



“X-Positioner 光电联用”在生物领域中的应用

双束电镜系统 (FIB-SEM) 是一个集 FIB 加工、SEM 成像、EDS/EBSD 分析等多样化功能于一体的综合微纳加工分析平台，对于生物样品同样具有十分广泛的应用价值。对于可直接使用双束电镜观察和分析的生物样品 (如植物种子、动物壳甲等)、经过脱水干燥处理的标本样品 (如银染标本、免疫组化标本、直接或间接荧光染色标本等) 或包埋样品等 (如琼脂或树脂包埋样品等)，都可以在光学显微观察分析的基础上，再利用电子显微镜进行进一步的高分辨精确定位和观察分析。

TESCAN “X-Positioner 光电联用”功能，支持用手机、相机、明视野显微镜、微分干涉相差显微镜、荧光显微镜、超高分辨光学显微镜、激光共聚焦显微镜等多种**光学成像设备采集得到的图像与双束电镜系统 SEM、FIB 图像的关联和叠加**，实现亚显微水平的**精确定位和动态导航**，从而进行更加精确的观察和分析。对于表面缺乏形貌或成分特征，难以用 SEM、FIB 成像定位的样品，光电联用功能显得尤为重要。

应用案例一：

例如，对于预先用荧光染料标记的细胞包埋样品，想要观察其**特定荧光标记区域的细胞或结构**。但在扫描电镜下观察时，由于生成的是灰度图像，无法辨别荧光标记区域，因而无法找到特定的细胞或结构。

但若先对样品进行激光共聚焦显微镜拍照，找到并获得特定细胞或结构所在区域的位置信息



荧光图片，再根据样品表面的标记方格、自然缺刻等形貌特征，利用 X-Positioner 光电联用功能将所得**荧光照片与双束系统 SEM 图像进行关联叠加**（图 1），便能够非常容易地找到并定位至感兴趣的细胞或结构（图 2），并可与**双束系统 FIB 图像关联**，进一步进行 FIB 切割加工和多方面的观察分析（图 3-4）。

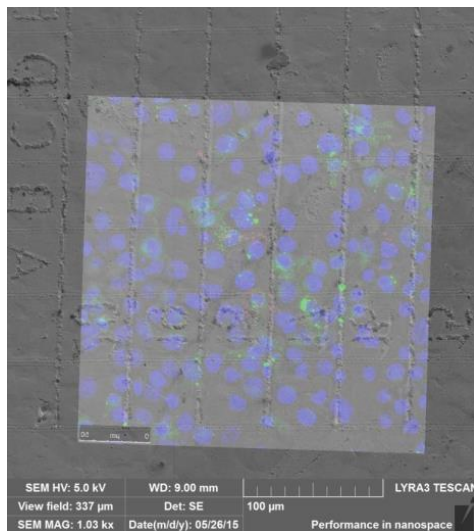


图 1：激光共聚焦显微照片与 SEM 图像关联叠加

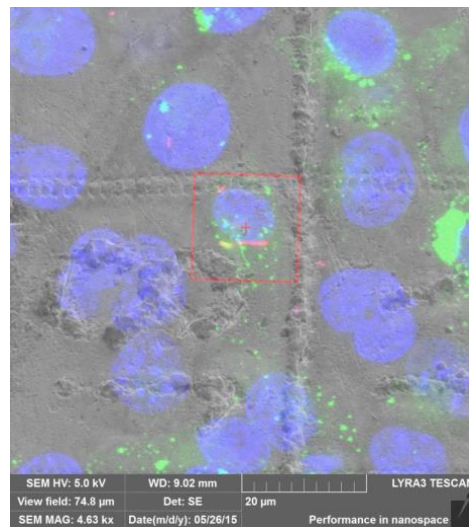


图 2：双束系统中精确定位待分析细胞或结构

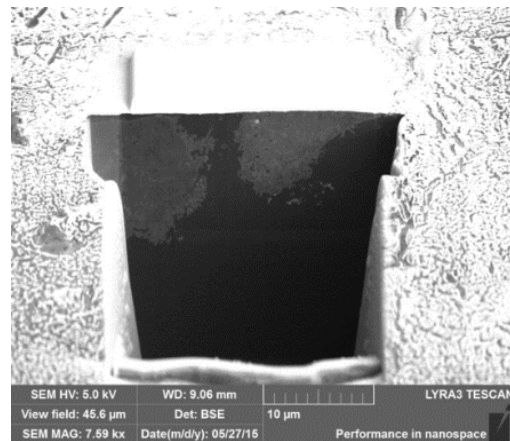
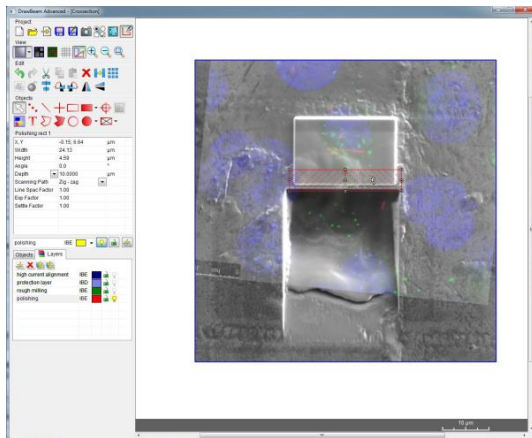


图 4：对加工后的细胞或结构进一步观察分析



图 3: 对细胞或结构进行 FIB 切割加工

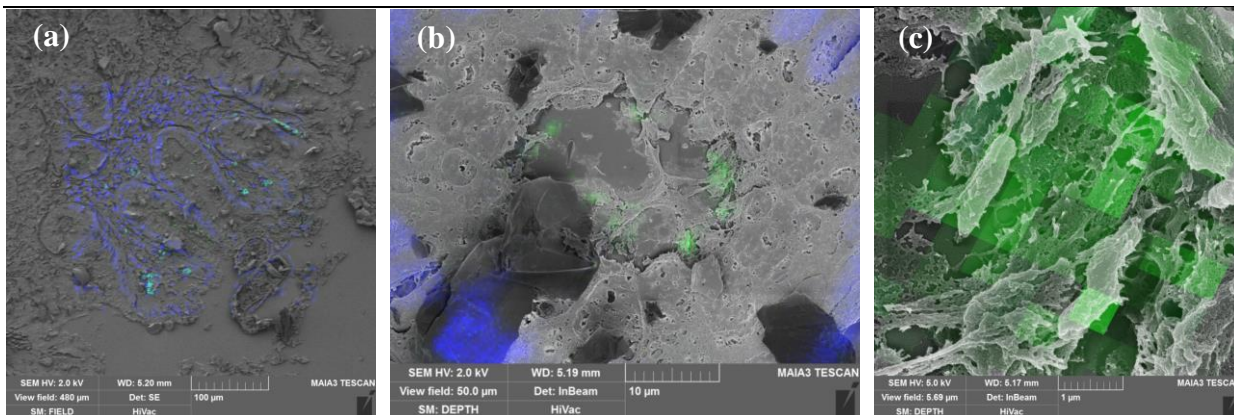
应用案例二:

对于较小的细胞或结构（如细菌、细胞器等），X-Positioner 光电联用功能也支持**逐级增加电镜的放大倍数，多次进行光电图像的关联叠加，逐步校正定位**至感兴趣的目标结构或区域。

例如：经双色荧光染色的感染幽门螺旋杆菌的动物胃黏膜样品，想要找到样品中含有幽门螺旋杆菌的位置并对其进行观察和分析。但螺旋杆菌**非常微小且在样品中分布稀疏**，还常常**被包裹在胃组织黏液中**，若直接在电子显微镜中去观察寻找，十分困难，工作量巨大。

TESCAN “X-Positioner 光电联用” 功能为解决上述问题提供了很好的解决方案。在扫描电镜样品制备前，先对样品进行 DAPI（蓝色）+ Alexa488（绿色）双荧光染色，这样 DAPI 将只标记动物胃黏膜组织细胞，而 Alexa488 则特异性地结合标记幽门螺旋杆菌。然后用激光共聚焦显微镜采集一定区域的荧光显微照片，便可知道蓝色荧光区域为动物组织细胞，而绿色荧光区域分布有幽门螺旋杆菌。

在 X-Positioner 软件模板中，可初步根据小倍数光学激光共聚焦显微镜照片和较大视野的 SEM 照片关联叠加，初步定位至绿色荧光区域（图 5a）；然后进一步增加放大倍数，将放大的光学显微照片与局部放大的 SEM 图像再次关联叠加（图 5b），并对关联位置进行精细校正，精确定位至幽门螺旋杆菌所在区域，进行进一步的观察和分析（图 5c）。



组图 5: 多倍数逐次光电联用实例。(a)双色荧光图像与大视野的 SEM 图像初步关联, 定位至绿色荧光区域;
(b) 增加放大倍数再次关联叠加, 精细定位; (c) 准确定位幽门螺旋杆菌所在区域, 进一步观察分析;