



# 台大醫學院第一共研電子報

101年9月 第8期



## 本期目錄

- 新添購：倒立活細胞共軛焦顯微鏡報導 .....P1
- 系統升級：正立共軛焦顯微鏡Leica SP5  
升級GaAsP感測器介紹 .....P5
- 專題介紹：3D影像處理軟體Volocity .....P7

NEW

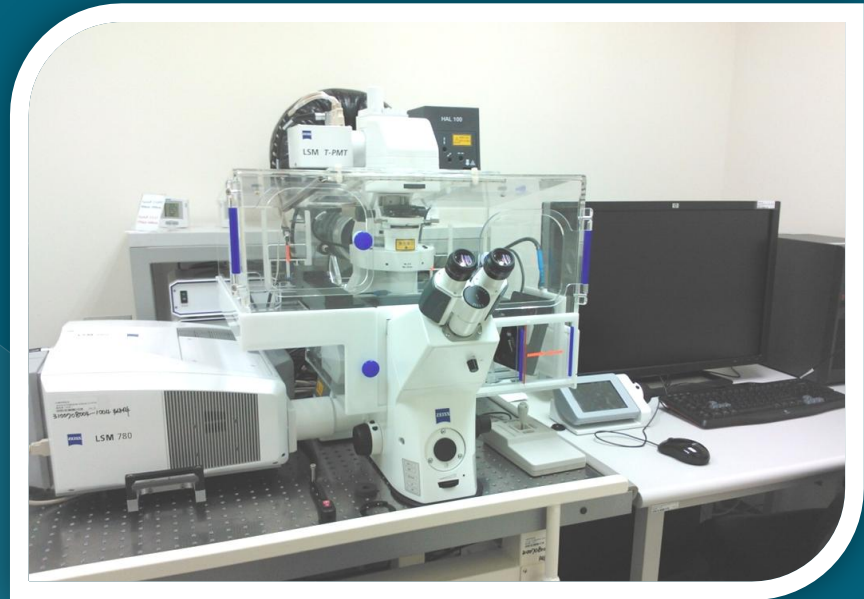
# 倒立活細胞共軛焦顯微鏡 Carl Zeiss LSM780

本中心今年初新架設了一套倒立活細胞共軛焦顯微鏡，自開放以來，預約踴躍、運作狀況良好，所展現的效能均獲得使用者之好評，本機功能設備齊全歡迎有需求之研究同仁蒞臨本中心或電洽分機88509/88930諮詢與預約，其收費標準請參考[收費網頁](#)。

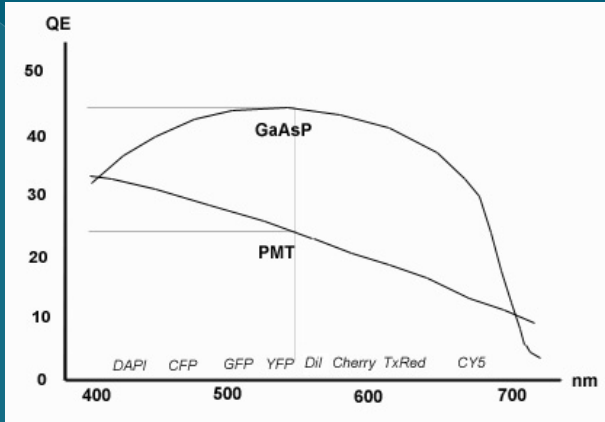
## 系統軟硬體設備與其應用

此次我們添購的共軛焦顯微鏡機型為 Carl Zeiss LSM780，提供405nm、

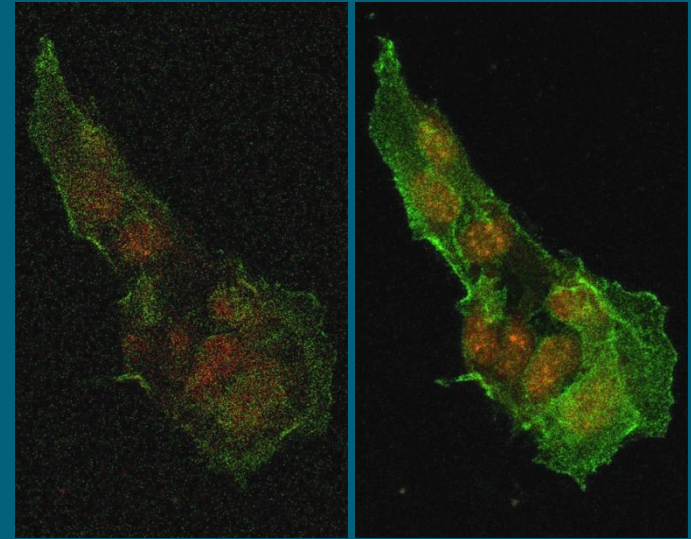
458nm、488nm、514nm、561nm、594nm、633nm等激發雷射波長，5個螢光PMT感測器（其中3組為GaAsP PMT）與穿透光感測器，全系列Apo等級高NA物鏡並且搭配有溫控培養箱與電動載物台與自動焦距鎖定系統；因此除了一般標準螢光染色玻片之外，也相當適合低亮度螢光樣品、活細胞樣品拍攝（可混合timelapse、Z stack、position、光譜等應用），photo-manipulation如photobleach、photoactivation、FRET...等實驗，還有大面積樣品拼圖與HDR高動態對比、photon counting等模式。由於系統功能複雜，本系統我們僅提供專人操作，除確保機器能發揮最高的效益之外也減去使用者之學習及操作負擔。



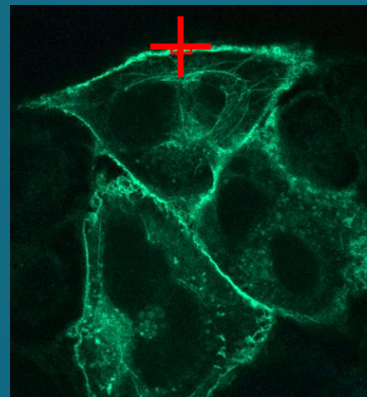
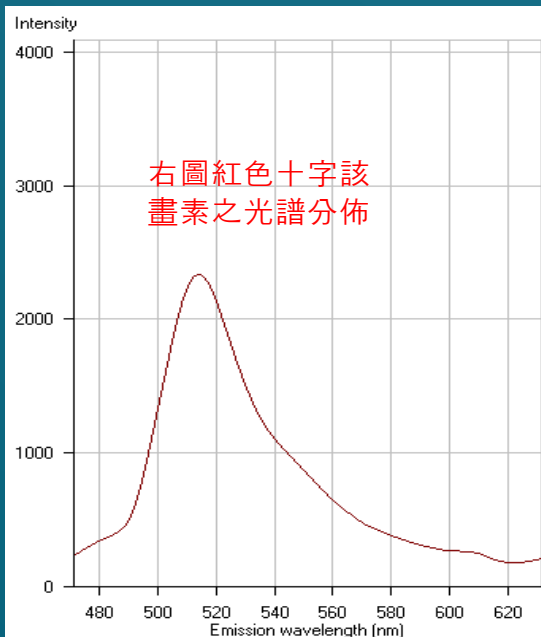
## GaAsP PMT與傳統PMT之光電轉換率比較



Carl Zeiss LSM780之設計特點在於感測器也改良成新一代GaAsP (磷砷化鎵) PMT，其感度最高可為傳統PMT之兩倍以上 (上圖)，此外新的光路設計效率更高、感度全面性的提升，影像品質更佳 (右圖)。



螢光極弱樣品以GaAsP PMT拍攝影像可獲得螢光利用效率與畫質的同時提升。

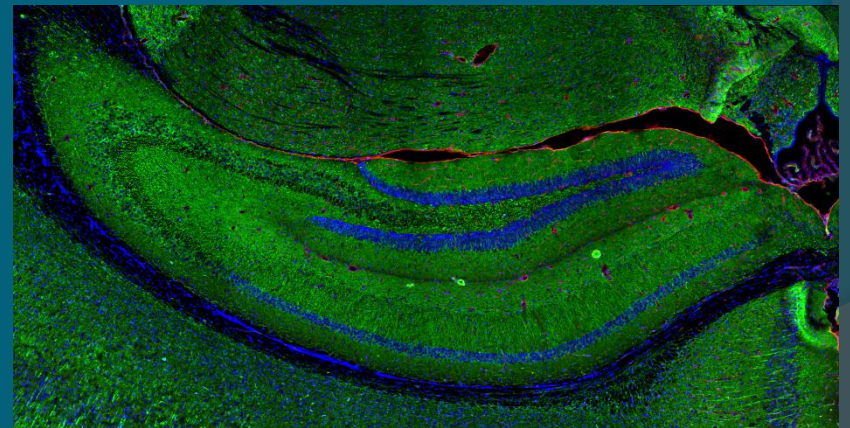
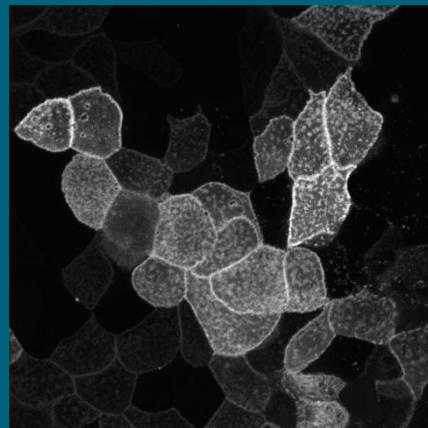
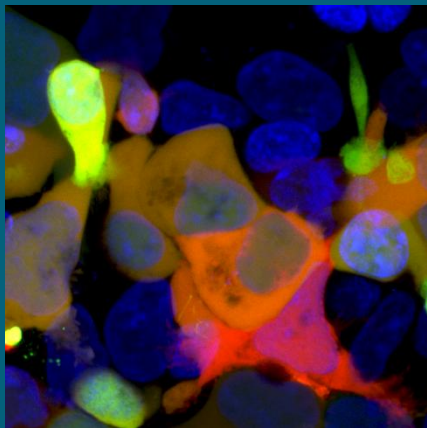
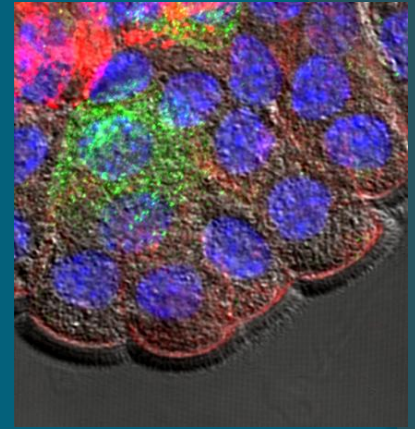
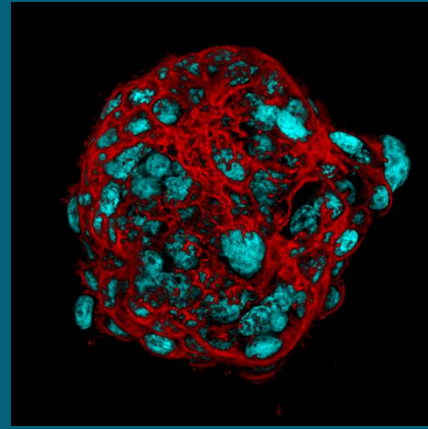
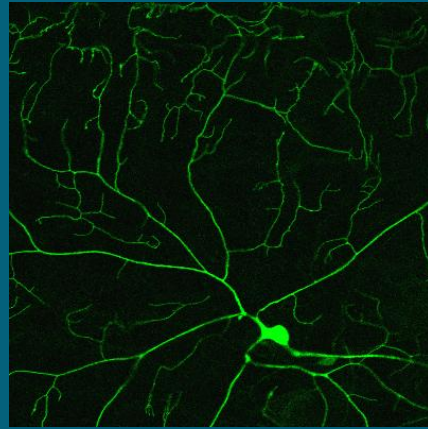
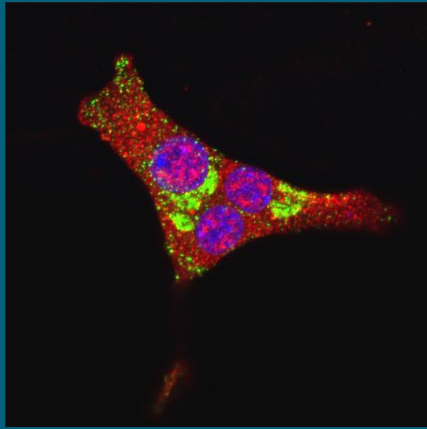


## 系統特色

總和而論LSM780之最大效益為：更佳的影像品質、掃圖更快、樣品活更久。在此我們在推廣它的另一特色scan head內部的32個微型GaAsPMT陣列，搭配光譜分析功能，在單次掃描之下數秒內即可以快速觀察樣品影像每一個畫素的光譜資訊，將此功能應用於螢光蛋白/染劑cross talk問題之解決將很有幫助。



# 本機實拍影像



UPGRADE

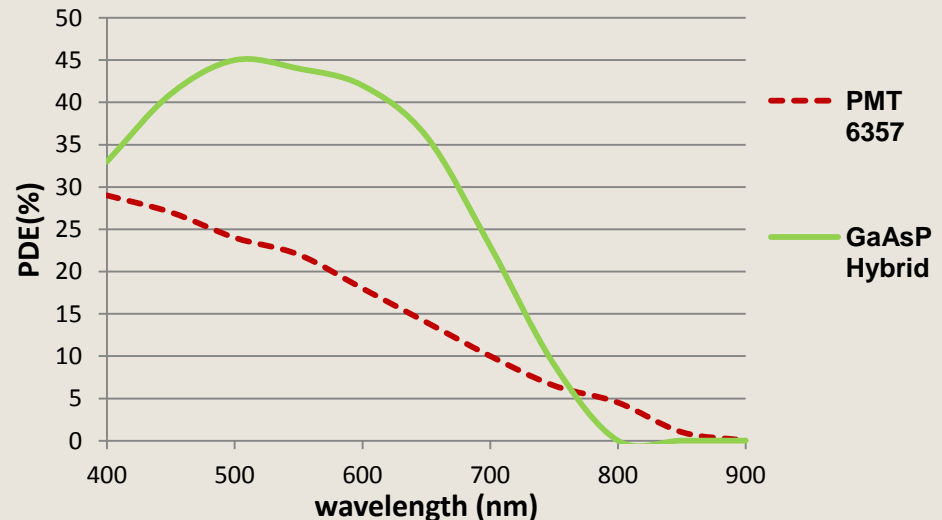
# 正立共軛焦顯微鏡 **Leica SP5** 升級 **GaAsP** 感測器

## 螢光感測器 **Leica HyD**

第一共研顯微影像中心於今年五月於舊有正立共軛焦顯微鏡 **Leica SP5** 進行了螢光感測器的升級。本次升級之感測器 **Leica HyD** (名稱來自於 Hybrid Detector 之縮寫) 特色在於高感度與低雜訊。一般共軛焦顯微鏡之感測器為光電倍增管 (Photomultiplier, 簡稱 **PMT**)。HyD 結合累崩式二極體 (avalanche photodiode, 簡稱 **APD**) 之超高靈敏度與 **PMT** 兩者優點, 利用磷砷化鎵 (GaAsP) 製作的光電陰極 (photocathode) 提升光電轉換效率, 繼而應用 **APD** 之高逆偏壓放大電子訊號, 因此即使螢光訊號強度弱, 也能得到高訊噪比的影像。

## 高感光度

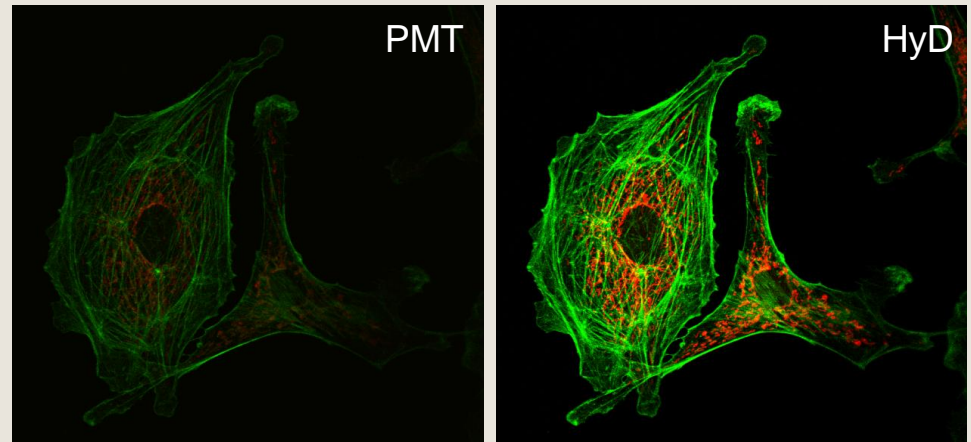
HyD 之光電轉換效率為原本 **SP5** 使用的標準 **PMT** 出約 2~3 倍, (見圖一), 以往在標準 **PMT** 較難拍出清楚影像的低螢光強度的樣品, 在使用 **HyD** 後通常可得到較佳的結果, (見圖二)。在激發光的雷射方面, 也使用較以往更低強度的雷射進行激發, 減少螢光漂白的風險, 延長樣品壽命。



圖(一)：HyD的光電轉換率與原有PMT之比較

## 高動態對比BrightR模式

使用HyD時可選擇Standard一般模式或BrightR模式。BrightR為一種high dynamic range模式，適用於明暗差異較大的樣品。神經細胞便是非常好的例子，神經元本體非常的亮，但樹突軸突的細絲部位都非常的黯淡，常常在掃圖時有無法同時記錄下本體及神經軸的困擾。



圖(二)：原有PMT與HyD的實拍比較。

面臨這種狀況時，可嘗試選用BrightR模式，將保留高強度的訊號仍在動態範圍內，低強度的訊號更加提昇，在同一張影像上便可同時觀察到高亮度與低亮度的螢光訊號，但使用此模式下須要注意的是不適用於用來量測螢光亮度。

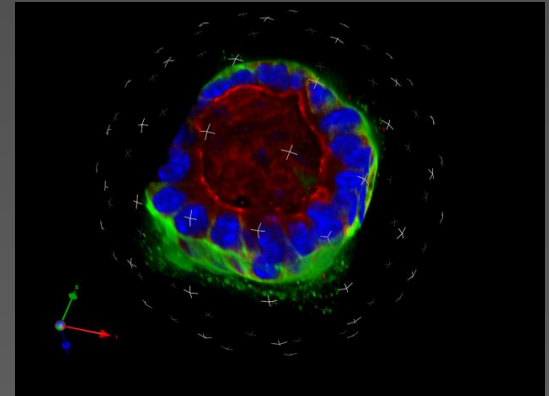
## 使用者教育訓練

本中心已經於本年度七月初針對新升級舉辦教育訓練課程。要特別提醒大家的是：由於感光度較高，HyD具備自我保護設計，當螢光強度過強時，將自動關閉訊號並於軟體上出現警示訊息，避免過多的訊號進入感測器。因此使用者必須特別小心使用，務必先將雷射強度調弱再依需求增加雷射及調整gain值，方為正確之使用方式以免降低HyD之壽命。目前升級過後的Leica SP5已經開放預約，使用者必須參加過教育訓練課程（本中心備有錄影課程可隨時上課）才能自行操作使用。



# 3D影像處理軟體Volocity

PerkinElmer Volocity是為3D/4D影像特別設計的影像處理及分析軟體，可以廣用於處理各種顯微鏡所拍攝下來的圖檔，影像處理迅速，支援Windows及Mac作業系統。目前第一共研顯微影像核心提供此套軟體服務，已幫助多位使用者處理出效果卓越的立體影像，特以此專欄將這個好用的影像軟體加以推廣，歡迎學校研究同仁至顯微影像中心洽詢使用。



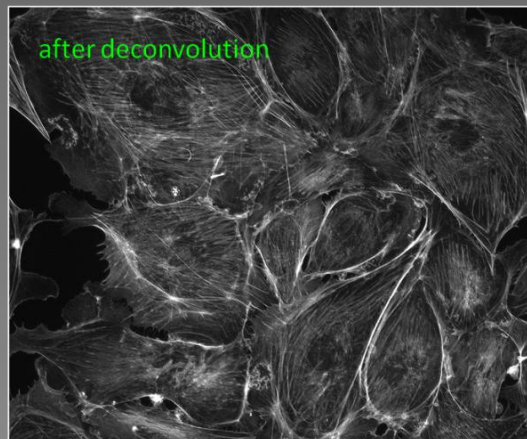
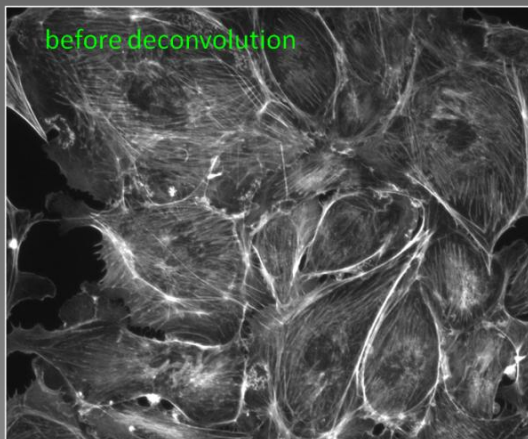
Volocity的使用簡單易學，且相容於多種顯微鏡軟體格式為此軟體的一大特色。除了一般螢光顯微鏡及共軛焦顯微鏡所拍攝下來的螢光影像，Volocity還可以處理明視野、相位差、差分干涉對比 ( Differential interference contrast , DIC )、spinning disk confocal、電子式、TIRF等類影像，檔案無需轉檔或設定，直接把原始檔拖曳入軟體內，即可開始分析或編輯。PerkinElmer Volocity網站非常貼心，準備有[Volocity online training](#)教學影片使用者可以依需求快速學習需要的軟體功能，除此之外也可自行下載免費試用版本[Volocity demo](#)，全版本完整功能請洽本中心使用軟體依功能可區分為以下三個部分：

### 立體3D影像重組功能Volocity Visualization

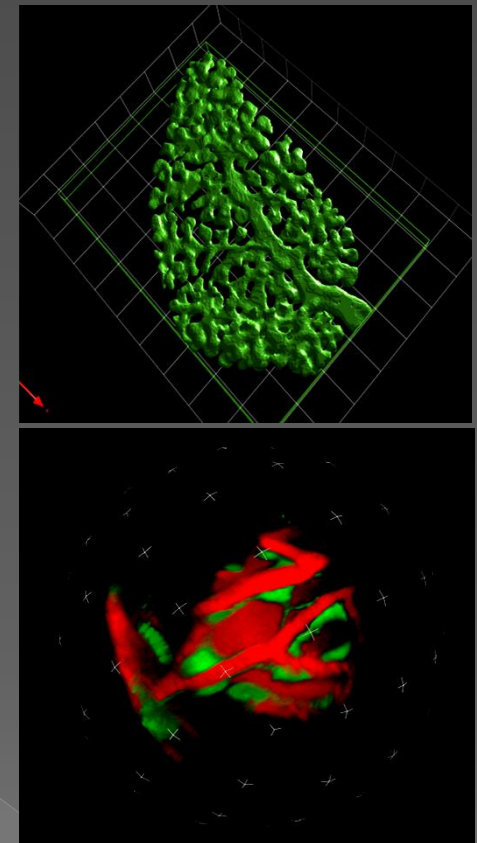
將Z section影像組成立體3D影像，經調整亮度對比後可以滑鼠以free hand方式調整物件位置、角度，依照展示需求旋轉、縮放...等，並重新輸出成一般電腦都可開啟的影像、影片檔等通用格式，方便用於演講或研討會。

### 螢光影像清晰化功能Volocity Restoration

提供螢光影像澄清化deconvolution (反捲積化) 功能，以運算方式得到點擴散函數(Point Spread Function, PSF)，將螢光顯微鏡拍出的模糊影像經過排除光點擴散影響，並去除焦距外螢光的干擾以達到影像清晰化的效果。此功能亦適用於共軛焦顯微鏡拍出的影像，透過deconvolution修正運算也可再進一步將干擾訊號去除，影像品質仍可再稍做提升。



BAPE cell actin- Alexa Fluor 488, 40x/0.75 objective (第一共研實測影像)

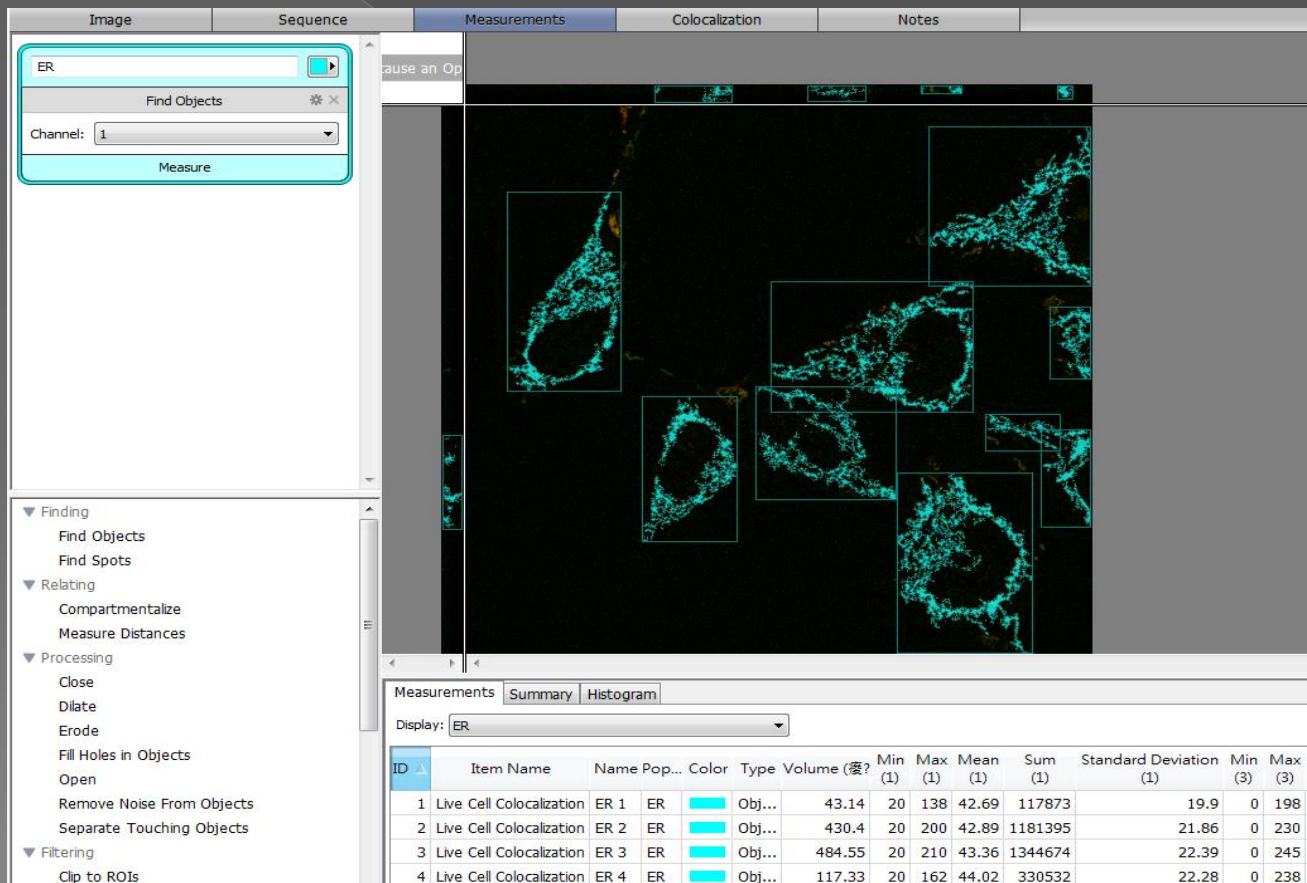


本中心以LSM780實拍影像後以Volocity處理，分別為斑馬魚發育中眼球血管與小鼠胚胎期之肺葉。



## 影像定量分析 Volocity Quantitation

軟體內建多種模組功能，一般常用分析如螢光共位分析 Colocalization、(細胞)數量、尺寸(長寬或體積等等)、螢光強度、移動距離.....等等。例如要追蹤細胞移動，在分析時選 Track Objects，軟體會自動開始分析，也可再依需求調整設定參數。使用者亦可自行新增專屬分析流程，便於重複以同樣流程與參數分析使用。所有測量圖表數據分析後皆可輸出為 excel 或 圖片檔案格式，方便攜帶。



The screenshot shows the Volocity software interface. The main window displays a fluorescence image with several cells outlined in cyan. A 'Find Objects' panel on the left shows 'ER' as the selected channel. Below the image, a 'Measurements' table provides quantitative data for four objects.

ID	Item Name	Name	Pop...	Color	Type	Volume (μm <sup>3</sup> )	Min (1)	Max (1)	Mean (1)	Sum (1)	Standard Deviation (1)	Min (3)	Max (3)
1	Live Cell Colocalization	ER 1	ER		Obj...	43.14	20	138	42.69	117873	19.9	0	198
2	Live Cell Colocalization	ER 2	ER		Obj...	430.4	20	200	42.89	1181395	21.86	0	230
3	Live Cell Colocalization	ER 3	ER		Obj...	484.55	20	210	43.36	1344674	22.39	0	245
4	Live Cell Colocalization	ER 4	ER		Obj...	117.33	20	162	44.02	330532	22.28	0	238