

激光扫描共焦显微镜技术

- 样品要求
- 原理
- 功能
- 在生物医学中的应用

激光扫描共焦显微镜技术及应用

**The techniques and application of
Confocal Laser Scanning Microscopy**

激光扫描共焦显微镜技术

人眼分辨率: 0.2mm

光学显微镜分辨率: 0.25 μ m

电子显微镜分辨率: 0.2nm

共焦显微镜分辨率: 0.18 μ m

激光扫描共焦显微镜技术

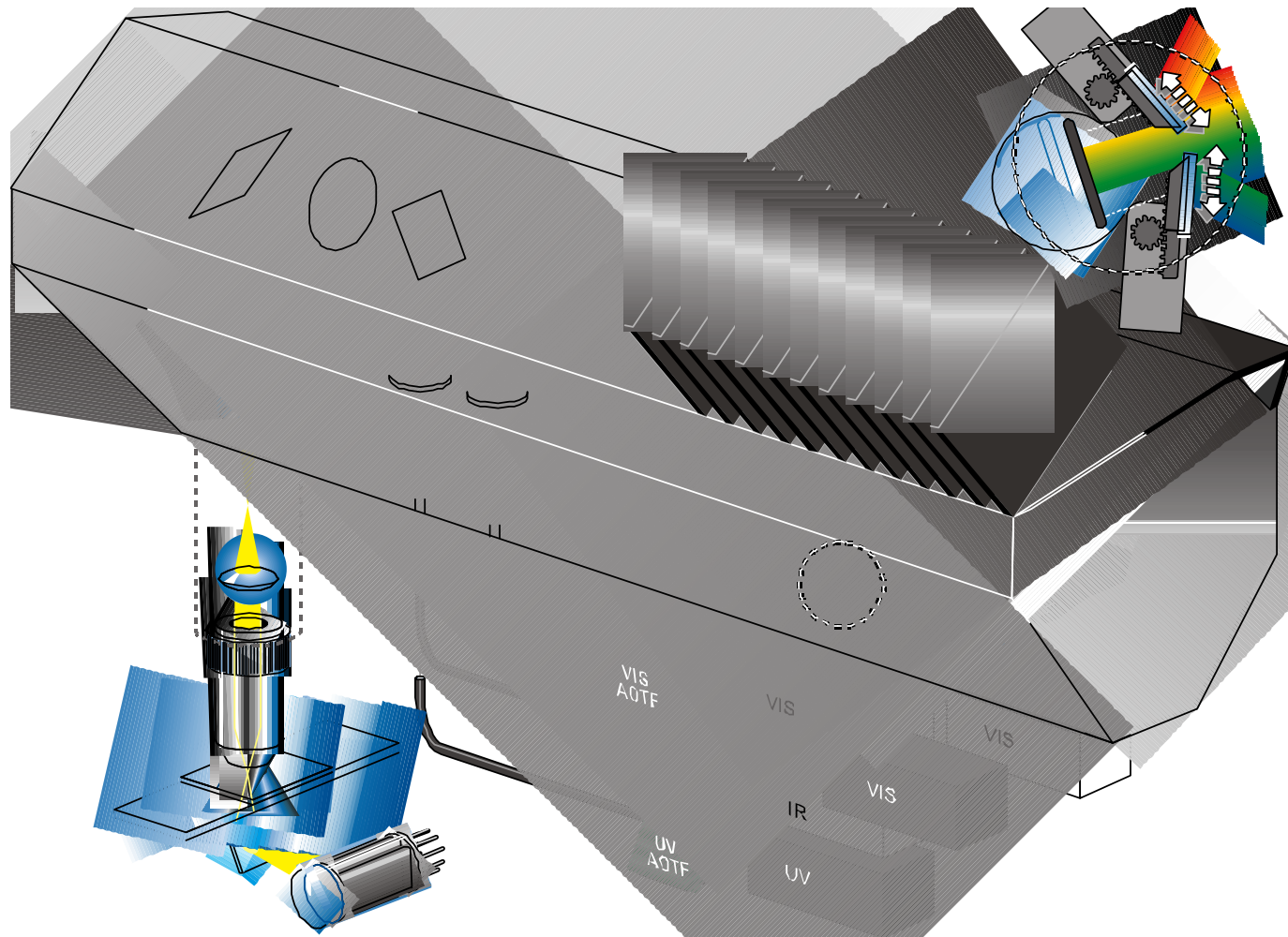
二、 原理

激光扫描共焦显微镜技术

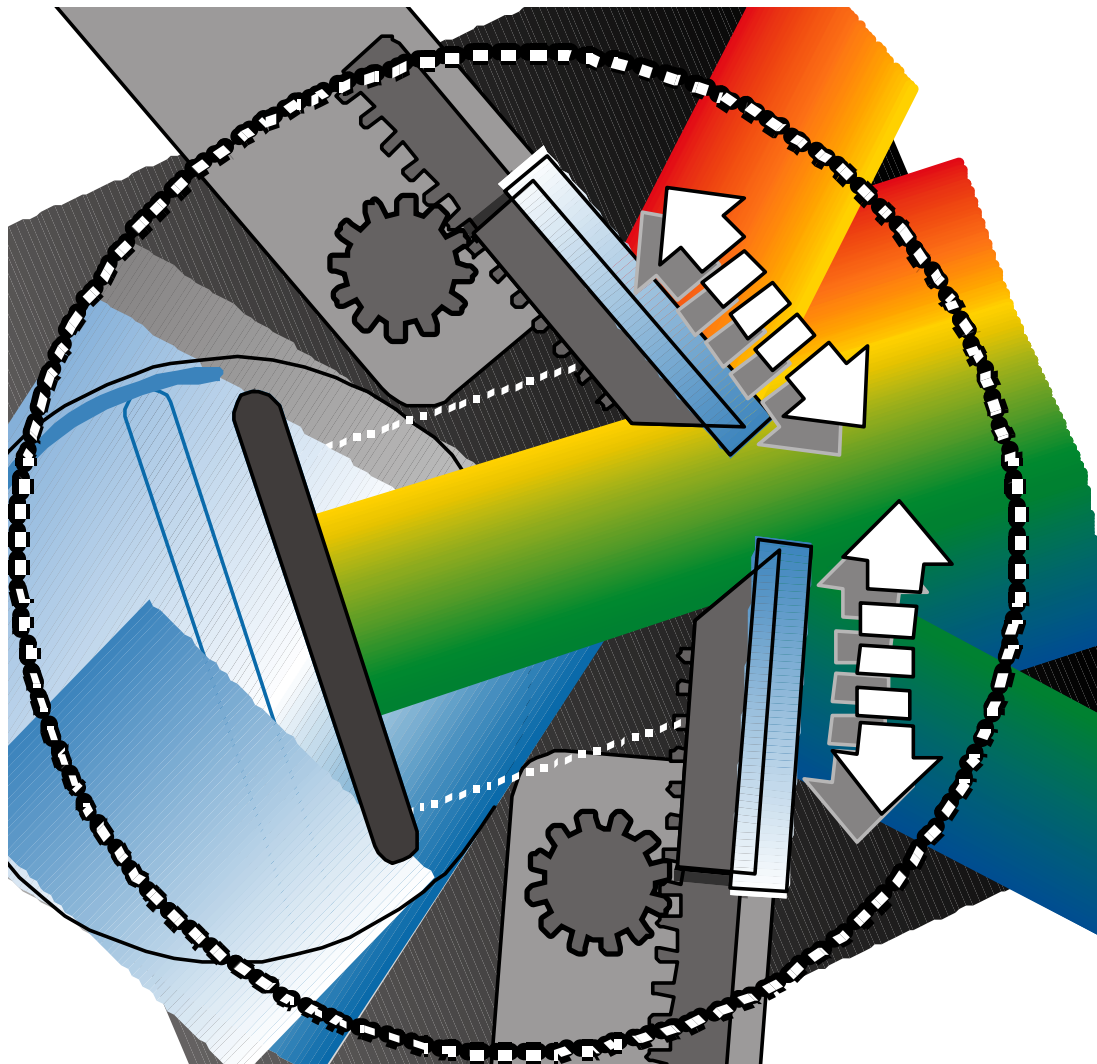
原理小结：

Confocal 利用放置在光源后的**照明针孔**和放置在检测器前的**探测针孔**实现**点照明**和**点探测**，来自光源的光通过照明针孔发射出的光聚焦在样品焦平面的某个点上，该点所发射的荧光成像在探测针孔上，该点以外的任何发射光均被探测针孔阻挡。**照明针孔**与**探测针孔**对**被照射点**或**被探测点**来说是**共轭**的，因此被探测点即共焦点，被探测点所在的平面即共焦平面。计算机以像点的方式将被探测点显示在计算机屏幕上，为了产生一幅完整的图像，由光路中的扫描系统在样品焦平面上扫描，从而产生一幅完整的**共焦图像**。只要载物台沿着 Z 轴上下移动，将样品新的一个层面移动到共焦平面上，样品的新层面又成像在显示器上，随着 Z 轴的不断移动，就可得到样品不同层面连续的光切图像。

激光扫描共焦显微镜技术



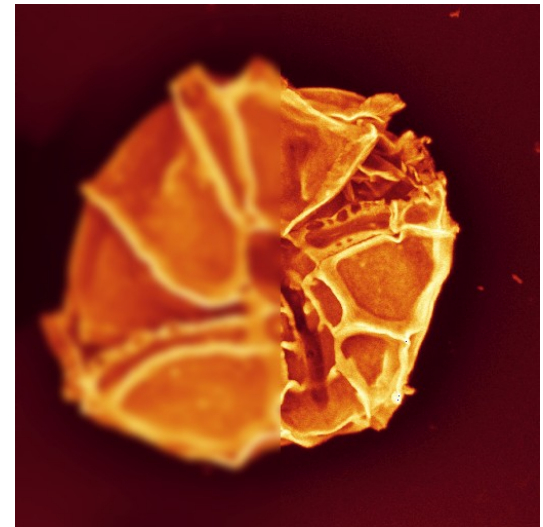
激光扫描共焦显微镜技术



激光扫描共焦显微镜技术

- 共焦显微镜与传统显微镜的区别

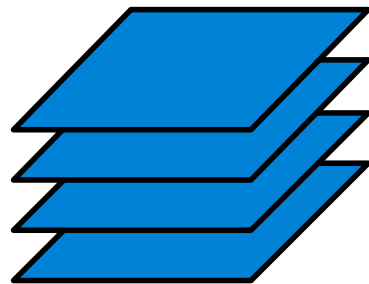
1. 抑制图像的模糊，获得清晰的图像



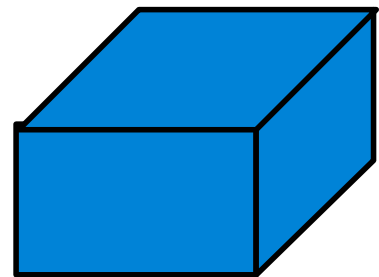
激光扫描共焦显微镜技术

- 共焦显微镜与传统显微镜的区别

2. 具有更高的轴向分辨率，并可获取连续光学切片



confocal

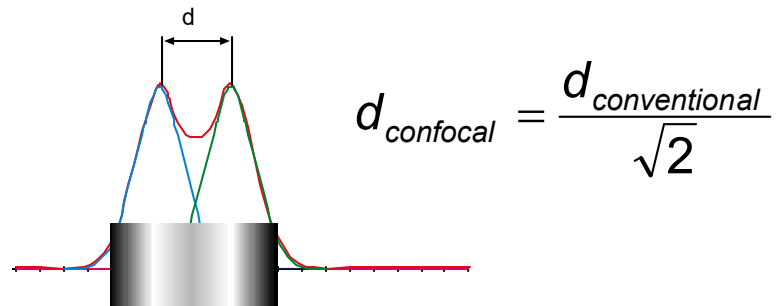


conventional

激光扫描共焦显微镜技术

- 共焦显微镜与传统显微镜的区别

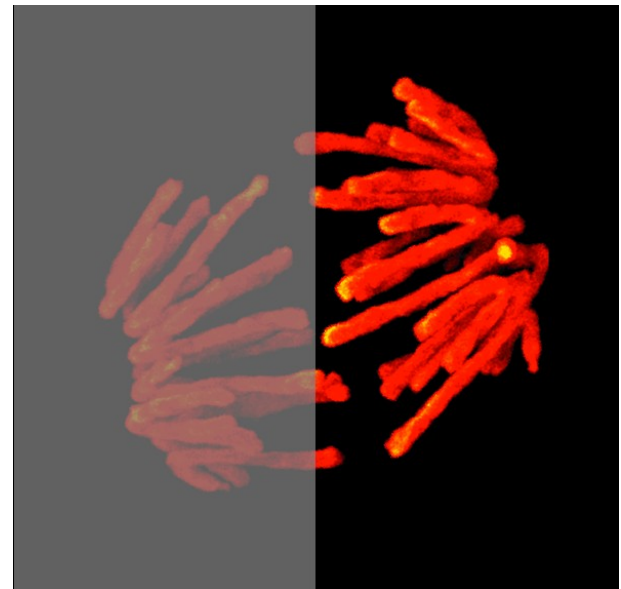
3. 增加侧向分辨率



激光扫描共焦显微镜技术

- 共焦显微镜与传统显微镜的区别

4. 由于点对点扫描去除了杂散光的影响



激光扫描共焦显微镜技术

三．激光扫描共焦显微镜的设计特点：

1. 点照明
2. 具有照明 pinhole 和探测 pinhole
3. 照明 pinhole 和探测 pinhole 共轭 (共焦), 共焦点即被探测点, 被探测点所在的平面为共焦平面
4. 具有扫描系统—— 逐点扫描成像
5. 具有多个 (四个) 荧光通道, 可同时探测多个被标记物

激光扫描共焦显微镜技术

- 技术指标 (Leica TCS SP2) :

1. xy 分辨率比传统显微镜小 1.4x

传统显微镜 : $R_{xy}=0.61\lambda/NA$ (**0.25 μm**)

Confocal: $R_{xy}=0.4\lambda/NA$ (**0.18 μm**)

2. 样品的最大厚度 :

取决于 : 物镜的 **NA** 、物镜的**工作距离**

激光的穿透力、样品的透明度

Z 轴的最大移动范围 (166 μm 、 **Z-wide**)

3. 样品的最小光切厚度 : (载物台最小移动距离为 40nm)

取决于 : 物镜的 NA 、针孔大小

Z 轴的最小移动步距 : 40nm

Z 轴的分辨率 : **0.35 μm**

激光扫描共焦显微镜技术

4. 激光器

Ar 激光器 : 458nm, 476nm, 488nm, 514nm

GreNe : 543nm; HeNe: 633nm

Ar 激光器 (UV): 361nm

- **激光器的特点 :**

1) 方向性好 : 激光基本沿直线传播

2) 单色性好 : $\Delta\lambda=10^{-8}\text{nm}$

3) 高亮度 : 激光方向性好 , 其在空间上的能量分布是高度集中的。

4) 偏振性 : 激光为平面偏振光 , 光纤耦合

激光扫描共焦显微镜技术

5. 四个荧光通道，一个透射光通道

即除了可同时采集多标记荧光图像外
还可以同时采集透射光图像，但透射光
图像为**非共焦图像**。

6. 扫描速度 :	slow 220lines/s	512×512	2-3 秒
	slow2 440lines/s (2 : 双向扫描)		
	medium 450lines/s	512×512	1.7 秒
	medium2 900lines/s		
	fast 1000lines/s	512×512	0.7 秒
		128×128	0.2 秒
	fast2 2000lines/s		

64×64
128×128
512×512
1024×1024
2048×2048

激光扫描共焦显微镜 技术的应用

**The application of Confocal Laser
Scanning Microscopy**

激光扫描共焦显微镜应用

功能 .

1. 多荧光标记样品的高清晰度、高分辨率图像采集
2. 无损伤、连续光学切片，显微“CT”
3. 真正的三维重组
4. 假三维图的显示
5. 可沿 Z 轴（xy 平面）和 Y 轴（xz 平面）方向进行光切
6. 定量分析
7. 时间序列扫描：xyt 、 xyzt 和 xt 扫描
8. 图像处理
9. 旋转扫描
10. 感兴趣区域扫描
11. 光谱扫描

激光扫描共焦显微镜应用

应用

- 定位、定量
 - 三维重组
 - 动态测量
- 化
- ◆ 活细胞或组织内游离 Ca^{2+} 分布和浓度的变化
 - 测量 (Mg^{2+} 、 Zn^{+} 、 Na^{+} 、 K^{+})
 - ◆ 自由基的检测
- 量
- ◆ 药物进入细胞的动态过程、定位分布及定量
 - ◆ 蛋白质的转位

激光扫描共焦显微镜应用

- 活细胞内 H^+ 浓度（ **pH 值** ）的测量
- 线粒体**膜电位**的测量
- 荧光漂白恢复（ **FRAP** ）的测量
- 笼锁解笼锁的测量
- 荧光能量共振转移（ **FRET** ）的测量
- 其他应用

激光扫描共焦显微镜应用

一、定位、定量

- 免疫荧光标记（单标、双标或三 标）的定位、定量：如：细胞膜受体或抗原的分布，
微丝、微管的分布、 两种或
三种蛋白的共存与共定位、蛋白与细胞器的共定位、核转录因子转
位和干细胞的增值、分化
- 细胞凋亡：AnnexinV-fitc + PI
末端原位杂交 -fitc + PI
- 荧光原位杂交： 染色体基因定位

激光扫描共焦显微镜应用

- 定位、定量研究中常用荧光探针

1.Amine-Reactive Probes

与抗体耦联、与配体耦联、与肽耦联、与人工合成的寡聚核苷酸耦联的探针，可用于免疫组化、荧光原位杂交、受体标记等

Green

FITC 494/518

(异硫氰基荧光素)

Alexa Fluor 488 488/530

Red

TRITC 544/572

(四甲基异硫氰基罗丹明)

PE 565/578

(藻红蛋白)

Texas Red 595/615

(德州红)

Cy3 558/568

Fura-red

Cy5 650/690

BODIPY FL 503/512

BODIPY TMR 543/569

**BODIPY TR
592/618**

激光扫描共焦显微镜应用

1) 细胞表面抗原、胞内某种蛋白

免疫荧光标记：与抗体耦联，

直标：一抗 + 荧光探针

间标：二抗 + 荧光探针

如：微管蛋白 tubulin (抗 tubulin 抗体 + 荧光探针)

肌动蛋白 actin (Phalloidine + 荧光探针)

2) 细胞膜表面受体

配体 + 荧光探针

如：nAChR、mAChR、多巴胺受体 (D1,D2)

标记 Gm1: 霍乱毒素受体

霍乱毒素 + FITC

激光扫描共焦显微镜应用

2. 标记细胞器荧光探针

1) 线粒体 Mitochondria

Rodamin 123 505/534 , 可染活细胞, 阳离子, 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 FM 490/516, 染活细胞或固定细胞 ,
稳定不漏出

Mitotracker Orange CMTMRos 551/576, (氧化型)

Mitotracker Orange 还原型, 只能染活细胞

激光扫描共焦显微镜应用

2) 溶酶体 Lysosome

中性红 541/640: 微偏碱性, 可标记溶酶体等酸性器官
为非特异性

AO :

LysoTracker Green DND-26 504/511, 染活细胞

LysoTracker Blue

LysoTracker Red

3) 内质网 Endoplasmic Reticulum

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

4) 高尔基体 Golgi apparatus

NBD C6-ceramide 466/536, 可染活或死细胞

激光扫描共焦显微镜应用

◆ 细胞器的单克隆抗体

5) 细胞核

PI propidium iodide	536/617	DNA\RNA	死细胞
碘化丙啶			
EB ethidium bromide	518/617	DNA/RNA	死细胞
Hoechst 33342	352/461	DNA A-T	活细胞
Hoechst 33258	352/461	DNA A-T	活细胞
DAPI	358/461	DNA A-T	半通透细胞
Chromomycin A3	450/470	DNA G-C	
AO	500/526	DNA	活细胞
	560/650	RNA	
TOTO-1	514/533	DNA	死细胞
SYTO11~16 20~24	488/ 520		活细胞
SYTO11~16 20~24	521/ 556		活细胞
SYTO 17	621/634		活细胞

激光扫描共焦显微镜应用

3. GFP 绿色荧光蛋白

GFP 的发现：60 年代，Shimomura 等首先从水母中分离出一种水母发光蛋白 (aequoren)，该蛋白与钙和肠腔素结合后可产生蓝色荧光。然而水母整体提取的颗粒都呈绿色，后经证实在水母体内还存在另外一种发光蛋白即绿色荧光蛋白 GFP，后经研究表明，在水母体内 Ca^{2+} 和肠腔素与水母发光蛋白结合后，水母发光蛋白产生蓝色荧光，GFP 在蓝光的激发下，产生绿色荧光。

将外源基因与 GFP DNA 相连，GFP 可作为外源基因的报告基因实时监测外源基因的表达。

激光扫描共焦显微镜应用

GFP 主要应用：

- 对活细胞中的蛋白质进行准确定位及动态观察
可实时原位跟踪特定蛋白在细胞生长、分裂、分化过程中或外界刺激因子的作用下的时空表达，如某种转录因子的核转位、蛋白激酶 C 的膜转位等。
- GFP 基因与分泌蛋白基因连接后转染细胞，可动态观察该分泌蛋白分泌到细胞外的过程
- GFP 基因与定位于某一细胞器特殊蛋白基因相连，就能显示活细胞中细胞核、内质网、高尔基体、线粒体等细胞器的结构及病理过程
- 可用于观察分子的运动（FRAP）
- 蛋白之间的相互作用（FRET）

激光扫描共焦显微镜应用

三. 动态测量

- Physiology: 细胞内离子动态变化测量

1). 游离 Ca^{2+} 测量

检测游离 Ca^{2+} 变化荧光探针的原理：这类探针多为 Ca^{2+} 螯合剂，不与 Ca^{2+} 结合时不发荧光，通常也不能进入细胞膜，只有与乙酰甲酯 AM 相连方可进入细胞内，被细胞内酯酶水解后并与胞内游离钙结合后发出荧光。 K_d 值为 Ca^{2+} 解离常数，表明检测 Ca^{2+} 浓度的范围： $0.1 \times K_d - 10 \times K_d$ ， K_d 和很多因素有关，如 pH、 Mg^{2+} 、与蛋白的结合、温度等。细胞内生理 Ca^{2+} 浓度值 (10-100n M)，细胞内 Ca^{2+} 超载浓度值（基础 Ca^{2+} 浓度的10倍左右）

激光扫描共焦显微镜应用

荧光探针 K_d	激发波长		发射波长
FLuo3-AM, K^+ , dextran	506nm	525nm	390nM
Fluo4	506nm	525nm	
Calcium Green-1	507nm	530nm	190nM
Calcium Green-2	507nm	535nm	550nM
Fura red	420/480nm	637nm	140nM
Oregon Green 488	494nm	520nm	20,000nM
Calcium Crimson	583nm	602nm	328nM
Indo-1	356nm	405/458nm	230nM
Fura-2	340/380	476nm	145nM

激光扫描共焦显微镜应用

- 程序化测量：用 timelapse 中的编程按钮可进行不同时间序列的扫描测量。

$$\Delta F/F = (F - F_{\text{base}}) / (F_{\text{base}} - F_{\text{BG}})$$

•Ca²⁺ 浓度绝对测量

1) 单波长公式法

Fluo3: 530nm K_d=450nM

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F)$$

F_{min}: 细胞内无钙时的荧光强度 (MnCl₂)

F_{max}: 细胞内钙饱和时的荧光强度 (A23187)

- 测量时切记细胞内静息 Ca²⁺ 浓度的相对荧光强度值不能太低 (F 值不低于 40)

激光扫描共焦显微镜应用

细胞内生理 Ca^{2+} 浓度值 (10^{-8} - 10^{-7} M)

细胞内 Ca^{2+} 超载浓度值 (基础 Ca^{2+} 浓度的**10倍左右**)

2) 标准曲线法

根据仪器条件和负载条件, 以不同 Ca^{2+} 浓度的 Buffer (EGTA- Ca^{2+}) 做标准曲线, 横轴为 Ca^{2+} 浓度, 纵轴为荧光强度

3) 比例荧光的测量

. 双波长 (比例荧光: ratio)

Indo1(360, 420/480), fura2(340/380, 440)

$$[\text{Ca}^{2+}]_I = K_d(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) F_{f2} / F_{s2}$$

激光扫描共焦显微镜应用

快速 Ca^{2+} 变化的测量

1. 改变扫描速度
2. 采用双向扫描
3. 减少采样点数 (牺牲空间分辨率)
4. 采用线扫描 (xt)

激光扫描共焦显微镜应用

•细胞器的 Ca^{2+} 测量

1. 线粒体内游离 Ca^{2+} 测量

Fluo-3 + TMRM(线粒体荧光探针, 红色)

2. 特异定位的重组水母发光蛋白

水母发光蛋白与 Ca^{2+} 结合后发蓝光

用含有水母发光蛋白和含有特定细胞器蛋白的表达载体转染细胞, 可测定亚细胞器内的游离 Ca^{2+} 变化

目前已商品化的探针可检测: 线粒体、内质网、细胞核内的游离 Ca^{2+} , 因生物发光很弱不能使用 Confocal 检测

激光扫描共焦显微镜应用

细胞内游离 Ca^{2+} 测量的应用

●钙的特性

1. 细胞内外的电化学梯度 10^3 – 10^4 倍
2. 细胞膜渗透性稍有改变或钙库释放稍有增加，导致胞内钙明显升高
3. 细胞内钙为细胞激活“开关”

●细胞内钙的生理作用

1. 肌肉的兴奋收缩 - 收缩偶联
2. 神经递质的释放
3. 学习记忆的增强
4. 卵子受精
5. 细胞分裂和再生
6. 细胞调亡
7. 细胞间通讯

激光扫描共焦显微镜应用

8. 细胞信号传导

9. DNA 合成

10. 基因表达

●细胞内钙超载与疾病

1. 高血压、脑缺血、心脏病、内分泌病—胞内钙浓度异常
2. 糖尿病、风湿性关节炎、多发性硬化病—胞内钙浓度增高
3. 人体缺钙—骨钙大量丢失，神经细胞的钙浓度增高
4. 老化和老年性痴呆—神经细胞内钙浓度增高

细胞内生理 Ca^{2+} 浓度值 (10^{-8} - 10^{-7} M)

细胞内 Ca^{2+} 超载浓度值 (基础 Ca^{2+} 浓度的10倍左右)

激光扫描共焦显微镜应用

- pH 值的检测:

BCECF-AM	490nm	530nm	6.5-7.5
----------	-------	-------	---------

Snarf-1-AM	488nm	580/640nm	7.0-8.0
------------	-------	-----------	---------

激光扫描共焦显微镜应用

• 自由基的检测

荧光探针： $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (504nm/529nm)

$^{88}\text{2- 氢, 2氯荧光素乙酰乙酸盐}$

胞外 $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ $\longrightarrow$ 扩散入细胞内 $\longrightarrow$ 酯酶脱乙酰

DCF-H (不荧光) $\longrightarrow$ DCF (发荧光)

* 样品不能在镜下用汞灯照射及观察

$\text{Dihydrorhodamine 123}$ (507nm/529nm)

$\text{H}_2\text{rhod123}$ $\longrightarrow$ 被动扩散入细胞内 $\longrightarrow$ 在细胞内被氧化成 rod123 (发光)

激光扫描共焦显微镜应用

- 药物进入细胞的动态过程及定位分布

xyzt 扫描

激光扫描共焦显微镜应用

四. 膜电位的测量

标记膜电位探针(慢反应)：

JC1	510nm	530/590nm
-----	-------	-----------

Dioc5(3)	548nm	573nm
----------	-------	-------

Dioc6(3)	484nm	500nm
----------	-------	-------

快反应探针：

Di-4-ANEPPS	496nm	703nm
-------------	-------	-------

Di-4-ANEPPS	498nm	713nm
-------------	-------	-------

细胞膜静息膜电位： -70mV

线粒体膜电位： -150mV

以上均属于阳离子探针，更容易与线粒体亲和，为线粒体膜电位探针

激光扫描共焦显微镜应用

七. 荧光能量共振转移 (fluorescence Resonance Energy Transfer)

能量转移：能量从分子的一个部位向另一个部位的传递，或能量从一个分子向另一个分子传递。能量的提供者叫**能量供体**，能量的接受者叫**能量受体**。

荧光能量共振转移的条件：

- 两个荧光分子：**供体** -FL1 ， **受体** -FL2
- 供体与受体的距离在 **2-7nm**
- 供体的**发射波长**与受体的**激发波长**一致

激光扫描共焦显微镜应用

样品要求:

1. 经荧光探针标记（单标、双标、三标）
2. 固定的或活的组织
3. 固定的或活的贴壁培养细胞应培养在 Confocal 专用小培养皿或盖玻片上
4. 悬浮细胞，甩片或滴片后，用盖玻片封片

激光扫描共焦显微镜应用

激光扫描共焦显微镜的发展趋势：

- 连续光谱型 Confocal
- 多光子激光扫描显微镜——
Multiphoton Laser Scanning Microscopy

- **双（多）光子激光扫描显微镜的优势**

多光子激光扫描显微镜简介

1. 多光子激光器波长从 700-1000nm 连续可调

双光子波长: 350-500nm 连续

三光子波长: 230-330nm 连续

应用: 可直接清晰活体观察某些**非标记**神经递质的
分泌 (5-HT) 或 NADPH 的分布

例 4 长时间观察活体阿尔茨海默病模型 小鼠 β -淀粉蛋白形成的状况

Long-term *in vivo* imaging through thinned skull. In a recent study, Christie *et al.* [45**] investigated senile plaques (β -amyloid peptide deposits) in the neocortex of transgenic mice that serve as a model of Alzheimer's disease. Plaques were stained with thioflavine S, applied through a small hole in the skull, and the plaques were repeatedly imaged over several months through the thinned skull ($\sim 20\ \mu\text{m}$ thickness). In the examples shown here, cortical vasculature was counterstained by injecting fluorescein into the tail vein. Two-channel volume-rendered images of thioflavine S plaques (red) and fluorescein angiograms (green) taken from the same animal during the initial imaging session (left images) and 104 days later (right images). Four clearly imaged plaques can be seen in these volumes, labeled A–D. The graph below represents the percentage change in diameter for each plaque. The plaques labeled A and B increased in size by about 50%, plaque C remained the same size, and plaque D decreased by 40%. Changes in size (such as for plaques A, B and D) were, however, exceptions. Christie *et al.* found that most plaques remained stable in size and shape over time, supporting a dynamic feedback model of plaque growth. Reprinted with permission from [45**].

