Leica STELLARIS 激光共聚焦 FRAP 操作流程

FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching)是已被认定为观察大分子平移扩散过程方面使用最为广泛的一种方法。由此产生的信息可用于确定动力学性质,如扩散系数、流动分数和荧光标记分子的传输速率。FRAP 通常应用于活细胞上荧光信号的扩散,用于研究蛋白质、囊泡和其他运动分子的运输和扩散过程。被广泛应用细胞生物学、生理学、生物化学和神经科学等研究领域。

在这个过程中, 检测被荧光标记相关分子的荧光变化主要分三步:

第一步漂白前成像 Pre-bleach,测量待研究区域漂白前荧光的强度。

第二步漂白 Bleach, 该段的荧光被短激光脉冲局部破坏。这导致在样品中形成一个荧光 大大减弱的区域, 周围的分子再次扩散。

第三步漂白后成像 Post-bleach,测量待研究区域漂白后荧光的强度。荧光分子也随分子流进入漂白区域,通过测量荧光强度曲线确定扩散时间和扩散常数随时间的变化。

1. Overview: 向导, 提供了 FRAP 的说明并解释了每一个步骤所应进行的操作

1) 在左上角下拉选择 FRAP 模块

Open projects Simulator V Acquisition Mode Live Data Mode xyt +

在向导界面的顶部,各工作步骤显示按钮:"Overview" (概述)、"Set Up"(设置)、"Bleach"(漂白)、"Time Course" (时间过程)、"Evaluation"(评估)

Seicu O	FRAP Overview Setup Bleach Time Cour	* 🗅 🔪	> Evaluation	File Help	
Fluorescence Recovery After Photobleaching: Bleach select	ed regions with high laser intensity and observe the recovery of fluorescence		Annotations	N 🔊 î 🖌	<u> </u>
	Setup Adjust hardware parameters for pre- and post-bleach imaging. - Set general settings at a low laser intensity for imaging fluorescence before and after bleaching. - Orange from your to yout, fy you mark to do 40 FRAP experiments. - For two channel experiment: To reduce crosstalk add Seq. 2 to do sequential scan between lines.				+ 30
Step 2	Bleach Tune the laser power for bleaching. Define KOI for bleaching. Start experiment.				
Step 3	Time Course Define the number of pre-bleach, bleach and post-bleach frames. Start the experiment.				
Step 4	Evaluation Evaluate the recovery of fluorescence. Offline Quantification is possible.	•			

<complex-block>

2. Setup,设置成像参数,此处同普通拍照

- 3. Bleach,设置漂白参数,软件界面左侧提供了每一步的操作说明及解释
- 1) 定义需要漂白的 ROI 区域: ROI 区域选择尽量准确,通常一次实验漂白一个 ROI, 若需要多个 ROI,则 ROI 距离不宜太远;
- 2) Zoom In 模式, Set Background to Zero 和 Delete Bleach Images after Scan 为 ON
- 3) 设置漂白的激光及能量:漂白和成像的激光一般相同,如 GFP 成像漂白都用 488nm 激发;能量任意可调,通常以漂净为目的,预实验可 30%起开始尝试。





漂白模式的选择:通常用 Zoom in 模式,功能释义如下:

Fly mode: 漂白并同时采图,适用与快速恢复的样品。 单向扫描(常规扫描):每行扫两次,分别用于漂白和采图; 双向扫描(Bidirectional X):前向激光漂白,返回采集图像。 Bidirectional X: ON 对于极快速动力学,可以应用 Fly Mode。在这种模式下,在扫描头的 x 方向返 回时读取信号,为 FRAP 实验提供了线之间的时间分辨率,而不是帧之间的时间 分辨率。



- Zoom in 放大模式: 仅漂白 ROI 区域,只在光漂白过程中启用。 在绝大多数光漂白应用中推荐使用"Zoom In"模式。然后将光漂白期间的扫描区 域最小化,让更多的光施加到 ROI 上。
- Change Bleach Format: 漂白区域内实际漂白的线数取决于 ROI 区域的大小。在更改漂白格式模式下,根据 ROI 大小减少扫描行数来减少漂白所需的时间。当需要多个漂白帧(例如 10 次或更多)时,您可以使用此选项来加速光漂白。此模式仅在光漂白期间启用,光漂白前和光漂白后的图像采集不受此影响。此选项可以与"Zoom In"结合使用,无法与"Fly mode"结合使用。

注意:切换扫描格式需要一些时间,因此该方法不太适合分析非常快速的扩散过程,其目标是在光漂白后尽快获得第一个漂白后图像。

- > Set Background to Zero: 在漂白过程中背景为零, 即 ROI 以外无光。
- Delete Bleach Images after Scan:通常情况下 ROI 照明非常明亮,次选项可防止不必要的数据积累。
- Use Laser Settings for all ROIs: 所有 ROI 都用相同的激光设置,即使用相同的 激光线和强度。

光活化

也可以使用 FRAP 向导进行光活化操作(例如在使用 PA-GFP 时)。打开 UV (紫外线)-快门, 然后在光漂白步骤中使用 405 激光线而非 488 激光线

4. Time Course,设置时间过程来定义漂白前、漂白和漂白后扫描的数量

漂白前后的时间根据样品和实验要求可以有不同设置。比如:

- 1) Pre-Bleach 为 3, 即漂白前拍 3 张照片;
- Bleach 为 5。若样品荧光不容易被漂白,可增加 Bleach 的时间,或在第 3 步 Bleach 中增加激光的能量;若荧光分子运动很快,则 Bleach 时间也应尽量短;
- Post-bleach 为 20, 若勾选 Minimize 则以最小时间间隔连续成像。Post-bleach 的 照片可以观察漂白后荧光恢复的变化,如果需要可以中途停止实验。也可以通过单 击"+"来添加其他时间刻度,进行多次时间成像;
- 4) 点击 Run Experiment 进行实验

FRAP 实验循环

如要进行荧光漂白消失(FLIP, Fluorescence lose in Photobleach)实验,可以设定 漂白和第一次后漂白步骤之间的重复次数 Repetitions

Ale -0	FRAP 🗘 Overview Setup Bleach TimeCou	rse Evaluation
	Define the number of pre-bleach, bleach and post-bleach frames.	
	For FLIP Experiments: Define how often the sequence 'Bleach' and 'Post-bleach 1' should be re	peated.
	Start the experiment.	
	Image: Construction of the sector of the	
Live O		2 Run Experiment 0



- 5. Evaluation: 评估 FRAP 结果及导出
- 1) Project 中选择 FRAP 文件



- 2) **Tools** 工具中选择 **Stack Profile**,在 Graphs 中可以查看荧光强度变化,数据同时在 Statistics 中展示。
- 3) 数据导出可以直接点击 Tools 中的 **Report** 导出报告, 或在 Graphs 或 Statistics 窗口 右击 Export

