尼康广州 Nikon

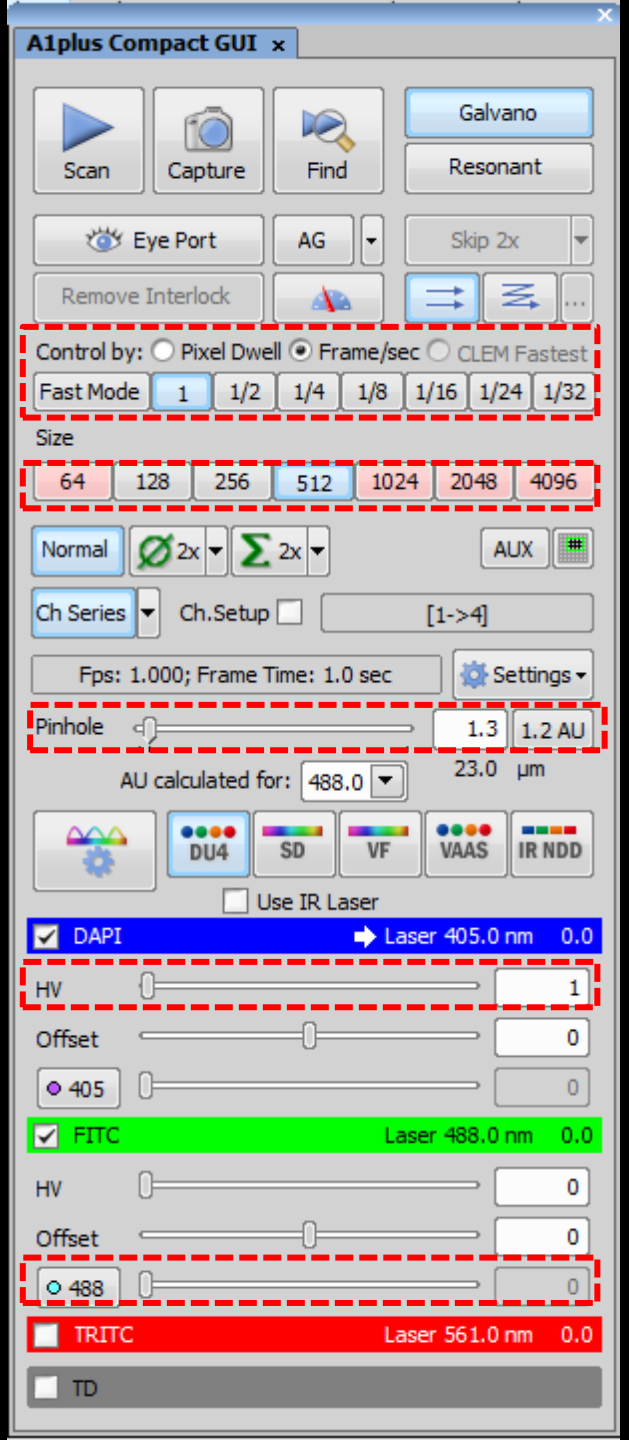
共聚焦图像优化使用技巧

段妍　　尼康仪器（上海）有限公司



共聚焦显微镜使用技巧

成像参数设置



❑ 共聚焦关键参数

尼康广州 Nikon

① 扫描速度/驻留时间（影响成像速度，亮度）

②扫描分辨率（影响成像速度，分辨率）

1024x1024最常用

③ 针孔大小（影响分辨率，亮度）

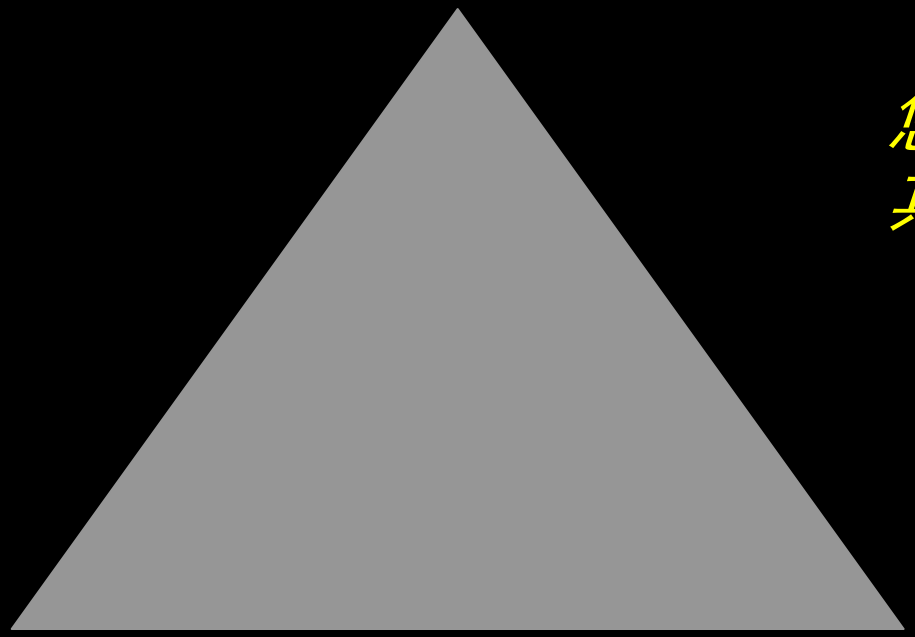
1.2AU

④HV（影响亮度，噪声）

控制在100以下可以获得较好性噪比

⑤ 激光功率（影响亮度，光漂白）

三角定律

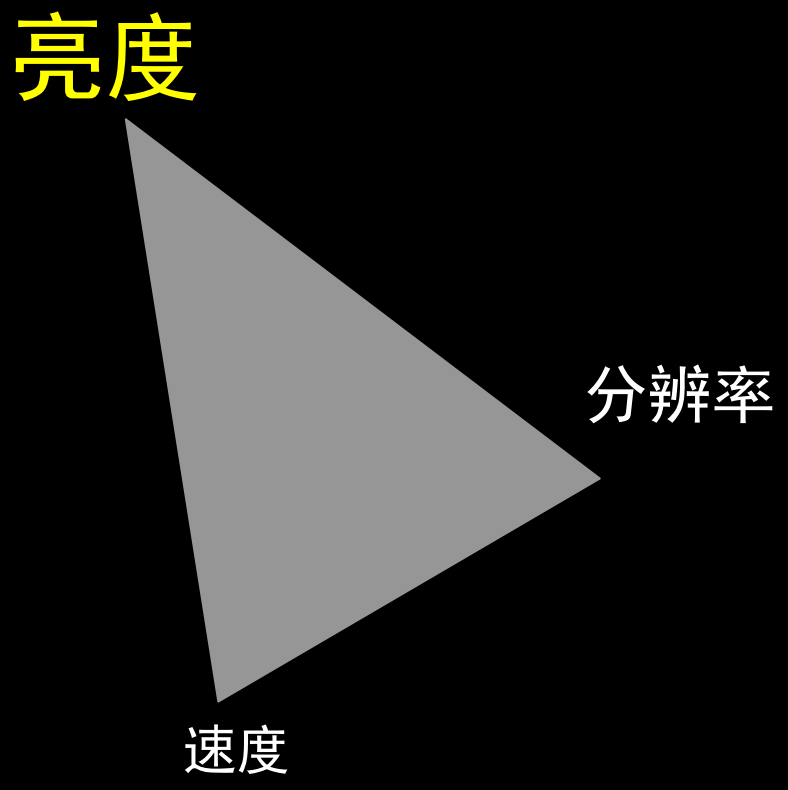


您只能同时提高
其中两个指标！

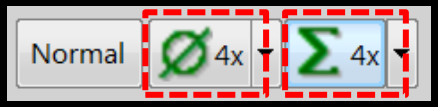
❑ 弱荧光样品的拍摄

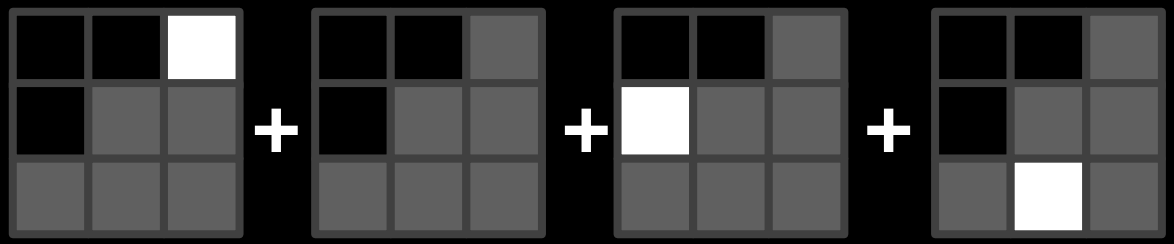
- ✓ 降低扫描速度
- ✓ 增加HV
- ✓ 加大激光功率
- ✓ 开大共聚焦针孔

- ✓ 使用平均和加和

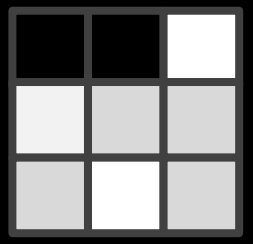


❑ 平均 & 加和

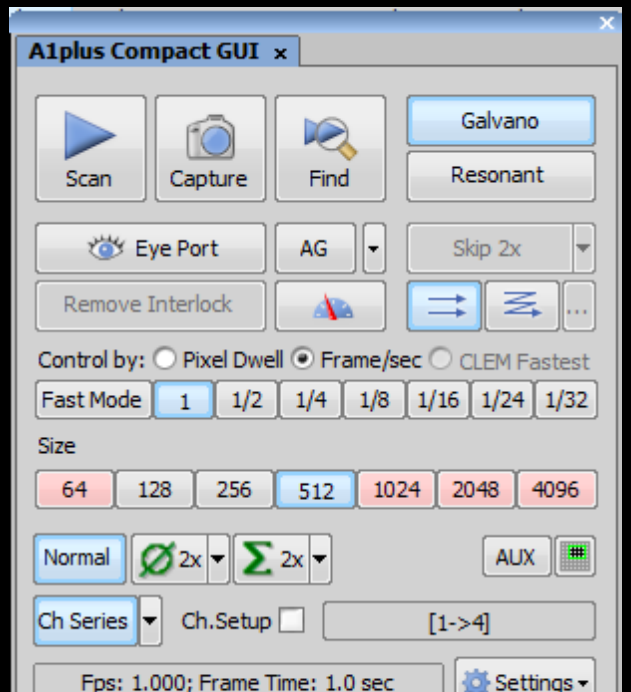

Normal
4x
4x



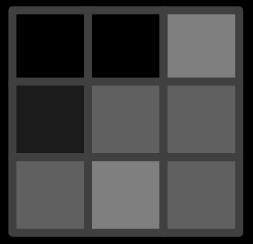
=



（加和）


A1plus Compact GUI
Scan
Capture
Find
Galvano
Resonant
Eye Port
AG
Skip 2x
Remove Interlock
Control by: Pixel Dwell Frame/sec CLEM Fastest
Fast Mode 1 1/2 1/4 1/8 1/16 1/24 1/32
Size
64 128 256 512 1024 2048 4096
Normal
2x
2x
AUX
Ch Series
Ch.Setup
[1->4]
Fps: 1.000; Frame Time: 1.0 sec
Settings

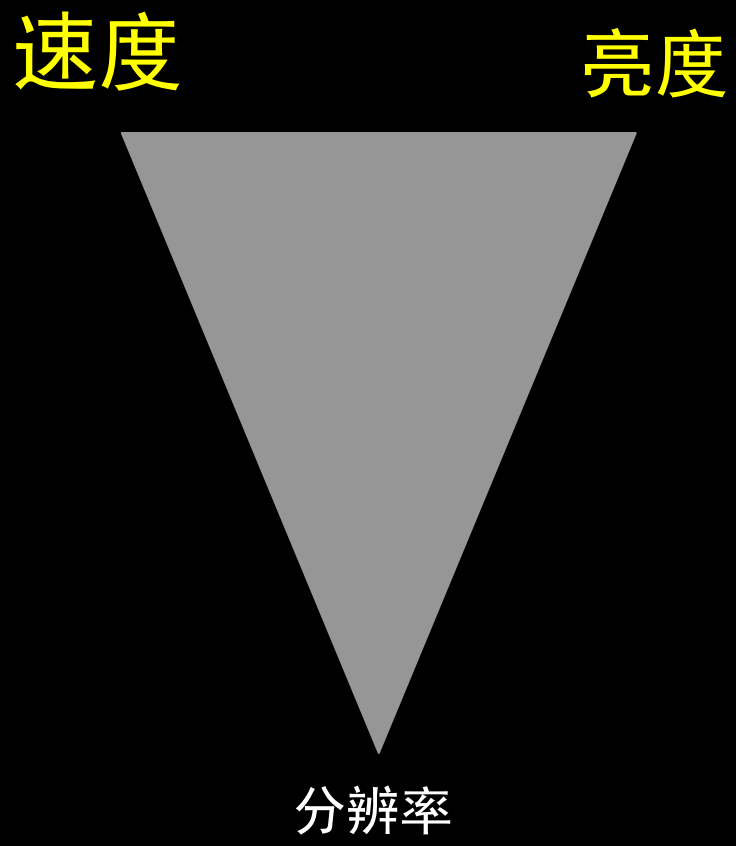
/ 4 =



（平均）

❑ 易淬灭样品的拍摄

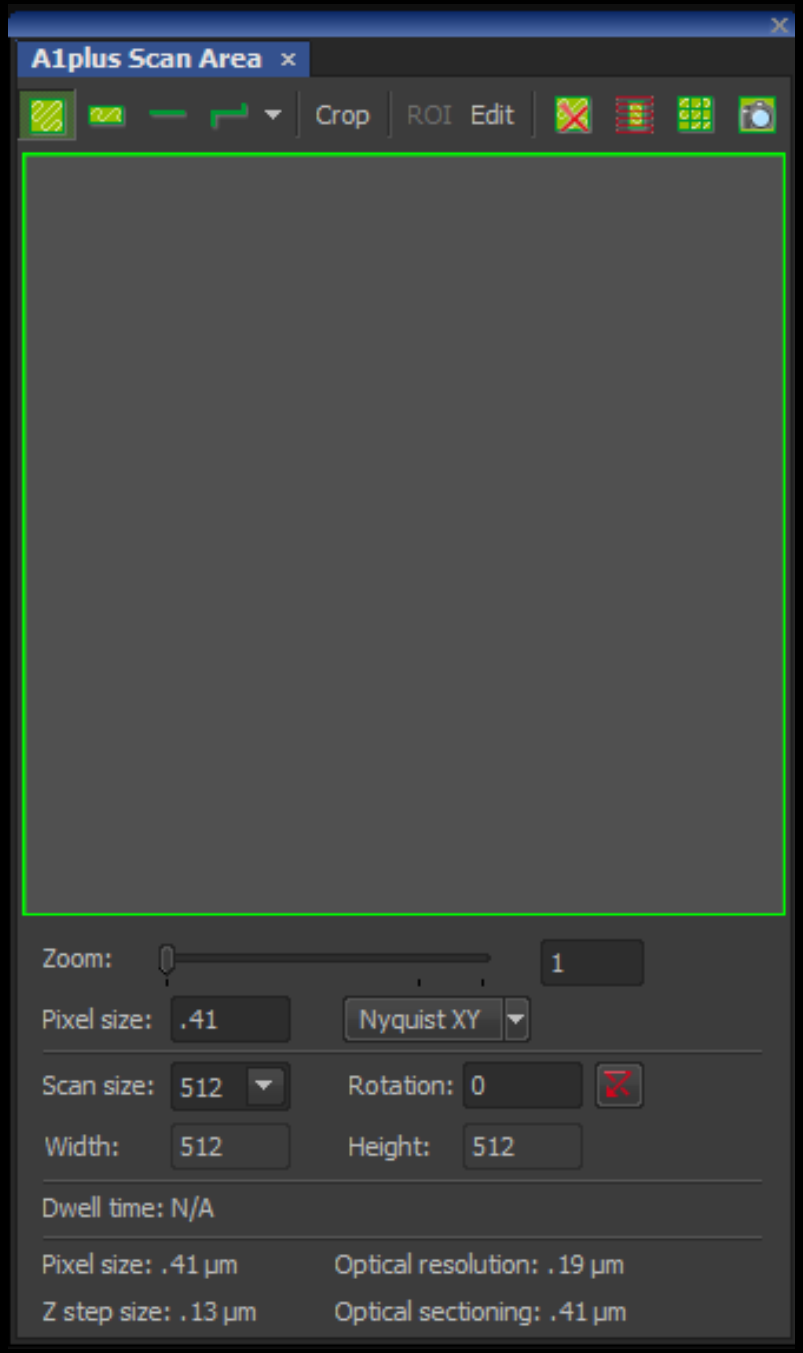
- ✓ 提高扫描速度
- ✓ 降低扫描分辨率
- ✓ 减小激光功率
- ✓ 增大HV
- ✓ 开大共聚焦针孔

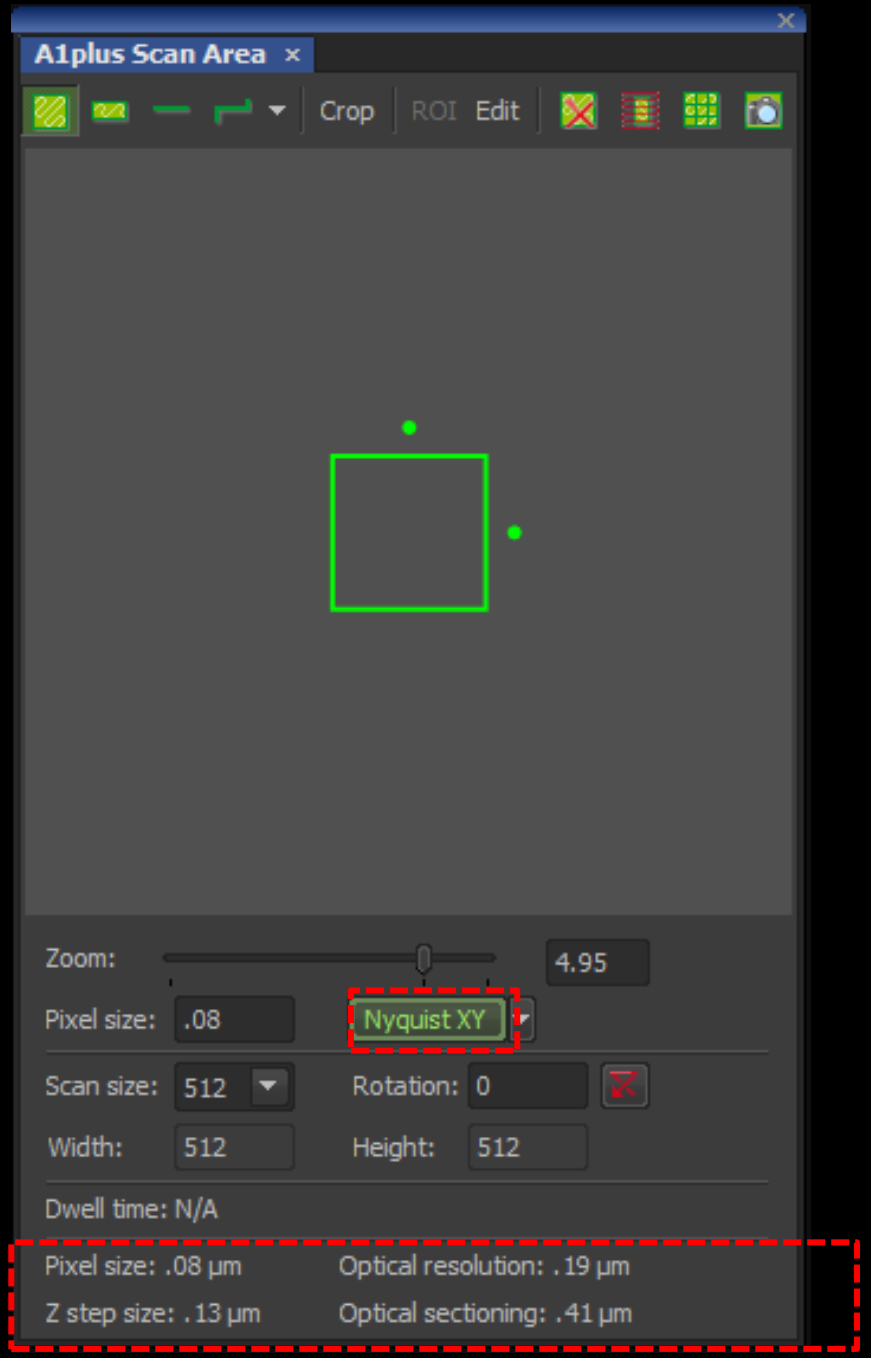


❑ 共聚焦中的分辨率

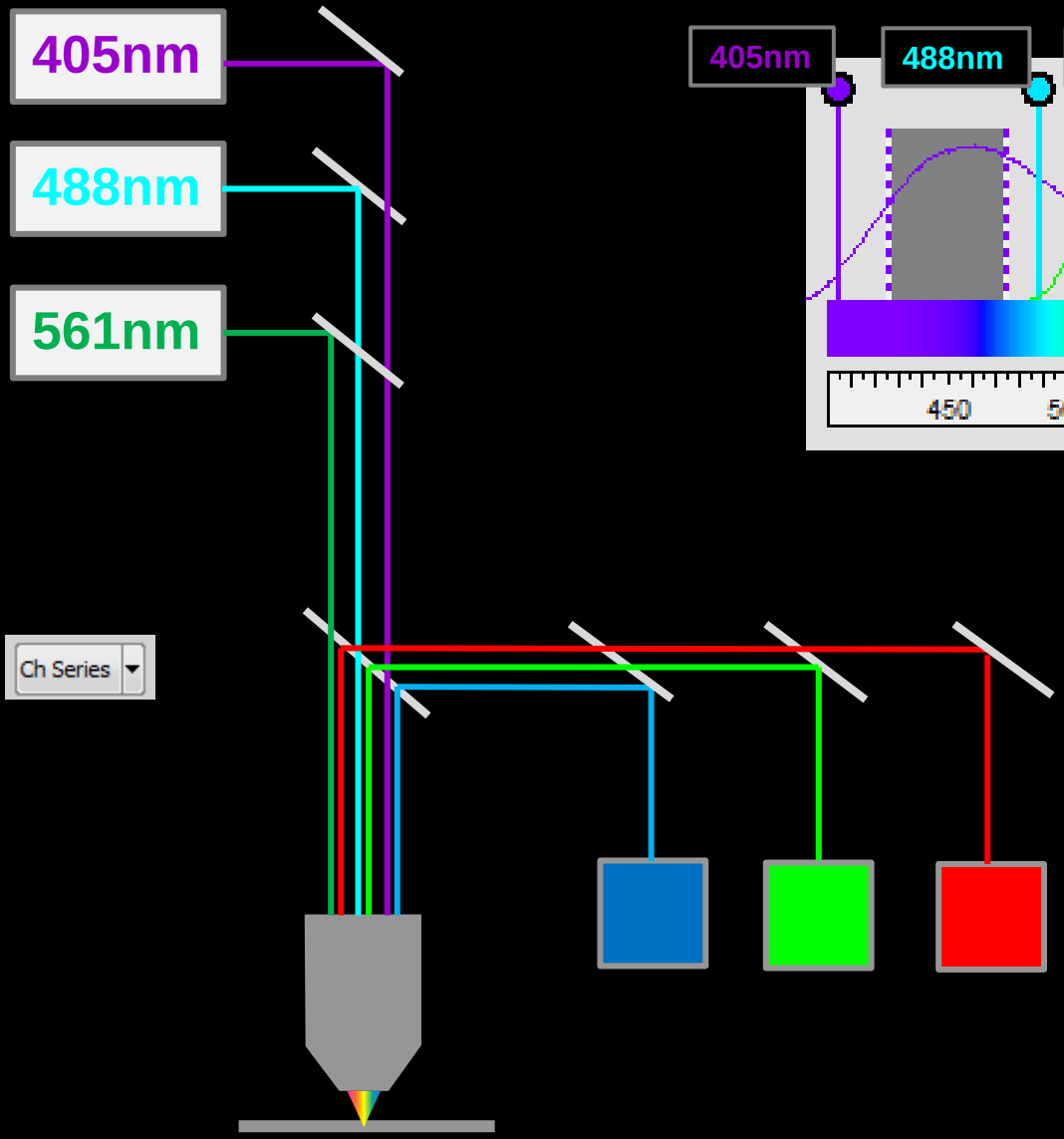
- 光学分辨率 **由物镜的数值孔径决定**
- 扫描分辨率(像素大小) **扫描分辨率 ≤ 光学分辨率/2.44**

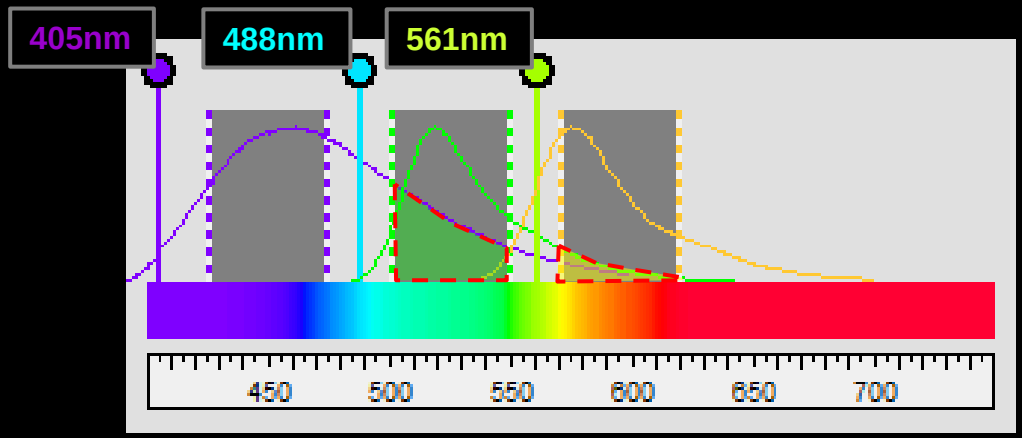
- Z轴分辨率(切层厚度) **由物镜的数值孔径，针孔大小决定**
- Z轴扫描步进 **Z轴步进≤ Z轴分辨率/2.44**

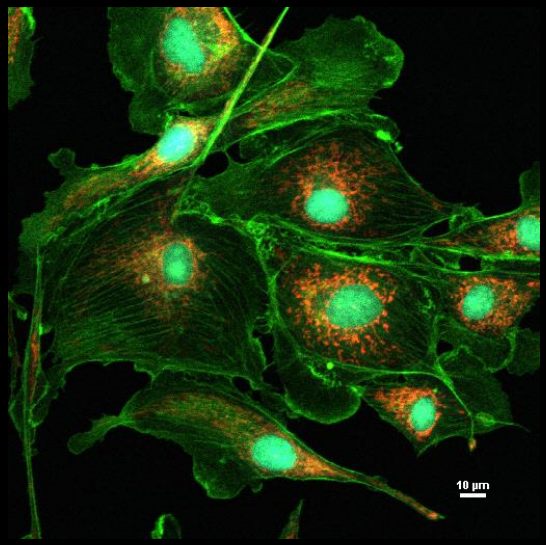

A1plus Scan Area
Crop
ROI
Edit
Zoom:
1
Pixel size:
.41
Nyquist XY
Scan size:
512
Rotation:
0
Width:
512
Height:
512
Dwell time: N/A
Pixel size: .41 µm
Optical resolution: .19 µm
Z step size: .13 µm
Optical sectioning: .41 µm


A1plus Scan Area
Crop
ROI
Edit
Zoom:
4.95
Pixel size:
.08
Nyquist XY
Scan size:
512
Rotation:
0
Width:
512
Height:
512
Dwell time: N/A
Pixel size: .08 µm
Optical resolution: .19 µm
Z step size: .13 µm
Optical sectioning: .41 µm

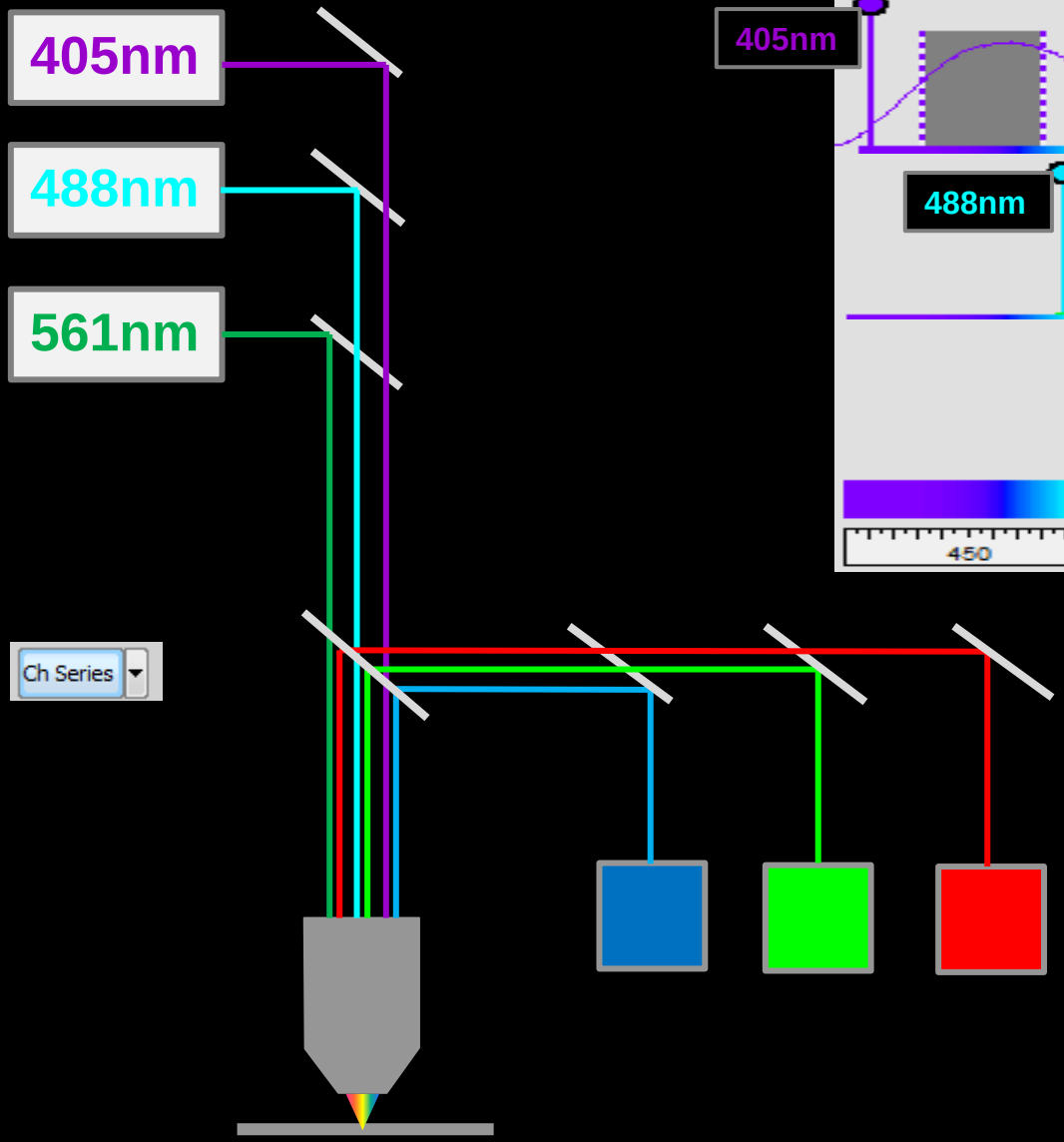
❑ 同时激发出现串色

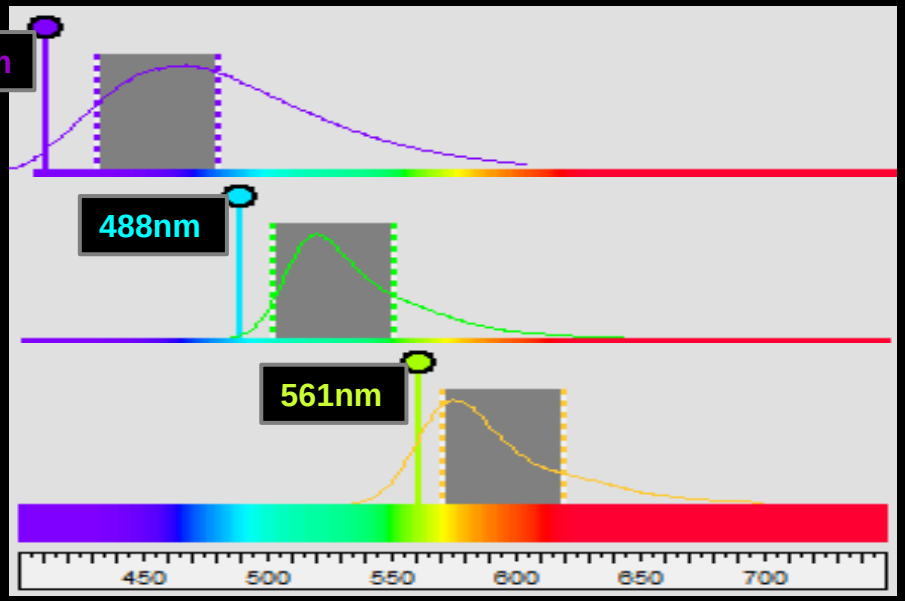

405nm
488nm
561nm
Ch Series

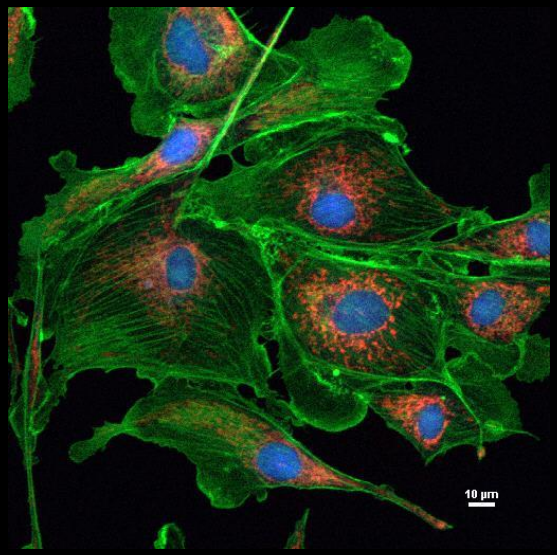

405nm
488nm
561nm
450
500
550
600
650
700


10 µm

❑ 顺次激发避免串色


405nm
488nm
561nm
Ch Series


405nm
488nm
561nm
450
500
550
600
650
700


10 µm

共聚焦显微镜使用技巧

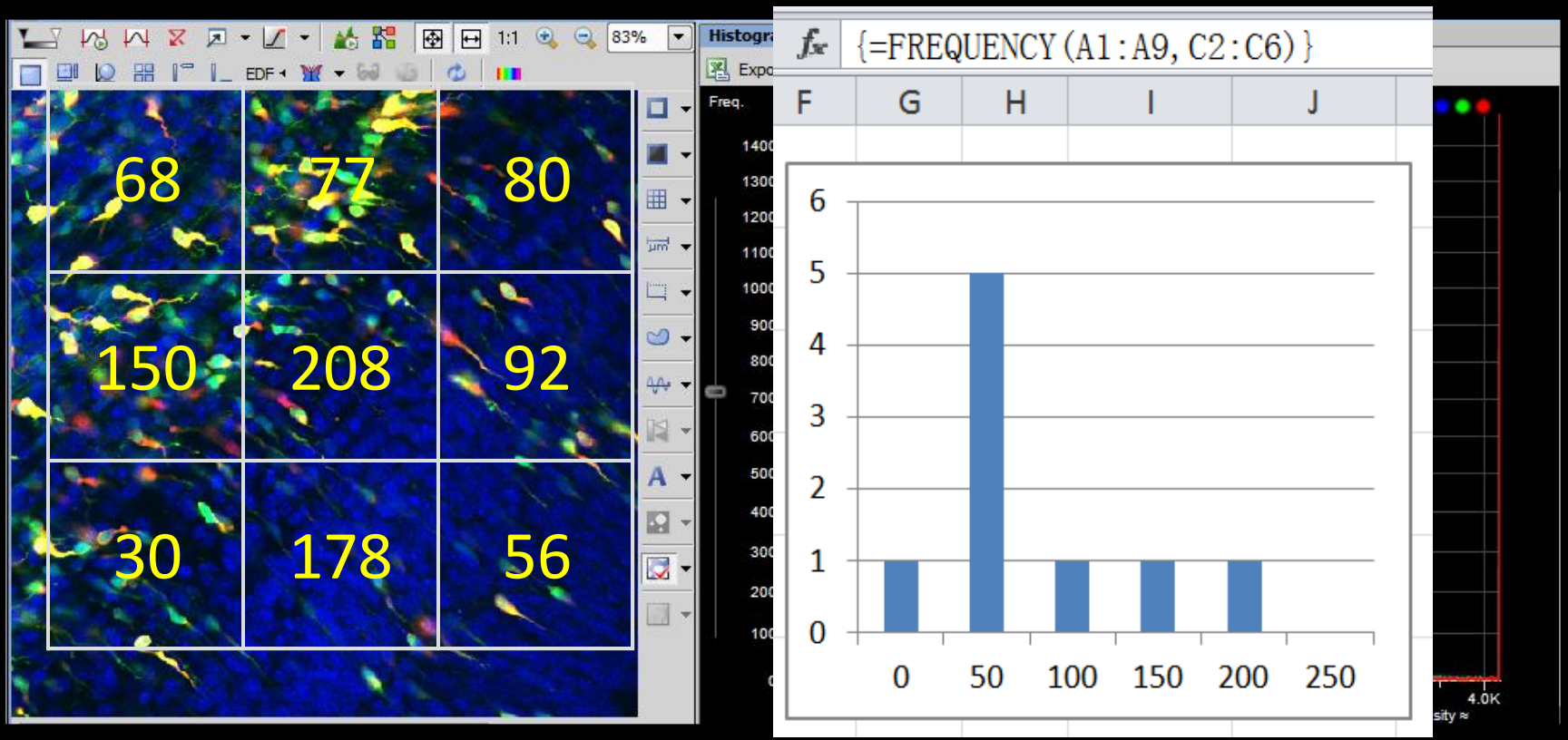
图像后期分析

❑ Histogram：

pixel intensity distribution in the image

横坐标：亮度值（如0-256,0-4096）
纵坐标：像素点频数

用于评估图像的整体亮度信息，及是否存在亮度不足或过饱和。



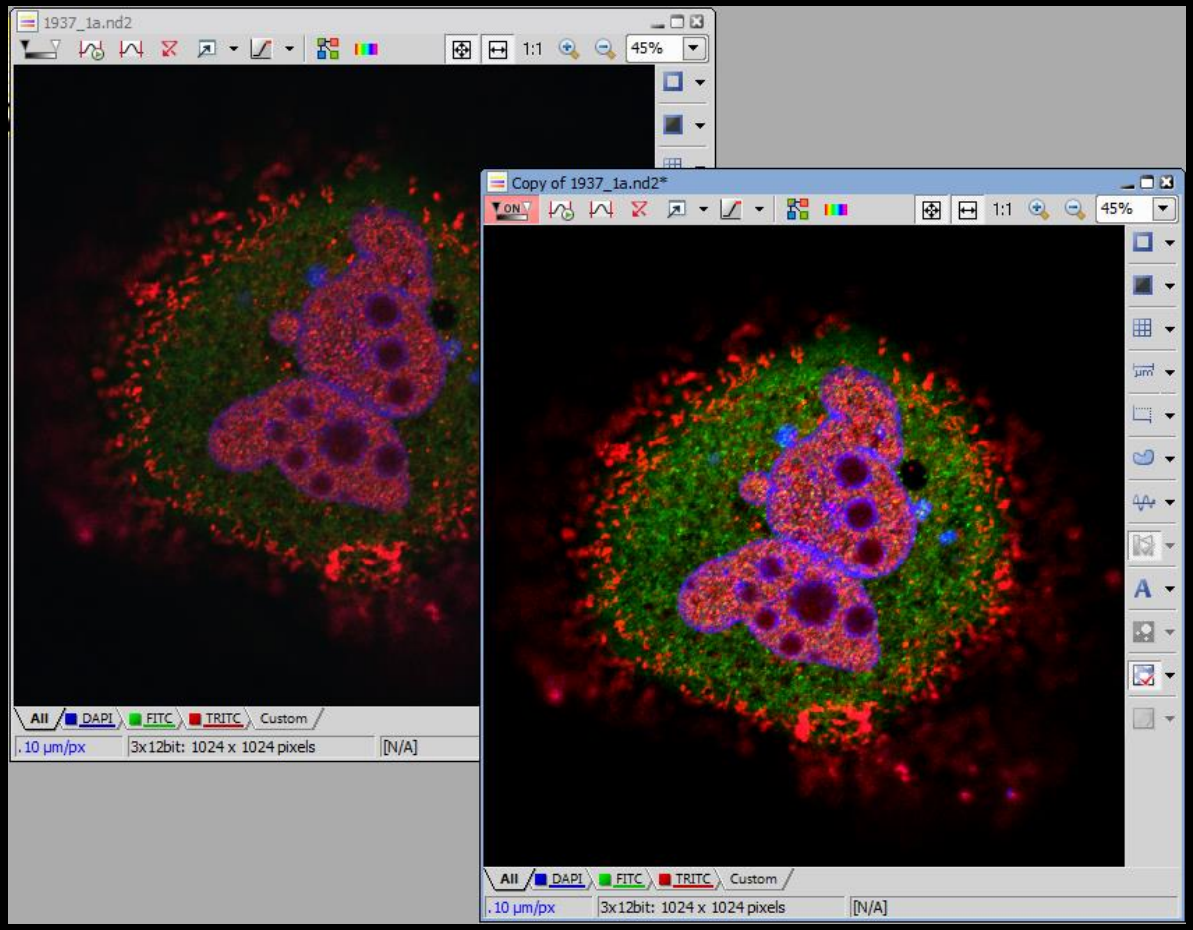
像素亮度分布

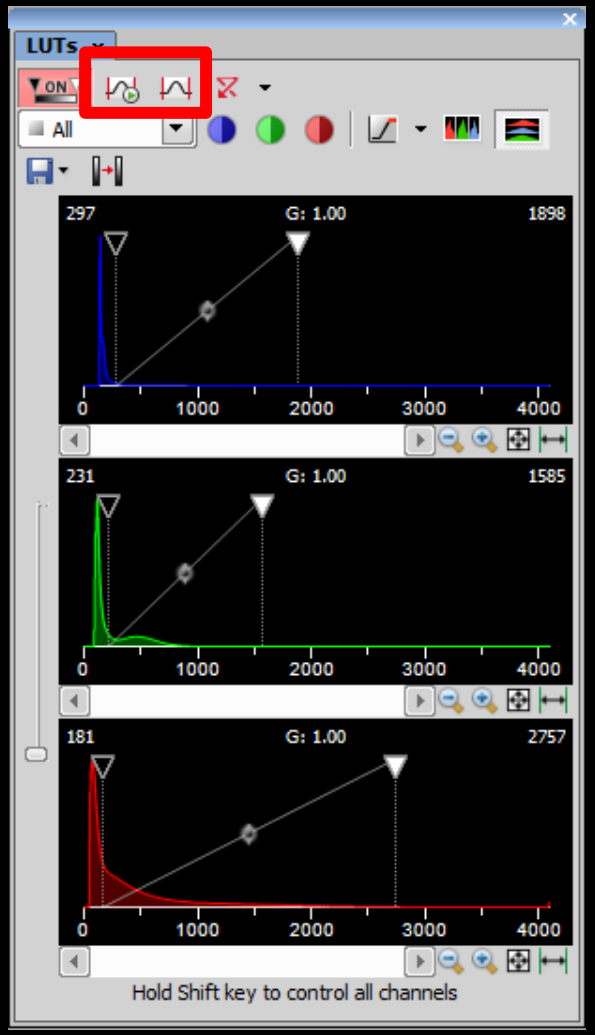
❑ 图像调节LUTs

尼康广州 Nikon

Non-destructive Image Enhancement

① Intensity ② Contrast ③ Gamma

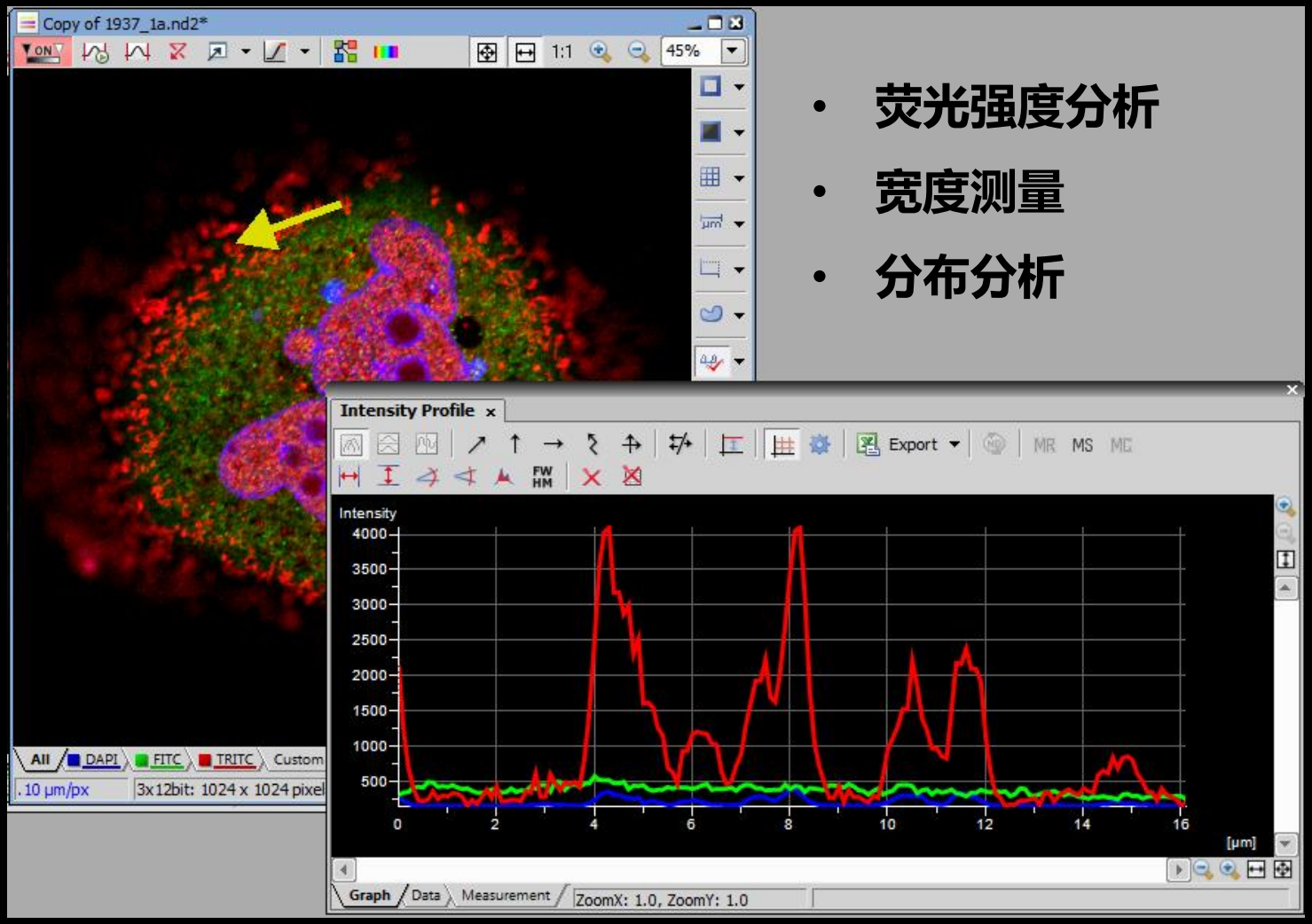




❑ Intensity Profile

尼康广州 Nikon

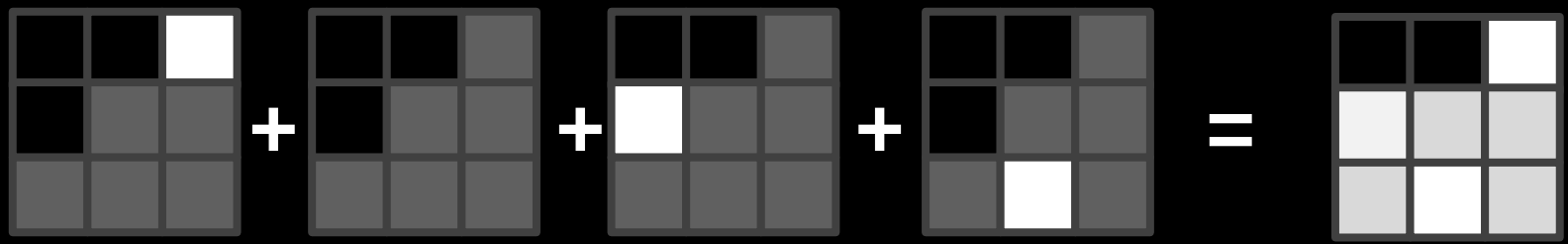
荧光强度分析请使用**原始图像**！



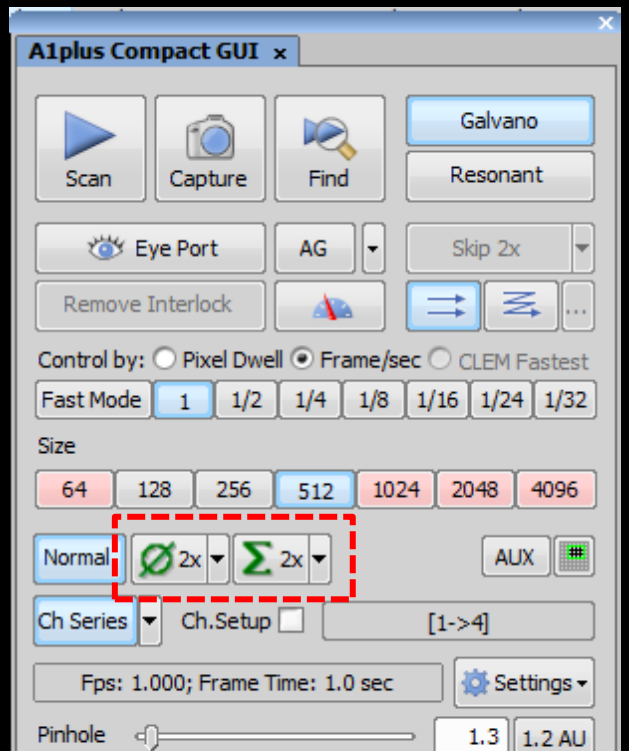
❑ 噪声消除（成像前）

尼康广州 Nikon

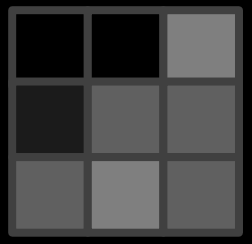




（加和）



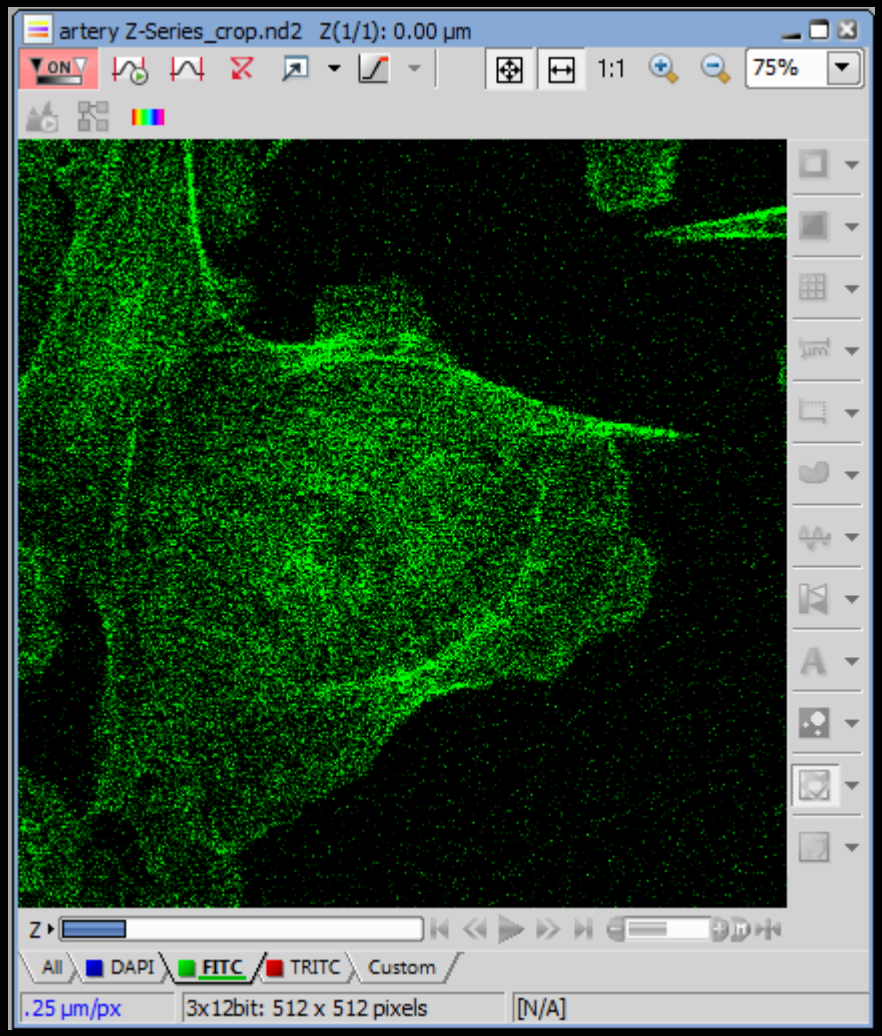
/ 4 =

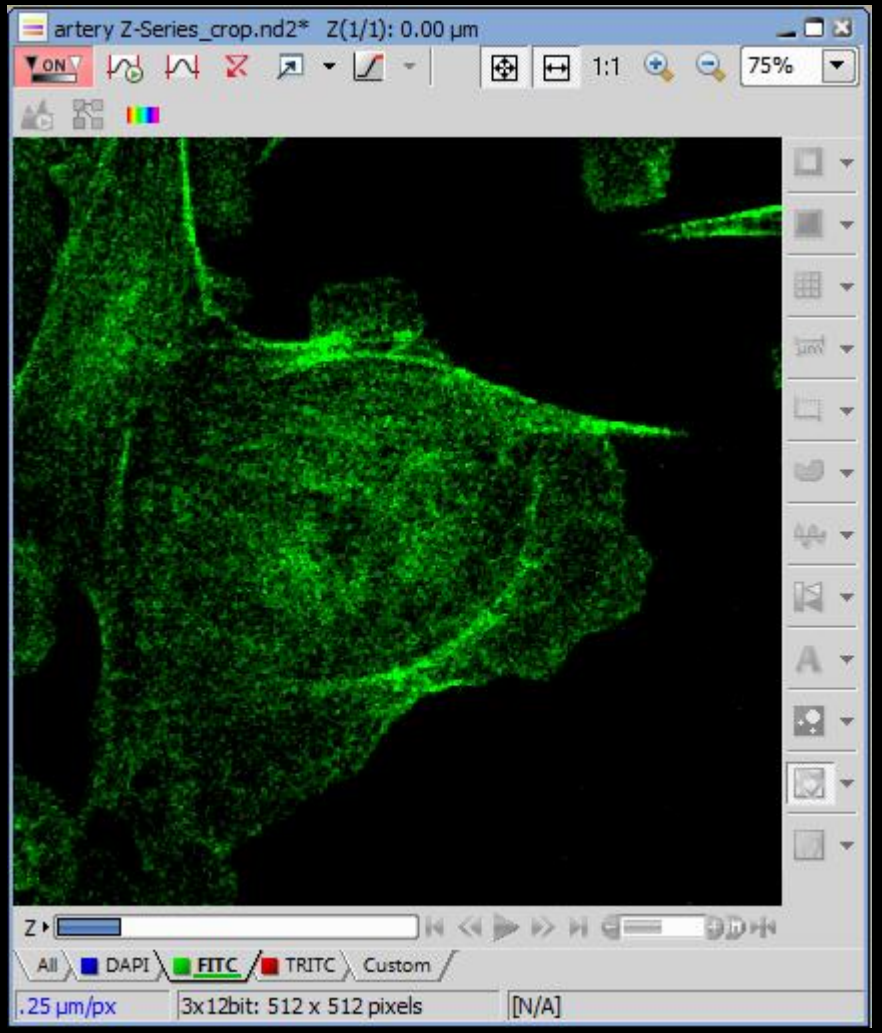


（平均）

❑ 噪声消除（成像后）

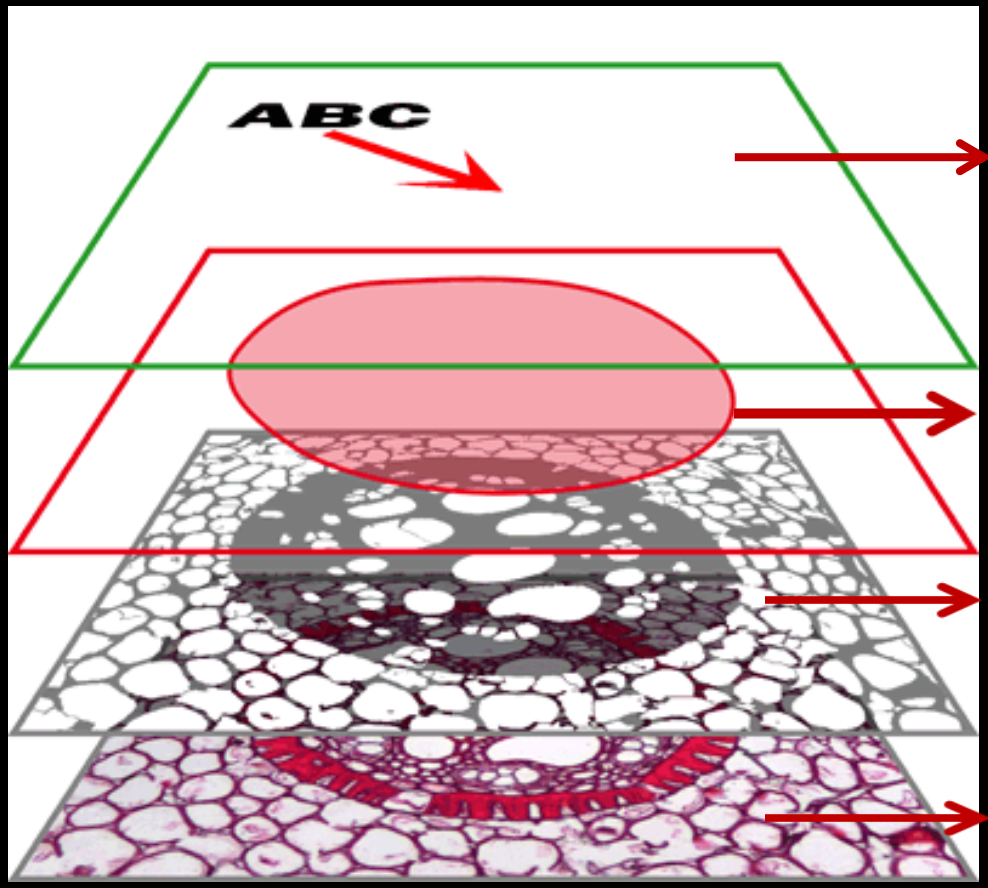
软件提供多种降噪工具。①中值滤波　②平滑　③去噪声





❑ 图层

NIS-Element图像文件包含多个图层



Annotation layer ：

矢量图层，如标尺，文字标注，测量标记。

ROI layer:

矢量图层，用于区分目标和背景，并提供灵活的操作。

Binary layers：

区分目标和背景，可建立多个Binary layers，用于图像分割及测量运算。

Color layer：

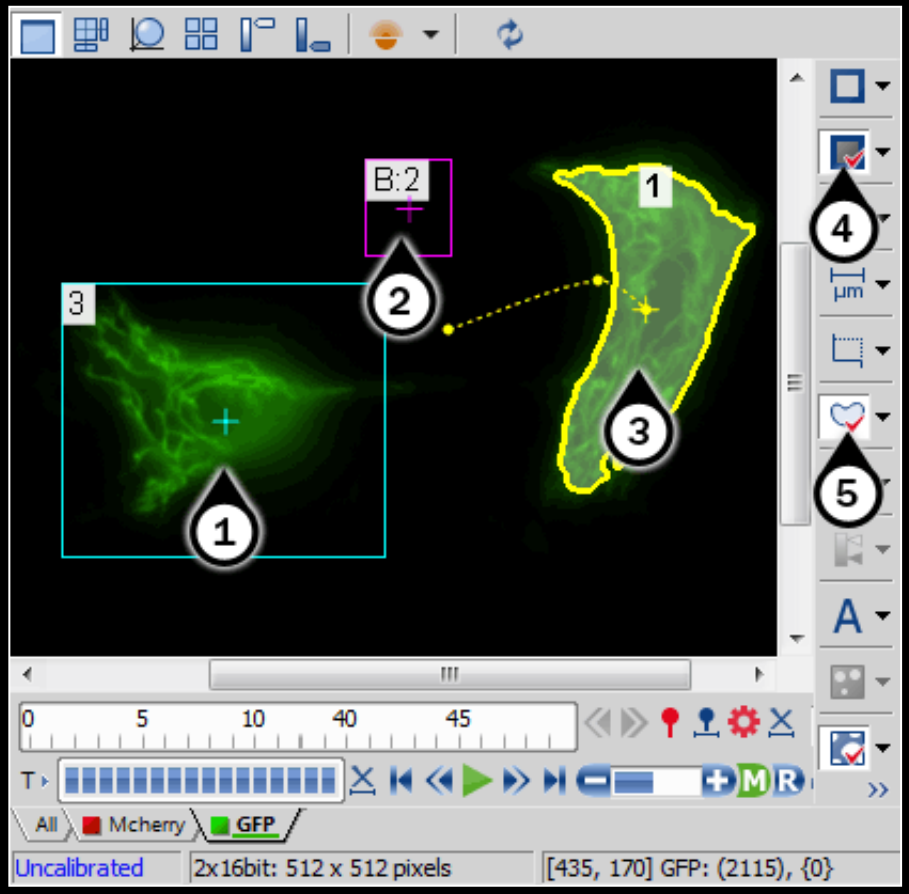
图像图层，即用相机拍摄到的原始图像，具有一定大小和位深（灰阶）。

❑ ROIs

尼康广州 Nikon

Regions Of Interest

- 创建及编辑ROI
- ROI类型（标准ROI，背景ROI，光刺激用ROI……）
- 基于ROI的分析测量



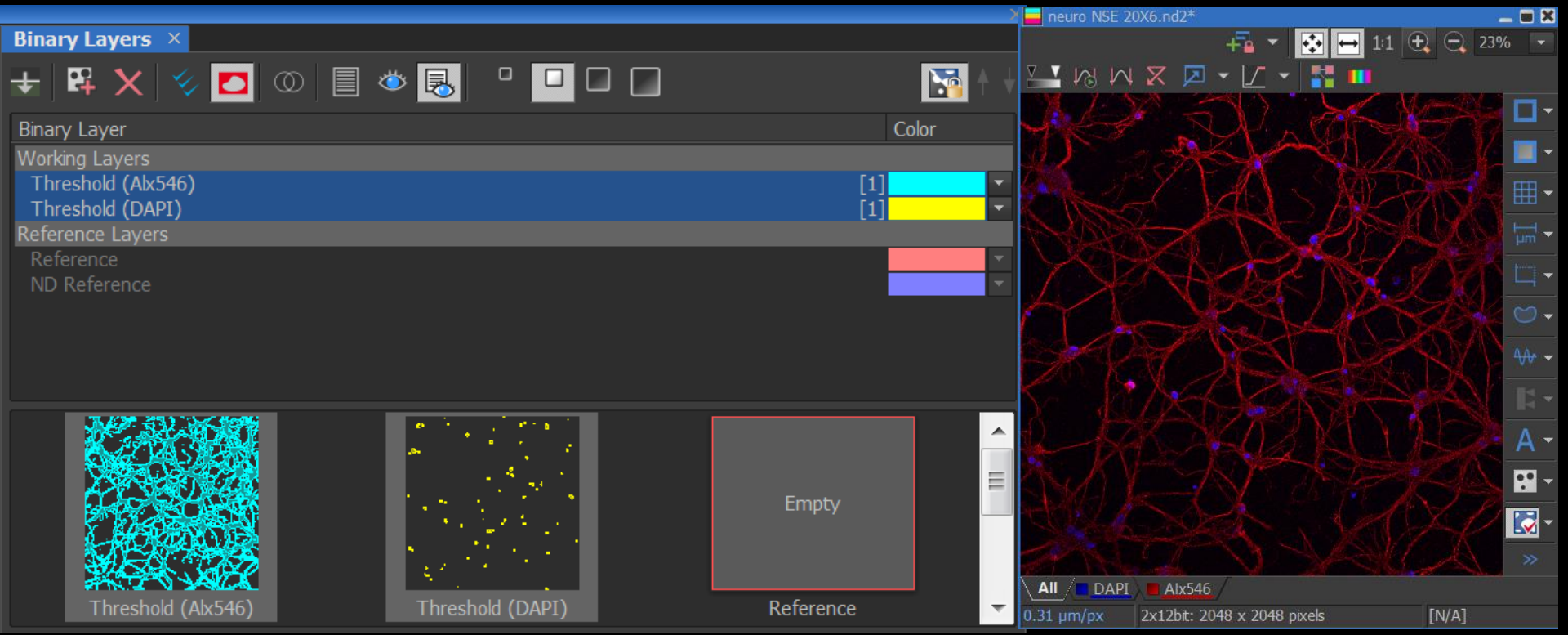
1.Global ROI
2.Background ROI
3.Moving ROI
4.Turn Background ROI On
5.Turn ROI On

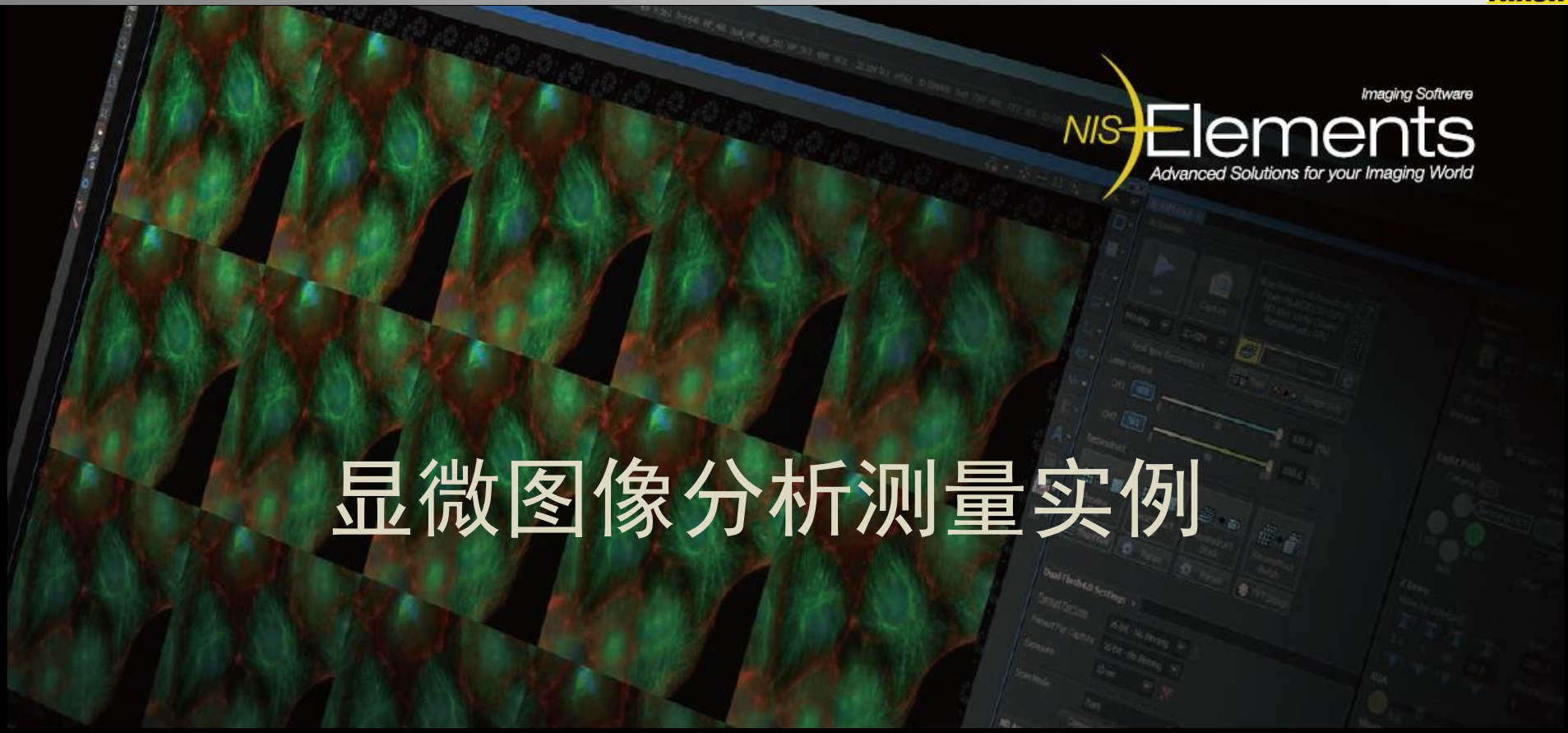
❑ Binary

基于不同的阈值水平对图像进行分割

- 通过亮度阈值将像素分割为目标或背景；
- 使用不同图像分割类型，可生成多个二进制图层；
- 不同的二进制图层可以进行各种运算。







显微图像分析测量实例

- 共定位分析
- 自动计数
- 荧光强度分析
- 反卷积图像增强
- 三维图像渲染