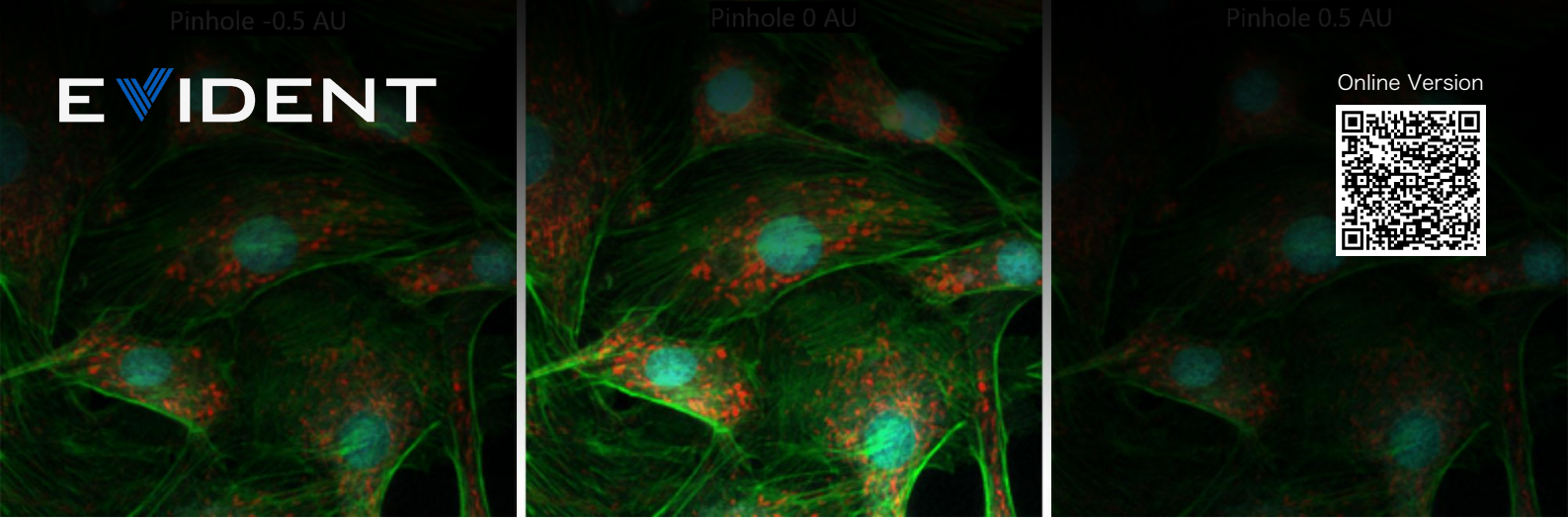


EVIDENT

Online Version

白书 2024年9月12日

显微镜性能监控器有助于进行可靠的定量性共聚焦荧光成像

简介

虽然光学显微镜的荧光成像主要用于定性观察，但其定量分析应用也越来越多。在这种情况下，建议进行定期维护，因为光源的功率会因环境温度变化等原因而波动，从而导致图像质量不佳。此外，由于系统存在热膨胀，如果从激光光源到显微镜框架之间的光学器件稍有偏差，则系统的激光功率也会发生波动。

共聚焦显微镜是一种复杂设备，需要训练有素的技术人员对其进行维护或性能评估。定期维护显微镜对实验的可重复性和研究质量至关重要，这个问题在业界一直备受关注，并且相关的讨论仍然在进行中。[1,2,3,4] 国际标准化组织（ISO）也在跟进这一问题，不仅发布了ISO21073 2019，还规定了共聚焦激光扫描显微镜的图像性能。[5]

在Evident，我们意识到这一问题的重要性，并努力加以解决。当我们在2023年推出FLUOVIEW FV4000共聚焦激光扫描显微镜时，我们决定使用显微镜性能监视器为其提供支持，以帮助核心实验室管理人员和用户跟踪三个关键性能参数，这些参数能够影响定量共聚焦荧光成像并对图像质量产生影响。

在本白皮书中，我们将讨论这些关键性能参数以及显微镜性能监视器如何帮助实现更高质量的定量成像。我们还将介绍每个性能特征的测量原则和标准，并讨论性能监视器能为核心实验室和其他希望尽可能提高荧光定量成像的实验室提供哪些优势。

需要监控的荧光定量成像性能因素

2022年，O. Faklaris等人针对应定期检查的七项显微镜性能指标及各性能指标测量指南提出了建议。[6]这七项显微镜性能指标是：辐照度功率稳定性、成像性能、场照明平整度、色差、载物台漂移、载物台位置重复性和检测器背景噪声。

不过，这里存在一项挑战，如果没有一定水平的光学显微镜专业知识，就很难测量这些性能特征。由于很难获得这方面的专业知识，因此很难对显微镜进行定期维护，以确保这七个因素保持在容差范围内，尤其是对于负责多个显微镜系统的核心实验室管理人员而言。

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

为了向用户提供初始帮助，Evident开发了一种解决方案，使用户能够轻松定量测量荧光信号。荧光信号的波动很难根据图像的外观来判断，因此研究人员不太可能注意到这些问题，相比之下，共聚焦观察中的色差或延时成像中的载物台漂移等问题更容易被注意到。显微镜性能监视器的目的之一是让研究人员能够在成像过程中及早发现性能变化，而不是在成像实验完成后才发现，因为这有可能导致错误的结果和重复工作。

在上述七个特性中，荧光显微镜的亮度与三个因素高度相关--辐照度功率稳定性、成像性能和检测灵敏度。

这是因为荧光亮度取决于照射到样品上的光强度以及荧光信号的检测能力。

在荧光显微镜中，照射到样品上的光强度取决于激光功率和照射面积。照射面积由成像性能决定，成像性能是衡量光学仪器将光通量从光源聚焦到单点的准确程度。 换言之，激光束的聚焦和照射到样品上的光强度都会随着成像性能的变化而变化。

其次，荧光信号的检测效果取决于整个系统的检测灵敏度。因此，监测激光功率、成像性能和检测灵敏度的变化对于高质量、稳定的荧光定量成像非常重要。

监测激光功率非常重要，因为通过物镜照射的激光功率会因环境温度变化或其他各种因素而波动。显微镜性能监视器可在激光功率从光纤输出端进入FV4000系统后立即对其进行测量，从而使系统能够确定功率与安装了显微镜时相比是否发生了变化。 通过自动调整激光器的输出功率，系统可以纠正波动，使其在一段时间内达到一致的值。

需要对检测灵敏度进行监测，以便定量了解自显微镜安装以来，由于光学器件老化或针孔光轴没有对齐而导致的检测效率下降。 针孔的中心位置对于共聚焦激光扫描显微镜尤为重要，如果室温因季节变化等原因发生显著变化，针孔的中心位置就会发生偏移。 如果显微镜安装在温度得到严格控制并保持恒定的地方，则可能不需要监控检测灵敏度，但并非所有共聚焦激光扫描显微镜都安装在这种高度稳定的环境中。 此外，镜头表面的灰尘和划痕虽然不常见，但也会降低透光率。 不过，由于这种变化是逐渐形成的，因此性能的缓慢下降很难察觉。

成像性能的变化主要是由物镜表面的划痕、灰尘、使用了错误的浸泡油或校正环调整不当造成的。 如果不具备丰富的显微镜知识，便很难注意到大多数成像性能问题。 在少数情况下，我们曾发现因物镜掉落而导致的性能问题，但核心实验室管理员仍未意识到该问题的存在，因为物镜掉落的情况从未报告过。

虽然上述成像性能问题是由与物镜有关的问题引起的，但还有一些其他因素也会导致常见的性能问题，例如由于温度波动而导致镜片和透镜与光轴错位。

显微镜性能监视器的工作原理

显微镜性能监视器可独立测量激光功率、检测灵敏度和成像性能。 下面将解释系统如何测量每种特性。

激光功率

图1为显微镜性能监视器的激光功率测量系统概览图。 测量开始后，系统会自动执行以下流程。

1) 405 nm激光设置为100%，其他激光设置为0%。

2) 发射激光。

3) 激光被位于光纤进入FV4000后的分光器(BS)部分反射。

4) 激光输入到安装在FV4000内部的光电探测器（激光功率监视器，简称LPM）。

5) 系统根据LPM的实际输出值计算出100%的激光功率输出。

6) 将激光设置为0%，然后将短波长激光设置为100%。

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

依次对所有已安装的激光器重复步骤2-6。

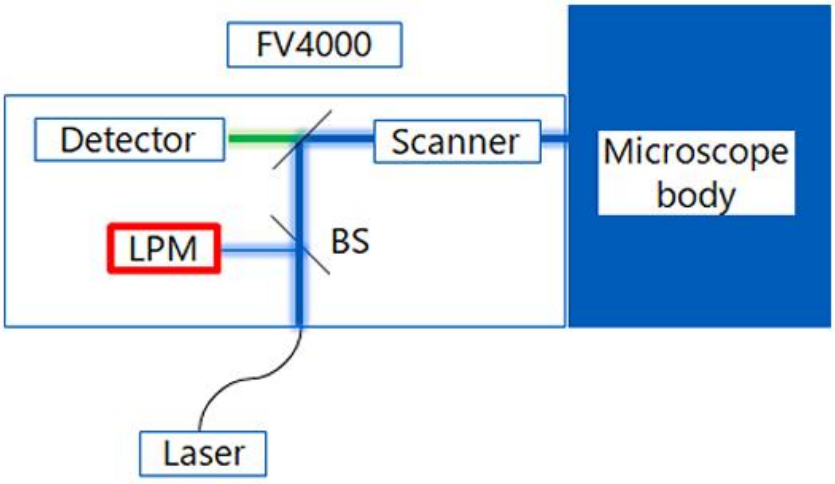


图1：激光功率测量系统示意图。

使用LPM测量值对激光功率进行自动修正。 将测量到的电流输出与安装显微镜时的输出进行比较，并计算出两者之间的差值百分比。根据计算出的百分比调整激光控制参数，以保持激光输出恒定。我们建议用户在每次图像采集之前启用激光功率监控功能，以确保每次成像实验的激光功率保持恒定。

为了确定显微镜性能监视器测量的激光功率与样品上发射的实际光强的匹配程度，我们对性能监视器测量的激光功率和物镜发射的激光功率进行了为期六个月的跟踪。结果如图2所示。我们使用UPLSAPO10X物镜测量了物镜发射的激光功率。

如图2所示，显微镜性能监视器测量的激光功率与物镜发射的激光功率之间存在高相关性；确认精度在5%以内。不过，当激光器设置为低电平时，如果仪器没有充分预热，物镜发射的激光功率就不稳定。图3为系统预热两小时后记录到的结果。物镜发射的激光功率变化记录在六个激光设定点上：1%、10%、25%、50%、75%和100%。从图3中可以看出，激光器设置越低，预热效果越明显。根据这些数据，我们建议用户将系统预热至少60分钟，然后在成像前使用显微镜性能监视器校正激发光源功率。

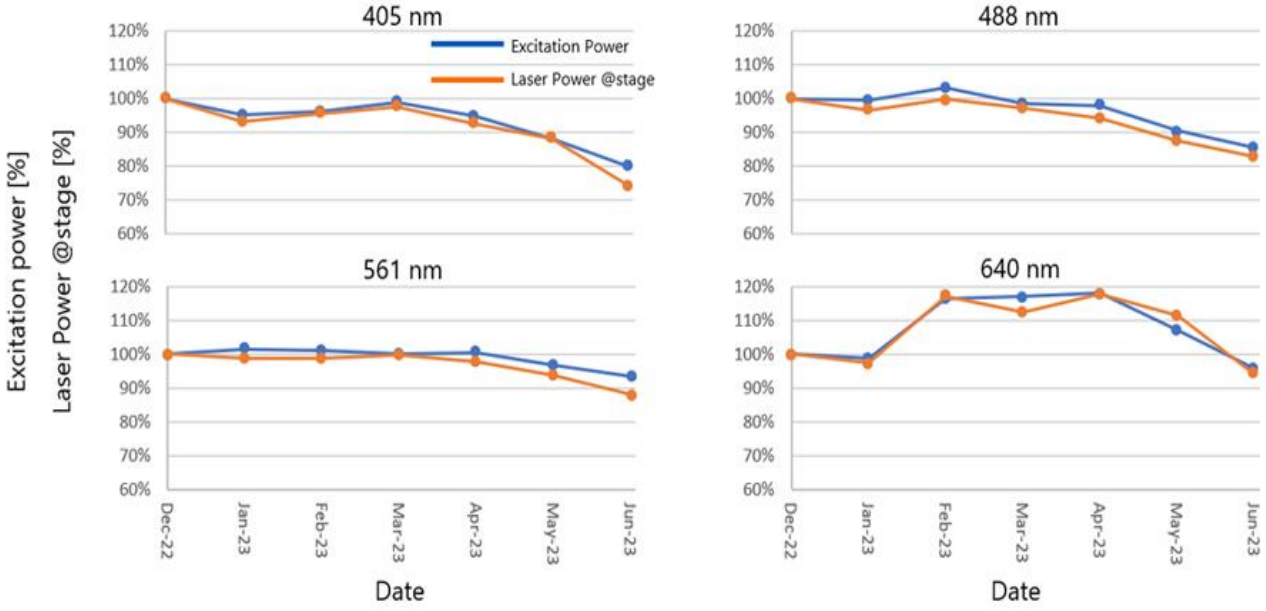


图2：物镜发射的激光功率与性能监视器测量的激光功率之间的比较结果。

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

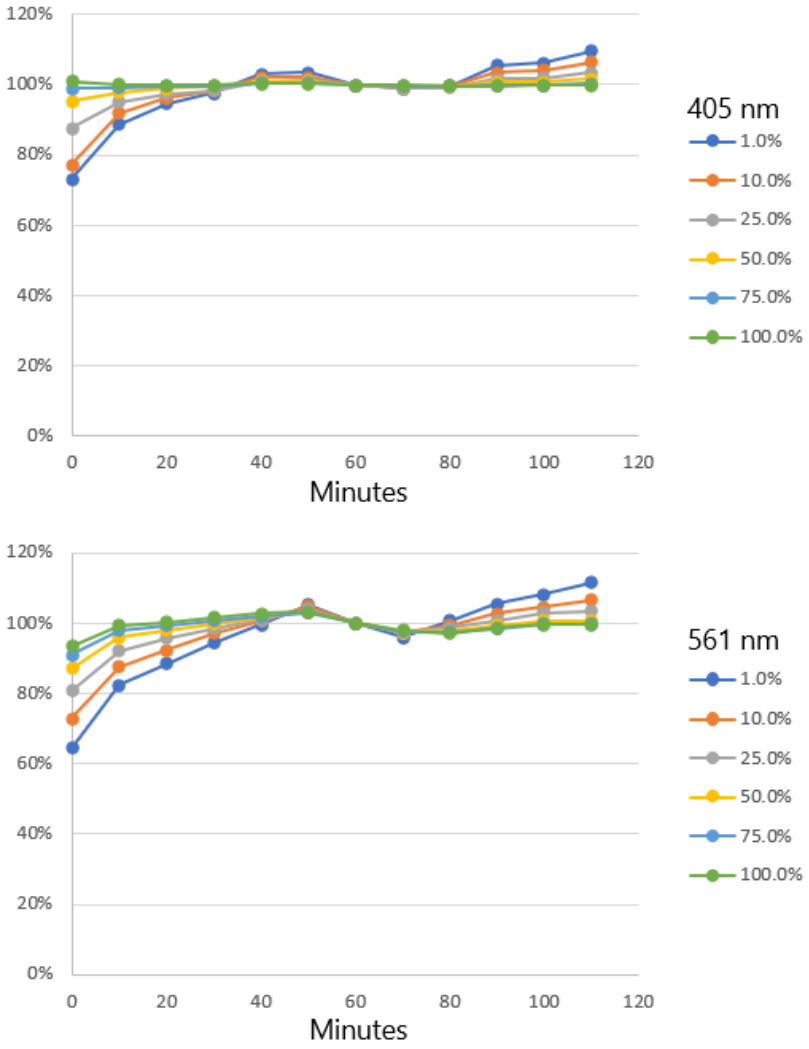


图3. 预热期间不同激光设置值（1%、10%、25%、50%、75%和100%）下物镜发射的激光功率输出变化。

定期监测激光功率可以检测到激光器本身的低功率，以及激光合束器和光纤的缺陷。当输出功率下降到显微镜系统首次安装时所测输出功率的50%以下时，就会触发维护工作。当激光功率达到这个临界值时，尽管实际输出功率始终被校正为一致，其也可能不足以用于一些应用，例如深层观测。

如果连续使用激光器数小时，系统产生的热量可能会对室温产生影响，导致激光功率波动。因此，我们建议用户记录激光器的使用时间，并在每次获取图像时校正激光功率，因为激光功率对温度变化很敏感。

检测灵敏度

检测灵敏度有两个测量特征：每个检测器的灵敏度和针孔位置。图4为每个检测器灵敏度测量系统的概览图，图5为按检测灵敏度获取图像顺序的流程图。与激光功率测量一样，一旦开始测量，系统就会自动执行以下流程。

检测灵敏度

1) 选择分光器BS10/90，将405 nm激光和检测器1调至ON（光路会自动调整，使激光反射到所选检测器）。

2) 安装在显微镜镜架转换器上的直角反射镜可以反射激光，同时减少激光功率。

3) 激光通过分光镜和针孔进入FV4000检测系统

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

4) 以安装时测量的同一检测器的灵敏度为准，计算检测器的相对灵敏度（图像的中值）。

5) 关闭检测器1，打开检测器2，重复步骤2-4。

6) 对所有已安装的检测器重复此过程。

针孔位置

7) 再次选择检测器1，在10个针孔光轴位置（X轴和Y轴各5个位置，其中针孔表面为XY轴）各重复步骤2-4共10次。

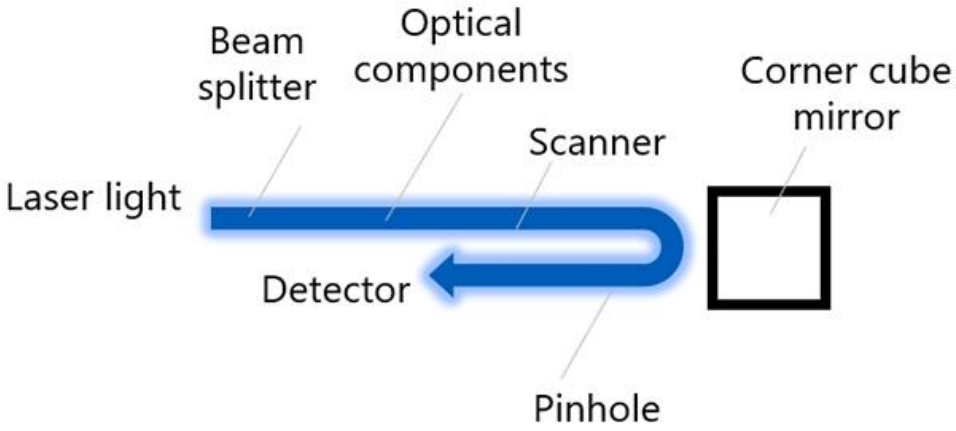


图4：检测灵敏度测量系统示意图。

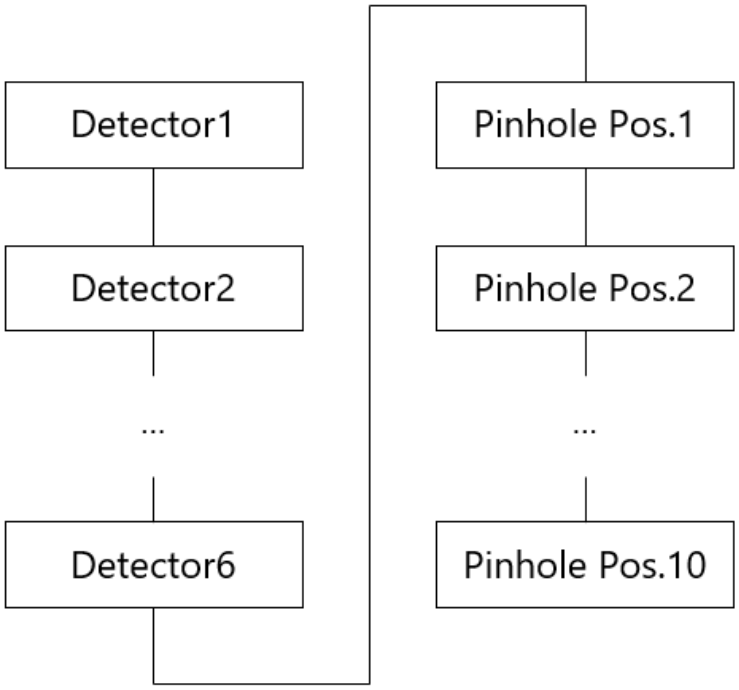


图5：检测灵敏度测量流程图。

测量检测灵敏度时，需要测量每个检测器的灵敏度变化和针孔光轴的适当移动位置。设备整体检测灵敏度的降低可归因于针孔光轴位置的偏差。

图6中左上和右上图分别显示了11个针孔光轴位置与检测系统X轴和Y轴方向相应输出值之间的关系图。 这些图还

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

显示了利用11个数据点中的5个数据点绘制的高斯近似曲线。通过使用高斯近似法，即使无法获得针孔光轴中心位置的数据，也能以高精度计算出位移量。

因针孔光轴错位导致的荧光强度降低程度取决于物镜的放大倍率和数值孔径（NA）。针孔的位置与物镜焦平面共轭，针孔平面的Airy尺寸由三个因素决定：物镜放大率、投影透镜放大率和焦平面的Airy尺寸。

图6右上图显示了使用两种物镜时针孔光轴错位程度与细胞试样中荧光强度之间的关系。图6下部为三幅荧光图像示例，均为使用UPLXAPO20X物镜拍摄的细胞图像，针孔光轴分别偏移了-0.5 AU、0 AU（标准）和+0.5 AU。图6右上图是根据这些图像，以及使用UPLXAPO20X（NA 0.8）和UPLSAPO100XS（NA 1.35）物镜在每个位移量下获得的图像中的荧光强度绘制而成的。

结果适用于投影透镜的1X放大倍率，并且表明，当针孔光轴移动0.32 AU时（假设UPLXAPO20X物镜的Airy尺寸为 1），UPLXAPO20X物镜的荧光强度降低10%，UPLSAPO100XS物镜的荧光强度降低1.1%。这说明针孔光轴偏差所产生的影响因物镜而异。

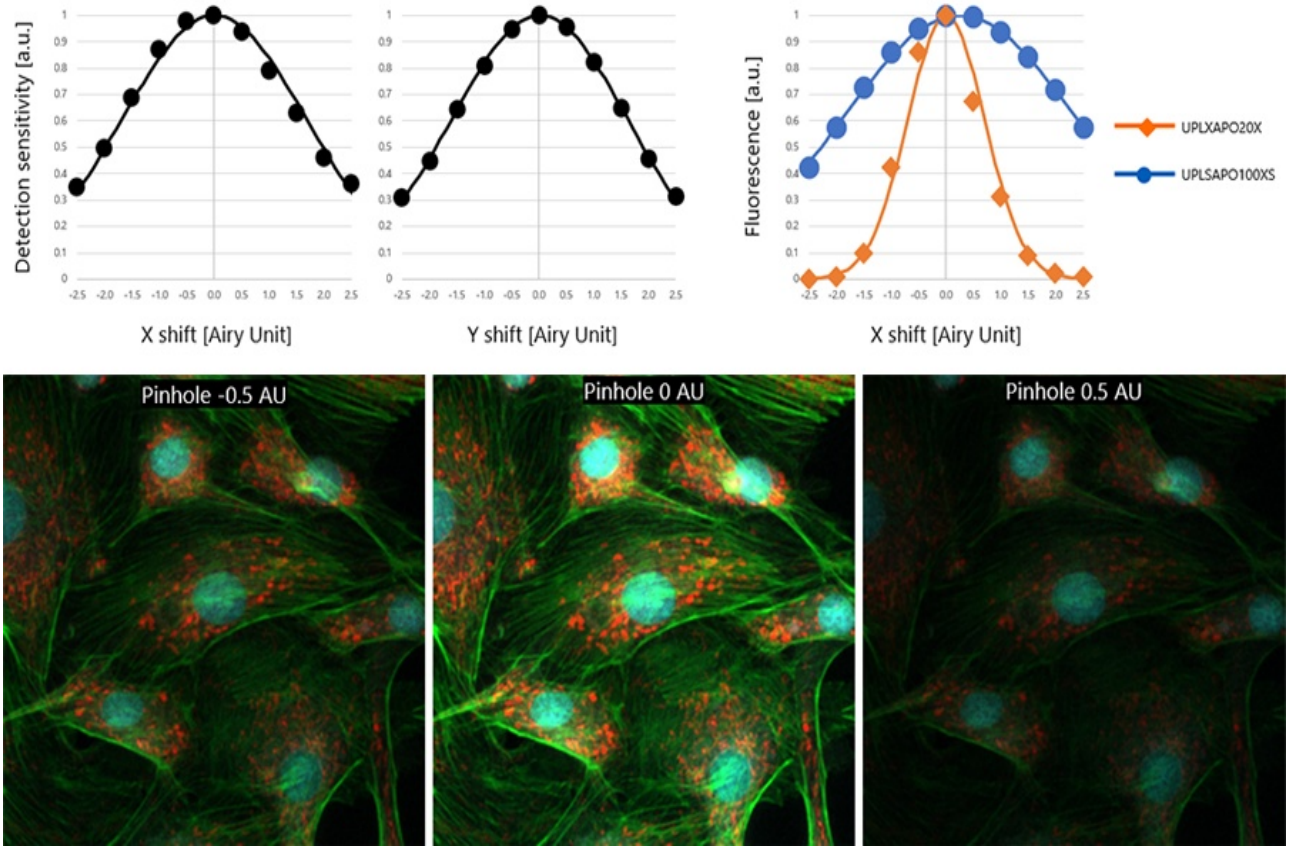


图6：针孔光轴偏差与检测灵敏度的测量值对比（左上，中上）。UPLXAPO20X和UPSAPO100XS物镜的荧光强度与针孔光轴偏差的关系（右上）。使用UPLXAPO20X物镜获取的细胞图像，针孔光轴分别偏移了-0.5 AU、0 AU和+0.5 AU（下图）。

当每个检测器的灵敏度与系统首次安装时所测得的灵敏度相比下降到80%以下时，便需要进行维护。判断针孔位置的标准是使用UPLXAPO20X时荧光强度的降低率，因为UPLXAPO20X物镜被认为是影响最大的因素。由于研究人员很难自行调整检测器灵敏度和针孔位置，我们建议用户在检测结果持续显示“失败”时与Evident联系。

我们建议经常对检测灵敏度进行测量，并在每一次关键定量成像时对检测灵敏度进行测量，因为检测灵敏度会随着环境温度变化和系统预热而略有变化。

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

成像性能

图7显示了如何利用边缘图样本的三维反射观测结果计算三维线扩展函数（3D LSF）。从反射图像的测量到成像性能的定量评估，整个过程遵循以下步骤。

1) 选择要测量的物镜。

2) 将边缘图样本放在FV4000载物台上。

3) 打开561 nm激光器，设置分光镜BS10/90，并启用一个检测器。

4) 将针孔设置为2 AU，以获取边缘图样本的三维共焦反射图像。

5) 从三维图像中提取由八个方向组成的三维边缘响应。

6) 通过区分边缘响应计算LSF。

7) 计算具有理想成像性能的3D LSF和LSF的二维交叉相关值；相关值通过零均值归一化交叉相关（ZNCC）获得。[7]

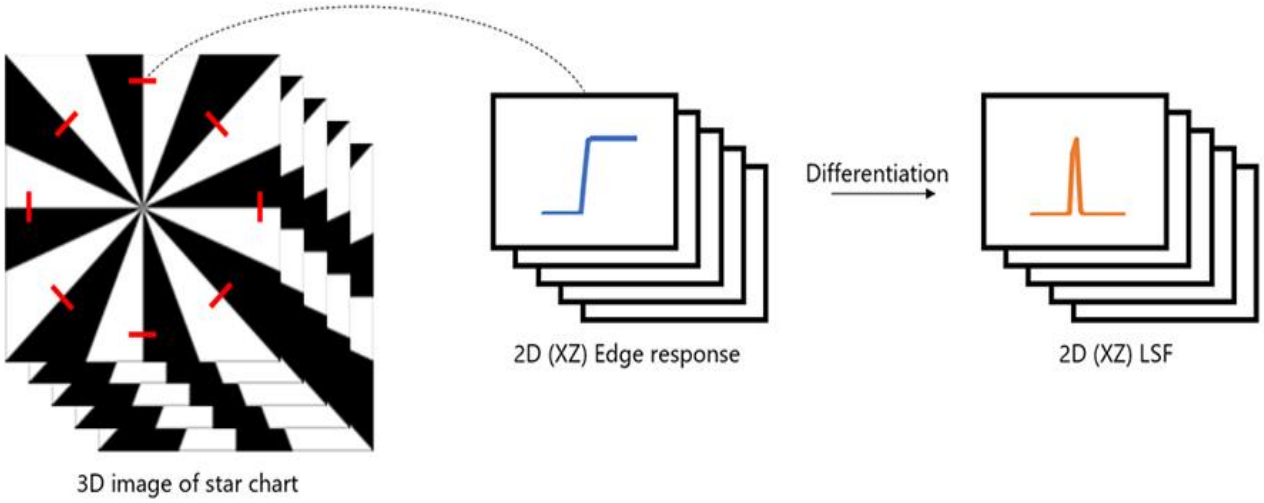


图7：3D LSF提取方法示意图。在XZ方向上提取8个LSF。

显微镜性能监视器自动执行所有其他任务，但需要手动干预的任务除外，如设置物镜、对焦和边缘图案居中。

我们采用三种特殊方法实现3D LSF高精度测量。首先，我们特意将针孔设置为2 AU，这样即使在散焦时也能检测到更多的反射光强度。其次，与典型的星图相比，我们使用的标本只有8对明暗条纹，这样可以防止在散焦过程中相邻条纹对反射光的干扰。第三，我们将边缘图案做得非常薄，这样就能获得接近理论值的边缘响应。这些方法使3D LSF测量更加准确可靠。

点扩散函数（PSF）通常用于评估成像性能，其可以用于显示单点在图像上的表现，并能捕捉成像性能的各向异性退化。然而，LSF显示的是线的成像过程，可能会忽略某些方向上成像性能的下降。

在上述方法中，3D LSF从八个方向获取，提供的信息几乎等同于三维PSF（3D PSF）。图8显示了当存在慧差（发生在物镜倾斜以及样本盖玻片或载物台相对于物镜倾斜时）时，3D PSF和2D LSF在八个方向上的模拟结果。

3D PSF呈香蕉状，2D LSF也呈类似的香蕉状。然而，在某些方向上，各向异性像差——如彗差——不会被2D LSF捕获，因此可能看似不存在像差。通过获取8个方向的2D LSF，可以捕捉各向异性信息及3D PSF。

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

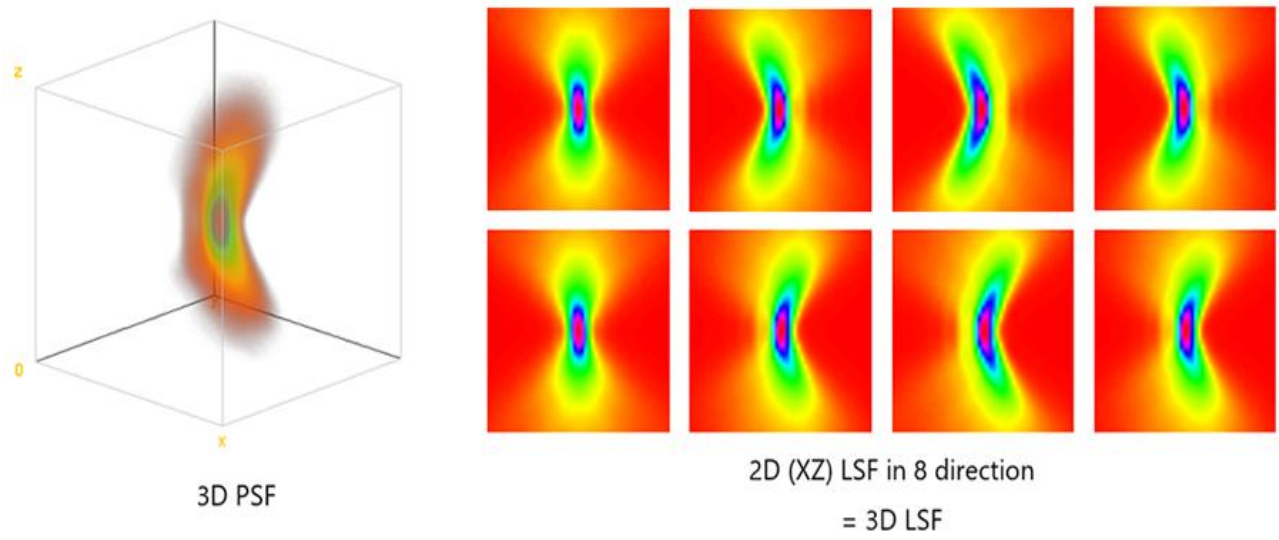


图8. 通过模拟获得的3D PSF和3D LSF对比图。

为了定量验证8个方向上的LSF是否与PSF处于同一水平，我们计算了PSF的斯特列尔比和LSF的ZNCC，同时改变了彗差和球差的大小。斯特列尔比是一个表示聚光强度的定量值，表示为当使用无像差光学系统获得的理想PSF中心强度为100%时，实际光学系统PSF所对应的中心强度比值。 众所周知，斯特列尔比与波前像差高度相关，而波前像差是物镜质量控制的一个指标。

如前所述，彗差是使用显微镜时产生的像差之一，球差是另一种像差。球差可能是由于物镜校正环调整不当、使用了错误的浸泡介质或液体意外附着在物镜或样品表面造成的。下图显示了这些像差所产生的影响；ZNCC值是8个方向计算结果的平均值。还提供了PSF半峰全宽（FWHM）与斯特列尔比的对比参考图。斯特列尔比和FWHM是PSF的两个量化指标。

图9中的图形显示，PSF斯特列尔比与LSF的ZNCC之间存在高度相关性，线性回归的决定系数R2高达0.959。这表明3D LSF的ZNCC可以替代3D PSF的斯特列尔比。另一方面，由于FWHM与斯特列尔比之间存在相关性，因此应谨慎设置统一阈值。例如，如果测得的FWHM为340 nm，可认为成像性能没有问题，因为其接近320 nm的理论值，但可能会出现由于球差导致斯特列尔比降低到65%的情况。不过，根据3D LSF计算出的ZNCC可用来确定图像形成性能，其精度高于PSF的FWHM。

直接测量另一个指标——斯特列尔比，需要从显微镜上安装单独的波前像差测量设备，因此用户很难直接测量该指标。相反，用户可以使用ZNCC来确定成像性能。

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

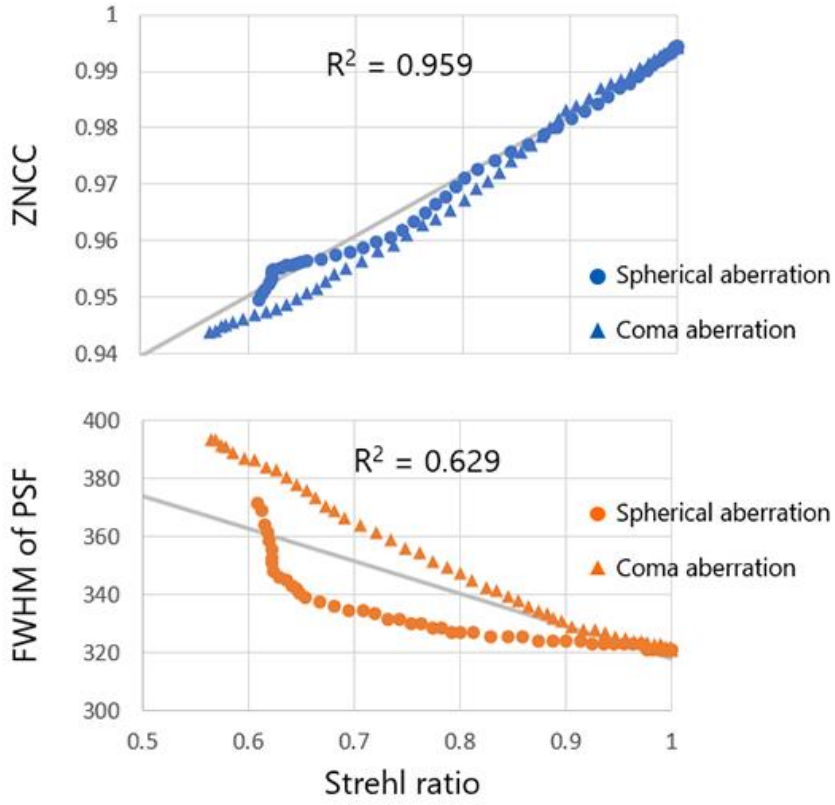


图9. 根据3D PSF计算出的斯特列尔比与根据3D LSF计算出的ZNCC（上图）以及根据3D PSF计算出的FVHM（下图）三者之间的关系。

当斯特列尔比下降至小于80%时，需要对成像性能进行维护。80%的斯特列尔比通常被称为衍射极限，而斯特列尔比低于80%的物镜在性能上无法满足要求。我们建议用户每次启动FV4000系统时都进行一次成像性能检查。建议在更换用户的情况下，或使用24小时后，重新运行此检查。

显微镜性能监视器应用

图10显示了荧光定量实验中对照样本的定量评估结果。 对照样本因实验而异，但在本例中，其被定义为用于校准荧光强度标准的样本。这里，第二次实验是在第一次实验一个月后进行的。第一次实验是在荧光观测条件确定后进行的，第二次实验是在仪器开启后立即进行的。

虽然含有激光的共聚焦显微镜需要根据制造商的规定进行预热，但为了清楚地显示效果，还是在开机后立即进行了实验。图10比较了使用和未使用显微镜性能监视器时第一个和第二个对照样本的荧光强度。

结果表明，如果不使用显微镜性能监视器进行校正，仪器启动后立即会出现性能不稳定和数据波动较大的情况。另一方面，在进行性能校正时，即使实验跨越了几天，荧光定量的准确性也很高。

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

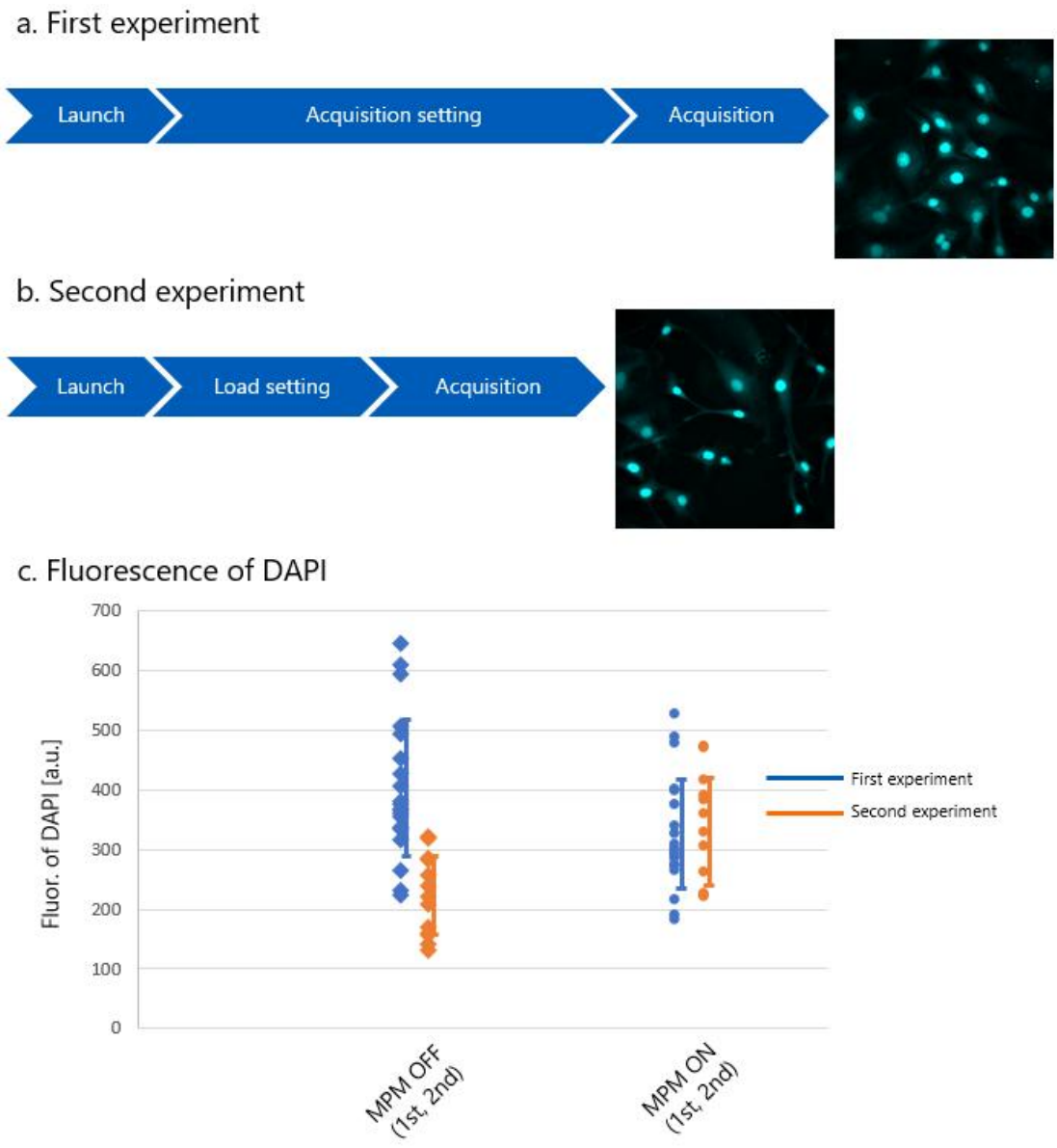


图10. 两天实验中对照样本荧光强度的变化。

总结

显微镜性能监视器可为FV4000激光扫描共聚焦显微镜提供半自动维护功能。这不仅能提高维护工作的效率，而且无需对其他用户进行维护培训。此外，该系统还能使管理人员无需花费时间进行故障排除，并提供清晰的数据。这样，管理人员在与制造商沟通时，能更容易且准确地说明显微镜系统存在的问题，从而有助于尽可能减少停机时间。显微镜性能监视器提供的数据还能帮助用户了解设备预热、物镜校正环调整和物镜发射激光功率波动的重要性。

对于在实验中使用共聚焦激光扫描显微镜系统的研究人员而言，事先监控与荧光强度波动有关的显微镜性能可以大大降低荧光定量的差异性，从而获得可靠稳定的图像和定量数据。显微镜性能监视器的半自动测量功能能够确保不熟悉显微镜操作的初级用户也能轻松完成这些测量。此外，如果实验结果出乎意料，还能用其帮助确定问题出在显微镜还是样本上。

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

我们认为，对研究人员而言，提高个人用户实验的可重复性以及研究论文的可重复性均非常重要。为此，EVIDENT将继续努力提高显微镜性能测量数据的可追溯性。

*本内容基于日本理化学研究所CBS-EVIDENT开放式协作中心（BOCC）的技术开发，目前正在申请专利。

作者

Yasuo Yonemaru

Advanced Technology, R&D, Evident Corporation

---

1 G. Nelson, et al. "QUAREP-LiMi：A community-driven initiative to establish guidelines for quality assessment and reproducibility for instruments and images in light microscopy", Journal of Microscopy, vol. 284 (1), 56-73, (2021).

2 U. Boehm, et al. "QUAREP-LiMi： A Community Endeavor to Advance Quality Assessment and Reproducibility in Light Microscopy." Nature Methods, vol. 18, 1423-1426. (2021).

3 H. K. Jambor. "A Community-Driven Approach to Enhancing the Quality and Interpretability of Microscopy Images." Journal of Cell Science vol. 136 (24), jcs261837, (2023).

5 ISO 21073-2019 "Optical data of fluorescence confocal microscopes for biological imaging"

6 O. Faklaris, et al. "Quality Assessment in Light Microscopy for Routine Use through Simple Tools and Robust Metrics." Journal of Cell Biology, vol 221 (11), e202107093, (2022).

7 Lewis, J. P. "Fast Normalized Cross-Correlation." Industrial Light & Magic, 1995.

相关产品



激光扫描共焦显微镜

FV4000

- 改变了游戏规则的大动态范围，实现从宏观尺度到亚细胞结构的成像
- 采用TruSpectral技术可扩展多达6个通道的同步多色成像能力
- 重新设计的高速、高分辨率扫描单元，可进行固定细胞和活细胞的高效成像
- 凭借出色的近红外（NIR）功能和高品质光学器件，提供优异的成像深度和灵敏度
- 可靠、可重复的SilVIR探测器让研究者安枕无忧
- 业界出色的*10条激光谱线，提供从405 nm到785 nm的更广光谱范围

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

*截至2023年10月。

学习更多内容 ▸ https://www.olympus-lifescience.com/laser-scanning/fv4000/

EVIDENT

lifescience.evidentscientific.com.cn

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

Evident Corporation is certified to ISO 9001, and ISO 14001.

All specifications are subject to change without notice. All brands are trademarks or registered trademarks of their respective owners and third party entities. Evident and the Evident logo are trademarks of Evident Corporation or its subsidiaries.

联系我们

lifescience.evidentscientific.com.cn/contact-us