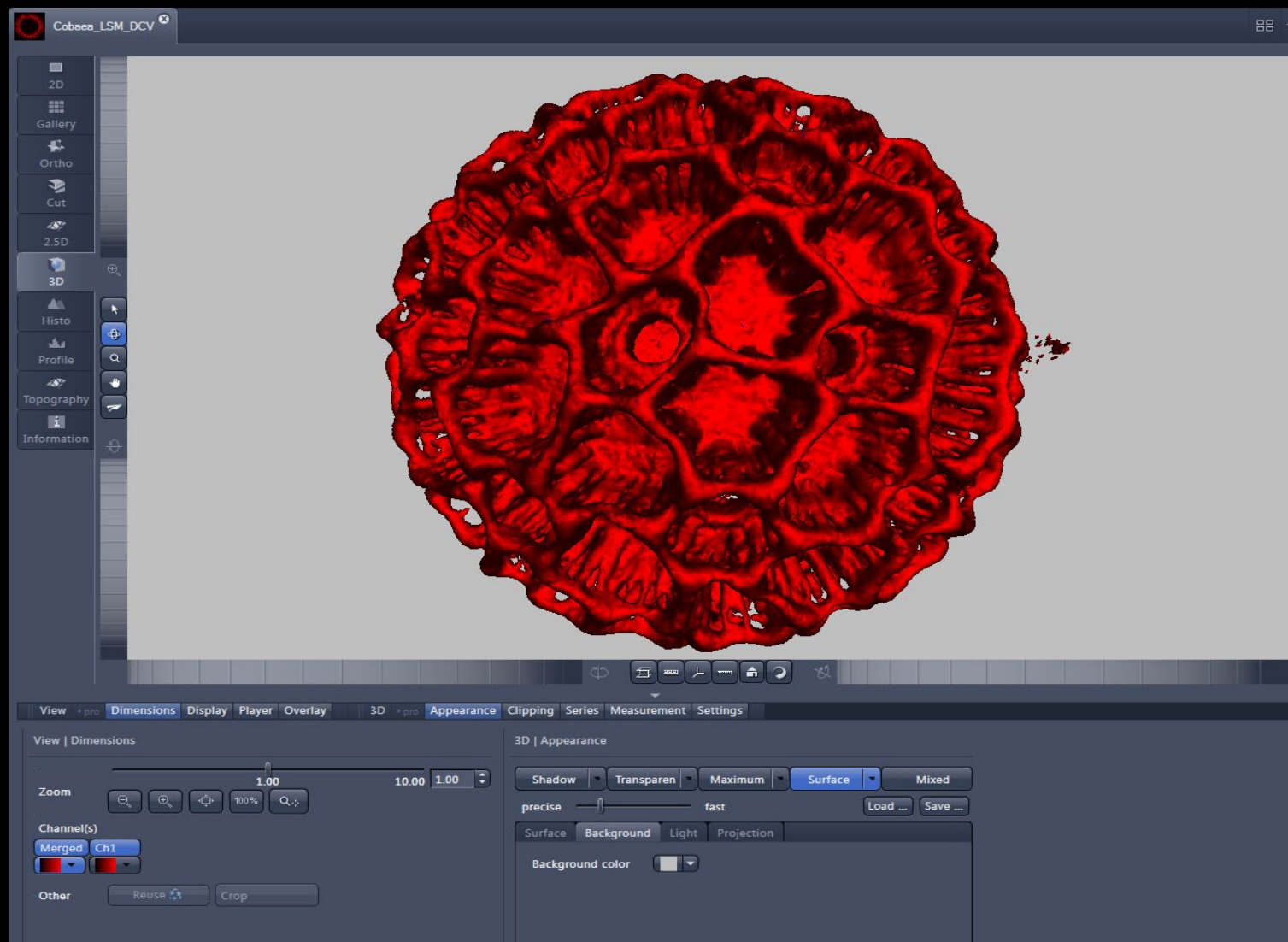
最大强度投影 (MIP-Maximum Intensity Projection)



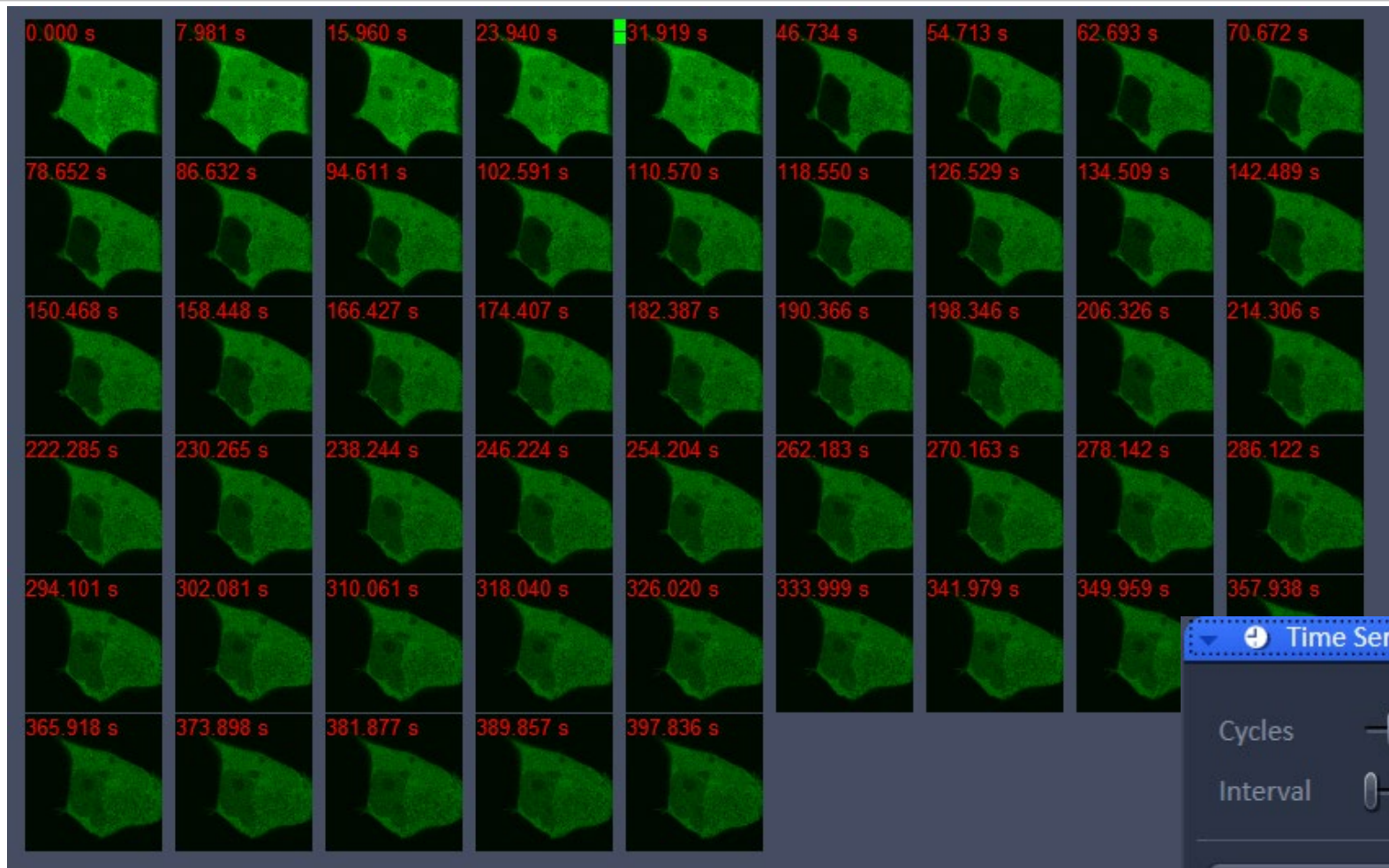
- 物镜: Plan-Apo 63x/1.4 Oil
- 最大强度投影

3D 功能

三维结构分析和测量 (需3D模块)



基本功能：时间序列成像



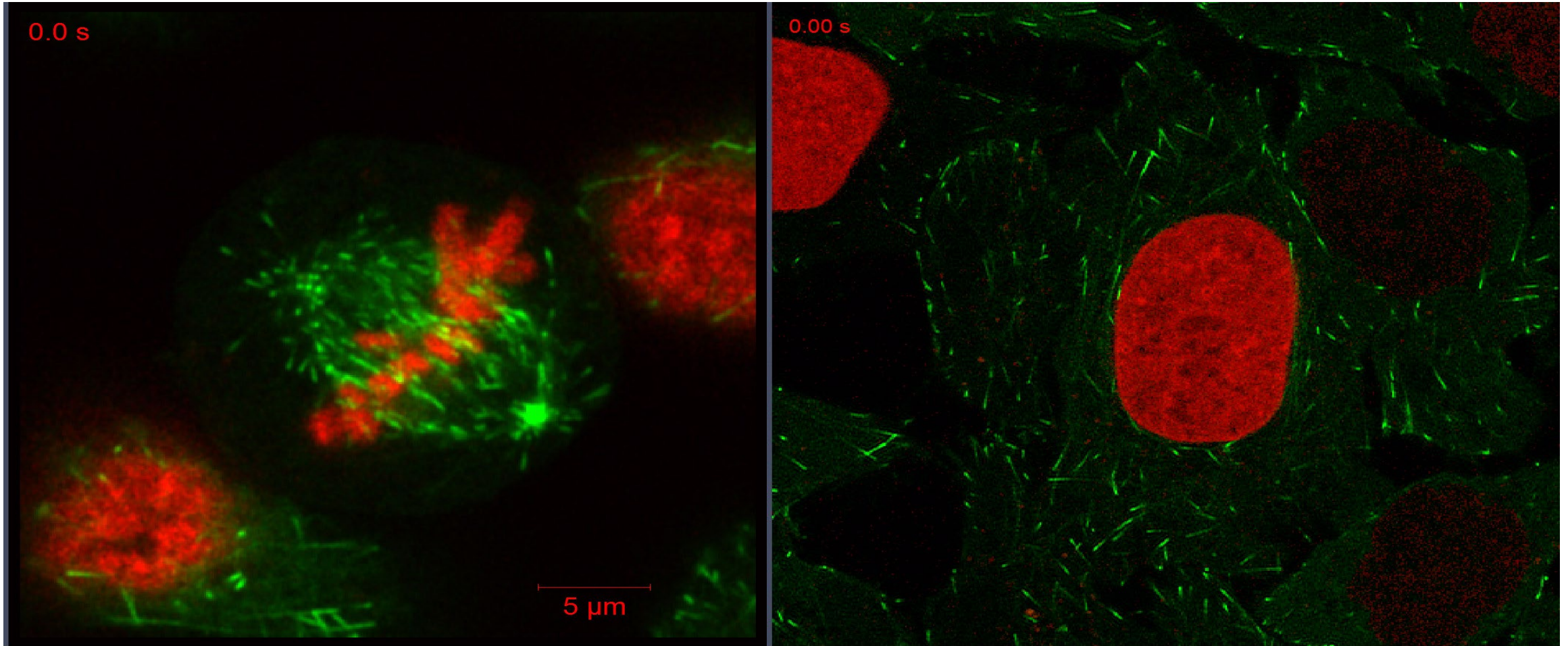
Time Series Show All

Cycles

Interval msec

Pause

基本功能：时间序列成像

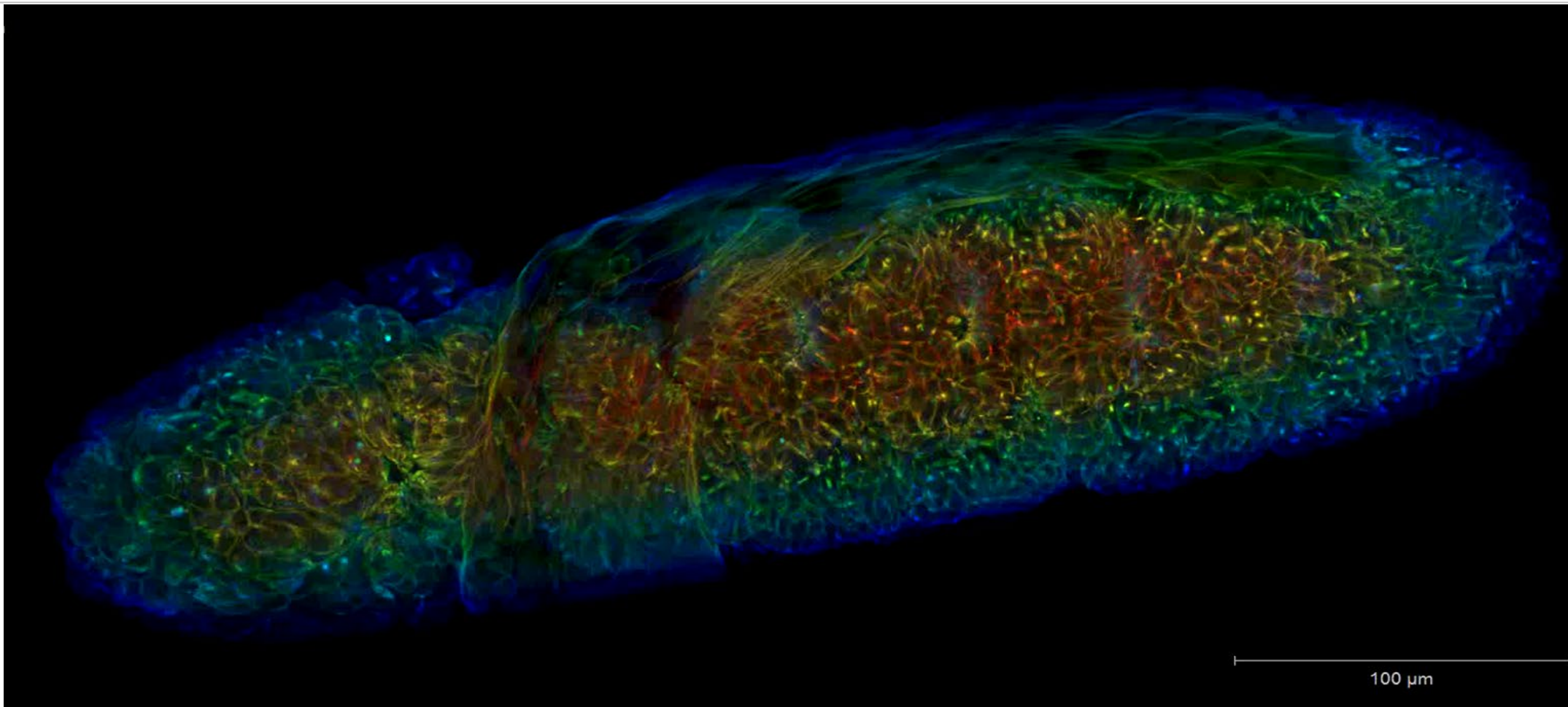


Mitosis in HeLa-Kyoto cell line during mitosis

Video showing Histone 2B (H2B, red, mCherry) and microtubule end-binding protein 3 (EB3, blue, EGFP)

Sample courtesy of: Jan Ellenberg, EMBL, Heidelberg.

四维动态结构 果蝇胚胎发育



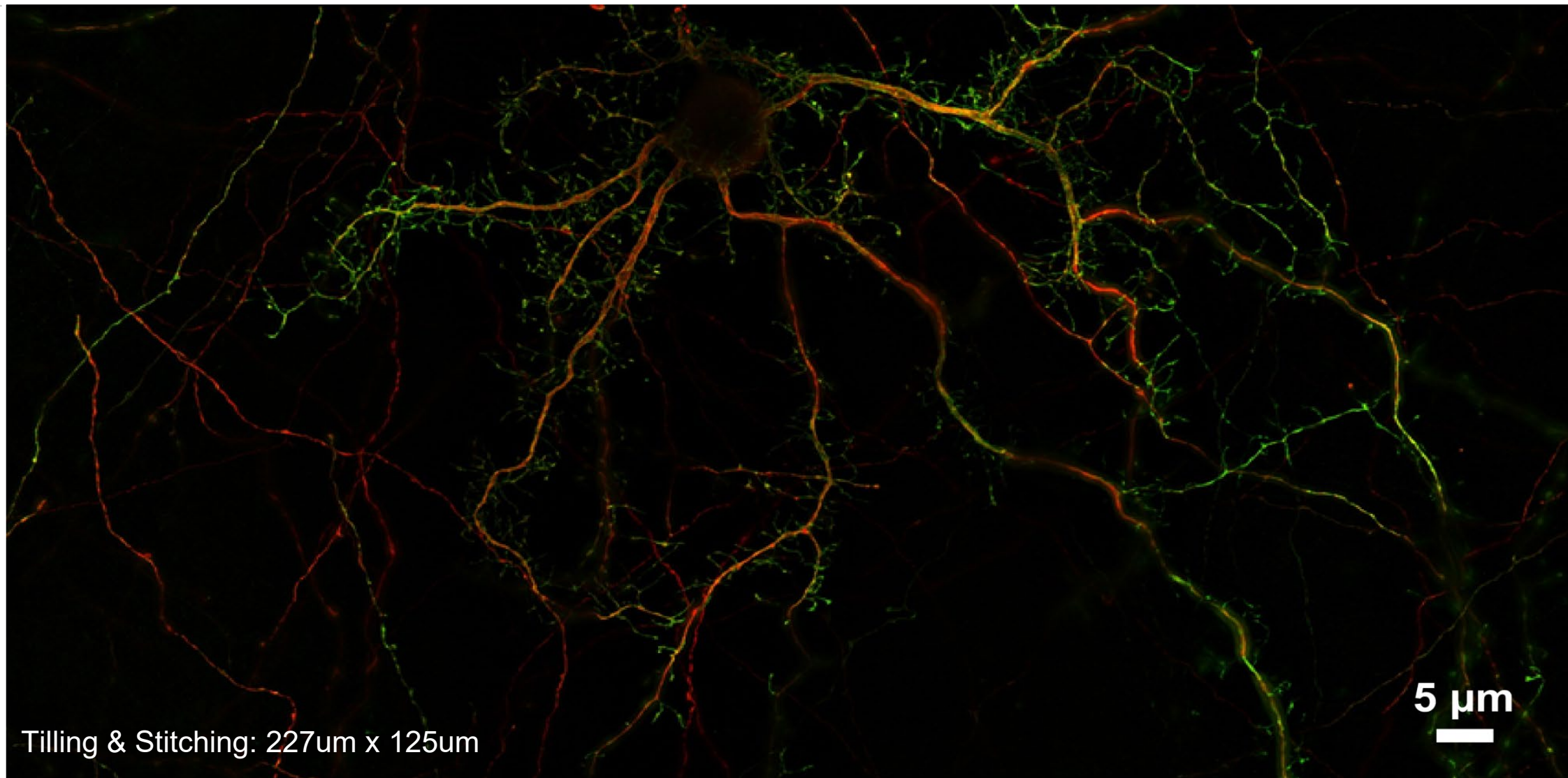
Drosophila melanogaster embryo, Jupiter-GFP (microtubules)

Z-stack depth coded: 72 slices, Every 15 min, 11.5 h

Sample courtesy of Balazs Erdi, Max F. Perutz Laboratories, University of Vienna, Vienna Biocenter

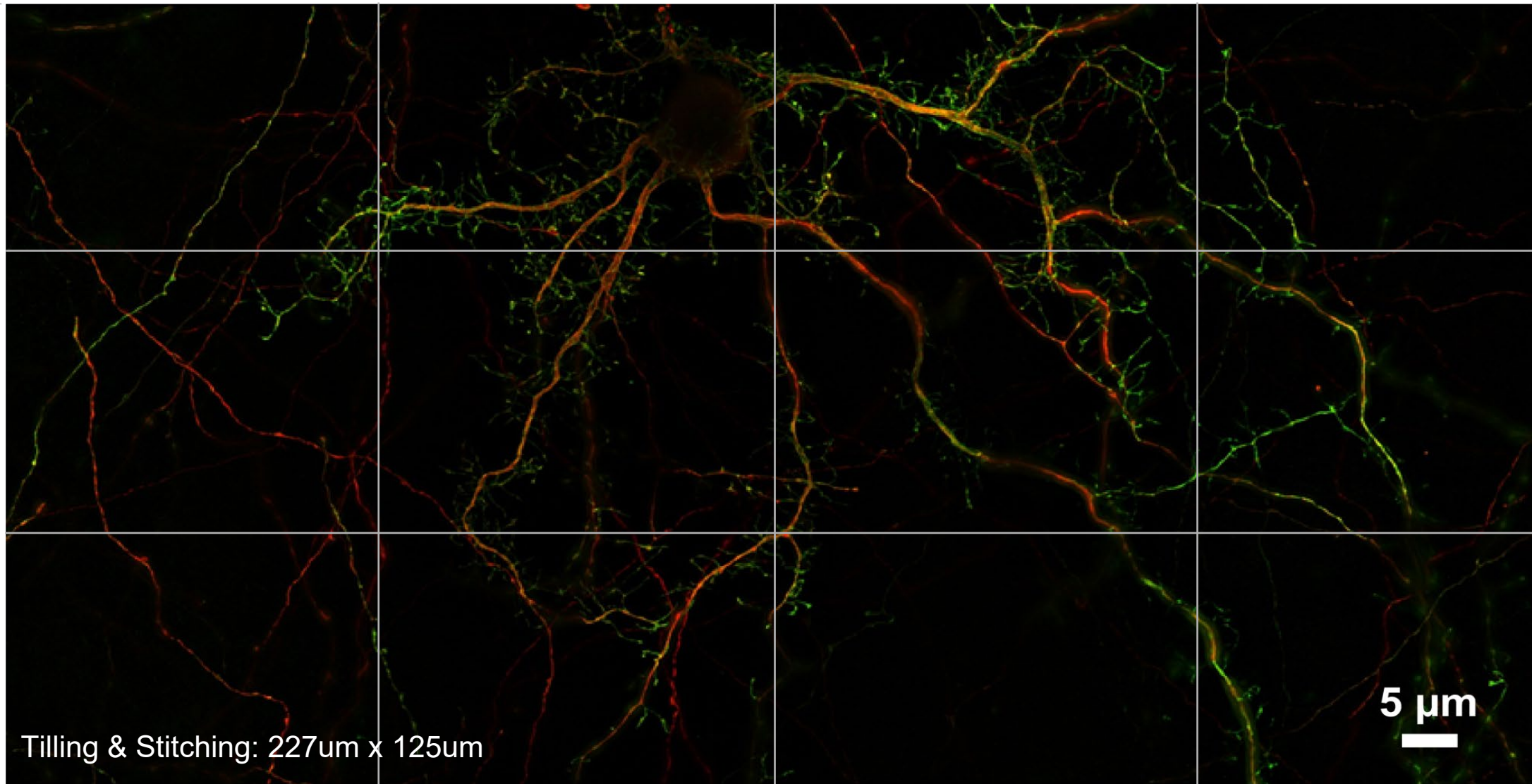
基本功能：大视野拼图

视野的扩展



基本功能：大视野拼图

视野的扩展

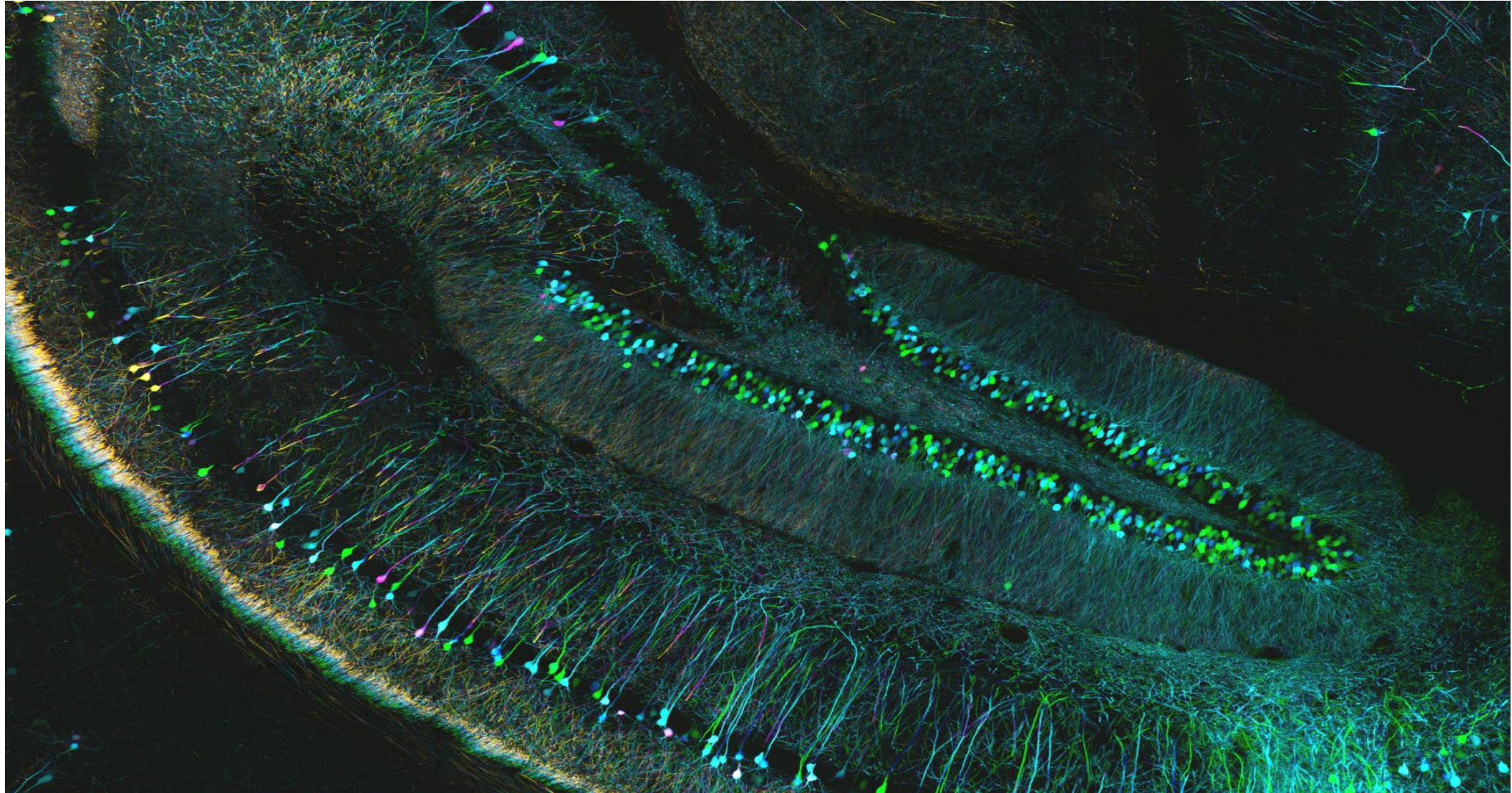


Tiling & Stitching: 227um x 125um

5 μm

基本功能：大视野拼图

大鼠脑片 (Z-stack, Tiled, MIP)



基本功能：聚焦地形图

优化采集数据



Focus Strategy

Use Focus Surface/Z Values Defined by Tiles Setup

Reference Channel and Offsets

Focus Surface

Local (per Region/Position) Global (Carrier based)

Adapt Focus Surface/Z Values

Initial Definition of Support Points/Positions/Tile Regions

By Tiles Setup

Software Autofocus

Multidimensional Acquisition

Tiles

Advanced Setup

Tile Regions

Contour

Tiles Size Stake

X 3 3577.8 μm

Y 3 3577.8 μm

Name	Category	Tiles	Z (μm)
TR1	Default	54	1410.4

Verify Tile Regions...

Positions

Sample Carrier

None

Ensure stage/carrier calibration

Calibrate...

Focus Surface (Verify)

Local (per Tile Region)

Support Points of Selected Tile Region: TR1

X (μm)	Y (μm)	Z (μm)
44874.2	22548.4	1620.8
47222.4	23331.2	1627.2

Verify Tile Regions/Positions

Name	Z (μm)	Tile Region	Array
SP	1639.7	TR1	
SP	1620.8	TR1	
SP	1627.2	TR1	
SP	1620.8	TR1	
SP	1610.0	TR1	
SP	1623.8	TR1	

Autofocus (AF) Select Verification Helper Method

Move to Current Point ⚠ Current Stage X/Y \neq Current Point

Set Z & Move to Next Current Z 1623.8 μm

Run AF and Set Z Use AF to Verify the Remaining

All points have been verified.

Close

Tiles Preview Scan Dimensions Display

Tile Region Setup Position Setup Properties Support Points

Zoom 100% 5% Auto Fit

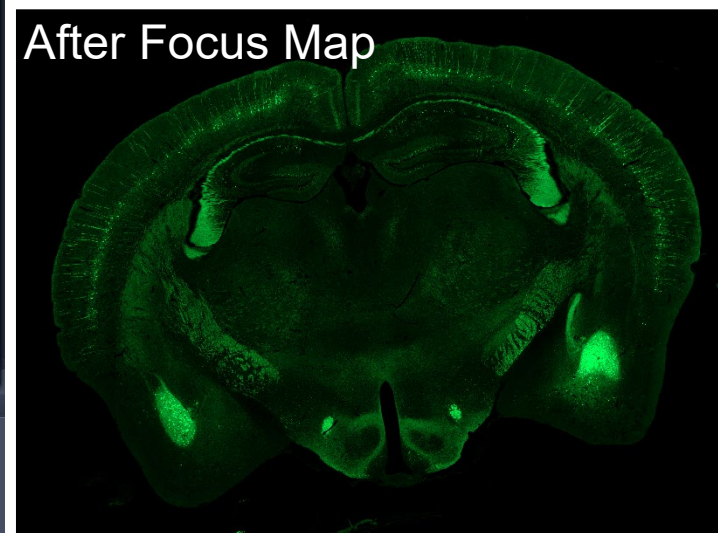
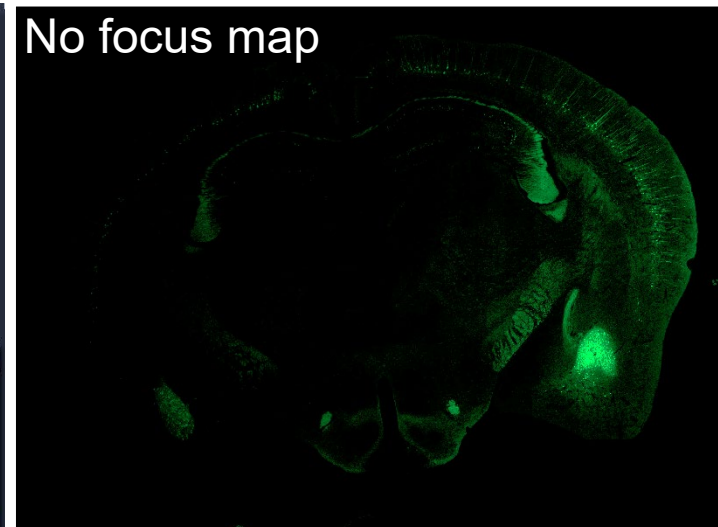
Tools Navigator Interpolation

Channels

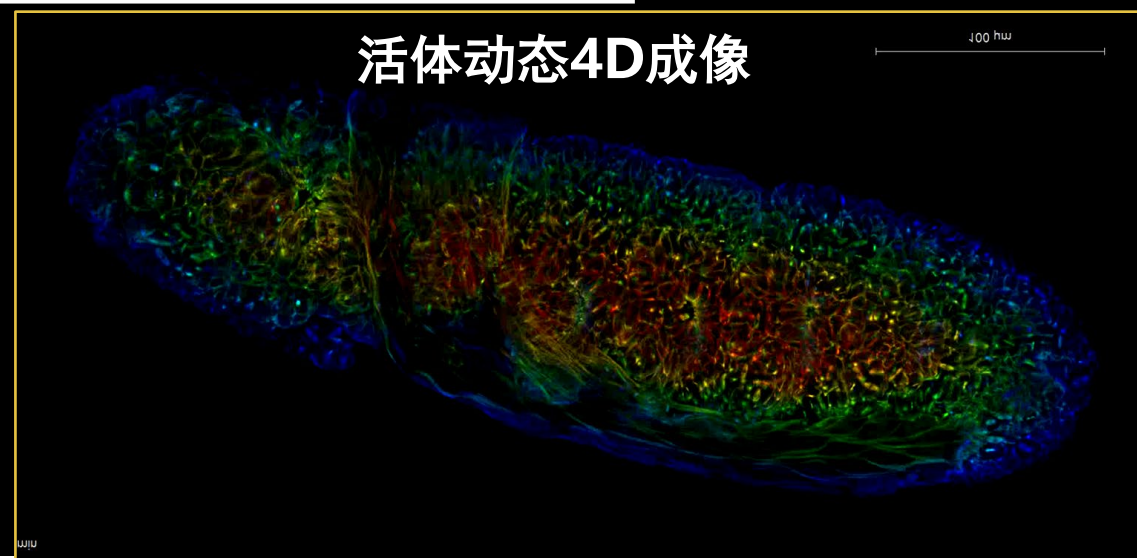
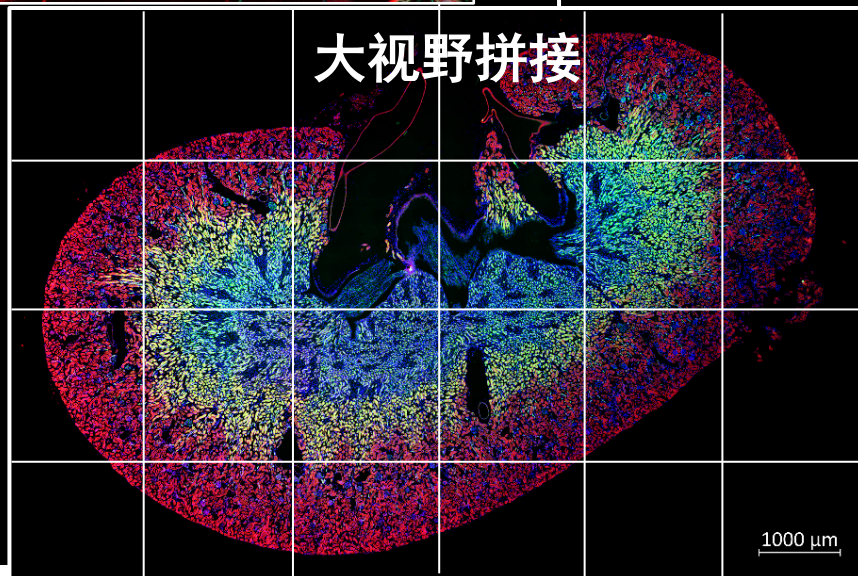
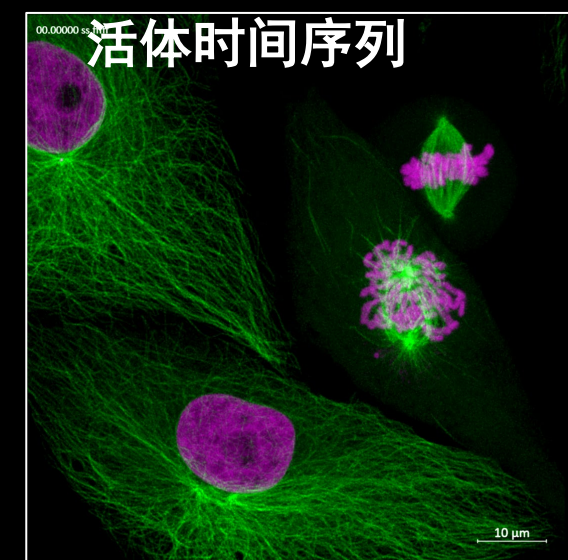
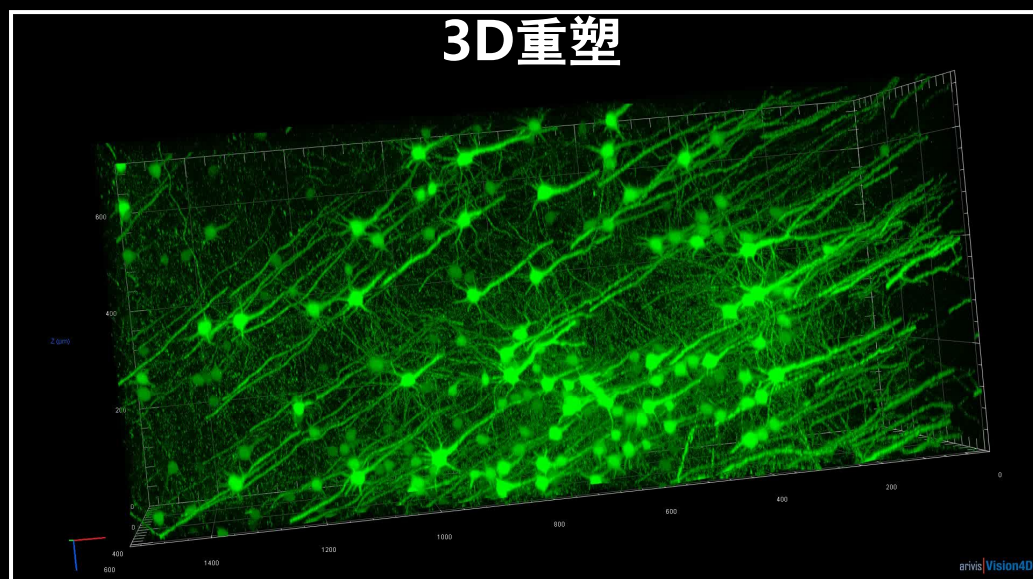
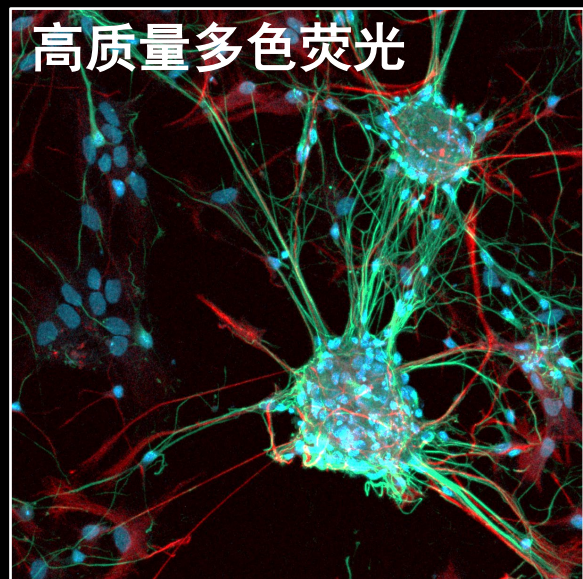
Setup by Contour Predefined Carrier

Contour Keep Tool

Anchor

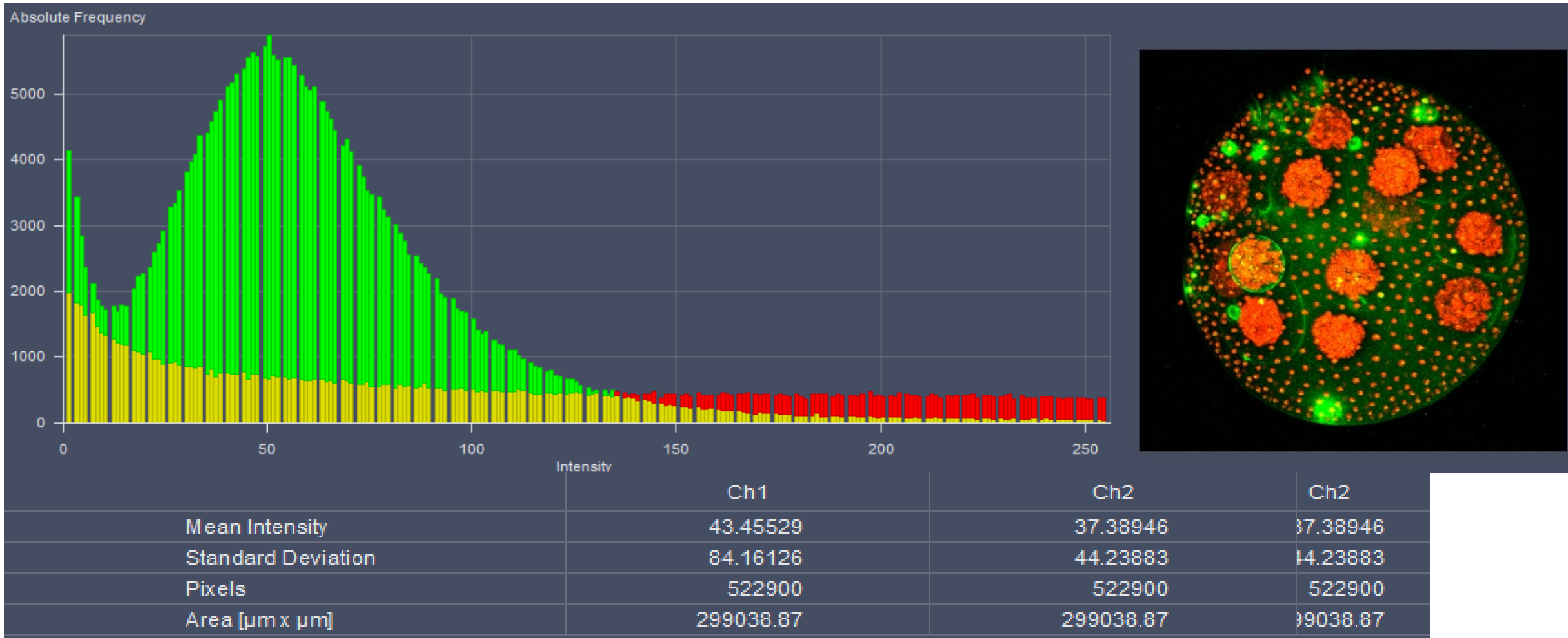


LSM 980 应用



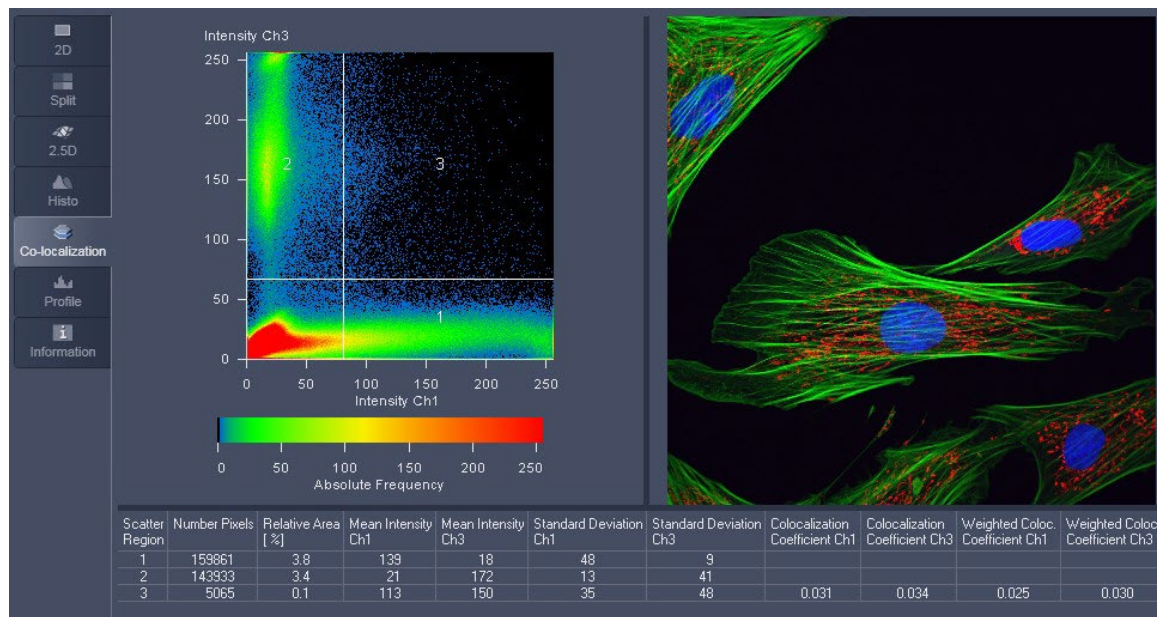
测量分析

荧光强度分析



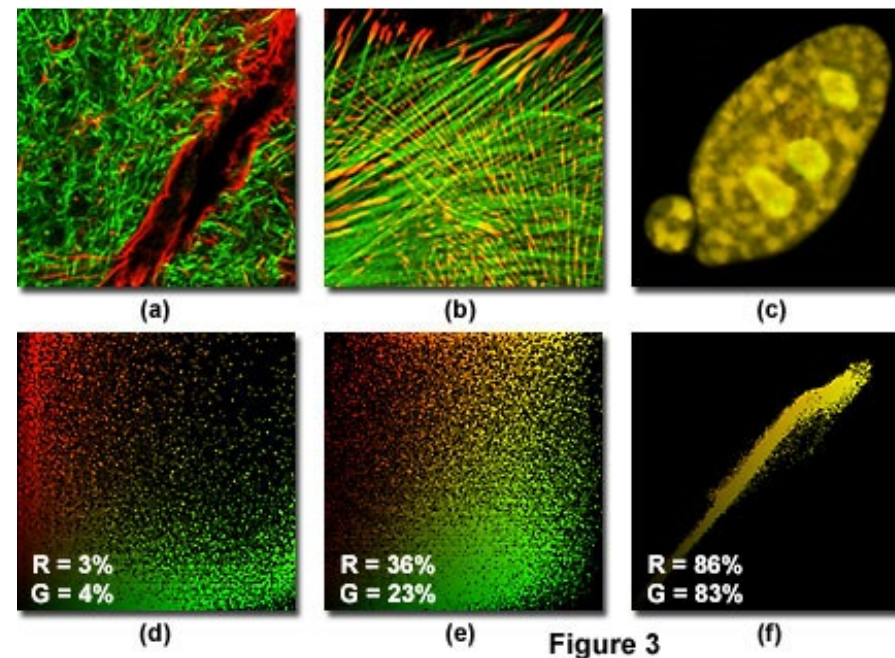
测量分析：共定位分析 co-localization

两种荧光信号的共定位定量分析



直接显示所选区域荧光信号的共定位系数

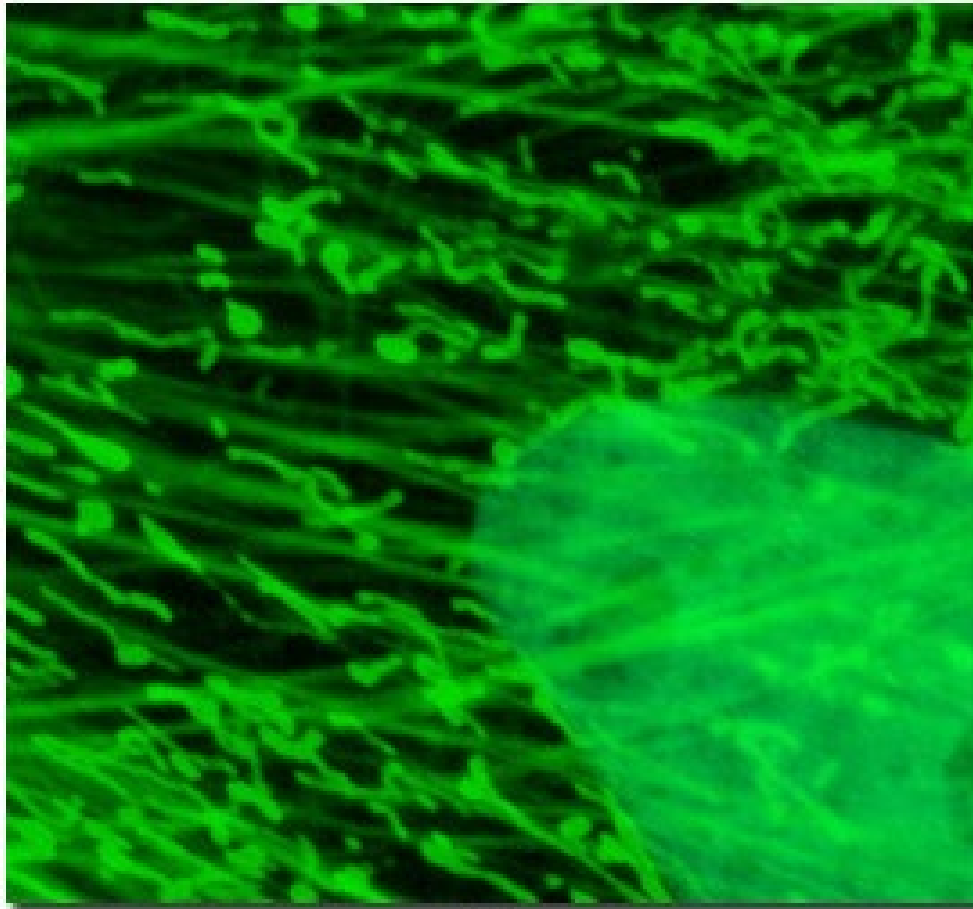
Various Degrees of Co-Localization in Confocal Microscopy



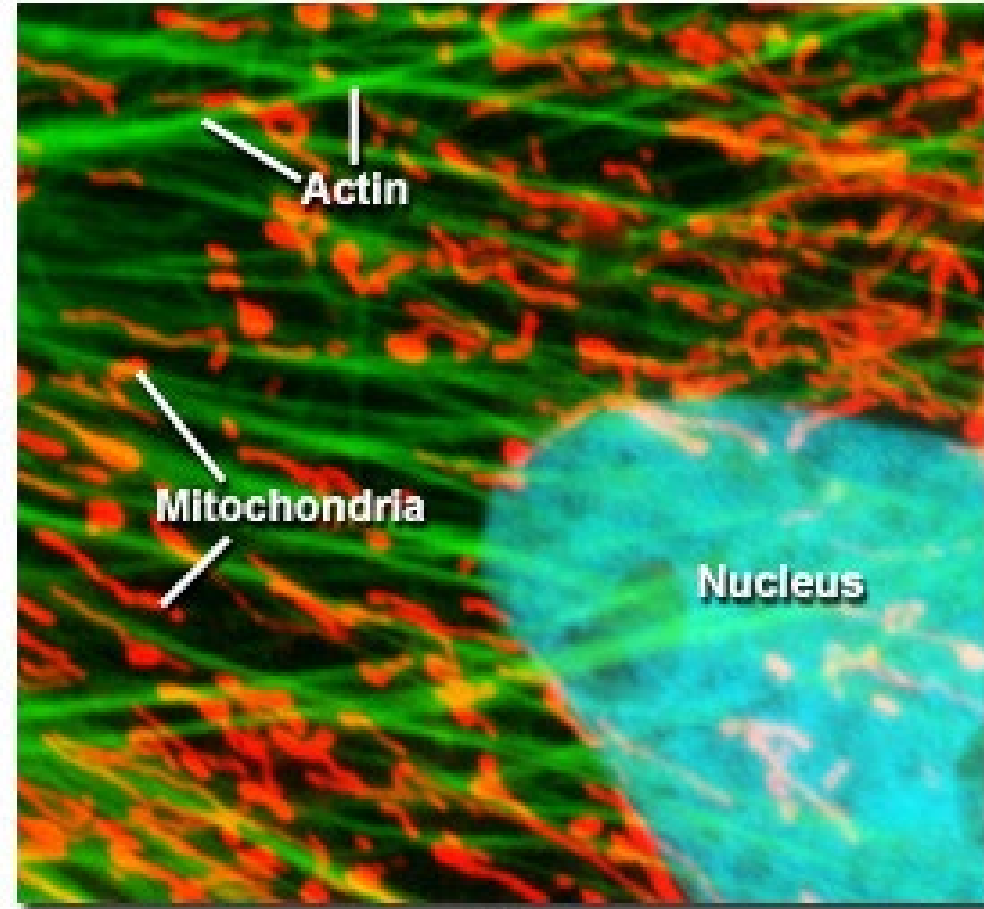
$$R_r = \frac{\sum_i (S1_i - S1_{aver}) \cdot (S2_i - S2_{aver})}{\sqrt{\sum_i (S1_i - S1_{aver})^2 \cdot \sum_i (S2_i - S2_{aver})^2}}$$

扩展功能：光谱扫描，线性拆分 最大程度避免荧光串色的影响

Spectral Imaging and Linear Unmixing of Fixed Cells with Synthetic Dyes



(a)



(b)

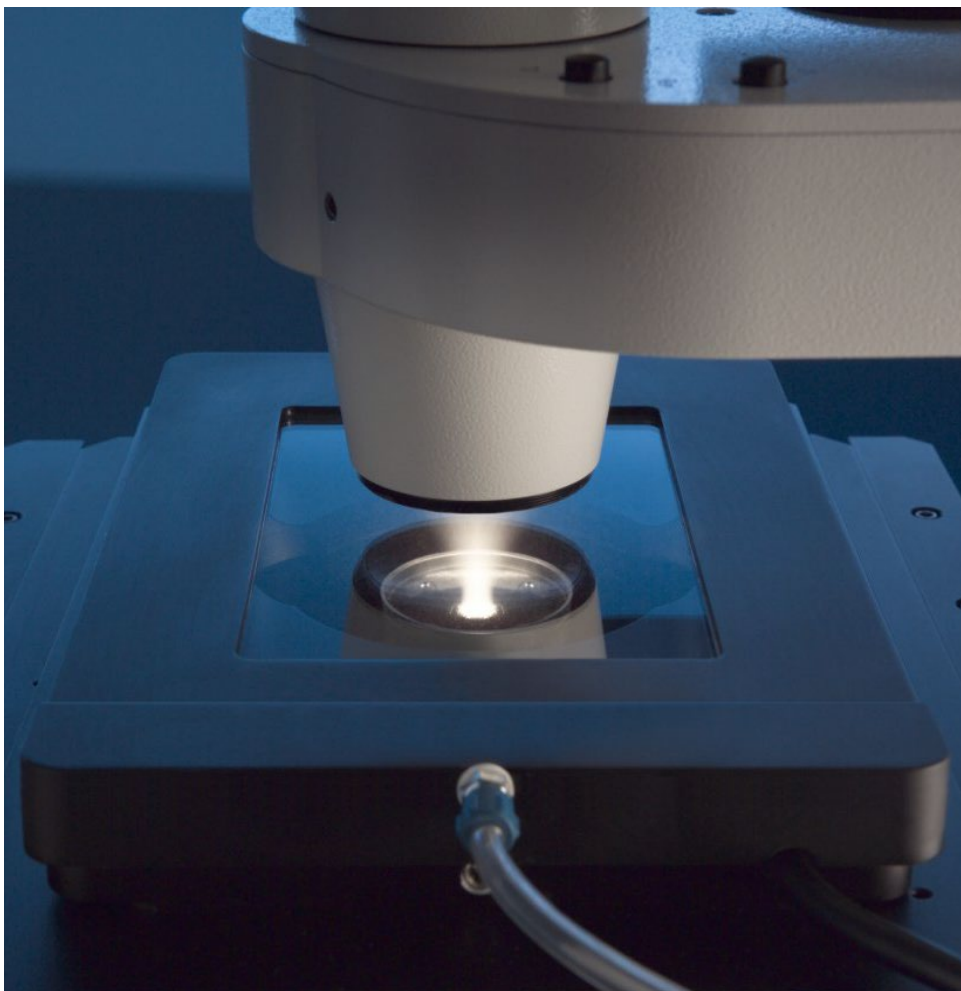
Figure 1

扩展功能：活细胞工作站 Incubator

一体化整合的活细胞工作站



加热保温装置



气体温度控制模块



扩展功能：超高分辨率成像

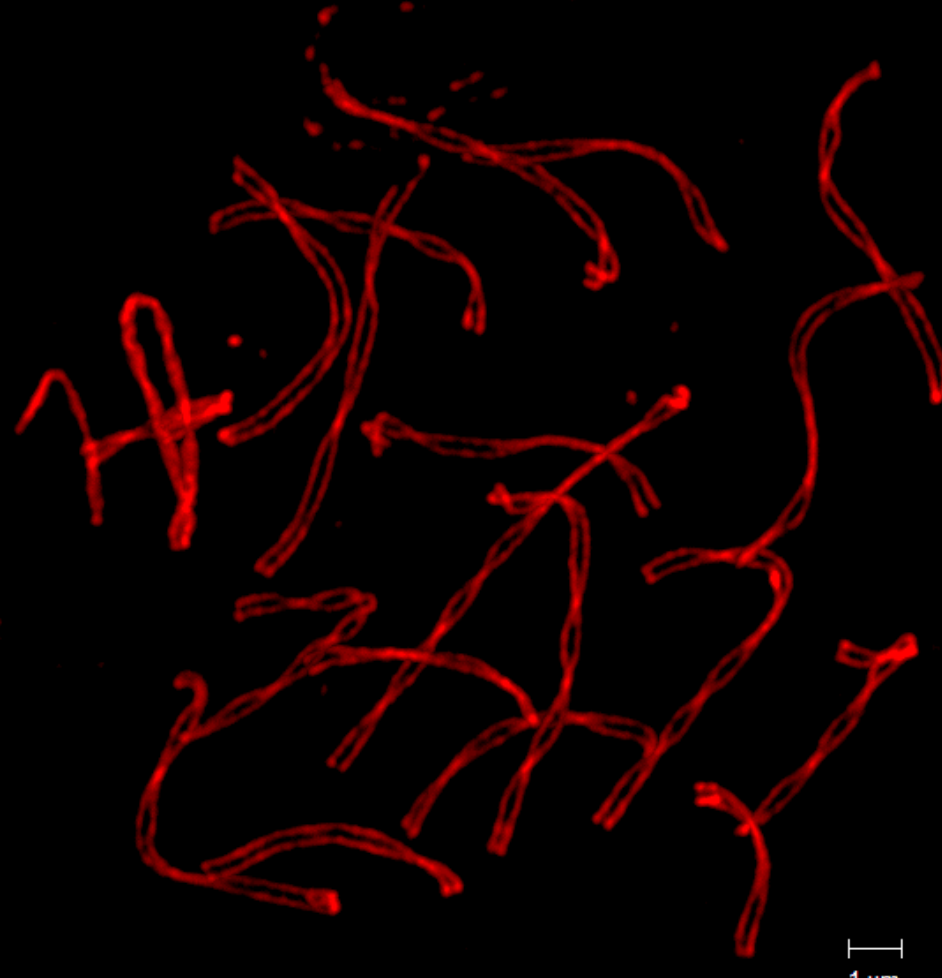
Airyscan



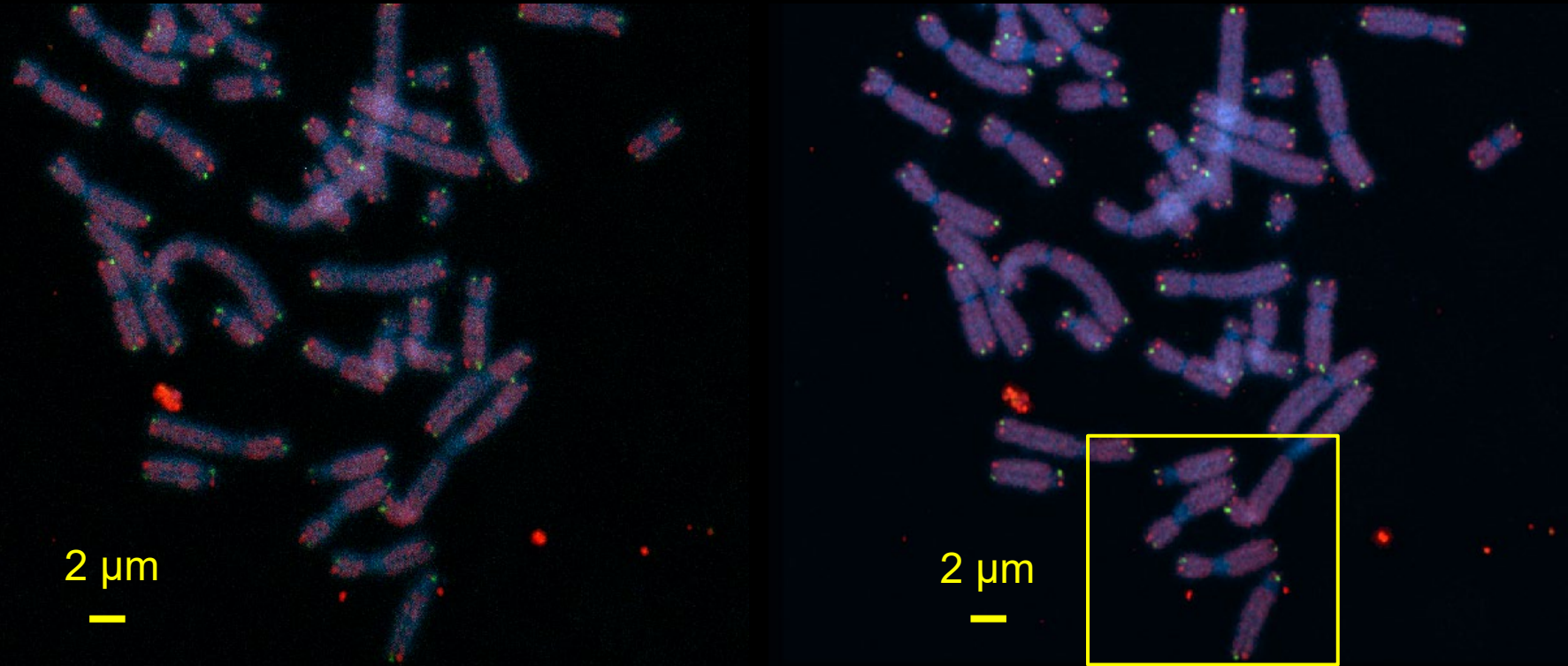
Confocal



Airyscan 2



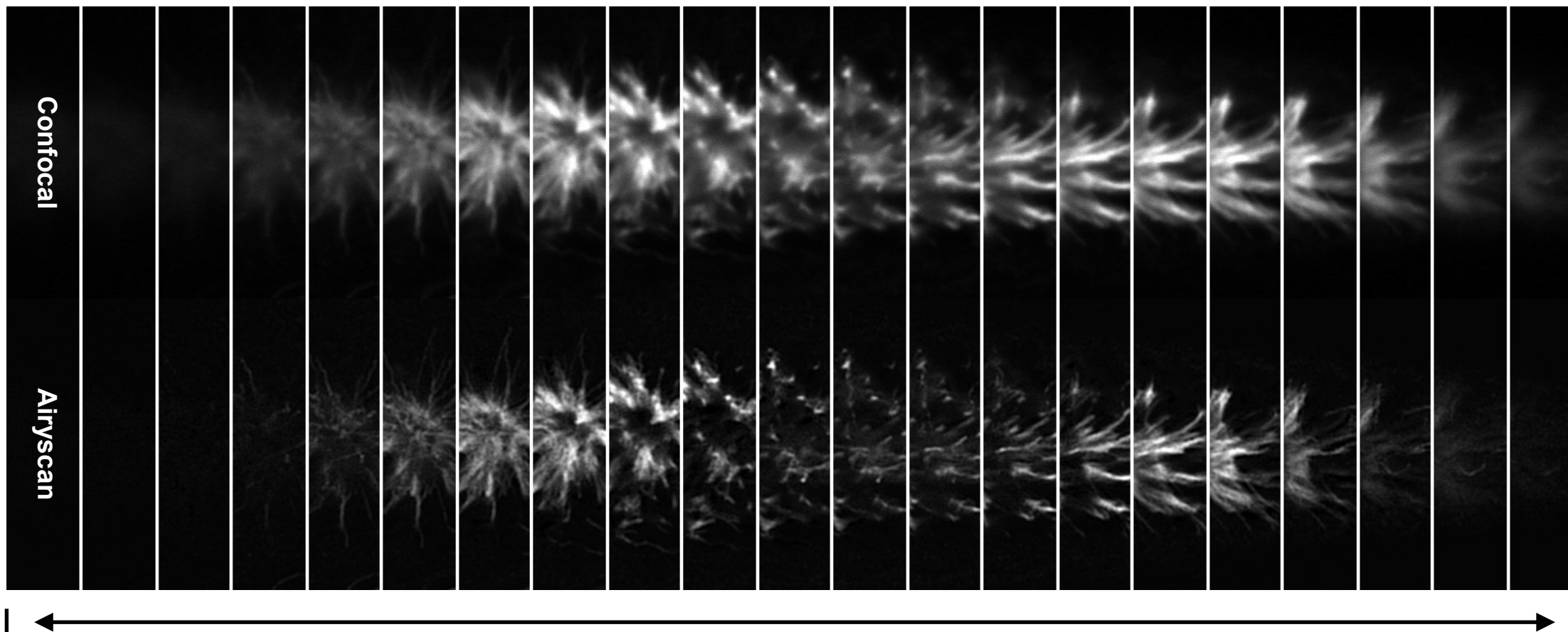
扩展功能：超高分辨率成像 Airyscan



Telomere replication without RTEL1: Stalled forks and telomere breakage visualized as doubled dots using Airyscan. Resolution is meaningless without good SNR.

扩展功能：超高分辨率成像

不仅提高平面分辨率而且提高纵向分辨率1.7倍



Z-stack: 3.98 μm ; 步进: 200 nm (Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil)
有丝分裂中的细胞微管蛋白

Airyscan jDCV

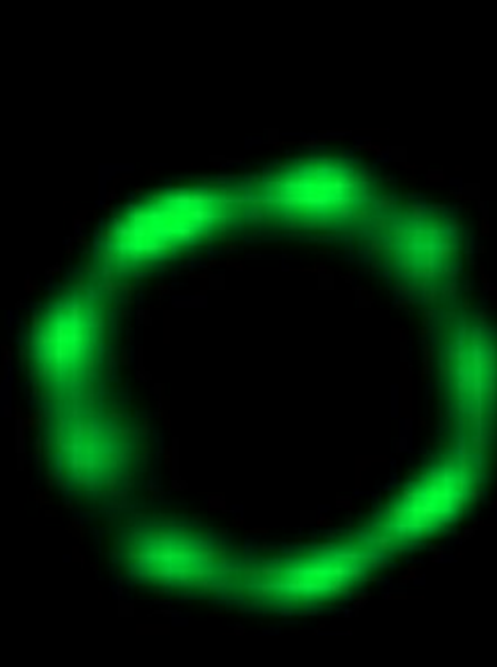
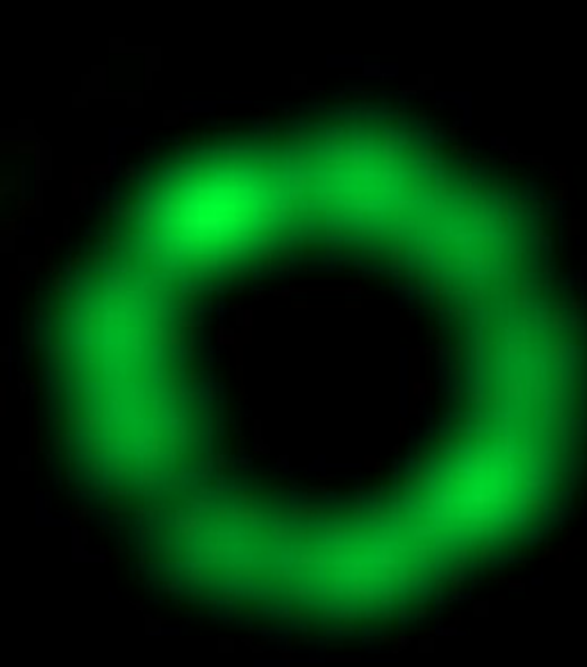
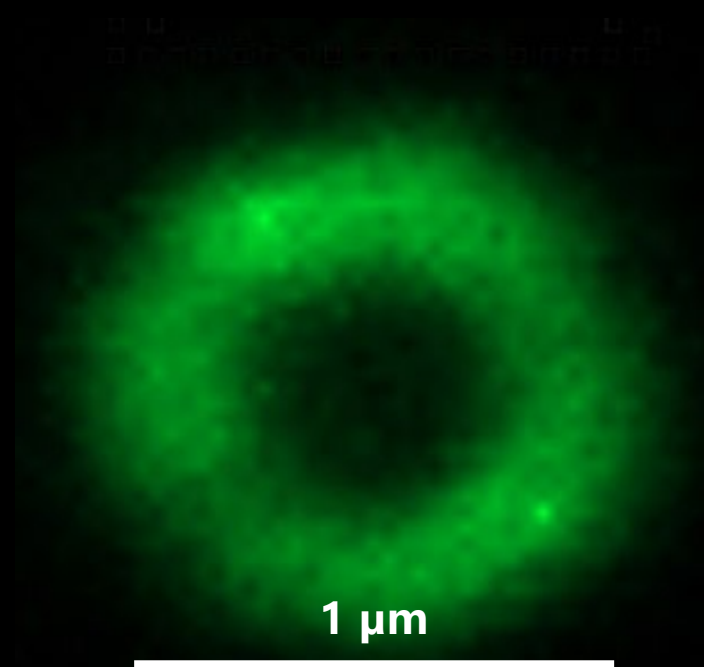
进一步提高Airyscan的分辨率



Confocal

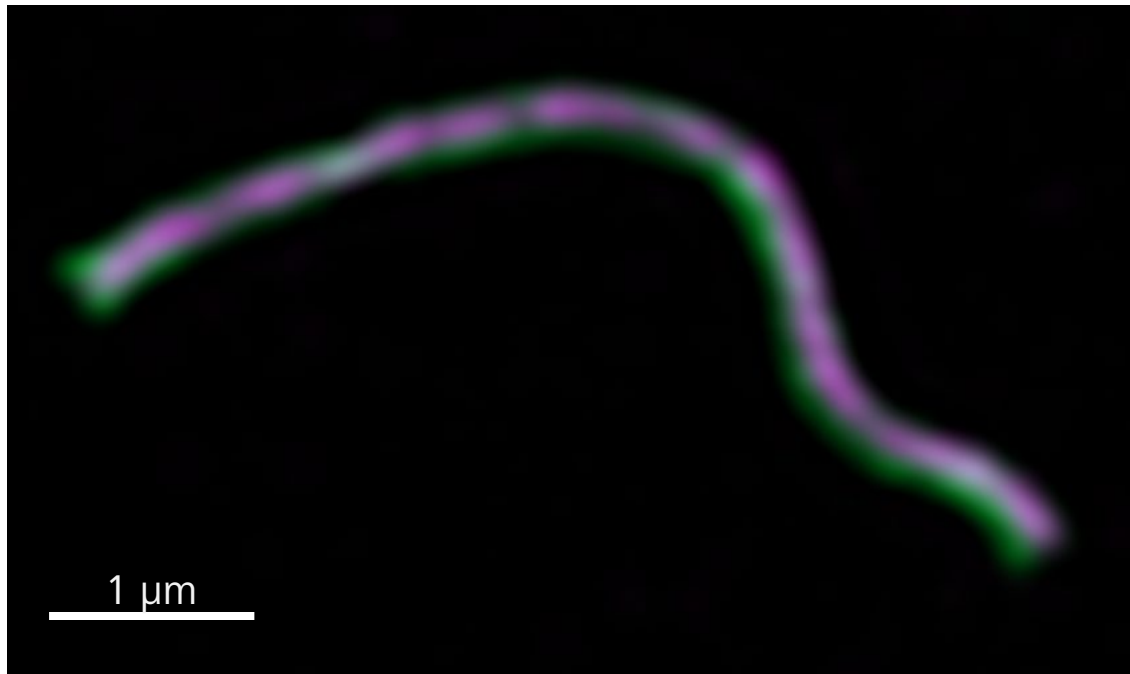
Airyscan SR

Airyscan jDCV

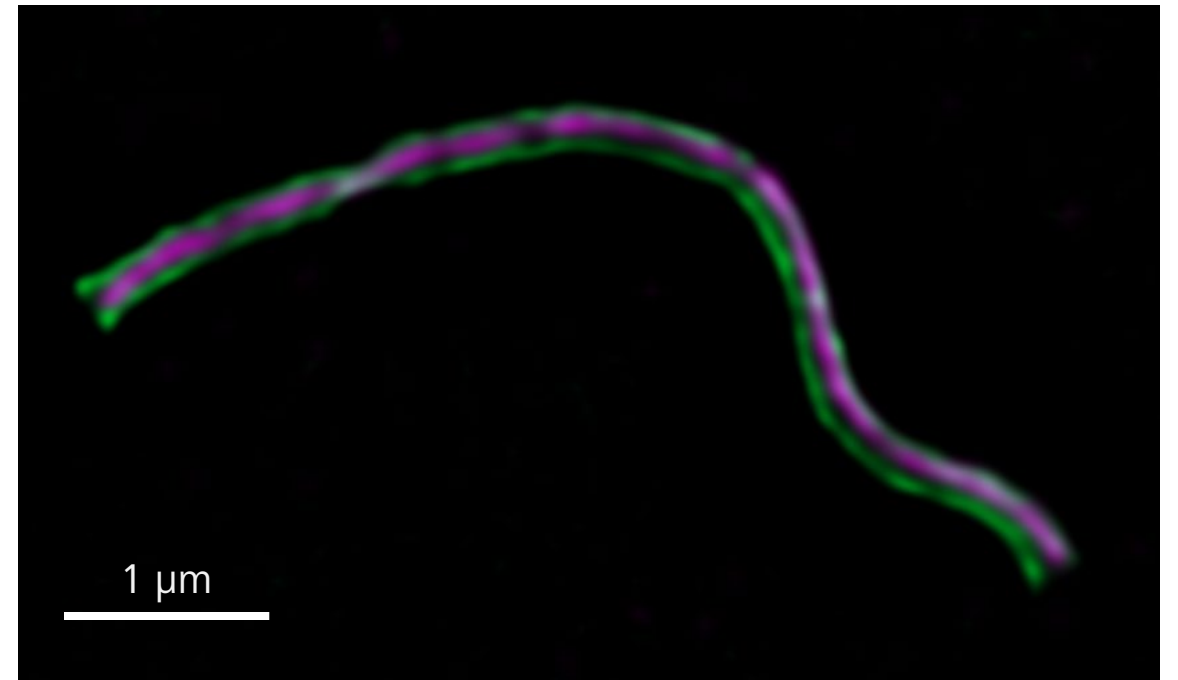


LSM 980: HeLa Cell, 4x expanded, Centriole structure with 9 elements

Airyscan SR



Airyscan jDCV



Visualization of synaptonemal complexes from a pachytene stage mouse spermatocyte. Sumit Sandhu and Neil Hunter, University of California, Davis.

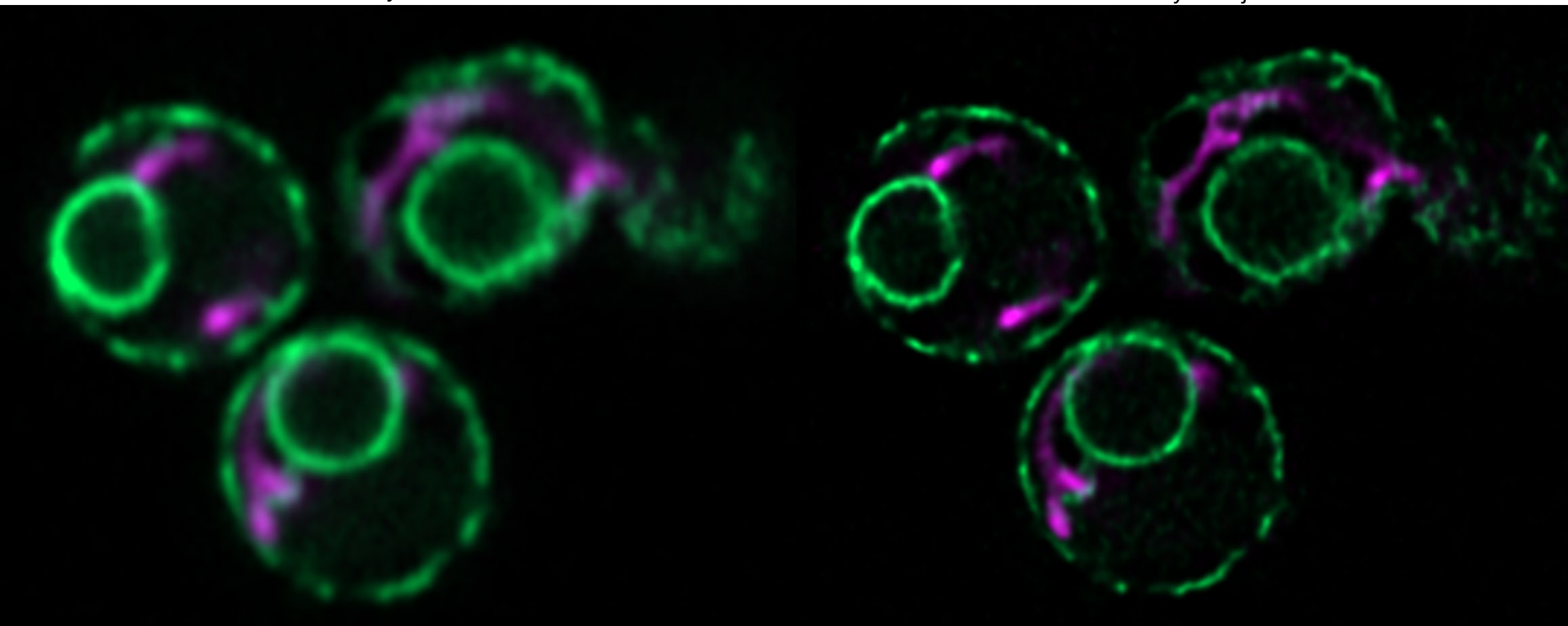
Airyscan jDCV

增强样品分辨率



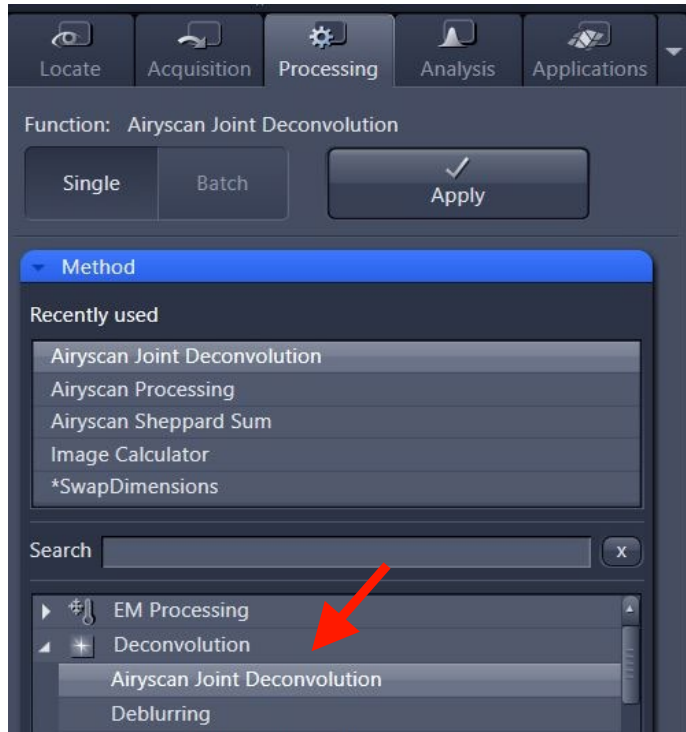
Airyscan SR

Airyscan jDCV

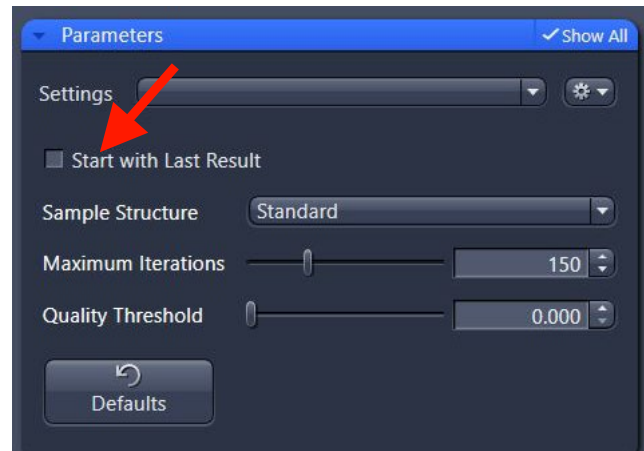
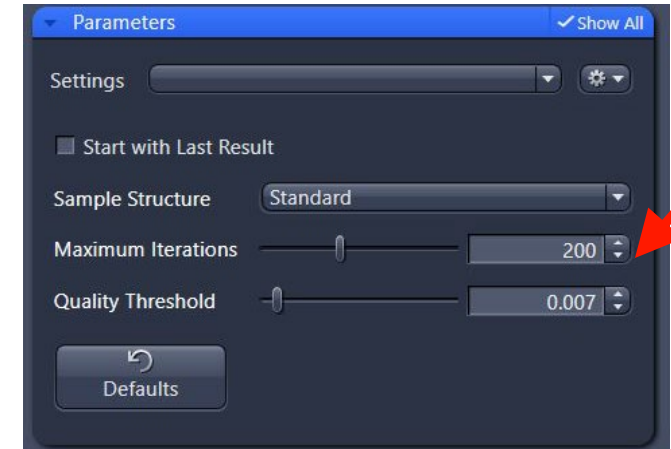
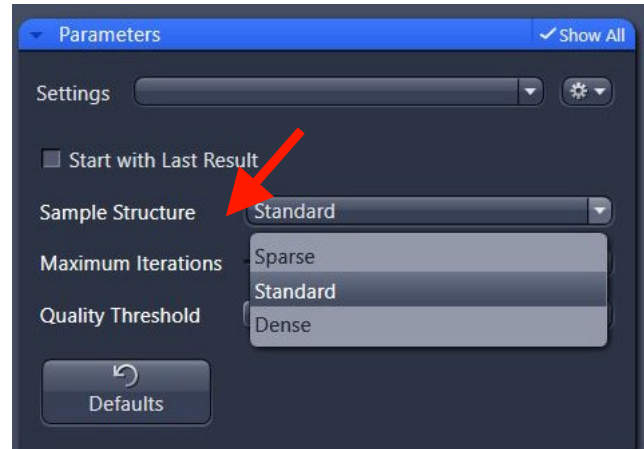


Airyscan jDCV

只需调节一个参数



Airyscan Joint Deconvolution 对 Airyscan SR模式拍摄的图像进行后处理，只需采用默认参数，或者手动设置迭代次数，即可完成图像处理。



如果初次处理迭代次数不足，可以保留结果，并且下一次迭代将从停止的地方继续，以节省时间。这就像手动逐步预览迭代进度。

或者，可以定义质量阈值，自动停止迭代。

01 激光共聚焦显微镜的应用范围

02 激光共聚焦显微镜的原理

03 激光共聚焦显微镜的光路部件

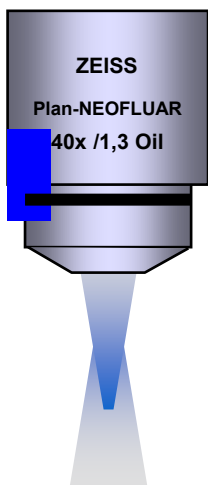
04 如何获取一张高质量的图像

05 样本制备建议

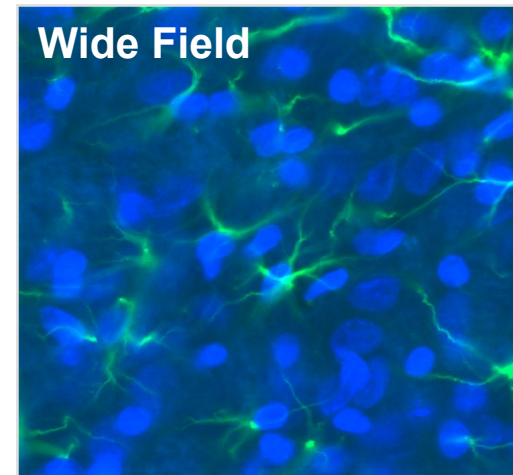
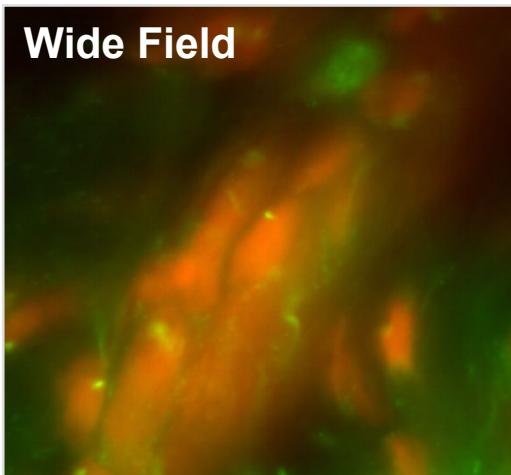
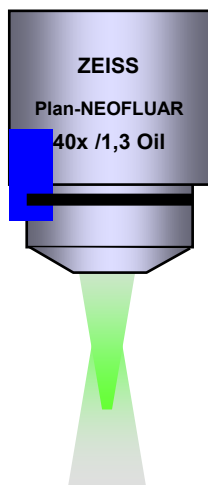
激光共聚焦显微镜 只检测焦平面信号



Excitation

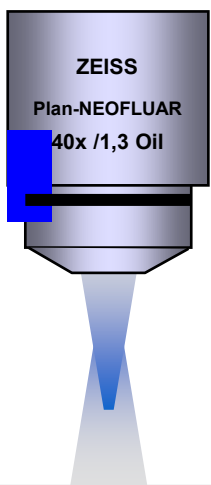


Emission

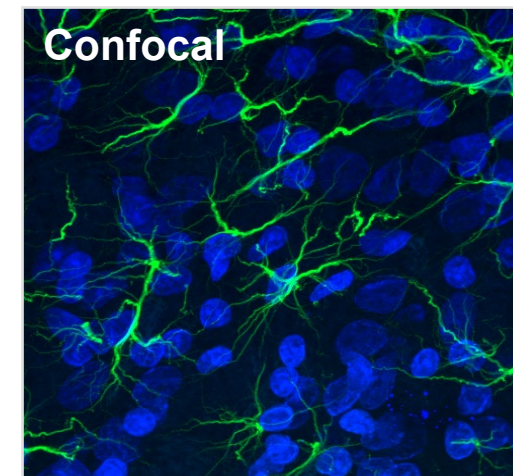
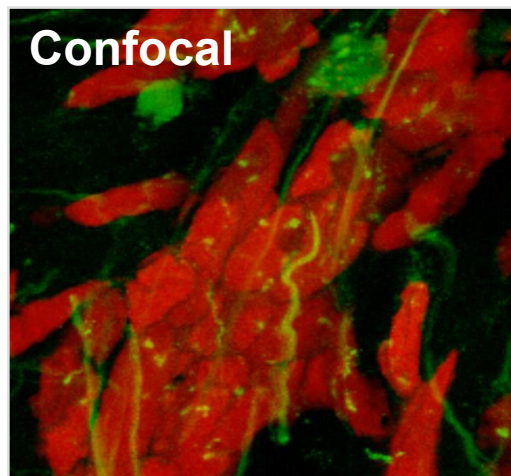
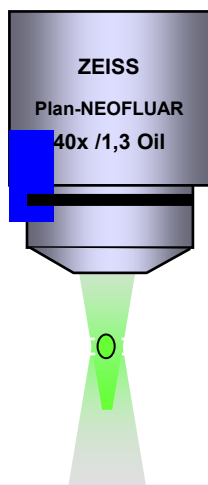


Problem:
Detecting in-focus information together with out-of-focus fluorescence signals in wide-field microscopy

Excitation



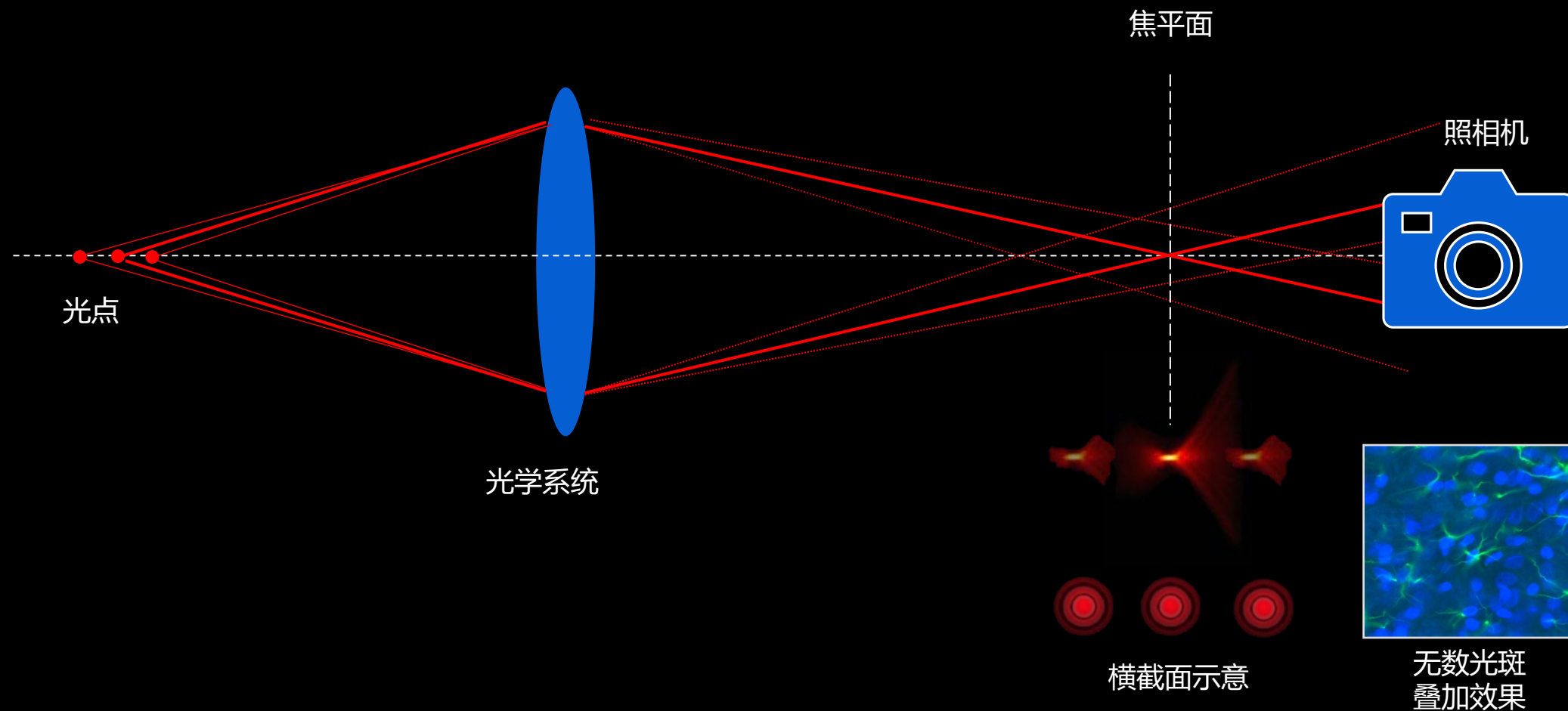
Emission



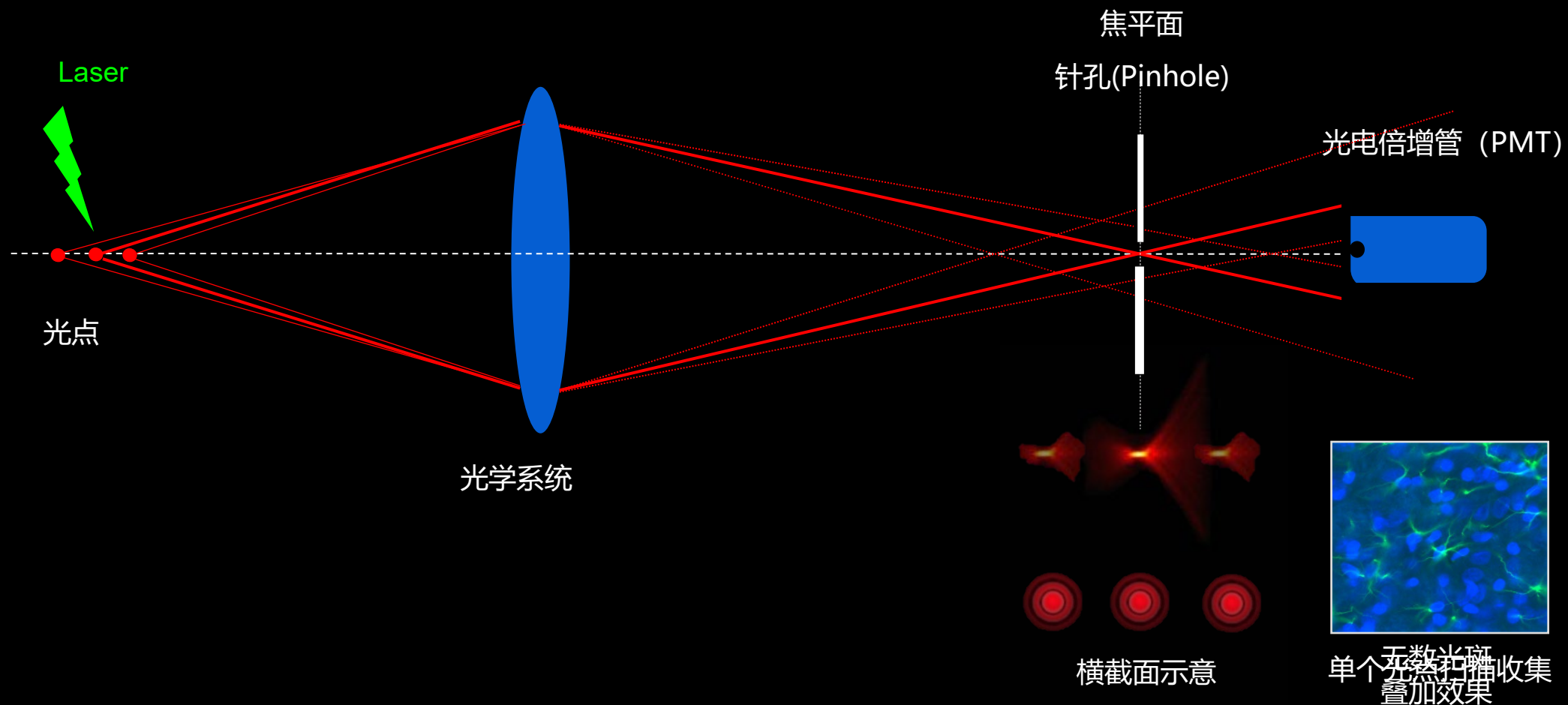
Only detect in-focus information

光学显微镜特性

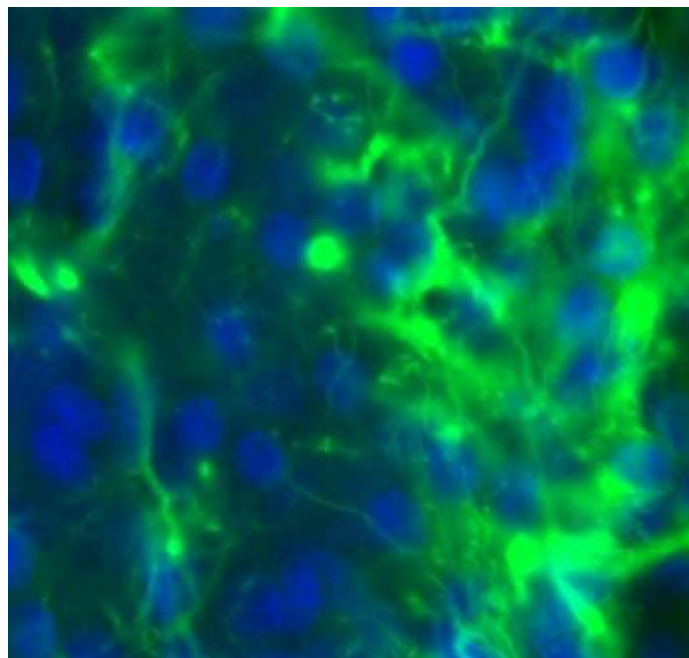
宽场荧光显微镜成像



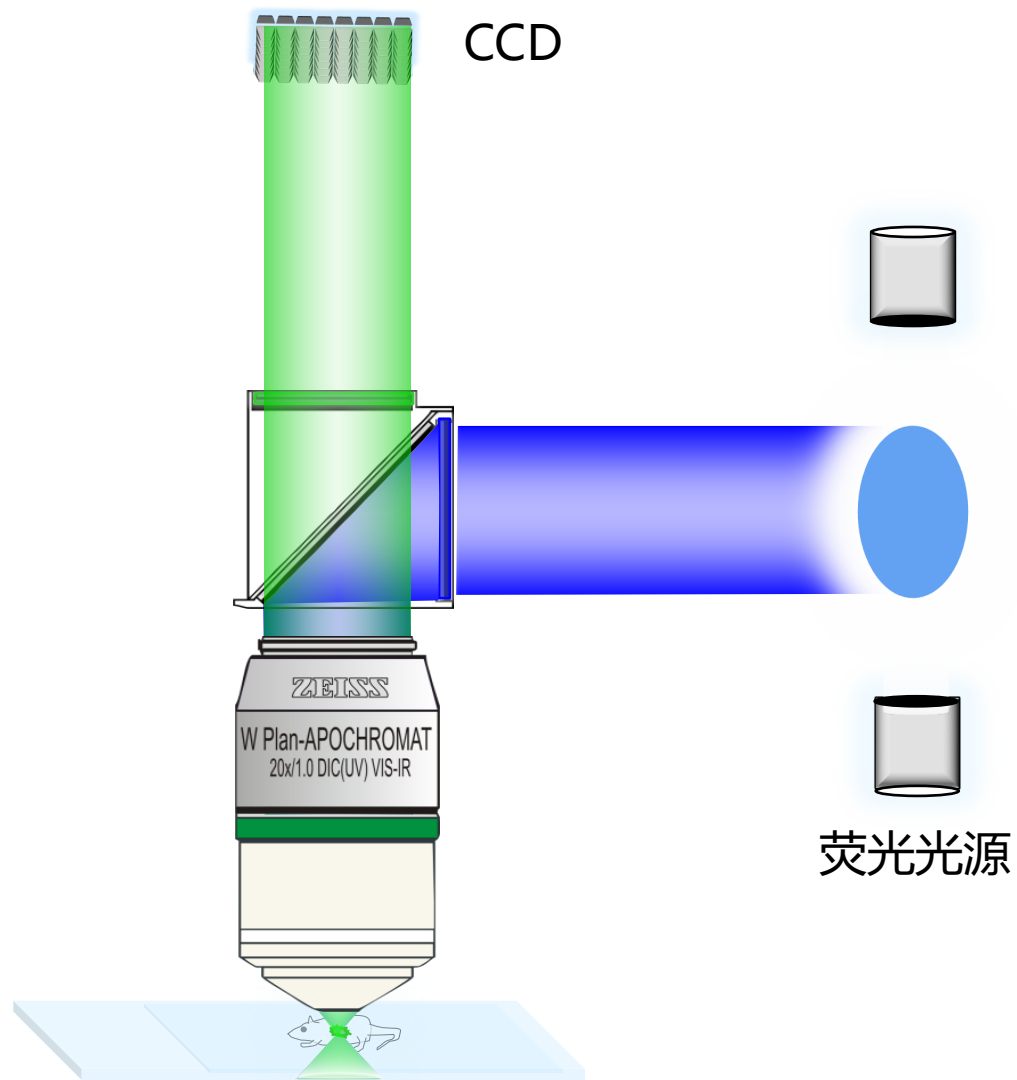
共聚焦显微镜成像



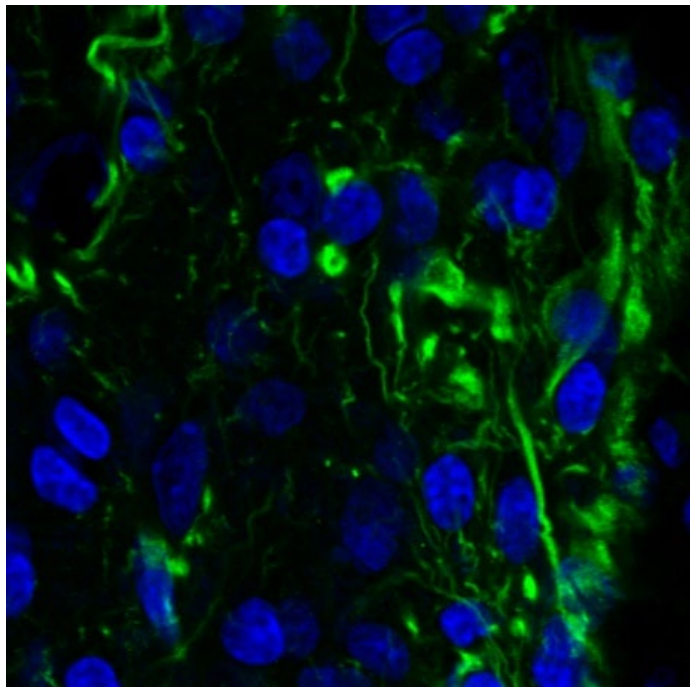
宽场荧光显微镜光路



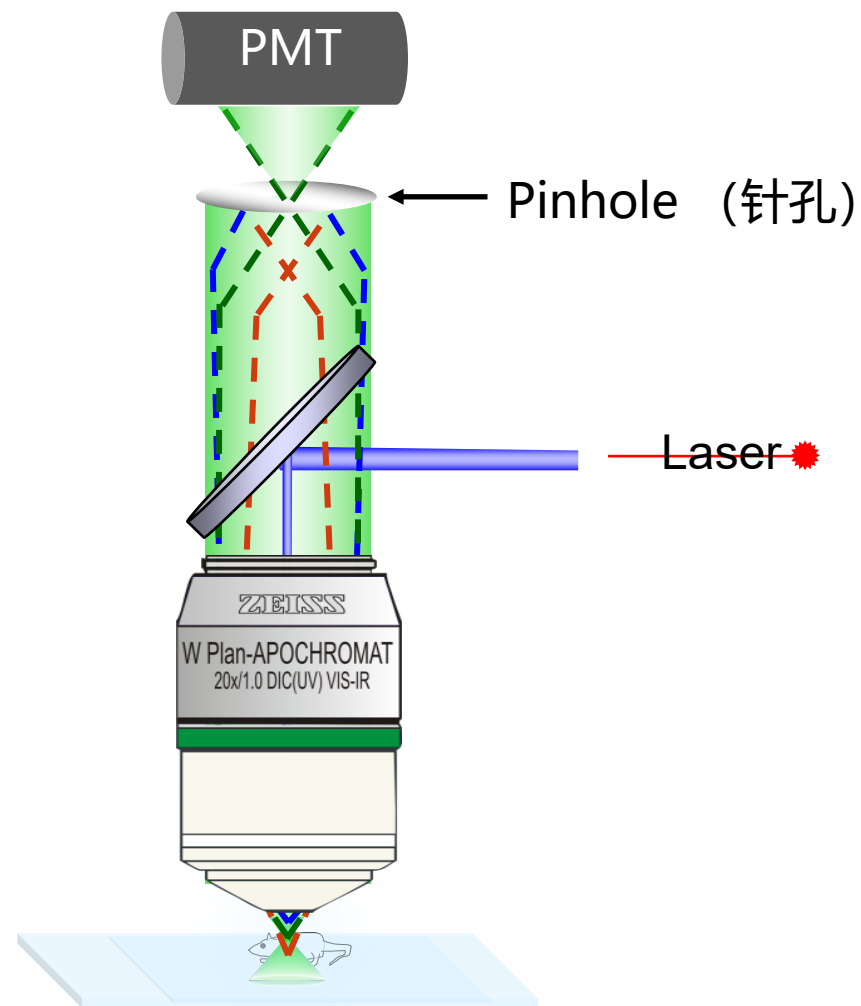
Rat Brain, Double labelling:
Green: Neurons, Blue: Nuclei



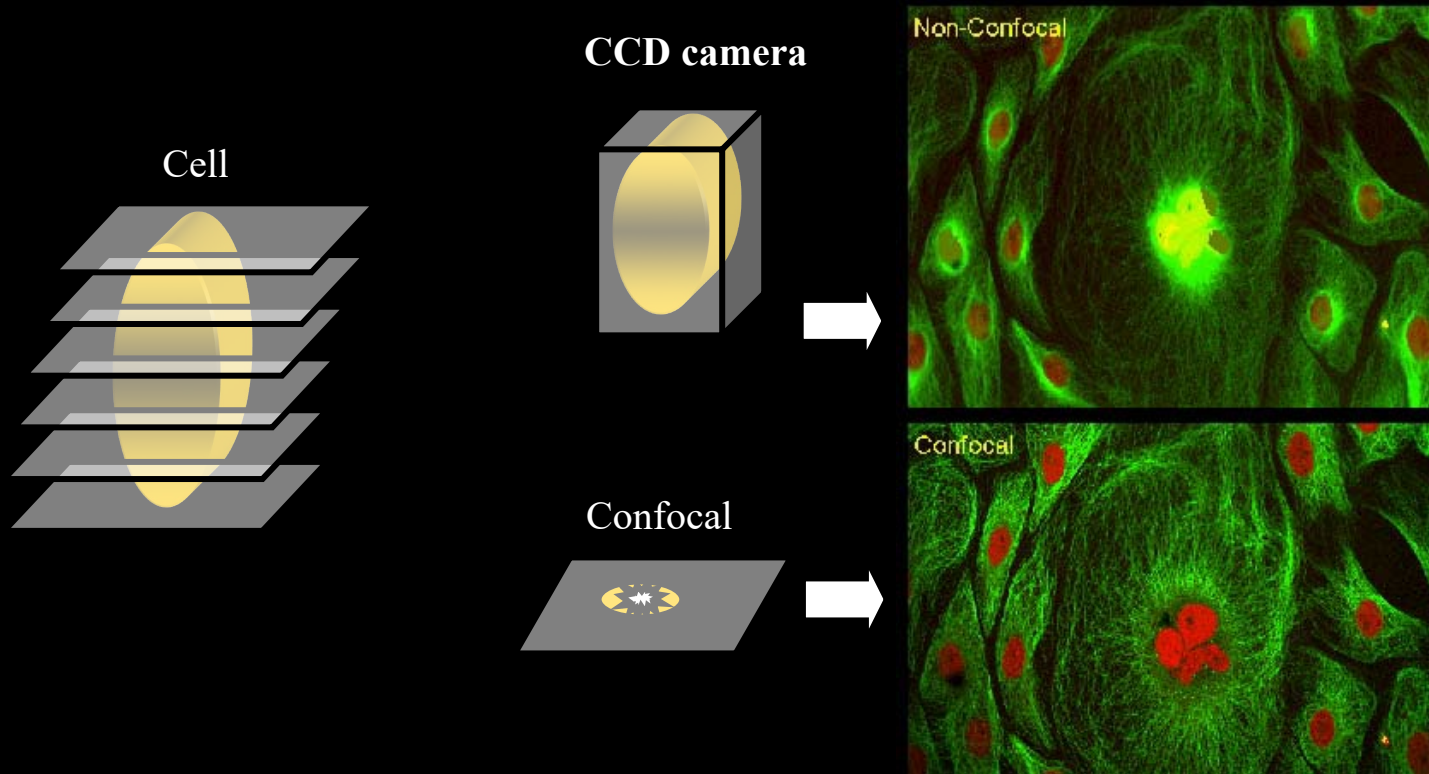
激光共聚焦显微镜光路



Rat Brain, Double labelling:
Green: Neurons, Blue: Nuclei



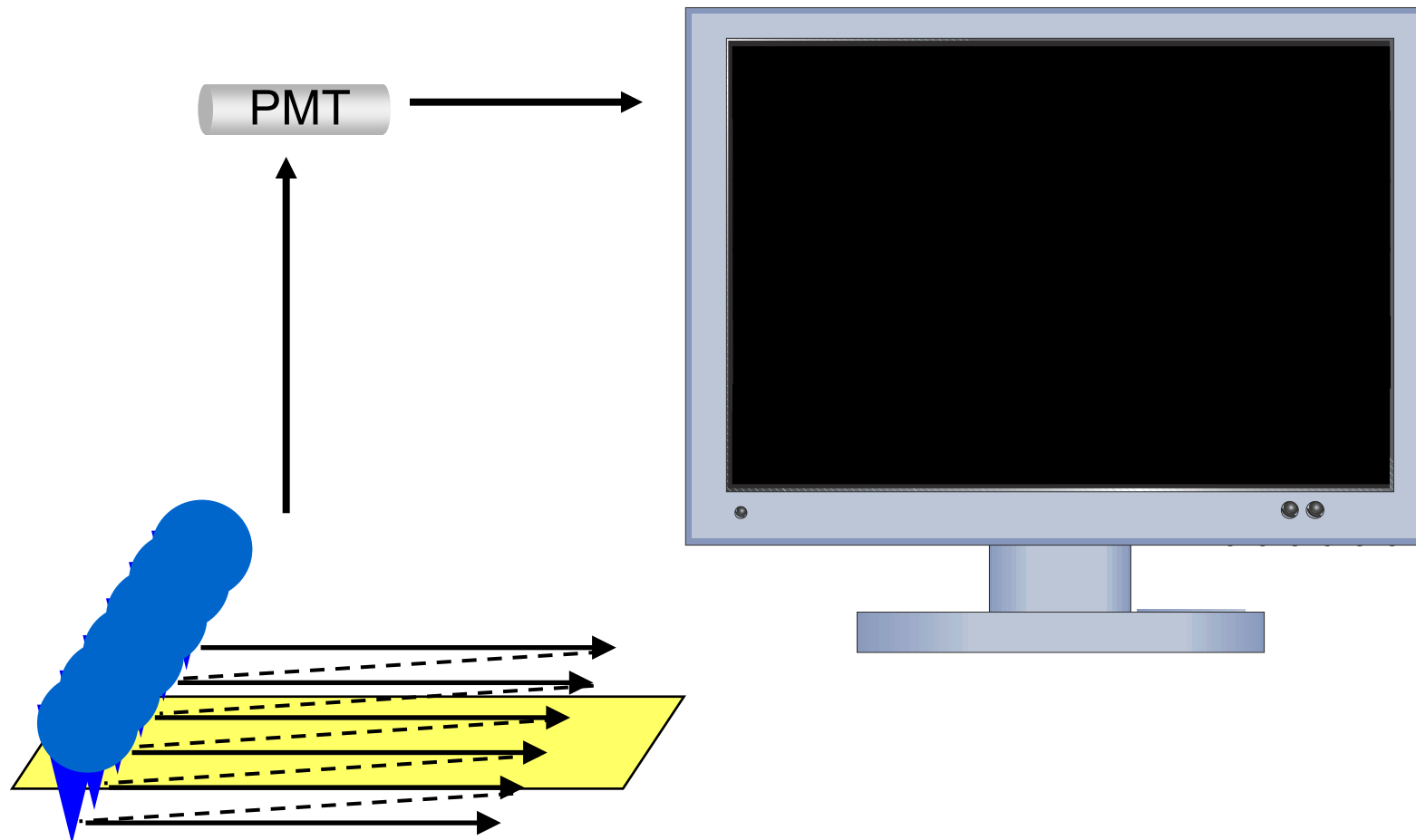
Confocal vs C-CCD: Optical Section



$$d \approx P n \lambda / (N.A.)^2$$

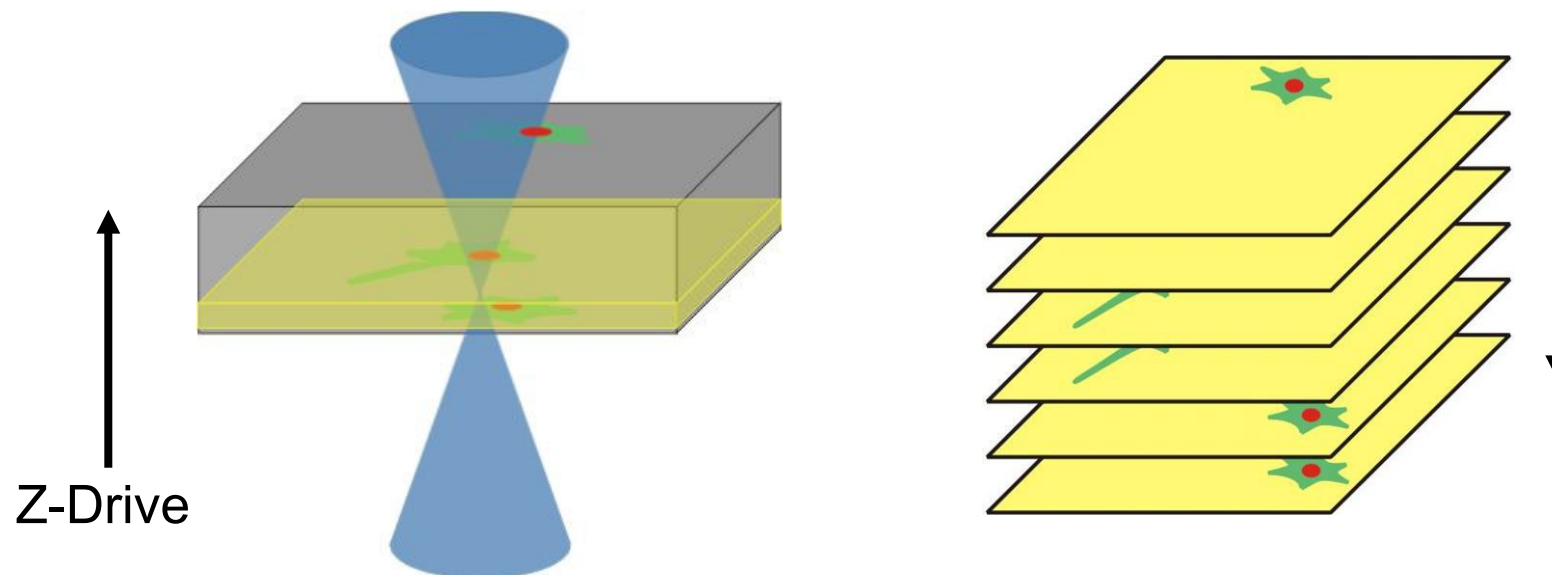
X-Y平面扫描方式

逐点扫描 点—线—面



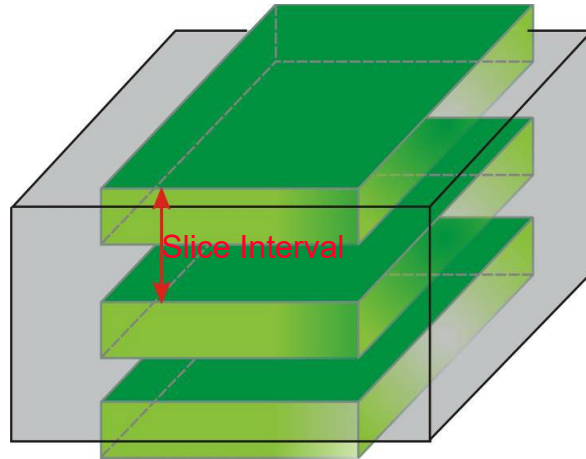
Z轴扫描方式 逐层扫描

How is a X/Y/Z Stack produced?

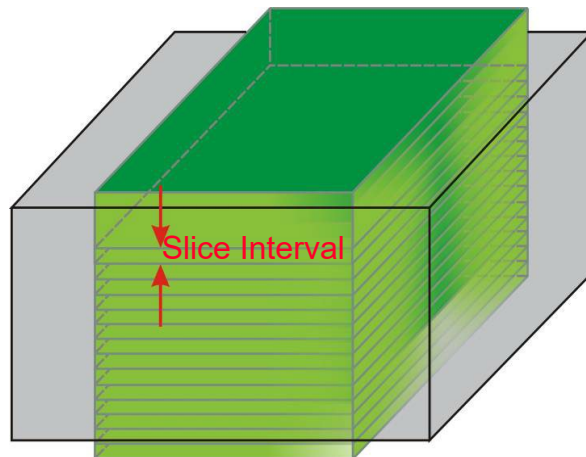


Optical Slice Thickness

Overlap between Optical Slices



With this setting, the object structures between the slices cannot be detected.



At very small intervals a lot of additional data without additional information is generated.

- 1 激光共聚焦显微镜的应用范围
- 2 激光共聚焦显微镜的原理
- 3 激光共聚焦显微镜的光路部件
- 4 如何获取一张高质量的图像

共聚焦原理

共聚焦显微镜的主体结构



共聚焦光路



宽场光路



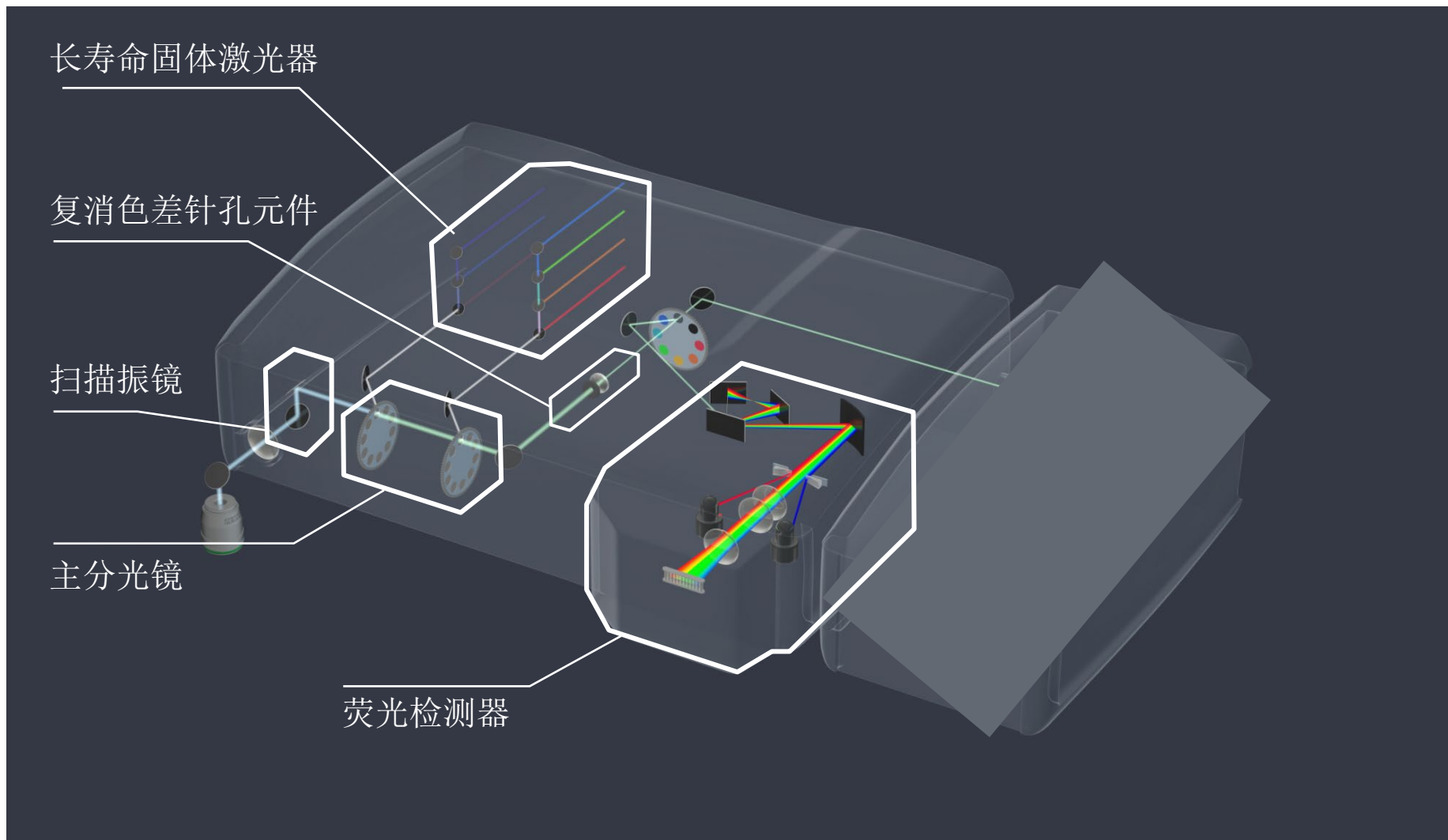
图像获取及软件分析



LSM 980 with Airyscan 2

LSM980 扫描图

共聚焦系统核心部件



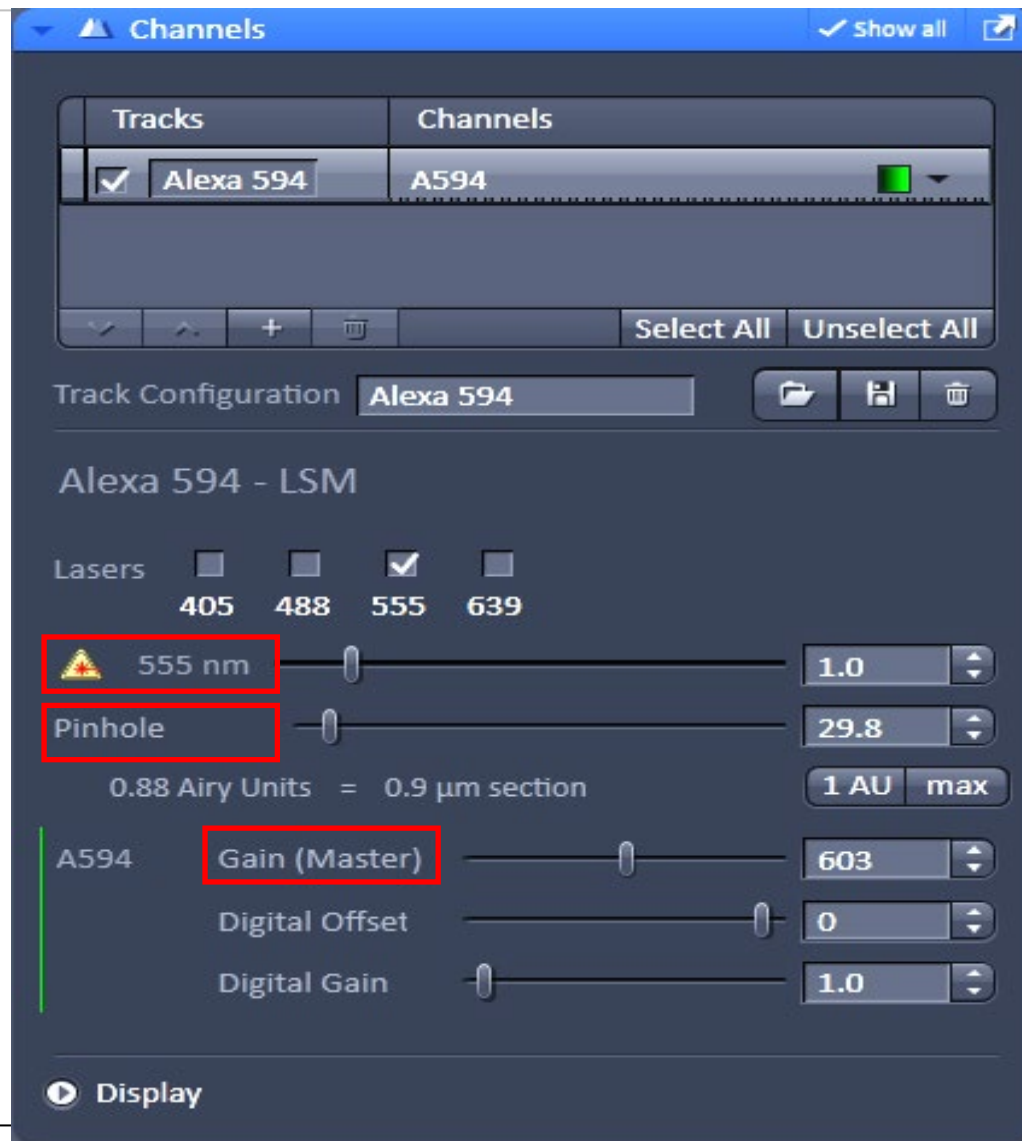
获取一张好的图片，需要关注.....

激光 针孔 PMT



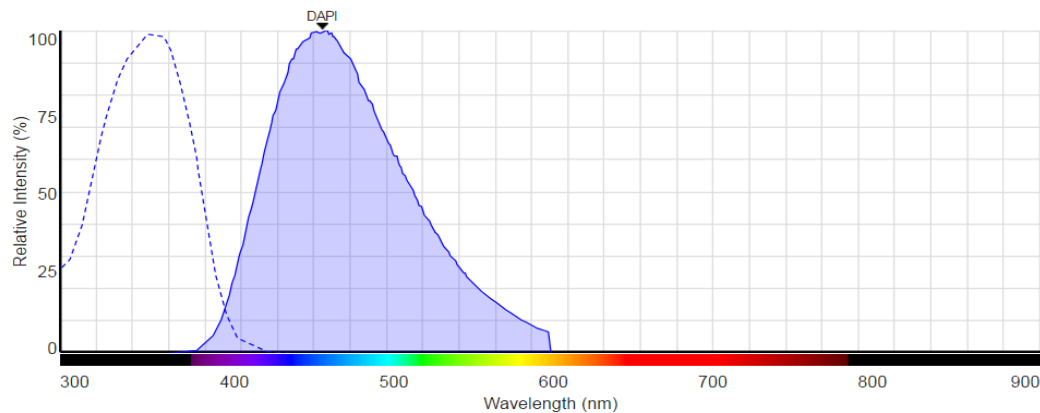
The main tools are:

- Laser power
- Pinhole
- PMT (Gain)

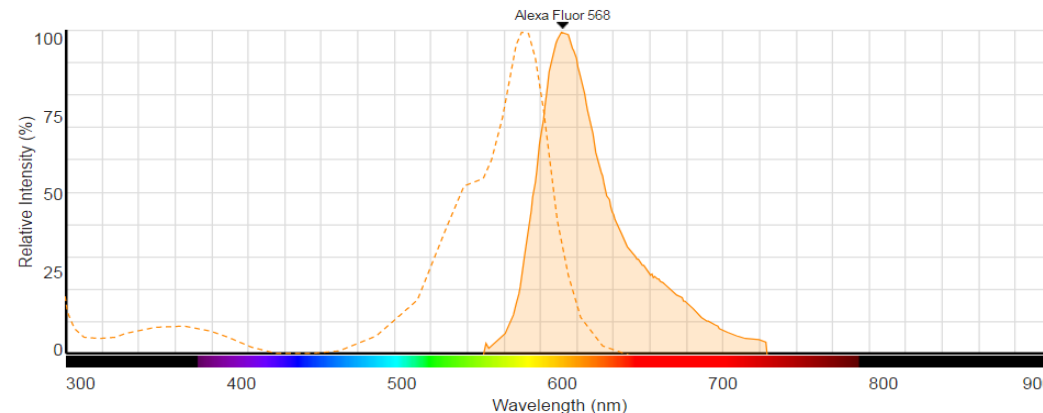


激光

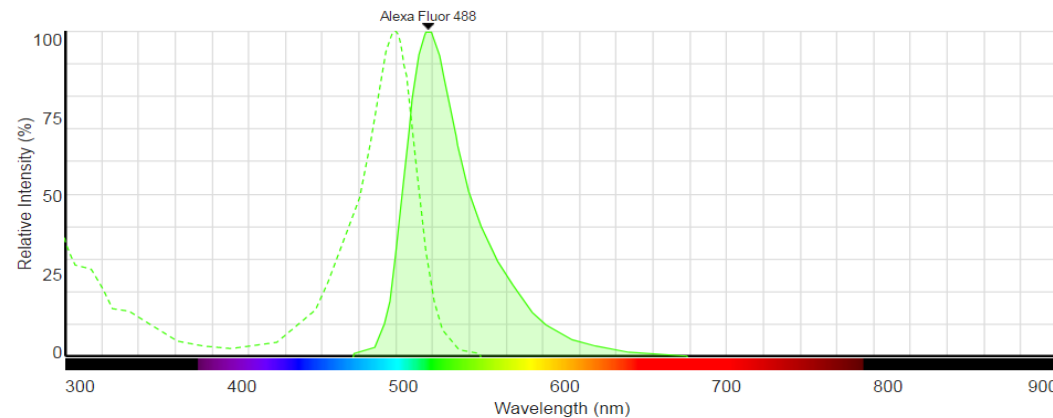
颜色：选择与荧光基团匹配的激光



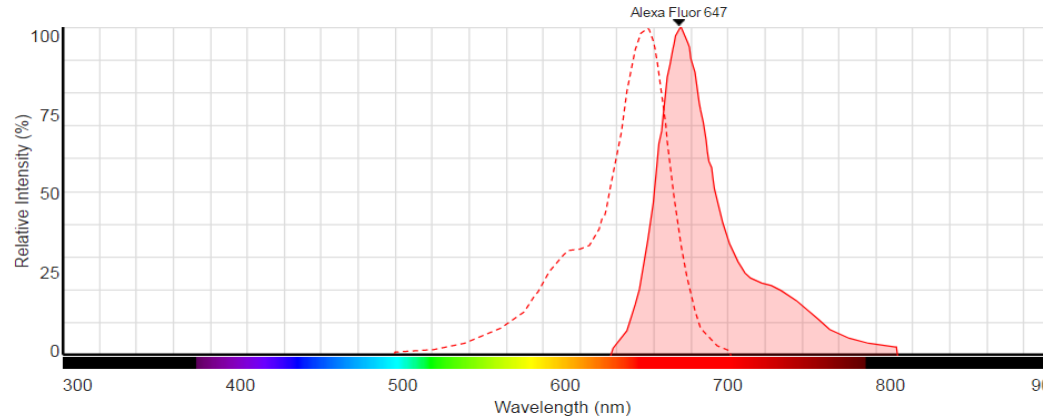
405 nm DAPI / Hoechst



561nm RFP / Alexa Fluor 568 / Cy3
594nm Alexa Fluor 594



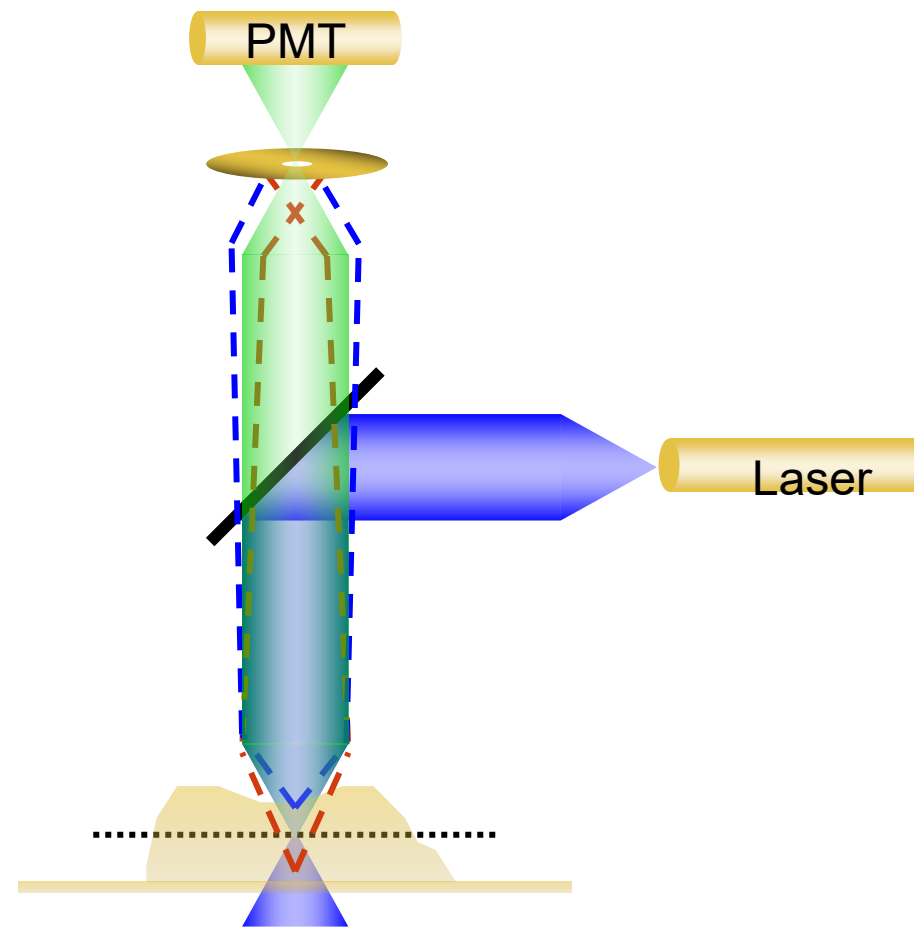
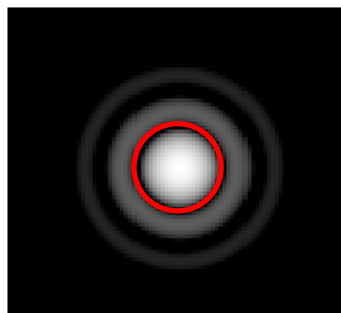
488nm GFP / Alexa Fluor 488 / FITC



640nm Alexa Fluor 647 / Cy5

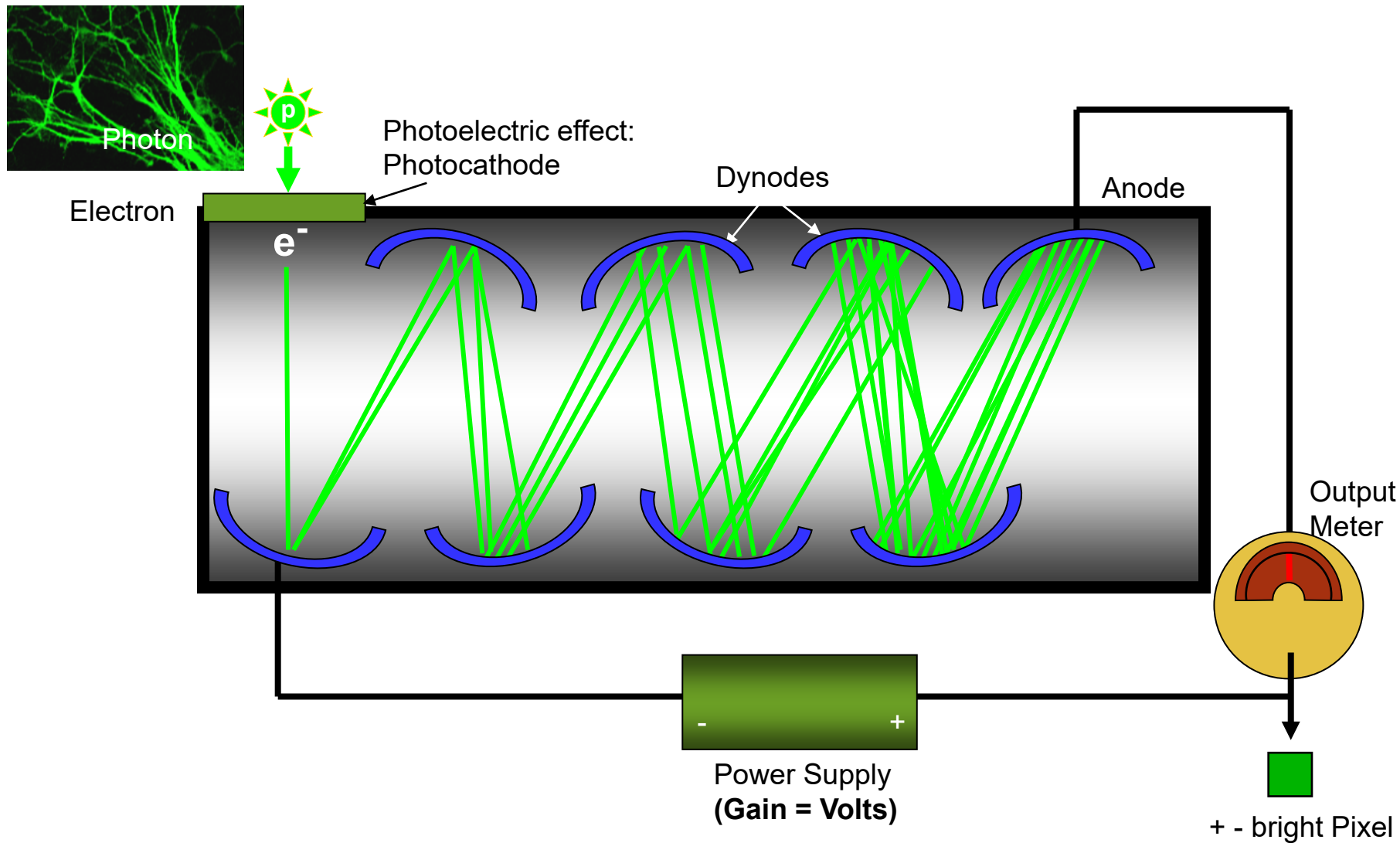
- 屏蔽非焦平面信号
 - 针孔增加，光通量增加，非焦平面信号增加
 - 针孔减小，光通量减小，非焦平面信号减小
- 影响光切厚度
 - 针孔增加，光切厚度增大，Z轴分辨率变差
 - 针孔减小，光切厚度减小，Z轴分辨率增加

一般情况，针孔大小为1AU



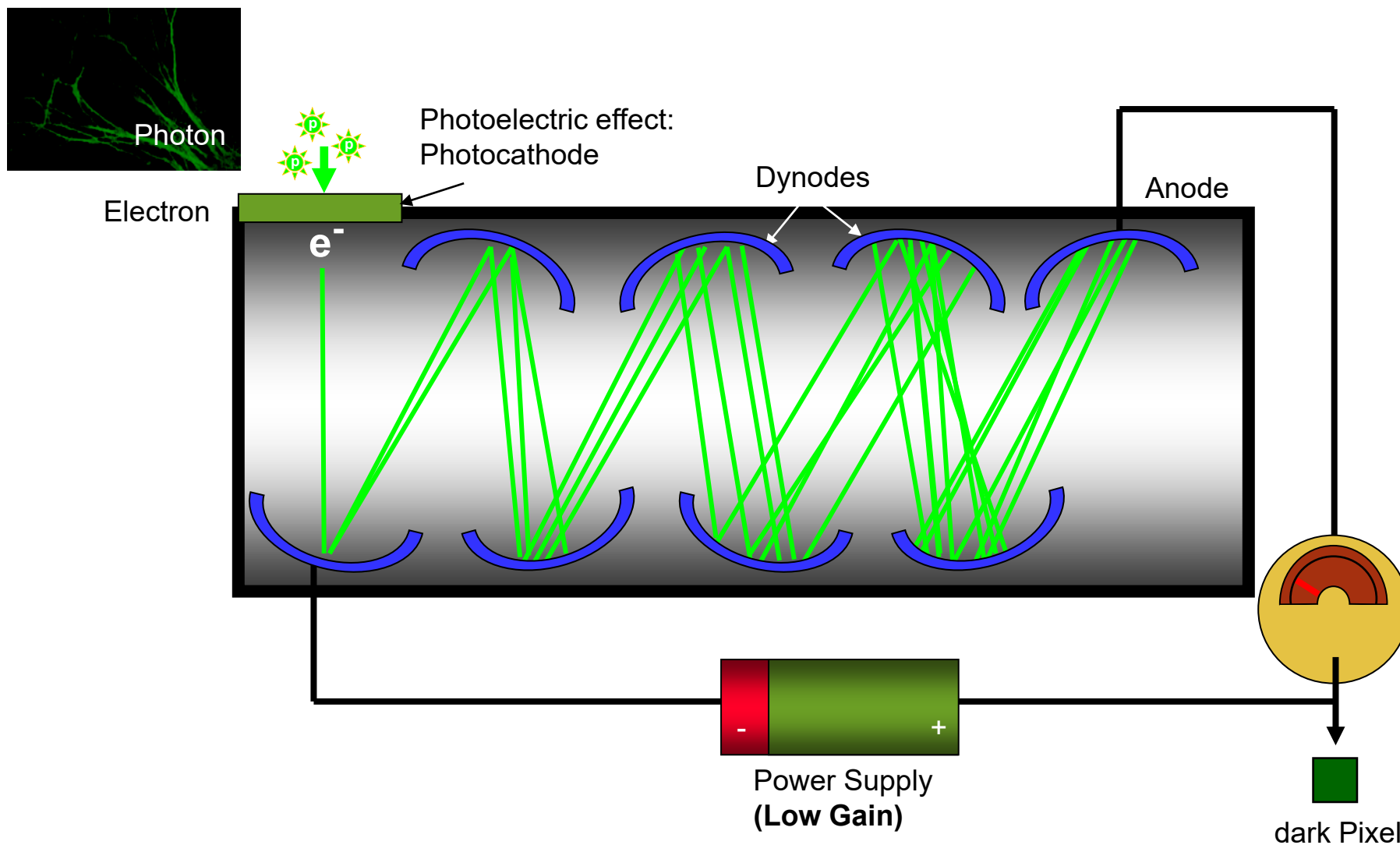
LSM 980的光路与配置

PMT工作原理



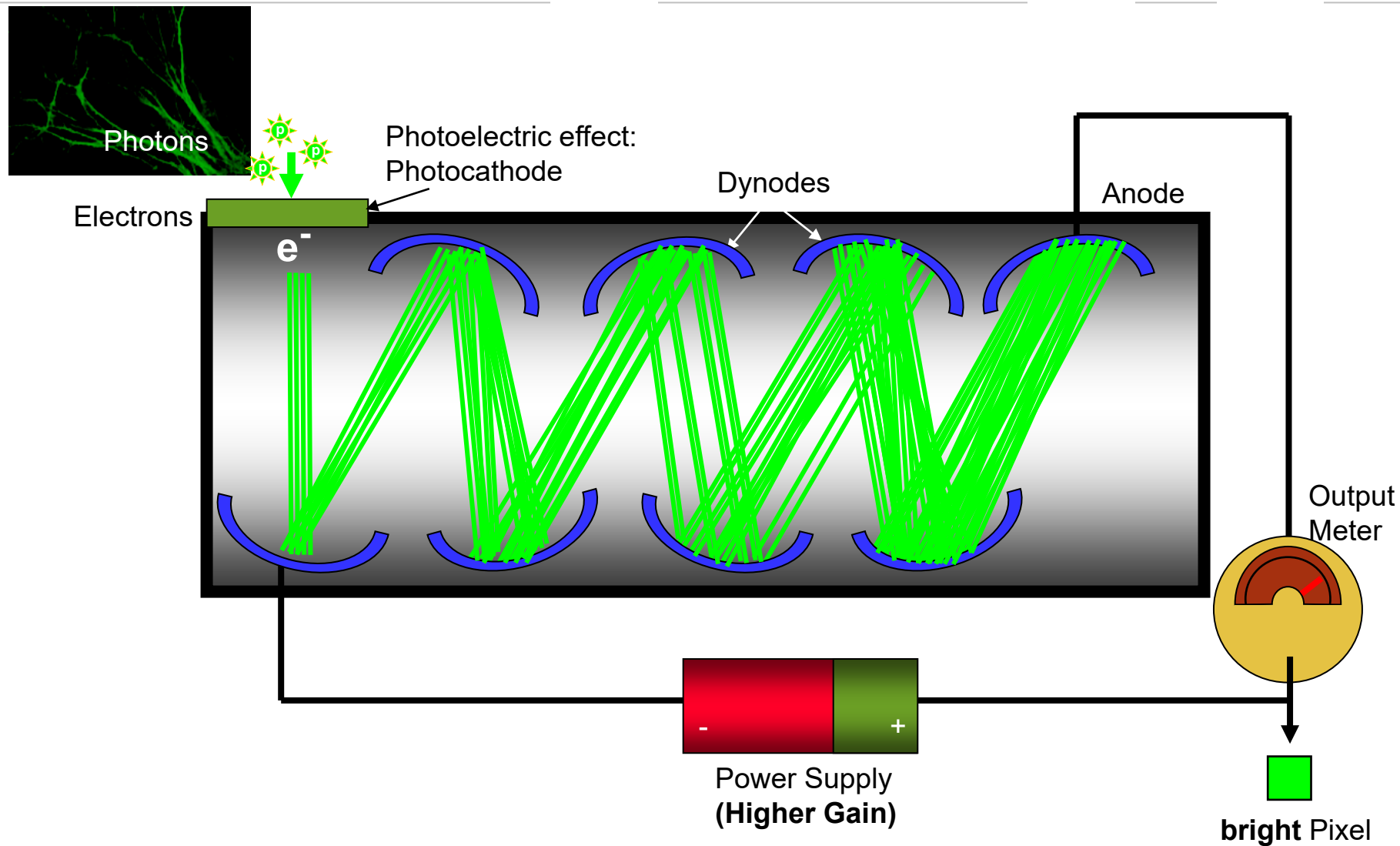
LSM 980的光路与配置

样本暗，检测不到信号



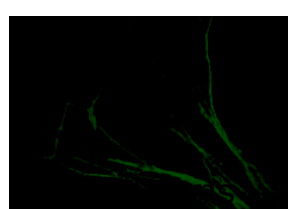
LSM 980的光路与配置

样本暗+适宜Gain, 检测到亮图像信号

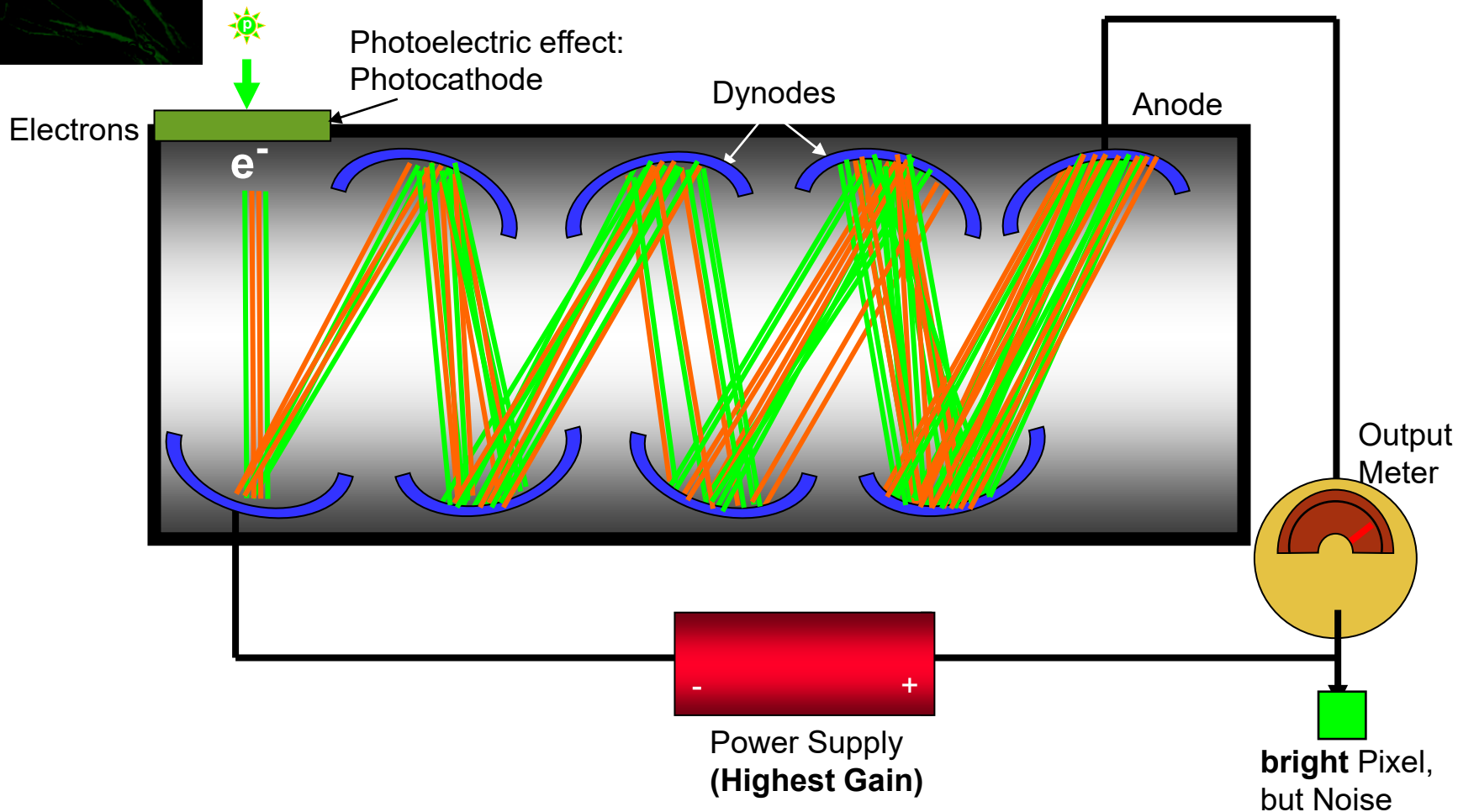


LSM 980的光路与配置

样本暗+超级高Gain, 检测到噪音信号

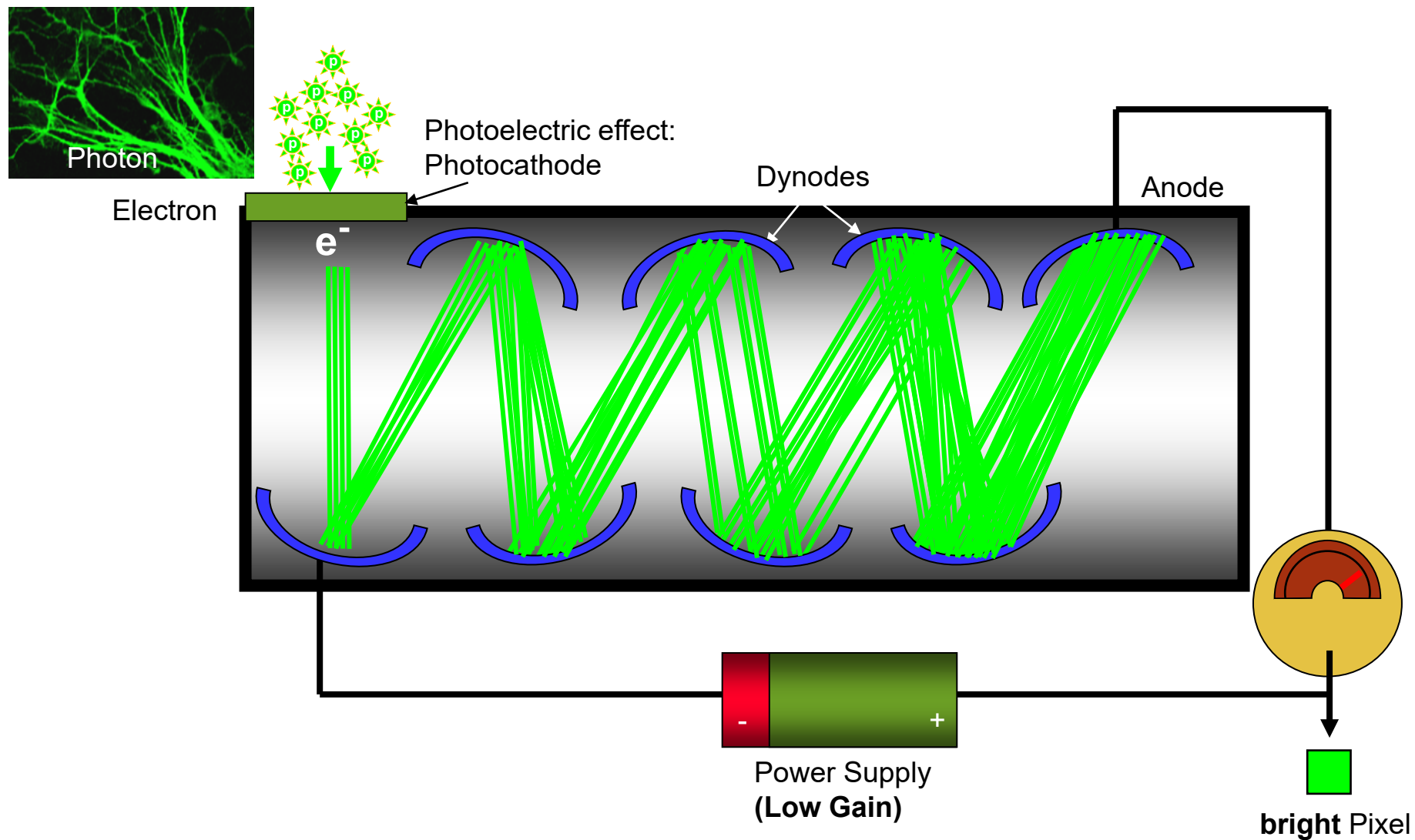


Red lines indicate electrons that were generated but have not come from the photons within the sample



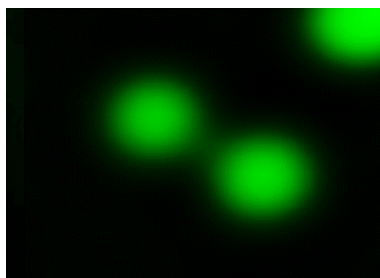
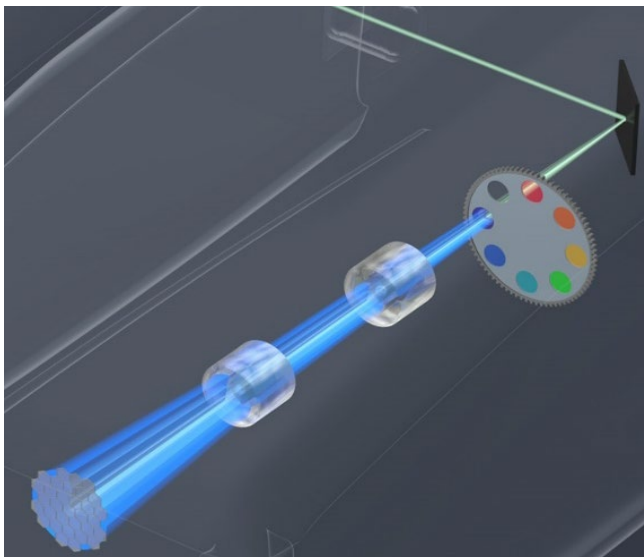
LSM 980的光路与配置

样本亮，检测到亮图像信号



Airyscan, More than just a confocal

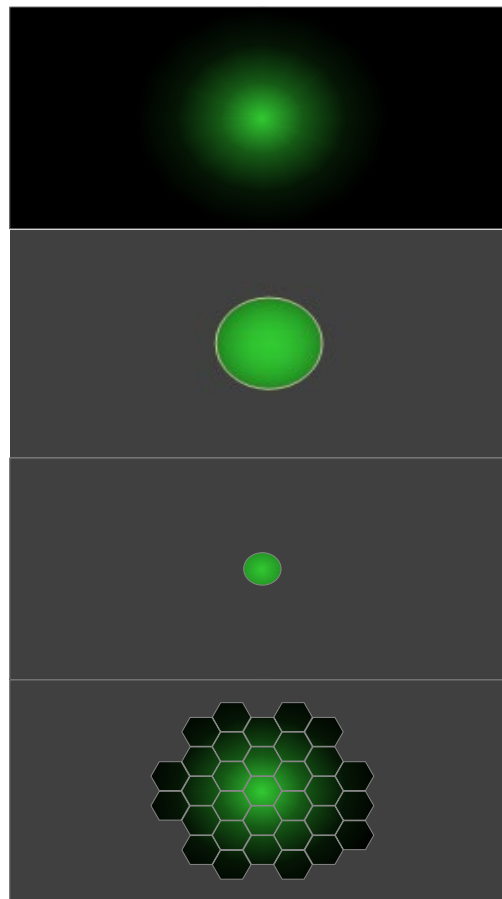
Airyscan, 不止于共聚焦



Airyscan检测

信噪比提升4~8倍

分辨率提升>1.7倍
($<120\text{nm}$)



信号光斑

共聚焦检测

(pinhole: 1.0 AU)
为达到最佳光学切面效果

共聚焦检测

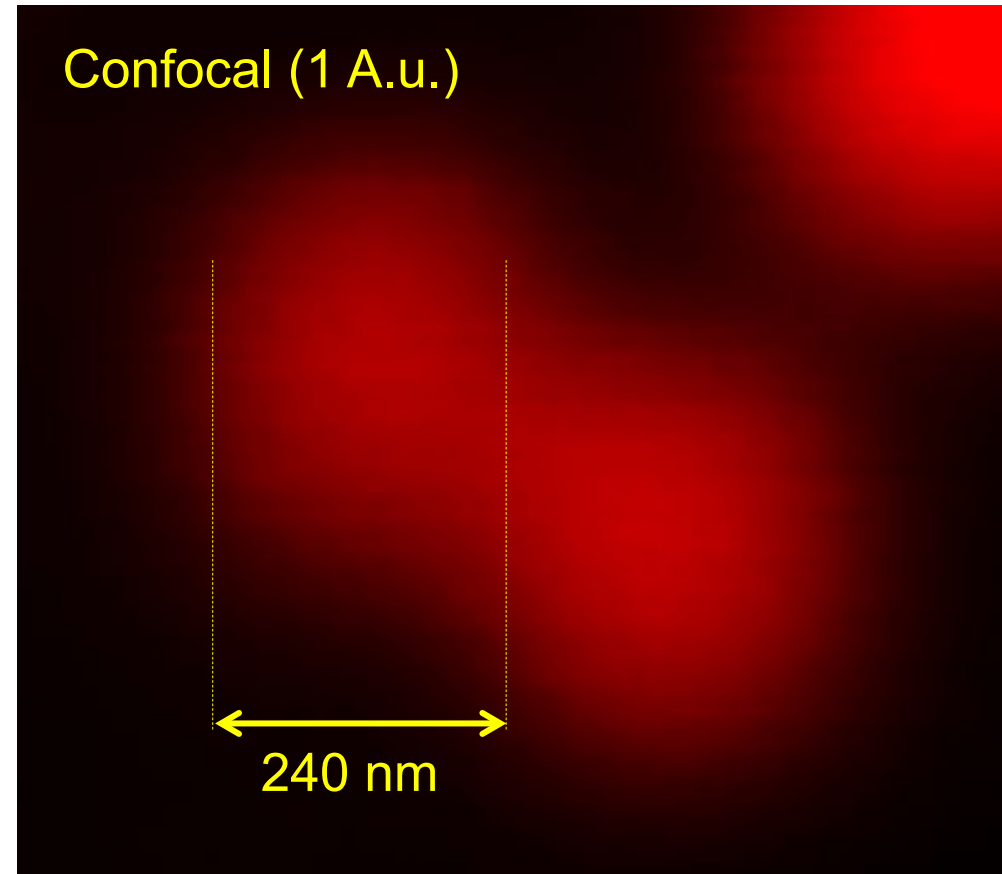
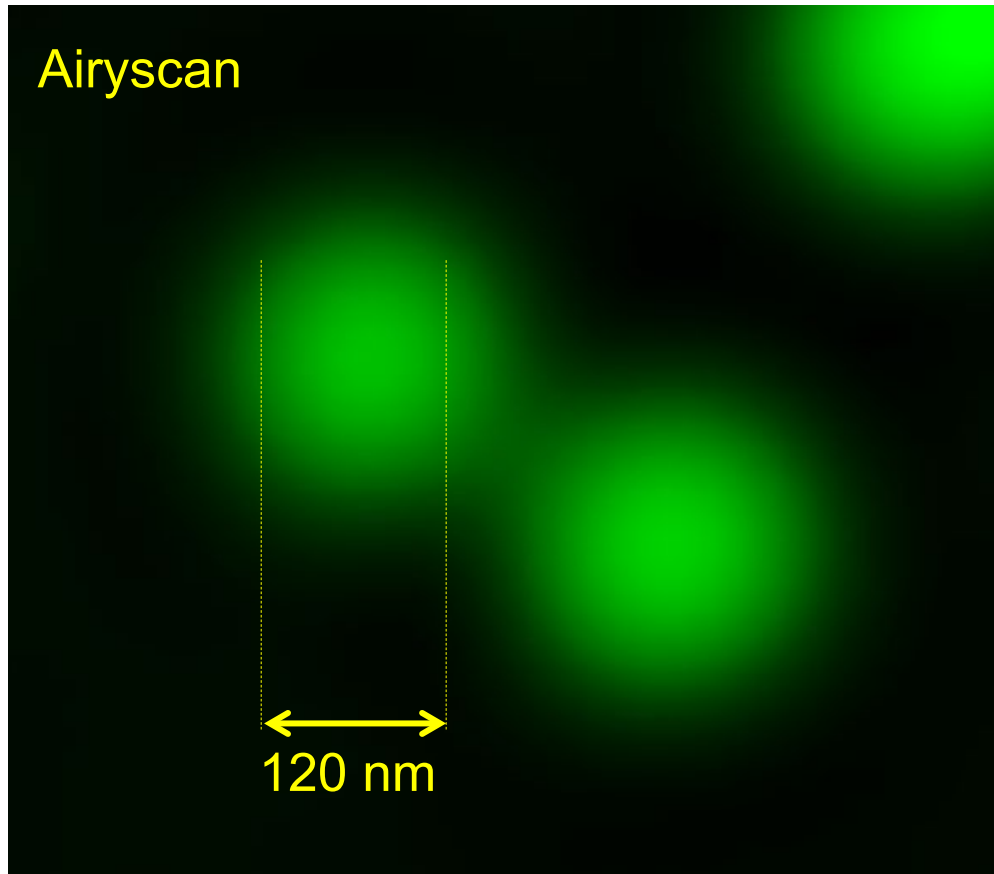
- 0.2AU针孔达到最佳分辨率.
- 摒弃95%的信号

复眼阵列检测器
(32个磷酸砷化镓检测器组成)

- 每个检测器直径为0.2 AU
- 收集所有信号

Airyscan enhances resolution up to 1.7 fold

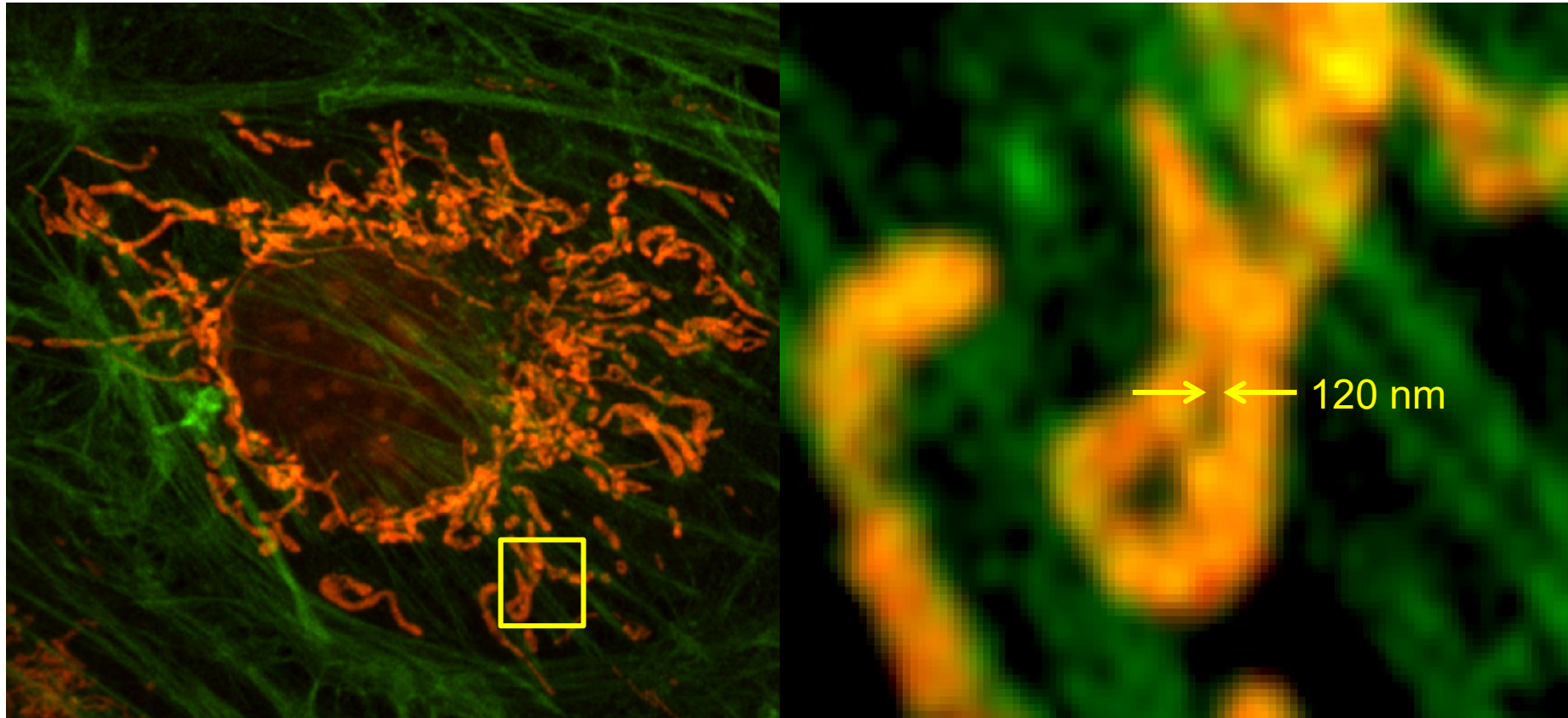
The comparison is made with confocal using PH = 1 A.u.



Improvement 1,7x: Measured using 40 nm beads (excitation at 488 nm)
Same acquisition time, same laser power.

AiryScan: Resolution, SNR, and Flexibility

Choose zoom-in ROI's, orientations, laser wavelengths, etc.



Use Airyscan just as an additional detector. Scan speeds, ROIs, field orientations, laser wavelengths, multitracking, z-stacks, time series etc. are setup as always. Sample handling and fluorophore selection don't need rethinking

LSM9 with Airyscan 2

高速、高分辨率、高信噪比



	Airyscan	Airyscan 2
分辨率 (增长倍率)	120nm/350nm (2倍)	120nm/350nm (2倍)
信噪比增长倍率	4x - 8x	4x - 8x
数据大小 (1024x, 1024y, 150z)	40.6 GB	6.2 GB
处理时间 (1024x; 1024y; 150z)	1分 25秒	17 秒

01 激光共聚焦显微镜的应用范围

02 激光共聚焦显微镜的原理

03 激光共聚焦显微镜的光路部件

04 如何获取一张高质量的图像

05 样本制备建议

什么是高质量的图片？



当我们谈到图像质量，我们说的是……

信号强度：亮度适宜

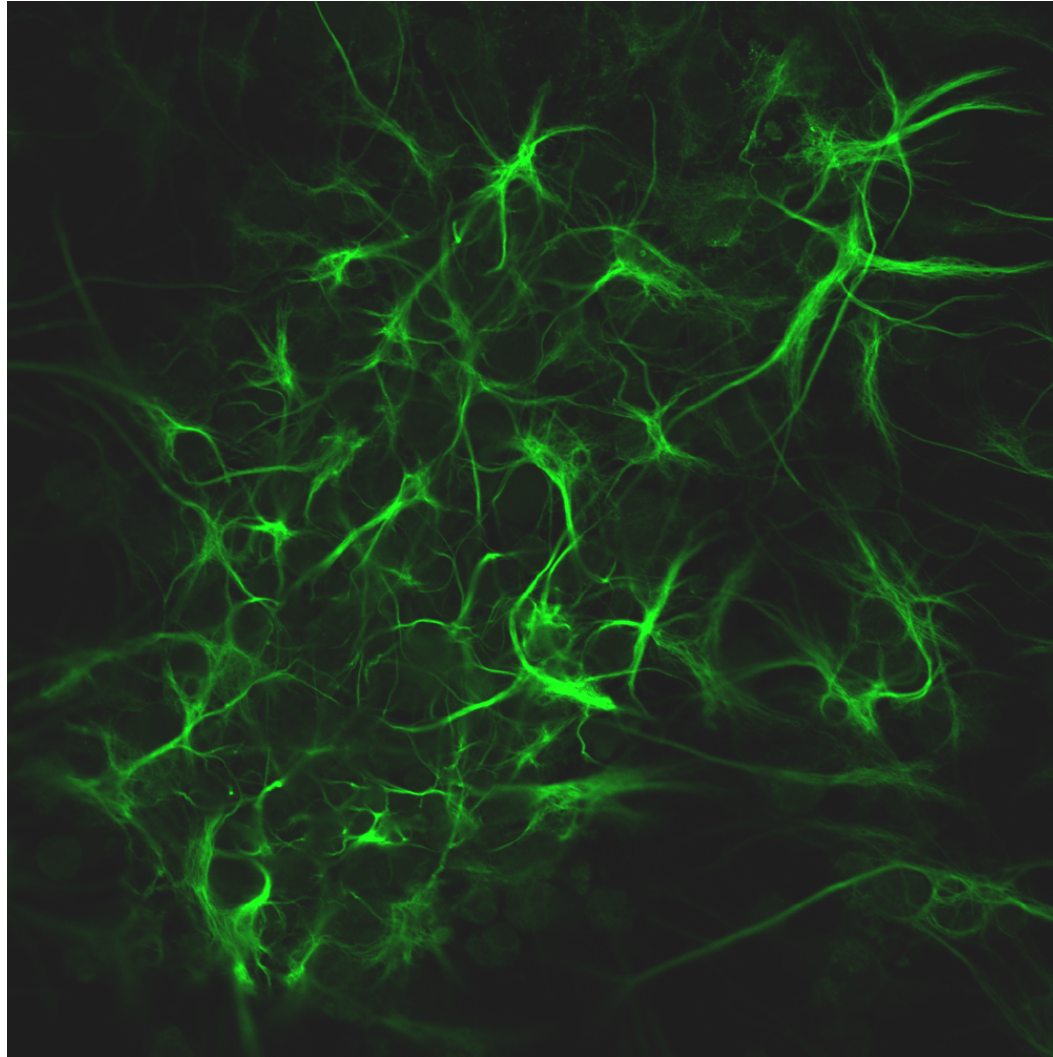
信噪比：流畅度适宜

分辨率：细节清晰

如何拍摄一张好的图片？

合适的图像亮度

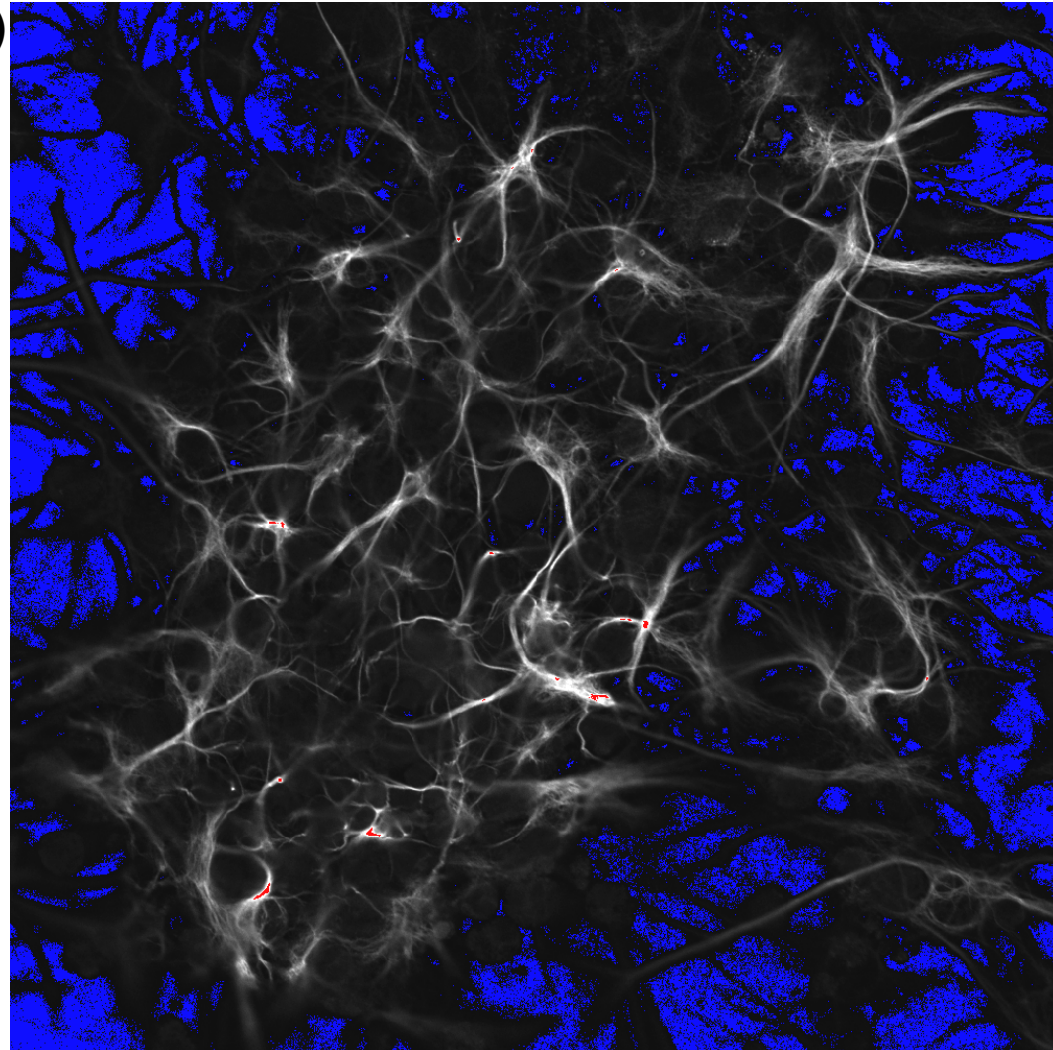
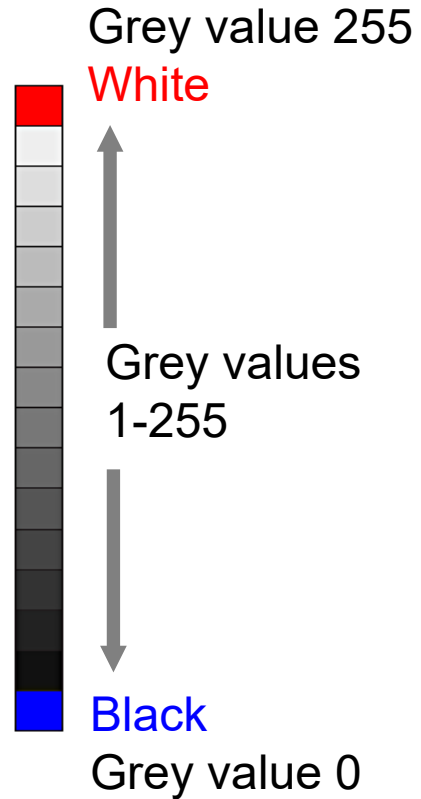
**Illumination:
Not too bright,
Not too dimm**



如何评估一张图像的亮度

Range Indicator

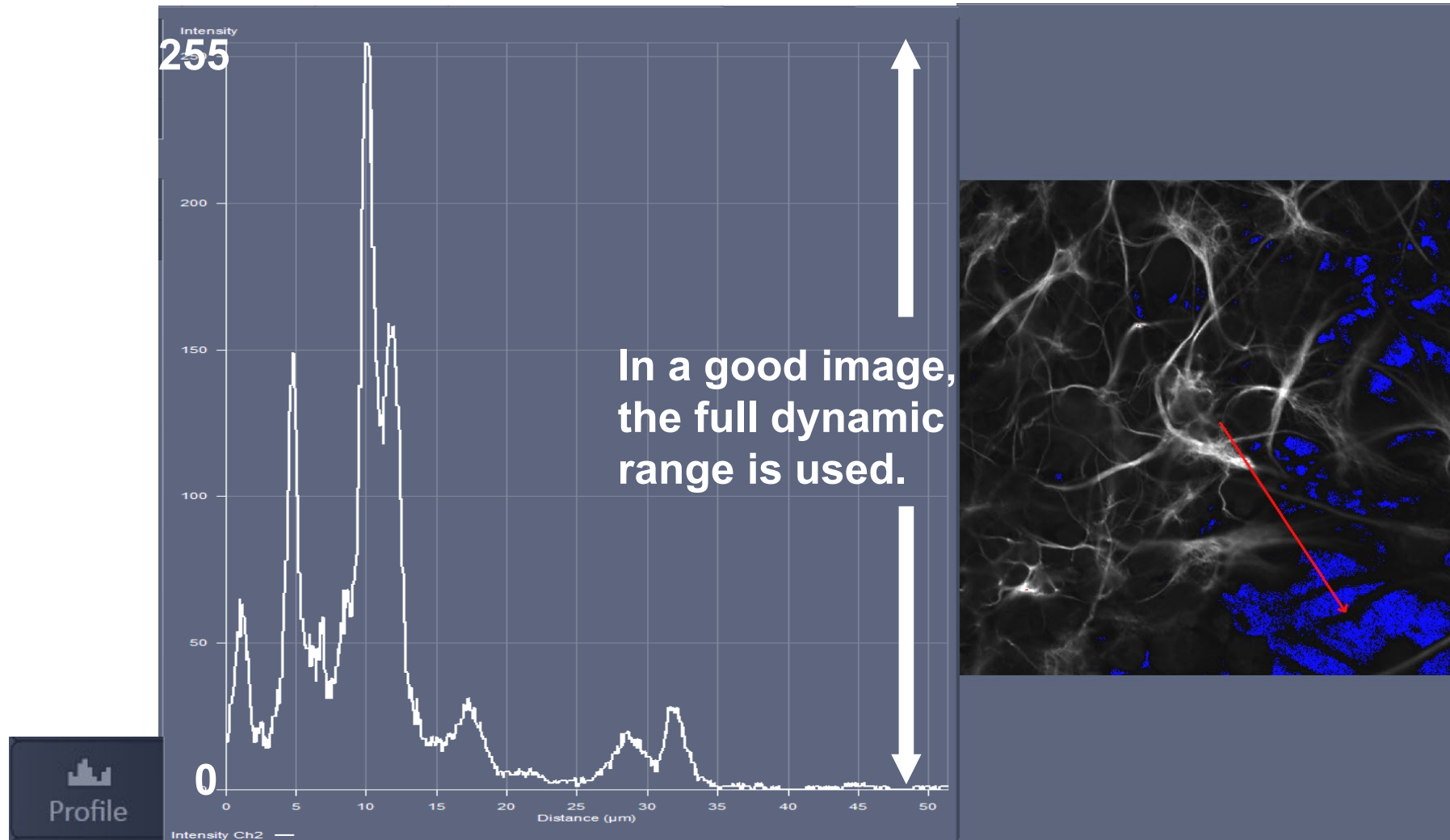
Look-up table Range Indicator (8bit)



Channels

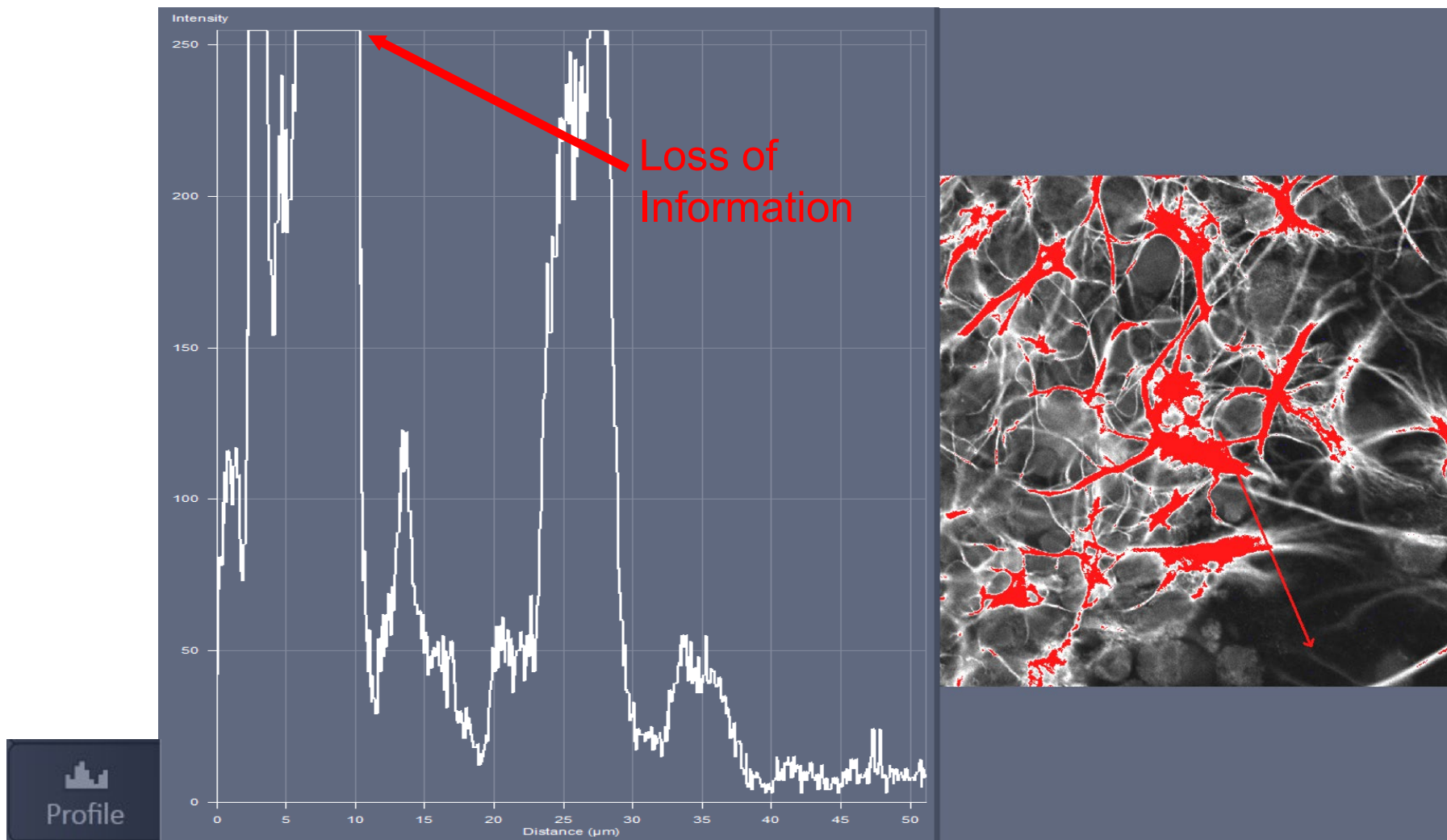
Single Channel Range Indicator

如何测量图像亮度的动态范围 Profile



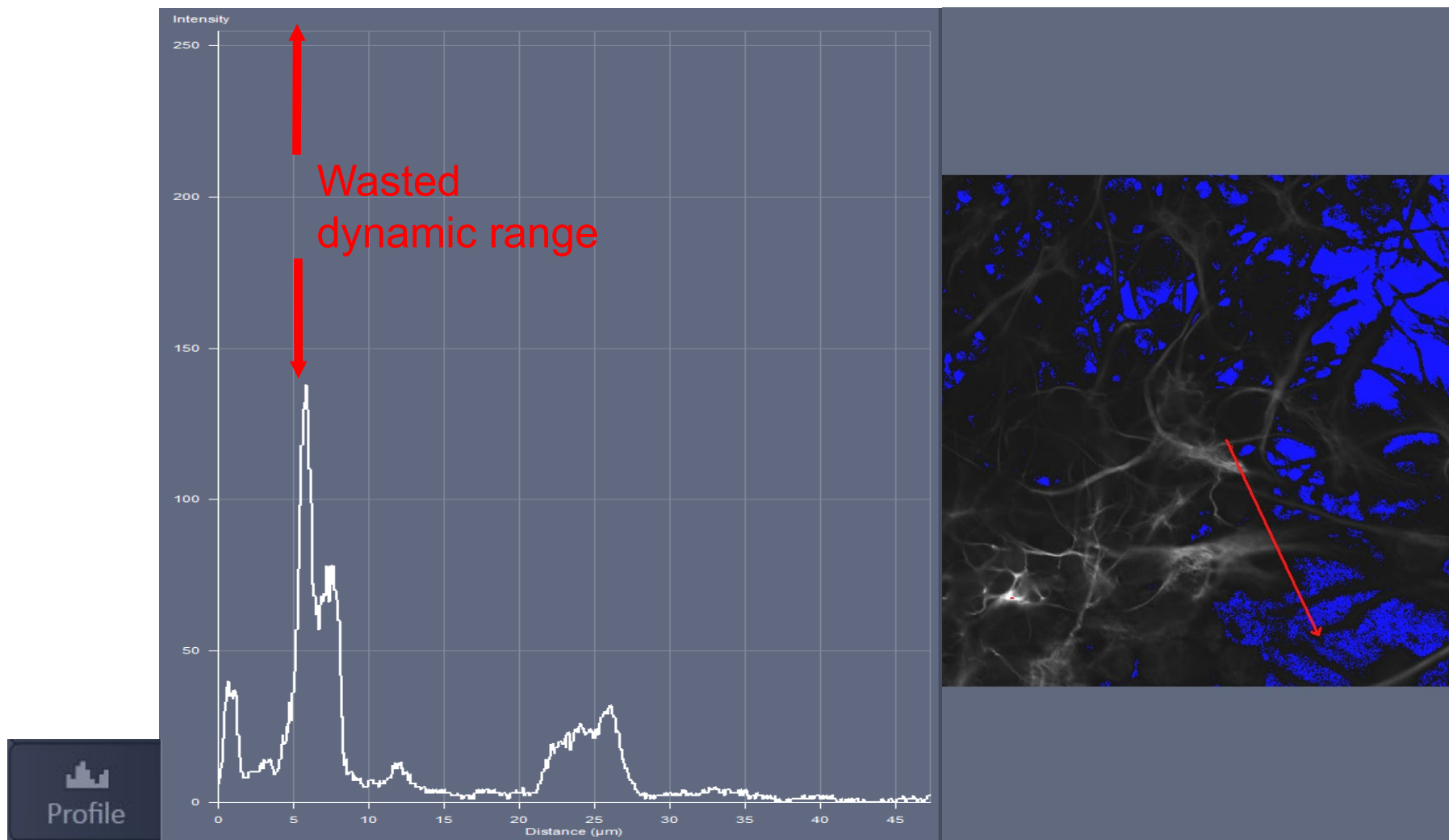
图像过曝

Laser power、Gain (Master) 过高



图像过暗

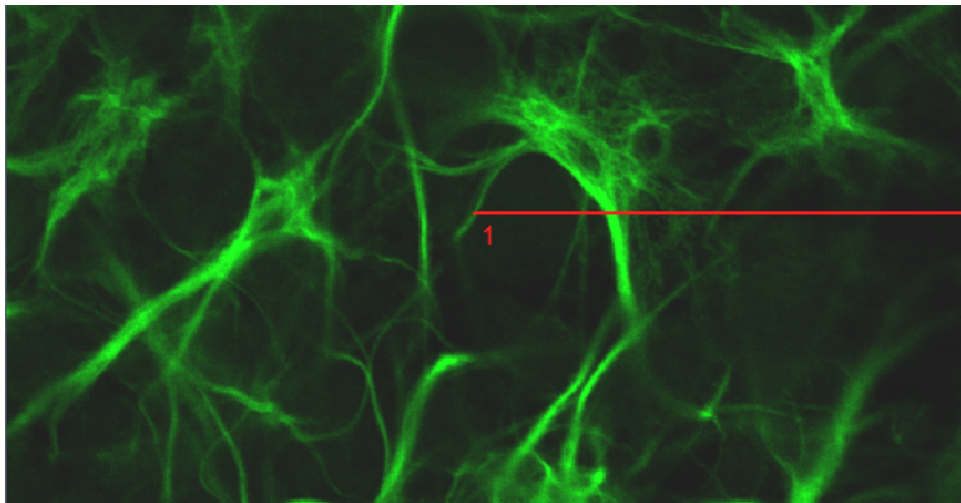
Laser power、Gain (Master) 不足



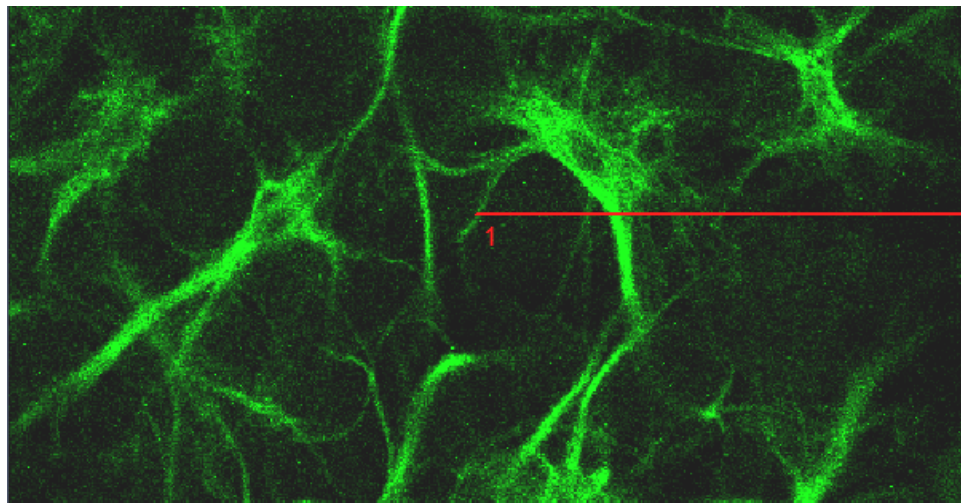
扫描策略

如何拯救图像的信噪比

“Good” Image



“Bad” Image



扫描策略

扫描速度、平均

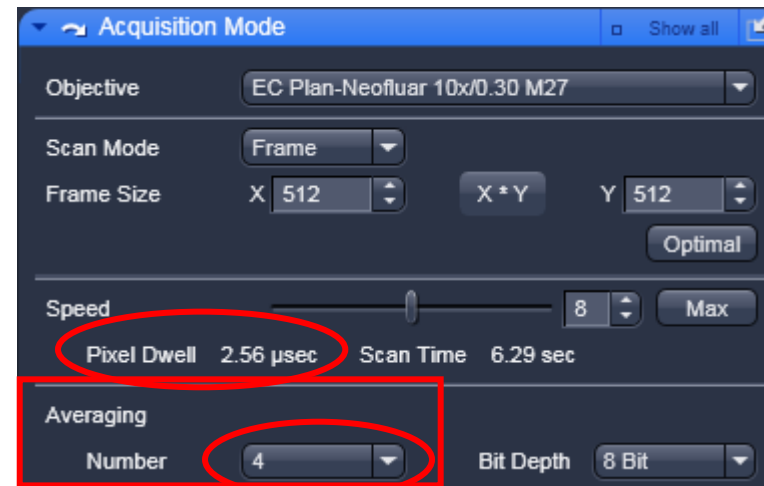
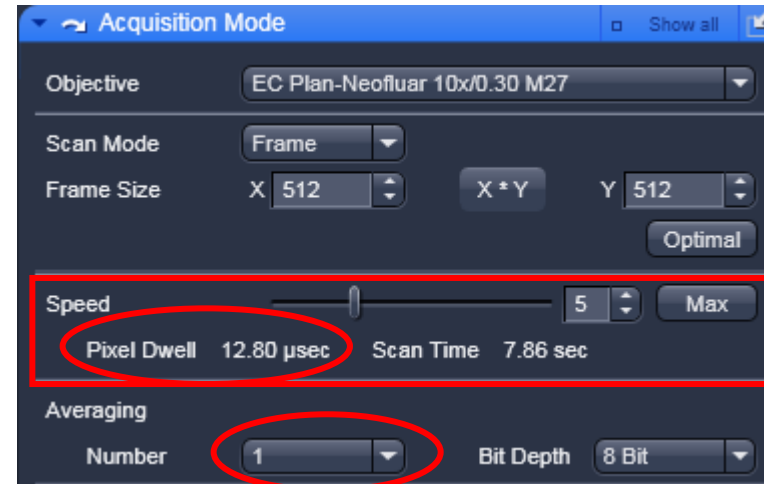
To decrease the effect of noise, more photons (signal) must be collected:

1) Slower Scan Speed

2) Averaging

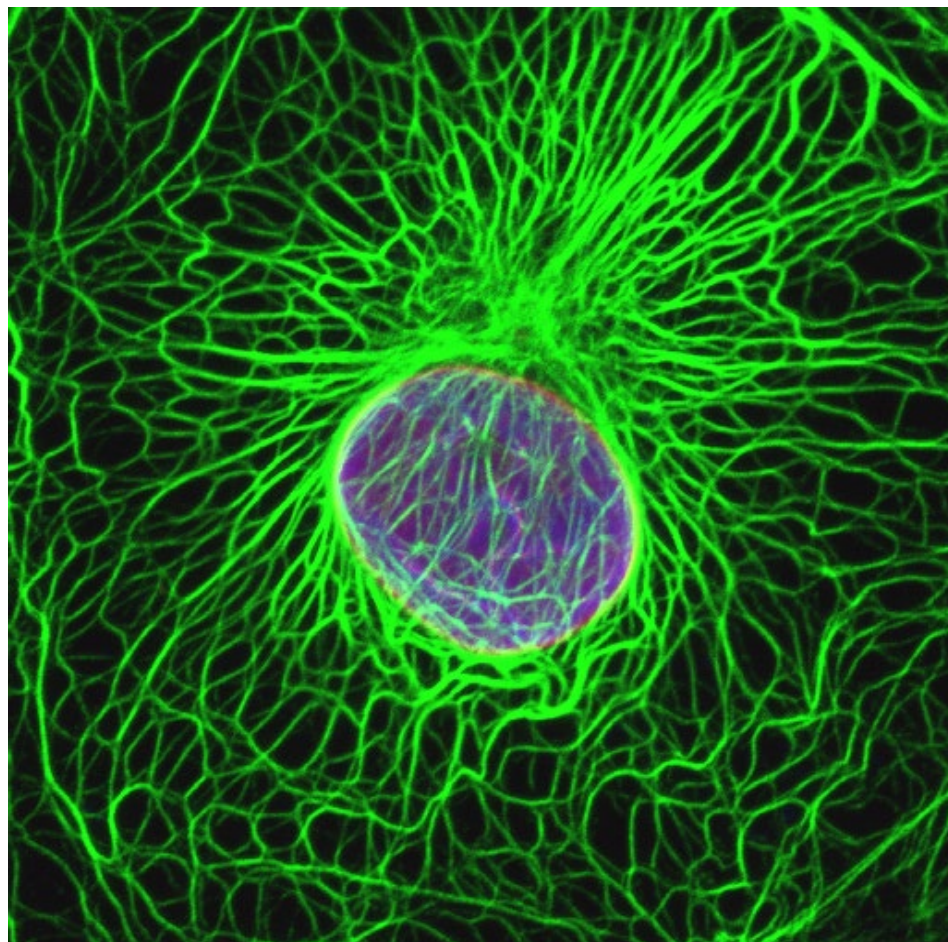
Scan the image x-times and take the average signal for each pixel
-> addition of photons from several scanning runs

Which of the two setups will lead to better image quality?

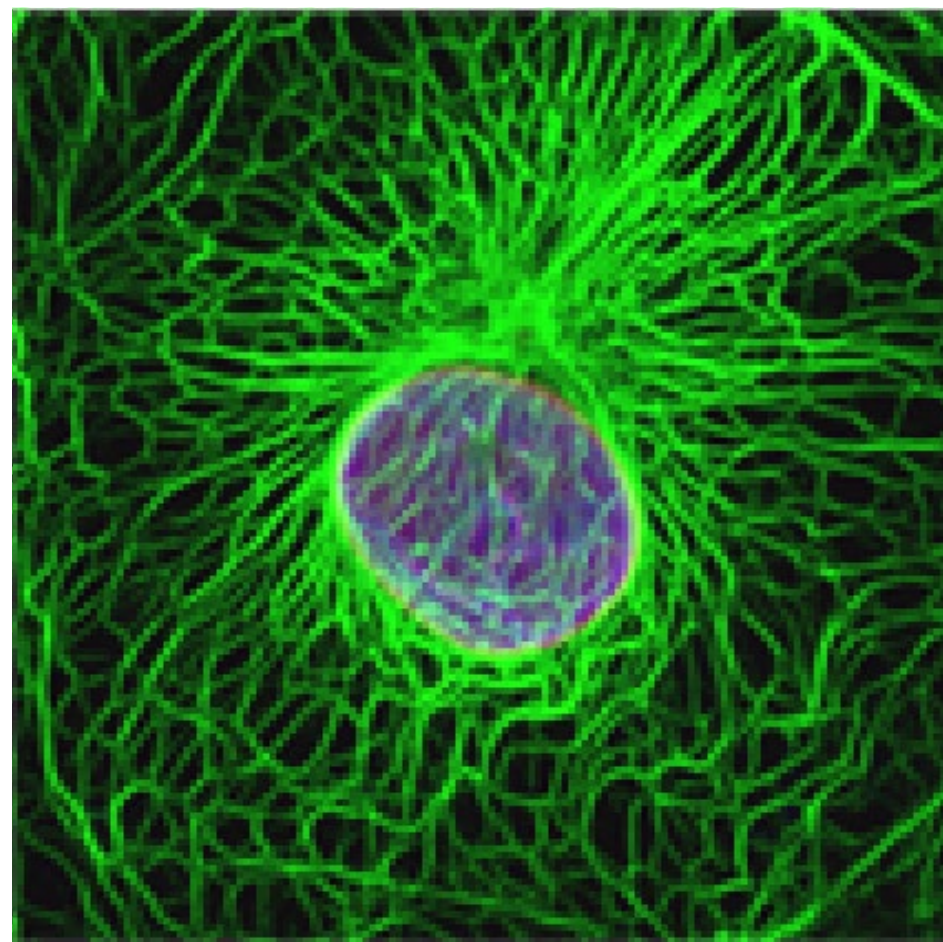


如何充分展示图像细节

分辨率和 Frame size



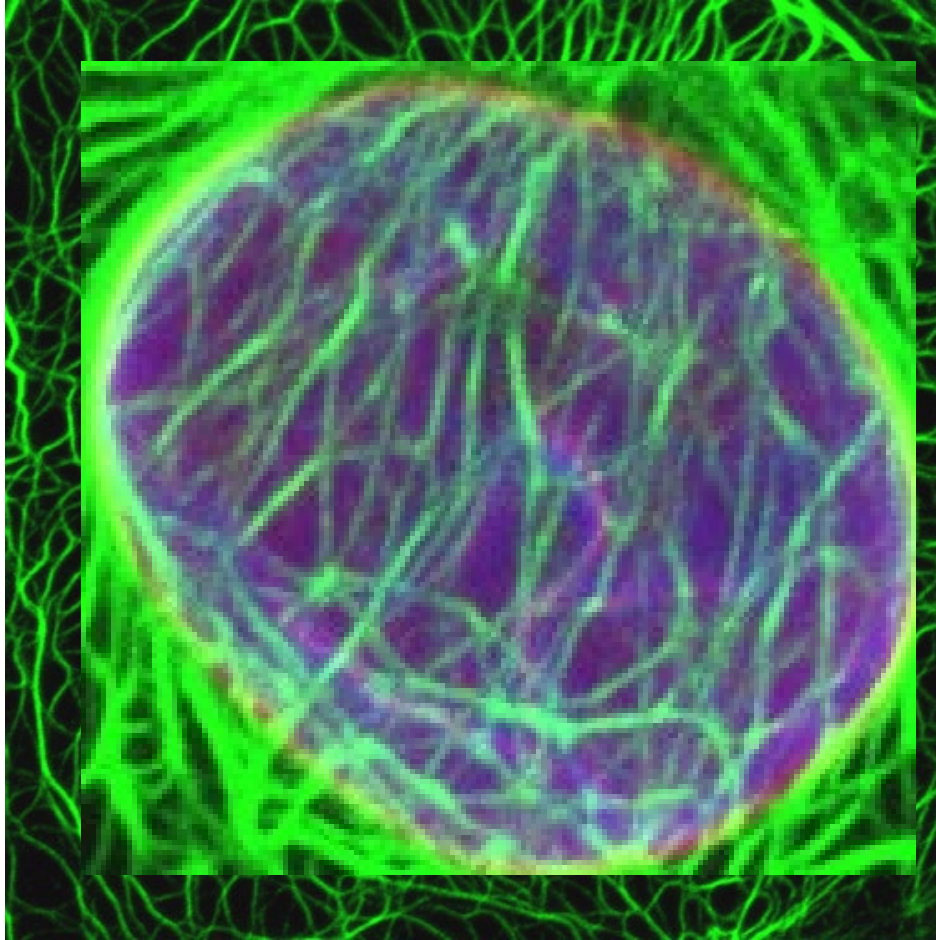
Resolution okay



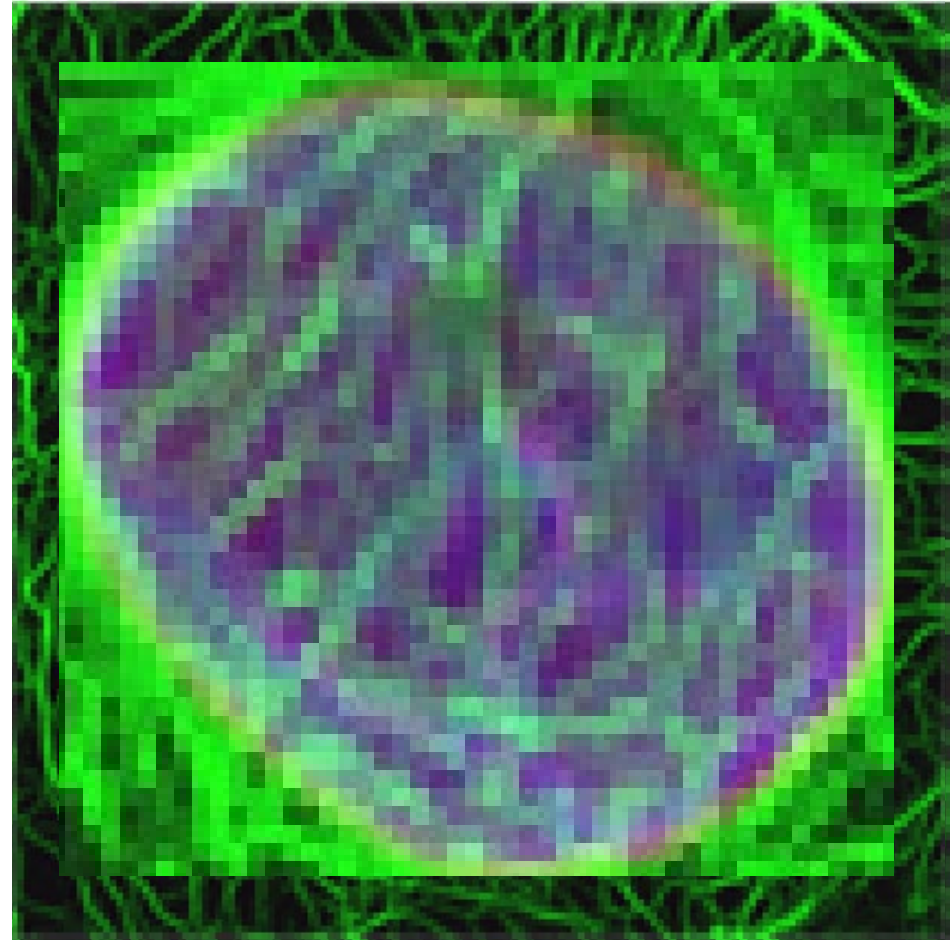
Resolution too low

如何充分展示图像细节

分辨率和 Frame size



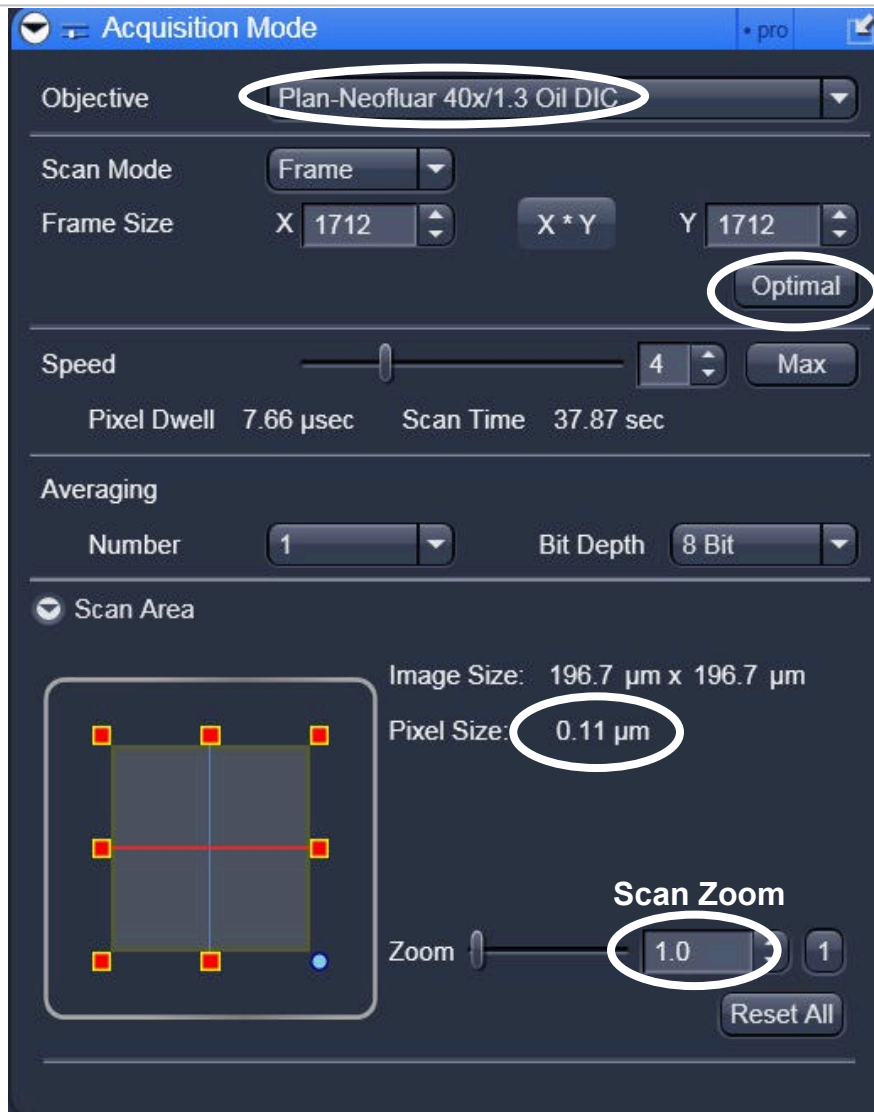
Resolution okay



Resolution too low

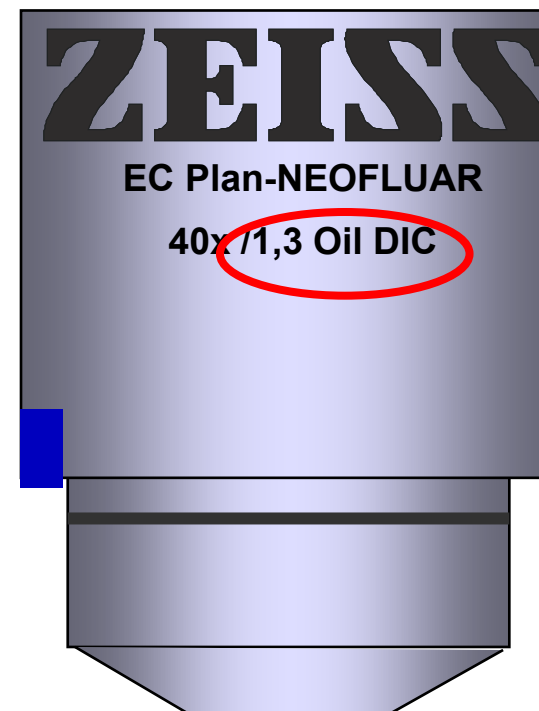
分辨率

软件给出匹配最佳分辨率的拍摄参数



Plan-Neofluar 40x/1.3 Oil DIC

Image Size: 196.7 μm x 196.7 μm
Pixel Size: 0.11 μm

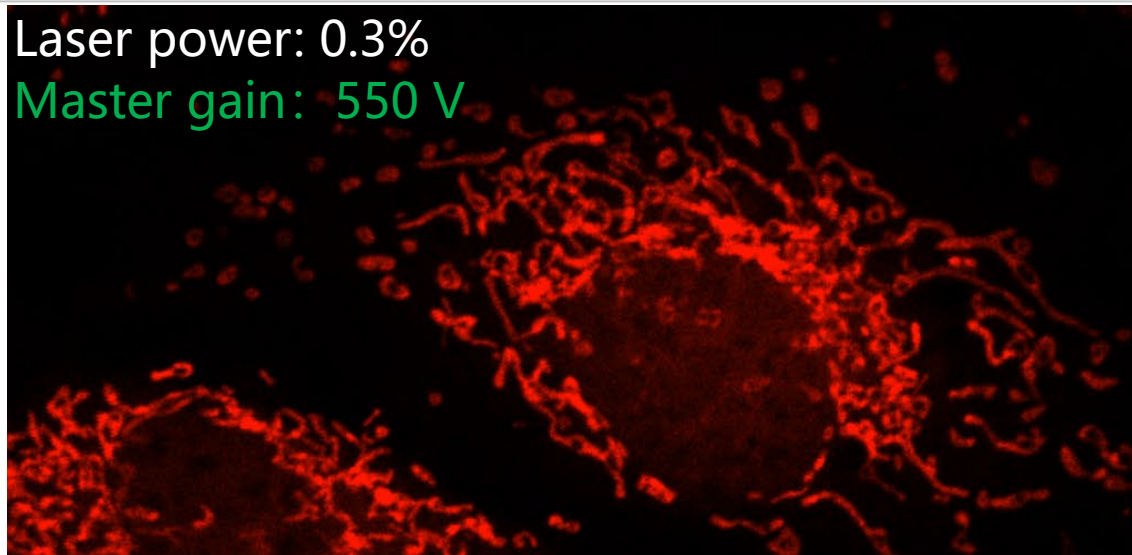


合理设置参数提升成像信噪比

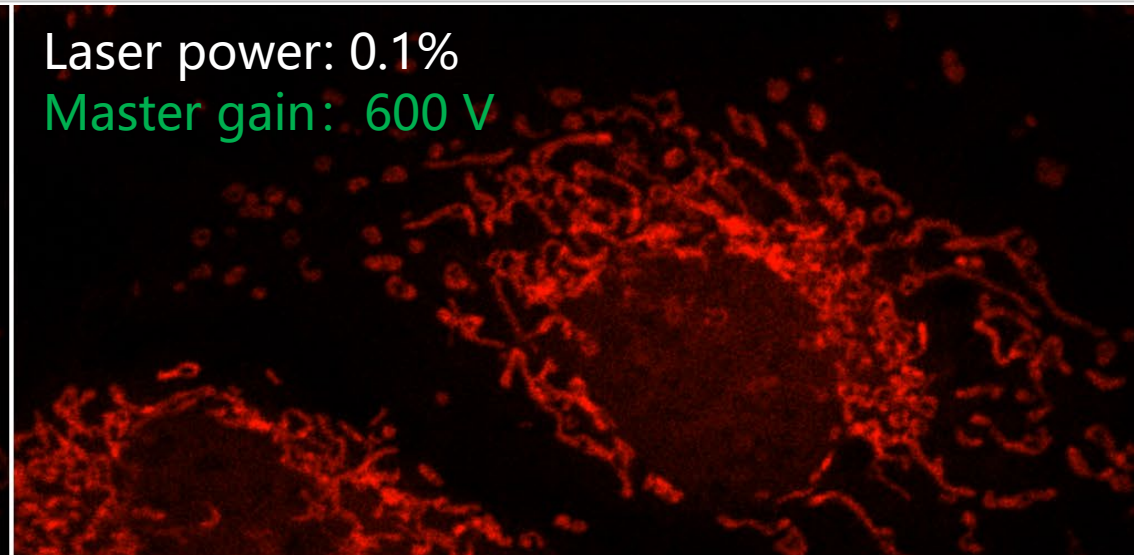
亮度：光损伤和成像信噪比的平衡



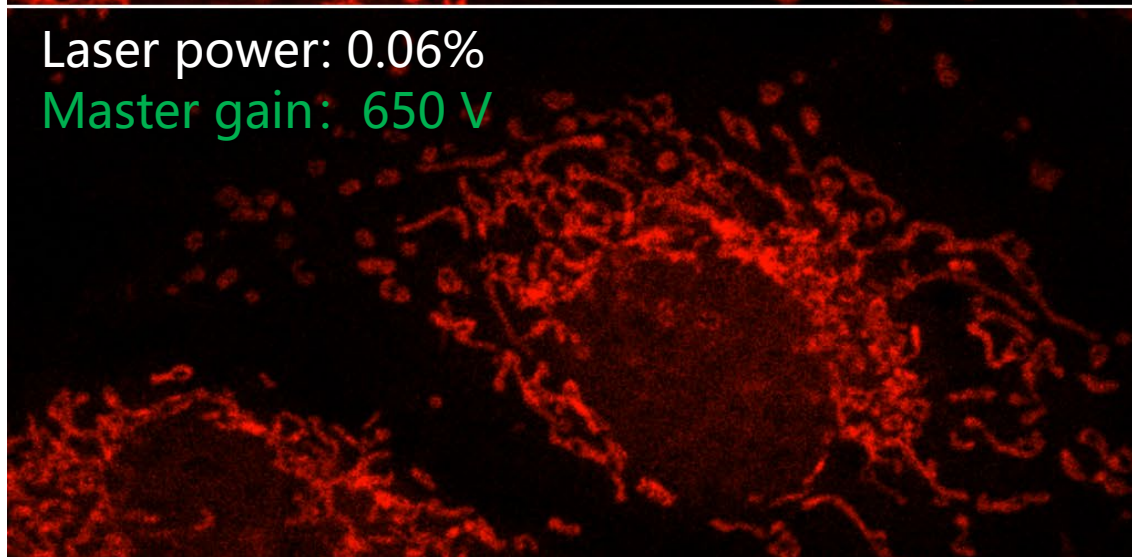
Laser power: 0.3%
Master gain: 550 V



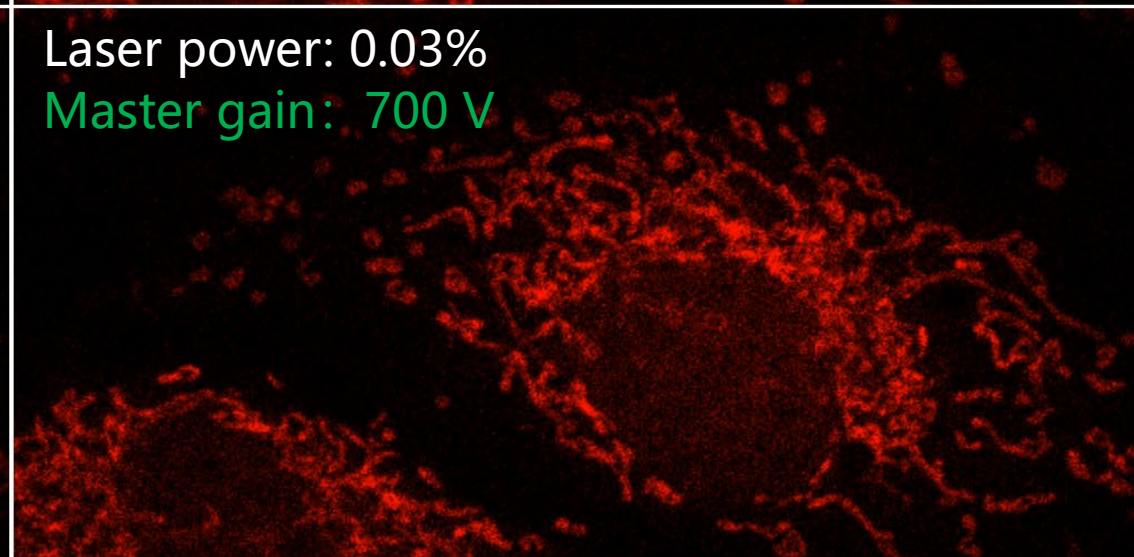
Laser power: 0.1%
Master gain: 600 V



Laser power: 0.06%
Master gain: 650 V



Laser power: 0.03%
Master gain: 700 V



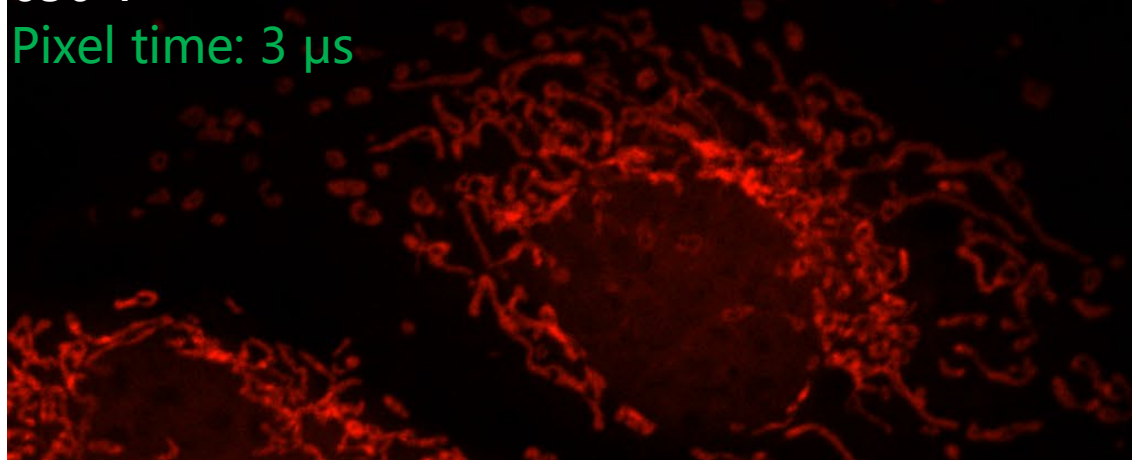
合理设置参数提升成像信噪比

成像速度和信噪比的平衡



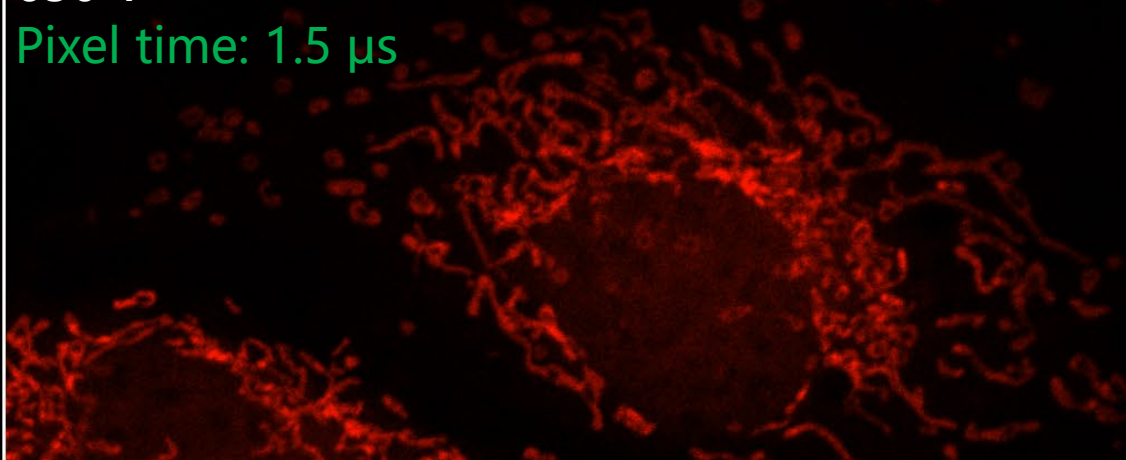
Laser power: 0.05% Master gain:
650 V

Pixel time: 3 μ s



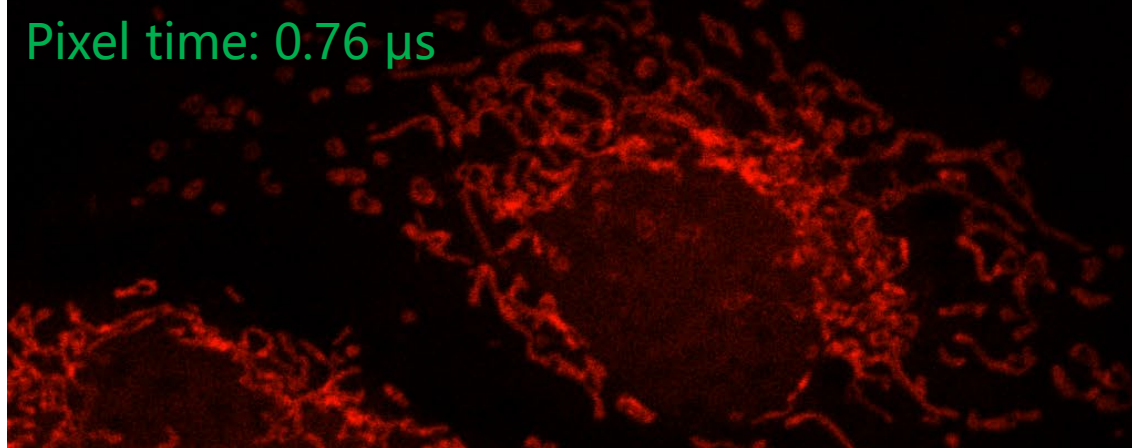
Laser power: 0.05% Master gain:
650 V

Pixel time: 1.5 μ s



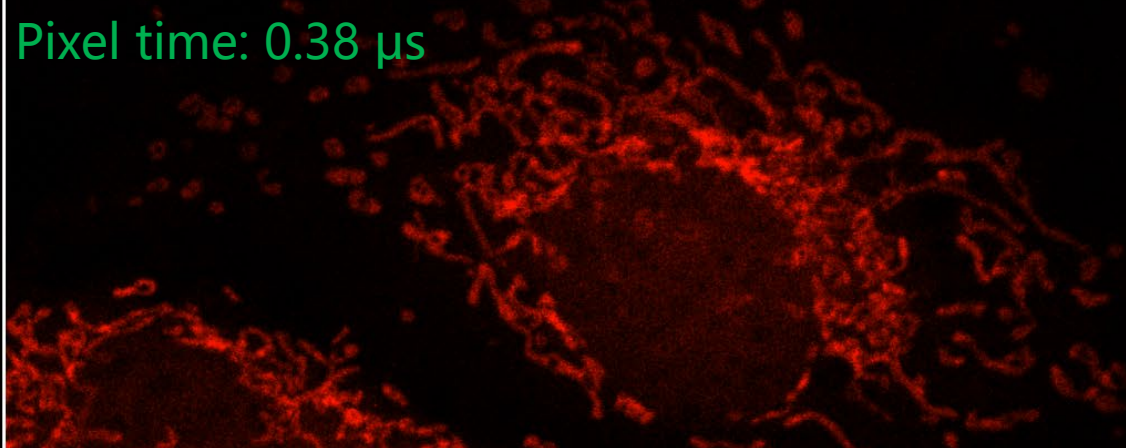
Laser power: 0.05% Master gain:
650 V

Pixel time: 0.76 μ s



Laser power: 0.05% Master gain:
650 V

Pixel time: 0.38 μ s



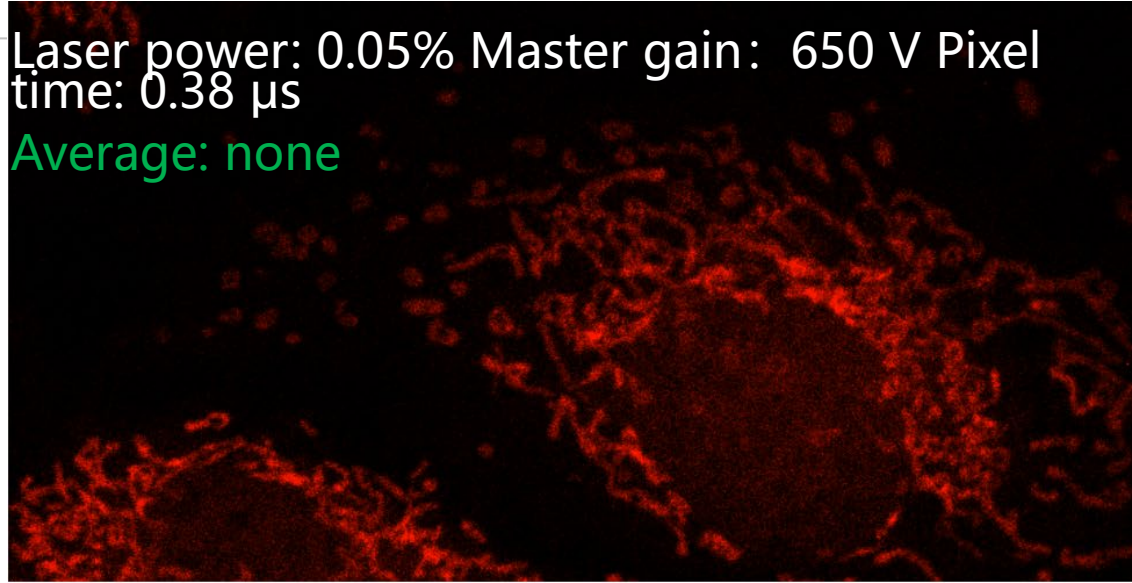
合理设置参数提升成像信噪比



增加平均次数提升信噪比

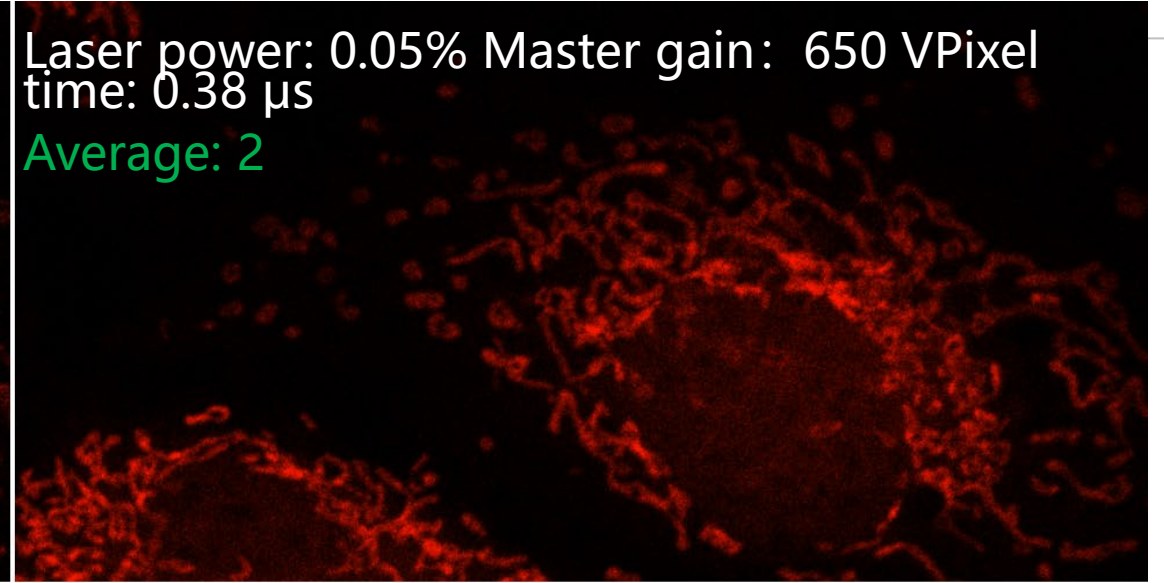
Laser power: 0.05% Master gain: 650 V Pixel time: 0.38 μ s

Average: none



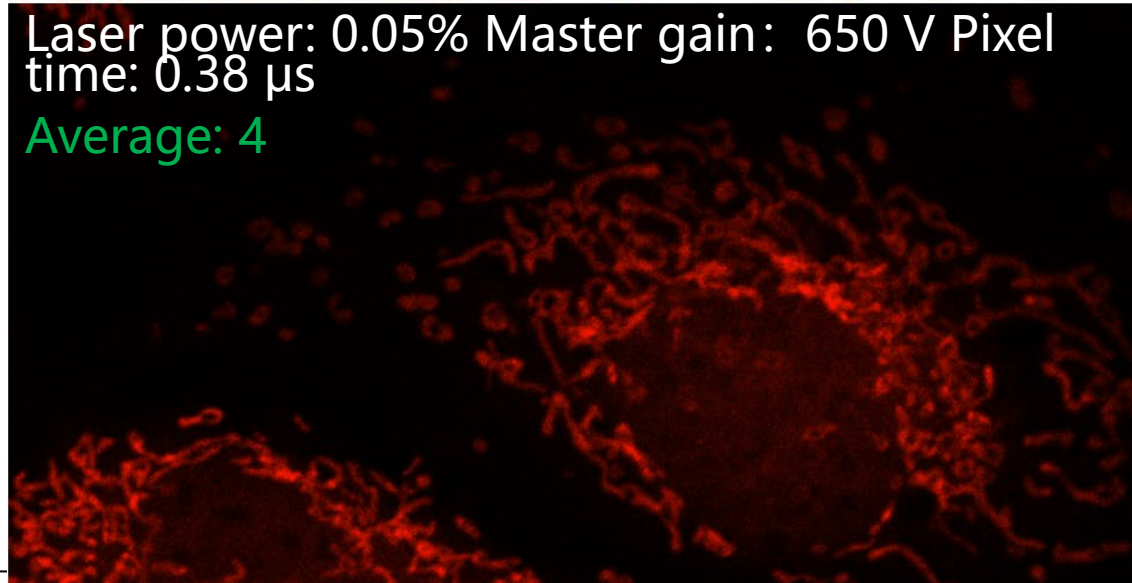
Laser power: 0.05% Master gain: 650 V Pixel time: 0.38 μ s

Average: 2



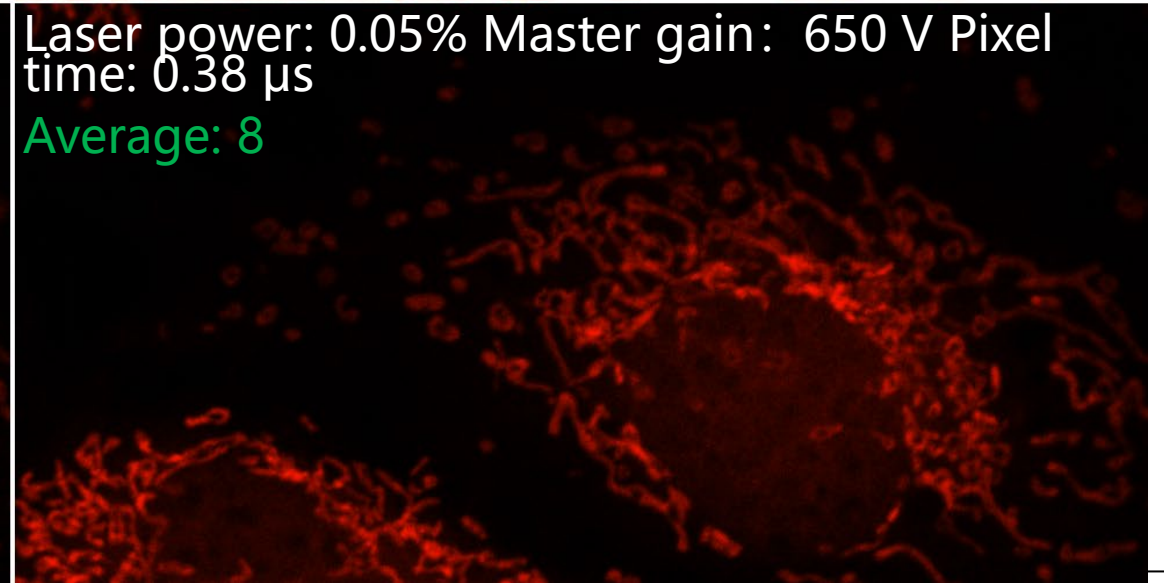
Laser power: 0.05% Master gain: 650 V Pixel time: 0.38 μ s

Average: 4



Laser power: 0.05% Master gain: 650 V Pixel time: 0.38 μ s

Average: 8



合理设置参数提升成像质量

分辨率、信噪比、成像速度的平衡



参数注释



拍摄视野大小：可通过光学变倍扩大或缩小拍摄视野

拍摄视野角度：通过旋转扫描方向控制视野角度，Crop Area可快捷调整视野大小和角度

扫描分辨率：根据能奎斯特采样定律，为达到理论分辨率，采样分辨率需提升2X，即共聚焦sampling 1x，超分辨率sampling 2X，一般文献Fram Size最低要求为1024x1024

扫描速度：激光扫描速度越慢，成像越清晰，常规样品为平衡成像速度和清晰度，建议pixel time 为1-2 μ s

扫描方向：激光单向扫描图像质量佳，双向扫描可提升成像速度，

扫描平均次数：通过多次采集图像平均可有效降低系统噪音，提升信噪比，但是会增加成像时间，建议根据样品2-4次平均

灰阶值：灰阶值越高，信号强度分级越细腻，建议16 bit

合理设置参数提升成像质量

亮度和光损伤的平衡



参数注释

不同的荧光通道

激光功率: 激光功率越高, 激发光子数越多, 信号越亮, 但对样品的光损伤也越大

针孔大小: 针孔可过滤非焦平面信号, 缩小针孔可提升分辨率, 但亮度降低; **针孔1 AU**分辨率和亮度达到最佳平衡

PMT信号放大: Master gain越高, 信号越亮, 但暗电流越多, 信噪比下降

Digital offset/gain: 信号的数码放大或扣除, 可通过后期数据处理增加对比度和扣除背景达到类似效果, 一般不调节

01 激光共聚焦显微镜的应用范围

02 激光共聚焦显微镜的原理

03 激光共聚焦显微镜的光路部件

04 如何获取一张高质量的图像

05 样本制备建议

一张“好”图片的必要条件



风景



设备



技术

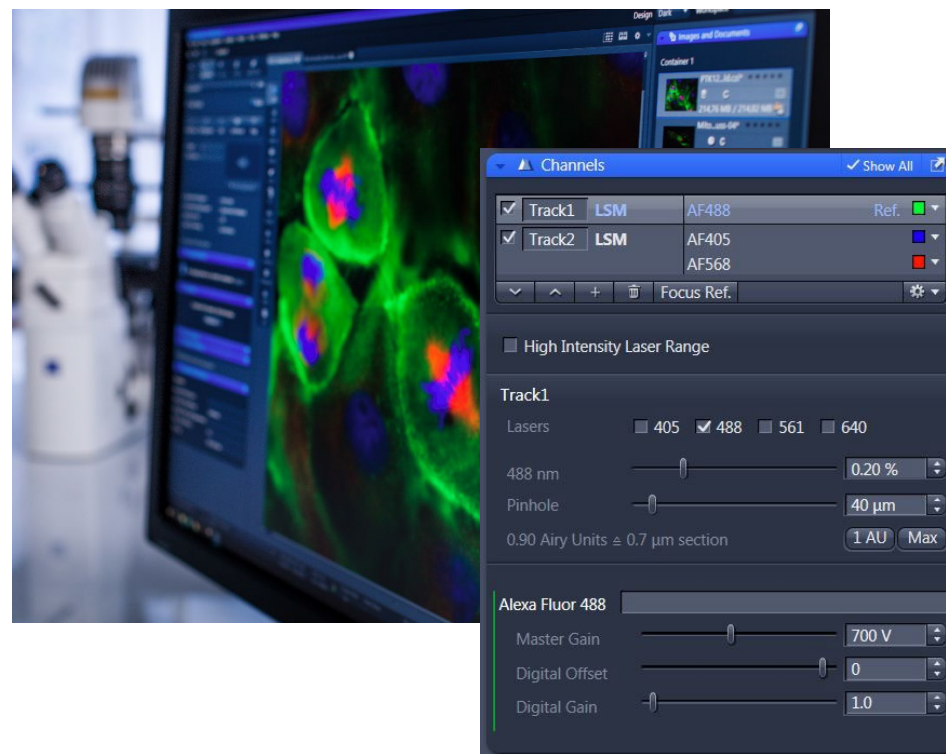
一张“好”图片的必要条件



样品制备



合适设备



成像参数

生物样本制备流程

样本类型



➤ 样本载具:

玻片、培养皿 (35/60mm) 、孔板、腔室

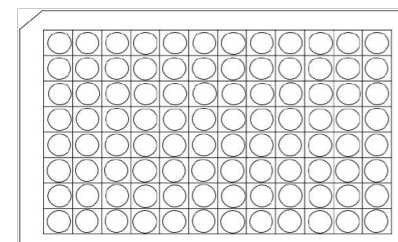
➤ 样本类型:

动物: 器官组织切片、细胞爬片、悬浮细胞、胚胎、类器官

植物: 植物根茎、叶片、花粉等

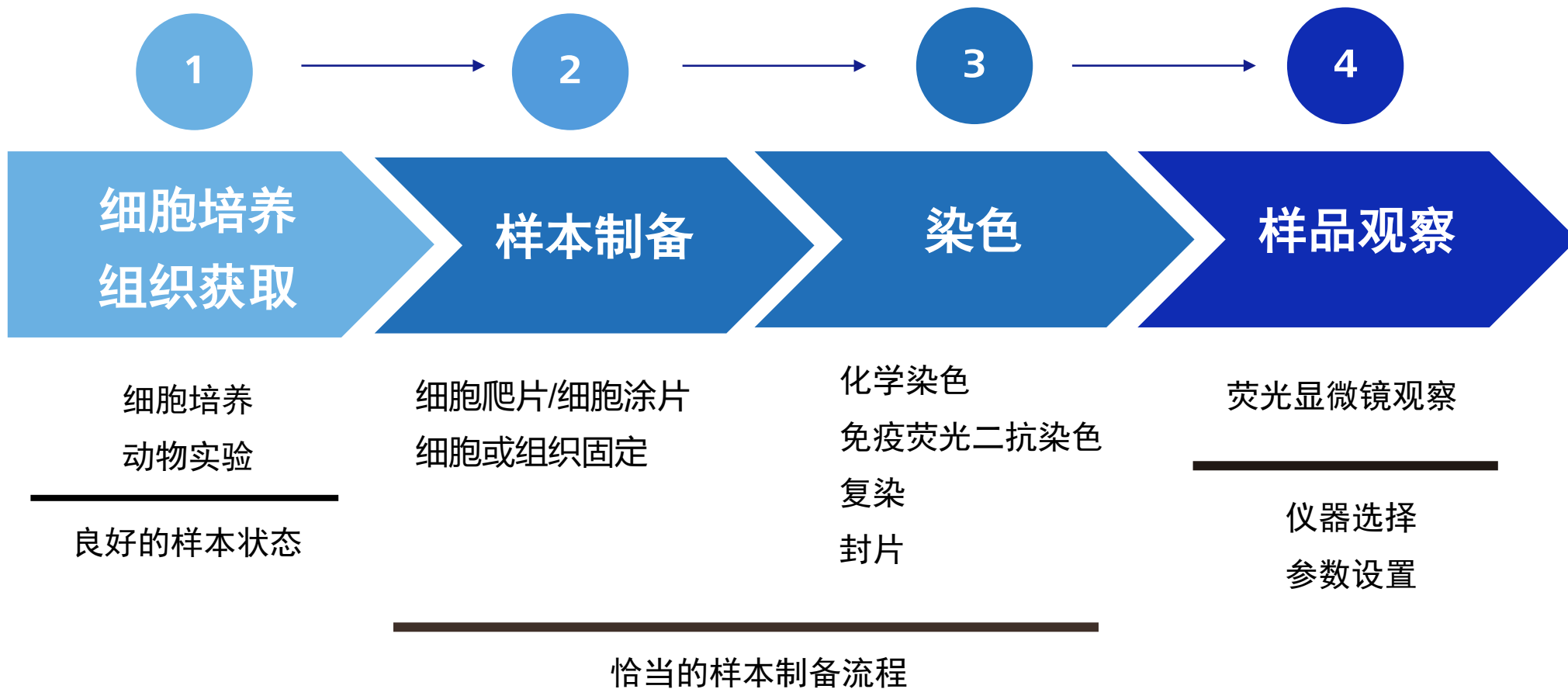
小型模式生物: 线虫、斑马鱼、果蝇, 其他昆虫

微生物: 细菌、真菌等

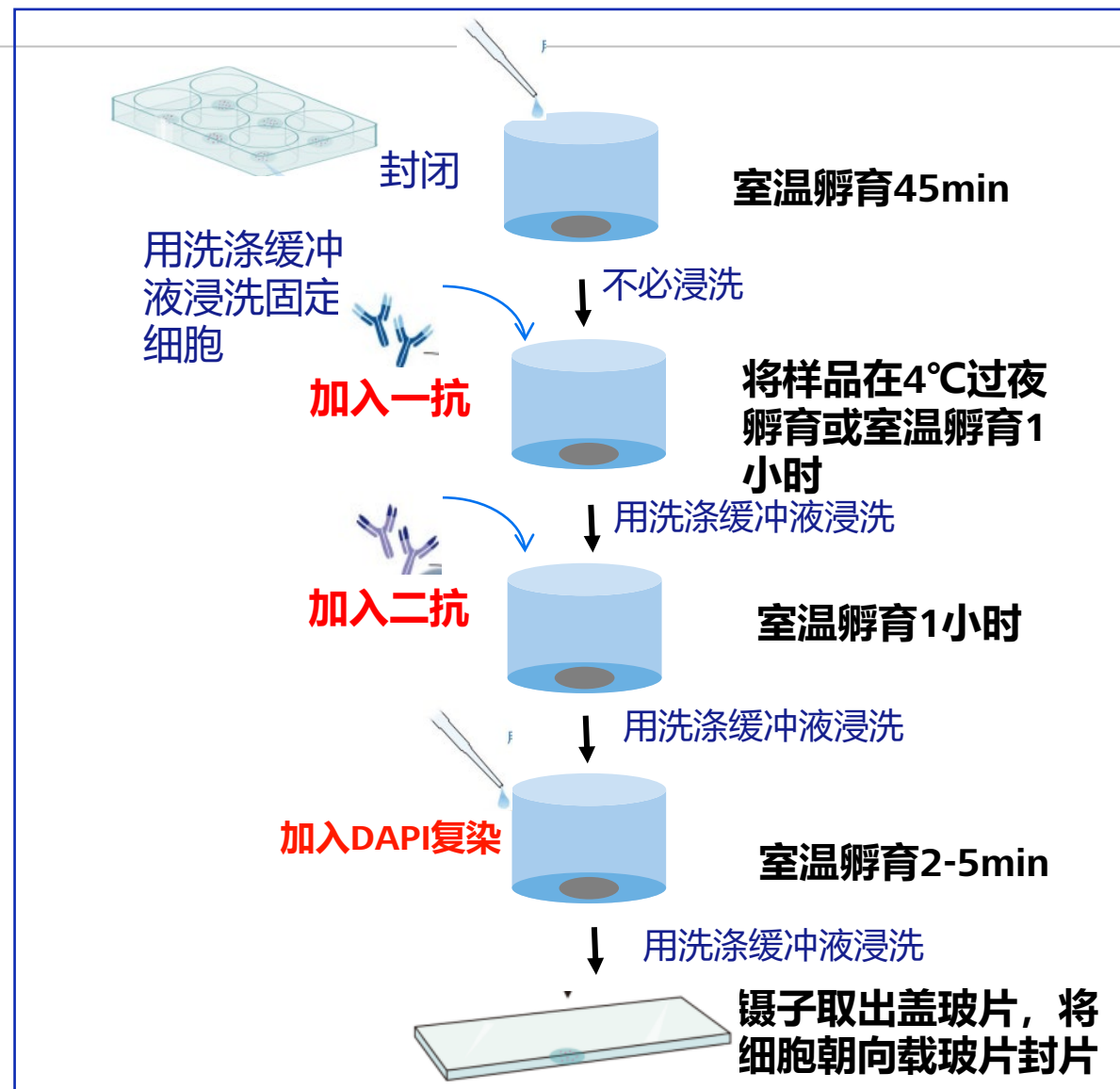
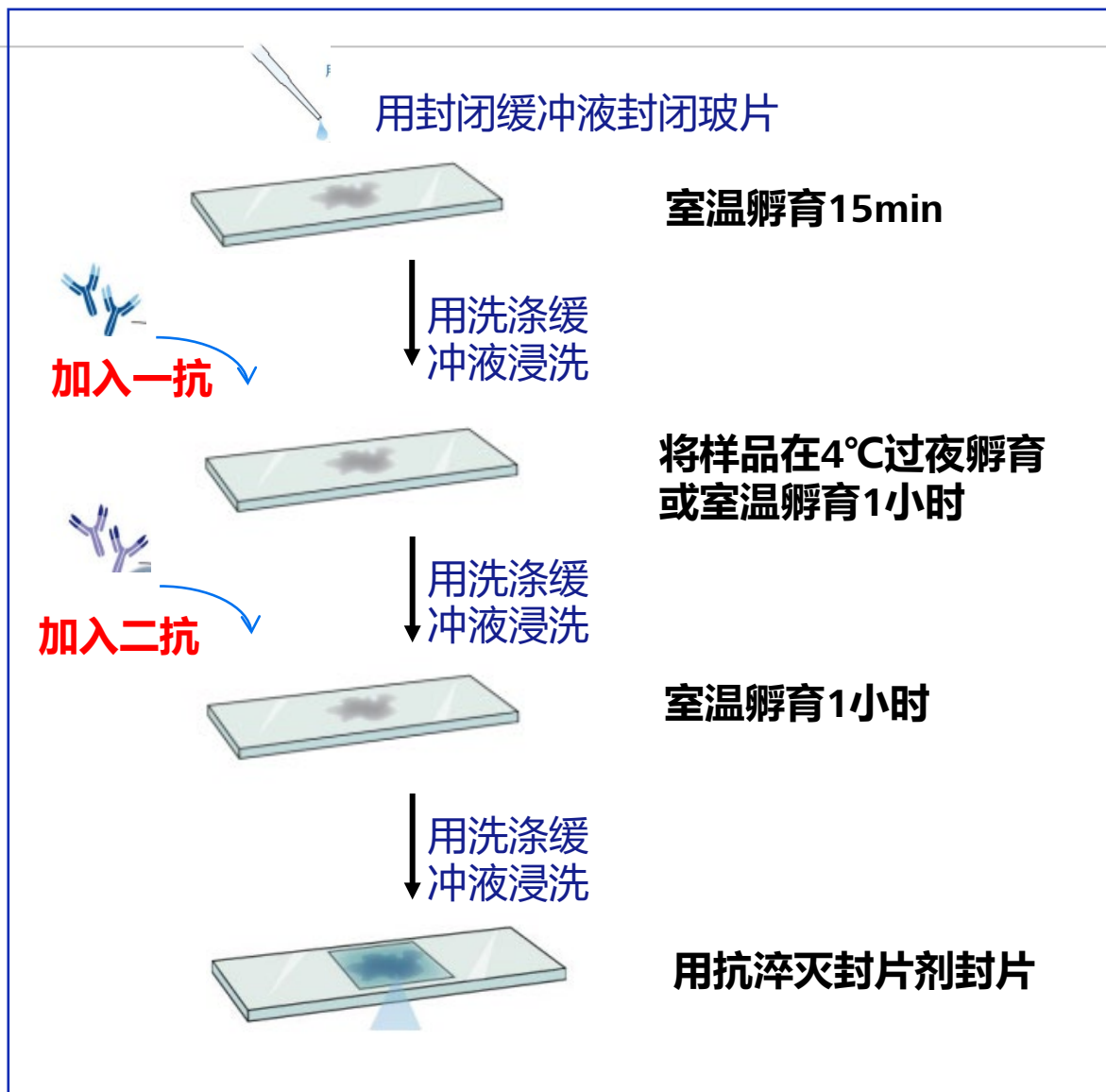


细胞样本的成像流程

影响成像质量的因素



免疫荧光染色 组织荧光染色 vs 细胞荧光染色流程



免疫荧光染色 抗原检测——组织荧光染色 vs 细胞荧光染色



抗体选择

Anti-IL-1 beta antibody (ab2105)

★★★★☆ 评价 (23) 具体的参考文献 (113)

Description: Rabbit polyclonal to IL-1 beta

Application: IHC-P

Reactivity: Human

Conjugate: Unconjugated

应用类型、反应性、**一抗种属**

一抗:

整个免疫染色的核心。

加入稀释好的一抗并放入湿盒，4°C孵育过夜

Rabbit anti-A

Mouse anti-B

Rat anti-C

荧光二抗:

根据一抗的物种来源，例如:如果一抗是小鼠来源的, 就找 “X抗鼠”

加入稀释好的一抗湿盒中，37°C孵育1h

Goat anti-Rabbit-IgG-alexa 633

Goat anti-Mouse-IgG-alexa 543

Goat anti-Rat-IgG-alexa 488

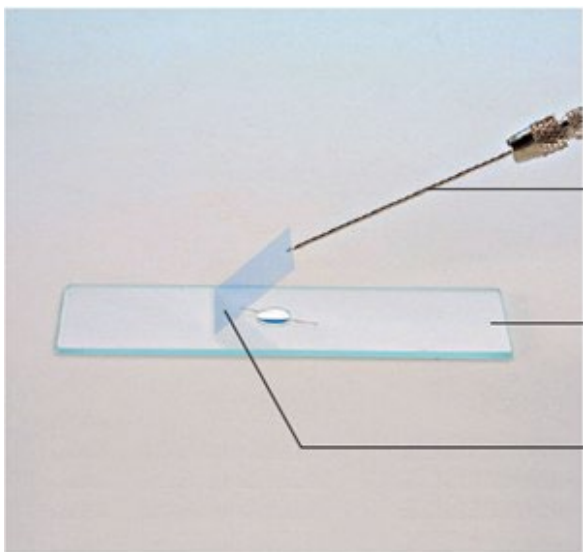
复染:

复染可以在二抗孵育后单独进行，能够确定细胞的位置和结构。

复染的染料有多种，比如定位细胞核的 DAPI

封片剂选择

- 自动封片
- 手动封片



切记：不要加太多封片剂！！

规格参数						
规格形式	即用型硬质封片剂			100x 浓缩液	即用型软质封片剂	
折射率	1.52 (固化后)	1.47 (固化后)	1.47 (固化后)	1.3	1.42	1.42
您需要做哪种类型的成像实验?						
活细胞成像				✓		
固定细胞, 即时成像					✓	✓
固定细胞, 长期成像 (样品厚度 ≤ 10 μm)	✓	✓	✓			
固定细胞, 长期成像 (较厚样品厚度 ≤ 150 μm)	✓					
哪款物镜可匹配得到最佳的结果? (所有物镜类型都能兼容这些试剂)						
油浸物镜	✓					
甘油浸物镜		✓	✓		✓	✓
水或空气浸物镜				✓		
样品标有哪种荧光染料?						
Alexa Fluor 系列染料	✓	✓	✓	✓	✓	✓
传统荧光染料	✓	✓		✓	✓	
荧光蛋白	✓	✓		✓	✓	

抗荧光淬灭剂选择

- 选择优质的抗荧光淬灭剂
- 封片不要有气泡

	ProLong Live	ProLong Gold	ProLong Diamond	SlowFade Gold	SlowFade Diamond
What type of imaging am I planning?					
Live-cell imaging	✓				
Fixed-cell, immediate imaging				✓	✓
Fixed-cell, long-term imaging		✓	✓		

选择合适的染料和探针

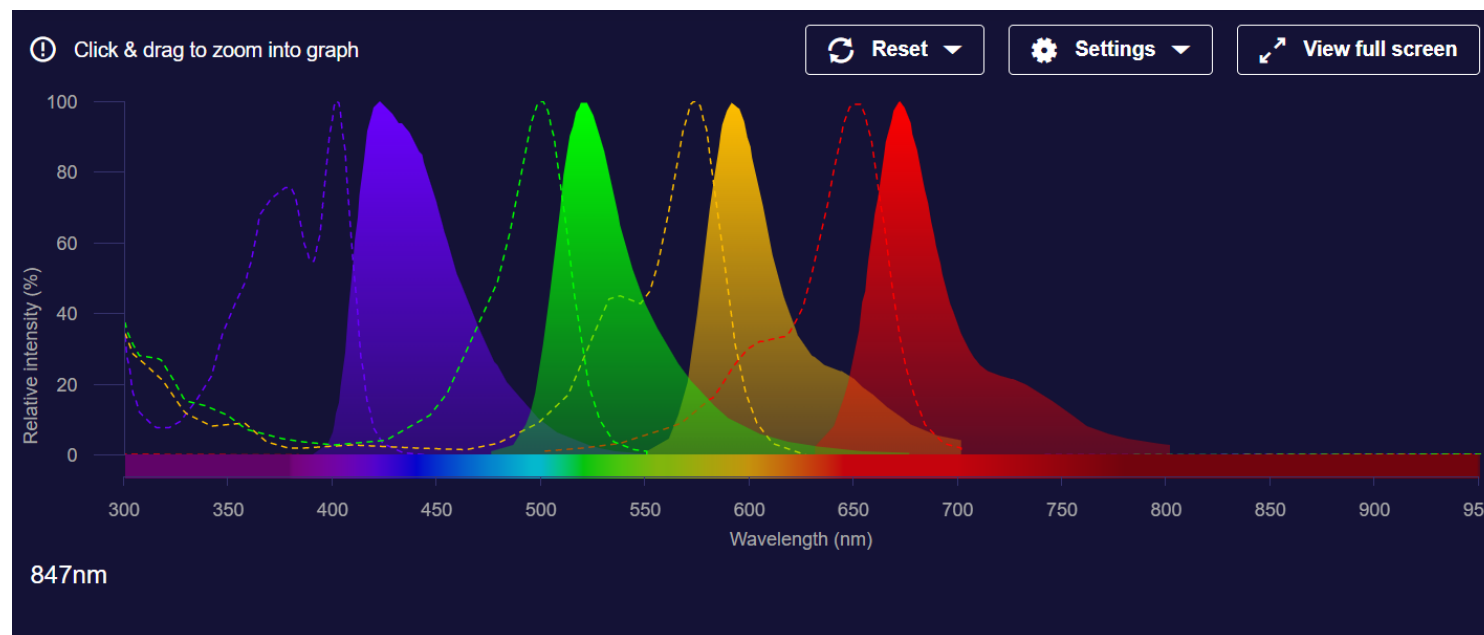


Light Lab



SpectraViewer

<https://www.thermofisher.cn/order/fluorescence-spectraviewer#!/>



线粒体

- **Rhodamine 123** 505/534 , 可染活细胞, 可检测线粒体膜电位, 且在多数细胞中停留时间短

- **JC1** 线粒体膜电位低时为单体 490/527 发绿光

线粒体膜电位高时为多聚体 490/590 发红光

可标记活细胞线粒体, 且为检测线粒体膜电位最佳探针

- **Mitotracker Green** 490/516, 染活细胞或固定细胞, 稳定不漏出

Mitotracker Orange 551/576

细胞骨架

- 用FITC或Rhodamine标记的**Phalloidin** (鬼笔环肽) 。
- 荧光素直接标记tubulin或actin等细胞骨架蛋白的一抗

溶酶体

中性红 541/640 微偏碱性, 可非特异性标记溶酶体等酸性器官

LysoTracker Green 504/511, 染活细胞

LysoTracker Blue

LysoTracker Red

内质网

DiOC6 484/500 非特异性, 较高浓度标记内质网, 较低浓度标记线粒体

ER tracker Green 504/511 染活细胞

高尔基体

NBD C6-ceramide 466/536, 可染活或死细胞

Golgin-97 antibody with Alexa Fluor 555 染固定细胞

- 1、整个加抗体免疫染色的步骤，直到最后封好片子，一定要注意不要让样品干，一旦干掉的话，样品形态会改变并且背景荧光也会骤增，哪怕再重新加水湿润也难以完全恢复。
- 2、设计实验时，一定要设计好对照，最好是阳性阴性都有。如果是多色标记的话，最好要有单标
- 3、所有实验开始前尽量都做预实验，摸索抗体浓度，固定时间等重要步骤，平行实验不可少，其他步骤要完全一致。
- 4、抗体配置要遮光，现配现用。

免疫荧光 IF常见问题及解决方案



- 1、染色弱/无信号
- 2、背景高/非特异性信号
- 3、自发荧光
- 4、组织形态破坏
- 5、荧光淬灭快

样本自身表达量低
样品处理问题
实际选择

封闭不充分
一抗问题
二抗问题

更换荧光染料
化学试剂处理 (硼
氢化钠)

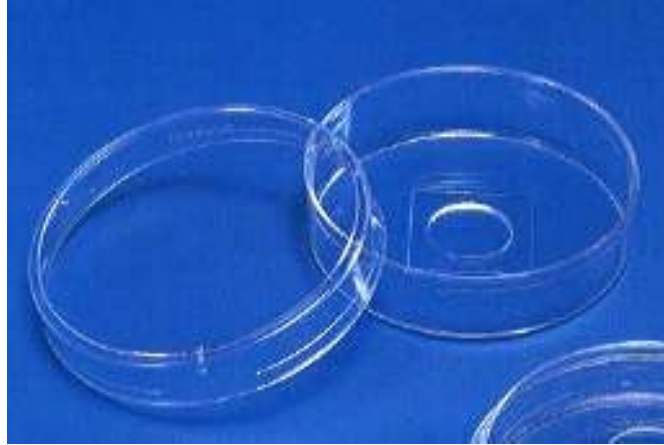
切片从载玻片脱落
切片下有气泡
抗原修复方法过于剧烈
组织自发裂解

荧光素稳定性差
封片剂没有放淬灭剂

问题	可能原因	优化方案
信号弱或无信号	目标蛋白在细胞中没有表达	制备细胞裂解液，用Western Blotting验证目标蛋白在细胞中是否表达
染色细胞过少	表达目标蛋白的细胞过少	标本中使用更多的细胞，使用其他瞬时转染方法，或者使用稳定
	转染细胞系	增加通透剂作用的时间或者浓度，或改用其它的通透剂
	细胞通透性差	改用其他固定方法
	染色前的固定步骤破坏了抗原表位	减少通透剂作用的时间或强度
	通透使抗原丢失	换用其他抗体
背景过高	抗体不识别	同一样品按最佳的二抗用量作一抗稀释曲线，以确定最佳的一抗稀释比例
	一抗稀释度过大	使用正确的二抗
	二抗选择错误	使用特异性高，效价高的一抗
	一抗质量不高	同一样品按最佳的二抗用量作一抗稀释曲线，以确定最佳的一抗稀释比例
	一抗浓度太高	同一样品按最佳的一抗用量作二抗稀释曲线，以确定最佳的二抗稀释比例
	二抗浓度太高	使用二抗来源动物的非免疫血清进行封闭；改善封闭条件
	封闭不完全	使用高纯度 (IgG free) 的BSA
封闭液BSA中含IgG	充分洗涤，加入少量表面活性剂（吐温）提高洗涤效率	
	洗涤不充分	

问题	可能原因	优化方案
细胞呈扁平状	细胞片被风干	在任何时候都不要让细胞片干燥；使用湿盒
	使用了甲醇固定	甲醇可破坏细胞膜，因此不能很好保持细胞形态。改用甲醛或戊二醛等其他固定剂
细胞有自发荧光	使用了戊二醛固定	在固定后荧光染色前进行荧光淬灭，如使用NaIO ₄ ，NaBH ₄ ，甘氨酸等，染色前检查自发荧光
	材料本身（如石蜡）有自发荧光	
细胞模糊，封片剂明亮	因洗涤不充分导致背景太亮	充分洗涤
	二抗结合太弱	确保抗体牢固结合，确保固定良好
整个细胞片都出现荧光亮点	二抗浓度过高	降低二抗浓度
	二抗发生沉淀	过滤或离心荧光标记二抗

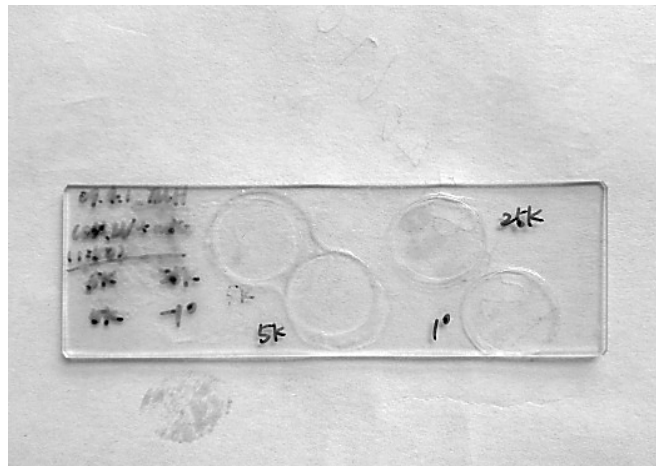
共聚焦推荐使用的耗材



Cover Glass:170um
Glass bottom dish



Cover Glass:170um
Cell Chamber Slides



显微镜室内温度控制在22°C，湿度在45-60%。

如需换物镜请在管理员老师的指导下更换

使用油镜时应使用专业油，不要用其它介质（如香柏），以免损伤物镜。每次使用完油镜后，需将油镜擦拭干净（物镜及样品）。

为保证安全，并尽可能延长光源的使用时间，激光器开关至少间隔1h.

刻录图像数据资料：应使用刻录光驱刻录，实验前应准备好刻录光盘

定期打扫实验室，保证工作环境的清洁。不要使用吸尘器，地面清洁需要使用墩布。

每天工作完成后，请使用防尘罩遮盖显微镜及扫描头



蔡司显微镜

—— 在身边的显微成像小助教

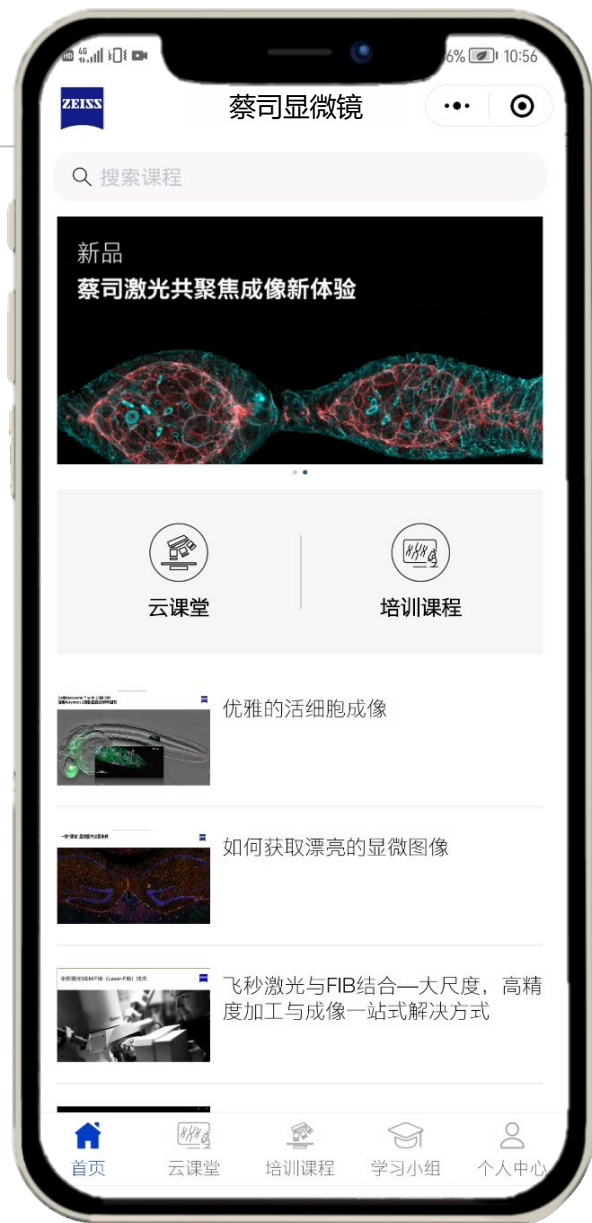


扫码关注或者直接搜索“蔡司显微镜”小程序



显微成像基础原理
显微镜操作方法及使用技巧
日常维护与保养
常见使用问题及解决方法
前沿显微技术知识

• • •





Seeing beyond