



A1R HD25：用最新的共振扫描技术实现活细胞成像新方法

过去，点扫描共聚焦显微镜通常使用检流计振镜产生各种样本的高对比度图像。这种方法虽然对常规成像十分有效，但并不太适合活细胞成像。本应用说明将着重介绍新型尼康A1R HD25共振扫描模式及其对活细胞应用的影响。

因其灵活性，点扫描共聚焦系统已成为全世界各实验室中的主力仪器。这种灵活性得益于使用检流计振镜激发激光。检流计振镜可根据所施加的波形进行驱动，使得研究人员可以即时改变光学变焦（和其他参数），也意味着图像分辨率可以针对几乎任何物镜或应用场景进行优化。这一点在转盘共聚焦系统上使用固定像素大小的相机的其他落射荧光系统上都是不可能做到的。一般来说，点扫描共聚焦的扫描速度比基于相机的系统更慢。然而，共振扫描突破了这一束缚，既提高了总体帧率，又保留了点扫描模式的灵活性。

驱动共振扫描镜与驱动检流计振镜的波形不同，后者需要的是线性锯齿波。共振扫描模式使用高频(A1R HD25使用的频率约为7.8 kHz) 正弦波，降低了电机上的压力并允许电机在极高速度下无限期运行。对于A1R HD25来说，以上特点转化为在整个业界领先的25mm视场(FOV)上高达30帧/秒(FPS)的扫描速度。本应用说明重点描述尼康A1R HD25共振扫描模式的独特技术成就及其在活细胞成像中的应用。

利用共振扫描减少光漂白和光毒性

如上所述，开发共振扫描共聚焦系统的关键目标是提高扫描速度。附加的效应是大幅度降低激光对样品的潜在损伤。考虑到这一点，假设有一个活细胞样品，需要每30分钟时间间隔拍摄一次细胞动态情况。这种情况下，成像既可以选择使用检流计振镜扫描模式进行，也可以选择使用共振扫描模式进行。图1具体给出了对比：15小时内每30分钟分别用尼康共振扫描模式(图1 a-c)和检流计振镜扫描模式(图1 d-f)拍摄的100张Z轴图像。在整个15小时的实验过程中，这些数据表明，通过共振扫描获得的图像质量保持不变，但光漂白更少，样本活力更好。

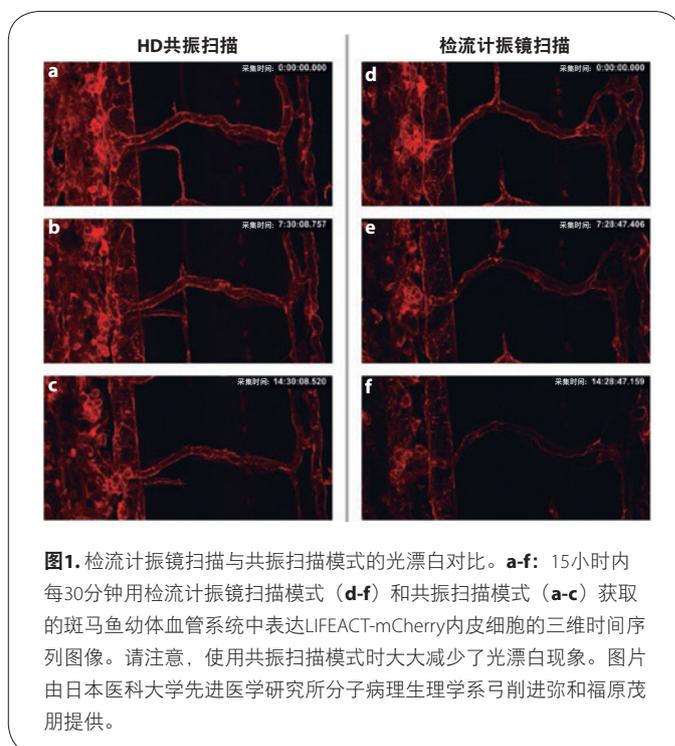


图1. 检流计振镜扫描与共振扫描模式的光漂白对比。a-f: 15小时内每30分钟用检流计振镜扫描模式(d-f)和共振扫描模式(a-c)获取的斑马鱼幼体血管系统中表达LIFEACT-mCherry内皮细胞的三维时间序列图像。请注意，使用共振扫描模式时大大减少了光漂白现象。图片由日本医科大学先进医学研究所分子病理生理学系弓削进弥和福原茂朋提供。

过去，在此类实验中选用共振扫描模式一直存在某种妥协：即降低信噪比(S/N)和图像质量。图1和图2表明，尼康HD共振扫描模式可以利用共振扫描的优势而不会牺牲图像质量。A1R HD25的开发需要对共振扫描仪的电路设计进行全面更新。决定共振扫描分辨率的因素之一是这种电路设计方式对图像采集与创建像素速度的影响。采样率越高意味着相同时间内创建的像素越多，电路因而能产生更好的分辨率。尼康提高了HD扫描模式的采样率，所以使其具备了以最高 1024×1024 的分辨率捕捉更多清晰图像的能力。其次，尼康改进了电路的质量，减少了它们在最终图像中的噪声。其原因有两个：降噪不仅提高了图像的总质量，而且有效地最大化了图像的信噪比，从而克服短的像素停留时间导致的信号降低。

Adam White

Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA. E-mail: adam.white@nikon.com

应用说明

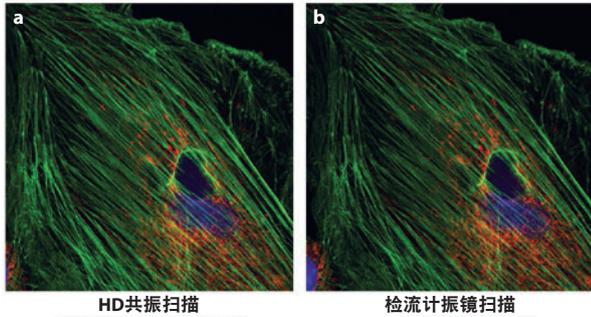


图2. 图像质量对比。**a、b**：可使用A1R HD25共振扫描**(a)**和检流计振镜扫描**(b)**获得的图像质量实例。共振扫描保持了图像质量。两张图像均出自牛肺动脉相同部位的荧光染色内皮细胞。

使用25mm A1R HD25共振扫描获取大型活细胞样品的高分辨率图像

其他的高速共振扫描共聚焦系统，均未充分考虑视场（FOV）大幅缩减的问题。缩减的原因是共振扫描模式高度依赖于正弦波驱动方

式的校正。而尼康的做法始终是对共振成像和检流计振镜成像维持相同的扫描区域。这是通过利用独特的基于硬件的像素时钟校正的方法，从物理层面追踪振镜的移动来实现的。这种即时追踪振镜的位置和速度的方法，使得业界领先的25mm FOV校正策略得以应用。该FOV是上一代A1R扫描面积的两倍，比某些竞争技术大13倍还多。图3是以25mm FOV为核心优势的实验。在该实验数据中，以30 FPS的帧率捕捉了完整斑马鱼幼体1024 x 256扫描尺寸的图像。然后利用NIS-Elements软件追踪血液流动方向。在该背景下，由于细胞追踪既需要较高的空间分辨率，也需要较高的时间分辨率，因此只有结合25mm FOV和A1R HD25卓越的共振扫描质量，该实验才有可能完成。

结论

尼康推出了A1R HD25，以提高点扫描仪的灵活性为重点，使所有用户都能受益。该HD共振扫描模式允许研究人员在该技术早期版本可能不兼容的实验中选择共振模式，并充分利用光毒性降低的优势。需要指出的是，提高时间分辨率也会对许多成像应用案例产生重要的影响，特别是在与25mm FOV结合时。A1R HD25带给用户的是—台具有极强灵活性的仪器，与任何其他共聚焦系统相比，它能用更少的时间产生更多的高质量数据。

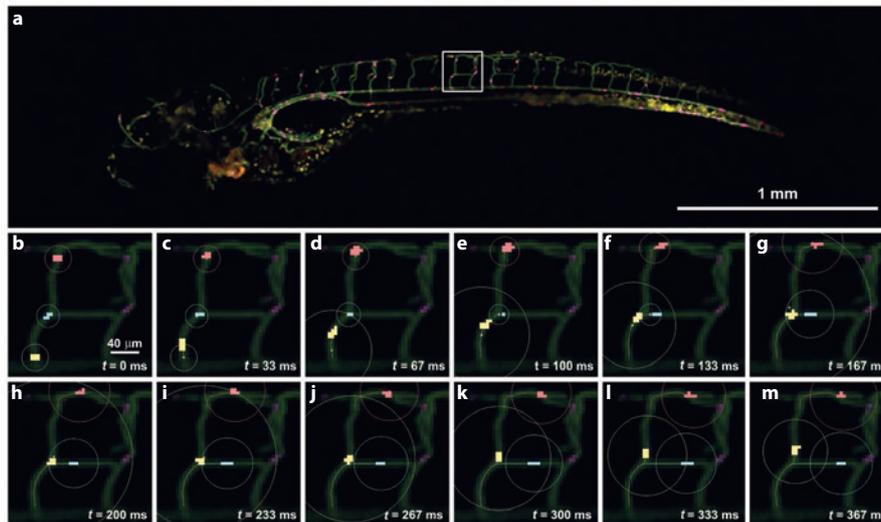


图3. 用A1R HD25采集的完整斑马鱼幼体血流二维时间序列静态图像。图像用4x物镜、2x平均和1024 x 256扫描尺寸按帧率30 FPS采集。**a**：时间序列中的一帧，表示整个25mm FOV中的斑马鱼幼体的生长。**b-m**：在**a**中白框区域内采集的连续12帧的时间序列图像，表示了单个血细胞的追踪数据。检流计振镜扫描的时间分辨率不足以在相似的实验环境中精确分辨这些轨迹。追踪数据用NIS-Elements 2D追踪功能获得。样本由威廉姆斯学院的M. Marvin提供。