

武汉大学 WUHAN UNIVERSITY



医学研究院
Medical Research Institute



免疫与代谢前沿科学中心
Frontier Science Center for Immunology and Metabolism

显微镜新手上路

仪器设备共享中心
影像平台

目 录

Part 1 中心显微镜简介

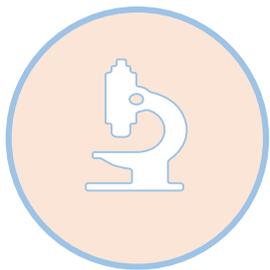
Part 2 中心显微镜配置

Part 3 优质成像关键点

Part 4 显微镜使用规定

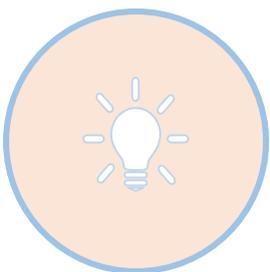
01

中心显微镜简介



共享中心现有**5台**显微镜：

2台正置式，2台倒置式，1台侧式



按荧光激发光源来分类：

- I类 —— **卤素灯**提供激发光
- II类 —— **激光器**提供激发光

I类



正置荧光显微镜

- Upright Fluorescence Microscope
- Zeiss Axio Image A2



玻片扫描显微镜

- Brightfield, Fluorescence & FISH Digital Pathology Scanner
- Leica Aperio VERSA 8

II类



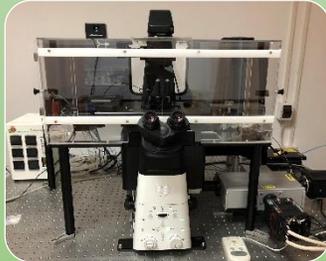
激光共聚焦显微镜

- Laser scanning confocal microscope (LSCM)
- Zeiss LSM 880 with AiryScan



光片荧光显微镜

- Light-sheet fluorescence microscope (LSFM)
- Luxendo MuVi-SPIM-CS



结构光照明显微镜

- Structured illumination microscope (SIM)
- Nikon N-SIM S



02

中心显微镜配置



正置荧光 显微镜

对固定在载玻片上的生物材料进行明场或荧光观察，
并数字成像，适用于组织切片、细胞爬片。

镜头	10×, 20×, 40×, 63× oil, 100× oil		
荧光滤片	滤块组	激发光谱	发射光谱
	DAPI	365-395nm	420-470nm
	GFP	450-490nm	500-550nm
	Rhodamin	530-560nm	575-640nm
检测系统	600W像素 CCD彩色相机		



玻片扫描 显微镜

该设备将明场、荧光和FISH全切片成像集成到一个系统中，能够进行HE染色分析、免疫化学染色分析、免疫荧光分析、荧光原位杂交（FISH）分析、组织芯片分析等。

镜头	1.25×, 5×, 10×, 20×, 40×, 63× oil		
荧光滤片	滤块组	激发光谱	发射光谱
	DAPI	325-375nm	435-485nm
	Aqua	420-440nm	475-500nm
	Green	530-560nm	575-640nm
	Gold	540-550nm	560-585nm
	Orange	535-555nm	570-605nm
检测系统	单色相机、彩色相机		



可用于组织切片、活细胞荧光标记、三维图像重建分析研究；细胞生物物质、离子的定性、定量、定时和定位分布检测等。

中心本台设备功能：多色荧光叠加、3D重构（Z-Stack）、荧光共定位、时间序列、多点扫描及拼图、光谱扫描及拆分、荧光漂白后恢复（FRAP）、荧光能量共振转移（FRET）、活细胞成像。

LSCM

镜头	10×, 20×, 40×, 63× oil, 100× oil
激光	405nm, 458nm, 488nm, 514nm, 561nm, 633nm
检测系统	两个PMT检测器, 一个GaAsP检测器, 一个Airyscan检测器, 一个透射光检测器
最高分辨率	普通模式: XY方向 260nm, Z方向 600nm Airyscan模式: XY方向 140nm, Z方向 400nm
可成像深度	100 μm
最快成像速度	普通模式: 13f/s (512 × 512) Airyscan模式: 5f/s (512 × 512)

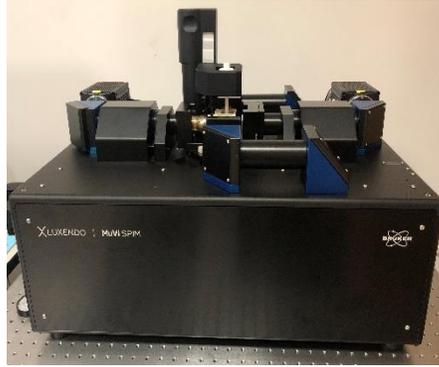


SIM技术是一种易操作的超分辨率成像技术，相比PALM/STORM技术和STED技术，SIM成像对荧光蛋白或分子要求少（常规荧光探针即可），时间分辨率高（可用作活细胞成像），荧光光子利用率高。

中心本台设备具有2D-SIM、3D-SIM、TIRF-SIM成像模式，适用于细胞生理学、细胞动力学等亚细胞水平的研究。

SIM

镜头	10×, 20×, 40×, 60× W, 100× oil, 100× Sil,
激光	405nm, 488nm, 561nm, 640nm
检测系统	两个ORCA-Flash 4.0 sCMOS Camera
最高分辨率	3D-SIM模式: XY方向 115nm, Z方向 269nm TIRF-SIM模式: XY方向 86nm
可成像深度	3D-SIM: 30 μ m (60×), 4 μ m (100×, buffer样品)
最快成像速度	15f/s (TIRF-SIM/2D-SIM, 2msec exposure)



光片显微镜的照明光是一张与成像面平行的“薄光片”，相比传统荧光照明方式，该设备具有低杀伤、高速度、高灵敏度的3D样品显微成像优势。

中心本台设备可用于小胚胎（如斑马鱼、线虫、果蝇、拟南芥等）发育过程的研究，也可用于透明化样品（如动植物组织、器官）三维结构成像。

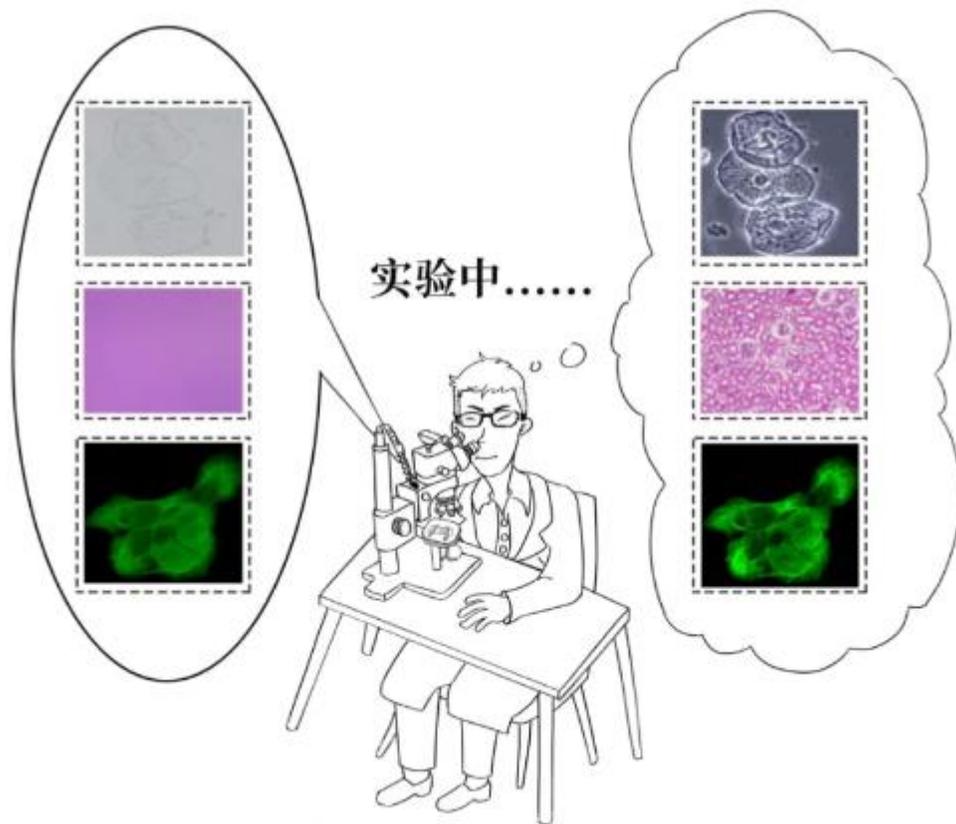
LSFM

镜头	照明物镜：10×（一对） 成像物镜：20×（一对，用于发育样品）；10×（一只，用于透明化样品）
激光	488nm, 561nm, 642nm
检测系统	两个Flash 4.0 sCMOS Camera
最高分辨率	XY方向：300nm（发育样品成像），600nm（透明化样品成像） Z方向：2 μ m（2.5 μ m光束厚度），旋转90度融合可达XY分辨率
可成像深度	发育样品1mm；透明化样品11.6mm
最快成像速度	80f/s (2048 \times 2048)

03

优质成像关键点

眼前的样子



想象中的样子

1

选择合适的显微镜

2

制备好的样品

3

设置恰当拍摄参数

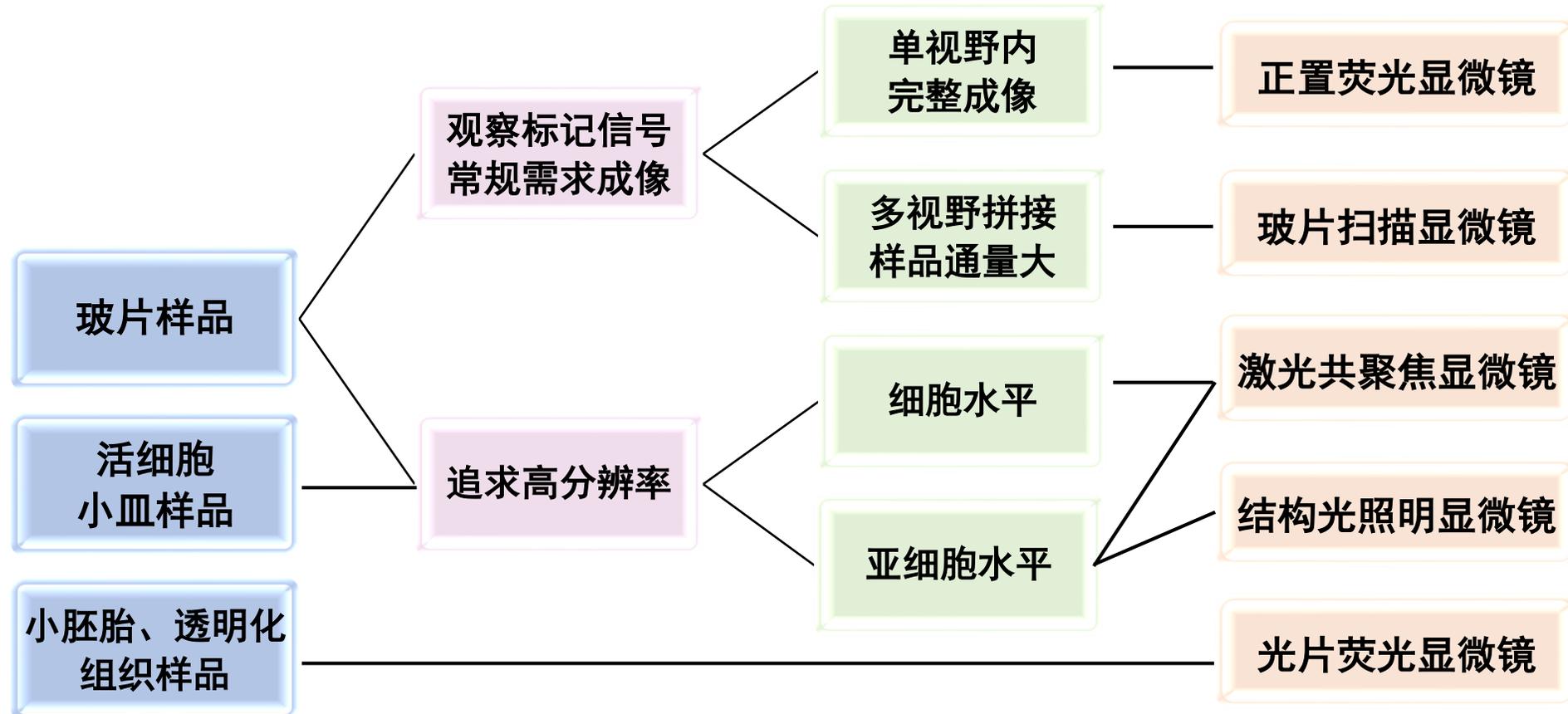
4

图像后期处理

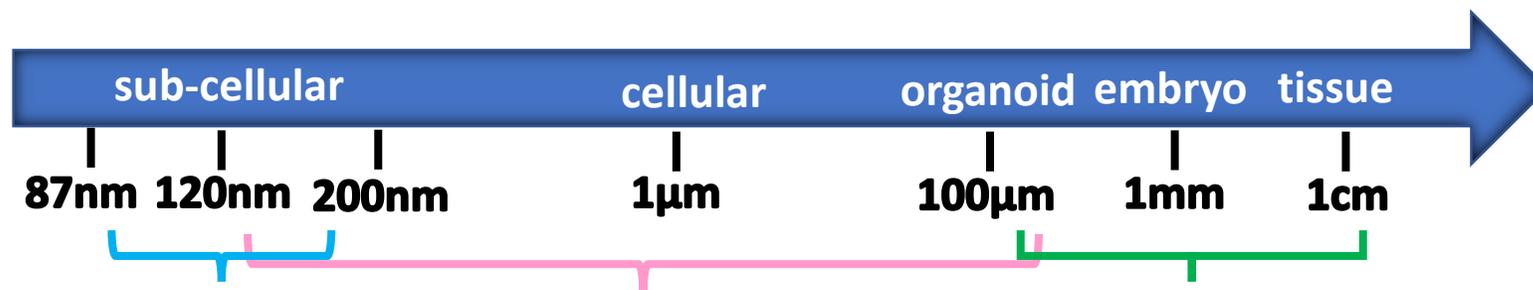
显微镜的选择

观察荧光是否表达，染色是否成功	→ 荧光体视镜/宽场显微镜
要求高质量成像	→ 共聚焦显微镜
拍精细结构，进一步追求分辨率	→ 超分辨率显微镜
想快速成像	→ 转盘共聚焦显微镜
拍摄更深的样品或活体成像	→ 双光子显微镜
培养皿，活细胞	→ 倒置共聚焦显微镜
玻片样品	→ 正置/倒置共聚焦显微镜
高通量，一次设置拍完多张玻片	→ 玻片扫描仪
透明化组织、整个斑马鱼	→ 光片显微镜

如何选择共享中心的显微镜



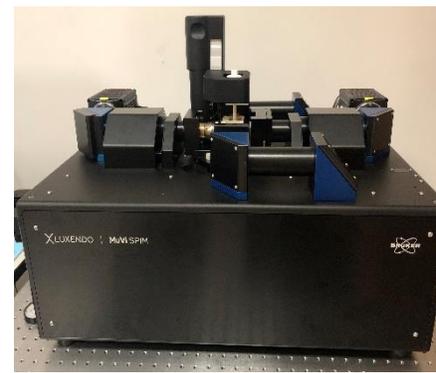
II类显微镜适用样品大小:



SIM



LSCM



LSFM

样品制备

载玻片

- 厚度要求0.8~1.2mm，载玻片必须光洁，厚度均匀，无自发荧光

盖玻片

- 厚度要求0.17mm，盖玻片质量越好，厚度误差越小

标本

- 不能太厚，如果太厚激发光大部分消耗在标本下部，而物镜观察到的上部不充分激发。另外，细胞重迭或杂质掩盖，影响判断

荧光标记

- 要考虑荧光亮度、光稳定性、设备兼容性，详见下一页

封片剂

- 无自发荧光，无色透明，折射率在1.3~1.518
- 封片前通过荧光显微镜检查染色是否成功，样品周围是否有杂质

荧光标记

用荧光基团来特异标记细胞或组织样品中感兴趣的区域

荧光标记常用方法

表达荧光蛋白

抗体偶联免疫荧光染料

细胞器及DNA特异性染料

离子敏感型荧光探针

.....

荧光标记选择因素

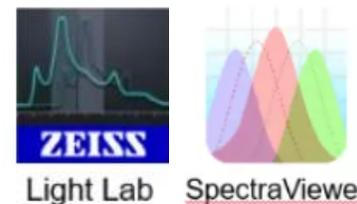
荧光亮度。荧光基团越亮，所需激发光能量越低，样品受光损伤越小

荧光基团的**光稳定性**，即抗漂白能力

设备兼容性。确认现有设备能检测所选择的荧光基团

如何了解染料或者蛋白的激光和发射光波长？

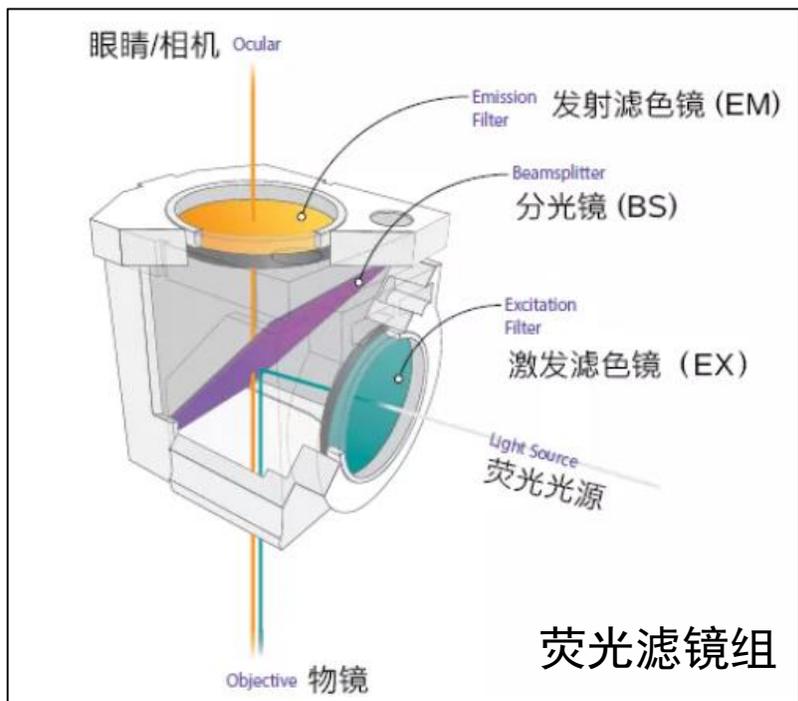
- 染料商业说明书
- ZEISS Light Lab (iSO系统) App
- Spectra Viewer (Android系统) App



样本进行多色荧光标记时，尽量选择多种颜色可选的染料，避免串色带来实验误差！

荧光滤色片

用于荧光显微光学系统，筛选激发光与发射光特征波段光谱

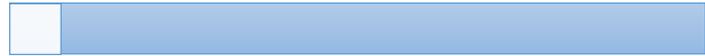


荧光滤镜组主要组成

- 激发滤色片 (EX)：只能让特定波段的激发光通过
- 分色镜 (BS)：反射激发光，透过发射光
- 发射滤色片 (EM)：只能让特定波段的发射光通过，进一步过滤未被分色镜滤掉的激发光和其它杂散光

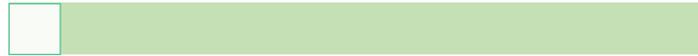
拍摄参数设置

物镜的选择



- 贴壁细胞，选择相差物镜
- 荧光样品，选择荧光物镜
- 液体细胞样品，水镜效果优于油镜
- 塑料孔板样品，选择长工作距离物镜

放大倍数与分辨率



- 大成像视野，选择低倍镜
- 高分辨率，选择高倍镜
- NA值越高，分辨率越高，而不是单纯比较放大倍数
- 高倍镜，需要更高的激光强度，要防止光漂白及光毒性
- 高倍镜，大图拼接，要考虑时间成本

图像信号获取



- 明确荧光标记的激发与发射光，选择正确的荧光滤镜组
- 设置激光强度、曝光时间、增益值等参数，使图像最大荧光强度处于dynamic range的50-75%，不要出现过曝
- 比较各组荧光强度时，要同一批制样，且拍摄参数一致
- 拍z-stack，在最亮一层设置参数，避免每层过曝

图像后期处理

- 优先保存显微镜厂家格式文件，因为原始文件包含了拍摄时的参数，方便日后查阅和参考。
- 如果需要图像分析和处理，导出无损压缩的PNG,TIFF或GIF格式，这些格式虽然缩小了图片大小，却保存了图像的原始信息。
- 避免将图片保存成JPG/JPEG格式，这样会损失图像质量和图像信息。
- ZEN，学习参考共享中心群文件视频，群号：415167194。
- Imaris，学习参考
<https://space.bilibili.com/512602011/video?tid=0&page=1&keyword=&order=pubdate>
- Fiji ImageJ，学习参考
https://space.bilibili.com/619936856?spm_id_from=333.788.b_765f7570696e666f.1

04

显微镜使用规定

使用总规定

- 中心所有显微镜，初次使用，需提前联系中心老师指导；
- 冬夏两季，使用显微镜前注意开空调，保持室温22-23°C；
- 使用油镜必须登记并清理，后一位用户应监督（清洁镜头、显微镜周边，或其他违规行为）；
- 显微镜使用完毕，通知下一位用户（间隔时间在1h内）接着使用，尽量避免重复开关荧光光源；
- 额外拷贝数据请在仪器空闲时段进行，不支持预约占用机时；
- 图像处理工作站，已安装正版Imaris、ZEN，不支持使用仪器配套PC分析处理图像。

共聚焦使用规定

- 中心共聚焦显微镜，必须参加新用户培训，才有资格使用；
- 用户参加培训后，首次使用，提前联系老师委托预约；
- 操作当日，中心老师评估操作，合格后授权用户自行预约使用；
- 普通用户可预约8：00-18：00，熟练操作者，可参加资深用户（24小时可约）的考核；
- 资深用户考核内容包括开关机操作、拍摄设置和注意事项，三次考核不合格，取消本学期的考核资格；
- 出现1次违规行为，用户资格依次降级（资深用户→普通用户→未授权用户）。