

Leica 白激光*共聚焦成像系统 Stellaris 8 功能介绍

►穆娇 刘美蓉

(分析测试中心光谱组 Email:mujiao@iccas.ac.cn)

分析测试中心光谱组 2022 年度新购置 Leica 白激光* (WLL, 本文中“白激光”指可调谐脉冲激光光源, 351 根谱线连续可调, 440-790 nm 之间任意谱线可选, 可同时发出 8 根谱线) 共聚焦成像系统 Stellaris 8 (图 1), 于 2024 年 1 月份完成安装调试, 经试运行后已投入正常使用。Stellaris 8 与现有 FV1000 激光扫描共聚焦显微镜相比, 在激发光源、检测器、分辨率等硬件设施上有较大性能提升, 同时拓展了荧光寿命成像 (FLIM)、Lightning 模块、Navigator 等更广泛的使用功能。



图 1、Leica 白激光共聚焦成像系统 Stellaris 8

一、仪器主要配置介绍

1. 激发光源: WLL 白激光, 激发谱线范围 440-790 nm 自由可调, 调节精度 1 nm; 单独配备 405 nm 激光器 (脉冲、连续), 补充短波长激发光。常见的激光共聚焦显微镜一般配备具有固定激发波长的激光器, 而 Stellaris 8 配备了 405nm 激光器和 WLL 白激光, 可实现与激发光谱峰值的完美匹配 (图 2)。

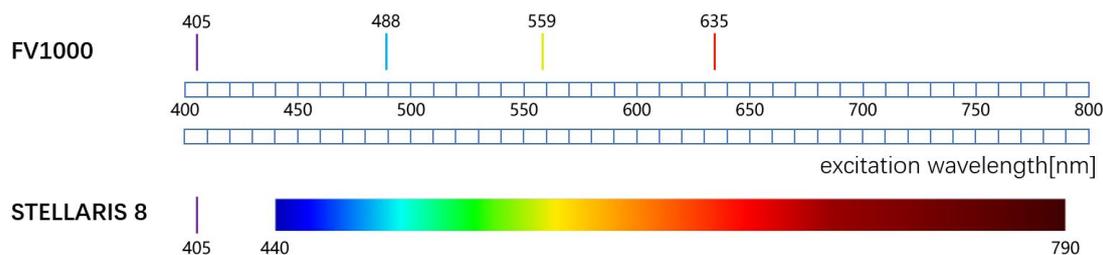


图 2、FV1000 与 Stellaris 8 激光光源对比

2. **检测器**: 配备 3 个徕卡新一代 HyD 检测器, 采用棱镜分光, 狭缝检测 (图 3), 均可实现**光谱式检测**, 即 410~850 nm 范围任意调节光谱接收范围, 最小调节步进=1 nm, 具有无损伤、各检测器动态范围**独立可调**、光子检测效率 (PDE) 高 (58%@480nm) 等特点, 不再受滤光片分光限制。

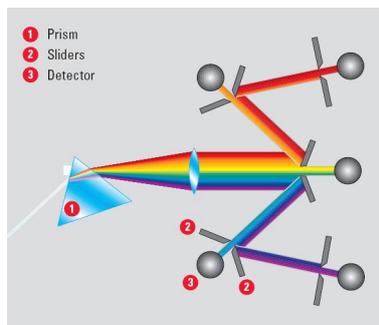


图 3、HyD 检测器棱镜分光示意图

3. **物镜**: 配备 3 个干镜 (HC PL APO 10×/0.4, HC PL APO 20×/0.75, HC PL APO 40×/0.95) 和 1 个油镜 (HC PL APO 63×/1.40)。

4. **分辨率**: 图像扫描最高分辨率可达 **8192×8192**。

二、仪器主要功能介绍

1. **荧光寿命成像 (FLIM)**。共聚焦成像系统包含基本的荧光成像以及荧光寿命成像。荧光寿命成像时每个像素点都携带有荧光寿命数据。通过对整幅图或某个 ROI 区域拟合可以得到样品的荧光动力学数据, 包括拟合曲线、寿命值等。基于拟合的荧光寿命值, 可完成基于荧光寿命的组分拆分。

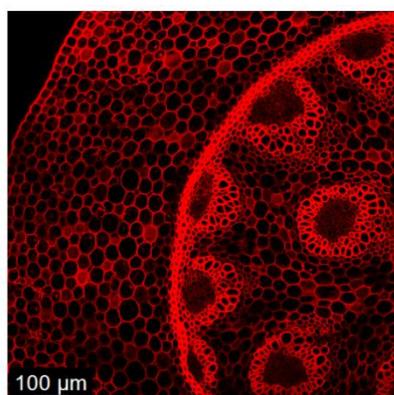
以经Fast Green-Safranin染色的铃兰草植物根茎为例, 选择561 nm 作为激发波长, HyD X检测器作为检测器, 收集范围585-810 nm, 选用10×干镜 (APO 10×/0.4), 同时采集样品的荧光成像 (图4a) 以及荧光寿命成像 (图4b), 不同颜色代表了样品结构的不同荧光寿命属性。

荧光寿命分布: (1) 荧光寿命直方图 (图4c, Fast FLIM Histogram) 以寿命值为横轴, 以寿命值对应的像素数为纵轴, 直观显示可能存在的寿命峰值, 可选取合适的感兴趣区域 (ROI) 进行分析; (2) 相位图 (Phasor图) (图4d) 无需做曲线拟合, 更简单、更直观, 尤其适合多寿命成分的分析, 它采用极坐标来显示荧光寿命的分布, 恰好位于半圆上则可说明样品为单组分, 位于半圆内则说明样品为多组分, 越靠近左侧荧光寿命越长, 越靠近右侧荧光寿命越短。观察样品的

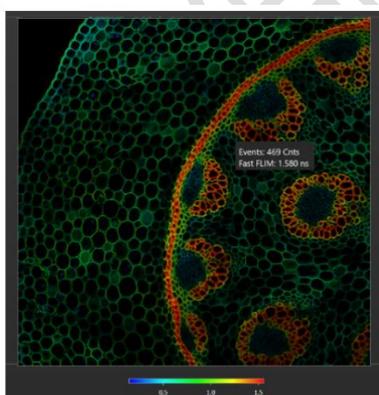
Phasor图，两个比较集中的区域位于半圆内，说明样品为多组分，靠近左侧区域的荧光寿命为1.227 ns，对应荧光寿命成像中偏橙色的结构，靠近右侧区域的荧光寿命为0.645 ns，对应荧光寿命成像中偏绿色的结构。

荧光寿命数据：选取样品显示不同寿命的位置ROI1、ROI2，分别进行双指数拟合得到拟合曲线（图4e），ROI1和ROI2荧光寿命分别为0.746 ns、1.404 ns，与Phasor图得到的数据大致相符。

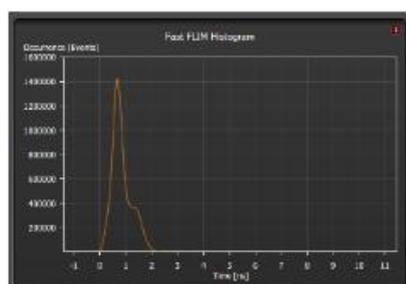
组分拆分：荧光寿命成像可直观地看到该样品不同结构位置具有明显不同的荧光寿命属性，将荧光寿命数据进行拟合后观察到全图的荧光寿命为 0.289 ns、1.341 ns，根据荧光寿命进行拆分后即可得到样品的荧光寿命拆分图（图4f）。



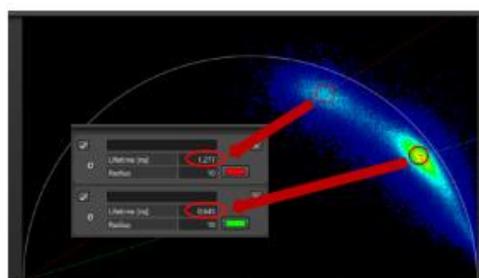
(a)



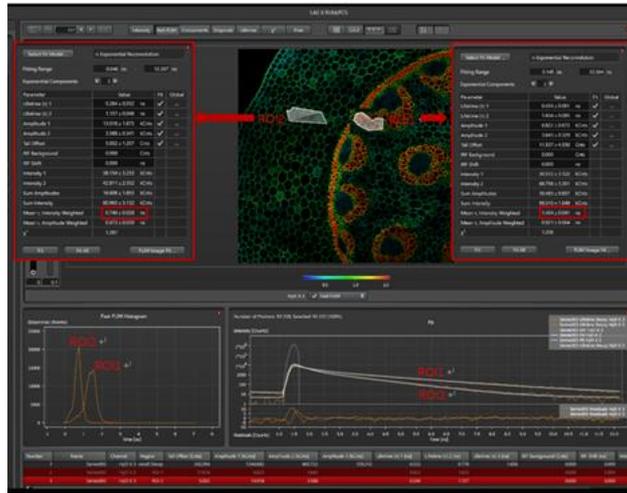
(b)



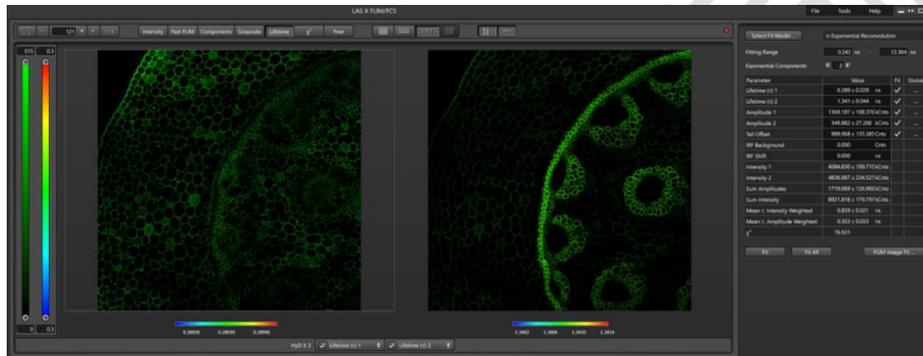
(c)



(d)



(e)



(f)

图4、铃兰草植物根茎 (a) 荧光成像。 (b) 荧光寿命成像。 (c) 全图荧光寿命直方图。 (d) 荧光寿命Phasor图。 (e) ROI区域荧光寿命直方图、数据拟合后荧光动力学数据。 (f) 荧光寿命拆分图。

2. 高分辨率 Lightning 模块，通过软硬件结合的方式，可实现 XY 方向 120 nm，Z 方向 200 nm 的分辨率，实现智能一键出图获得高分辨图像。模块包括新一代高灵敏 HyD 检测器、全自动图像信息提取模块、高速 GPU 处理器、Leica 自适应去卷积算法等，操作简单，分辨率提升效果明显。当进行 Lightning 一键操作时，系统自动将针孔关小，通过高灵敏 HyD 检测器检测荧光，然后通过 Leica 自适应去卷积算法计算，最终获得荧光高分辨成像。

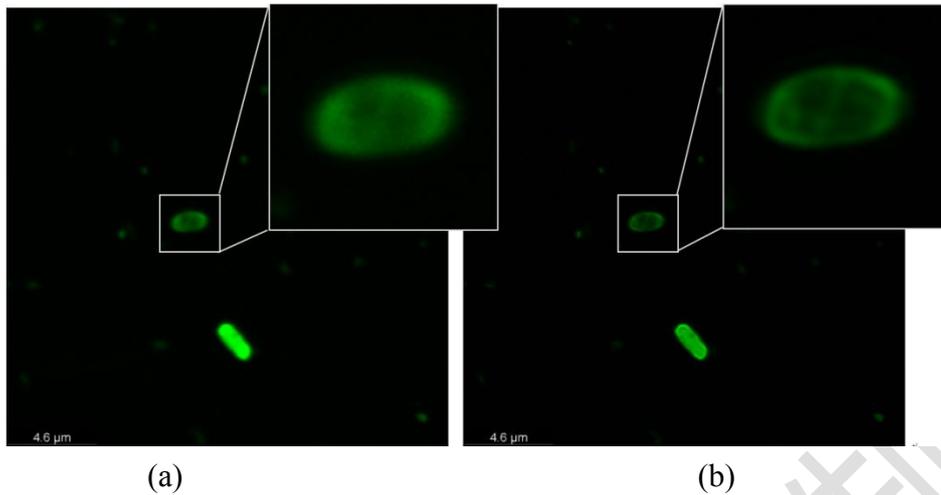


图 5、(a) 使用 Lightning 功能前采集的图像。(b) 使用 Lightning 功能后采集的图像，观察到 1 μm 大小细菌的具体染色位置，图像分辨率明显提升。

3. 配有 **Navigator** 快速大视野拼图模块，适用于采集大视野图像（最大可达 22 mm）。Navigator 功能通过螺旋扫描超快预扫，可将任意形状视野采集拼接，也可对多个感兴趣区域独立采集，通过 Focus map 功能选定多个焦面，保证样品不同位置不同焦面时也能有效拼接，利用仪器优化算法减少图像拼接痕迹，实现了大视野样品图像的采集。

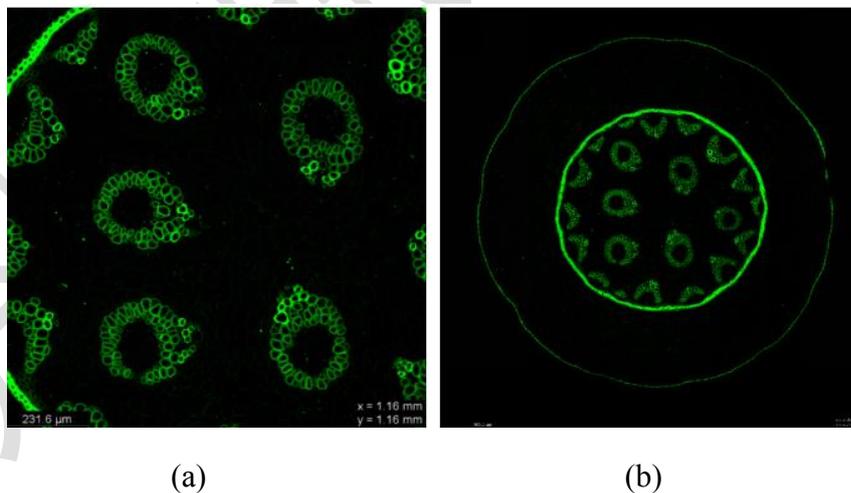


图 6、10 \times 物镜下观察的 Fast Green-Safranin 染色铃兰草植物根茎切片。(a) 不使用 Navigator 功能采集的图像（ $X=1.16\text{mm}$, $Y=1.16\text{mm}$ ）。(b) 使用 Navigator 功能采集的大视野图像（ $X=3.25\text{mm}$, $Y=3.27\text{mm}$ ）。

4. 更好的3D成像效果，LAS X软件能够多维度参数调整生成的3D图像，优

化成图效果，在处理3D荧光图像切割方面优势明显，能够通过控制杆实现任意切面的图像切割。

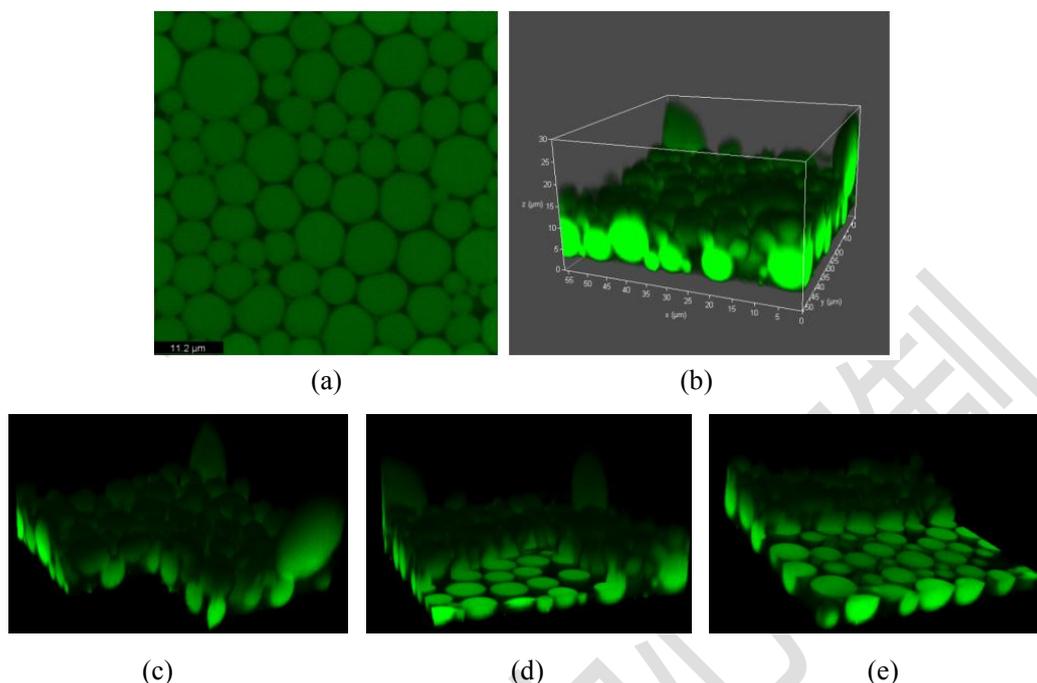


图7、使用3D成像的油水混合物样品。(a) XY成像。(b) 3D图像。(c)-(e) 任意角度切面图像。

三、总结

综上所述，Leica白激光共聚焦成像系统Stellaris 8相较于现有Olympus FV1000激光共聚焦显微镜来说，配备有更全的激发光谱光源、更灵敏的HyD检测器、更高的图像扫描分辨率、更好的3D成像效果，同时可以实现荧光寿命成像、Lightning超高分辨率、Navigator大视野拼图等使用功能，适用于自发荧光样品、荧光标记样品的荧光强度成像、荧光寿命成像（FLIM）及分析，也适用于透光样品微分干涉差（DIC）或明场（BF）成像。同时经过样品台改造后，Stellaris 8可与自主研发的控温装置适配，实现样品在25-80℃之间的精准升温。

致谢：

感谢分析测试中心丁丽萍老师对稿件的多次审读和编辑加工！