

Nikon

超分辨率显微镜

N-SIM

培训手册

目录

1	前言.....	3
2	超分辨显微镜原理.....	4
2.1	光学衍射极限.....	4
2.2	结构化照明显微技术(Structured-Illumination Microscope, SIM).....	5
3	N-SIM 培训手册.....	6
3.1	N-SIM 的开机与关机.....	6
3.1.1	硬件开机.....	6
3.1.2	启动软件.....	6
3.1.3	退出 N-SIM 系统.....	8
3.2	N-SIM 面板设置.....	8
3.3	基本操作.....	9
3.3.1	N-SIM 操作流程图.....	9
3.3.2	光栅的选择.....	11
3.3.3	预览画面.....	12
3.3.4	拍摄模式的选择.....	13
3.3.5	图像的拍摄.....	15
3.3.6	ND 拍摄 SIM 图像.....	16
3.3.7	相机设定.....	17
3.4	Stack SIM 图像的拍摄.....	18
3.4.1	选择 3D-SIM 模式.....	18
3.4.2	Z-Stack 设置.....	18
3.5	图像重建.....	20
3.5.1	SIM Slice 图像重建.....	20
	设置重建参数.....	20
	重建 Slice SIM 图像.....	22
3.5.2	SIM Stack 图像重建.....	23
	设置重建参数.....	23
	重建 Stack SIM 图像.....	25
4	结束语.....	26

1 前言

17 世纪末期，世界上出现了第一台真正意义上的显微镜，它的发明者是荷兰的布匹商人、显微镜的先驱人物，列文虎克。当时的显微镜，只有一个镜片，可以用手拿着进行观察，镜片是列文虎克亲手磨制，通过创新型方式磨制精品，他把一个小玻璃球磨制成了镜片，放大倍数竟然达到了 720 倍。要知道，当时其他显微镜的放大倍数最高仅有 50 倍。他就是用这个镜片做成了世界上第一台实用显微镜。

到了 19 世纪末，著名德国物理学家恩斯特·阿贝（Ernst Abbe）提出了完善的显微光学正弦理论，阐述了光学显微分辨能力受光学衍射的限制。分辨能力受光学衍射的限制（一般物镜的最小分辨距离与光波长成正比，与物镜的数值孔径成反比）。随后发明了油浸物镜，使得物镜数值孔径可以大于 1，能观察到更清晰的生物学图像（赵凯华，1981）。

1852 年，爱尔兰数学与物理学家斯托克斯爵士（Sir George Gabriel Stokes）发现某些物质在一定波长的光照射下，会发出波长较长的光，被称为“荧光”。1935 年 Haitinger 发现生物组织经过一些有机染料处理后，会在激发光照射下产生高亮度的荧光来。因为染料分子的荧光的低背景，科学家们可以观测到反差很高的生物组织结构图像。经过几十年的发展，荧光显微技术已相当成熟，现在已经发明了分别用于标记各种细胞器、细胞骨架、核酸和钙离子等的特异荧光染料或通过免疫反应来对特异的蛋白质进行荧光标定的方法，并且可以通过分子生物学手段外源性地表达带有荧光信号目的蛋白，例如 2008 年获得诺贝尔奖的下村修、查尔菲和钱永健，正是因为发展了绿色荧光蛋白（GFP）的研究，如今广泛的应用于各种生物标记研究，甚至可用于活细胞以及活体观察生命活动（Shimomura et al, 1962 Tsien RY, 1998 Vadim Zinchuk et al, 2009）。

2 超分辨显微镜原理

2.1 光学衍射极限

现代的光学显微镜是基于点对点的远场光学成像，主要的成像过程可以看做是样品平面上的点经过显微透镜的聚焦，在像平面上成像为一个相应的点。但光具有波粒二相性，光的波动性会导致样品平面上的点会衍射成不是一个严格意义上的点，而是在侧向和轴向上有一定光学分布的斑，在显微学上，这样的斑叫作点扩散函数(Point Spread Function, PSF)(图 2.1 所示)(赵凯华, 1981)。这样的点扩散函数的半高全宽(Full Width at Half Maximum, FWHM)值与光学显微技术的分辨率直接相关。PSF 的在侧向上的分辨率可以简化地用 $\Delta xy=0.61 \lambda / NA$ 来描述，这里的 λ 是光学波长， $NA=n \sin \theta$ 为物镜的数值孔径， n 为成像介质的折射率， θ 为物镜聚焦光的半中心角。

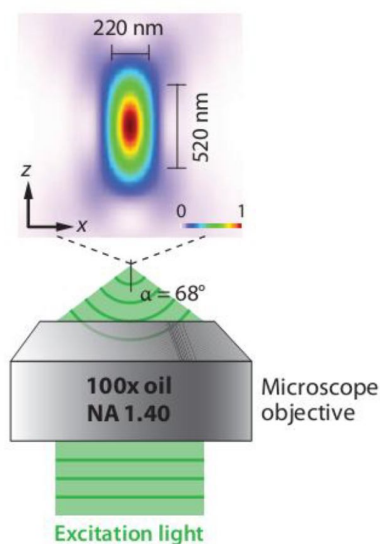


图 2.1 在显微镜下观察到的光学波动性所造成的点扩散函数(Huang Bo et al, 2009)

如图 2.1 所示，当 λ 为 550nm，NA 为普通的油镜 NA 值=1.4，那么相应的 PSF 为侧向 220nm，轴向约 500nm 的立体光斑。

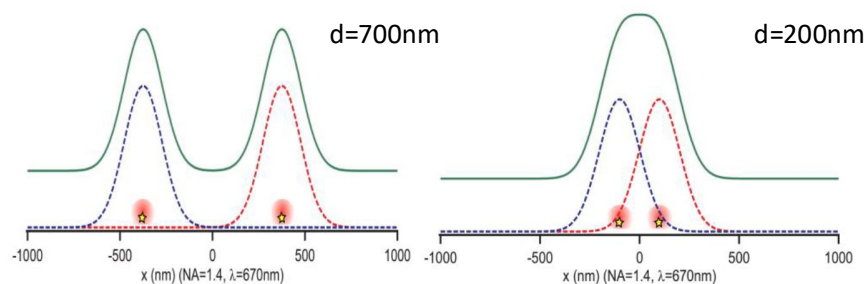


图 2.2 像平面上的 PSF 的不同的距离分布显示光学显微分辨率(Zhuang XW)

图注：左图为两个成像点在样品平面上的距离为 750nm 时，在像平面上的两个 PSF 的分布，右图为两个成像点在样品平面上的距离为 200nm 时，在像平面上的两个 PSF 的分布。

如图 2.2 所示，当物平面上的两个信号点距离较远时，在像平面上的相应的 PSF 可以被区分；当物平面上的两个信号点距离越近，像平面上的两个 PSF 的距离也越近，直至不能被分开，这种在像平面上荧光分子的 PSF 相互交叠而不能被分辨的现象称为光学的衍射极限。

在很多研究中，需要探测的细胞内的信号在超过光学分辨极限的尺度上会有大量的分布，因此想要利用光学成像去研究细胞内生物学的细节，急需发展出新的光学显微技术，突破衍射极限，进一步提高光学显微镜的分辨能力。

2.2 结构化照明显微技术(Structured-Illumination Microscope, SIM)

2000 年，Gustafsson 利用结构化干涉产生的条纹照明场照射样品，即采集图像的过程中，在照明光路中插入一个空间光调制器（如光栅），形成一定已知规律的照射条纹照射在样本上，然后在照射方向和位置上分别采集多个图像，最后用算法将这些原始图像中的高频信息计算出来，经过特定的重建程序，得到高清晰地图像。

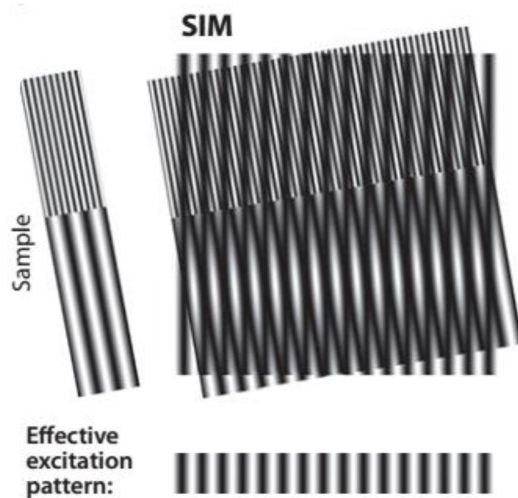


图 2.3 SIM 成像技术原理图（Huang B et al, 2009）

图注：由光栅和透镜产生的正弦照明光场激发样品会产生一个较低空间频率的莫尔条纹，将该条纹旋转和扫描之后所得的图像经过算法重构可得到突破光学衍射极限分辨率的图像。

3 N-SIM 培训手册

3.1 N-SIM 的开机与关机

3.1.1 硬件开机

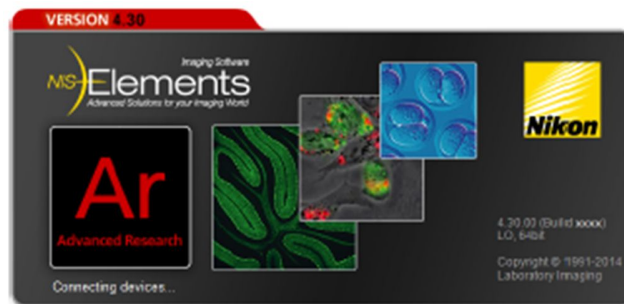
- ①. 打开 N-SIM 照明器的 piezo 控制器电源
- ②. 打开 Z 载物台控制器电源
- ③. 打开电动载物台控制器电源
- ④. 打开显微镜背部的 HUB 控制器电源

(以上为初次开系统时需要开的部件，此后只需要从第 v 步开始操作)

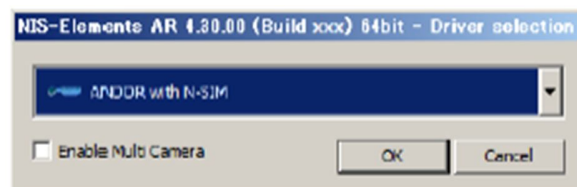
- ⑤. 打开 HG 光纤照明器电源
- ⑥. 如果要使用明场照明，则打开明场光控制器电源
- ⑦. 打开需要用的激光台
- ⑧. 打开电脑
- ⑨. 打开激光锁钥匙
- ⑩. 开启软件 NIS-Elements AR

3.1.2 启动软件

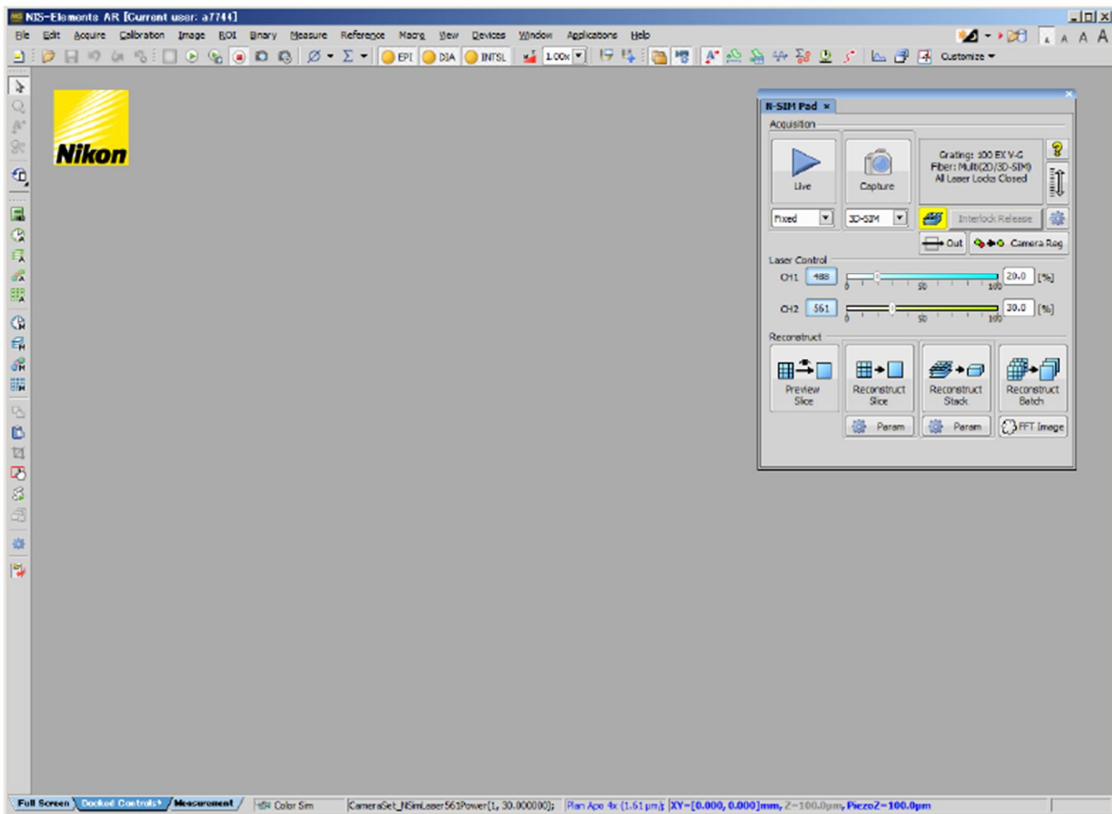
双击软件图标，出现软件开机画面



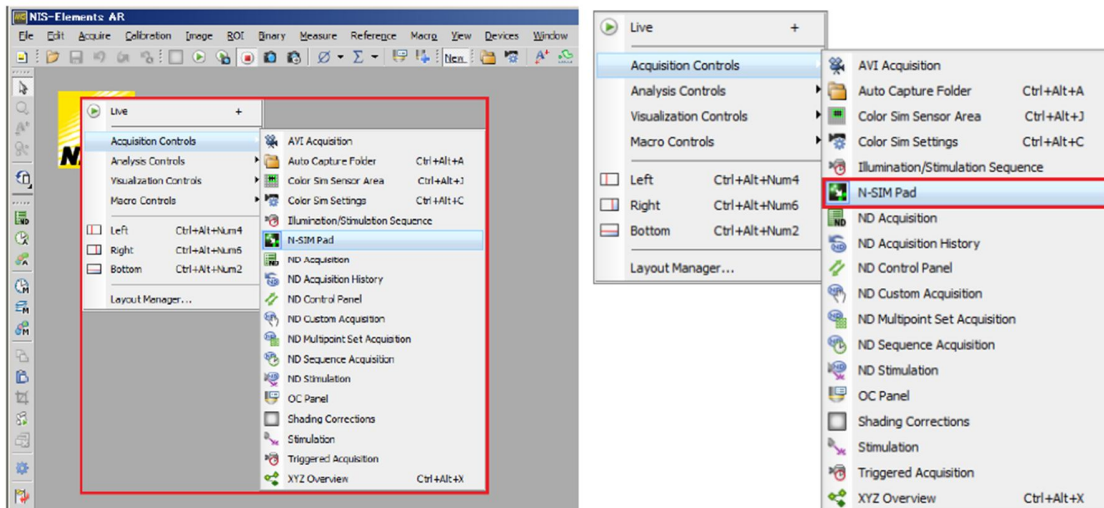
选择 ANDOR with N-SIM



进入软件后，N-SIM 面板会自动显示出来在软件里



如果上一次使用中此面板被关闭，则开机后不会自动显示出来，需要在软件面板内点击鼠标右键，选择[Acquisition Controls]->[N-SIM Pad]，即可调出该面板。



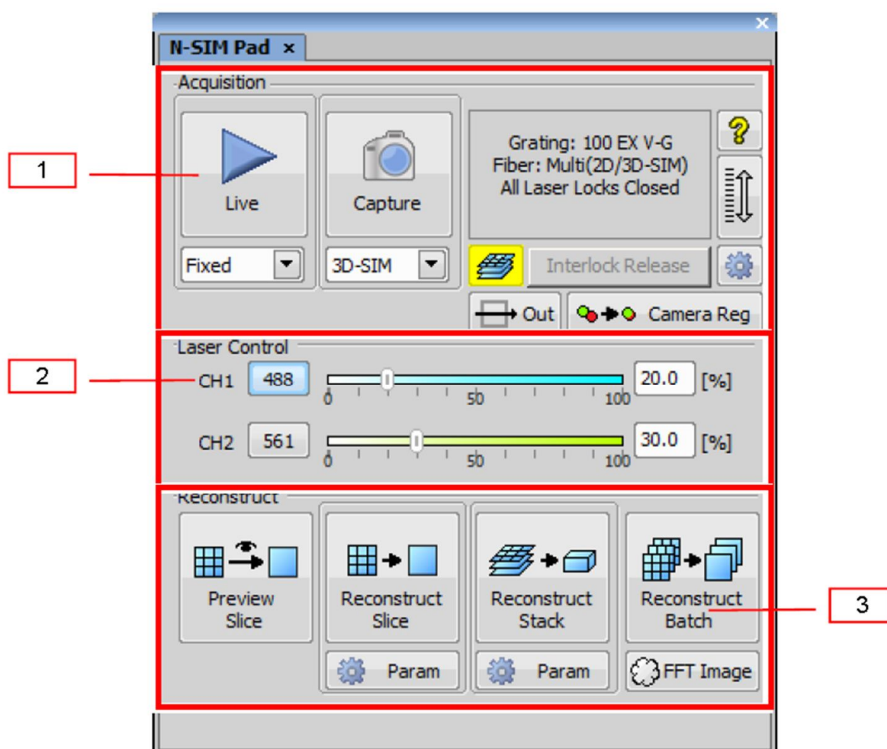
3.1.3 退出 N-SIM 系统

- ①. 将载物台上的样本拿下来，物镜用石油醚擦干净；
- ②. 退出 NIS-Elements AR 软件；
- ③. 将激光锁钥匙关闭，关掉汞灯及明场光源（如果有使用）；
- ④. 关掉电脑电源；
- ⑤. 关闭激光台电源；

（普通使用使只需要关到这一步即可）

- ⑥. 关闭显微镜背部的 HUB 控制器开关；
- ⑦. 关闭电动载物台控制器电源；
- ⑧. 关闭 z 控制器电源；
- ⑨. 关闭 N-SIM 照明器 piezo 控制器电源；

3.2 N-SIM 面板设置



名称	功能
1	拍摄面板
2	激光控制面板
3	图像重建

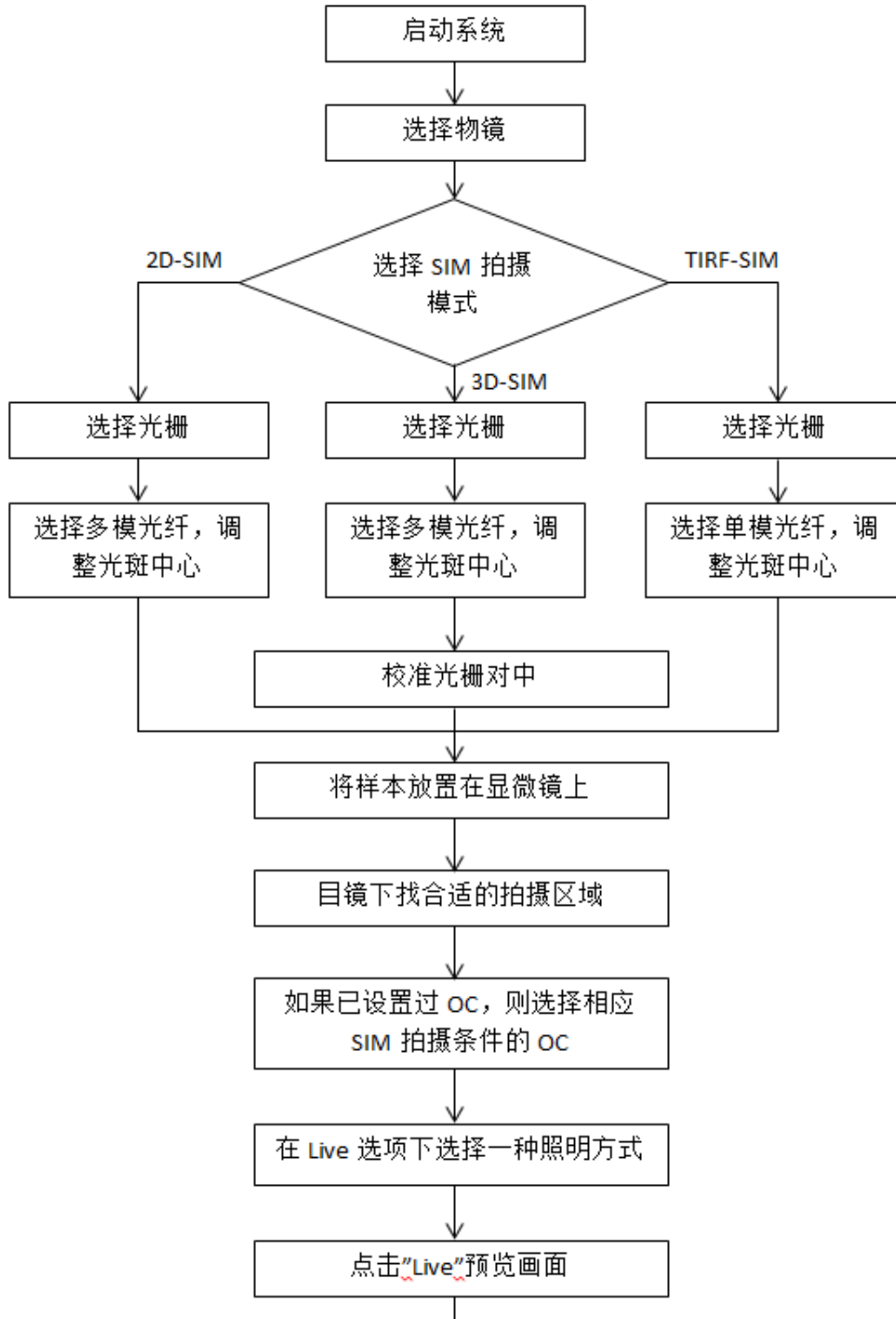
设置 SIM 图像的拍摄参数，包括拍摄模式及选项

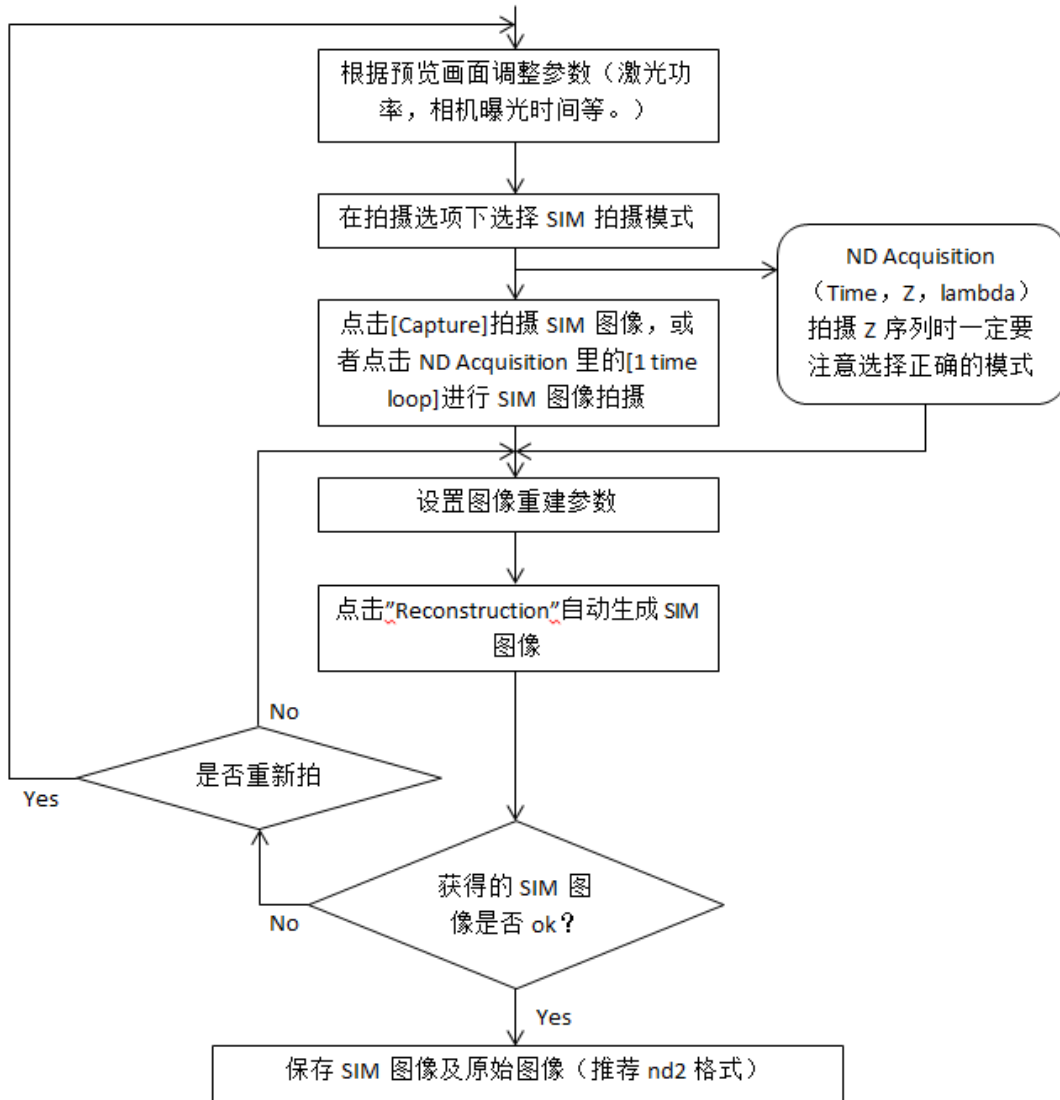
选择激光及调节激光功率

设置重建参数，重建 SIM 图像

3.3 基本操作

3.3.1 N-SIM 操作流程图

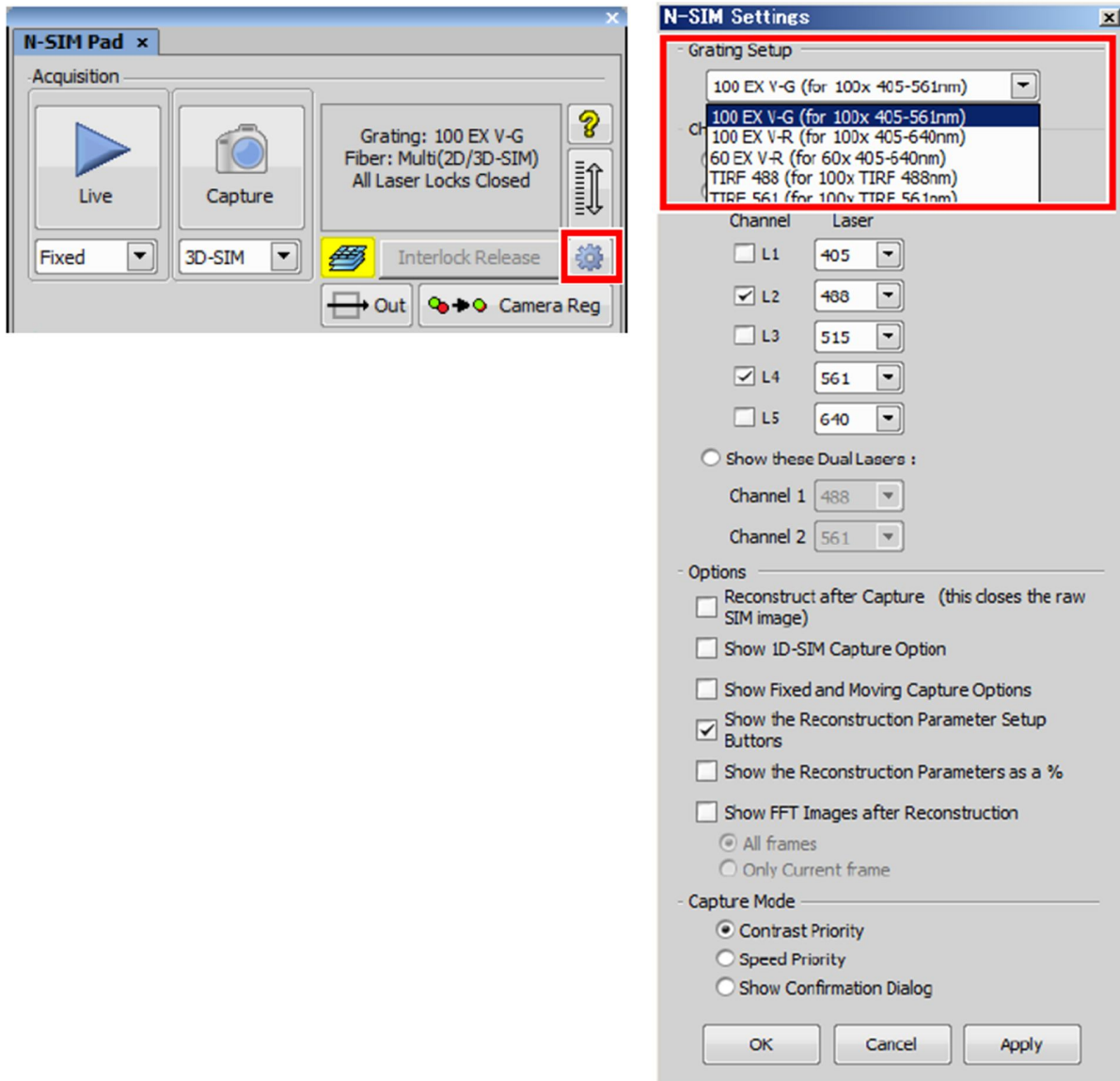




3.3.2 光栅的选择

选择光栅时需要先将相应的光栅块放入 SIM 照明器内（通常由管理员完成），然后对 N-SIM 面板进行设置。

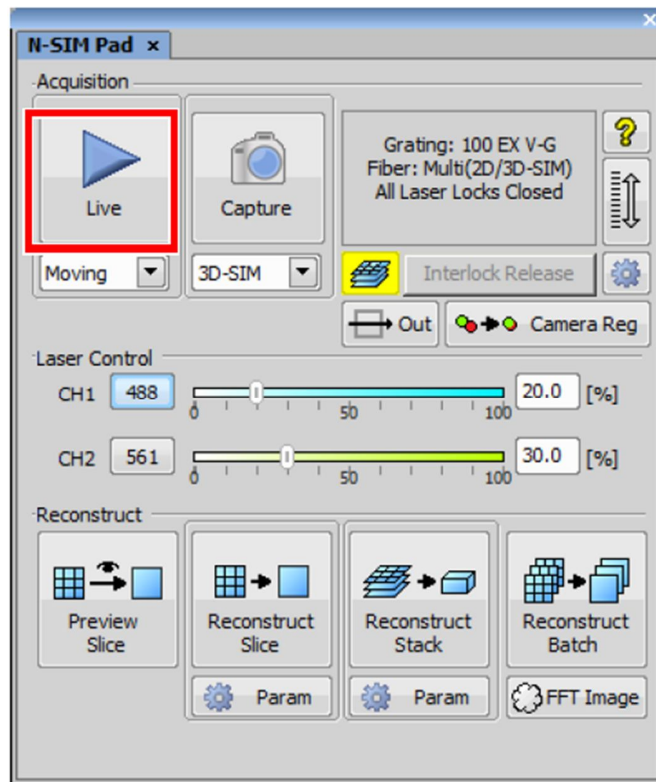
点击[Settings]按键，会弹出光栅设置窗口。



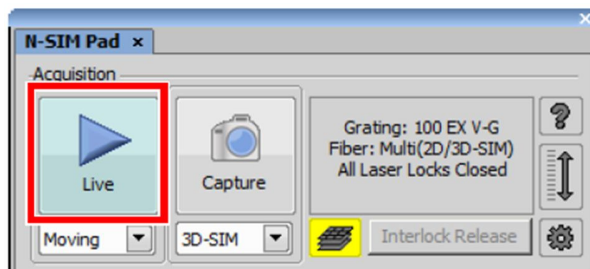
光栅	光纤	描述
100EX V-G	多模光纤	支持 100x 物镜，405-561nm 波长的激光
100EX V-R	多模光纤	支持 100x 物镜，405-640nm 波长的激光
60EX V-R	多模光纤	支持 60x 物镜，401-640nm 波长的激光
TIRF 488	单模光纤	支持 100x 物镜，TIRF 488 波长的激光
TIRF 561	单模光纤	支持 100x 物镜，TIRF 561 波长的激光

3.3.3 预览画面

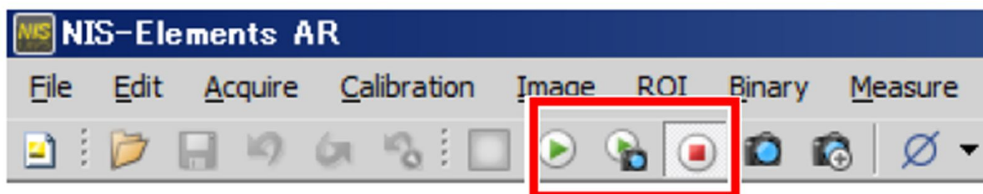
点击[Live]开始预览画面。



再次点击[Live]画面，即可停止预览。

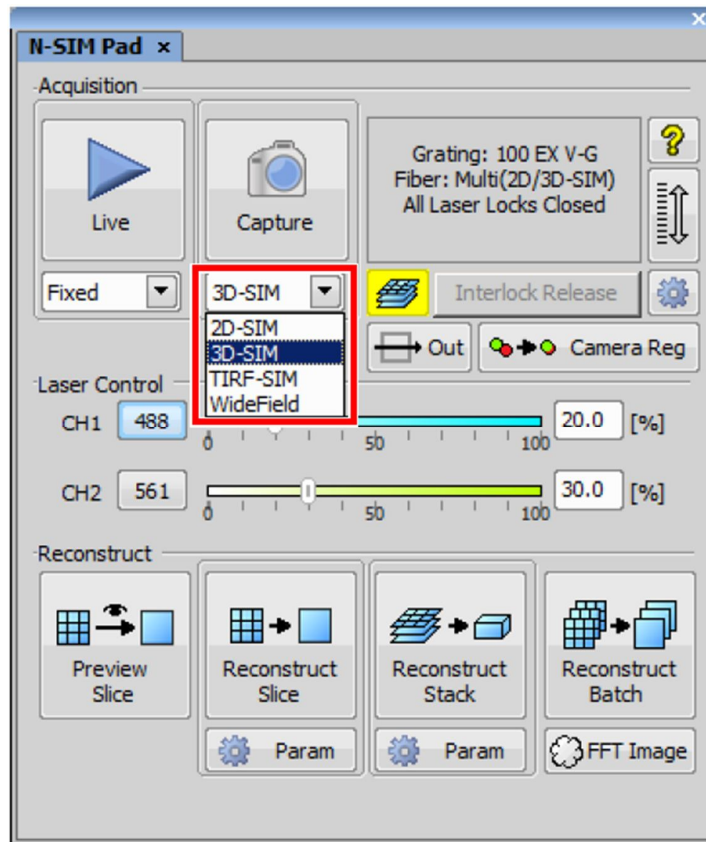


在 Elements 菜单上也可以点击相应按钮进行预览的开始和结束。



*预览画面是使用 epi 照明的实时图像，并非真正的 SIM 图像。

3.3.4 拍摄模式的选择

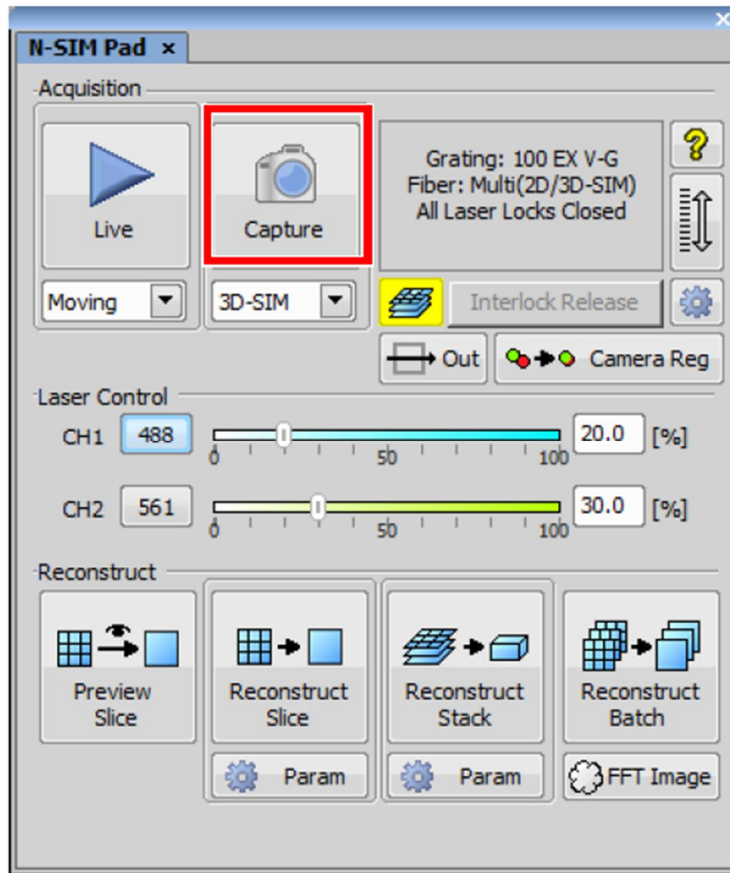


SIM 模式	描述	
2D-SIM	<p>自动拍摄 9 张图像，包括 3 个相位和 3 个光栅角度，作为 SIM 原始数据。</p> <p>这个模式使用的是多模光纤。其 Z 方向上的分辨率与常规荧光成像相同，因此适合薄样本。</p>	
3D-SIM	<p>自动拍摄 15 张图像，包括 5 个相位和 3 个光栅角度，作为 SIM 原始数据。其 XY 方向分辨率与 2D-SIM 一样，但 3D-SIM 可以在样本 Z 轴上做光学片层扫描。</p> <p>这个模式使用的是多模光纤。</p> <p>3D-SIM 有两种重建方式，“Slice 3D-SIM”和“Stack 3D-SIM”。理论上这两种重建方式得到的图像质量是一样的。Slice 3D-SIM 可以扫任意层数的 Z stacks 图像，并且适用于做活细胞的成像。</p> <p>而 Stack 3D-SIM 是一次性获取 Z 方向的信息，因此会比 Slice 3D-SIM 有着噪音更小的图像质量。Stack 3D-SIM 适合于做固定细胞拍摄，因为这种方式的拍摄时间较长。</p>	
	Slice 3D-SIM	<p>Slice 3D-SIM 也可以指拍摄 1 层 SIM 图像。重建 Z stacks 的 3D 立体图像时，Slice 3D-SIM 是对每一层图像分别单独进行重建的，最后再合成一个完整的 3D 立体图。</p>
	Stack 3D-SIM	<p>Z-Stacks 的可以设置 16-512 层。重建数据也可以低于 16 层，但是会导致图像质量下</p>

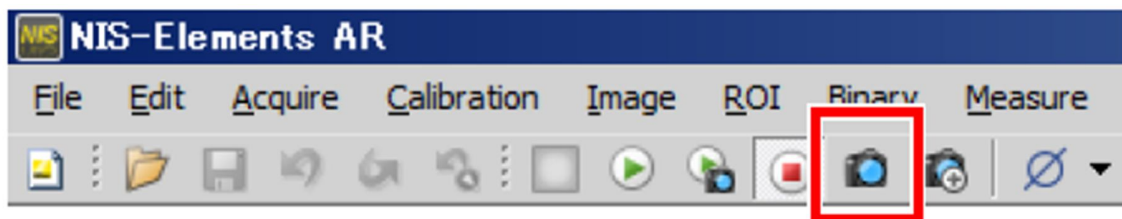
		<p>降。如果层数多于 512 层，也可以拍摄两次进行拼接，但是有可能会造成两层中间出现拼缝。</p> <p>Z-Stacks 的层数是与步径大小相关的，关于 Z-Stacks 的层数与步径大小的推荐组合，详见 3.5-2 表格。</p>
TIRF-SIM	<p>自动拍摄 9 张图片，3 个相位和三个光栅角度作为 SIM 原始图。</p> <p>无法拍摄真正的 TIRF 图像。</p> <p>这个模式使用的是单模光纤。</p>	
Fixed	<p>普通拍摄模式下，代表拍摄中结构化照明的± 1相位的照明光固定不动。</p>	
Moving	<p>普通拍摄模式下，代表拍摄中结构化照明的± 1相位的照明光会发生移动。</p>	
WideField	<p>普通拍摄模式下，使用通过光栅 0 相位的照明光进行照明。</p>	

3.3.5 图像的拍摄

点击[Capture]可进行 SIM 图像的拍摄。



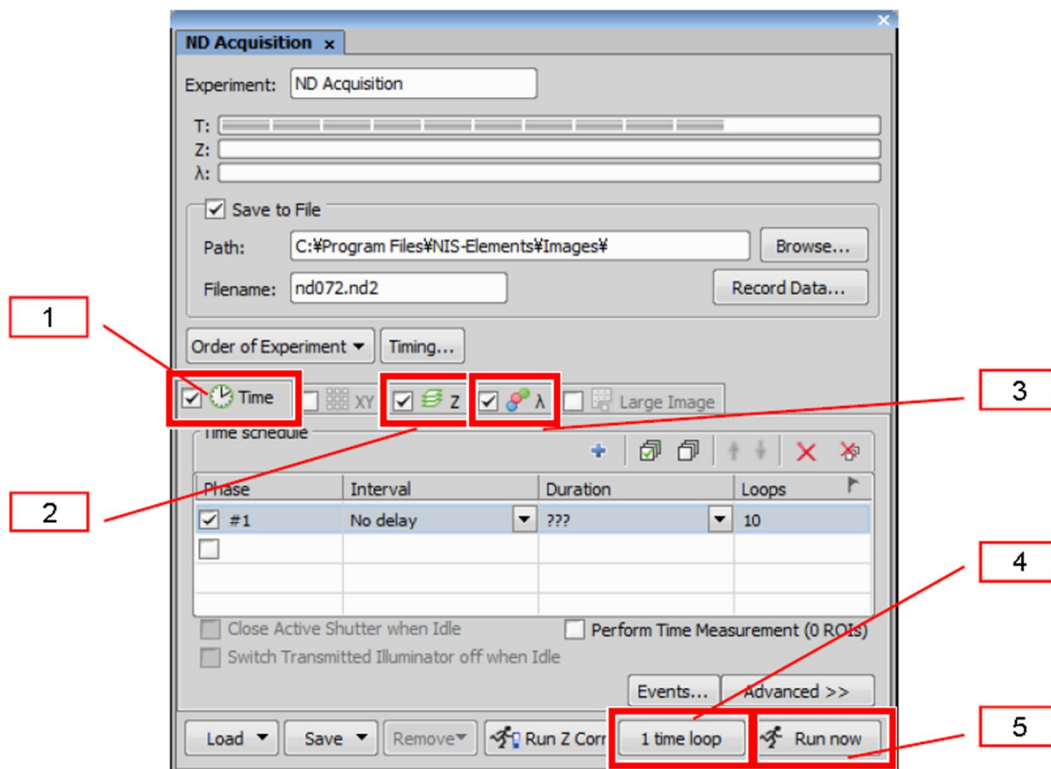
也可以使用 NIS-Elements 菜单栏里的拍摄按钮进行拍摄。



*Capture 按键只能拍摄单张（单通道）的 SIM 图像，如果想要拍摄多通道等多幅的 SIM 图像，请使用 ND 拍摄模式进行拍摄。

3.3.6 ND 拍摄 SIM 图像

选择菜单栏中[View]->[Acquisition Controls]->[ND Acquisition], 或者在软件面板上点击鼠标右键选择[Acquisition Controls]->[ND Acquisition], 调用 ND 设置面板。

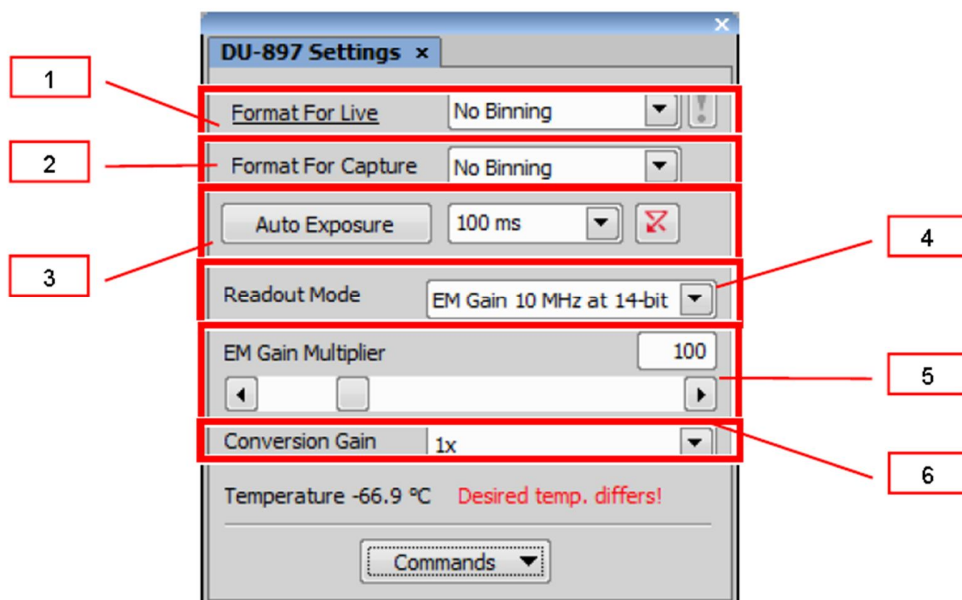


控制键		描述
1	时间设置栏	设置长时程拍摄模式，每一个拍摄序列中可以设置时间间隔、总时长和拍摄循环数。
2	Z-Stack 设置栏	用于设置拍摄 Z-Stack 数据，可以设置 Z-Stack 的层数、步径大小及位置。
3	Lambda 设置栏	用于拍摄多通道，通过设置不同通道的 OC 进行多通道拍摄。
4	1 time loop	启动一次拍摄循环，通常用于检测拍摄参数设置是否完善已经单次循环所需的时间。
5	Run now	开启 ND 拍摄模式，会按照所有打勾的拍摄模式进行 ND 拍摄。

3.3.7 相机设定

Andor DU-897

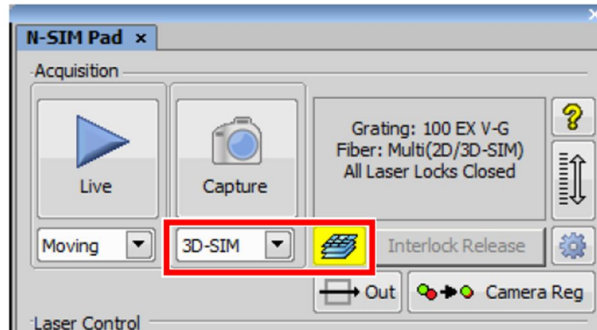
点击菜单栏中[View]->[Acquisition Controls]->[DU-897 Settings]，或者在软件空白处点击鼠标右键选择[Acquisition Controls]->[DU-897 Settings]显示相机设置面板。



设置单元		推荐设置
1	Live 格式	No Binning (Binning 模式无法再 SIM 拍摄中使用)
2	Capture 格式	No Binning (Binning 模式无法再 SIM 拍摄中使用)
3	曝光时间	可以设置任意所需的时间 数据的采集时长会取决于相机的曝光时间
4	读出模式	2D/ Slice 3D-SIM 对于会运动的样本而言，例如活细胞等，选择“EM Gain 10MHz at 14-bit”。选择“EM Gain 1MHz at 16-bit”时，虽然会使拍摄时间变长，但是能获得更好的信噪比。
	Stack 3D-SIM	选择“Normal 1 MHz at 16-bit”或者“EM Gain 1MHz at 16-bit”
5	EM Gain 增益	小于 300 都可选择
6	次级增益	2D/ Slice 3D-SIM 1x (三种都可以选)
	Stack 3D-SIM	1x 或者 2.4x (更高的 gain 可能会增加噪声)

3.4 Stack SIM 图像的拍摄

3.4.1 选择 3D-SIM 模式

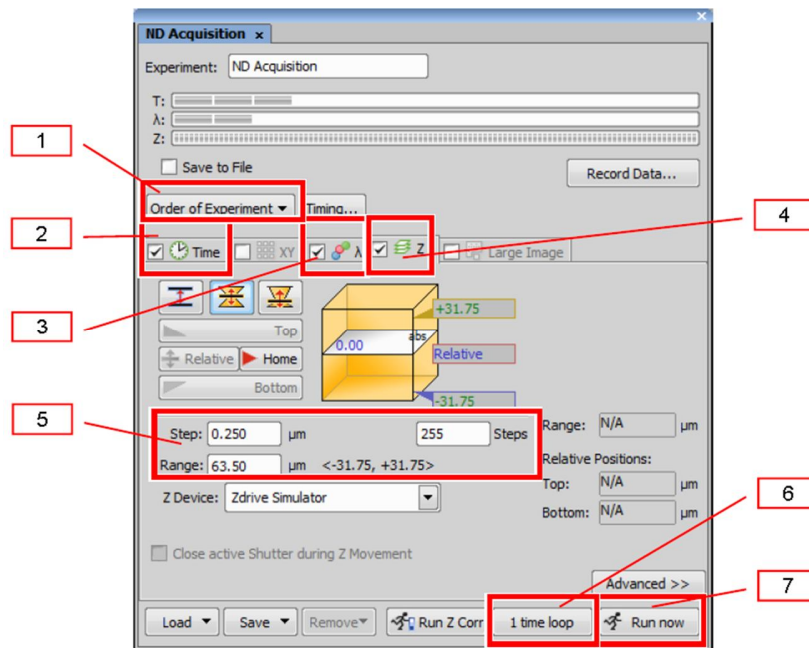


*做 Stack SIM 拍摄时，NIS-Elements 必须连上 MCL Nano-Drive。如果没有连上 MCL，那么即使选择了 3D-SIM 模式，Z-Stack 窗口也会不可点。

*拍摄 Stack SIM 图像时，相机的读出模式推荐使用“EM Gain 1MHz at 16-bit”。

3.4.2 Z-Stack 设置

拍摄 Z-Stack SIM 图像时，需要在 ND Acquisition 中设置 Z 方向上的拍摄范围。



在 Z (4) 选项卡前打勾，并在预览画面下，设置拍摄范围（可以 Top, Bottom 设置范围，也可以中心定位法手动输入范围值），(5) 即设置步径 (Step) 及层数 (Steps) 的区域。通常拍摄 Z-Stack 时有推荐的步径与层数组合。

N-SIM Stack 拍摄步径与层数推荐组合（100x 物镜）

Step Pitch	7	8 to 15	16 to 31	32 to 63	64 to 127	128 to 255	256 to 511
0.03 μm	Unsettable	Unsettable	Settable	Settable	Settable	Settable	Settable
0.06 μm	Unsettable	Deprecated	Settable	Settable	Settable	Settable	Settable
0.12 μm	Deprecated	Deprecated	Settable	Settable	Settable	Settable	Settable
0.24 μm	Deprecated	Deprecated	Settable	Settable	Settable	Settable	Unsettable
0.48 μm	Deprecated	Deprecated	Settable	Settable	Settable	Unsettable	Unsettable
0.96 μm	Deprecated	Deprecated	Settable	Settable	Unsettable	Unsettable	Unsettable
1.92 μm	Deprecated	Deprecated	Settable	Unsettable	Unsettable	Unsettable	Unsettable
3.84 μm	Deprecated	Deprecated	Unsettable	Unsettable	Unsettable	Unsettable	Unsettable
7.68 μm	Deprecated	Unsettable	Unsettable	Unsettable	Unsettable	Unsettable	Unsettable

N-SIM Stack 拍摄步径与层数推荐组合（60x 物镜）

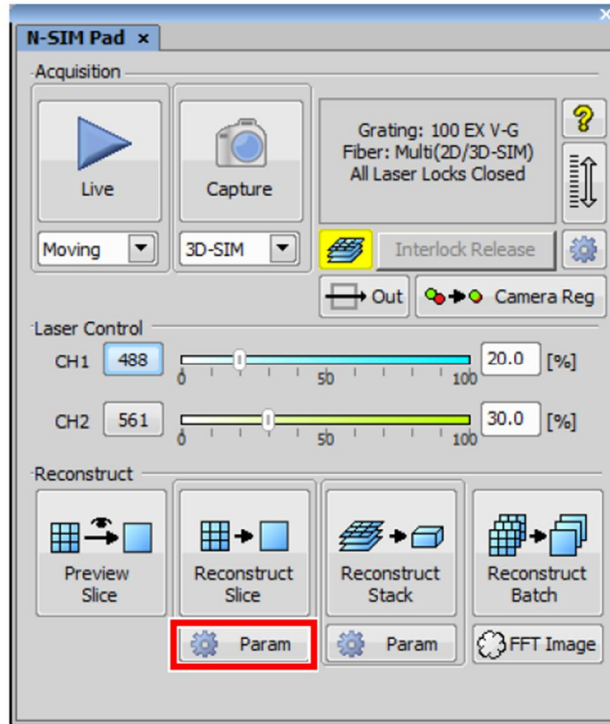
Step Pitch	7	8 to 15	16 to 31	32 to 63	64 to 127	128 to 255	256 to 511
0.04 μm	Unsettable	Unsettable	Settable	Settable	Settable	Settable	Settable
0.08 μm	Unsettable	Deprecated	Settable	Settable	Settable	Settable	Settable
0.16 μm	Deprecated	Deprecated	Settable	Settable	Settable	Settable	Settable
0.32 μm	Deprecated	Deprecated	Settable	Settable	Settable	Settable	Unsettable
0.64 μm	Deprecated	Deprecated	Settable	Settable	Settable	Unsettable	Unsettable
1.28 μm	Deprecated	Deprecated	Settable	Settable	Unsettable	Unsettable	Unsettable
2.56 μm	Deprecated	Deprecated	Settable	Unsettable	Unsettable	Unsettable	Unsettable
5.12 μm	Deprecated	Deprecated	Unsettable	Unsettable	Unsettable	Unsettable	Unsettable
10.24 μm	Deprecated	Unsettable	Unsettable	Unsettable	Unsettable	Unsettable	Unsettable

*当参数设定成超出规定范围的数值时，会弹出窗口提示错误，并且无法将数值赋予 ND Acquisition 面板上。

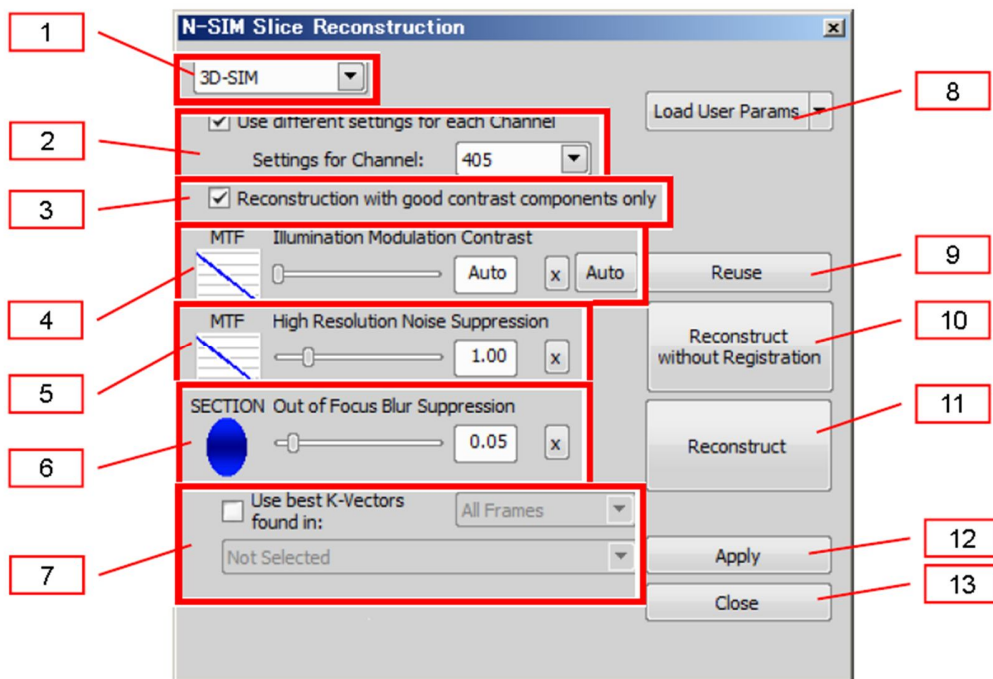
3.5 图像重建

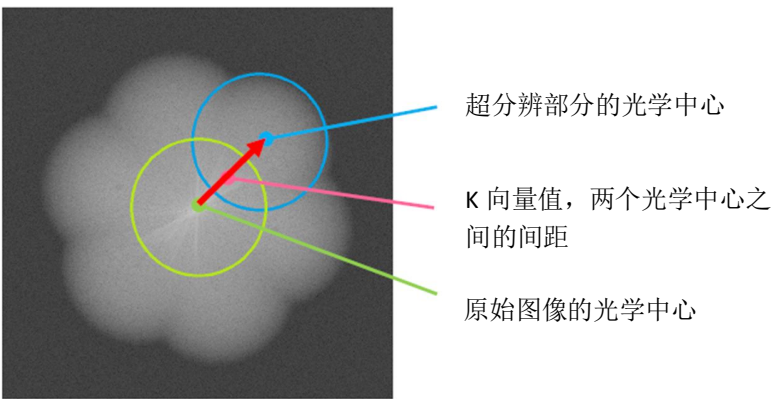
3.5.1 SIM Slice 图像重建

设置重建参数



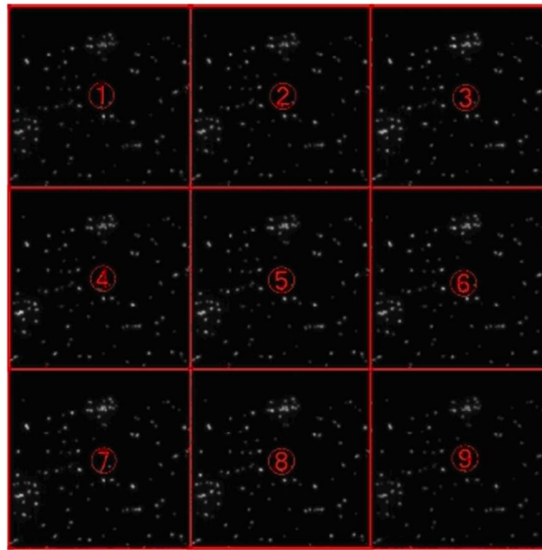
点击“Reconstruct Slice”下方的[Param]按键，会显示 N-SIM Slice 重建设置窗口。



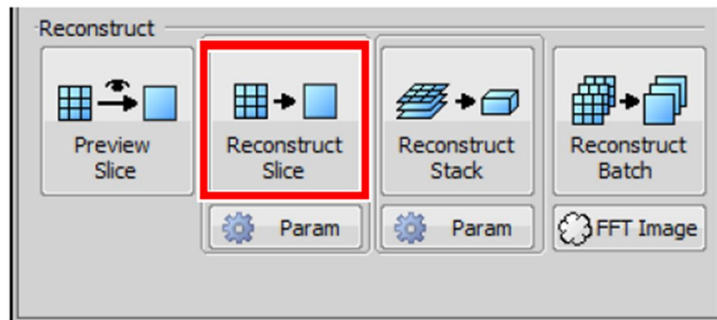
功能图标		描述
1	SIM 模式选择	选择所处理图像的拍摄模式，不同的模式有不同的参数设定。
2	是否单独设置通道参数选择框	勾选此选项代表每个通道单独使用一套设置参数，不勾选此选项代表所有通道共用同一套设置参数。
3	是否仅处理对比度高的图像部分	当光照对比度被认定为“低”使，勾选此选项则仅针对图像中对比度高的信号进行重建。 这一选项只有在“ Illumination Modulation Contrast ”设置为“ Auto ”时才可选。
4	照明调制对比度	用于降低 SIM 重建图像中的伪像信号并提高对比度。可以设置为从 0.01 至 1.00 的数字（3D-SIM 可设置 0.01-5.00）。 若选择“ Auto ”，则系统会根据获取的图像质量，自动进行最优方案的设置。
5	噪音抑制参数设定	设定对重建的 SIM 图像的噪音水平的抑制程度参数。设置范围为 0.10-5.00。 改变这一参数代表改变高频信号的强弱。
6	非焦面干扰抑制	设置重建图像的光学切面厚度。设置范围为 0.01-0.50。 改变这一参数代表改变 Z 方向上的光照覆盖范围。
7	最优 K 矢量选择	在重建过程中，计算所需的 K 矢量值是从不同波长拍摄的图像中计算出来的。勾选此选项将从一个序列图像（ Timelapse 和 Z-Stack 等）中的每一张图里获取最可靠且噪音最低的 K 向量值。 
8	载入自定义参数	可以加载已保存的用户自定义参数，也可以添加或删除自定义参数。
9	复用参数	将已重建好的图像参数赋予新的图像参数设定中。
10	重建图像（不应用校准参数）	显示出重建图像。 在双相机模式中，重建图像的不同通道不会应用已保存的校准参数。
11	重建图像	显示出重建图像。 在双相机模式中，重建的图像的不同通道会应用以保存的校准参数。
12	应用	应用被更改过的参数，当前窗口将不会关闭。
13	关闭	关闭当前窗口。如果有参数发现改变，会弹出对话框询问是否保存更改。

重建 Slice SIM 图像

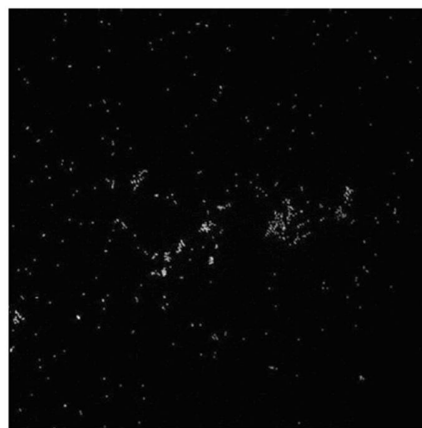
点击[Reconstruct Slice]按键，就可以获得一张重建好的 SIM 图像。



9 张原始 SIM 图像



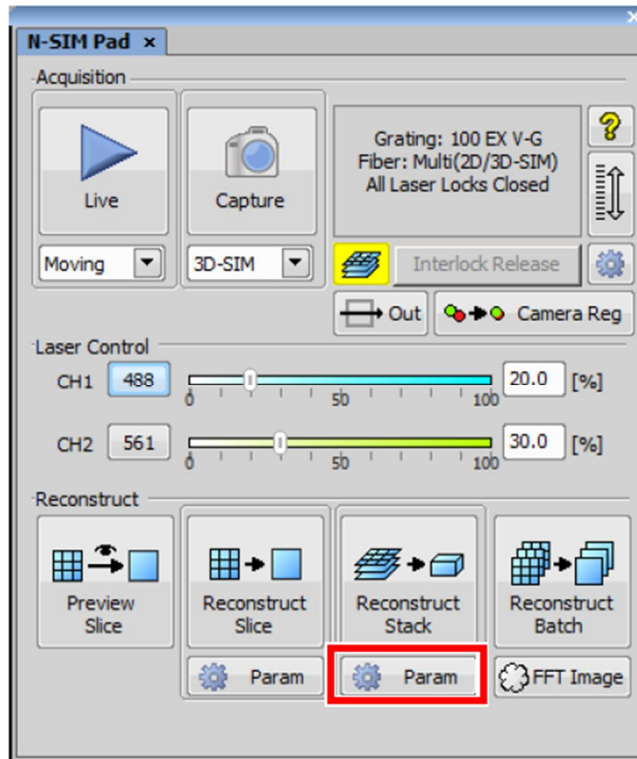
点击[Reconstruct]之后会自动弹出重建后的 SIM 图像。细胞标本[0.5,0.1,0.15]



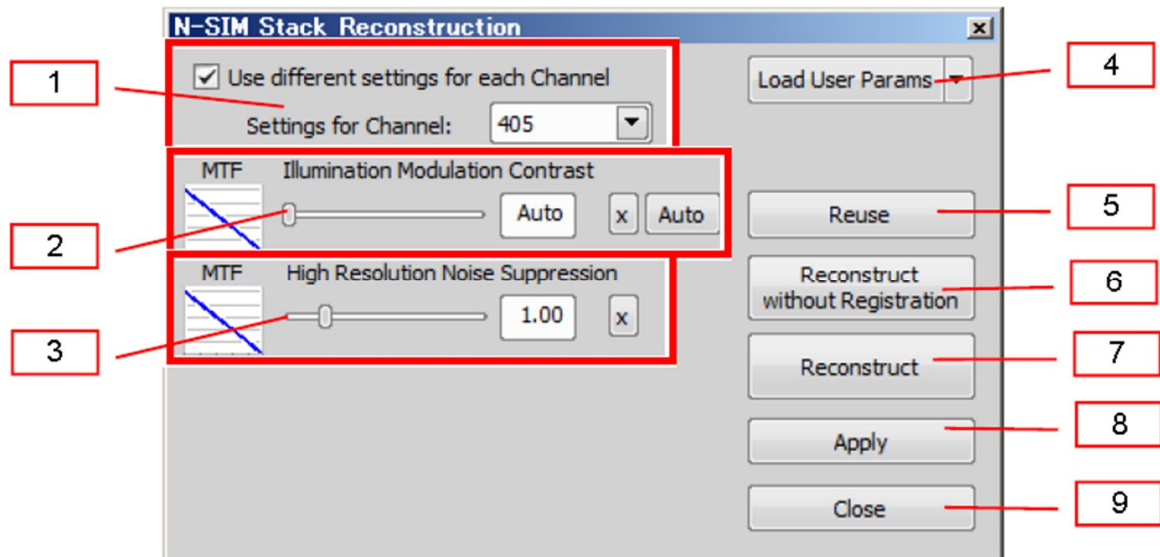
重建后的 SIM 图像

3.5.2 SIM Stack 图像重建

设置重建参数



点击“Reconstruct Stack”下方的[Param]按钮，会显示 N-SIM Slice 重建设置窗口。

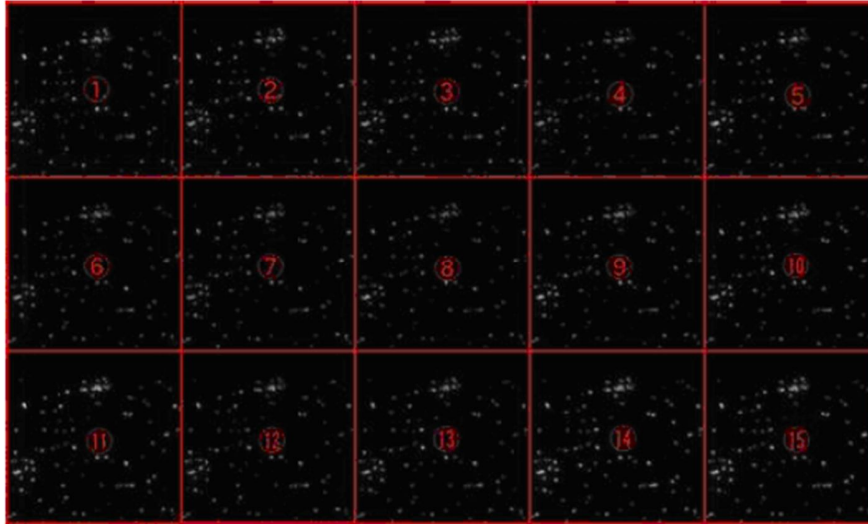


功能图标		描述
1	SIM 模式选择	选择所处理图像的拍摄模式，不同的模式有不同的参数设定。
2	照明调制对比度	用于降低 SIM 重建图像中的伪像信号并提高对比度。

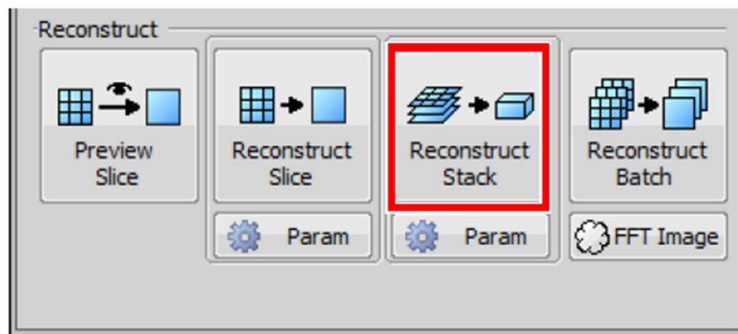
		<p>可以设置为 Auto 或者 0.01-5.00。</p> <p>若选择 “Auto”，则系统会根据获取的图像质量，自动进行最优方案的设置。当图像的光照对比度很低时，也可能会获得噪音较大的图像，这种情况下，请选择 3 中的仅处理对比度高的图像信号。</p>
3	噪音抑制参数设定	<p>设定对重建的 SIM 图像的噪音水平的抑制程度参数。</p> <p>设置范围为 0.10-5.00。</p> <p>改变这一参数代表改变高频信号的强弱。</p>
4	载入自定义参数	<p>可以加载已保存的用户自定义参数，也可以添加或删除自定义参数。</p>
5	复用参数	<p>将已重建好的图像参数赋予新的图像参数设定中。</p>
6	重建图像（不应用校准参数）	<p>显示出重建图像，但多通道图像将不会应用偏移校准参数。</p> <p>在双相机模式中，重建图像的不同通道不会应用已保存的校准参数。</p>
7	重建图像	<p>显示出重建图像。</p> <p>在双相机模式中，重建的图像的不同通道会应用以保存的校准参数。</p>
8	应用	<p>应用被更改过的参数，当前窗口将不会关闭。</p>
9	关闭	<p>关闭当前窗口。如果有参数发现改变，会弹出对话框询问是否保存更改。</p>

重建 Stack SIM 图像

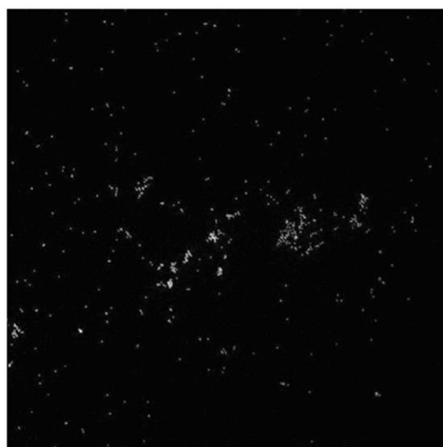
点击[Reconstruct Stack]按键，就可以获得一张重建好的 SIM 图像。



15 张原始 3D-SIM 图



点击[Reconstruct]之后会自动弹出重建后的 SIM Stack 图像。



重建后的 3D SIM 图像

4 结束语

写在最后，近些年关于超分辨率成像技术越来越引人注目，并带来了显微镜领域上里程碑式的革新。与传统的普通荧光成像以及十分流行的共聚焦成像一样，超分辨率成像技术同为科学研究的一种辅助工具，都是生化研究领域中的一把利器。尤其是对蛋白质水平上的探索，更是对从前的理论基础提供了重要佐证，如同科学家的“眼睛”一般，继续在科研道路的浩瀚宇宙里，不断发现新的行星。

工欲善其事，必先利其器。在科研的探索之路上，选择得力的研究方法，势必能对科研工作带来极大的助益。不存在所谓更优越的研究之法，只有合适与不合适的研究方法之分。穿最合适的鞋，才能走更远的路。所以想要甄选最适宜的研究方法，就需要认真、理性的去学习和了解它们，尤其是那些最前沿的科学技术。本手册即是在这样的初衷下整理和编纂完成，希望能对各位科研工作者们，带来一点收获。

祝所有的科研工作者都能获得灵感之源，碰撞出最美的科学火花。