

将硅油浸没物镜配合共聚焦激光扫描显微镜用于透明化标本的深层组织观察

使用让标本透明的透明化技术进行深层组织观察

有关“Scale”（一种让生物标本透明的透明化技术）使用的最早研究发表于2011年8月的《自然神经科学》期刊上。^{*}从那时起，已经开发出诸如SeeDB、Clarity、ScaleS和Clear See等各种让样本透明的技术。这些技术配合双光子显微镜使用，可观察深度达8 mm的组织内部。由于目前只有少数研究机构可以使用双光子显微镜，因此便开发出了，普遍的激光共聚焦显微镜观察透明化标本的新方法。

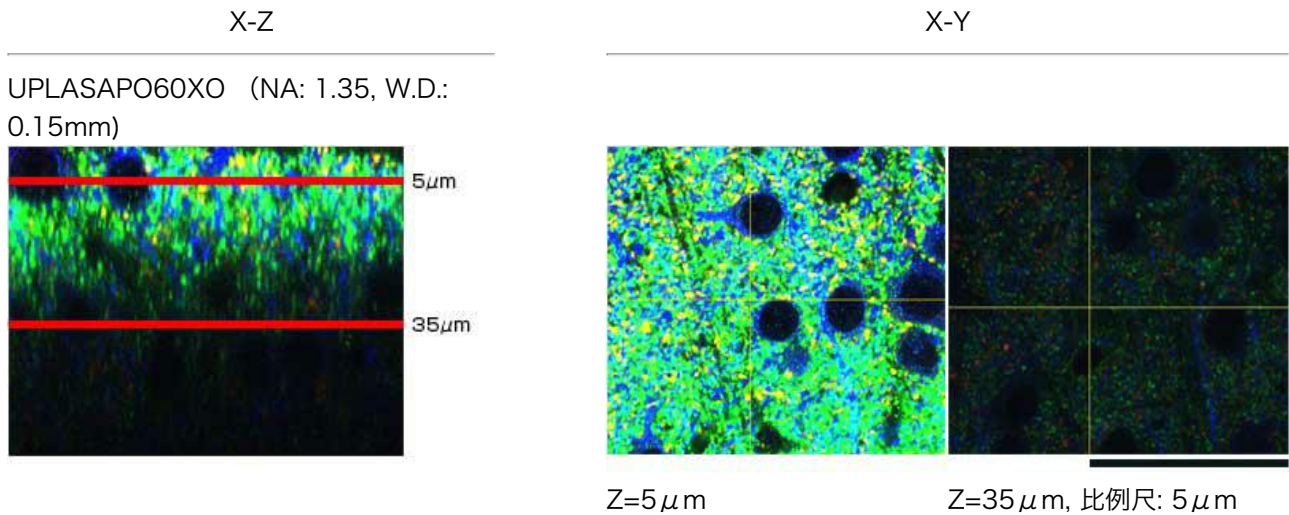
使用激光共聚焦显微镜对透明化标本进行深层组织观察时，物镜选择非常重要。观察这些样品时，奥林巴斯硅油浸没式物镜系列具有出色的性能。在本应用指南中，我们讨论了使用FLUOVIEW[®]系列共聚焦激光扫描显微镜和硅油浸没物镜对透明化标本的深层组织进行高分辨率观察的两个示例。

^{*}Hama, Hiroshi, Hiroshi Kurokawa, Hiroyuki Kawano, Ryoko Ando, Tomomi Shimogori, Hisayori Noda, Kiyoko Fukami, Asako Sakaue-Sawano, 和Atsushi Miyawaki. “Scale：用于透明化小鼠大脑荧光成像和三维重建的化学方法。”自然神经科学14, 第11期（2011）：1481-1488.

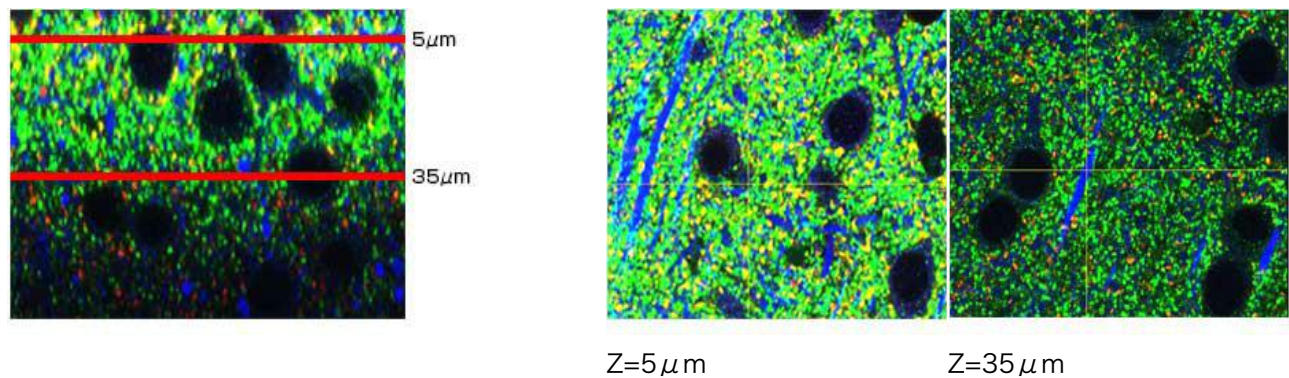
使用SCALEVIEW-A2进行透明化小鼠大脑切片的深层组织观察

SCALEVIEW[®]-A2是奥林巴斯用于让生物标本透明的产品。SCALEVIEW-A2可消除光散射，且不会降低福尔马林固定生物标本的光吸收或荧光。将哺乳动物的脑标本浸没在SCALEVIEW-A2溶液中会让其变得透明。无需脑标本切片即可观察到从表面到组织深处标记荧光蛋白的结构。

我们使用FLUOVIEW系列共聚焦激光扫描显微镜，对使用SCALEVIEW-A2渲染透明的小鼠大脑切片进行了成像。使用60X油浸物镜拍摄的图像与60X硅油浸物镜UPLSAPO60XS2拍摄的图像进行比较。



UPLASAPO60XS2 (NA: 1.30, W.D.: 0.30mm)



使用60X油浸物镜和60X硅油浸物镜，拍摄并渲染透明的小鼠大脑的新皮层切片，进行深层组织图像比较。
(荧光抗体染色：VGluT1 (绿色) / VGluT2 (红色) / MAP2 (蓝色))

使用常规油浸物镜和硅油浸物镜拍摄的小鼠新皮层XY图像。当使用两组物镜获得明亮荧光图像时，在使用硅油浸物镜成像时，深度为35µm的XY图像明显更亮并且具有更高的分辨率。

在35µm处拍摄图像之间的亮度差异是由于油浸透镜球差所致，其原因是物镜所使用的油种类 ($n_e \leq 1.52$) 和透明化溶液SCALEVIEW-A2 ($n_e \leq 1.38$) 之间折射率差引起的。

由于硅油的折射率 ($n_e \approx 1.40$) 更接近SCALEVIEW-A2的折射率, 从而减少了因折射率不匹配而引起的球差, 因此硅油浸没物镜的性能更好。这让用户可以捕捉到更明亮的图像。

此外, 硅油浸没物镜比水浸物镜具有更高的数值孔径 (NA), 因此与使用水浸物镜相比, 研究人员可以获得更清晰的内部组织和更高分辨率的图像。

在使用SCALEVIEW-A2制成透明标本上进行深层组织观察时, 较高的数值孔径和减少折射率不匹配度, 让硅油浸没物镜具有出色的性能。

成像系统

显微镜: 奥林巴斯FV1200共聚焦激光扫描显微镜

物镜: UPLSAPO60XS2 (60X, NA: 1.30, W.D.: 0.3毫米)

图像数据由Motokazu Uchigashima医学博士, MDahiko Watanabe博士提供。

北海道大学医学研究生院解剖学系

[利用硅油浸没物镜对使用ScaleU2透明化试剂的整个胎盘进行深层组织观察](#)

在Development杂志上发表的一项实验中, 研究人员使用ScaleU2试剂、40X硅油浸没物镜UPLSAPO40XS和FLUOVIEW激光扫描显微镜对透明化标本进行了深层组织观察。**

在实验中, 使用ScaleU2将表达基于荧光泛素化细胞周期指示剂 (Fucci) 的TG小鼠胎盘 (E10.5) 透明化, 并用琼脂糖凝胶固定。使用40X硅油浸没物镜和倒置共聚焦激光扫描显微镜观察胎盘内的细胞。ScaleU2的使用让研究人员无需准备组织切片即可对胎盘内形态完整的细胞进行高分辨率观察。此外, 由于硅油浸没物镜设计具有较低的色差, 因此可以精确观察Fucci (S / G2 / M-绿色, G1-红色) 和核 (DAPI-蓝色) 的共定位。

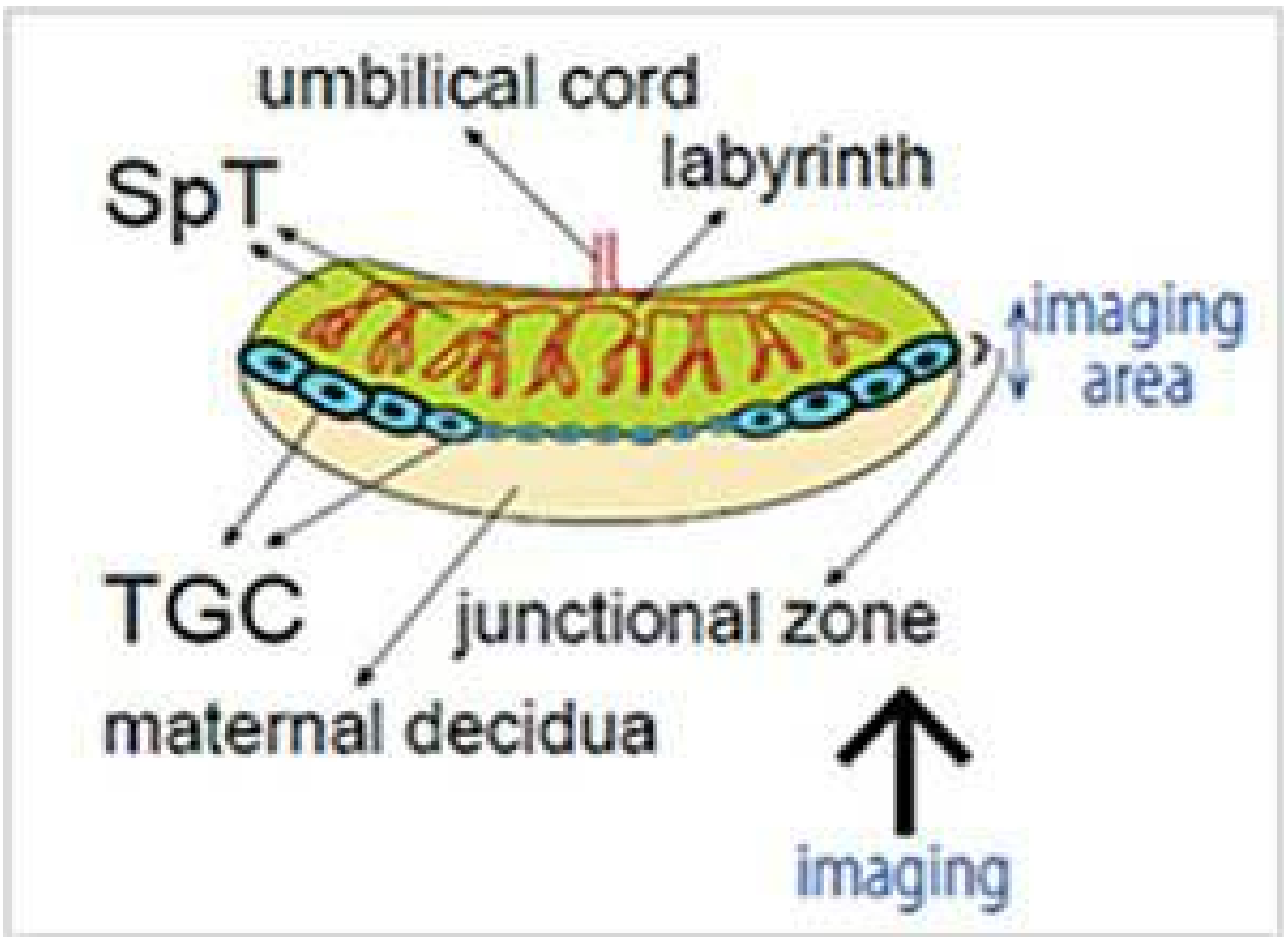


图1：观察完整小鼠胎盘（E10.5）中的细胞-轮廓图。

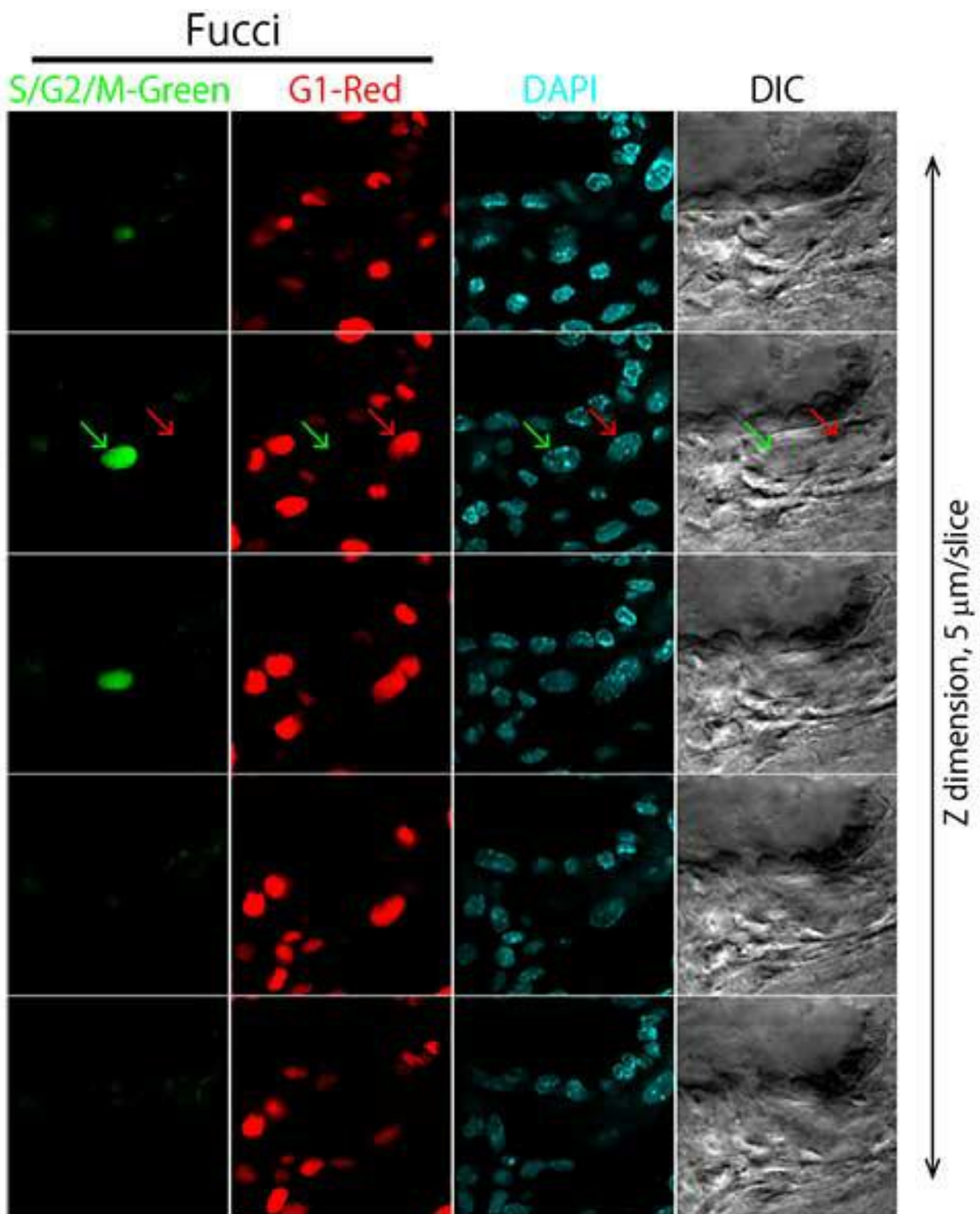


图2：观察完整小鼠胎盘（E10.5）中的细胞-断层扫描。

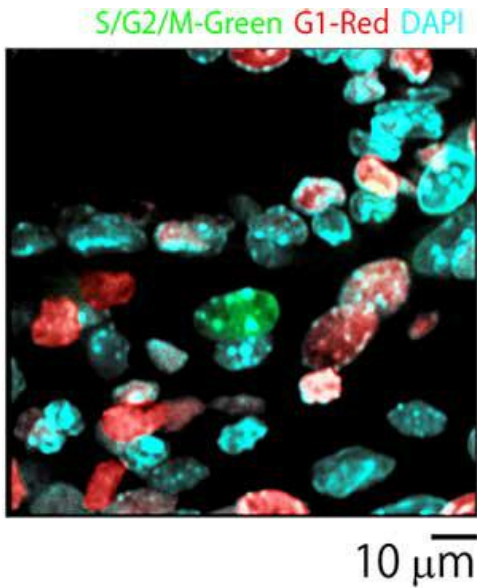


图3：胎盘细胞的合并图像。

成像系统

显微镜：奥林巴斯FV1000共聚焦激光扫描显微镜

物镜：UPLSAPO40XS (40X, NA : 1.25, W.D. : 0.3 mm)

二极管激光器：405 nm, 473 nm, 559 nm

图像数据由Asako Sakaue-Sawano博士, Atsushi Miyawaki医学博士提供

RIKEN脑科学研究所细胞功能动力学实验室

参考文献

**Sakaue-Sawano, Asako, Tetsushi Hoshida, Masahiro Yo, Reiko Takahashi, Kenji Ohtawa, Takashi Arai, Eiki Takahashi, Shinichi Noda, Hiroyuki Miyoshi, 和Atsushi Miyawaki. “使用泛素振荡器将哺乳动物发育性编程内复制可视化。”Development 140, 第22期 (2013) : 4624-4632.

结论

奥林巴斯硅油浸没物镜具有较高的数值孔径和长工作距离。由于硅油折射率 ($n_{\text{e}} \approx 1.40$) 接近活组织的折射率 ($n_{\text{e}} \approx 1.38$)，因此对较厚活组织进行高分辨率成像可以降低由折射率不匹配引起的球差。此外，由于硅油不会变干，用户无需在实验过程中额外添加硅油。硅油浸没物镜可与IX-ZDC Z漂移补偿器兼容，能够在始终保持聚焦的同时实现长期、稳定、高分辨率的3D成像。

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SiVIR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

*截至2023年10月。

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

"平场超级复消色差硅油物镜 / 平场超级复消色差水镜"



UPLSAPO-S/UPLSAPO-W

这些超级复消色差物镜提供球面像差和色差补偿以及从可见光到近红外区域的高透过率。它们使用硅酮油或水浸介质，其折射率与活细胞的折射率很接近，可在活组织深处实现高分辨率成像。

- 补偿球面像差和色差，并且从可见光到近红外区域具有高透过率
- 硅酮油或水浸介质有助于在活组织深处实现高分辨率成像和减少球面像差，因为它们的折射率与活细胞折射率相近

学习更多内容 ▶ <https://www.olympus-lifescience.com/objectives/uplsapo/>