

JB

中华人民共和国机械行业标准

JB/T XXXXX—XXXX

激光扫描共聚焦显微镜

Laser Scanning Confocal Microscope

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中华人民共和国工业和信息化部 发布

目 次

前 言	II
引 言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 分类及基本参数	2
4.1 分类	2
4.2 基本参数	2
5 技术要求	2
5.1 显微镜主机	3
5.2 激光光源	3
5.3 扫描成像系统	3
6 试验方法	3
6.1 试验条件	3
6.2 显微镜主机	3
6.3 激光光源	3
6.4 扫描成像系统	4
7 检验规则	7
7.1 检验分类	7
7.2 出厂检验（即交货检验）	7
7.3 型式检验	7
8 标志、包装、运输及贮存	7
8.1 标志	7
8.2 包装	7
8.3 运输	7
8.4 贮存	7

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国机械工业联合会提出。

本文件由全国光学和光子学标准化技术委员会（SAC/TC103）归口。

本文件起草单位：宁波永新光学股份有限公司，麦克奥迪实业集团有限公司，上海千欣仪器有限公司，上海理工大学、微仪光电（浙江）有限公司、浙江水晶光电科技股份有限公司、南京东利来光电实业有限责任公司、宁波舜宇仪器有限公司、广州市明美光电技术有限公司、杭州海康威视数字技术股份有限公司、南京木木西里科技有限公司、梧州奥卡光学仪器有限公司、杭州玉之泉精密仪器有限公司、上海光学仪器研究所、南京江南永新光学有限公司。

本文件主要起草人：崔志英、陈木旺、华越、张薇、张昌、吴鹏、洪宜萍、王春梅、张春旺、杨扬、崔远驰、张韬、匡翠方、冯琼辉、姚晨、陈友华、任根华、邢燧、王泽霖。

引 言

激光扫描共聚焦显微镜基于针孔滤波技术能有效滤除非焦平面的杂散光,提高荧光显微镜的成像信噪比和分辨率,主要用于研究组织、细胞、亚细胞结构的形态和生物动态变化过程,在生物学、医学等领域具有广泛的应用。随着科学技术进步和社会经济的发展,激光扫描共聚焦显微镜的应用需求日益扩大,其应用范围和产品产量也逐步增长,产业已形成规模。

随着当前国内外共聚焦成像技术高速发展,激光扫描共聚焦显微镜已成为生物学、医学等前沿科研领域必不可少的工具,其制造技术及使用性能得到了不断提升。然而,当前我国共聚焦显微镜领域尚无统一的通用产品类行业标准,对于该类产品的测试方法空白,各设备制造商只能按照自己的测量方法进行测量,缺乏客观性和统一性。因此,迫切需要制定激光扫描共聚焦显微镜的行业标准,用来规范术语、分类及基本参数、技术要求、试验方法、检验规则、包装运输等内容,推动共聚焦显微技术的规范,为产业高质量发展提供坚实支撑,促进行业的创新和发展。

鉴于上述原因,为了提高激光扫描共聚焦显微镜行业生产、制造、检测的规范性、科学性和先进性,构筑生产者与用户间的质量与技术交流,需要制定激光扫描共聚焦显微镜的行业标准。

激光扫描共聚焦显微镜

1 范围

本文件规定了用于荧光生物标本成像的激光扫描共聚焦显微镜中的术语和定义、分类及基本参数、技术要求、试验方法、检验规则、标志、包装、运输及贮存。

本文件仅适用于使用单光子激发的激光扫描共聚焦显微镜。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 2985—×××× 生物显微镜

GB/T 13384 机电产品包装通用技术条件

GB/T 25480—2010 仪器仪表运输、贮存基本环境条件及试验方法

GB/T 27668 显微镜 光学显微术术语

ISO 21073 Microscopes - Confocal microscopes - Optical data of fluorescence confocal microscopes for biological imaging

3 术语和定义

GB/T 27668和ISO 21073界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

激光扫描共聚焦显微镜 laser-scanning confocal microscope

基于共聚焦显微术，采用激光扫描技术形成图像的显微镜。

3.2

激发波长 excitation wavelength

激发荧光分子如荧光抗体或荧光蛋白在发射波长处发光所需的特定光的波长。

3.3

检测波段 detection wavelength band

光电探测器收集光的特定波长范围。

3.4

艾里斑单位 Airy unit

AU

在低数值孔径近似模型下，检测点扩散函数（PSF）理论第一极小值的直径，按公式（1）计算艾里斑单位：

$$AU = 1.22 \frac{\lambda_{\text{ref}}}{NA} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

AU——艾里斑单位，单位为纳米（nm）；

NA——数值孔径；

λ_{ref} ——参考波长，单位为纳米（nm）。

3.5

像素 pixel

分配属性的数字图像中最小的单元。

3.6

像素尺寸 pixel size

在物体空间中测量的，从一个像素中心到相邻像素中心的最短距离。

3.7

共聚焦图像点扩散函数 **confocal point spread function**

cPSF

照明和探测光学系统的强度点扩散函数的乘积。

3.8

坐标系 coordinate system

右手笛卡尔坐标系，以光轴为 z 轴， x - y 平面垂直于 z 轴

注： x 和 y 坐标称为横向坐标，而 z 坐标称为轴向坐标。

3.9

分辨率 resolution

在物体场中心测量的cPSF的半高全宽值，以FWHM表示。

3.10

横向分辨率 lateral resolution

荧光点状物体中心沿横向方向的强度信号的半高全宽值，以FWHM表示。

3.11

针孔 pinhole

位于探测器前方的微小圆形光阑，通过共轭焦点原理选择性透过焦平面信号并阻挡非焦平面杂散光。

4 分类及基本参数

4.1 分类

激光扫描共聚焦显微镜（以下简称仪器）的分类如下：

- a) 基础应用型仪器；
- b) 高端实验型仪器。

4.2 基本参数

仪器的基本参数应符合 GB/T 2985—××××中第4章关于研究用显微镜的规定，并应符合表1的规定。

表 1 基本参数与规格

项目		基础应用型仪器	高端实验型仪器
共聚焦扫描头	扫描视场	$\geq \Phi 18\text{mm}$	$\geq \Phi 22\text{mm}$
	扫描速度	$\geq 1\text{FPS}@512 \times 512$	$\geq 24\text{FPS}@512 \times 512$
	针孔	尺寸至少在 $0.4U \sim 5.0U$ 之间多档调节或连续可调	
激光光源	激发波长	不限定， ≥ 3 色	405nm, 488nm, 561nm, 640nm 等， ≥ 4 色
探测器	荧光通道数量	≥ 1 个	≥ 4 个
	DIC通道	不限定	1 个
	检测波段	≥ 3 个	≥ 4 个或连续光谱
软件功能		图像采集	图像采集、图像分析
必须具备的选购模块		—	光谱探测模块、超分辨成像模块、荧光漂白恢复模块、荧光共振能量转移模块等
其它附件		活细胞工作站、光学防震平台	

5 技术要求

5.1 显微镜主机

应符合GB/T 2985-××××中第5章的规定。

5.2 激光光源

5.2.1 光纤出口功率应不小于 10mW。

5.2.2 激光光源应按制造商规定预热，预热完成后，激光光源在 5min 内的照射功率的短期稳定性（ $STAB_{short}$ ）和在 8h 内照射功率的长期稳定性（ $STAB_{long}$ ）应不超过±2%。

5.3 扫描成像系统

5.3.1 目镜观察与共聚焦观察的图像同步：目镜观察清晰像与共聚焦扫描清晰像应同步，即目视调焦清晰时，在 10×物镜下，切换共聚焦扫描成像清晰的物方调焦量应不超过±0.05mm。

5.3.2 扫描成像最大直径：基础应用型仪器应不小于 18mm，高端实验型仪器应不小于 22mm。

5.3.3 扫描成像均匀性：仪器扫描成像均匀范围应不小于 75%，光斑中心位置精度应不大于 15%。

5.3.4 目镜视场应与共聚焦视场内的图像中心点同步：目镜视场内应与共聚焦扫描成像视场的图像中心点一致，10×物镜下 XY 方向最大中心偏移量应不大于 0.05mm。

5.3.5 目镜观察与共聚焦观察的图像方位基本一致：用目镜观察到的图像与共聚焦扫描成像观察到的图像的 XY 方向方位应基本一致。

5.3.6 扫描成像分辨率：405nm 激光激发，使用 100×NA1.49 物镜，14U 针孔成像下横向分辨率应不大于 180nm。

5.3.7 扫描成像频率：在 512×512 像素连续扫描分辨率下，基础应用型仪器应不小于 1fps，高端实验型仪器应不小于 24fps。

5.3.8 扫描成像视场：视场内应清洁，亮度均匀，无影响观察的阴影、斑点、条纹及各种反射光斑或闪烁现象。

6 试验方法

6.1 试验条件

- a) 温度：18°C-25°C；
- b) 温度变化量：不大于 0.5°C/h；
- c) 相对湿度：40%-60%；
- d) 实验室内应无影响成像结果的振动、电磁辐射以及强烈环境光等因素；
- e) 激光光源预热时间按制造商的规定，预热完成后进行试验。

6.2 显微镜主机

按GB/T 2985-××××中第6章规定试验。

6.3 激光光源

6.3.1 光纤出口功率

6.3.1.1 试验工具

经过校准的光功率计，光功率计的最小输出功率应不小于10mW。

6.3.1.2 试验程序

将光纤出口和光功率计的检测面进行固定，激光器启动后分别开启每个通道至出光功率最大处，选择光功率计对应的波段检测功率。

试验激光功率时，激光束应保持静止并持续照射功率计传感器。功率计的积分时间应设定在0.2s至1s之间。

分别读取每个激发波长的功率值，取其最大值（ P_{max} ）为光纤出口功率。

6.3.2 光源稳定性

6.3.2.1 试验工具

10×物镜；经过校准的光功率计，光功率计的最小输出功率应不小于10mW。

6.3.2.2 试验程序

将光功率计安装在物镜的端面位置，调整10×物镜位置使光斑大小略微小于光功率计的探测面。

激光束应保持稳定并持续照射光功率计的探测面。光功率计的积分时间应设定在0.2s至1s之间。

激光持续照射功率计探测器，在5min的时间间隔内记录激光功率，且每秒记录一次。按公式（2）计算照射功率的短期稳定性（ $STAB_{short}$ ）。

$$STAB_{short} = \left(1 - \frac{P_{smax} - P_{smin}}{P_{smax} + P_{smin}}\right) \times 100\% \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

P_{smax} ——在5min的时间间隔内记录的最大激光功率值；

P_{smin} ——在5min的时间间隔内记录的最小激光功率值。

激光每30秒照射功率计探测器一次，每次持续1秒，在8h的时间间隔内分别记录每个激发波长的功率，且每秒记录一次。按公式（3）计算光照功率的长期稳定性（ $STAB_{long}$ ）。

$$STAB_{long} = \left(1 - \frac{P_{lmax} - P_{lmin}}{P_{lmax} + P_{lmin}}\right) \times 100\% \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中：

P_{lmax} ——在8h的时间间隔内记录的最大激光功率值；

P_{lmin} ——在8h的时间间隔内记录的最小激光功率值。

6.4 扫描成像系统

6.4.1 目镜观察与共聚焦观察的图像同步

6.4.1.1 试验工具

10×物镜；荧光生物标本片。

6.4.1.2 试验程序

将荧光生物标本片置于被检显微镜的载物台上，以10×物镜和10×目镜对标本片成像，目镜调焦得到清晰图像，记录此时Z轴坐标 Z_1 ，切换至共聚焦观察光路扫描成像，再次调焦使图像清晰，记录此时Z轴坐标 Z_2 ，根据公式（4）计算调焦量。

$$Z_{fc} = Z_2 - Z_1 \quad \dots\dots\dots (4)$$

6.4.2 扫描成像最大直径

6.4.2.1 试验工具

10×物镜；0.1mm网格板。

6.4.2.2 试验程序

在荧光成像或者透射光成像状态下，使用10×物镜并以最大扫描视场，对网格板进行扫描成像。

按公式（5）计算扫描区域最大直径（ $d_{scanfield}$ ）。

$$d_{scanfield} = \frac{S_{object} \times d_{image}}{S_{image}} \quad \dots\dots\dots (5)$$

式中：

S_{object} ——已知的物体实际结构尺寸；

d_{image} ——图像的最大直径；

S_{image} ——物体结构图像的直径；

注1：扫描区域的最大直径与共聚焦扫描光学系统的视场数均针对单幅图像的独立成像范围定义，即在不移动物镜位置、不通过多幅图像拼接生成全景图的前提下，单幅图像所能覆盖的最大有效区域，通常单幅图像都是正方形的，因此扫描区域的最大直径是扫描图像的单边距离的 $\sqrt{2}$ 倍。

注2：扫描区域的实际大小取决于共聚焦扫描光学系统的视场数以及显微镜控制中设置的扫描镜偏转范围（变倍值）。共聚焦激光扫描显微镜制造商对其显微镜控制中的变倍值使用不同的定义。因此，这些变倍值不适合用于比较不同显微镜。

6.4.3 扫描成像均匀性

6.4.3.1 试验工具

10×物镜，荧光标记物溶液或均光板。

6.4.3.2 试验程序

将荧光标记物溶液或均光板置于被检显微镜的载物台上，将10×物镜安装到物镜转换器上，切换至共聚焦光路扫描成像，调焦使图像清晰。均匀性与中心位置精度的测量采用均匀荧光标本（如荧光标记物溶液或均光板）。

针孔直径设置为1AU，测量所需的最小像素区域为128×128像素。确保采集的全部数据均来自样品的均匀荧光区域，以避免因光学系统场曲或样品倾斜等因素导致误判。此外，信号传输路径应保持线性响应，例如荧光团激发和检测器信号不得饱和，且共聚焦显微镜系统的信号传输链路（尤其是电子硬件与软件部分）应满足线性特性要求。

按公式（6）计算亮度均匀性：

$$\text{亮度均匀性} = \frac{\text{像场中的最小亮度}}{\text{像场中的最大亮度}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (6)$$

中心位置精度 CA用图像中亮度最大值的居中程度表示，其值按公式（7）计算：

$$CA = \left(1 - \sqrt{(x_{\max} - x_{\text{centre}})^2 + (y_{\max} - y_{\text{centre}})^2} \times \frac{2}{\sqrt{w^2 + h^2}} \right) \times 100\% \quad \dots\dots\dots (7)$$

式中：

CA——中心位置精度；

$\{x_{\max}, y_{\max}\}$ ——亮度最大值的像素点坐标；

$\{x_{\text{centre}}, y_{\text{centre}}\}$ ——图像中心的像素点坐标；

w和h——分别为图像的宽度和高度。

注：相较于固体样品，标记物溶液通常更具优势，因图像区域内漂白的荧光分子可通过扩散被未漂白的荧光分子取代。

6.4.4 目镜视场与共聚焦视场内的图像中心点同步

6.4.4.1 试验工具

10×物镜；0.1mm 网格板；10×十字分划目镜（其视场数为18或22mm，分格值为0.1mm，任意两分划线间的极限偏差不大于0.005mm，十字分划中心与目镜外圆机械轴同轴度为Φ0.02mm，十字分划线刻线面与目镜定位面之间距离为10±0.1mm）。

6.4.4.2 试验程序

将0.1mm网格板置于被检显微镜的载物台上，镜筒内装十字分划目镜，先用10×物镜对网格板调焦，使其像面上某一十字线与目镜分划板十字中心重合，然后换共聚焦成像系统成清晰像，通过显示屏读取目镜分划板中心相对显示屏中心的X、Y方向偏移量。

6.4.5 目镜观察与共聚焦观察的图像方位基本一致

6.4.5.1 试验工具

同6.4.4.1。

6.4.5.2 试验程序

将0.1mm 网格板置于被检显微镜的载物台上，镜筒内装十字分划目镜，先用10×物镜对网格板调焦，使其像面上某一十字线与目镜分划板十字中心重合，并使其横线处于水平位置，然后换共聚焦成像系统成清晰像观察，网格板的横线与显示屏的水平边框的横向应基本平行。

6.4.6 扫描成像分辨率

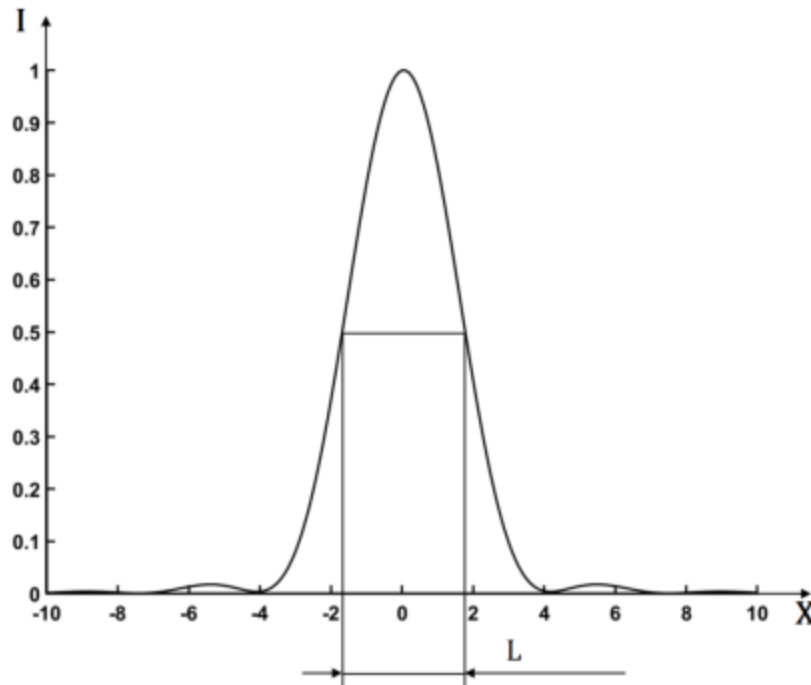
6.4.6.1 试验工具

100×NA1.49浸油物镜；100nm荧光颗粒（如100nm荧光微球，微球尺寸误差≤10%）。

6.4.6.2 试验程序

将100nm荧光颗粒样本置于被检显微镜的载物台上，将60×物镜安装到物镜转换器上，切换至共聚焦光路，选择405nm激光、选择合适的点曝光时间（如4μs）、512×512像素分辨率、1倍放大倍率，使用100×物镜对100nm荧光颗粒样本成像，调焦至成像清晰，选择合适的放大倍率（如25倍），保证单个像素尺寸至少满足3倍采样率（即pixel size≤33nm）、1024×1024像素分辨率拍摄图像。在软件中打开拍摄的图像，在视野范围内选择一个荧光颗粒，画一条直线经过荧光颗粒的中心，在图像处理软件中，

绘制过荧光颗粒中心直线的点扩散函数强度分布曲线，半高全宽（FWHM）值应通过归一化拟合高斯函数形式，按公式（9）对测量数据进行拟合。拟合后的点扩散函数强度分布曲线如图1所示，按公式（10）计算得到单个荧光颗粒的半高全宽（FWHM），统计不少于10个100nm荧光颗粒，多次重复测量其半高全宽（FWHM），并以平均值作为最终的扫描成像分辨率结果。



标引符号说明:

L——FWHM，半高全宽值；
X——距中心的距离；
I——强度。

图1 共聚焦图像点扩散函数（cPSF）半高全宽值（FWHM）的确定

$$I_x = A \cdot e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{x-x_0}{\sigma} \right)^2} + c \quad \dots\dots\dots (9)$$

$$FWHM = 2 \cdot \sqrt{2 \cdot \ln 2} \sigma \approx 2.35\sigma \quad \dots\dots\dots (10)$$

式中:

I_x ——高斯拟合强度分布函数
A——高斯拟合强度分布函数的幅值
 x_0 ——高斯拟合强度分布函数的峰值中心坐标
 σ ——高斯拟合强度分布函数的标准差
c——高斯拟合强度分布函数的常数项
x——中心距离
FWHM——半高全宽值

注：对于高数值孔径物镜和线性偏振激发光，垂直于偏振方向的FWHM小于偏振方向的FWHM。

6.4.7 扫描成像频率

6.4.7.1 试验程序

扫描成像频率取决于扫描格式（线、帧）。扫描成像频率按公式（11）或（12）计算

$$f_{\text{line}} = \frac{N_{\text{line}}}{t} \quad \dots\dots\dots (11)$$

$$f_{\text{frame}} = \frac{N_{\text{frame}}}{t} \quad \dots\dots\dots (12)$$

式中：

f_{line} ——行扫描频率，单位为赫兹（Hz）；

f_{frame} ——帧扫描频率，单位为赫兹（Hz）；

N_{line} ——行扫描的数量；

N_{frame} ——帧扫描的数量；

t ——获取行、帧所需的时间，包括将扫描设备重新定位到起点所需的时间，单位为秒（s）

扫描成像频率应针对图像采集系统向数据存储系统的连续数据传输进行说明。对 512 像素 × 512 像素的帧大小，给出帧扫描频率 f_{frame} 。

7 检验规则

7.1 检验分类

产品的检验分为出厂检验和型式检验。

7.2 出厂检验（即交货检验）

出厂检验不包括 GB/T 2985—×××× 中 5.4 的内容，所有项目全部检验，检验合格的产品直接接受，发现的不合格品应予以剔除。

7.3 型式检验

7.3.1 型式试验的样品应从检验合格的产品中随机抽取，并对标准中的所有项进行检验。

7.3.2 型式试验周期一般为 1 年，在两次型式试验检验周期内发生下列情况之一，也应进行型式检验。

- a) 产品的结构、材料、工艺有较大的改变，可能影响产品性能；
- b) 出厂检验结果与上次型式检验结果有较大差异；
- c) 产品停产一年再恢复生产。

8 标志、包装、运输及贮存

8.1 标志

每台仪器或包装物应至少包含如下标志：

- 制造厂名或注册商标；
- 产品型号或产品名称；
- 电器参数；
- 产品编号。

8.2 包装

产品包装应符合 GB/T 13384 中的规定。

8.3 运输

应用任何有遮蔽的运输工具运送。

8.4 贮存

应贮存在有遮蔽的场所，周围无酸性气体、碱、有机溶剂及其它有害物质。