

共軛焦及電子顯微鏡技術

92/07/ 07 (一)

錢宗良

光學顯微鏡基本原理及在細胞生物學運用

光學顯微鏡基本操作與影像擷取實習

92/07/08 (二)

江世元: 光學顯微鏡基本結構相位差與微分干涉運用

葉建宏: 立體解剖顯微鏡與微切解運用及實習

92/07/09 (三)

王金湧: 螢光顯微鏡及共軛焦顯微鏡基本操作原理

錢宗良: 螢光顯微鏡及共軛焦顯微鏡基本操作實習(I)

92/07/10 (四)

董成淵: Two photon 共軛焦顯微鏡原理

錢宗良: 共軛焦顯微鏡操作實習(II)

92/07/11 (五)

錢宗良: 共軛焦顯微鏡操作技術

錢宗良: 共軛焦顯微鏡操作實習(III)

92/07/14 (一)

錢宗良: 活體細胞螢光染色技術

錢宗良: 活體細胞螢光染色技術實習

92/07/15 (二)

盧國賢: 電子顯微鏡基本原理

盧國賢: 電子顯微鏡標本製作實習(I)

92/07/16 (三)

盧國賢: 電子顯微鏡上機操作實習(II)

盧國賢: 電子顯微鏡上機操作實習(II)

92/07/17 (四)

呂俊宏: 免疫電子顯微鏡之運用

盧國賢: 電子顯微鏡上機操作實習(III)

92/07/18 (五)

錢宗良: 測驗與課程心得座談

共軛焦及電子顯微鏡技術

1. 本課程考試將以是非題為主，期能為大家複習所學。
2. 請假事先報備，缺席三次視同放棄學分。

課程負責老師：錢宗良 (x8193)
盧國賢教授(x8174)

課程負責助教：許詩詠 (x8185)
林憶珊 (x8188) 共軛焦顯微鏡技術
賴淑美 (x8185) 電子顯微鏡技術

光學顯微鏡基本原理及 在細胞生物學運用

錢宗良
臺灣大學醫學院
解剖學暨細胞生物學科

光学顕微鏡

1 顕微鏡の種類と構造

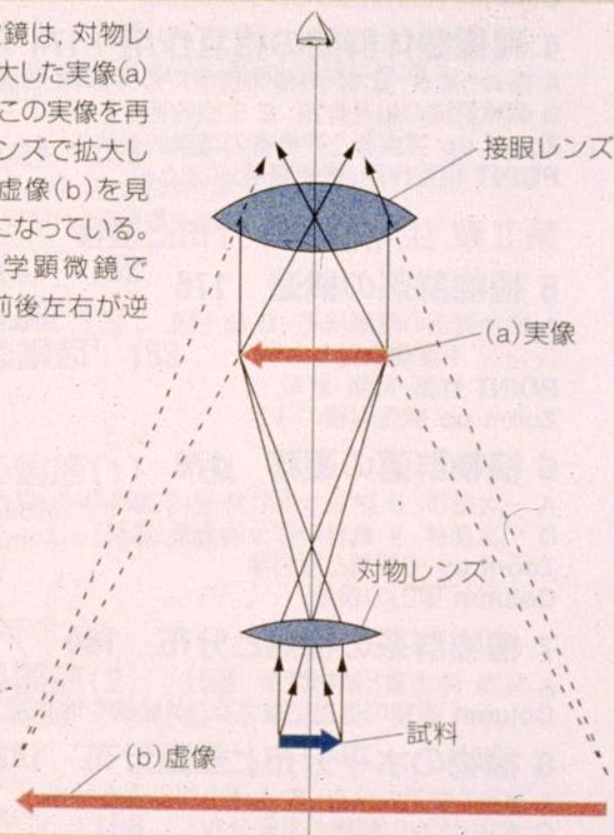
A 光学顕微鏡

● 研究用光学顕微鏡



● 光学顕微鏡の原理

光学顕微鏡は、対物レンズで拡大した実像(a)をつくり、この実像を再び接眼レンズで拡大してできる虚像(b)を見るしくみになっている。よって光学顕微鏡では、像は前後左右が逆に見える。



顯微鏡的分類

正立顯微鏡：觀察組織切片

倒立顯微鏡：觀察培養活細胞

實體顯微鏡：解剖及立體定位

第1章 顯微鏡的分類

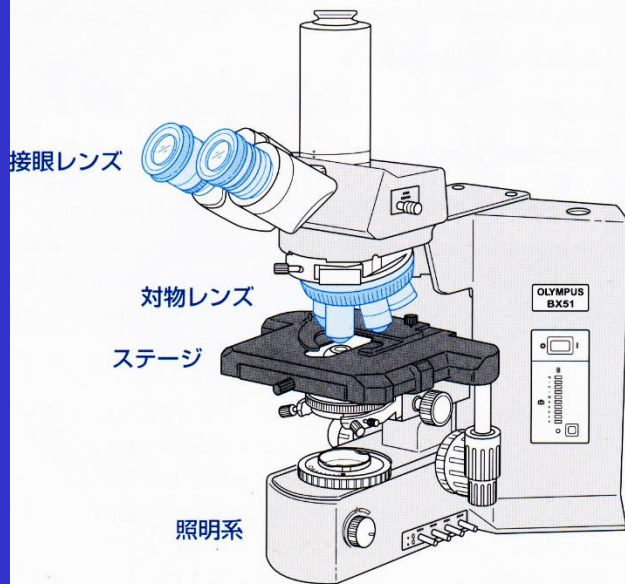


図1 正立型顯微鏡

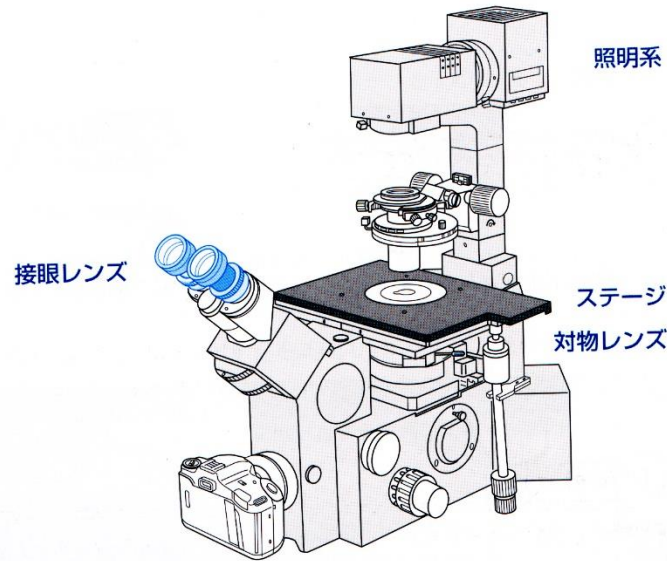
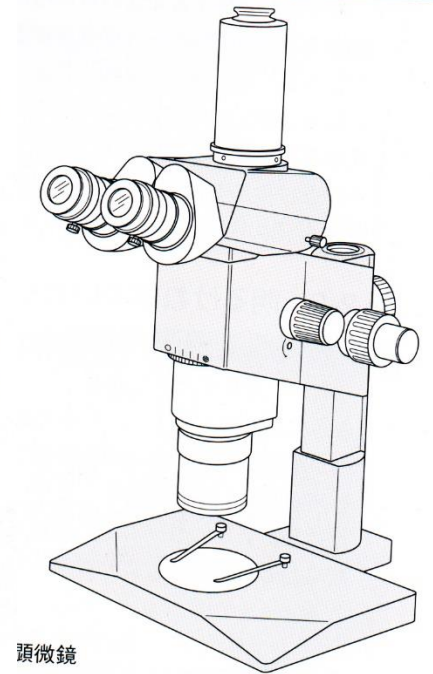


図2 倒立型顯微鏡



實體顯微鏡

D いろいろな顕微鏡と装置 試料をいろいろな面から観察できるような光学顕微鏡と付属装置が開発されている。

● 微分干渉顕微鏡



細胞分裂・原形質流動・アメーバ運動・繊毛運動の観察に使用。

● 培養倒立顕微鏡



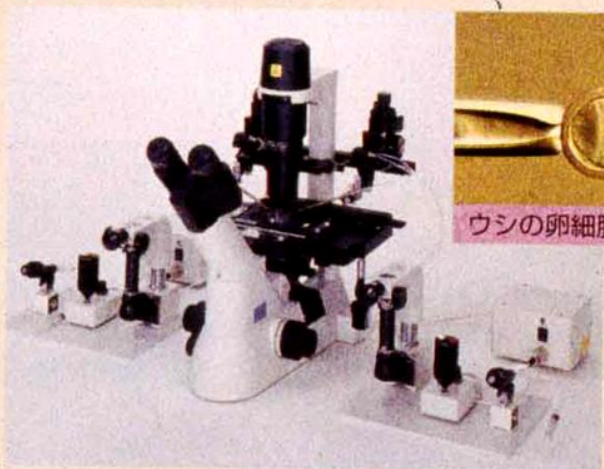
培養容器に入った細胞などの観察に使う。

● 偏光顕微鏡



偏光板を利用した顕微鏡で、筋繊維などの微細構造の観察に使用。

● マイクロマニピュレーター



顕微受精などに利用する付属装置。

● 蛍光顕微鏡



蛍光色素で抗体などを着色し、試料の発する蛍光を観察する。

● 実体顕微鏡

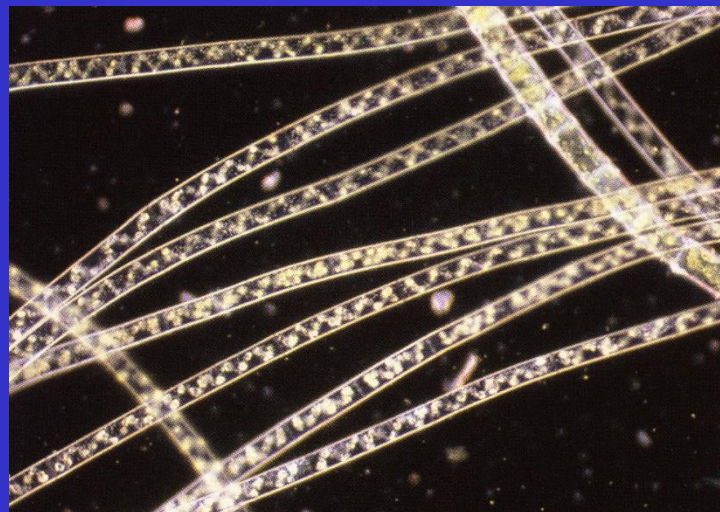
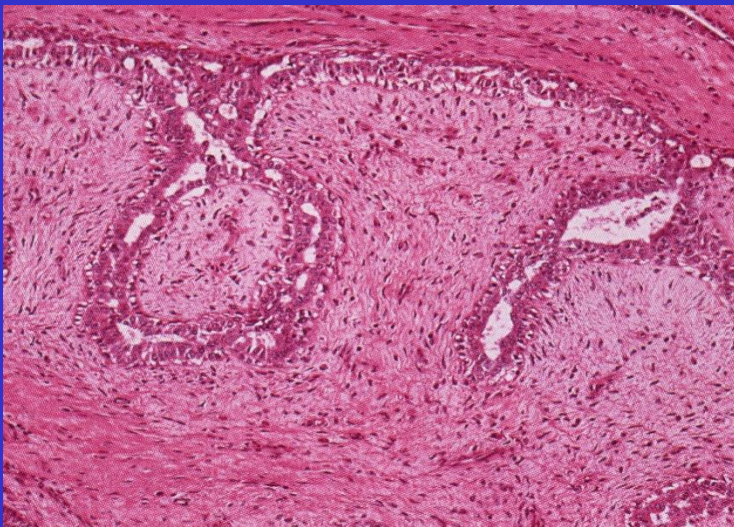
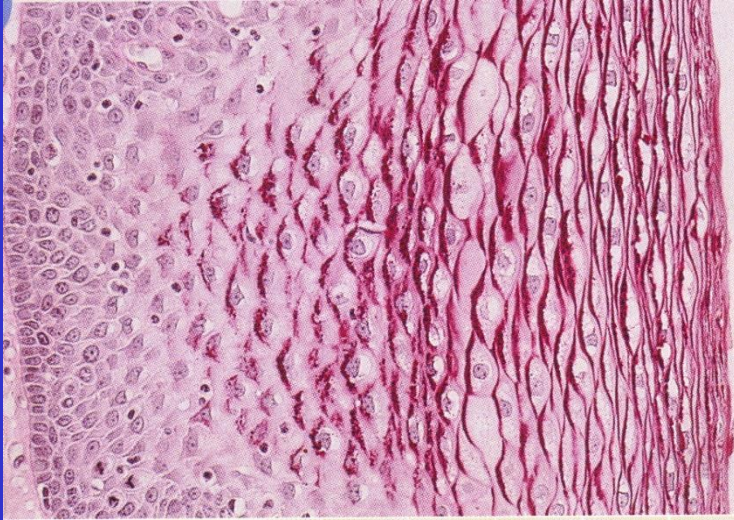


生試料を正立像で立体的に観察できる。

觀察法的顯微鏡分類

明視野 (bright field)：一般光學組織切片

暗視野 (dark field)：小動物如線蟲及纖毛鞭毛結構

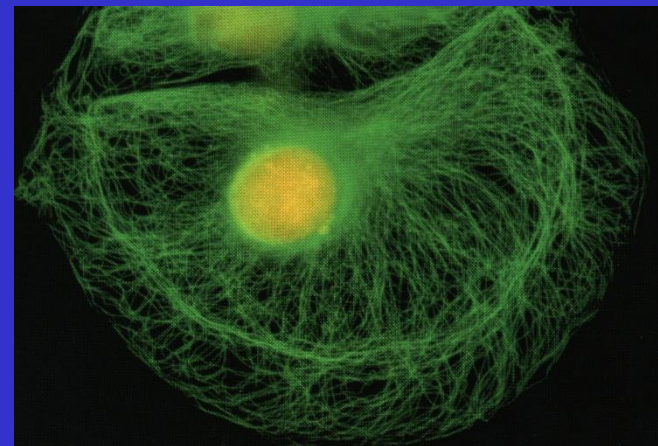
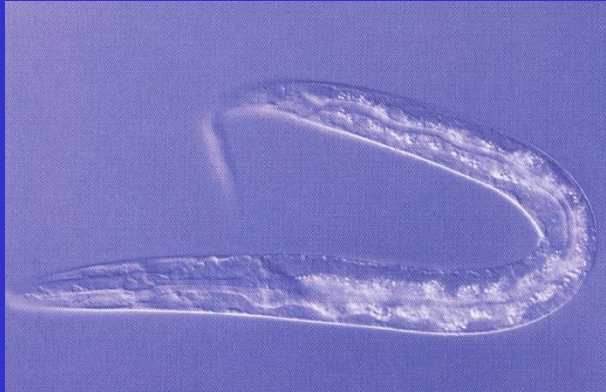
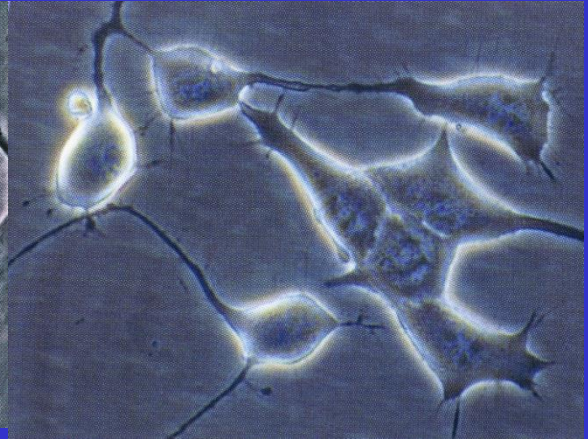
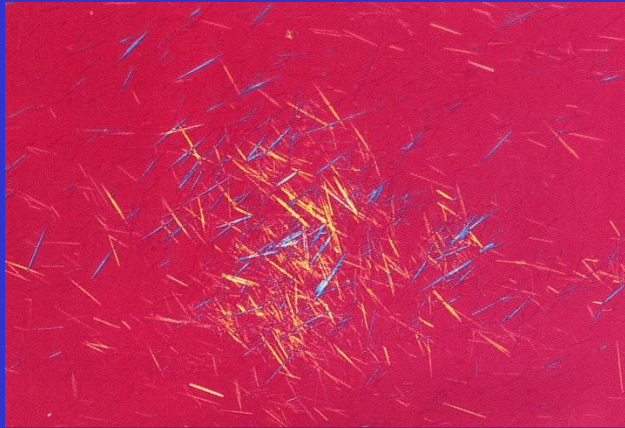


偏光 (polarized light)：堅硬的結晶結構等

位相差 (phase contrast)：一般培養活細胞

微分干涉 (differential interference contrast, DIC)：活體卵細胞及線蟲等

螢光 (fluorescence)：一般螢光染色標示或活體螢光如GFP等



照明光源路徑:

1. 穿透光照明：一般光學組織切片，薄具透光性；對比與染色
2. 反射照明：解剖及實體顯微鏡，螢光顯微鏡；表面光源反射

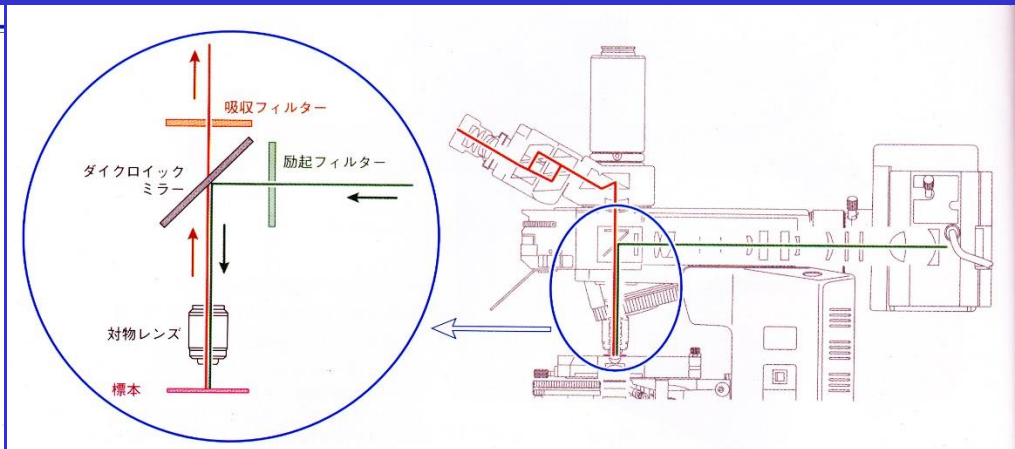
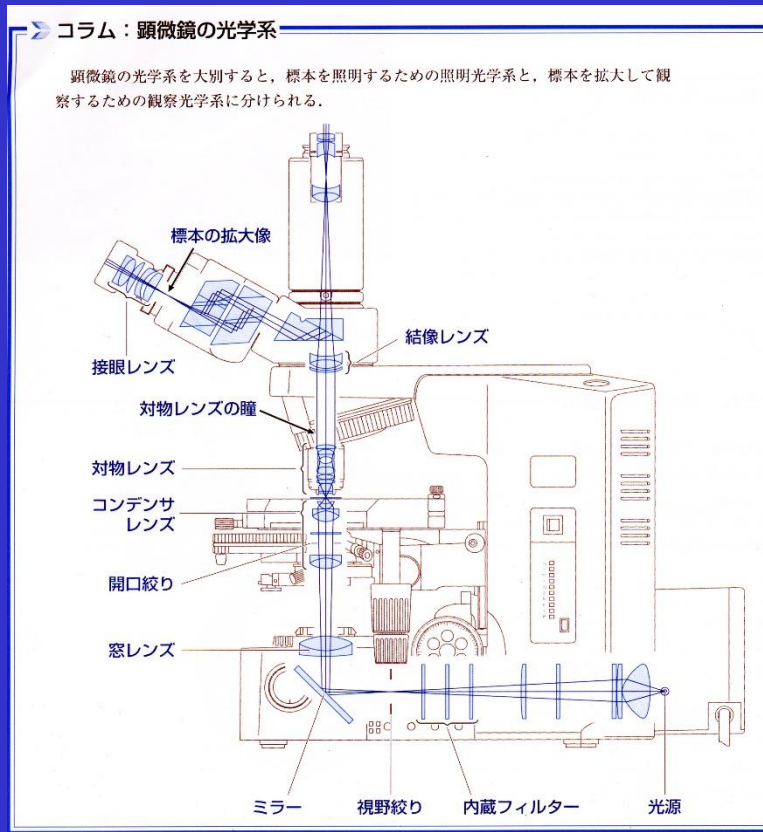
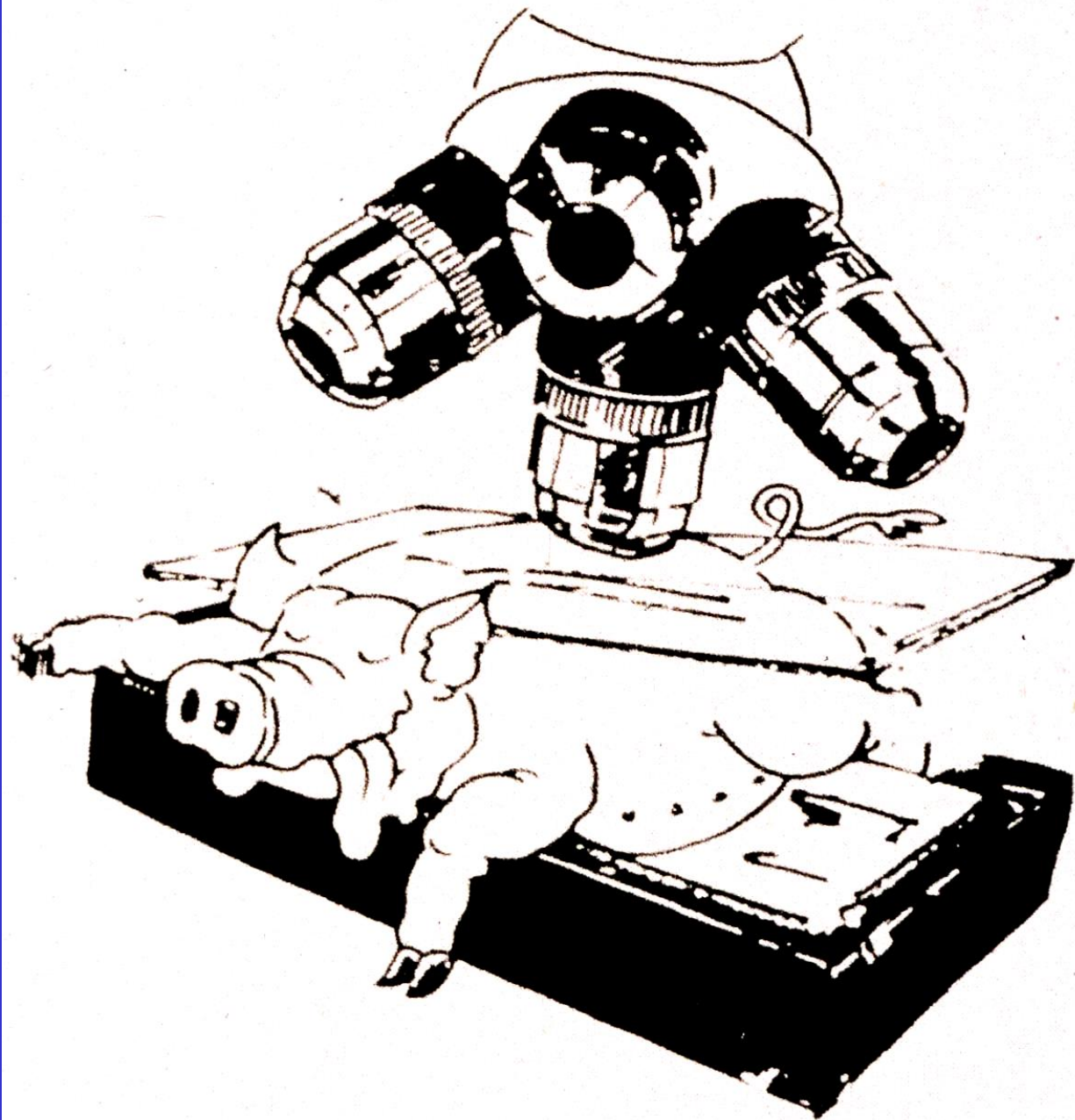


TABLE 1.3. Eye versus Instrument Resolution

DISTANCE BETWEEN
RESOLVABLE POINTS

Human eye	0.2 mm
Bright-field microscope	0.2 μm
SEM	2.5 nm
TEM	
Theoretical	0.05 nm
Tissue section	1.0 nm



(図：カールツァイス社)

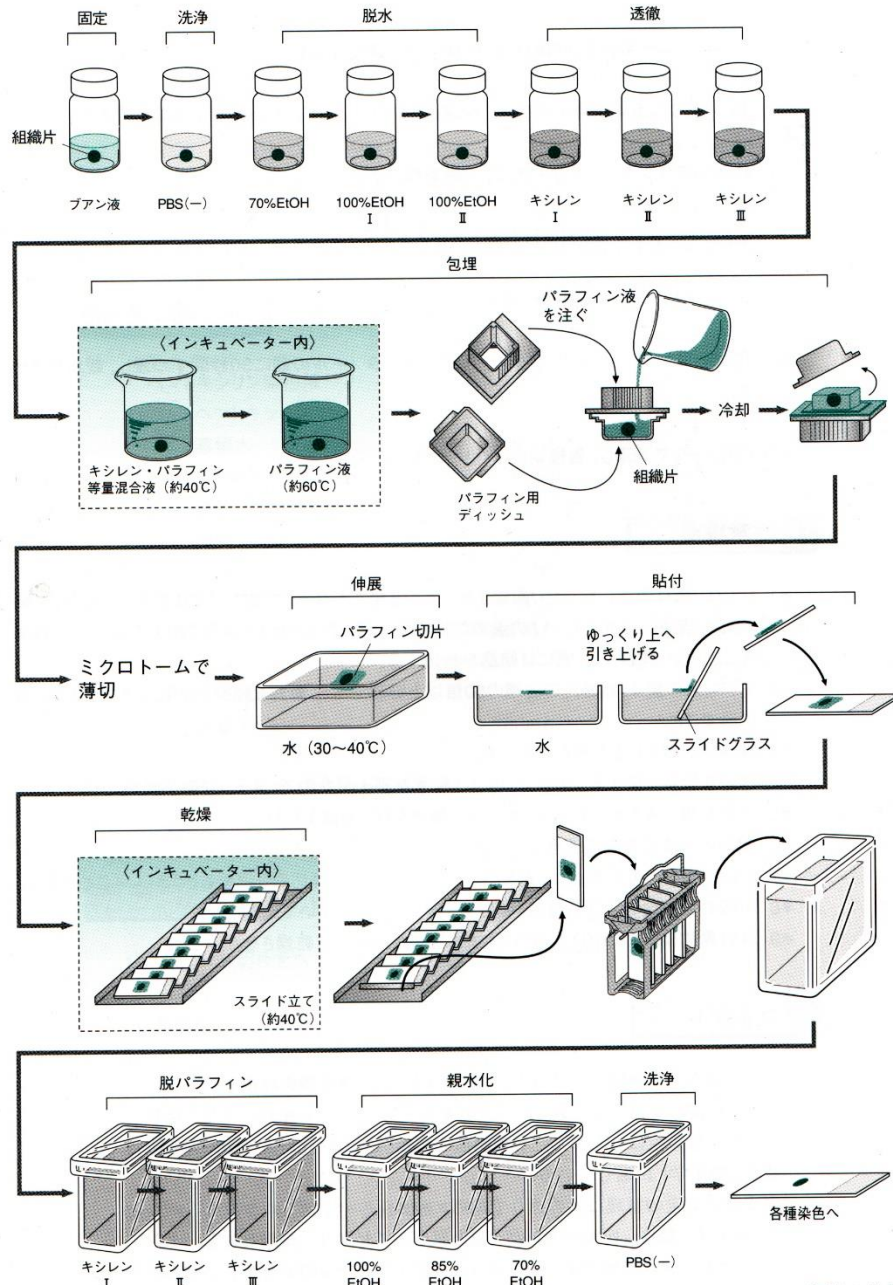


図2-8 パラフィン切片の作製

Cryostat sectioning



• Objective Lens

• Correction efficiency (UV – VIS – IR)

• N. A.

• Type (What's CS Objectives ?) - Quality

PL-APO (Delta, HCS)

PL-Fluotar

N Plan

C Plan

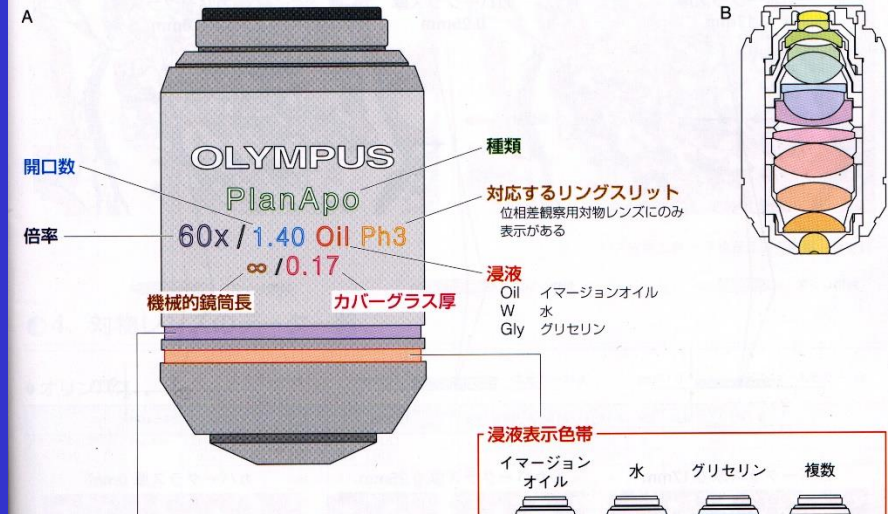
Air, Water, Oil (Imm)

Cover slip thickness
correction ?

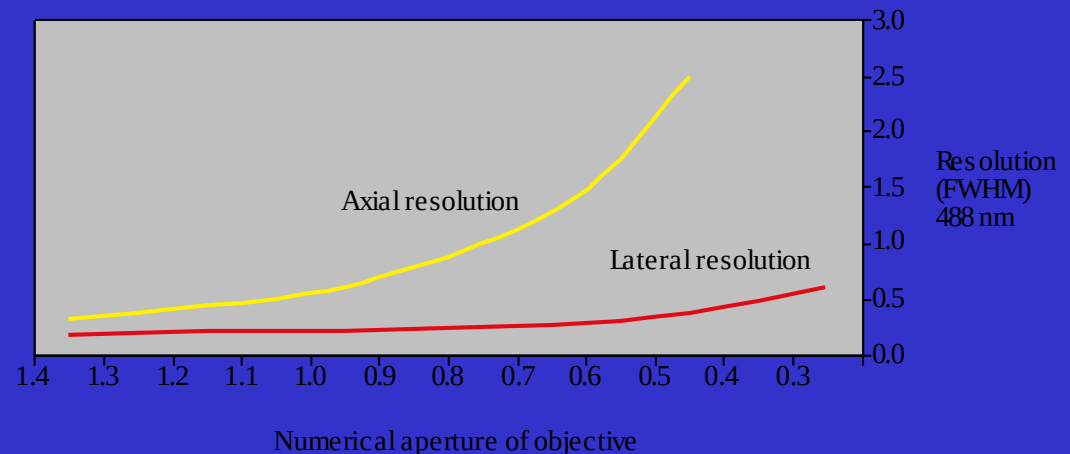
Chamber Type ?

2. 対物レンズの外と内

対物レンズの外には、種類、倍率、開口数、カバーガラス厚などが記されている。また、対物レンズの先端側には倍率と浸液を示す色帯(カラーリング)が付いており、外面の文字が見えなくてもカラーリングの色から倍率や浸液がわかるようになっている(図1A)。対物レンズの内部は、10枚前後のガラスが図1Bのように複雑に組み合わされている。



Resolving Power of the Confocal Microscope (Oil Immersion)



A

開口数

倍率



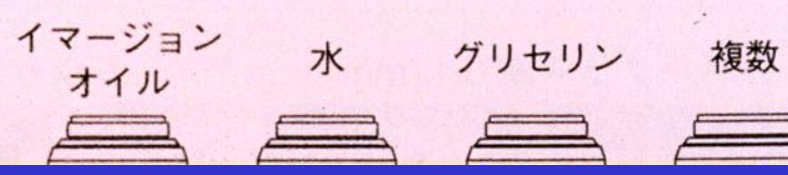
種類

対応するリングスリット
位相差観察用対物レンズにのみ
表示がある

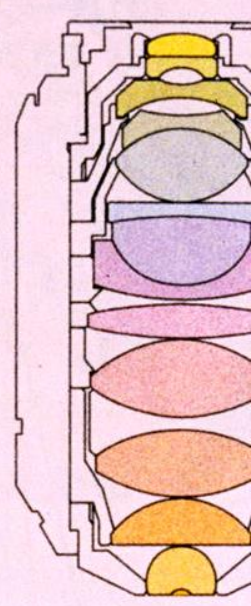
浸液

Oil イマージョンオイル
W 水
Gly グリセリン

浸液表示色帯



B



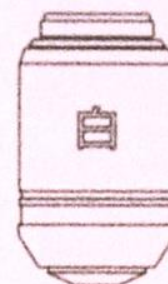
浸液表示色帯

イマージョン
オイル

水

グリセリン

複数



示色帯

2×

2.5×

4×, 5×

10×

16×, 20×
25×, 32×

40×, 50×

60×, 63×

100×以上

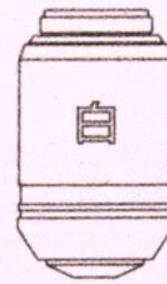
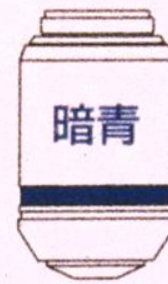
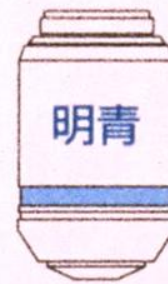
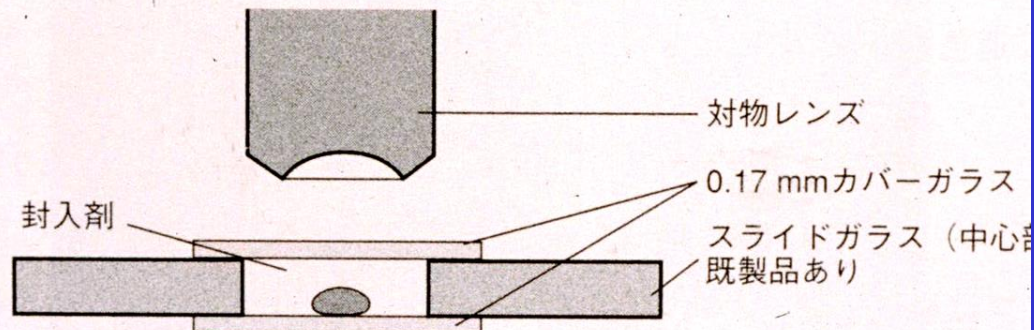
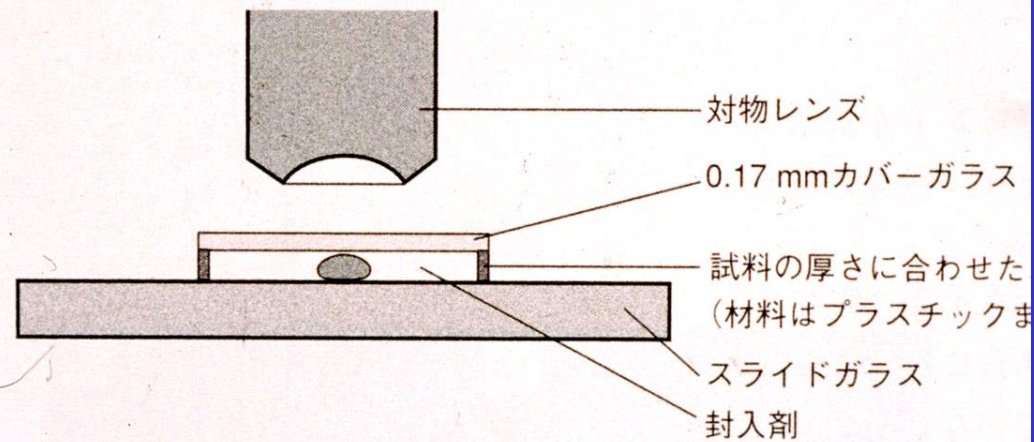
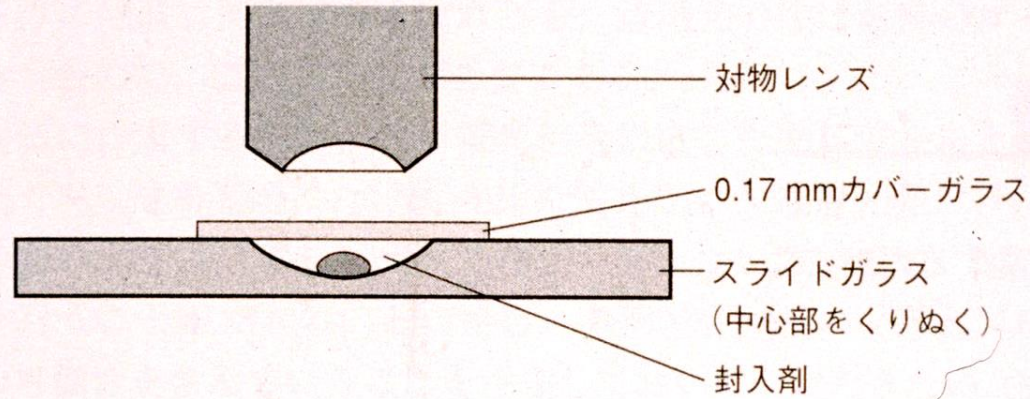


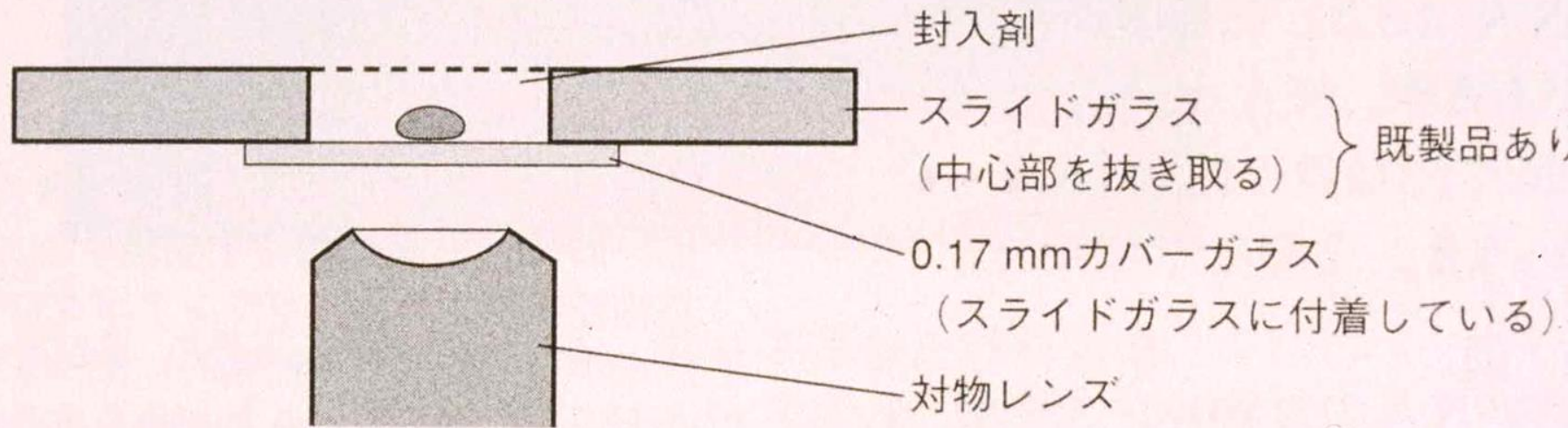
図3 対物レンズの外と内

A: 60×のプランアポクロマート油浸対物レンズの外表面。外表面に記されている文字は、明視野観察用では
用、位相差観察用では緑、偏光観察用では赤に色分けされている。また、機械的鏡筒長とは対物レンズの

正立型顕微鏡の場合

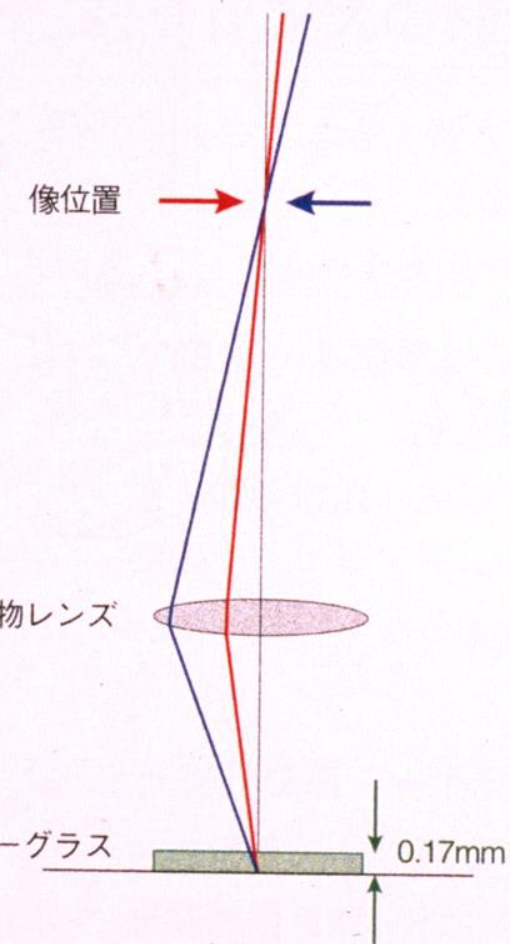


2) 倒立型顕微鏡の場合

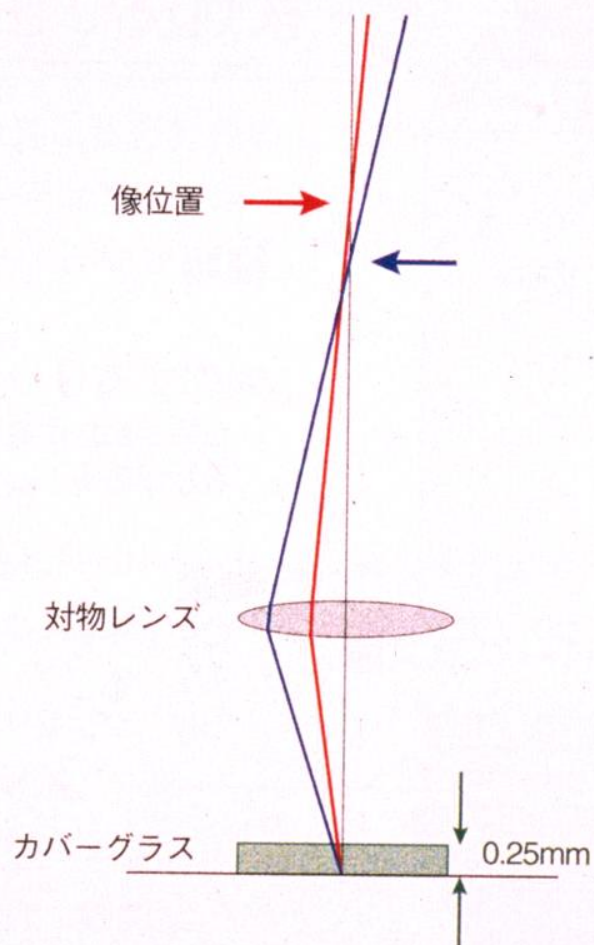


上記のほか、おのおのの研究者の必要に応じて工夫してほしい。

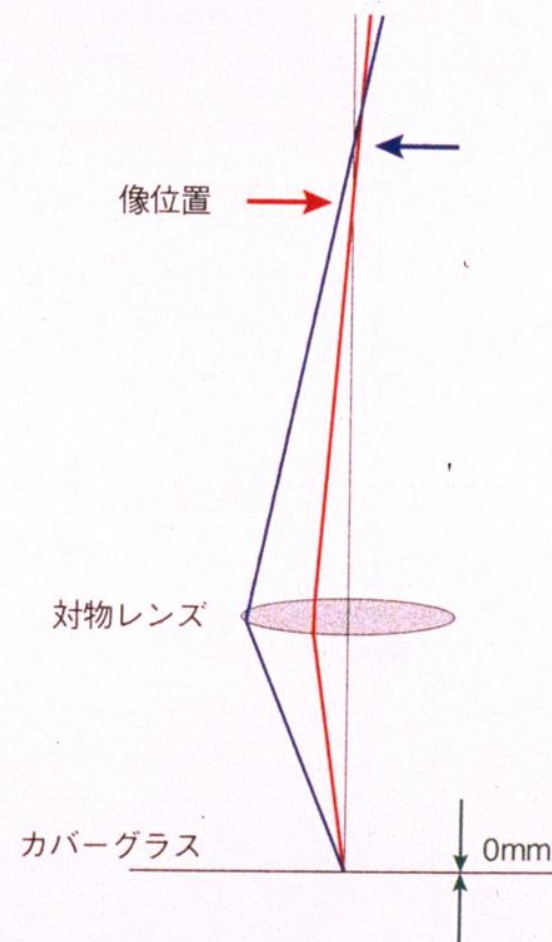
カバーガラス厚
0.17mm



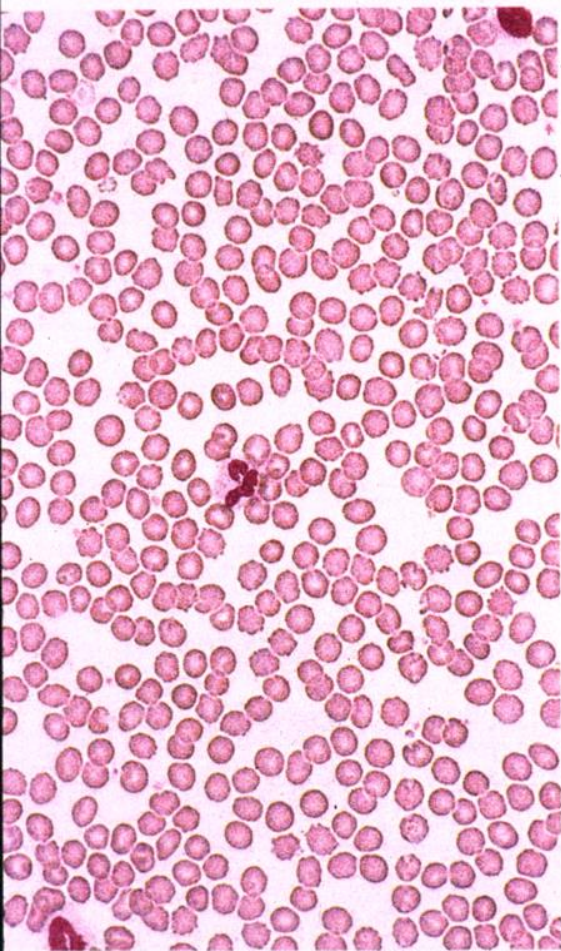
カバーガラス厚
0.25mm



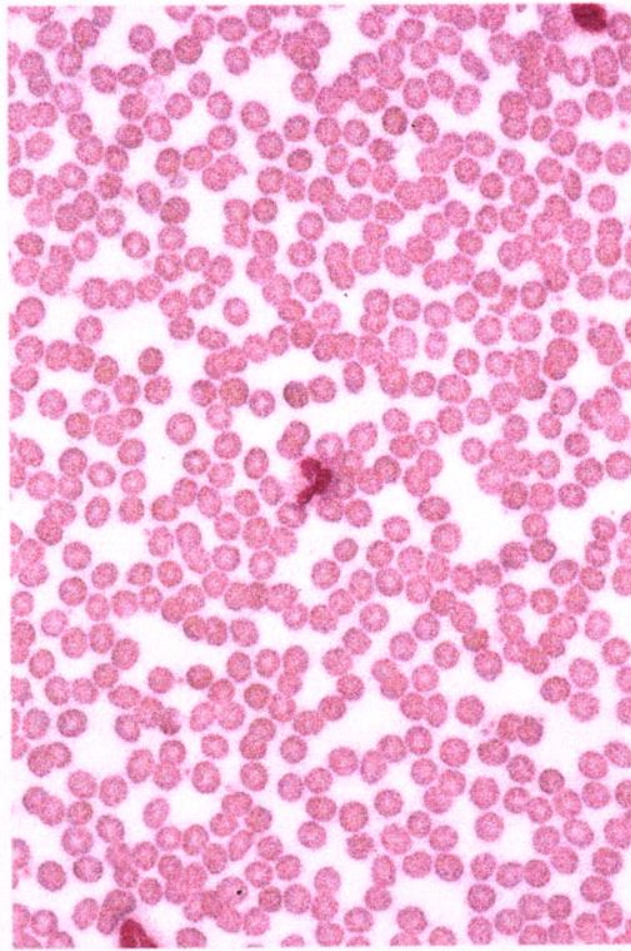
カバーガラス厚
0mm



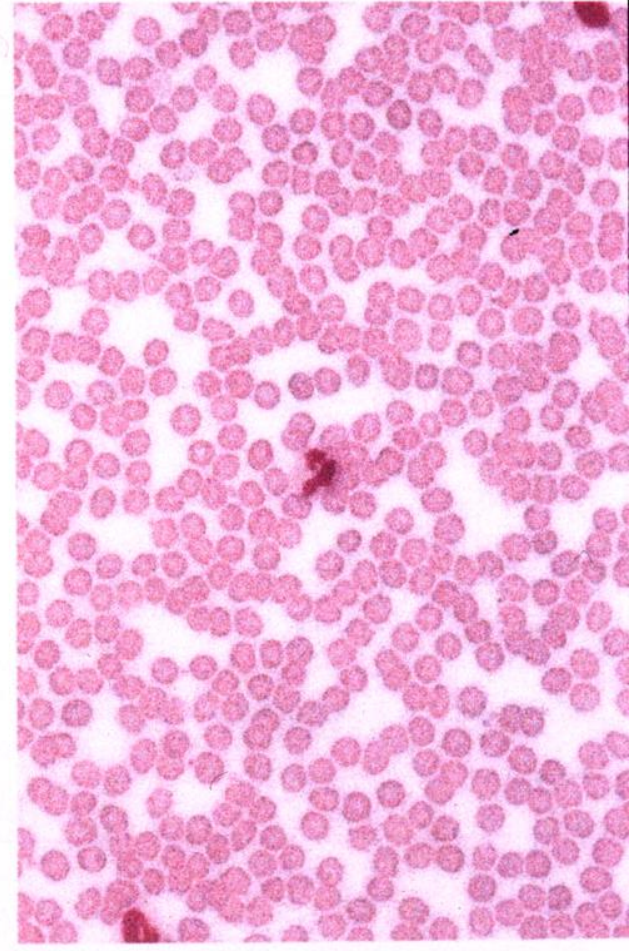
カバーガラス厚 0.17mm



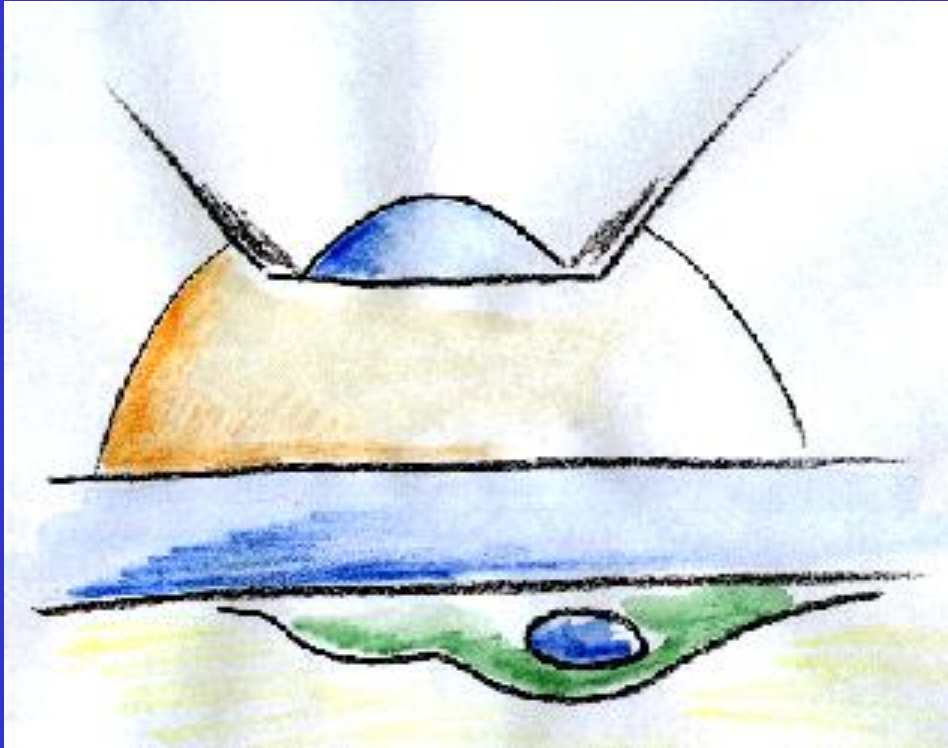
カバーガラス厚 0.25mm



カバーガラス厚 0mm



- **Observation and optical setup**



Micro objective

Immersion

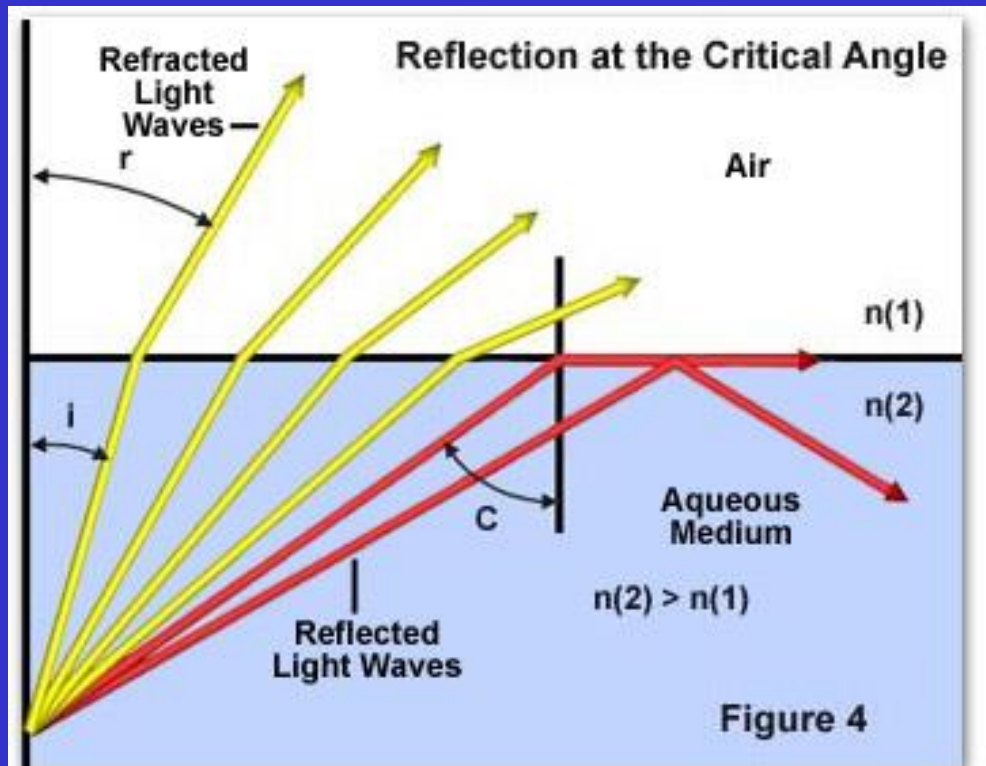
Cover slip

Sample

The last 3 optical elements are usually added by the user !

- **Measurements & artifacts: Message**

- Refractive index mismatch drastically reduces resolution and leads to significant loss of intensity in fluorescence
- 15 μm cover slip deviation approximately kills half of the resolution and intensity



影像擷取設備

傳統照相機及底片 (Camera and Film)

Film ISO (international organization for standardization) 底片感光度
測光模式設定：

$K \text{ 值} = \text{ISO 感光度} \times \text{標本照明度 (lux)} \times \text{曝光時間 (sec)}$

(<http://www.kodak.com/global/en/professional/support/databanks/filmDatabankBW.jhtml>)



- KODAK T-MAX 100 Professional Film (TMX)
- KODAK T-MAX 400 Professional Film (TMY)
- Color negative films



數位照相機及記憶體 (Digital camera and Memory)

Professional color digital camera:

Nikon D1x: 533萬有效畫素 CCD (Charge Coupled Device)

3008 x 1960 pixels (Large)

2000x 1312 pixels (Medium)

(<http://www.nikon-image.com/jpn/products/digital/d1x.htm>)



Image quality	File format	Image size	Approx. file size	Approx. number of images (96 MB card)*
High	YCbCr-TIFF	Large	11.2 MB	8
		Medium	5.0 MB	17
	RGB-TIFF	Large	16.9 MB	5
		Medium	7.5 MB	12
	RAW (uncompressed)		7.6 MB	11
	RAW (compressed)	—	**	†
JPEG Fine	JPEG (1 : 4)	Large	2.8 MB	29
		Medium	1.3 MB	66
JPEG Normal	JPEG (1 : 8)	Large	1.4 MB	59
		Medium	640 KB	132
JPEG Basic	JPEG (1 : 16)	Large	720 KB	118
		Medium	320 KB	256

Nikon D100 數位照相機

Professional color digital camera:

Nikon D100: CCD有效畫素 Effective Pixel 6.10 百萬

儲存影像

Image Resolution

3008x2000,

2240x1488,

1504x1000



Kodak DCS 760: 6-million pixel CCD (3032 x 2008)

(<http://www.kodak.com/global/en/professional/products/cameras/dcs760/dcs760Index.jhtml>)

比較與參考數位照相機中文網站

<http://www.digital.idv.tw/>



Kodak DCS Pro 14n

Full-Sized CMOS

CCD有效畫素

Effective Pixel

13.71 百萬

儲存影像

Image Resolution

4536×3024,

3024×2016,

2268×1512



Fujifilm FinePix S2 Pro

CCD有效畫素

Effective Pixel 12.1 百萬

儲存影像

Image Resolution

4256 x 2848,

3040x2016,

2304x1536,

1440x960



www.digital.idv.tw

Nikon CoolPix 995

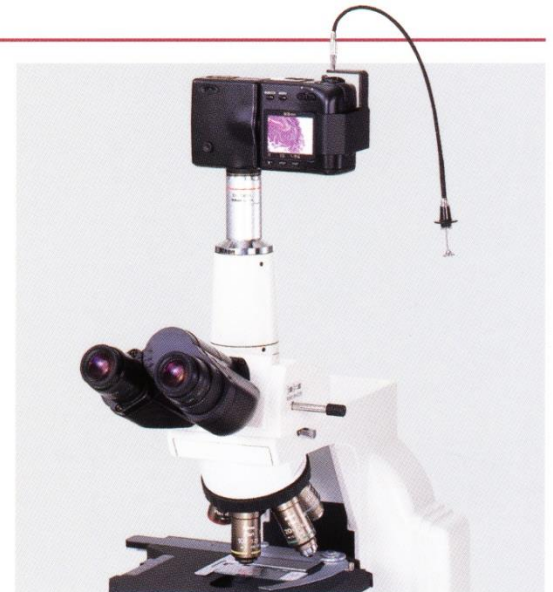
CCD Pixels 3.34 百萬
影像解析度: 2048 x 1536



Nikon COOLPIX990/950 Super-performance 3X zoom digital camera

Featuring a high-performance CCD and performance-proven Nikkor lens, the COOLPIX990 and 950 record photomicrographic images in digital format with ultrahigh-image quality. These cameras are useful for building an image data base or transferring images easily over the Internet. The COOLPIX990 has a 3.34 megapixel 1/1.8-in. CCD and produces ultrahigh-quality 2,048 x 1,536-pixel images, while the COOLPIX950 has a 2.11-megapixel 1/2-in. CCD and produces 1,600 x 1,200-pixel images.

- 3X Zoom Nikkor lens.
- Program, Shutter-Priority and Aperture-Priority Auto exposure control modes. (Model 990 also includes Manual and Auto Bracketing)
- Programmable or Preset Manual White Balance for optimum color reproduction.
- Auto and manual Gain control is available for low-light shooting.
- Image brightness and contrast can be compensated in five modes.
- High-resolution, low-temperature, polysilicon swiveling TFT LCD monitor.
- Auto File Numbering prevents doubling of numbers assigned to images.
- Model 990 comes with MC-EU1 remote cord connecting to USB terminal.(Option)



COOLPIX950

Nikon CoolPix 5000

CCD紀錄畫素

Effective Pixel 5.0 百萬

儲存影像

Image Resolution

FULL (2,560×1,920)

動畫模式Movie

ES → Cadiomyocyte

影像及聲音動態拍攝

(QVGA 檔，每秒15張，
連續拍攝60秒)



Cooled CCD

主要為黑白灰階為主；適合動態螢光、低螢光照度擷取

Scientific grade cooled CCD camera systems with software (such as Metamorph)

High speed CCD camera: MicroMax 5Mhz (scan rate)

Good for Calcium imaging

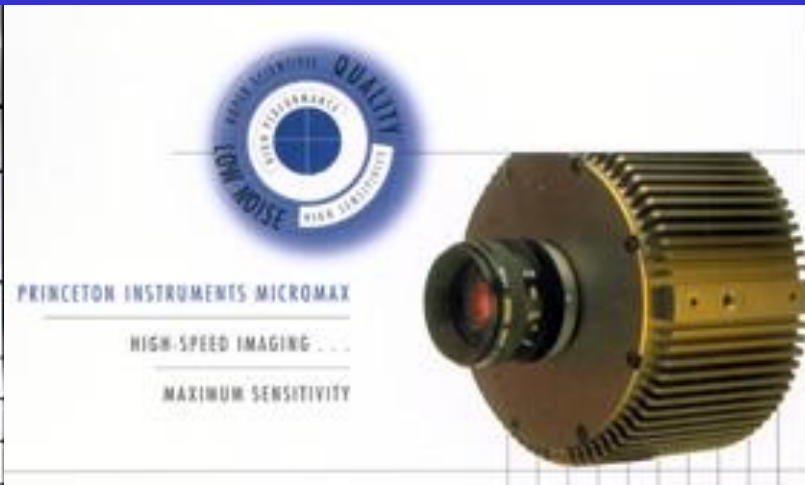
High resolution CCD camera: MicroMax 1Mhz

Good for GFP

Professional cooled CCD camera請參考(<http://www.roperscientific.com/>)

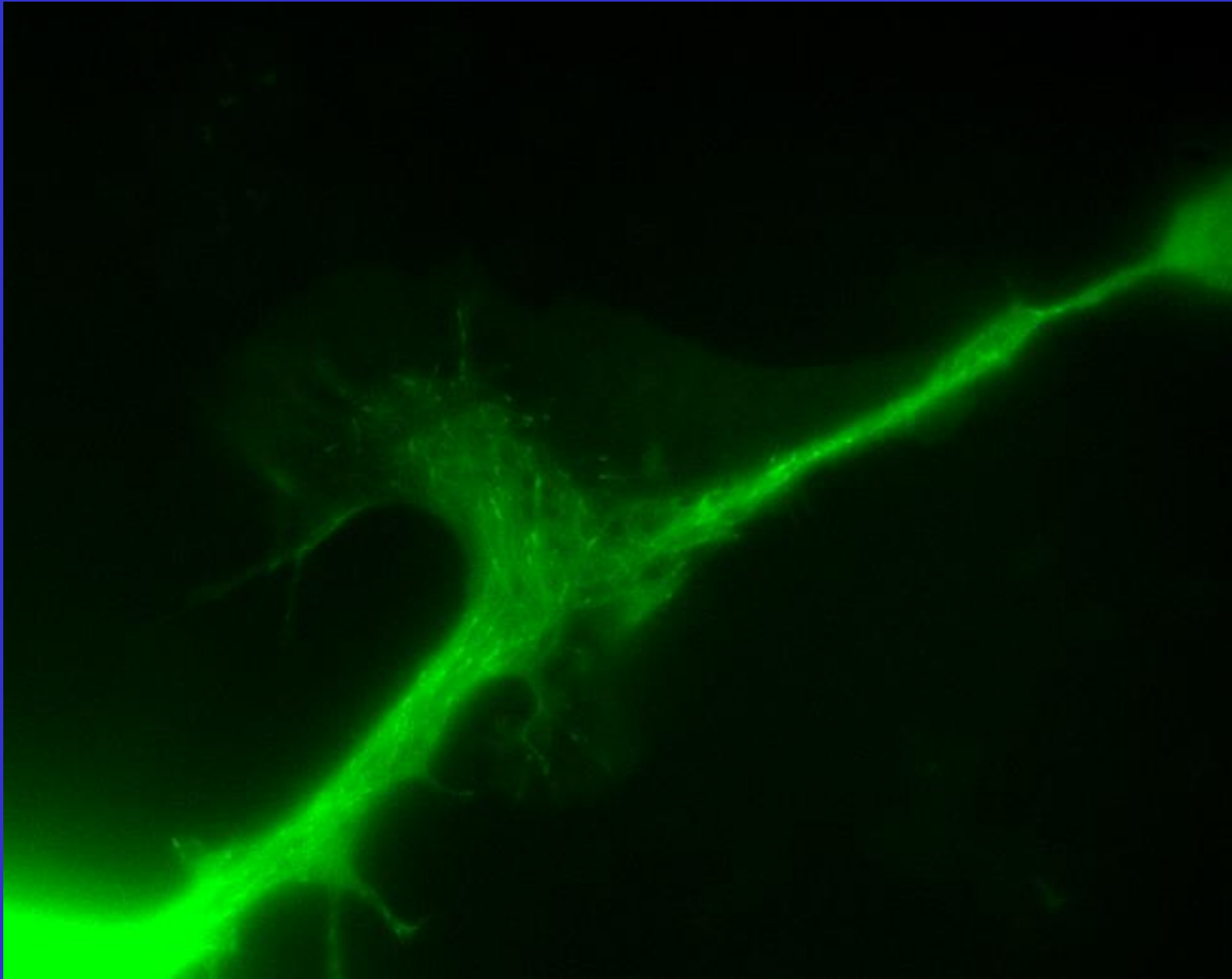
S P E C I F I C A T I O N S	
CCD image sensor	EEV CCD57-10; scientific grade; back-illuminated, frame-transfer CCD
CCD format	512 x 512 imaging pixels; 13.0 x 13.0µm pixels; 6.7 x 6.7-mm imaging area (optically centered)
Grade	Grade 1: ≤10 dark defects, ≤2 traps, ≤1 column defect (based on CCD manufacturer's cosmetic blemish definitions)
Linear full well	>120,000 e ⁻ (single pixel); 240,000 e ⁻ (2x2 binned pixel)
Read noise	8 e ⁻ rms @ 1 MHz
Nonlinearity	<1%
Readout bits/speed	16 bits @ 1 MHz; 16 bits @ 100 kHz
Frame readout	0.35 seconds for full frame @ 1 MHz
Dark current	<10 e ⁻ /p/s @ -45°C
Operating environment	0 to 30°C ambient, 0 to 50% relative humidity noncondensing

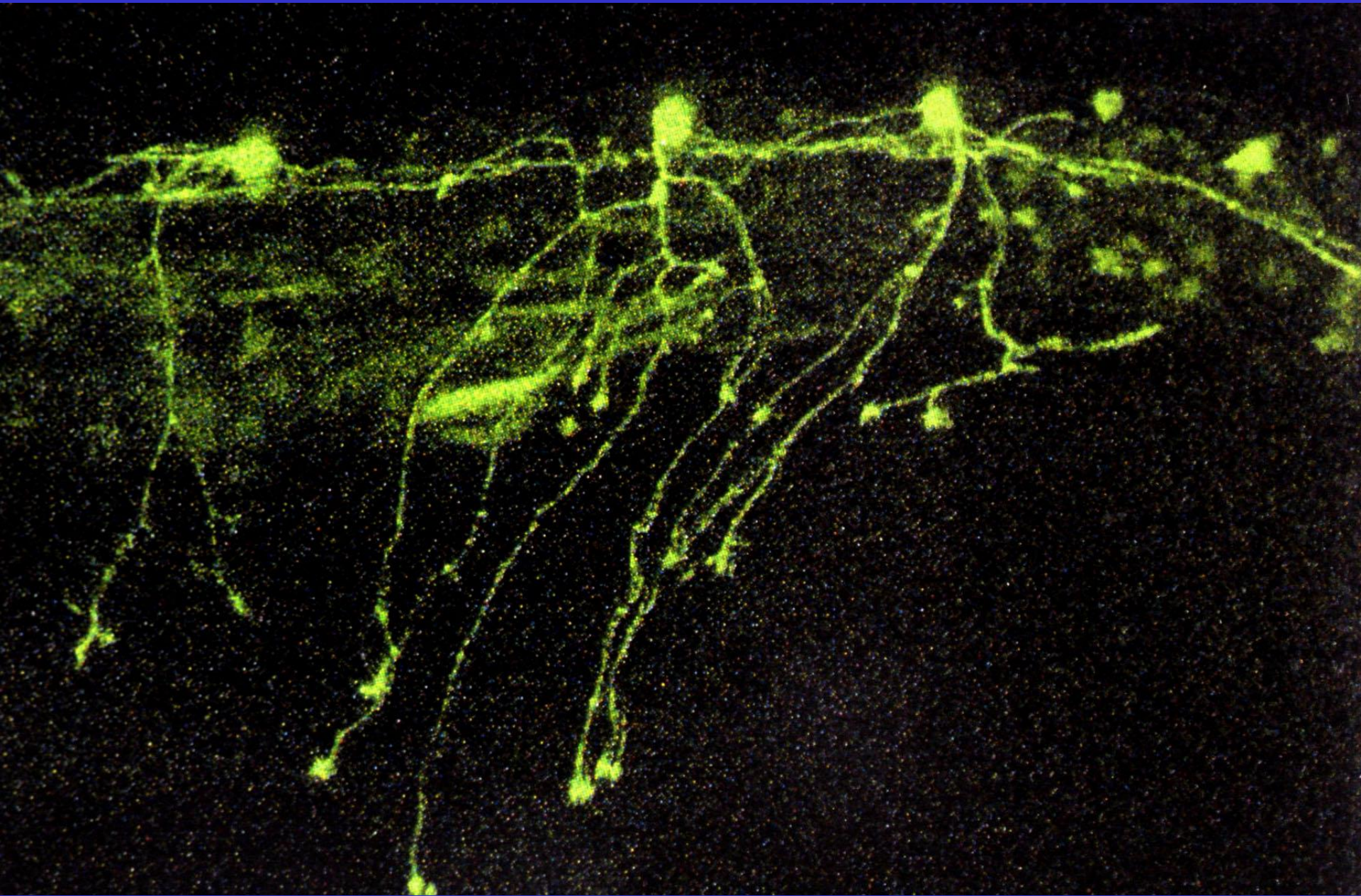
Note: Specifications are typical and subject to change.



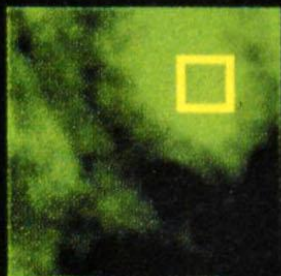
EB-1-YFP in Neuro2A cell

10 second / frame, total 40 frames

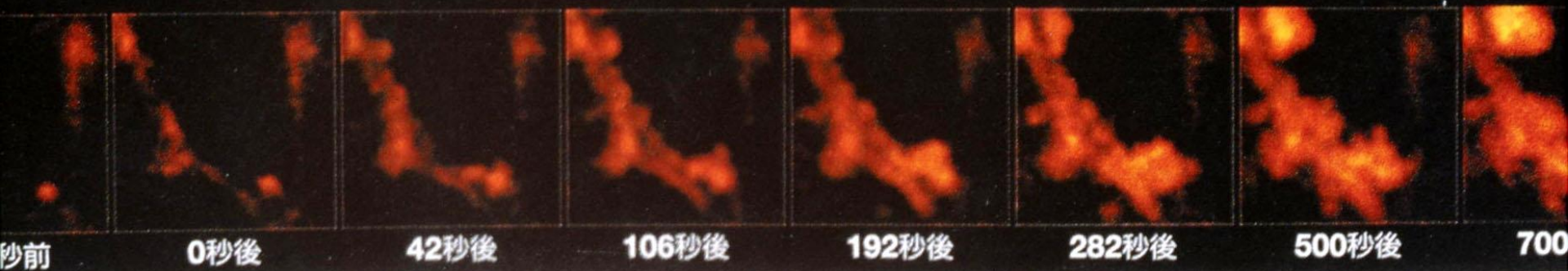
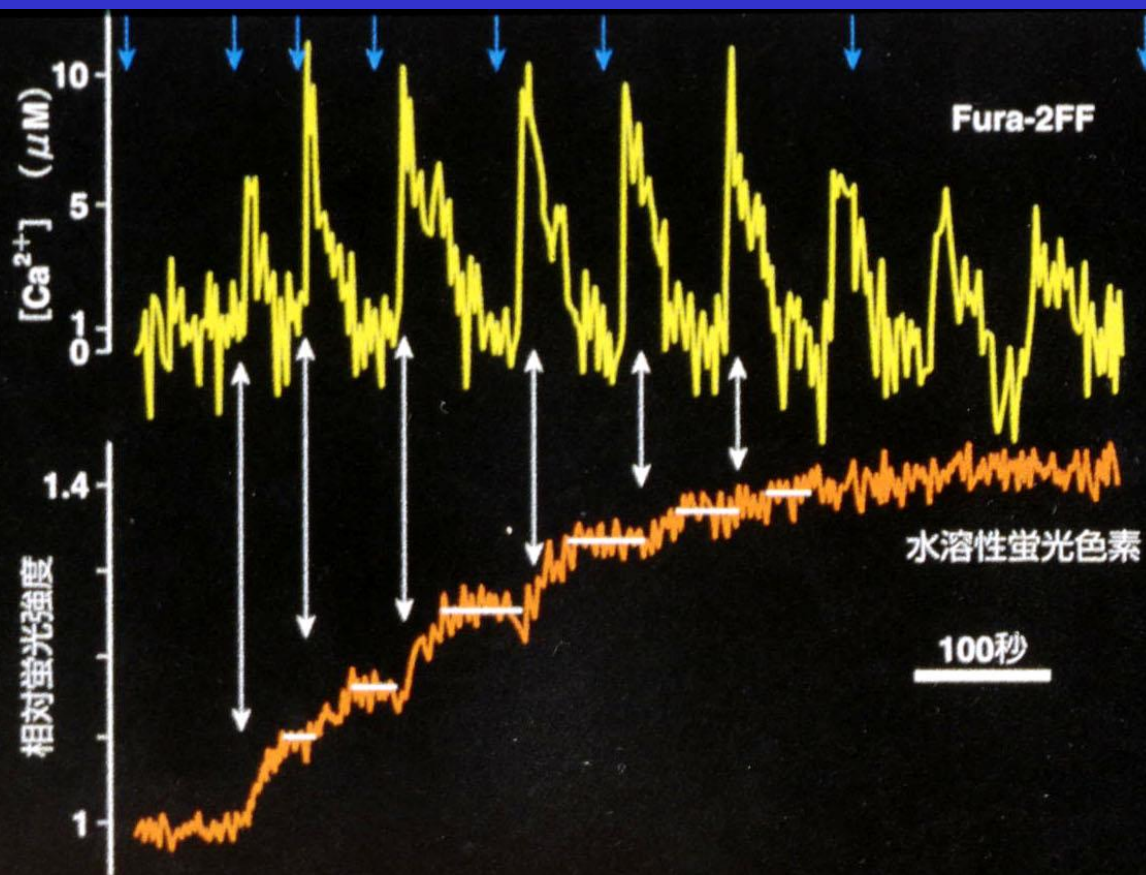




Fura-2 FF



水溶性蛍光色素



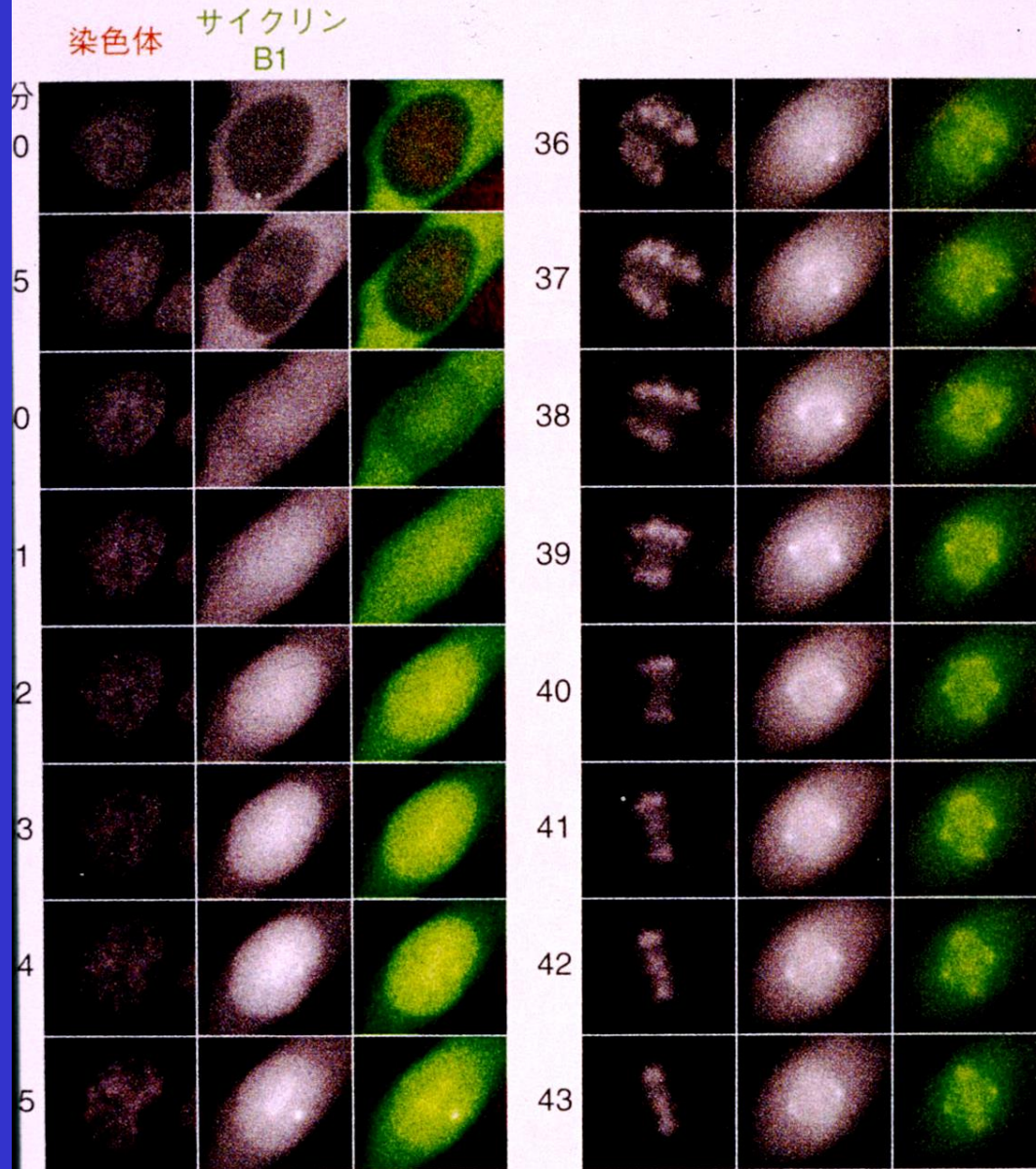


図1 生きているHeLa細胞における
ヘキスト33342を用いて染色体を（左列），サイクリンB1を染色し（中列），1分間おきに経時観察した。右列は左列のイメージに緑の疑似カラーを付けて重ね合わせた像。スケールバーは10μm。

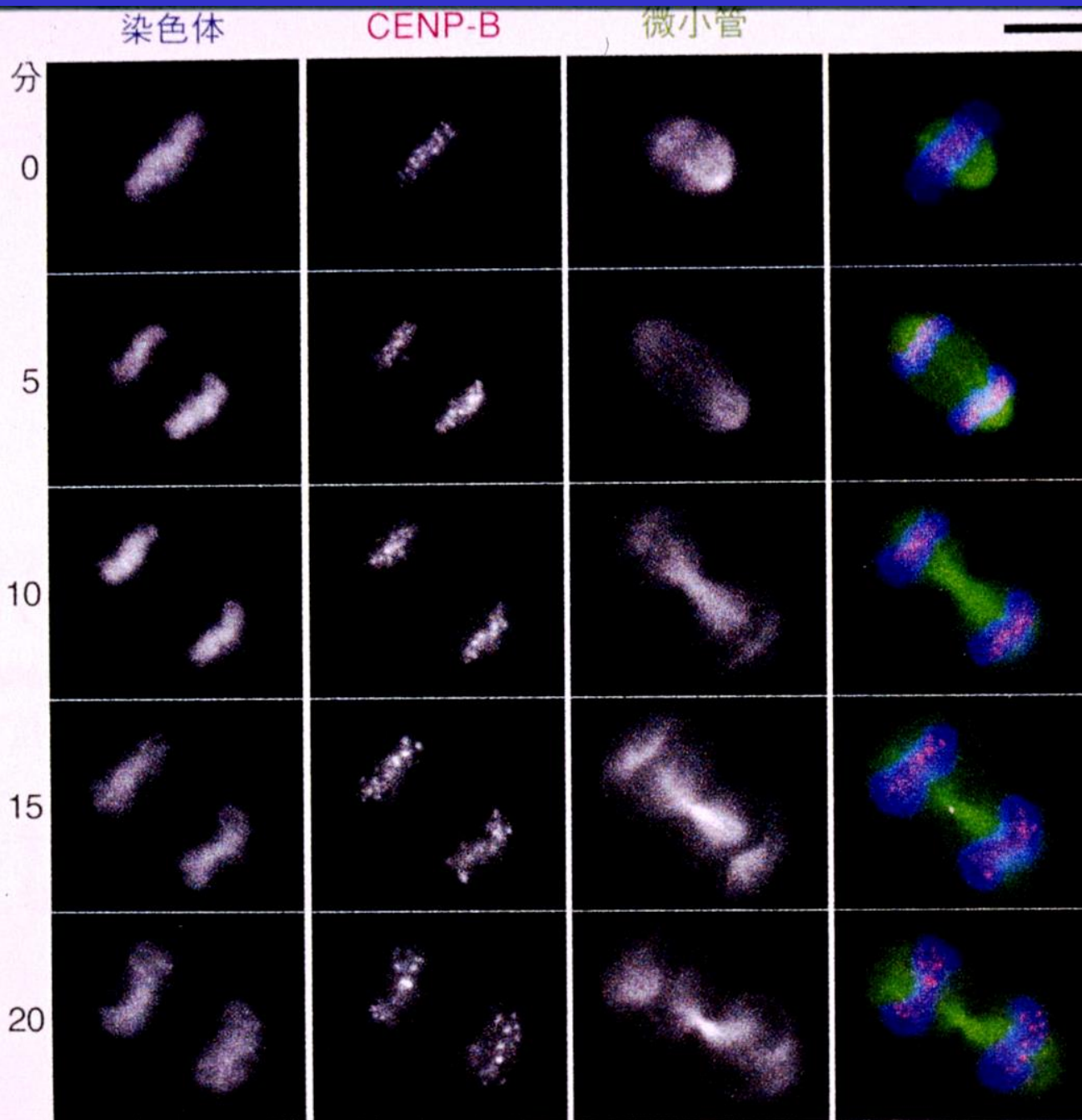


図3 生きているHeLa細胞の三重染色

ヘキスト33342を用いて染色した細胞を一過的に発現させてCENP-B-GFPをマイクロイミューノフลูオロゲンで染色した細胞と共培養した。5分間おきに経時観察した。染色体はヘキスト33342で青色、CENP-B-GFPにピンク、微小管は抗チューブリン抗体で緑色に染色した像。スケールバーは10 μ m。

A



B

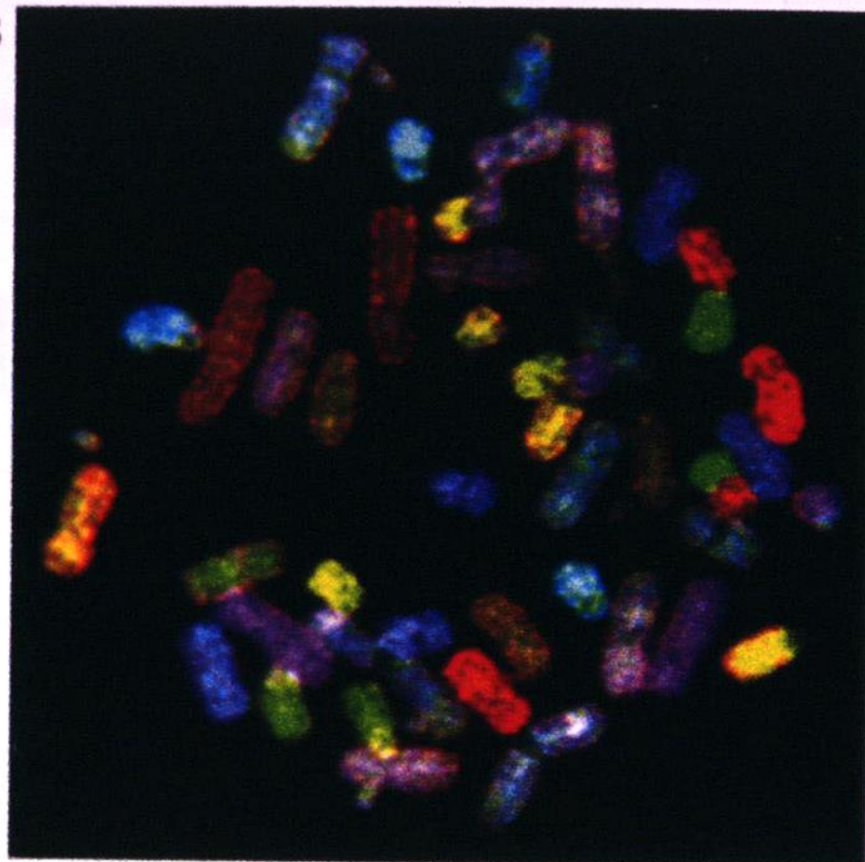


図2 SKY法による急性骨髄性白血病の染色体解析

A：DAPIバンドパターンは明瞭である。染色体は適度に広がり、重なりは全くない。しかし、SKY画像（B）では、蛍光のハレーションのために染色体画像が膨化し、その多くが接触して見える。このことから、SKY法で質の高い画像を得るには、染色体の広がり方が重要であることがわかる。SKY：spectral karyotyping.

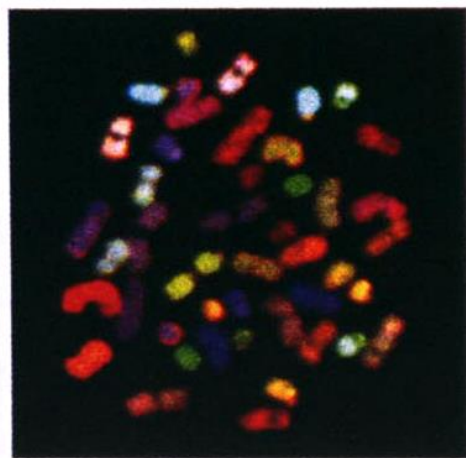
染色体標本を得やすい腫瘍
(白血病など)

染色体標本が得にくい腫瘍
(胃癌や肺癌など)

通常の方法による染色体分析

由来不明なマーカー染色体の出現や
正常核型の症例

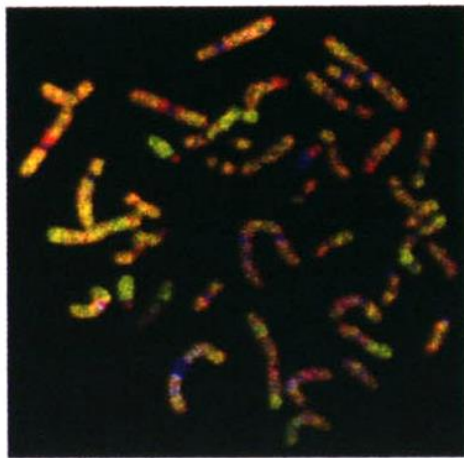
SKY法, M-FISH法による解析



SKY法

高分子DNAの抽出

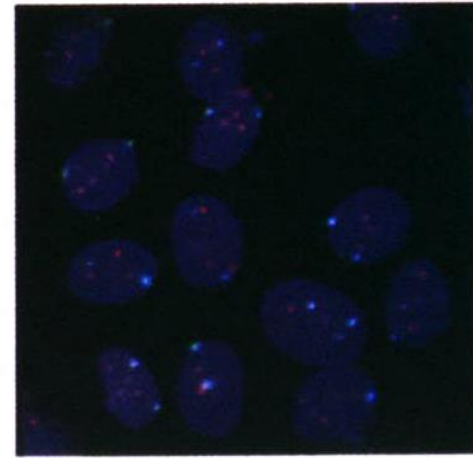
CGH法による
染色体コピー数異常の解析



CGH法

間期核標本の作製

FISH法による
疾患関連遺伝子異常の解析



間期核FISH法

光電倍增器 Photomultiplier (PMT)

主要運用在分光譜後的共軛焦顯微鏡上共軛焦顯微鏡所使用的感測器是光電倍增器(PMT)所提供的感測器精密度達 0.1 nA , 俱有冷卻設計, 可除去暗電流 (Dark current), 提供超高解析。

有關 Confocal Microscope 請參考 <http://info.ntu.edu.tw/biotech/core3-1.htm>



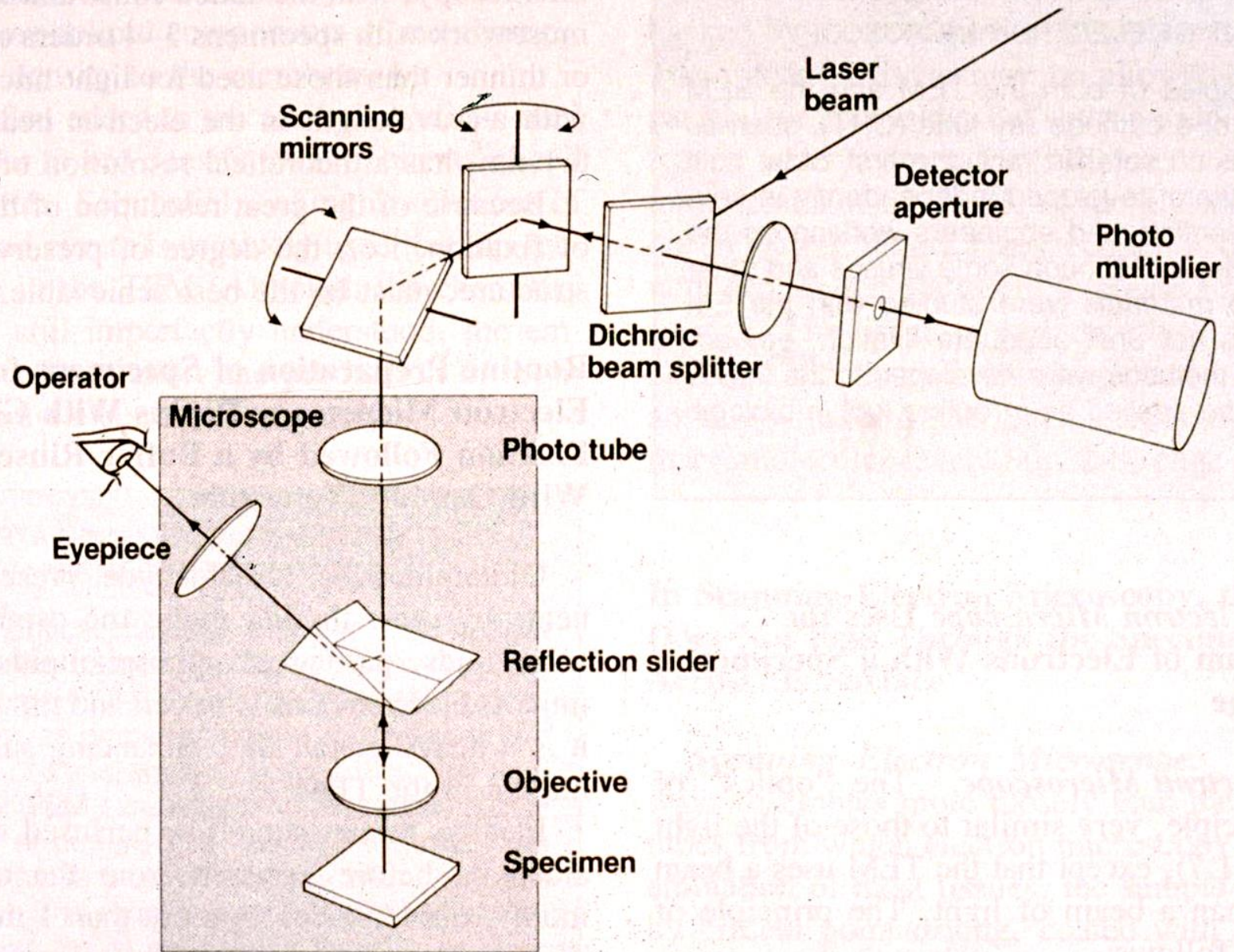
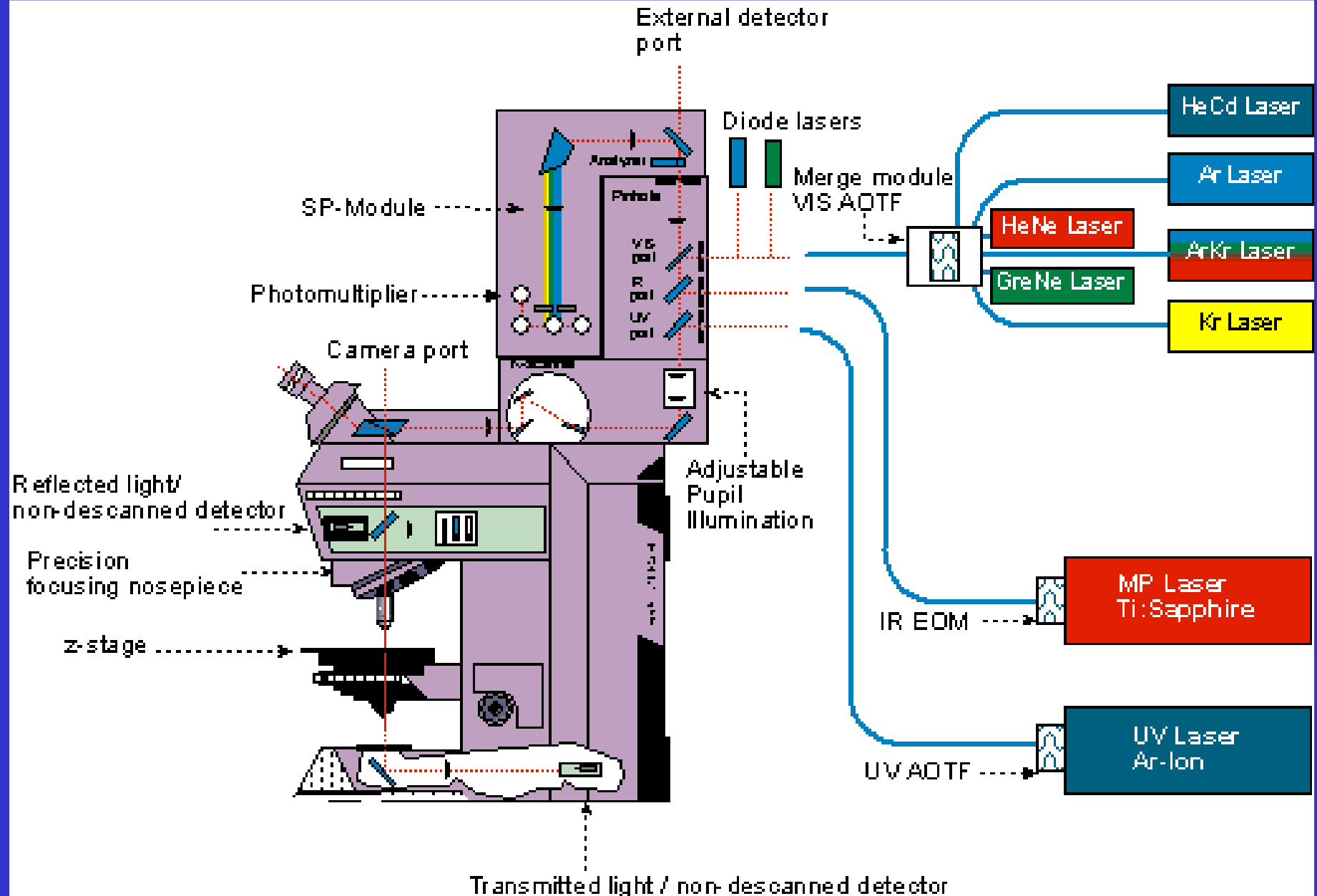
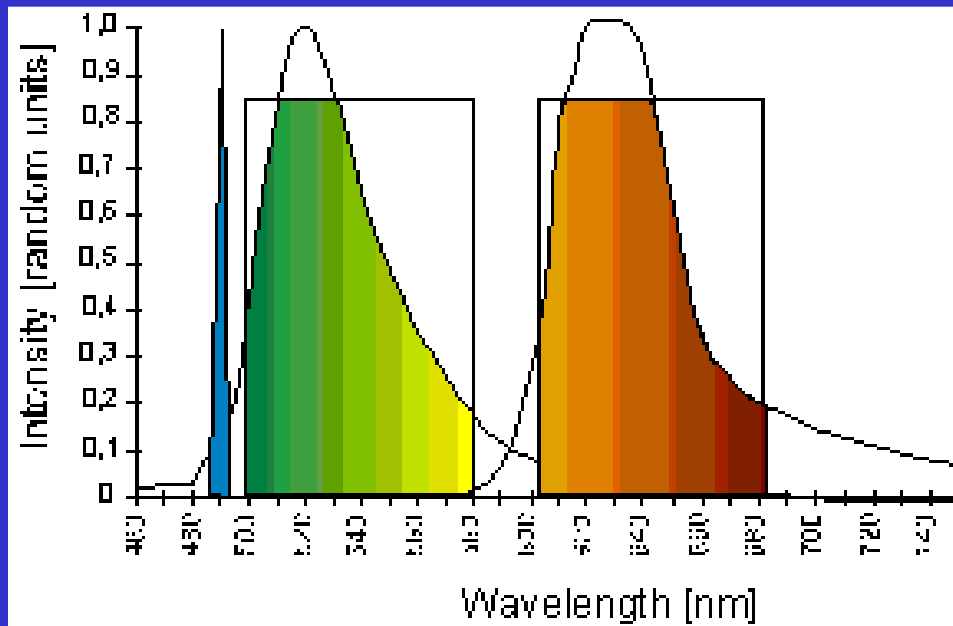


Figure 1.8. Diagram of the beam path in the confocal microscope. (Courtesy of Sarastro, Inc., USA.)

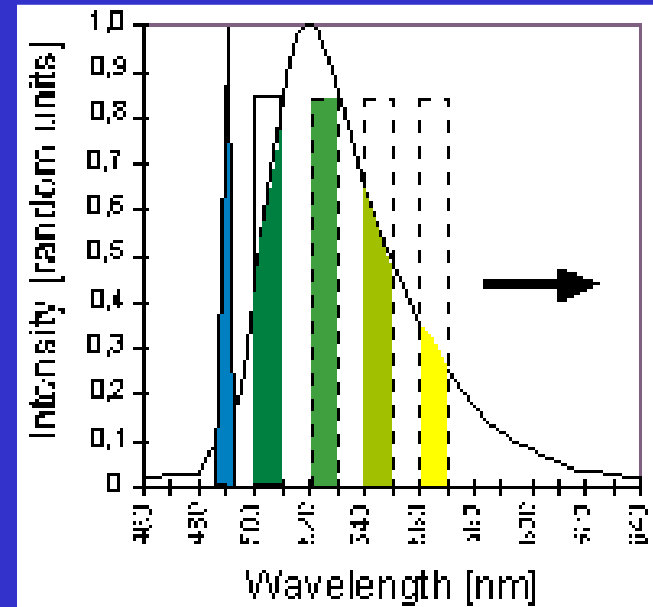
Leica TCS SP2/MP2: System Optics Overview



TCS SP/SP2: Prism Spectrophotometer Benefits



- Maximize efficiency
- Maximize flexibility
- Minimize crosstalk



- Analyze the spectrum

Parameter Setting

ArUV Laser



active

58% 59%



351 364
nm nm

ArKr Laser



active

20% 31% 51% 10%



476 514 568 647
nm nm nm nm

L FITC
L FITC_TRITC
L FITC_TRITC_CY5



User

Demo

Experiment 3

FITC_TRITC

Set as default setting

Remove default setting

Load

Rename

Delete

RT 30/70

Specimen

PMT Trans

Cyan

☐ Active

☐ Ext. Dyn.

PMT 1

FITC

Green

☒ Active

☐ Ext. Dyn.

PMT 2

TEXAS RED

Red

☒ Active

☐ Ext. Dyn.

PMT 3

PROPIDIUM IC

Blue

☐ Active

☐ Ext. Dyn.

PMT 4

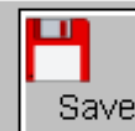
<None>

Gray

☐ Active

☐ Ext. Dyn.

☐ Sequential Scan



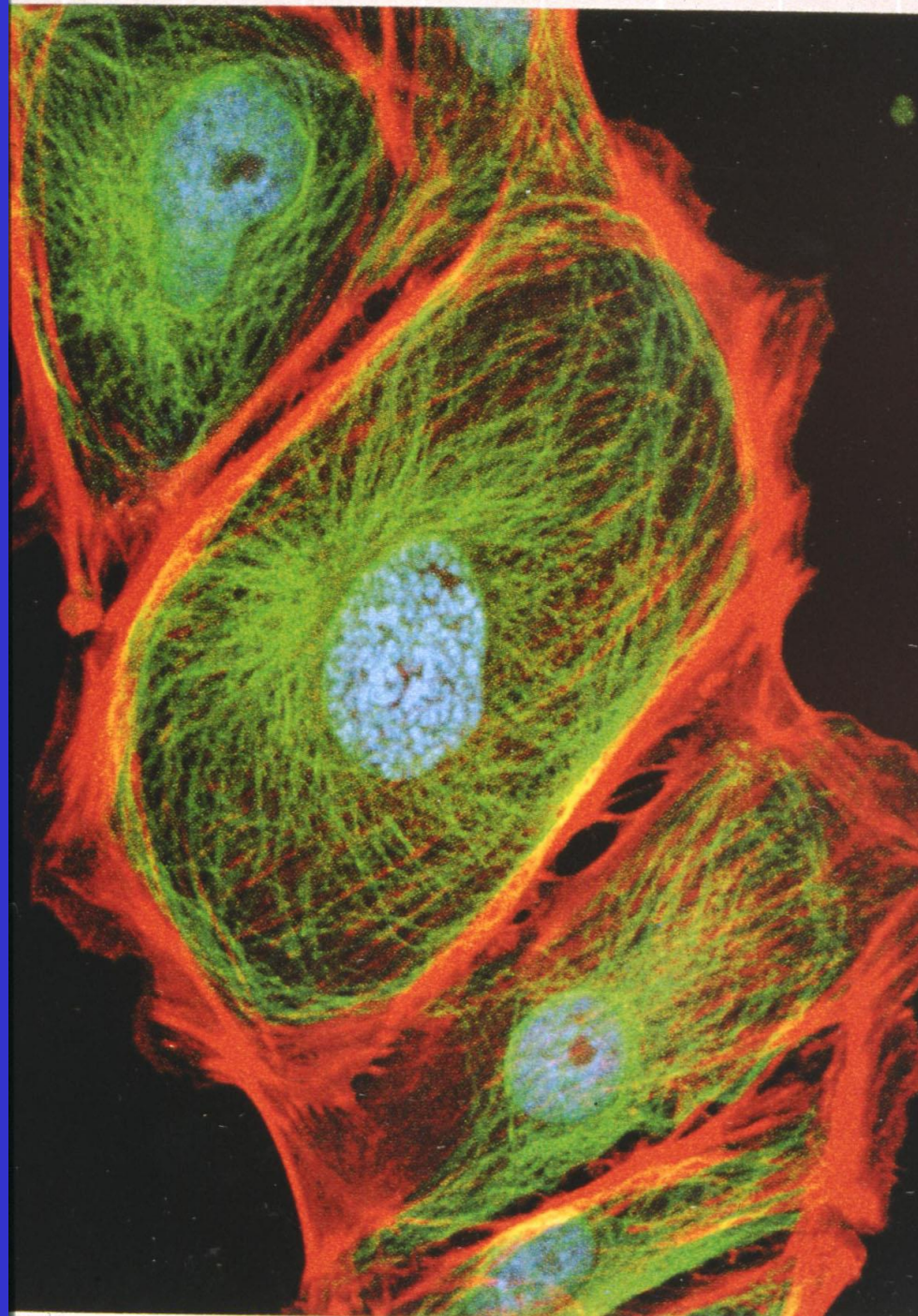
Save

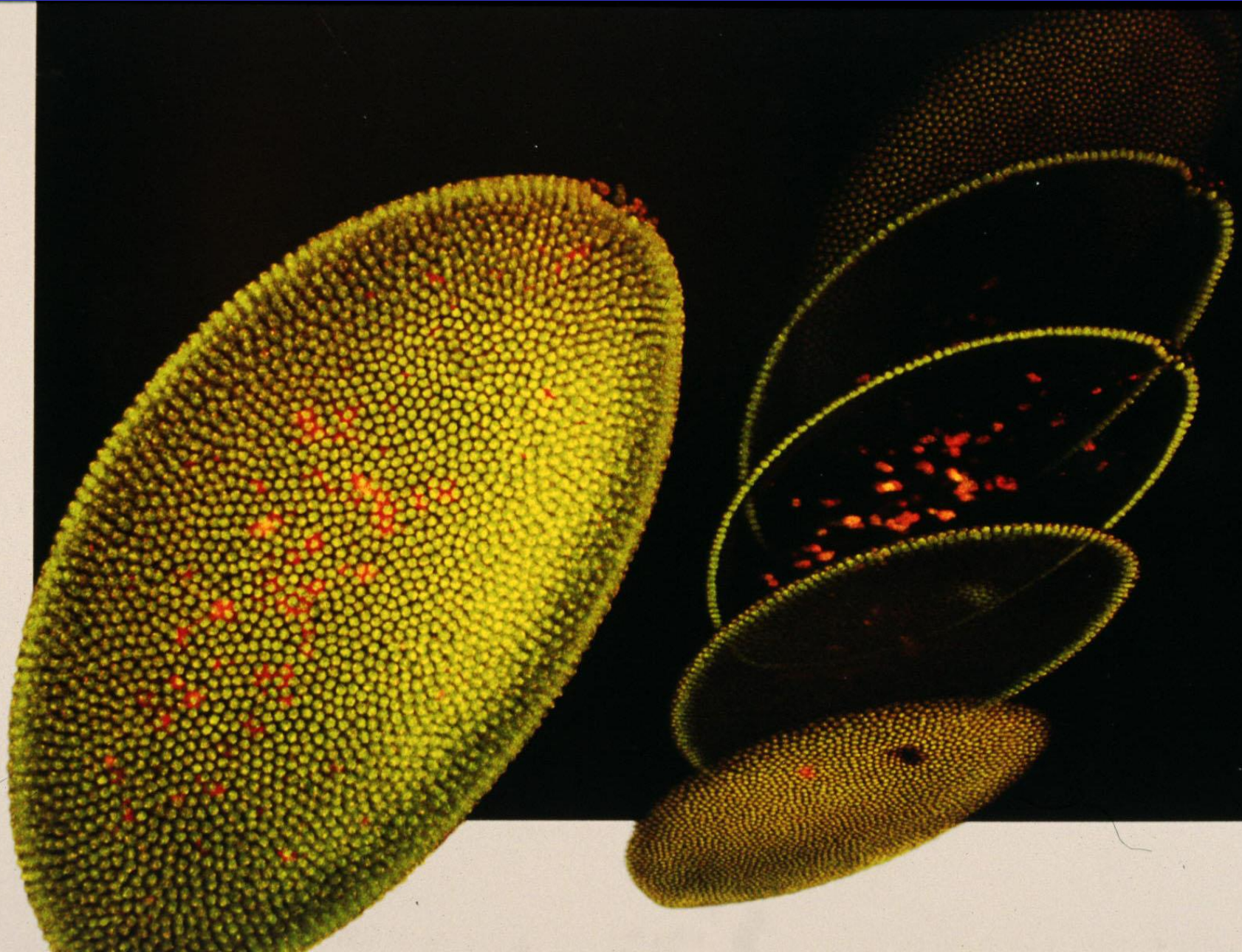


Close

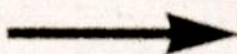
ca

核(青), FITC Phalloidinでアクチン繊維(赤), Cy5で微小管(緑)を染





成像の緑のラインで横
部分の断層像

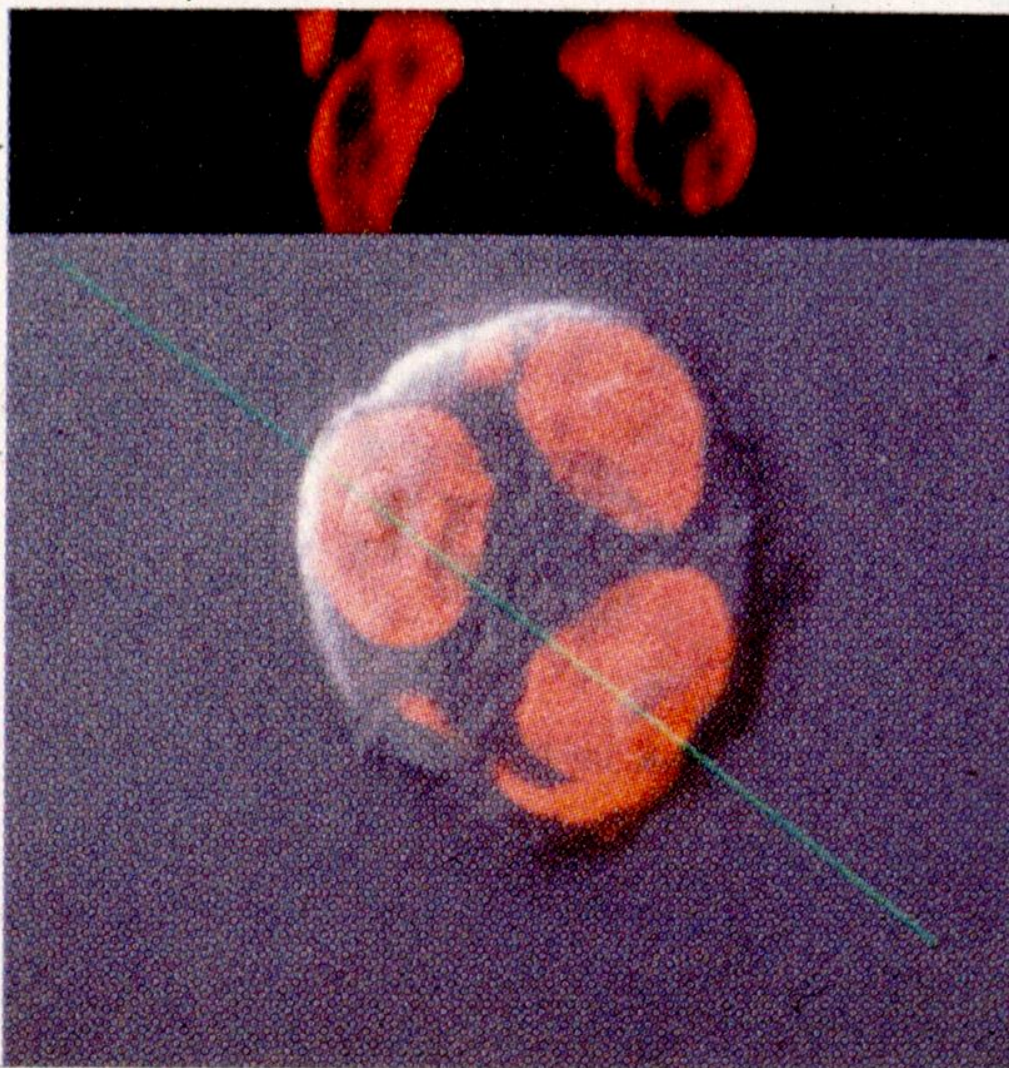


歩とPIで染められた核
像



多核細胞の断層像

Plan Neofluar 40 × / 1.3 油浸



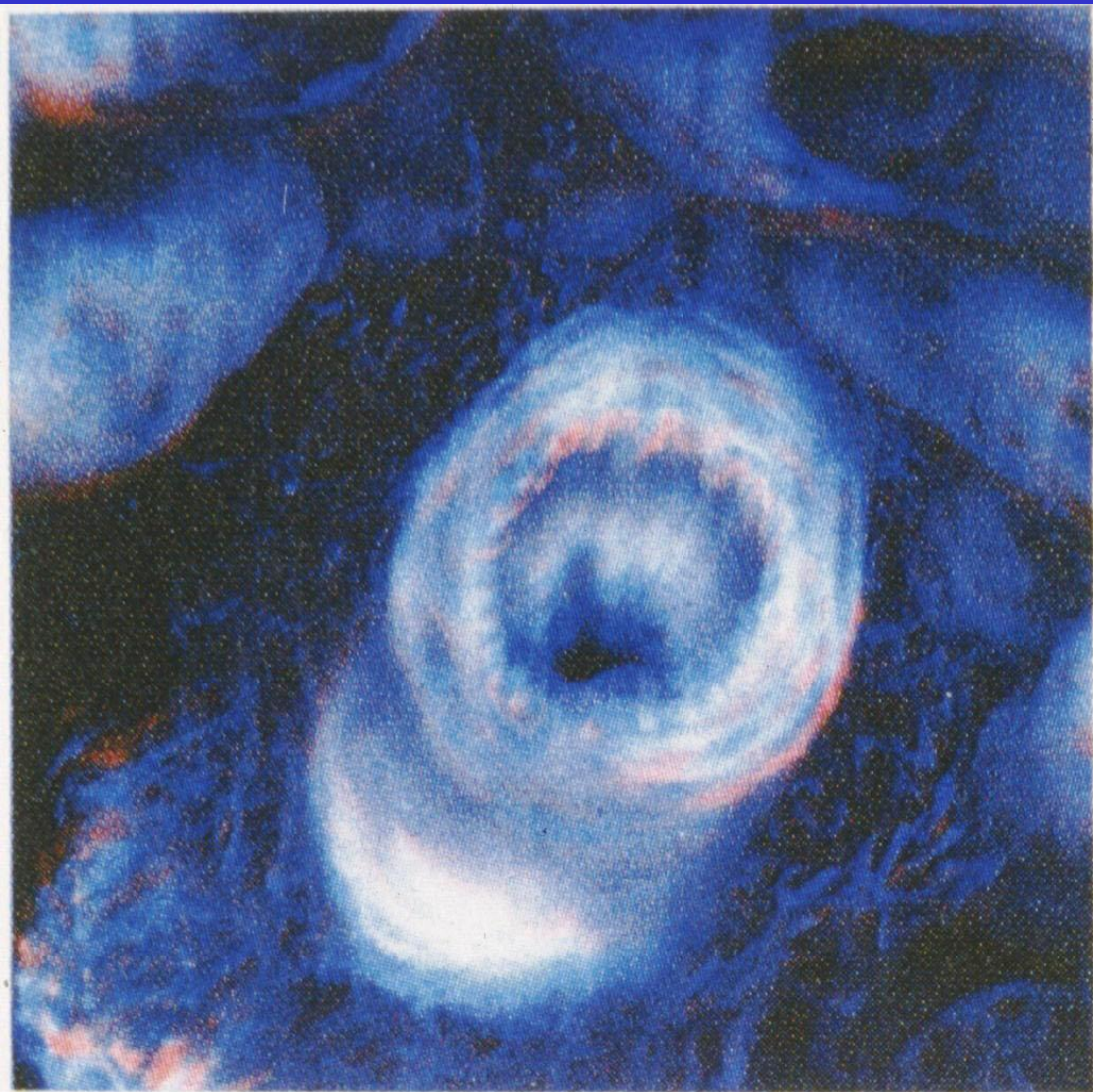
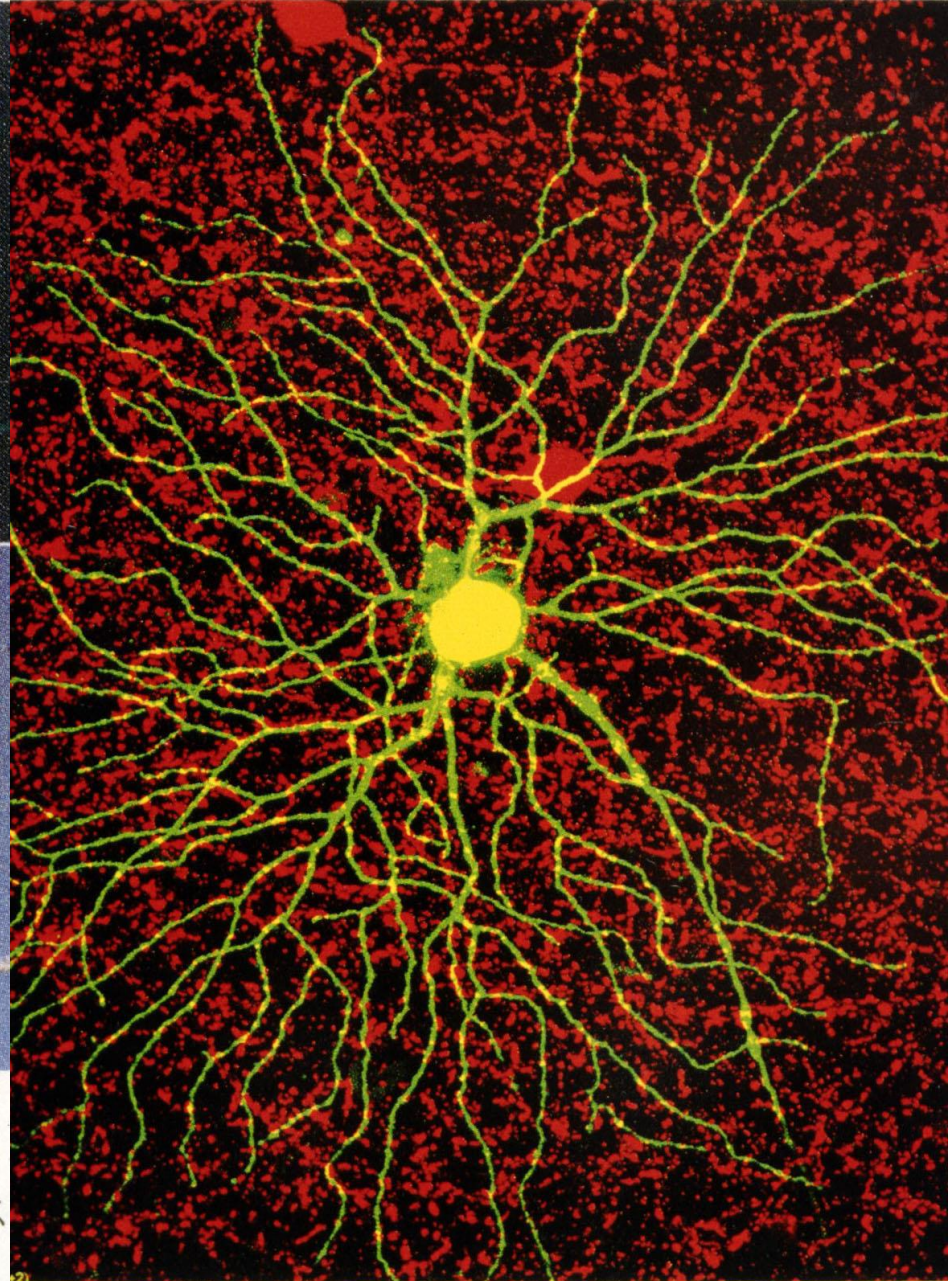
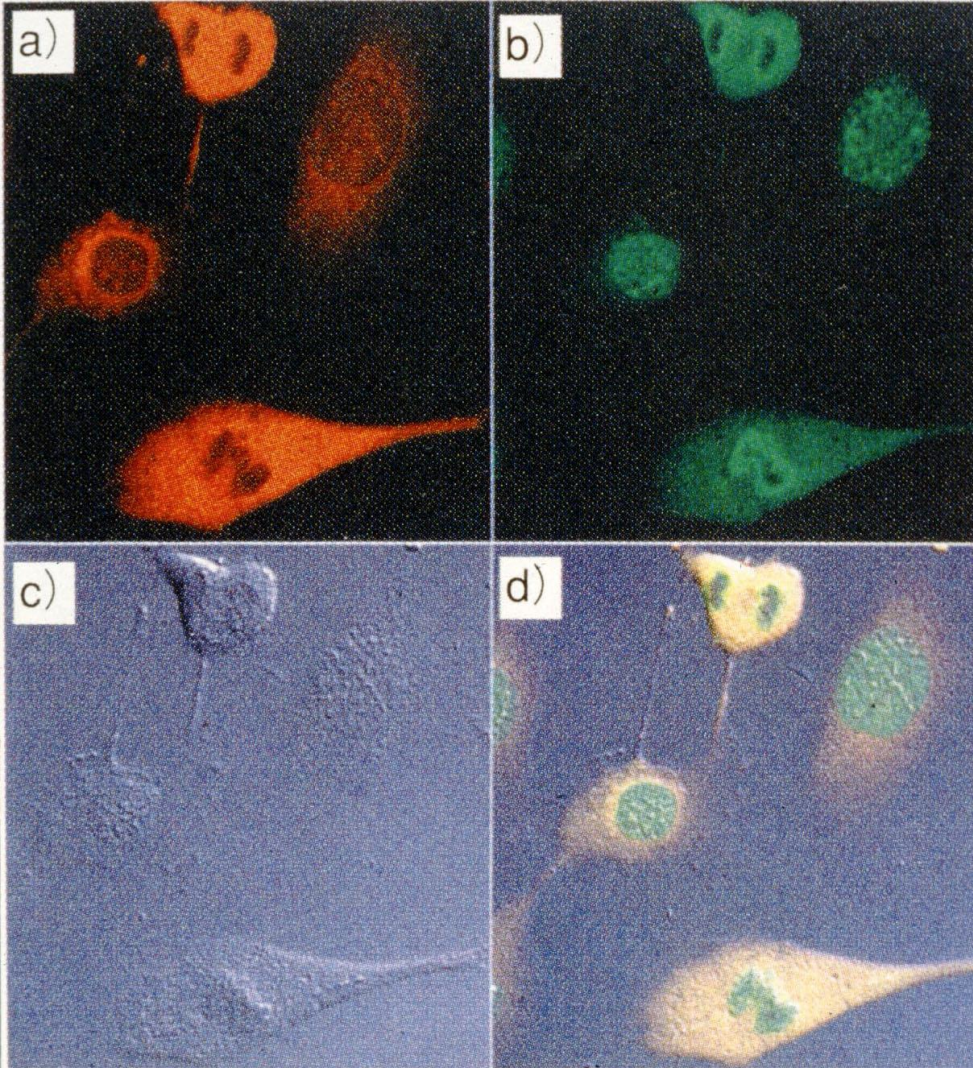
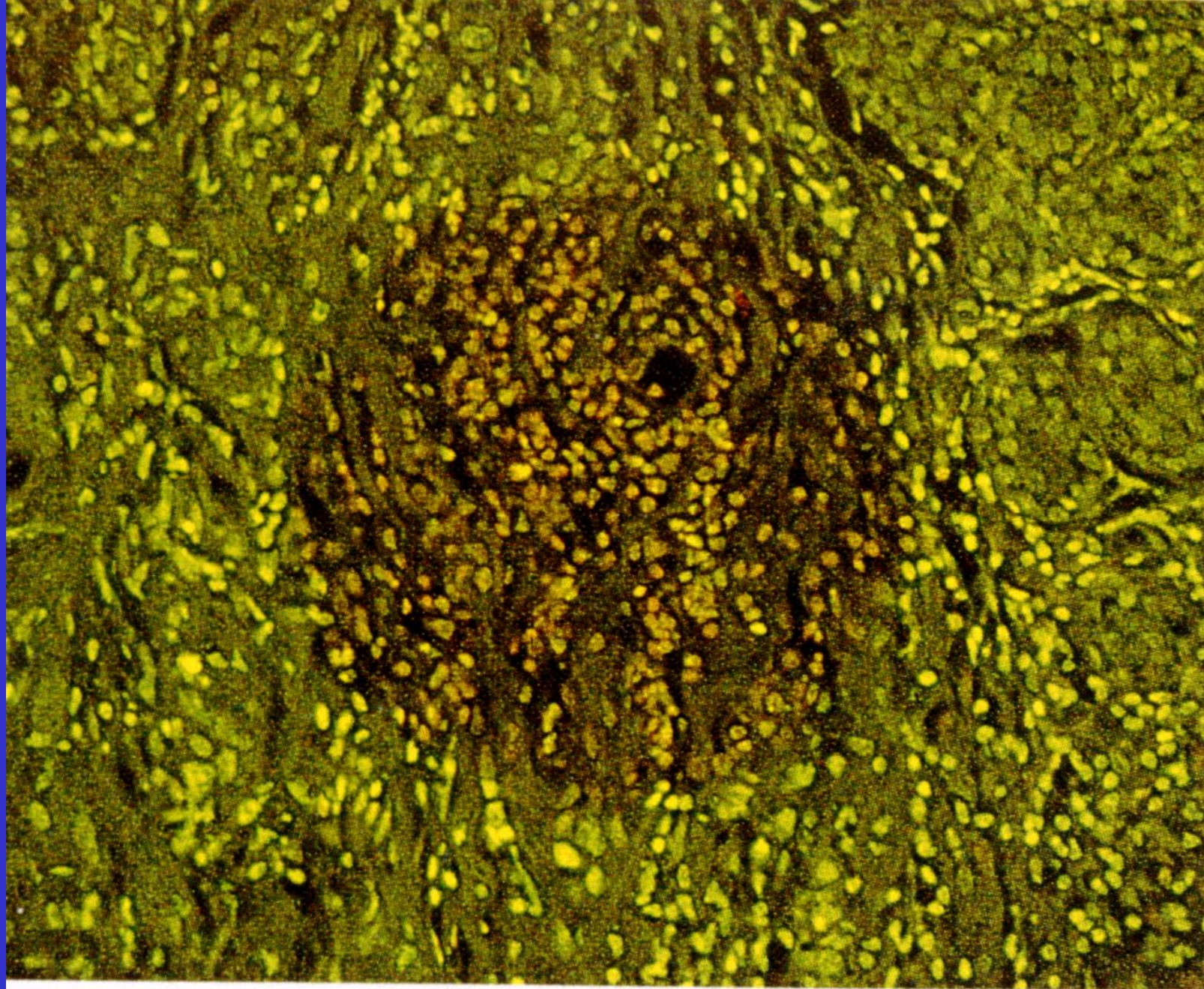


図 4 ラット腎臓内の小
C-Apochromat 63
3-5-2) One point
富山医科薬科大学
高田正信先生より



12 FITC, Rhodamine, 微分干渉および合成像
 a) F-アクチン/Rhodamine 染色像, b) クリスタリン/FITC 染色像, c) 微分干渉像, d) 合成像.
 ラット由来の筋芽細胞 (L-6) の観察像.
 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生
 環境科学系跡見順子先生より提供

細胞とドーパミン作動性アマクリン細胞のレーザー顕微鏡エクスト
 像. Lucifer Yellowで網膜神経節細胞, Texas Redでドーパミン
 を染色.



褪色してしまった例

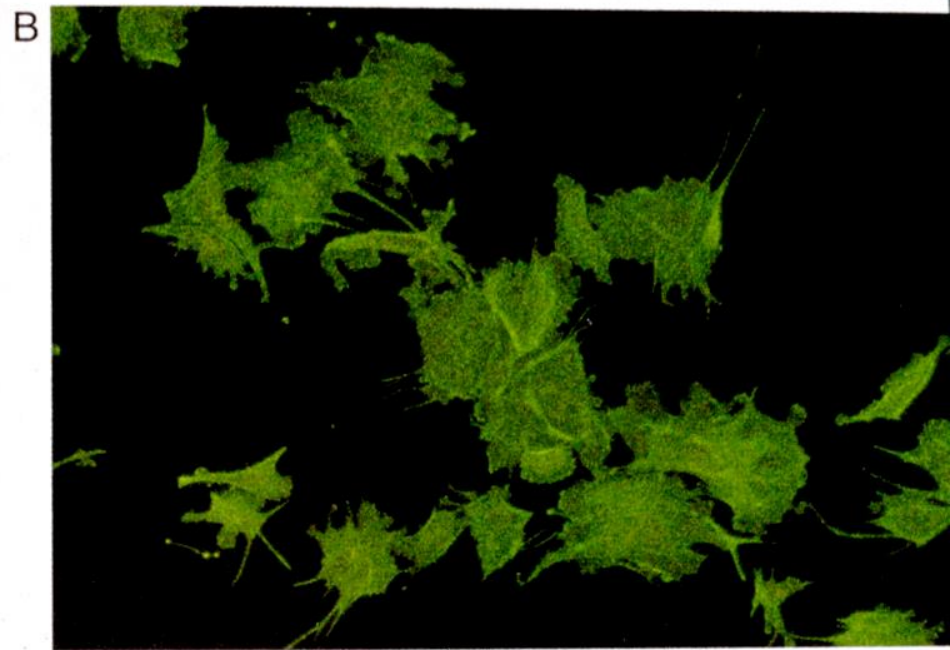
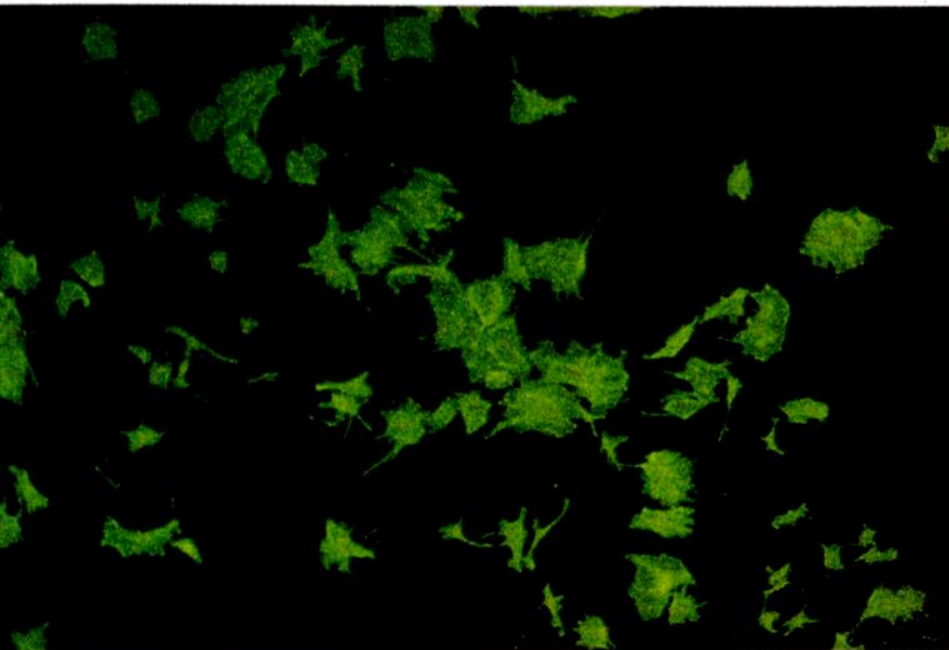


図5 倍率を切り換えたときの蛍光像

10×で観察した蛍光像（A，NDフィルターなし）と40×で観察したAの拡大像（B，ND25フィルターを使用）。A：低倍率で観察している場合は，NDフィルターを入れなくても適正な明るさの像が得られている。B：観察倍率を上げた場合には，ND25フィルターを入れて光量を落とさないと，適正な明るさにならない。

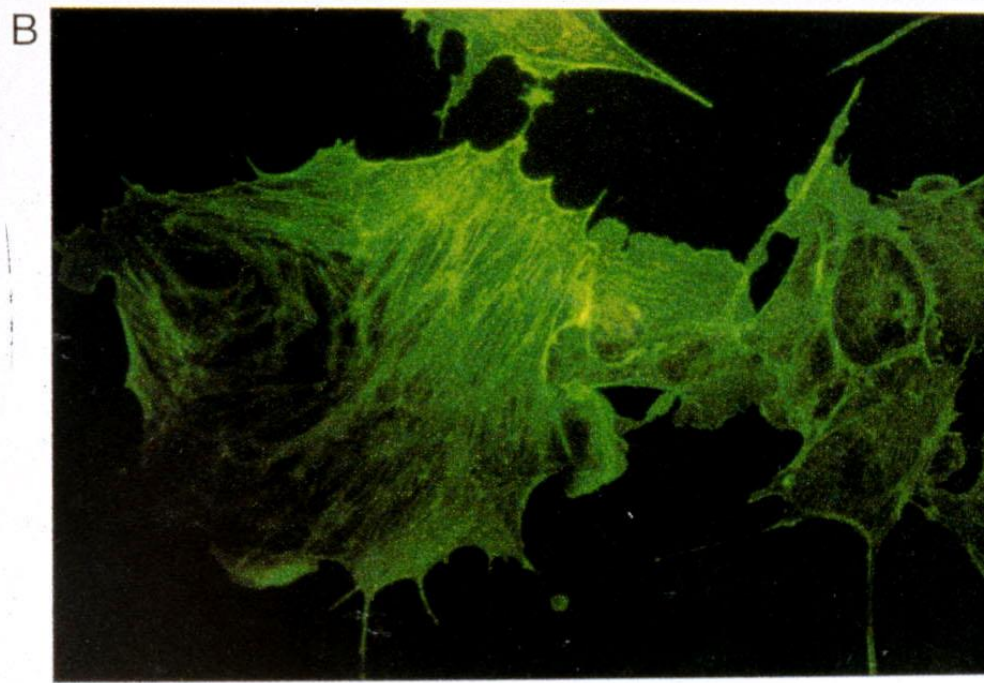
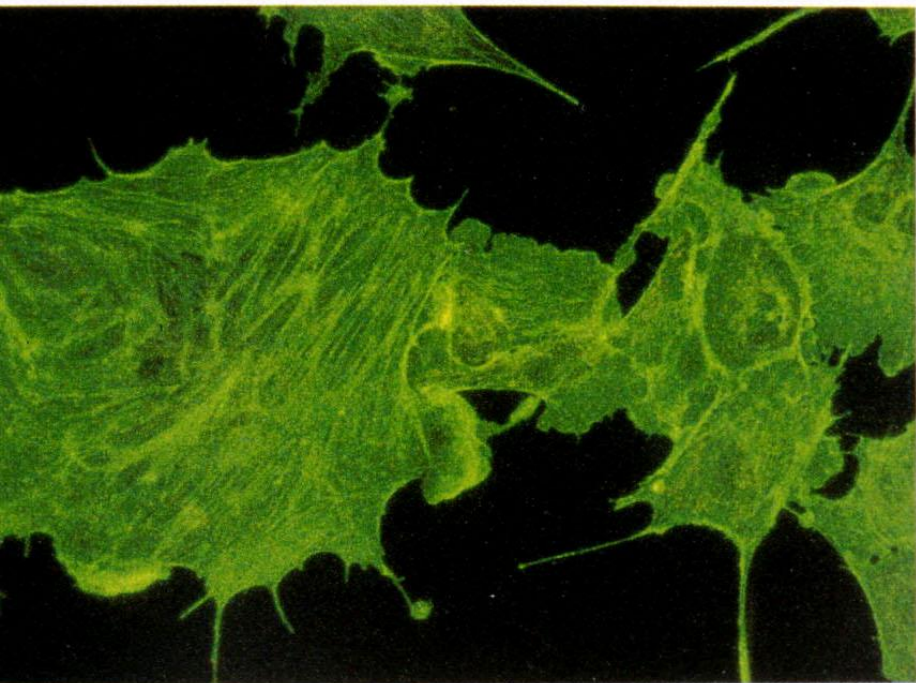


図7 水銀ランプの心出しの効果

水銀ランプの心出しを行った蛍光像 (A) と行っていない蛍光像 (B) . A : きちんと心出しが行われている場合は、視野全体が均一に照明されるため、蛍光像も均一な明るさになる. B : 心出しが不十分な場合は、視野内が均一に照明されないため、蛍光像の中に明るい部分と暗い部分が生じてしまう.

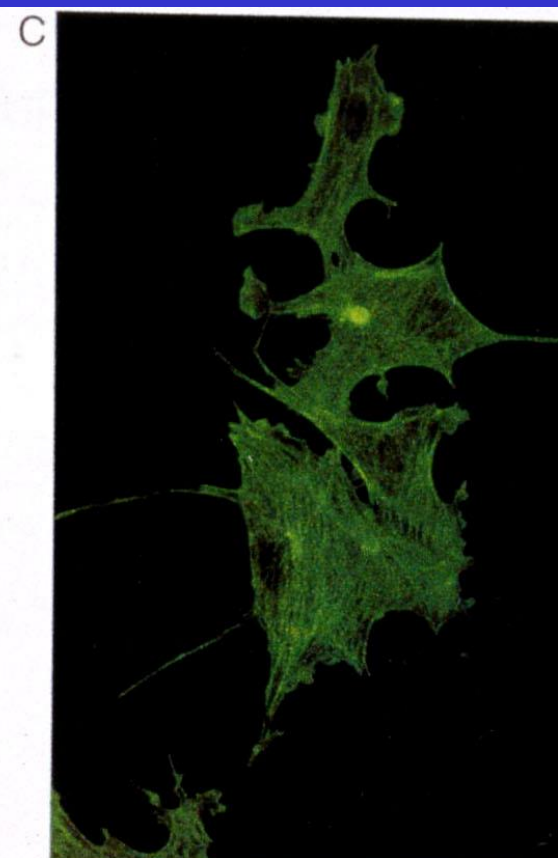
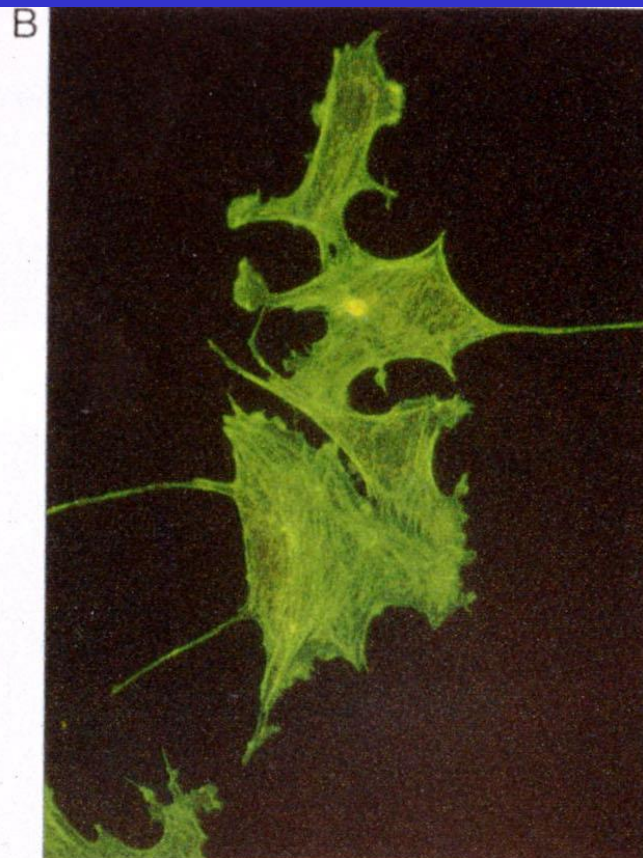
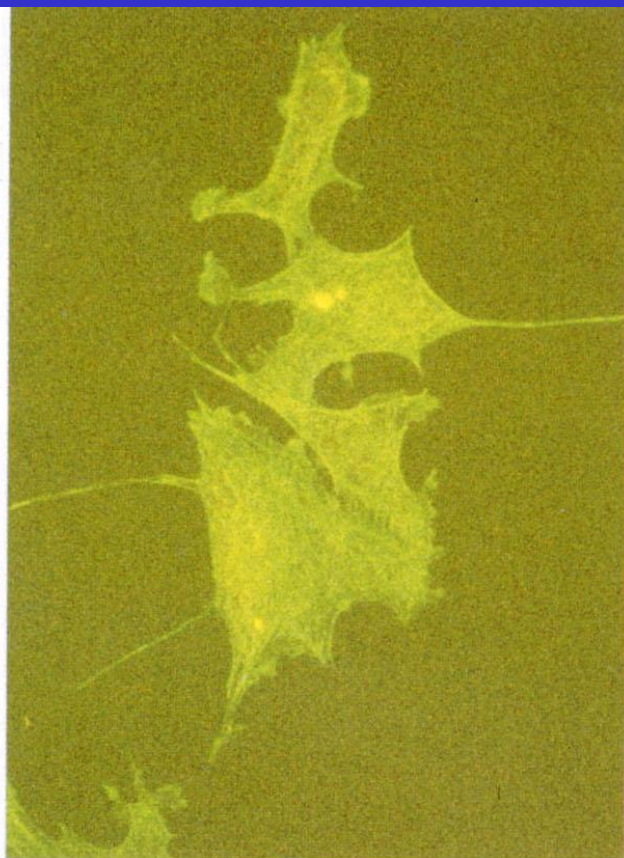
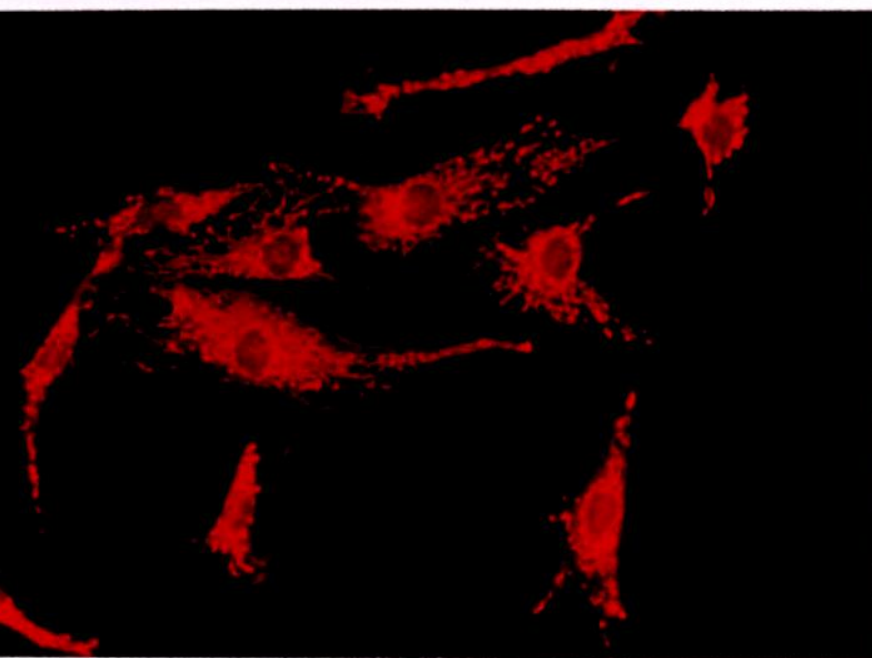


図9 励起フィルターの波長域の効果

A：蛍光キューブにU-MSWB2を使用したときのFITC蛍光像，励起フィルターの波長域が420～480nmと広いため，蛍光像は最も明るい，同時にバックグラウンドも高くなっている．B：蛍光キューブにU-MWIB2を使用したときのFITC蛍光像，励起フィルターの波長域が460～490nmと中程度なので，蛍光像はほどほどに明るく，バックグラウンドもほどほどに出ている．C：蛍光キューブにU-MNIB2を使用したときのFITC蛍光像，励起フィルターの波長域が470～490nmと狭いため，蛍光像は最も暗いが，同時にバックグラウンドも低くなっている．これらのバックグラウンドは，主に対物レンズと培地の自家蛍光によるものである．

第1部 顕微鏡が使えるようになるまで



B

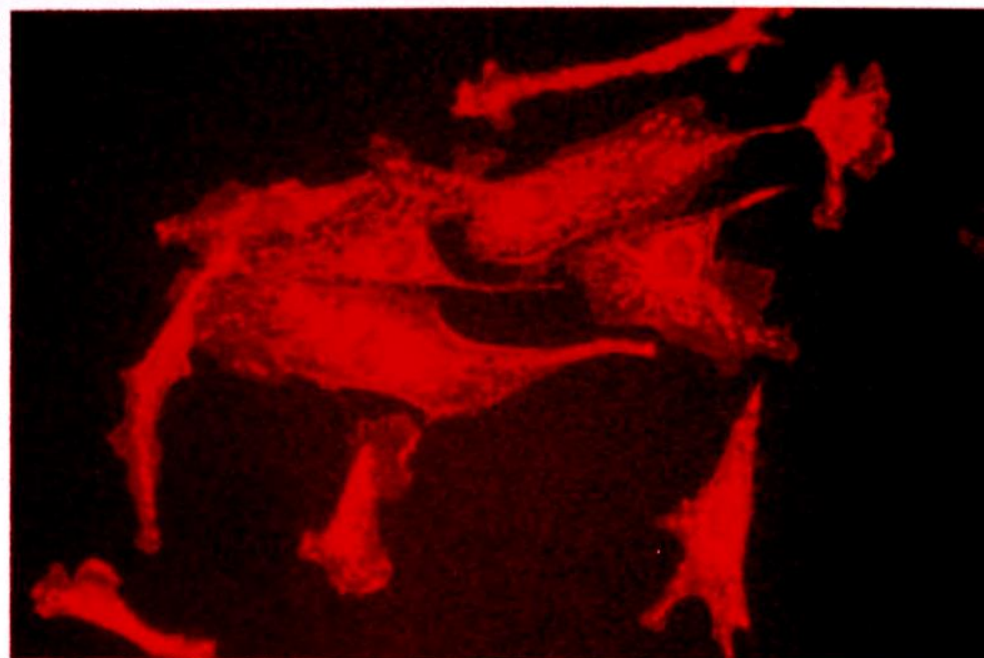


図4 励起光の強さの効果

適切な強さの励起光が当たっている蛍光像 (A) と励起光が強すぎる蛍光像 (B) 。 A : 励起光の強度が適切な場合は、バックグラウンドが暗黒に近くなり、蛍光像を高いコントラストで観察できる。また、褪色も抑えられる。 B : 励起光が強すぎると、蛍光像は明るい、同時にバックグラウンドも明るく、コントラストは劣ってしまう。標本の褪色も早い。