



通过最大化共聚焦视野来更高效地获取高保真图像

多年以来，共聚焦系统的视野（FOV）一直受限于系统所连接的显微镜的视野。随着尼康Ti2倒置显微镜的问世，尼康率先将25mm的视野范围带入到共聚焦系统中，利用这项技术制造了具有25mm FOV的点扫描共聚焦系统A1 HD25。本应用说明将着重介绍该技术对日常简单实验的影响。

自17世纪以来，利用显微镜来获取图像是一种不断发展演变的重要研究手段。如今的系统采用了各种技术，如高端相机、LED、激光和共聚焦点扫描仪，它们的目标都是为了更快更好地采集数据。为了实现这一目标，近年来人们致力于提高成像系统在单位时间内获取数据的能力，使得人们能用更少的时间获取更多的数据。对于共聚焦荧光显微镜来说，人们将精力主要集中在了使系统变得更快和更灵敏上。不过，由于荧光样品本身可以产生的光子数是有限的，因此这些方法往往因为使用的激光功率太高和/或产生的信号不足而在实际应用中没有得到理想的结果。

认识到这些极限的存在后，尼康除了寻求其领先市场的速度、灵敏度和图像质量外，还寻求新的途径来提高单位时间内获取图像的能力，那就是创建更大的图片。凭借尼康镜片出众的光学品质，公司制造出更大的新型光学组件，将标准共聚焦显微镜系统的FOV提高到难以置信的25 mm。本应用说明重点描述FOV扩大后对日常研究工作的影响并说明为什么尼康A1 HD25成为共聚焦显微镜的新标准。

视野扩大会大大增加单张图像中可测量的细胞数量

简单细胞计数实验是最为常见的显微镜成像实验类型之一。这种实验以各种方式进行，用于探究与细胞或组织的生长/死亡、药物疗效、以及环境应力/外加应力的后果有关的问题。当这种实验的所需模型最适合使用显微镜进行分析时，研究人员必须建立针对所有条件的样本并收集来自每种条件的图像。然后需要通过图像分析对每种条件进行细胞计数。多数情况下，研究人员在此类实验中不得不坐在显微镜前面，针对每种条件捕捉足够多的图像，从而产生足以解决给定问题的细胞计数（ n ）。那么，FOV会对这种常见的利用显微镜的实验产生哪些影响呢？

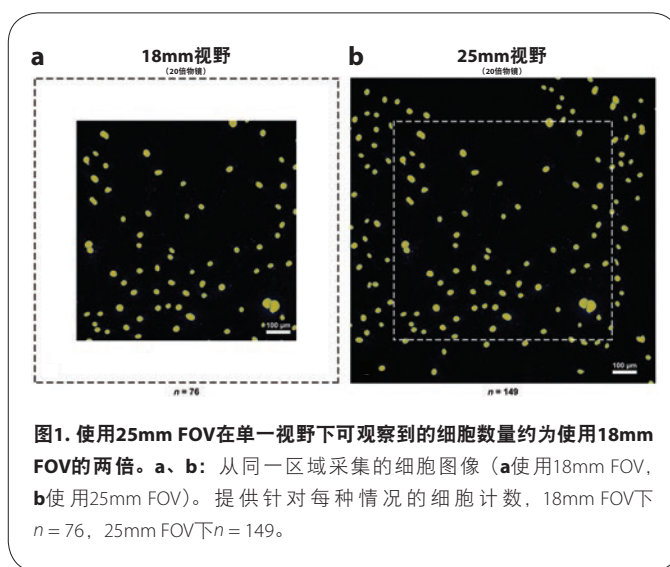


图1. 使用25mm FOV在单一视野下可观察到的细胞数量约为使用18mm FOV的两倍。a、b：从同一区域采集的细胞图像（a使用18mm FOV，b使用25mm FOV）。提供针对每种情况的细胞计数，18mm FOV下 $n = 76$ ，25mm FOV下 $n = 149$ 。

图1展示了使用25mm FOV和18mm FOV对单个区域中的细胞核进行计数时产生的代表性数据的对比。如图1a所示，使用18mm FOV时，该画面中的细胞计数为76。而在对同一区域成像的情况下，只需把FOV扩大到25 mm，该计数即增加到149（见图1b）。由此可见，FOV的这一改进使每张图像中收集的数据几乎增加一倍。由于得到相同细胞计数 n 需要收集的图像更少，缩短一半的实验时间将成为可能。以此为例，假如每种条件需要的细胞计数 n 为1500。使用25mm FOV时，只需大约10张图像就能达到这一计数，而使用18mm FOV时，达到相同计数则每种条件需要将近20张图像。

视野扩大为整个实验提供了更多的细胞计数和更好的统计数据

当然，共聚焦显微镜实验收集数据的目标并不总是为了节省时间。比如，某项研究数据虽然在某一特定条件下发生了微妙变化，但在统计分析后却没有得到具有显著性差异的结论。在这种情况下，增大样本群规模 n 可能会使得得到的结论可信度大大增加。图2显示FOV扩大对实验期间细胞计数的累积效应，实验中18 mm和25 mm FOV都采集了47张图像。首先，根据以上提供数据得出的明显结论是：25 mm FOV下47张图像上的累积细胞计数增加更迅速（图2a）。本

Adam White

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

应用说明

例还从这些图像的一个子集中收集了平均强度测量结果（图2b）。另一个不太明显但同样重要的结论是，仅凭更大的FOV收集更多数据意味着在相同张数的图像中产生了大得多的 n 值，使得统计误差（用图2b中的误差条表示）更小。换句话说，用大FOV采集数据促使相对不确定性随着图像总数的增加而迅速减小。不确定性更低意味着在整理实验结果时可以得出更理想的结论。A1 HD25的初衷就是利用现有手段和技术获得更好的数据，更为重要的是获得更有说服力的研究成果。

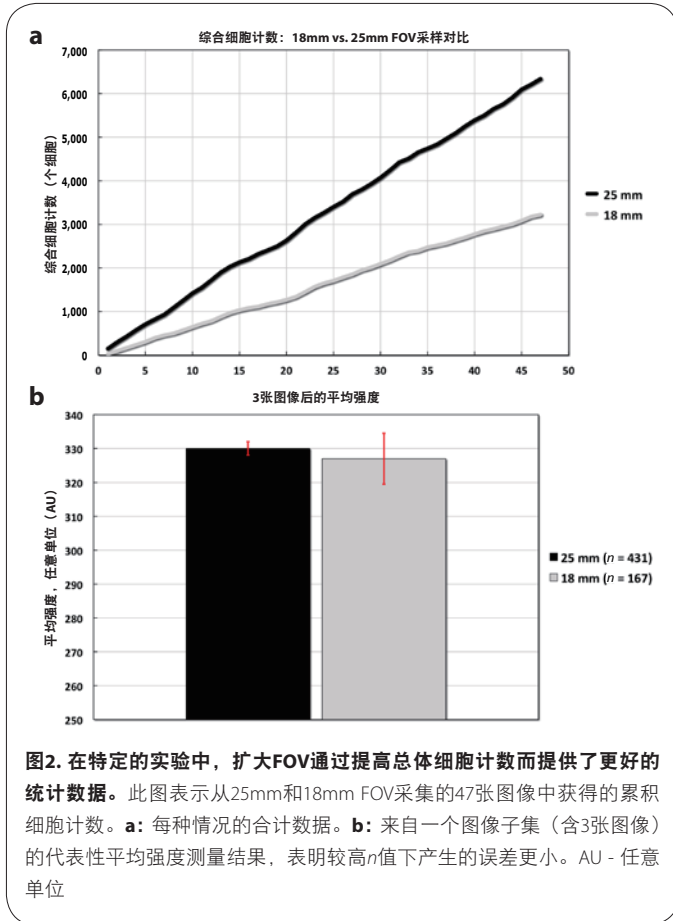


图2. 在特定的实验中，扩大FOV通过提高总体细胞计数而提供了更好的统计数据。此图表示从25mm和18mm FOV采集的47张图像中获得的累积细胞计数。**a:** 每种情况的合计数据。**b:** 来自一个图像子集（含3张图像）的代表性平均强度测量结果，表明较高 n 值下产生的误差更小。AU - 任意单位

结论

重要的是——尽管本应用说明中没有涉及——除细胞计数之外，尼康A1 HD25在其他很多的应用场景中都有出色的表现。例如，在共聚焦高内涵筛选系统中，尼康A1 HD25的大视野将最大化每张图像中的所采集到的数据量，这使得高内涵筛选系统的数据吞吐量上升到了一个新高度。此外，对于诸如斑马鱼胚胎这样的大模式生物，人们可以在单个FOV中用高放大倍率获得完整生物体的图像。与过去在指定大小FOV下捕捉的细节相比，用户可以在保证更高放大倍率和分辨率的细节的同时获取更大更完整的图像。共聚焦显微镜的另一种常见应用是大图像拼接。应用A1 HD25之后，不仅可以通过大FOV提高拼接图像的生成速度，同时全新的光学设计使得图像拼接的拼接痕迹更加不明显（见图3中的实例）。

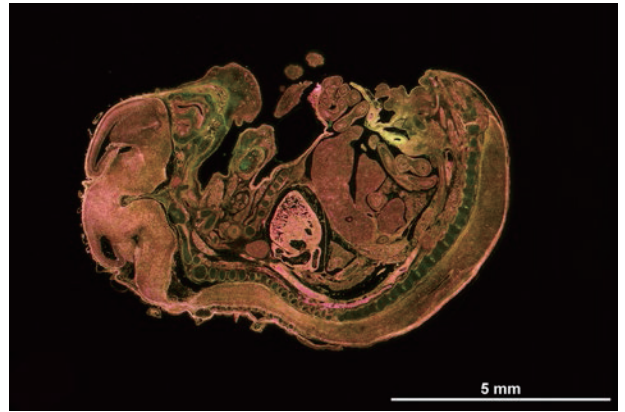


图3. 用A1R HD25在10倍放大倍率下捕捉和拼接的完整小鼠胚胎图像。

尼康A1 HD25凭借25mm FOV代表了点扫描共聚焦技术的前沿成果。以上介绍的数据和实例阐释了这一简单而重要的光学变革如何能够让研究人员减少在显微镜前花费的时间。选择A1 HD25就是在每一天、每一张图像上都能获得更多更好的数据。