

激光共焦扫描显微镜及其在生物学中的应用

于彦华 邢达

(华南师范大学激光生命科学研究所, 广州 510631)

摘要: 本文介绍了激光共焦扫描显微镜的结构, 分析了它的原理, 研究了它的光学特性, 并阐述了它在生物、医学上的应用, 并给出了此系统的基本光学系统及其光路设计。

关键词: 激光共焦扫描显微镜, 分辨率, 层析技术

The laser confocal scanning microscope and its applications in biology and medicine

Yu Yanhua Xing Da

(Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract: In this paper, we introduce you the structure of the laser confocal scanning microscope, analyze its principle, study its optical property and introduce its applications in biology and medicine. The basic optical system and the design of the optical path is also given.

Key words: laser confocal scanning microscope, resolving power, chromatography

1 引言*

在使用普通光学显微镜时, 由于光的衍射极限造成的分辨率的限制与在高分辨率时显微镜的聚焦深度很小之间的矛盾一直没有解决。自激光发明以来, 激光在显微镜中的应用日益广泛, 如利用激光的相干性成功的研制了全息显微镜, 利用激光的单色性作为荧光激励源设计成功的激光荧光显微镜等等。近十年来, 随着激光扫描测量图像技术的发展, 将其应用于显微领域从而形成了一种新型的显微镜——激光共焦扫描显微镜(Laser Confocal Scanning Microscope, 简称 LC-SM), 给传统的显微镜领域带来了革新^[1,2]。

2 LCSM 系统的结构

LCSM 系统由激光光源、扫描头、显微镜和图像处理系统四个基本部分组成。图(1)是美国 Bio - Rad 公司产 MRC - 600 型共焦扫描显微镜的结构示意图。

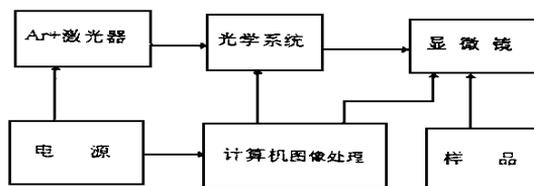


图1 MRC - 600 型 LCSM 结构示意图

2.1 激光光源

目前可供 LCSM 系统选做激光光源的激光器有三种:

(1) Ar⁺ 激光器。用空气进行制冷; 功率为 25mW; 能够输出波长为 488nm 和 514nm 的两条谱线; 每条谱线功率为 10mW。

(2) Kr⁺ / Ar⁺ 型混合气体激光器。功率为 15mW; 可供选择使用的有波长为 488nm (约 5mW)、488nm/568nm (约 5mW) 和 647nm (小于 5mW) 的谱线。

(3) Ar⁺ (25mW) 和 He/Ne (0.3mW) 双激光系统。能够输出的谱线的波长为 488nm、514nm 和 543nm。

本实验室的 LCSM 系统是美国 Bio - Rad 公司产 MRC - 600 型共焦扫描显微镜, 所使用的激光器是 Ar⁺ 激光器。

2.2 扫描头

扫描头是系统最关键的组成部分。图 2 是本实验室 MRC - 600 型共焦扫描显微镜扫描头的内部结构示意图。

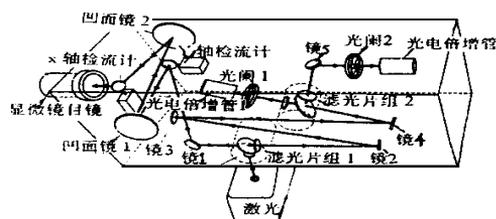


图2 MRC - 600 型 LCSM 扫描头内部结构示意图

从图中可以看出此装置为双通道: 有两个光电倍增管(PMT1、PMT2)可同时用来接收光信号, 能够对同一观测物所发出的两种光信号进行同时观察, 大大提高了效率并能进行实时对比。在使用通道 1 时, 调节 MIRROR1 和 MIRROR4, 使照射到样品上的激光能够实现良好的聚焦, 在使用通道 2 时, 调节 MIRROR5 可实现同样的目的。IRIS1 和 IRIS2 是两个可变光阑, 能够限制进入光电倍增管的光信号的量, 并能滤除杂散光, 提高成像质量。FILTERSET1 和 FILTERSET2 是两组滤光片, 使用不同的滤光片得到所需要的不同波段的光。

2.3 显微镜

一般情况下, LCSM 选用荧光显微镜, 可获得三种

* 1998 年 7 月 20 日收稿

光信息:

(1) 反射光(或散射光)信息:激光聚焦的小亮点照射在样品表面,在样品表面发生反射和散射,反射光(或散射光)经过物镜后,被安置在物镜像方的光电检测器(如光电倍增管)接收,再将所接收信号送到计算机处理,能够得到光强度及二维、三维图像等信息。

(2) 透射光信息:将透过样品的光用聚光镜聚焦或用光纤收集后,经过与(1)相同的处理过程,可以获得所需透射信息。

(3) 荧光信息:有些样品在激光照射后将产生荧光,荧光经物镜进入光电检测器得到荧光信息。探测这类光信息的显微镜称为“激光荧光扫描显微镜”。

3 LCSM 系统的原理

下面先给出此系统的原理示意图

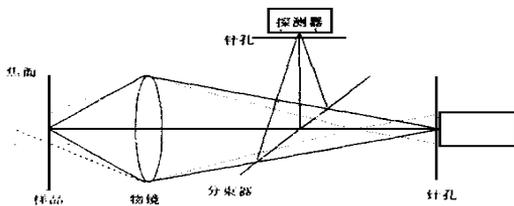


图3 LCSM系统的原理示意图

LCSM 采用共轭焦点技术,使光源、被照物和探测器处在彼此对应的共轭位置,光源通过系统在样品上得到的会聚点与目镜的焦点相重合,形成共焦。扫描是通过移动样品或移动光点的方法实现的。

LCSM 的基本原理是:平行的激光束从物镜的像方,向物镜照射,并在样品上由物镜聚焦成一直径很小的亮点。此亮点对样品进行二维扫描(可以是物面扫描,也可是像面扫描),将所获二维信息输入到计算机处理,从而获得三维图像信息。

光源经物镜在样品表面锐聚焦成衍射极限的斑点,其反射光或透射光再次通过物镜或聚光镜在空间滤波器的共焦针孔平面成像。由靠近像面位置的探测器接受光信号。由于光照和探测都限制在样品的一个点,通过对视野内所有的点逐个扫描即能获得样品的整个图像。而在普通的光学显微镜中是把物体作为平面图像进行观察的,容易产生不必要的散射光和闪烁引起的对比度降低。因而,与传统的显微镜相比,LCSM 提高了成像的分辨率。

4 LCSM 的光学特性

4.1 提高分辨率和图像反差

先对 LCSM 的光学性能进行分析。

为分析方便,假定激光器为单模输出,其径向振幅分布为高斯函数:

$$E(u) = E_0 \exp(-u^2/2L^2) \quad (1)$$

(E_0 为最大振幅, L 为此高斯函数的物征系数)

激光束一定要被聚焦到物平面上形成一个小亮点,这个小亮点的振幅分布是(1)式的傅里叶变换:

$$I_L(X) = I_0 \exp(-2L^2X^2/f_0^2) \quad (2)$$

(L 为激光波长, f_0 为使激光束聚焦的等效系统的焦距。)

再看显微镜成像光路,有两种情况:

第一种情况:由(2)式描述的激光聚焦小亮点的直径 $6L$ 显微镜像面衍射图形中心亮斑的直径时,此时的像面振幅分布函数 $I(X)$ 由两部分组成:(1)显微镜产生的点像分布函数数据为 $K(X)$;(2)激光在物面聚焦的亮点的振幅分布函数(折到显微镜像面上为 $I_L(X) = I_0 \exp(-2L^2X^2/f_0^2)$,为显微镜的放大倍数)。用卷积法把这两部分合成为:

$$I(X) = I_L(X) \cdot K(X) = I_0 \exp(-2L^2X^2/f_0^2) K(X) \exp(-iX/S) d \quad (3)$$

($2a$ 为显微镜光瞳直径, X 为坐标, $K(X)$ 为光瞳函数)

假设物镜是理想的,则

当 $-a < X < a$, $K(X) = 1$

当 $X < -a$ 或 $X > a$ 时, $K(X) = 0$

于是,(3)式变为

$$I(X) = I_0 \exp(-2L^2X^2/f_0^2) \exp(-iX/S) d \cdot K(X) \quad (4)$$

当 $L \rightarrow 0$ 时,即 $I(X) \rightarrow K(X)$,也就是说,使激光聚焦亮点直径很小,根据卷积公式的基本性质,可得

$$I(X) \rightarrow K(X) \exp(-iX/S) d \quad (5)$$

从上式可看出,其像面上的点像振幅分布函数也只是再现显微镜的点像振幅分布,其分辨本领不会有所改善。

第二种情况:由(2)式描述的激光聚焦小亮点的直径 $6L <$ 显微镜像面衍射图形中心亮斑的直径时,此时激光聚焦产生的小亮点不仅起到了前面描述的卷积作用,还起到了像面针孔作用,由它截取(3)式所描述的点像中心部分的振幅分布函数如下:

当 $X < -3L$ 或 $X > 3L$ 时, $I(X) = 0$

$$I(X) = I_0 \exp(-2L^2X^2/f_0^2) \exp(-iX/S) d \cdot K(X) \quad (6)$$

由(5)式可以得到以下有关分辨本领的结论:

(1)LCSM 的点像直径基本上由激光聚焦的小亮点决定。传统的显微镜在 $32 \times$ 时, $N.A. = 0.5$,在 $\lambda = 632.8\text{nm}$,其弥散圆直径 $0.5\mu\text{m}$ 。而激光聚焦光点直径 $d = f \cdot \theta$, f 为物方焦距, θ 为激光发射角, M 为扩展望远镜倍数, $f = 3\text{mm}$, $M = 34$, $\theta = 10^{\circ}$,则 $d = 0.3\mu\text{m}$,即 LCSM 的分辨本领比传统显微镜提高一倍左右,当

系统仔细设计时,可望达成 2~4 倍。

(2)LCSM 点像能量分布既不是高斯函数,也不是爱里衍射图形,而是它们的卷积,这一卷积将使爱里衍射图形平滑,即使提中心光斑之外的亮环亮度减弱甚至完全消除,这一作用将提高图像的反差,有利于显微镜观察生物体、细菌的细节甚至于内部结构。

4.2 获得实时图像

LCSM 对样品进行二维扫描,有两种形式:一是移动样品进行扫描,但物面信息摄取速度太慢,得到一幅图像要几十秒到几分钟。二是移动光点进行扫描,其光束扫描采用电流反射镜偏转光束进行扫描实现的。得到一幅图像需几秒到几十秒。美国研制的利用声光偏振器产生实时视频图像的 LCSM^[3],1/30 秒便可获得一幅图像^[4],大大提高了激光共焦扫描显微镜的性能,已无“扫描”的概念,似乎是“实时输出”的显微镜了^[5]。

4.3 层析技术

LCSM 把光束聚焦到样品的某个层面,而把该层面前后的离焦光束扫掉,通过改变聚焦的深度便可获得样品的一个个层面的光学切片图像,即层析技术。层析技术在激光扫描术中的早期应用是研究半导体的局部特性,现在则应用于激光共焦扫描显微技术进行细胞或生物体的结构分析,其主要信息来源是收集激光从细胞或生物体的表层进入内部所产生的散射光信息。如果对被观察的生物样品进行了荧光着色,那么就可以收集到不同激光照射截面的荧光信息。它与电子显微镜相比,无需进行超薄切片就可对活体进行层析观察,这正是生物学、医学研究所十分希望实现的新技术。

5 LCSM 在生物、医学中的应用

利用 LCSM 在生物、医学领域中已经进行了大量的研究工作,下文将从几个方面对该类工作做简要介绍。

5.1 细胞 Ca^{2+} 的研究

Ca^{2+} 做为细胞内重要的第二信使,对它的研究是当今生命科学研究领域的一大热点。在 LCSM 出现之前,对 Ca^{2+} 的研究大都是通过死细胞进行的,所以无法对细胞内的 Ca^{2+} 信号进行动态观察,而 Ca^{2+} 信号的动态变化是反映细胞生理过程及生理变化的重要信息。利用死细胞进行研究,就无法对同一个细胞或同一组细胞的不同生长阶段进行观察,缺乏对比性,也大大降低了可信度,并给研究工作带来了困难。而 LCSM 技术从根本上解决了这个问题,利用 LCSM 观察活细胞 Ca^{2+} 动态变化可以并且已经获得了大量信息。

到目前为止,此项技术应用于动物细胞的研究居

多。通过对单细胞 Ca^{2+} 的研究发现, Ca^{2+} 不仅在细胞局部区域间的分布是不均匀的,而且细胞内各局部区域的不同深度或层次间也存在不同程度的 Ca^{2+} 梯差即所谓空间 Ca^{2+} 梯差^[6,7]。细胞在受到外界刺激(如 A23187、KCl、Ionomycin、Triton 等)时, Ca^{2+} 荧光信号强度会发生很大的变化^[6,7,16],随着刺激时间的增长,即使刺激物继续存在,细胞 Ca^{2+} 荧光信号不但不会继续增强,反而会慢慢减弱,直至恢复到未加刺激物时的水平。对于细胞受精过程中 Ca^{2+} 荧光信号的变化情况,也已经有人做过研究^[8]。研究发现,配子在粘着过程中, Ca^{2+} 荧光信号未发生任何变化,而配子之间发生熔合作用时, Ca^{2+} 荧光信号强度却会出现一个不稳定的峰值,并可持续几分钟。这些现象,对研究受精引发的早期信号及 Ca^{2+} 在卵细胞激活和受精卵的发育过程中的作用具有重要意义。在其它一些生理过程如细胞分裂、胞吐作用等, Ca^{2+} 荧光信号强度也会发生很显著的变化。

Ca^{2+} 是重要的第二信使,对于调节细胞的生理反应具有重要作用,开发和利用 LCSM 技术对 Ca^{2+} 荧光信号进行观测,可以从某些方面对有机体或细胞的生理变化机制进行分析、阐述,具有重要意义。

5.2 细胞骨架的研究

细胞骨架在维持动植物细胞的形态、细胞分裂等生命活动中有着重要的作用,细胞内的骨架主要由微管和微丝组成,标记有荧光染料的微管和微丝的特异性抗体(如 FITC - Phall, TRITC - Phall, RHODA - Phall 等)与微管和微丝结合后,利用 LCSM 可观察到微管和微丝的具体形态。在细胞发生某些生理变化时(如外界刺激引起的内皮细胞膜下 Ca^{2+} 浓度升高),微管和(或)微丝的结构及其位置也会发生相应的变化,利用 LCSM 不仅可以对其位置进行定位,而且可以对其位置变化进行动态观察,从而可进一步探讨微管和微丝在细胞生理中的作用机理^[10-14]。

5.3 病变细胞的研究

病变细胞与正常细胞的内部结构以及在外界刺激下的细胞反应是有差别的。如果能对某个生理过程进行特异性荧光标记,那么就可利用 LCSM 对其荧光信号进行监测,从而获得病变细胞与正常细胞的不同信息,供进一步研究。比如,使 GFP(绿色荧光蛋白, Green Fluorescence Protein)基因整合到病毒基因,利用 LCSM 实时动态的探测 GFP 发出的荧光,就可以判断病毒侵染细胞的过程、侵染条件及抑制条件。这就极利于及早发现病变迹象,以获得及时治疗。

5.4 药物效用的研究

探讨药物在细胞水平上的作用部位、空间分布和

作用时间,对提高药效及研制新药具有重要的积极作用。利用 LCSM 不仅可以对药物在细胞中的分布及其所引起病变细胞的变化进行动态观察^[15],而且还可以通过观察在不同时间段内药物与其作用点(比如 DNA)的结合情况,判断服用药物的最佳时间,这样就可以进一步提高药效。另一方面利用 LCSM 还可以判断新药物的药效。LCSM 在药物研究领域具有广泛的应用前景。

6 结束语

LCSM 系统是一种集激光、显微镜和计算机于一体的新型、高精显微镜。LCSM 具有的共焦成像分辨率高、能层析扫描无需制作繁琐的电镜切片以及能观察样品的三维图像等优点,使其与生物技术相结合是生物、医学研究领域的一种强有力的仪器,有着广泛的应用前景。

参考文献

- [1] Born M, Wolf. Principles of Optics. Pergamon Press, Oxford England:1980,180
[2] Goodman J. W. Introduction to Fourier Optics. McGraw

- Hill, San Francisco. 1968,162
[3] 诸隰肇. 激光研究,1985,13(1):69~77
[4] Photonics spectra. 1989,(5):154
[5] 朱延彬、郭周义. 光学仪器,1994,16(3):11~19
[6] 杨小毅等. 自然科学进展,1997,7(4):437~442
[7] 杨小毅等. 生物化学与生物物理进展,1996,23(5):442~445
[8] Dignonnet, C. et al. Development, 1997,124:2867~2874
[9] Donald C. Chang and Chunling Meng. J. of Cell Biology, 1995,131(6):1539~1545
[10] Andreassen, PR. et al. Telophasedic: J Cell sci, 1991,99:523~524
[11] Baker J. et al J cell Biol, 1993,122(1):113~121
[12] Bradbury, F. M. and Ockleford, C. O. J. Anat, 1990,169:173~187
[13] Sauin, K. E., Leguellec, K, Philippe, M. and Mitchicson, T. J. Nature, 1992,359:540~543
[14] Zee, S.Y. Sex Plant Repord, 1992,(5):182~188
[15] S. Sharonov et al. Analytica Chimica Acta, 1994,290:40~47
[16] Joseph P. Y. Kao et al. The Journal of Biological Chemistry, 1989,264:8179~8184

(上接第34页)

3 讨论和结论

从(23)、(2)式说明,色散缓变光纤的参数 α 等效为一般光纤放大器的增益,其模面积参数 M 等效为损耗,其 $\alpha + M = \frac{1}{2}$ 色散缓减效应完全被偿损耗,此时孤子的传输完全不受损耗影响,由此说明,色散缓减效应等效长距离分布参数光纤放大器的增益,它导致非线性效应增加,孤子进一步被压缩:它提供设计色散缓减光纤通信系统之基础理论,若模面积随 X 增加,按指数律减少 $f(X) = e^{-2MX}$,那么模面积效应等效为分布信号放大器的增益,它非常有利于孤子的传输。从(33)式可见光纤中光场算符的量子力学平均值为不同幅度、不同中心位置修正的经典孤子波的迭加。从(29)、(30)式可说明,修正的量子态孤子的幅度、脉宽、能量、相位、面积、中心位置、形状随光子数 n 不同而变化。当系统的光子数很大时,即 $n_0 = |a_0|^2 \gg 1$,可忽略 $\hat{a}(x,t)$ 和 $\hat{a}^\dagger(x,t)$ 的相互关联,则 $\langle \hat{a}^\dagger(x,t) \hat{a}(x,t) \rangle = n(X,t)$, (32)式由量子力学情形过渡到经典解,说明在大量子数重要条件下,量子力学向经典力学过渡。在泊松分布的相干态下,量子波形强度的平均值(即量子场均

值)具有经典孤波双曲正割形式,由此说明,在该态下,量子态孤子的波包扩散效应可以忽略,它具有经典孤子的性质。所以,量子非线性方程的孤子态为整体束缚态,其量子起伏最小。从(36)式说明,场算符的准概率密度反映了系统的量子效应,准概率密度呈自压缩效应^[1]。此压缩效应与光纤的色散缓减效应以及传输距离、损耗、模面积等因素有关。这压缩效应是量子态波包扩散可略、量子起伏最小的重要因素。所以,经典光孤子的自压缩效应在光纤中存在的必然性由量子理论得到证明。

参考文献

- [1] Ewan M. Wright, Phy. Rev. A, 1991,43:3836
[2] Esinger, M. J. Potasek, J. M. Fang and M. C. Teich, Phy. Rev. A, 1992,46:4192
[3] M. J. Potasek, opt. Lett, 1987,12:921
[4] H. H. Kuehl, J. Opt. Soc. (B), 1988,5:709
[5] Boris A. Malomed, Opt. Lett., 1994,19:341
[6] S. V. Chernikov, P. V. Mamyshev, J. Opt. Soc. (B), 1991,8:1633
[7] Kodama, Hasegawa A. Opt. Lett. 1992,17:31