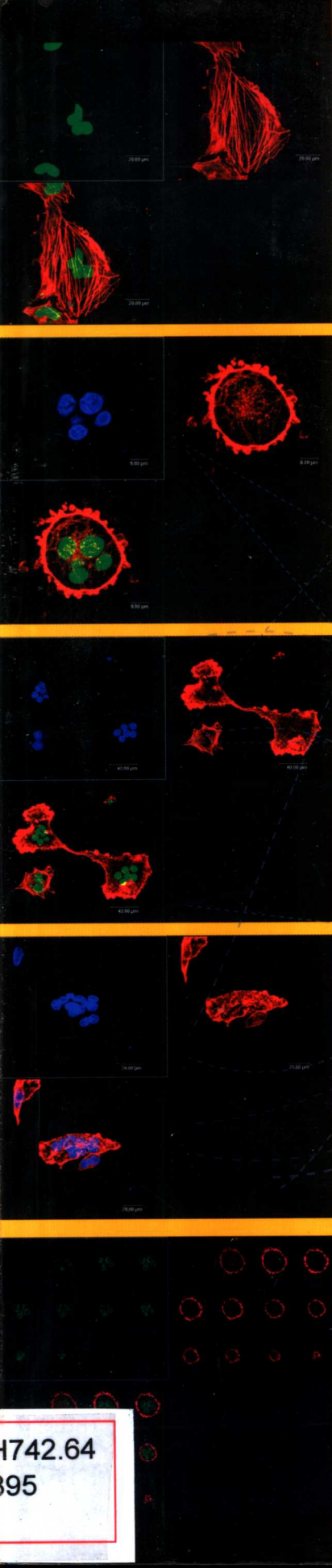




激光扫描 共聚焦显微镜 技术教程

袁兰 主编

北京大学医学出版社

H742.64
395

激光扫描共聚焦显微镜技术教程

袁兰 主编

编者名单 (以姓氏拼音为序)

刘红梅

刘会雪

刘 莎

魏 炜

邢 虹

杨晓改

余四旺

张 立

北京大学医学出版社

JIGUANG SAOMIAO GONGJUJIAO XIANWEIJING JISHU JIAOCHENG

图书在版编目 (CIP) 数据

激光扫描共聚焦显微镜技术教程/袁兰主编. —北京:
北京大学医学出版社, 2004.5
ISBN 7-81071-536-4

I. 激… II. 袁… III. 激光显微镜-医学院校-
教材 IV. TH742.64

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 004819 号

北京大学医学出版社出版发行

(100083 北京市海淀区学院路38号 北京大学医学部院内 电话: 010-82802230)

责任编辑: 安 林

责任校对: 王怀玲

责任印制: 郭桂兰

北京东方圣雅印刷有限公司印刷 新华书店经销

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 7.5 插页 4 字数: 187 千字

2004 年 3 月第 1 版 2004 年 3 月第 1 次印刷 印数: 1-3000 册

定价: 19.00 元

版权所有 不得翻印

本书由

北京大学医学部科学出版基金

资助出版

前 言

近年来激光扫描显微镜技术发展迅速、日益完善并已经成为生物医学研究必不可少的研究手段。根据教学和科研的需求，从实用的角度编写了这本《激光扫描共聚焦显微镜技术教程》。

本书共分为两部分。第一部分为掌握激光扫描显微镜技术所必备的基础知识；第二部分为教学实验，选择了具有代表性的 14 个实验，使学生在应用中掌握大部分激光扫描显微镜的功能、基本操作技术，学会生物医学研究中常见的样品荧光标记方法，以期望读者能够举一反三，使激光扫描显微镜技术得到更广泛的应用。

本书可作为硕士及博士研究生教材，也可作为生物医学相关专业的教师、科研和技术人员使用激光扫描显微镜的参考书。

编者

目 录

第一部分 激光扫描共聚焦显微镜的基本知识	(1)
序言	(3)
第一章 激光扫描共聚焦显微镜的基本结构、工作原理及基本功能	(4)
一、激光扫描共聚焦显微镜的基本结构和工作原理	(4)
(一) 激光光源	(5)
(二) 扫描器	(9)
(三) 激光扫描共聚焦显微镜使用的荧光显微镜的特点和要求	(9)
(四) 计算机系统	(11)
二、激光扫描共聚焦显微镜的基本功能	(12)
(一) 采集和处理图像	(12)
(二) 荧光分子的定性及定位	(13)
(三) 定量测定	(14)
(四) 激光扫描共聚焦显微镜可获取的图像的种类	(15)
(五) 光谱交叉干扰及其消除	(18)
第二章 荧光探针的选择和荧光样品的制备	(21)
第一节 荧光光谱基础知识	(21)
一、光的本质	(21)
二、荧光的产生	(22)
三、荧光的淬灭	(23)
四、激发光谱和发射光谱	(24)
第二节 用于共焦显微镜测定的荧光样品的制备	(26)
一、组织和细胞样品中荧光的来源	(26)
二、荧光样品的制备要求	(27)
三、选择荧光探针的主要步骤和方法	(28)
(一) 根据实验目的确定需要检测的指标	(28)
(二) 确定可供选择的荧光探针的范围	(28)
(三) 考察荧光探针的特性是否符合荧光样品的制备要求	(29)
(四) 考察荧光探针与所用的共聚焦显微镜系统的匹配情况	(30)
(五) 检查实验中存在的干扰情况	(31)
四、用荧光探针标记样品的过程及注意事项	(31)
(一) 荧光标记前样品的预处理	(31)
(二) 用荧光探针标记样品	(32)
第三章 激光扫描共聚焦显微镜在医学及生物学研究中的应用	(37)
一、原位鉴定细胞或组织内生物大分子、观察细胞及亚细胞形态结构	(37)

(一) 用激光扫描共聚焦显微镜在细胞原位检测核酸	(37)
(二) 用激光扫描共聚焦显微镜原位检测蛋白质、抗体及其他分子	(40)
(三) 检测细胞凋亡	(44)
(四) 细胞器的观察及测定	(47)
(五) 检测细胞融合	(48)
(六) 观察细胞骨架	(48)
(七) 检测细胞间缝隙连接通讯	(48)
(八) 检测细胞内脂肪	(49)
二、活体细胞或组织功能的实时动态监测	(49)
(一) 实时定量测定细胞内 Ca^{2+} 的变化	(49)
(二) 测定细胞内 pH 变化	(50)
(三) 检测膜电位的变化	(51)
(四) 检测细胞内活性氧物种的产生	(52)
(五) 检测药物等跨膜进入组织或细胞过程及其定位	(53)
(六) 检测荧光共振能量转移	(53)
(七) 检测荧光漂白恢复	(54)
第二部分 激光扫描共聚焦显微镜技术教学实验	(55)
实验一 激光扫描共聚焦显微镜系统的结构、开关机操作及注意事项	(57)
实验二 细胞内核酸的标记及其共焦图像采集方法	(60)
实验三 微分干涉差显微方法获取细胞光镜图像	(64)
实验四 荧光探针标记的鬼笔环肽染色法观察细胞肌动蛋白微丝	(66)
实验五 动物细胞微管-微丝-细胞核的同时定位观察	(70)
实验六 激光扫描共聚焦显微术测定单细胞凝胶电泳板中的“彗星”	(72)
实验七 用激光扫描共聚焦显微镜原位检测细胞凋亡	(75)
实验八 原位实时定量测定细胞内 Ca^{2+} 浓度的动态变化	(80)
实验九 荧光探针标记法检测活细胞中活性氧物种的变化	(84)
实验十 活体脑片细胞内 Ca^{2+} 及活性氧物种的测定	(87)
实验十一 用共聚焦显微镜和图像分析仪测定细胞膜电位的变化	(91)
实验十二 细胞内脂肪的检测	(94)
实验十三 细胞间缝隙连接通讯的检测——划痕标记染料示踪技术	(96)
实验十四 利用荧光光谱曲线分离并共定位细胞内的多种荧光蛋白	(99)
附录 1 激光扫描共聚焦显微镜需准备的器皿及要求	(101)
附录 2 多(双)光子激光扫描显微镜系统(简介)	(103)
附录 3 荧光相关光谱—激光扫描共聚焦显微镜技术(简介)	(107)
主要参考文献	(109)

第一部分

激光扫描共聚焦显微镜的基本知识

序 言

激光扫描共聚焦显微镜 (Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM, 简称共聚焦显微镜) 技术近年来发展迅速并日臻完善, 是目前生物医学领域中最先进的荧光成像和细胞分析手段之一, 其应用领域日趋广泛。

共聚焦显微镜在采集样品荧光图像的基础上实现其特殊的功能, 常用于定位、定性和定量地检测生物样品中分子和离子等成分变化、生理功能改变, 对生物组织、细胞及其亚细胞结构进行形态学观察。在医药、材料科学、化学化工等方面得到了广泛应用。

共聚焦显微镜的结构决定其功能。其结构和功能特点是: (1) 用激光作为激发光源、设有检测孔光栏 (pinhole)、装有高度精确微量步进马达, 从而实现了点光源在样品上逐点逐层扫描成像; (2) 根据样品中荧光信号的强弱、大小及分布, 调节激光能量、检测孔光栏、光电倍增管 (PMT) 的检测范围、物镜和电子放大倍数 (zoom), 以利于采集各种荧光信号; (3) 采用了图像处理技术, 实现了图像的优化、三维重建; (4) 实现了全自动程序化控制采集 (监测) 样品荧光图像的时间和空间 (5) 可同时采集样品中多重荧光信号的分解及合成图像, 并对其进行定量测定。

在采集样品荧光图像方面, 与荧光显微镜相比, 激光扫描共聚焦显微镜在很大程度上克服了普通荧光显微镜观察时经常出现的三维空间定位不准、结构细节模糊不清、过强或弱信号均难以成像的缺点, 其成像的分辨率、对比度、清晰度也大大提高。

早在 1957 年就已由 Marvin Minsky 提出有关共聚焦显微镜的某些技术原理, 但激光扫描共聚焦显微镜作为商品推出是在 20 世纪 80 年代初期。早期的激光扫描共聚焦显微镜在技术上很不完善, 其应用也受到限制。至 20 世纪 80 年代末, 光学系统设计不断改进, 成像的质量和灵敏度都有所提高; 进入 90 年代初期, 激光扫描共聚焦显微镜系统中逐步引入混合激光和紫外激光技术、计算机控制系统和光子记数技术。例如 1997 年出品的激光扫描共聚焦显微镜, 已具备完善的光学系统、模块化的仪器设计、灵活的软件和高配置的计算机硬件, 从而使共聚焦显微镜系统的功能不断扩展和升级。尤其是近两年来, 激光扫描共聚焦显微镜已经成为汇领先的激光技术、显微镜技术、光度技术、计算机及图像处理技术、精密的机械技术等多种高技术于一身的大型仪器, 是当今世界上最先进的荧光成像和细胞分析的手段之一。并且随着生物学、医学等研究的深入及荧光探针技术的迅速发展而显露出日益重要的作用。

第一章 激光扫描共聚焦显微镜的基本结构、工作原理及基本功能

一、激光扫描共聚焦显微镜的基本结构和工作原理

激光扫描共聚焦显微镜是一种用于图像采集和分析的大型精密仪器。其主要由以下几部分组成：激光光源、扫描器（内装有针孔光栏、分光镜、发射荧光单色器及检测器）、荧光显微镜（装有微量步进马达）系统、光学装置、计算机图像存储与处理及控制系统。现代激光扫描共聚焦显微镜各部分的设计应用了先进的激光技术、光学显微镜技术、计算机控制及图像处理技术、精密的机械技术，整个系统由共聚焦显微镜专用的计算机软件统一精确地控制，从而保证各部分协调地工作。图 1-1 和图 1-2 展示了激光扫描共聚焦显微镜仪器各部分相互关系和工作原理。

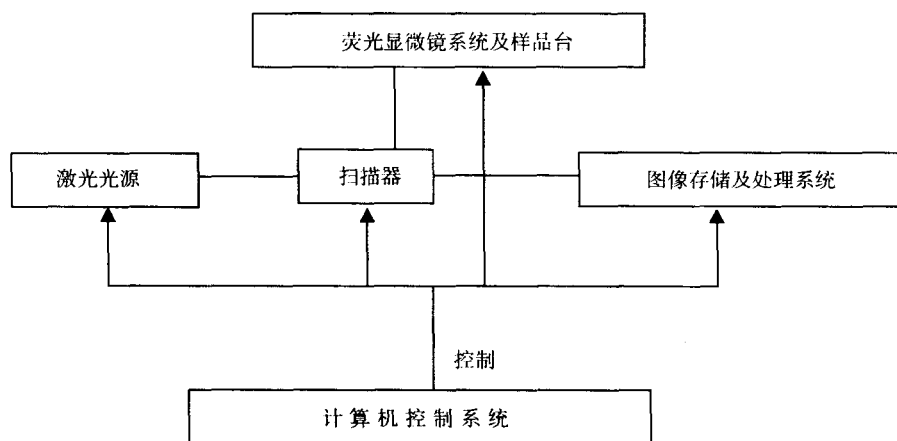


图 1-1 激光扫描共聚焦显微镜各部分相互关系示意图

由激光器发射的一定波长的激发光，经过扫描器内的照明针孔光栏 P1 (illumination pinhole, 或称为孔光栏) 形成点光源，由物镜聚焦于样品的焦平面上，样品上相应的被照射点受激发而发射出的荧光，通过检测孔光栏 P2 (detecting pinhole) 后，到达检测器，并成像于计算机监视屏上。这样由焦平面上样品的每一点的荧光图像组成了一幅完整的共焦图像，称为光切片 (optical section)，(见彩图 1-3A)。

在激光扫描过程中，某一瞬间只有焦平面上的被扫描点聚焦于检测孔光栏并被检测器记录，虽然样品的焦平面上也会有荧光产生，但来自非焦平面的光线，均被检测孔光栏阻挡，不能形成共焦图像。可见，样品上激光扫描点（聚焦点）与检测孔光栏是共焦的。在激光扫描共聚焦显微镜的载物台上所加装的微量步进马达，可驱动载物台在扫描过程中上下（沿着 Z 轴）步进移动，以使物镜聚焦于样品的不同层面上，获取该层的光学切片，

从而可以得到细胞或组织各个横断面的一系列连续光学切片，即实现了“显微 CT”（见彩图 1-3B）。这些光学切片可用于样品立体结构观察和图像的三维重建。

若间歇或连续地扫描样品的某一个横断面（或一条线）并对其荧光进行定位、定性及定量分析，则可实现对该样品的实时监测。

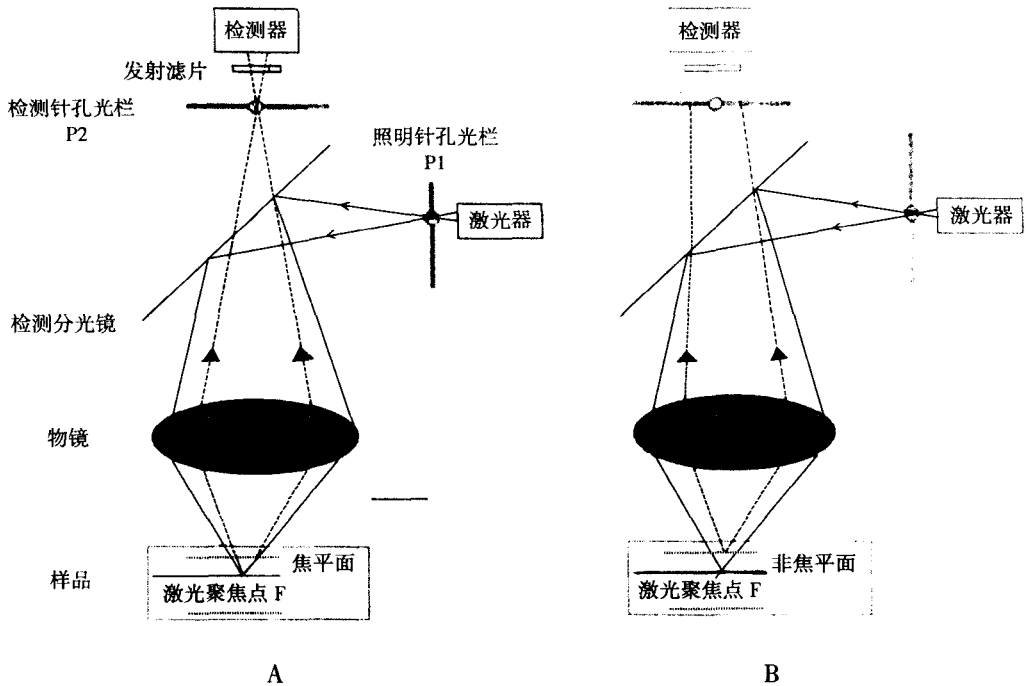


图 1-2 激光扫描共聚焦显微镜工作原理示意图

图 A：激光经照明针孔光阑（P1）形成点光源，由物镜聚焦于样品焦平面上，焦平面上只有被激光扫描的点 F 所发出的一定波长的荧光才能通过检测针孔光阑（P2）到达检测器，并成像于显示器上，得到相应的荧光图像。图 B：来自非焦平面的光线，均被检测针孔光阑阻挡，不能通过针孔光阑到达检测器，因而不能形成共焦图像。

本书主要介绍目前通用的激光扫描共聚焦显微镜工作原理、结构及其功能，由于不同型号的激光扫描共聚焦显微镜的结构、工作原理和功能有所不同，因此在使用具体型号的仪器前可参阅相应的仪器介绍。

（一）激光光源

1. 激光的产生

激光（也称为镭射）的英文全名是 light amplification by stimulated emission of radiation，意为“受激辐射光放大”，简称 laser。

物质的发光是由组成物质的粒子（分子、原子、离子）中的电子能级跃迁而引起的，从而该粒子由某一低能态 E_1 跃迁到高能态 E_2 ，电子在实现能级之间跃迁时，以光能的形式与外界交换能量，称为辐射跃迁。普通光源发光和激光的产生过程属于辐射跃迁。辐射

跃迁包括受激吸收、自发辐射和受激辐射。在实际发生的辐射跃迁中，以上三种基本过程总是不可分割地同时存在。

(1) 受激吸收 一个粒子吸收一个光子而实现由低能态 E_1 向高能态 E_2 跃迁的过程称为受激吸收 (图 1-4-1)。显然不是任何光子入射都能引起受激吸收的。我们称能引起受激吸收的入射光子为激发光子，它对粒子起激发作用，它的频率 ν 必须满足条件 $h\nu = E_2 - E_1$ 。受激吸收的结果是入射光被减弱了。

(2) 自发辐射 处于高能态的粒子总是力图向低能态跃迁而趋于稳定，这种粒子完全自发地从激发态向较低能态跃迁同时释放出光子的过程称之为自发辐射 (图 1-4-2)。其自发辐射的光子能量应为： $h\nu = E_2 - E_1$ ($E_2 > E_1$)。

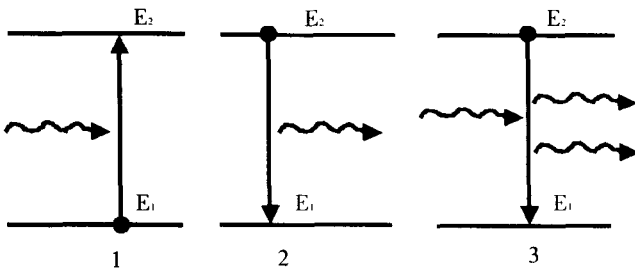


图 1-4 辐射跃迁的三种基本过程

1 受激吸收 2 自发辐射 3 受激辐射

普通光源的发光即属于自发辐射，其构成光源的各个粒子是互不相关的独立发光体，不同粒子或同一粒子在不同时刻自发辐射所发出的光子的频率、相位、传播方向、偏振状态各不相同。因此，自发辐射是各发光粒子之间互不相关的随机过程，它发出的是非相干的、向四面八方传播的自然光。

(3) 受激辐射 处于高能态 E_2 的粒子，当有一能量 $h\nu = E_2 - E_1$ 的外来光子趋近时，因受其“刺激”而从 E_2 跃迁到低能态 E_1 ，同时释放出光子的过程称为受激辐射 (图 1-4-3)。起“刺激”作用的光子称为刺激光子。受激辐射的光子与刺激光子在频率、相位、传播方向、偏振状态等特征上完全相同。于是一个光子射入，变成两个特征完全相同的光子射出，而这两个光子又可继续充当刺激光子，继续引起受激辐射。因此，受激辐射的结果是入射光被加强了。称之为光放大作用的激光就是受激辐射产生的光，显然，激光束里处于相同状态的光子是相干的、偏振的和沿同一方向传播的。

激光器是一种产生激光束的装置，它保证光子在其中持续振荡、反复放大得到大量的特征相同的光子，从而产生持续不断的激光束。目前激光器的种类很多，可产生多种波长的激光束，使用者可根据不同的荧光探针对激发光的需要，选择具有相应激光波长的激光器。

2. 激光的基本特性及其在激光扫描共聚焦显微镜中的应用

激光扫描共聚焦显微镜将传统荧光显微镜的汞灯或氙灯光源改用激光光源，就是利用了激光光源的特有优势。激光由于其特殊的发光机理与激光器的特殊结构而使其不仅有光的一切性质，而且有普通光源发出的光所无可比拟的优点。这些特点已被迅速地应用到激光扫描共聚焦显微镜上。共聚焦显微镜要求光源单色性好、亮度高，而激光光源则正好能满足其要求。采用激光光源成像系统色差小，尤其对大数值孔径、高放大倍率的显微镜，

可以提高其光学系统的分辨能力。

本质上讲,激光的光子与普通光的光子毫无区别,即两者的本质相同,所以,激光具有普通光的一切特征,但是,由于激光与普通光的发光机制不同,所以,激光具有与普通光不同的一些特性,尤其是有大量光子所组成的激光束所表现的整体行为与普通光有着显著的不同。其特点介绍如下:

(1) 激光比普通光单色性好

从理论上讲,只有一个确定波长的光称为单色光。但在自然界中绝对的单色光是不存在的,实际的测定中发现,每一种波长的光都不是单一的波长 λ ,而是有一段波长范围 $\Delta\lambda$ 。 $\Delta\lambda$ 越小,单色性越好。在普通光源中,氪(Kr^{86})灯发出的光,波长 $\lambda = 605.7\text{nm}$,谱线宽度最窄, $\Delta\lambda = 4.7 \times 10^{-4}\text{nm}$ 。由单模稳频氦氖激光器发出的激光,波长 $\lambda = 632.8\text{nm}$,谱线宽度 $\Delta\lambda < 10^{-8}\text{nm}$ 。两者相差数万倍,可见激光器是目前世界上最好的激光光源。

由于普通光源发射的光子,在频率上是各不相同的,所以包含有多种颜色。

根据公式 $\nu = c/\lambda$ (c 为光子的速度,在真空中为 $2.9979 \times 10^8\text{m/s}$),相应地,其频率也有相应的范围 $\Delta\nu$ 。将光谱线强度为其最大值一半时所对应的两个频率之差的绝对值 $\Delta\nu = |\nu_2 - \nu_1|$ 称为谱线宽度。谱线宽度越窄,则光的颜色越纯,称之为单色性越好。所以光谱线宽度是衡量单色性好坏的标志,而单色性好坏反映了光能量在频率上分布的集中性。与 ν_2 和 ν_1 所对应的是波长范围 $\lambda_2 \sim \lambda_1$,其波长范围 $\Delta\lambda = |\lambda_2 - \lambda_1|$ 。在制造单色光源时,应尽量缩小 $\Delta\lambda$ 。

激光单色性好除了可以减少色差外,在仪器设计上也带来很多优势,它使发射光的单色系统设计简单,激发光与发射光易于分离,减少干扰。

(2) 方向性好

从激光器发出的激光束,都是相当好的平行光束,发散角都在毫弧度(1毫弧度 $= 3'26''$)的数量级,具有很好的方向性。

光的方向性表明光能量在空间分布的集中性。激光束的方向性好,可使能量在空间高度集中。另外,激光平行性好,其光束经聚焦得到的焦斑尺寸小,再加之激光单色性好,经聚焦后无色散像差,使焦斑尺寸进一步缩小,可达波长的数量级,即形成微米级的微光束。这在激光扫描共聚焦显微镜进行点扫描过程中发挥了优势。

而普通光源发出的光射向四面八方,能量分散,无法替代激光。

(3) 亮度高,强度大

亮度高,强度大是激光的主要特征。激光的亮度可比普通光源高出 $10^{12} \sim 10^{19}$ 倍。因此在激光扫描共聚焦显微镜上,所用激光功率都很低,一般最高也只有几十毫瓦,就可以激发荧光物质,使之产生荧光。由于其扫描样品的时间短,所以虽然激光亮度高,强度大,但是其对样品的损伤仍然保持很低。通常共聚焦显微镜只有几条高亮度的激光谱线用于日常荧光分析。

(4) 激光的相干性和偏振性好

由于受激辐射的光子在频率与振动方向上均相同,且振动相位差恒定,因此激光是相干的,而且激光的时间和空间相干性均比普通光好。激光束中各个辐射光子的偏振状态是相同的,因此激光的偏振性好。

总之，激光的上述四方面特点是彼此关联的。首先，单色性与方向性好导致其亮度高、强度大，表明激光能量在时间、空间与频谱分布上的高度集中性。其次，单色性与相干性是相互关联的。这些特性的产生都是源于激光特殊的发射机制与激光器特殊的结构。

3. 激光扫描共聚焦显微镜常用的激光器

迄今为止，在 21nm ~ 7mm 范围内，用各种激光器可产生几千个激光波长，但其中有少量谱线能够用作共聚焦显微镜的光源。

通常采用的激光谱线有：Ar - 458nm, 476nm, 488nm, 514 nm; Kr - 568 nm、647 nm, HeNe - 543nm、633nm; Ar (UV) — 351nm、364nm 为紫外光线；蓝紫光半导体激光器发出 405nm 的激光。作为激光光源可单独或同时配备多个激光器，以获得更多的激光谱线，满足大多数常用荧光探针的需要。因此，不同的仪器激光谱线数目及功率的大小根据所配置的激光器不同而有所差异。选配合理，基本能满足多种荧光物质的测定。

现代激光光源的特点是质量稳定、寿命长、多种单波长可供选择。目前大多数新出品的共聚焦显微镜激光光源的调节由计算机来控制。照射到样品上的激光能量大小主要通过两条途径来控制：①调节激光器输出功率大小。该途径调节激光功率范围宽，但会引起激光电流的改变，一般需要 15 ~ 20min 才能使输出激光强度达到稳定。②调节声光控制器 AOTF (Acousto-optical tunable filter)。可以在一定范围内连续调节每个波长激光的输出能量和强度，同时还能够精确、快速地控制不同激光谱线间的开关切换。在进行定量测定时，以调节途径②为好，以保证测定激光的稳定性。

4. 辅助设备

激光光源系统以激光器为核心，同时还包括一些激光器正常工作所必须的辅助设备，如冷却系统、稳压电源、耦合光纤等。

(1) 冷却系统

其作用是带走激光器产生的大量热量，使之快速冷却，保证激光器正常工作。是激光器必须配置的辅助设备。

分为风冷及水冷两种方式。风冷系统主要是在激光器的激光管旁边安装一个风扇和粗管道，靠风扇不断地将热量排入管道，以带走激光器工作时不断产生的大量热量。水冷系统是靠泵带动的闭合水循环系统带走激光器产生的热量，然后水循环系统再与空气交换热量使自身得以冷却，以保证连续工作。紫外激光器使用水冷系统比较多。

在设计上，虽然激光器与冷却系统各自都有独立的电源开关，但一般激光光源都设计成自我保护方式，即必须先启动冷却系统激光器才能开始工作，一旦冷却系统断电则激光器也立即停止工作，这可以防止因激光器工作时散发的大量热量不能立即排除，而影响其工作寿命甚至烧毁激光管。

使用时，要求先关闭激光器电源，而保持冷却系统工作至整个激光器完全冷却至室温。

(2) 稳压电源及激光的稳定性

保证激光稳定是获得正确测定结果的前提条件，其中稳压电源在其中起着重要作用。

另外一旦激光管的电流发生改变，一般需要 10 ~ 20 分钟才能稳定下来，因此开机或调整输出激光电流后，要尽量等到激光强度稳定后再进行图像的采集，尤其对于需要定量测定的样品，更要注意在测定样品过程中保持实验条件的一致性。AOTF 调节激光强度不

会影响激光器的工作电流，一般尽量用它来改变激光强度。

（二）扫描器

扫描器内密封有检测针孔光栏（pinhole）、分光镜、发射荧光分色器及检测器。

由共聚焦显微镜工作原理示意图（图 1-2）可见，荧光样品中的混合荧光进入扫描器，经过检测针孔光栏、分光镜和分色器选择后，被分成各单色荧光，分别在不同的荧光通道（channel, ch）进行检测并形成相应的共焦图像，同时在计算机屏幕上可以显示几个并列的单色荧光图像及其合成图像。

针孔光栏（Pinhole）是共聚焦显微镜的一个重要组成部分，它是放在检测器前面的一个小孔，作用是控制光学切片的厚度，它对实现 CT 式断层扫描成像、排除非焦平面杂散光起着关键性作用，同时也影响图像的荧光强度。理论上讲，为了得到真正的断层扫描图像，针孔的直径越小越好，因为光线只有通过针孔光栏才能到达检测器，得到相应荧光信号的图像，因此在实际扫描图像中，在保证图像亮度的情况下，针孔光栏开得尽量小。

分光镜的作用是按照波长来改变光线的传播方向，使各激发光到达标本，并使来自标本的光线（荧光和反射光等）经过分光镜分离后进入相应的荧光检测通道。

发射荧光分色器的作用是选择出一定波长范围的光进行检测。不同型号的仪器采用的分色器部件有所不同。目前用于分色器部件主要有滤片、棱镜和光栅三种类型（见彩图 1-5A、B、C）。①滤片：滤片具有波长选择作用，与分光镜组合，只允许一定波长范围内的光通过，因此通过选择与荧光探针发射峰匹配的滤片就可以使相应波长的荧光进入检测器。为了适应多种波长范围荧光的测定，在扫描器内需要排列多个滤光片供测定时选用。②棱镜：棱镜和狭缝组成分色器。先由棱镜将混合光分为按照波长序列排列的光谱，然后调整狭缝的位置和宽度，选择出需要的波长进入到检测器。③光栅：光栅与 32 个检测器共同组成分色器，完成分光 and 检测功能。先由光栅将混合光分成按照波长序列排列的光谱，照射到 32 个阵列检测器上，其中每个检测器对应一定的波长检测范围，由此完成全部可见波长（400~700nm）范围的荧光检测，并测定出各荧光物质的荧光发射光谱曲线，再依据各荧光物质的峰值和荧光发射光谱将混合荧光分离，分别检测出各荧光的信号并成像。可见，在单色光获得的方式上，不同的仪器设计各有其特点。

检测器采用高灵敏度的光电倍增管，其检测的范围和灵敏度可根据样品的强度进行连续调节。将荧光图像的强度按照 0~255 分级显示。

目前，扫描器的设计有多种形式。包括多针孔型滤片式扫描器、单针孔型棱镜式扫描器、多针孔型光栅式扫描器或滤片+光栅混合式扫描器。

（三）激光扫描共聚焦显微镜使用的荧光显微镜的特点和要求

荧光显微镜是激光扫描共聚焦显微镜的一个重要的组成部分。它配备两个光源：卤素灯光源和汞灯光源，主要是用于预览样品，其中卤素灯光源用于寻找样品焦平面、观察样品位置、形态和分布；汞灯用于观察和分辨样品中产生荧光物质的成分和位置。对于光敏（例如淬灭）的样品最好用卤素灯进行预览，以减少对样品的刺激。

1. 常规荧光显微镜简介

荧光显微镜（fluorescence microscope）利用较短波长的光使样品受到激发，产生较长波长的荧光，可用来观察和分辨样品中产生荧光物质的成分和位置。

（1）荧光显微镜主要包括光源、激发滤片、双色反射镜、阻断滤片、物镜和目镜等几

部分（图 1-6），它们在光路中的作用分述如下：

①光源：高压汞灯或氙灯是常用的荧光激发光源。汞灯在 365nm、405nm、436nm、546nm、577nm 处有很强的发射线，氙灯在光的紫外区、可见区也有较强的发射线。

②激发滤片：放置于光源和物镜之间，其作用是选择适合荧光物质的激发光波长范围。

③双色反射镜：它是初步分开激发光（较短波长）和发射荧光（较长波长）的一个重要组件。它的放置方向与激发光的方向呈 45°，具有一个特征波长值 λ ，只有那些波长长于 λ 的光波能够透过其到达目镜或检测器，而波长短于 λ 的光波被反射。

④阻断滤片：常采用长波通滤片，能使长于某波长的光通过，短于某波长的光不能通过。阻断滤片的作用是进一步使荧光与激发光分离，以获得更纯的荧光。内阻断滤片已固定在内部，外阻断滤片可根据需要装入或卸下。

⑤物镜：由于激发样品和收集荧光都是由同一物镜实现的，所以物镜的选择对于荧光观察有重要作用。荧光物镜是能透过紫外光的特制物镜。荧光效率与所用物镜数值孔径的 4 次方成正比，所以用数值孔径较大的浸液（水浸或油浸）物镜效果较好，一些著名厂家生产了数值孔径大于 1.2 的荧光物镜，使用效果很好。

⑥目镜：荧光亮度与目镜放大倍数的平方成反比，如 6.3× 目镜比 10× 目镜观察荧光更亮，所以，可采用较低倍目镜观察。

(2) 正置荧光显微镜与倒置荧光显微镜

根据镜体的光学组件排列相对于载物台的位置而言分为两类：正置荧光显微镜与倒置荧光显微镜。正置荧光显微镜（如图 1-6 所示）的物镜在载物台的上方，汞灯光线从载物台的上方通过物镜聚焦到样品上；倒置显微镜的物镜在载物台的下方，汞灯光线从载物台的下方通过物镜聚焦到样品上。倒置显微镜可以直接将培养细胞的皿放在载物台上，物镜头从皿的底部方向聚焦样品，不会接触和扰动皿中的液体和样品，因此适用于多种样品的观察。正置荧光显微镜与倒置荧光显微镜还可以用于普通光镜观察，但二者的光镜光源和聚光镜位置不同，前者安置在载物台的下面，而后者则在载物台的上面。

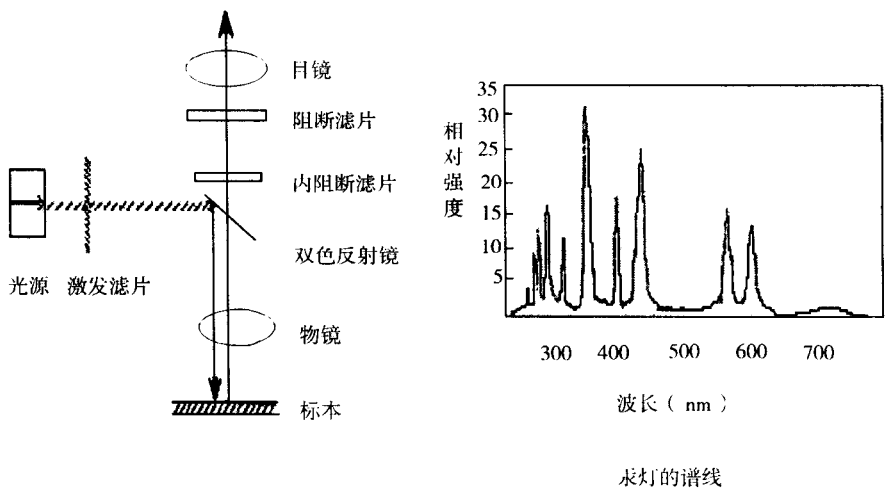


图 1-6 荧光显微镜的光路和汞灯的谱线