

## 激光扫描共聚焦显微镜及在生物学中的应用

邢 军

(天津医科大学实验中心 天津 300070)

**摘 要** 本文介绍了激光扫描共聚焦显微镜的基本原理、结构及其在生物学领域中的应用。

**关键词** 激光 共聚焦 显微镜 生物学

### 1 引言

激光扫描共聚焦显微镜(Laser Scanning Confocal Microscopy, 简称 LSCM)是 80 年代发展起来的机电一体化生物医学图仪器。传统的光学显微镜由于自身的结构所决定,其光学分辨率是有限的,二十世纪中期以来,许多科学家致力于提高显微镜成像质量的研究。1951 年 Young 和 Roberts 在光学显微镜中引入了扫描光栅,所得到的图像由一个个小点排列而成,图像储存于计算机内;1957 年 Miinbsky 首次阐明扫描共聚焦显微镜的基本原理;1969 年 Davidovits 和 Egger 将多种波长的激光加入扫描显微镜光源;1978 年 Brankenhoff 推出一种高数值孔径的透镜后,激光扫描共聚焦显微镜技术得以完善。LSCM 使用紫外光或可见光激发标本中的荧光探针,利用计算机进行图像处理,从而得到细胞、组织内部微细结构的切片图像和三维体系结构,以及在亚细胞水平上观察  $Ca^{2+}$ 、pH 值、膜电位等生理信号和细胞形态的变化;最近生物界新兴的组织微阵列技术也是运用激光扫描共聚焦显微技术获取信息的。LSCM 已广泛应用于分子细胞生物学、生理学、形态学、药理学、遗传学和神经生物学等领域,对生物医学样品进行定性、定量、定时和定位研究具有很大的优越性,成为这些领域新一代强有力的研究工具。

### 2 结构原理

激光扫描共聚焦显微镜突破了普通光学显微镜的成像模式,其光学原理如图 1 所示,组成部分比普通光学显微镜增设了激光光源、光电检测器及针孔光阑。光束通过光源针孔光阑入射,经由分光镜反射到标本的一个点上,发射光通过检测光路上设置检测针孔光阑进入光电检测器生成电信号。检测针孔光阑位于物镜焦平面,光源针孔光阑与之共轭,标本焦平面以外的光线不能在检

测针孔处成像。

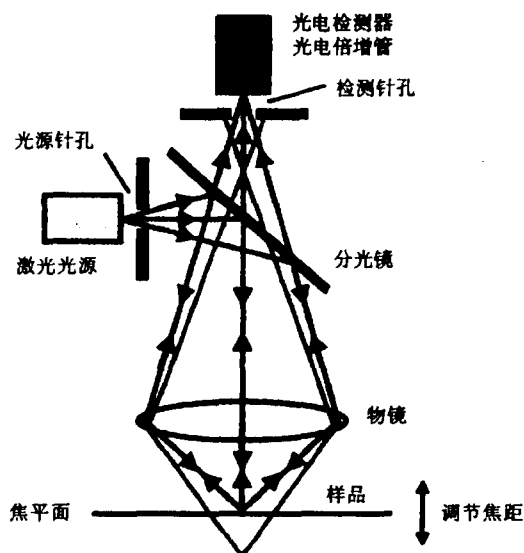


图1 LSCM 光学原理

激光扫描共聚焦显微镜的基本结构包括三部分:光学显微镜、共聚焦装置和计算机系统(见图 2)。LSCM 是点成像,扫描装置将标本逐点扫描,形成完整的二维标本信息,经微型计算机采集、储存、处理和转换合成为二维图像。当沿着显微镜光轴方向调节载物台做微位移,扫描不同焦平面的二维图像,可由计算机进行数据处理构建扫描标本的三维图像,即三维重建。LSCM 的激光光源强度、针孔光阑孔径、X-Y 扫描过程和焦距步进马达由操作者通过计算机同步控制。根据不同用途选用相应数据软件进行数据处理,仪器软件包含静态分析软件、动态测量软件和特殊软件等三类。

### 3 激光扫描共聚焦显微镜在生物学中的应用

众所周知,光学显微镜是研究生物医学形态学的主要工具,从 1590 年问世以来,经历了由简陋的光学仪器到复杂的光机电一体化精密仪器的几百年演变,它为人们了解显微世界开启了一扇

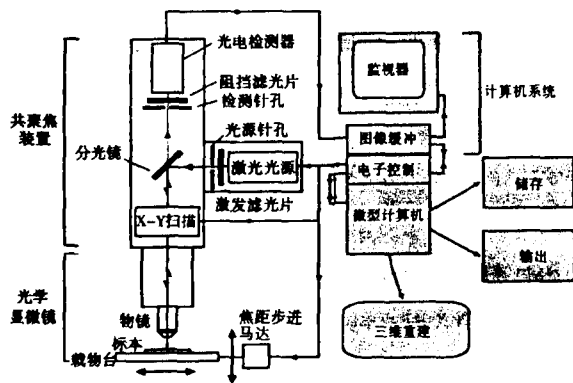


图2 LSCM基本结构

随之而生的组织染色技术,免疫组化技术、免疫荧光组化技术日臻完善,成为当今生物医学研究的重要手段。LSCM 秉承了普通光学显微镜的技术优势,并利用免疫荧光组化技术、荧光原位杂交技术和激光扫描共聚焦技术,在分子生物学、分析细胞学、组织学、病理学、免疫学、肿瘤学及基础研究等各个领域有着广泛的应用前景。

**3.1 图像处理功能包括组织光学切片、三维重建、细胞物理和生物化学测定;荧光定位定量分析;Ca<sup>2+</sup>、pH 细胞内离子实时测量**

激光扫描共聚焦图像分析是借助激光共焦系统,获得高反差、高分辨率、高灵敏度生物标本的二维图像。可得到完整细胞及组织的系列光切片,从而得到各层面的二维信息,通过三维重建后揭示亚细胞的结构,将各光学切片的数据组合成一个真实的三维图像,并可直观的进行形态学观察,产生生动逼真的三维效果。测定细胞光学切片的物理、生物化学特性的变化,定性、定量、定时及定位分析 DNA 含量、RNA 含量、分子扩散、胞内离子等动态指标。

定位定量荧光分析可进行重复性极佳的低光探测及活细胞荧光分析。利用这一功能既可对单个细胞或细胞群的溶酶体,线粒体、DNA、RNA 和受体分子含量、成分及分布进行定性及定量测定,还可测定诸如膜电位和配体结合等生化反应程度。另外,还适用于高灵敏度快速的免疫荧光测定,这种定量可以准确监测抗原表达,荧光原位杂交斑点、细胞结合和杀伤及定量的形态学特性。激光扫描共聚焦显微术在组织微阵列技术中得到充分应用,组织微阵列技术包括基因芯片技术、免疫芯片技术等,是当今生物医学领域新兴的研究

手段,可用于基因表达、验证新基因的特异表达、突变体与多态性的检验。

Ca<sup>2+</sup>、pH 及细胞内离子实时测定是对样品的点、线或二维图像扫描,测量单次、多次单色、双发射和三发射光比率,使用各种荧光探针对各种离子作定量分析,可以直接得到大分子的扩散速率,能定量测定细胞溶液中 Ca<sup>2+</sup> 对肿瘤启动因子、生长因子及各种激素等刺激的反应,以及使用双荧光探针进行 Ca<sup>2+</sup> 和 pH 的同时测定,完成活细胞生理信号的动态监测。

**3.2 细胞生物学功能包括粘附细胞的分选、激光显微外科及光陷阱技术、荧光漂白恢复技术、胞间通讯研究、胞膜流动性研究、光活化技术**

粘附细胞分选对培养皿底的粘附细胞有两种分选方法:(1)Coolie-Cutter TM 法,首先将细胞贴壁培养在特制培养皿上,然后用高能量激光的欲选细胞四周切割成八角形几何形状,而非选择细胞则因在八角形之外而被去除,该分选方式特别适用于选择数量较少诸如突变细胞、转移细胞和杂交瘤细胞。(2)Ablation 法即激光消除法,该方法基于细胞形态及荧光特性,用高能量激光自动杀灭荧光染色的细胞,留下完整未经荧光染色细胞亚群继续培养,此方法特别适于对数量较多细胞的选择。

细胞激光显微外科及光陷阱技术是将激光当作“光子刀”使用,借此来完成细胞膜瞬间穿孔、切除线粒体、溶酶体等细胞器,染色体切割、神经元突起切除等一系列细胞外科手术。光陷阱即光钳,通过光陷阱操作来移动细胞的微小颗粒和结构。此项技术广泛用于细胞融合术。

荧光漂白恢复 (FRAP) 技术是借助高强度脉冲式激光照射细胞某一区域,造成该区域荧光分子的光淬灭,该区域周围的非淬灭荧光分子将以一定速率向受照区域扩散,可通过低强度激光扫描探测此扩散速率。由此而揭示细胞结构及相关的机制,用以细胞骨架、核膜及大分子。

在胞间通讯方面的研究,动物细胞中由缝隙连接介导的胞间通讯被认为在细胞增殖和分化中起非常重要的作用。测定相邻植物和动物细胞之间细胞间通讯,测量由细胞缝隙连接介导的分子转移,研究肿瘤启动因子和生长因子对缝隙连接介导的胞间通讯的抑制作用,以及胞内 Ca<sup>2+</sup>、pH 和 cAMP 水平对缝隙连接的调节作用。

细胞膜流动性测定是通过专用的计算机软件对细胞膜的流动性进行定量、定性分析。荧光膜探针受到极化光线激发后,发射光极性依赖于荧光分子的旋转,这种有序运动的自由度依赖于荧光分子周围的膜流动性,因此极性测量间接反映细胞膜流动性。这种膜流动性测定在膜的磷脂酸组成分析、药物效应和作用位点、温度反应测定和物种比较等方面有重要作用。

用于光活化技术,许多重要的生活物质都有其笼锁化合物,在处于笼锁状态时,其功能被封闭,而一旦被特定波长的瞬间光照射后,光活化解笼锁,使其恢复原有活性和功能,在细胞的增值、分化等生物代谢过程中发挥功能。人为控制这种瞬间光的照射波长和时间,可以达到人为控制多种生物活性产物和其他化合物在生物代谢中发挥功能的时间和空间作用。

虽然激光扫描共聚焦显微镜问世时间不长,

但在生物医学领域已得到广泛应用,为研究者提供了先进的研究手段和方法,然而由于该仪器价格昂贵,其使用的普及受到一定限制。相信随着科学技术的不断进步,激光扫描共聚焦显微镜的性能价格比也会不断提高,成为每个生物医学研究者的手中利器。

#### 参考文献

1. Wilson T. Sheppard C. Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy. London: AcadPress, 1984
2. Brian M. Theresa K. Theory and applications of confocal microscopy. Cell Vision, 1994; 1: 190 ~ 198
3. Morgan G. Fluorescence decay-time imaging. Journal of microscopy, 1992; 165: 48 ~ 60
4. 李楠等. 激光扫描共聚焦显微术. 北京: 人民军医出版社, 1997
5. 刘连新组织微阵列技术原理及其在肿瘤研究中的应用. 国外医学: 肿瘤学分册, 2000; 27: 83 ~ 84
6. 陈耀文等. 激光扫描共聚焦显微镜系统及其在细胞生物学中的应用. 激光生物学报, 1998; 7: 2

## The Laser scanning Confocal Microscopy and The Applications in Bio-medical sciences

Xing Jun

(Center of Experiment Tianjin Medical University Tianjin 300070)

**Abstract** This paper introduces the fundamentals and structure of the laser scanning confocal microscopy, also reports its applications in the field of bio-medical sciences.

**Key words** Laser Confocal microscopy bio-medical

## 天津市中津光谱仪器技术开发部

(天津市光学仪器厂)

本部是天津市光学仪器厂设立在天津市高科技产业园区的对外窗口, 主要生产经营红外、紫外分光光度计及各种药典仪器并对武进科诺电子设备公司的所有产品在华北地区进行总代理。

联系地址: 天津市南开区鞍山西道 346 号 联系人: 顾永法 刘令淦

联系电话: 022-28340693、28181188、27414427、013902155261 邮编: 300193

产品型号	产品名称	产品价格(元)
KDW-300SMT	扰动双波峰焊机	98000
KN-5	联合式浸焊机	7800
KN-105	全自动散带合并电阻成型机	18000
KC-300A	超声波清洗机	4800
备注: 各种型号生产线如: 插件线、皮带生产线、滑板总装线、总装老化线、悬挂输送线及涂装、喷粉设备		
TJ270-30	红外分光光度计	126000
WFZ-25A	紫外分光光度计	68000
WFZ-39	紫外分光光度计	29800
WX-5	便携式看谱镜(光谱仪)	9980
FW-4	压片机(15吨)	5800
YB-1A	真空恒温干燥箱	4800
YB-II	澄明度检测仪	1500
HF-8	固定液体池	1400

备注: 各种红外附件及红外窗片