

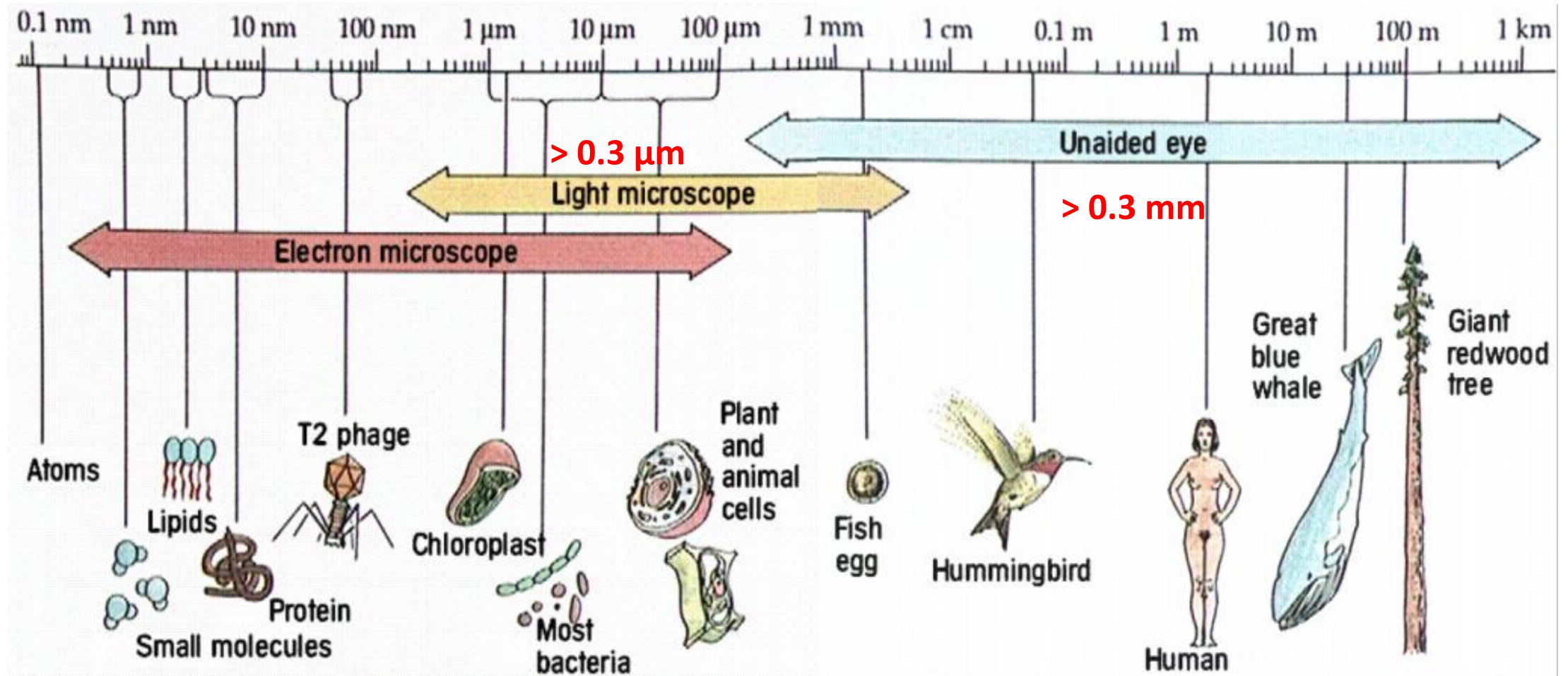
显微镜成像理论及应用

航海医学研究所

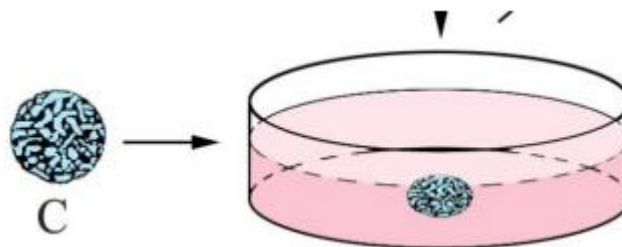
2017.10.19

丁玲芝

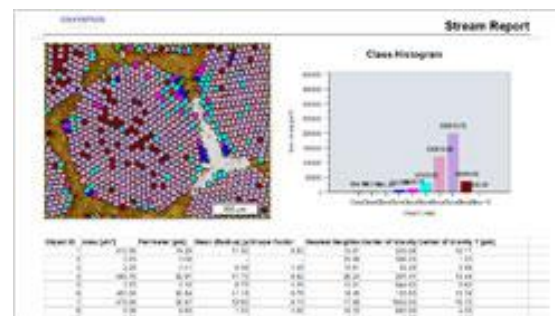
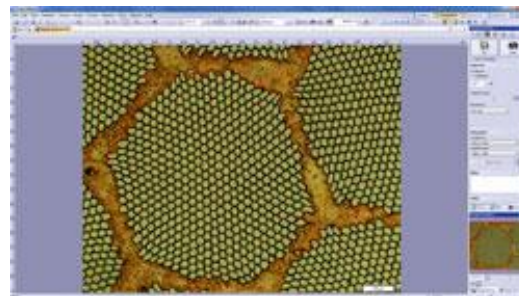
肉眼、光学显微镜和电子显微镜所能观察到物体大小范围（空间分辨率）



显微成像步骤



- 样品制备
- 图像采集
- 图像分析
- 统计并结果分析



光学显微镜

• 光学显微镜(Optical Microscope)是利用光学原理，把人眼所不能分辨的微小物体放大成像，以供人们提取微细结构信息的光学仪器。

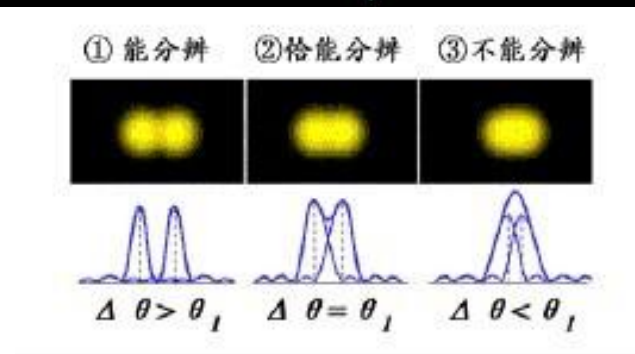
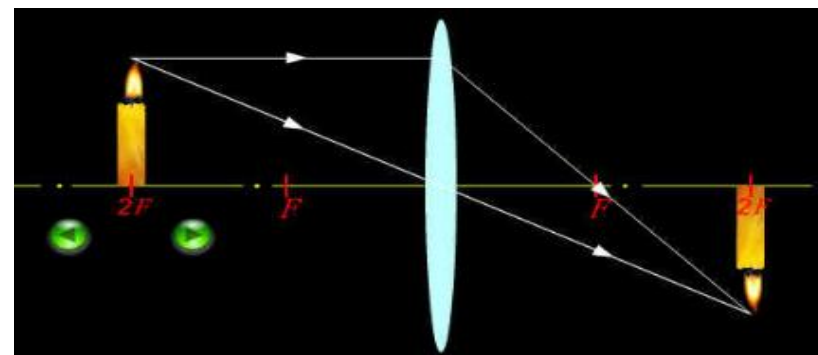
• 看清细小结构的3个必需条件：

(1) 放大

(2) 分辨率：能够分辨两点之间的最小距离

(3) 反差：辨认已经被放大

和具有一定分辨率的细节

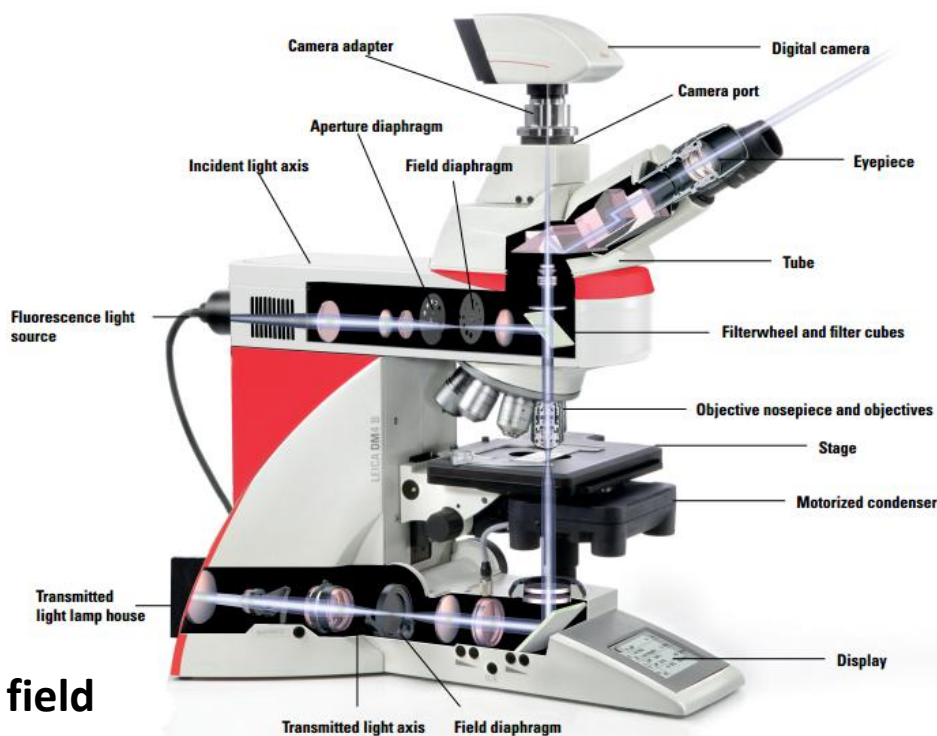


光学显微镜的分类

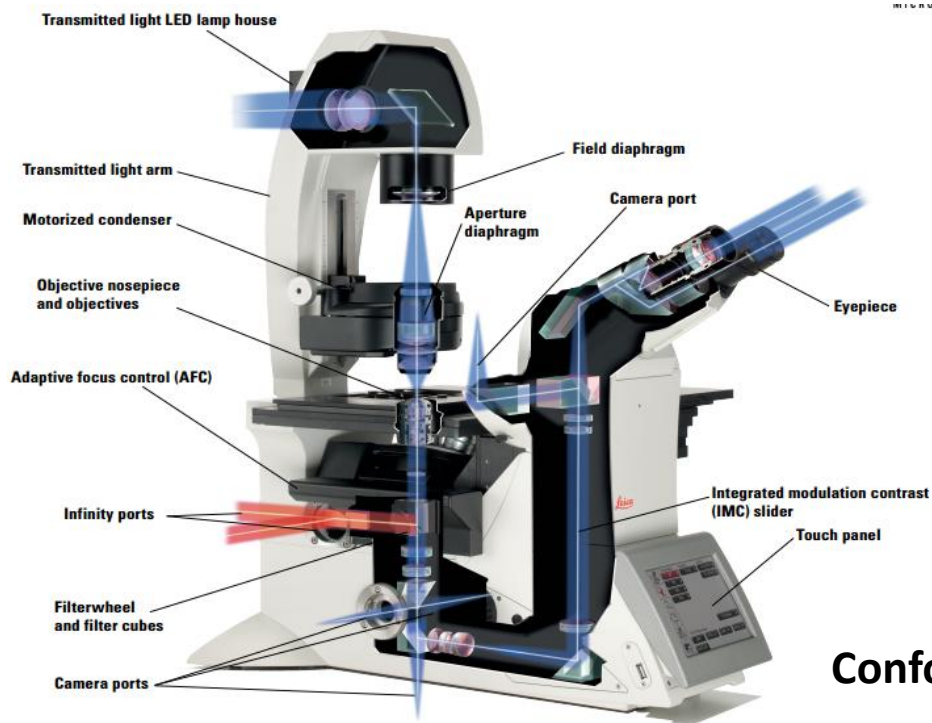
- 正置显微镜、倒置显微镜和体视显微镜，前两者又称**复合式显微镜**。
- 宽场显微镜和共聚焦（激光扫描）显微镜。

正置显微镜

Wide field



倒置显微镜



Confocal

复合式显微镜

- 复合式显微镜：

物镜通常由多个凸透镜和凹透镜组成。

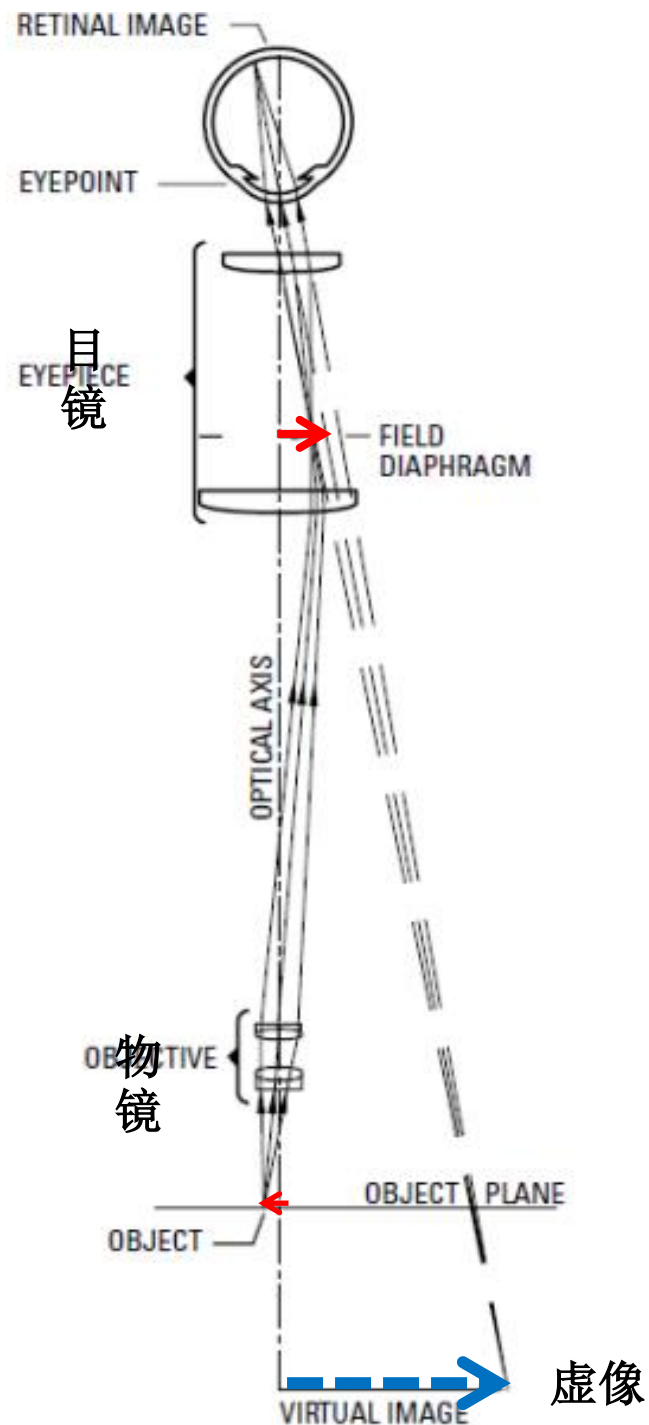
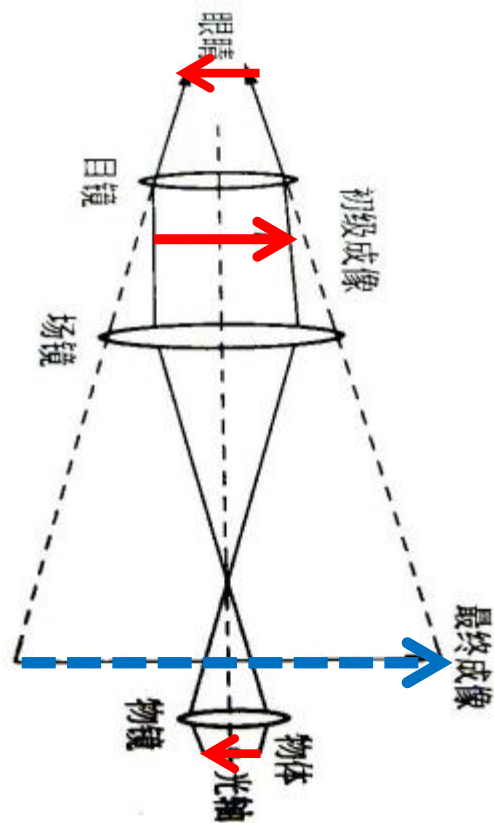
- A. 校正色差。

因为不同颜色的光有不同的折射率；

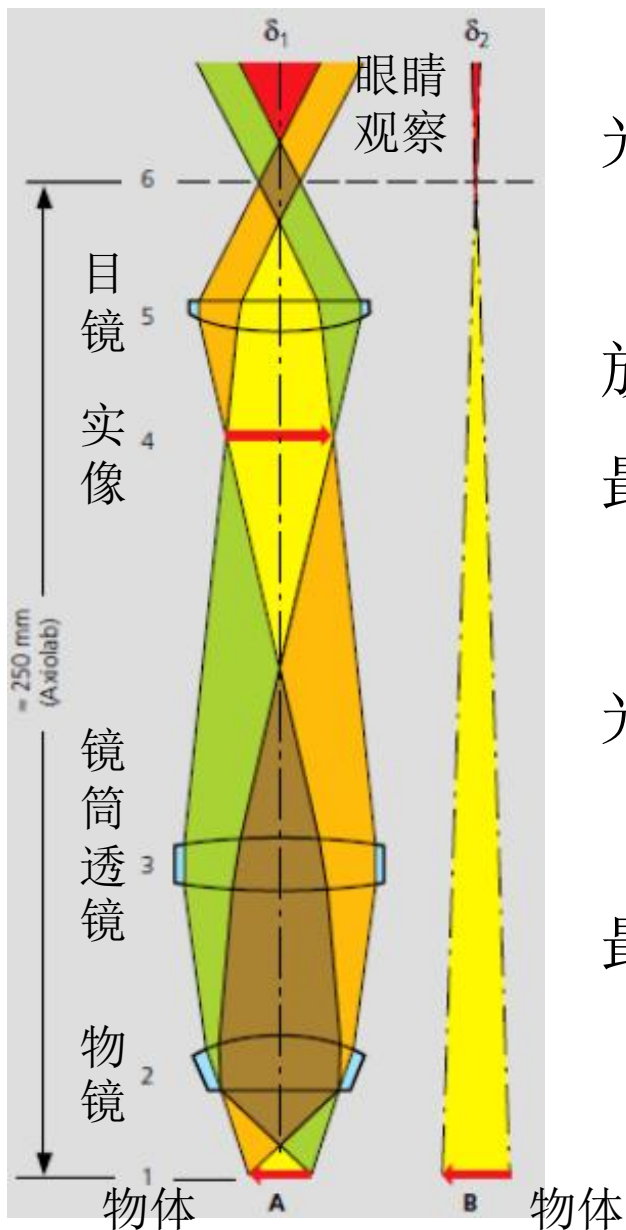
- B. 放大镜的放大倍数

有局限：8-10倍不可能。

- 科勒照明Koehler Illumination
(二次成像)



显微镜如何放大物体？



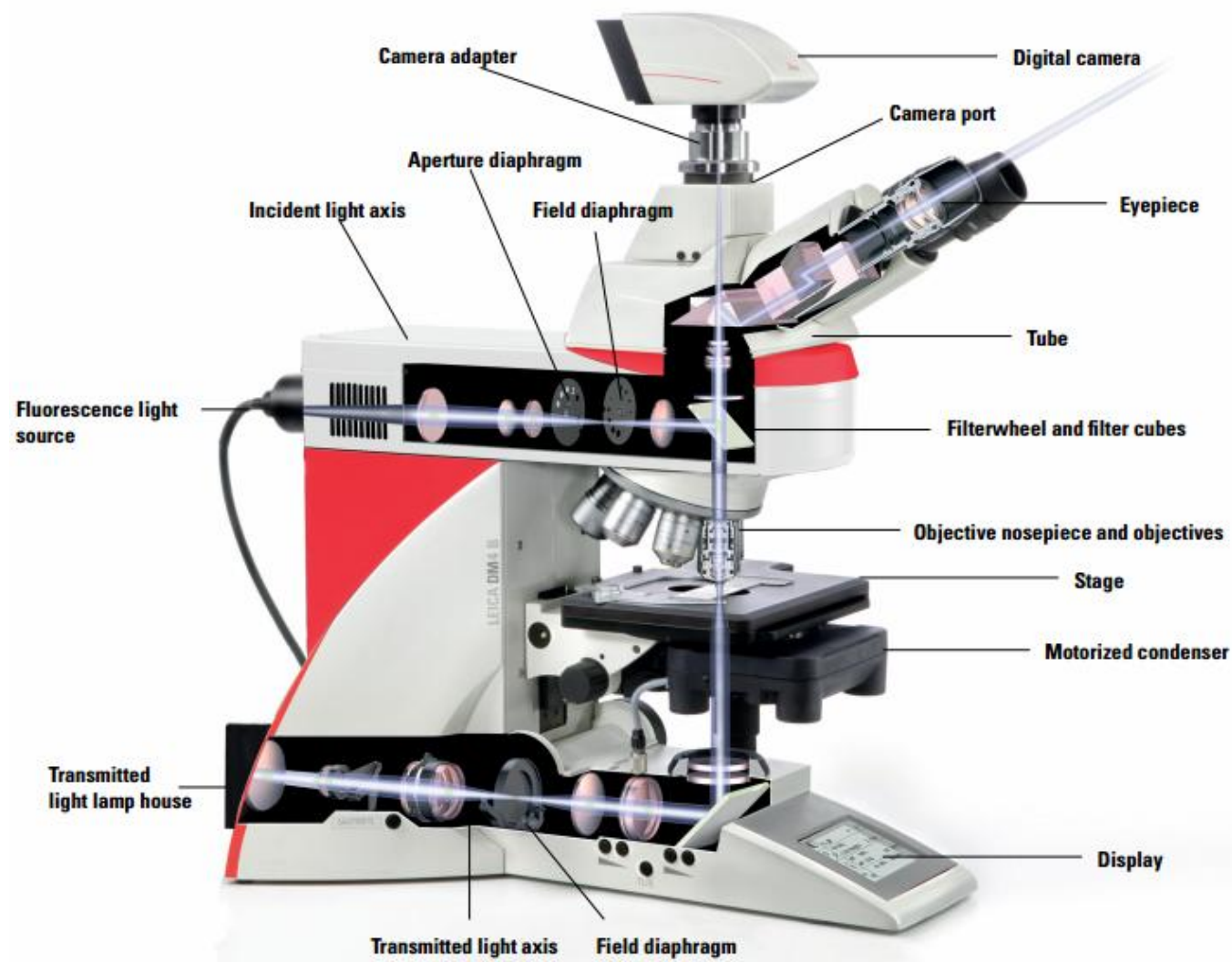
光路A:

物体 ← 经过物镜（2）以及镜筒透镜（3）产生一个放大实像（4），此实像再经过目镜（5）收集，最后被肉眼观察到（6）。

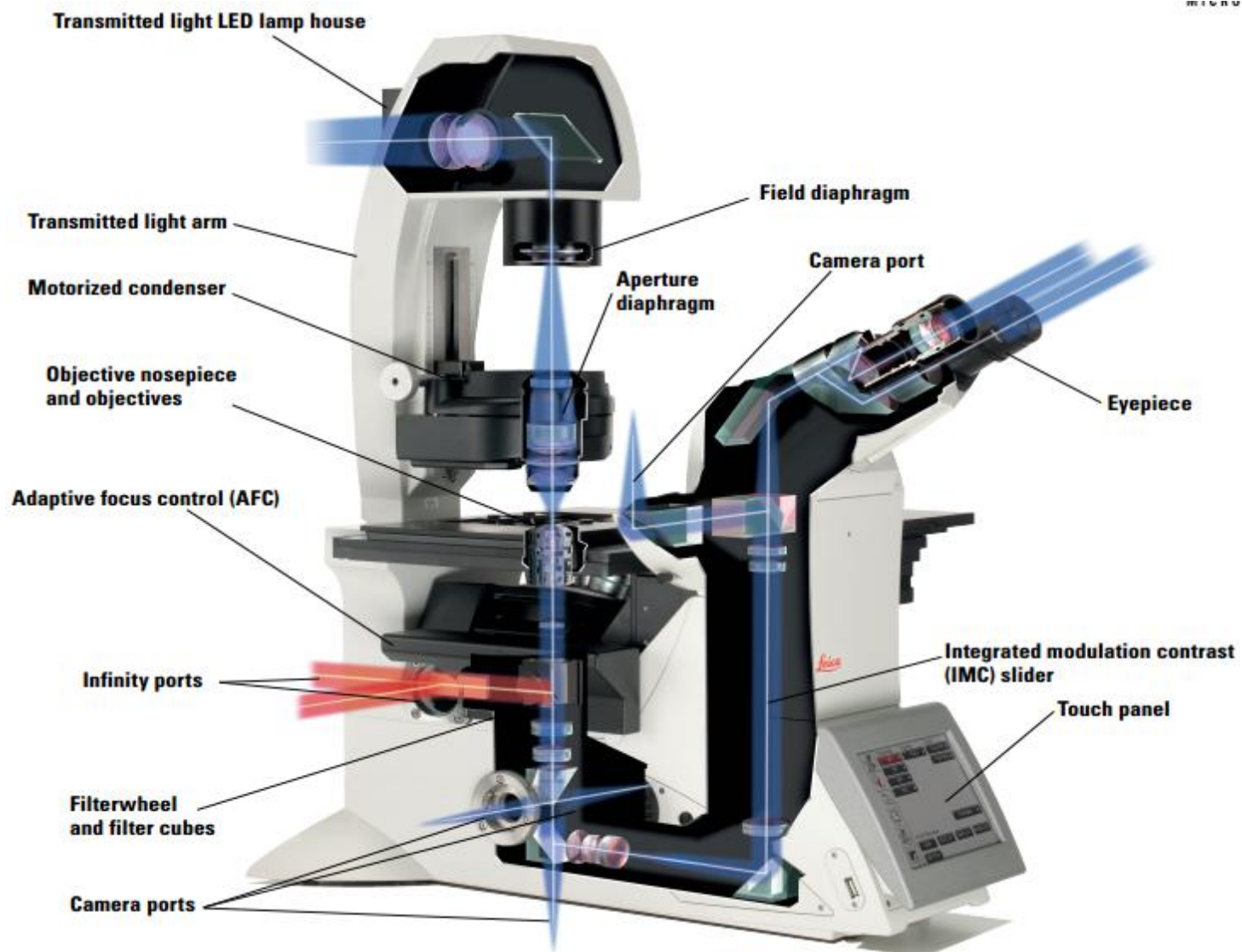
光路B:

物体 ← 直接在25cm 长的距离内被眼睛观察到。
最后这两个经不同光路A、B观察到的实像大小不同。

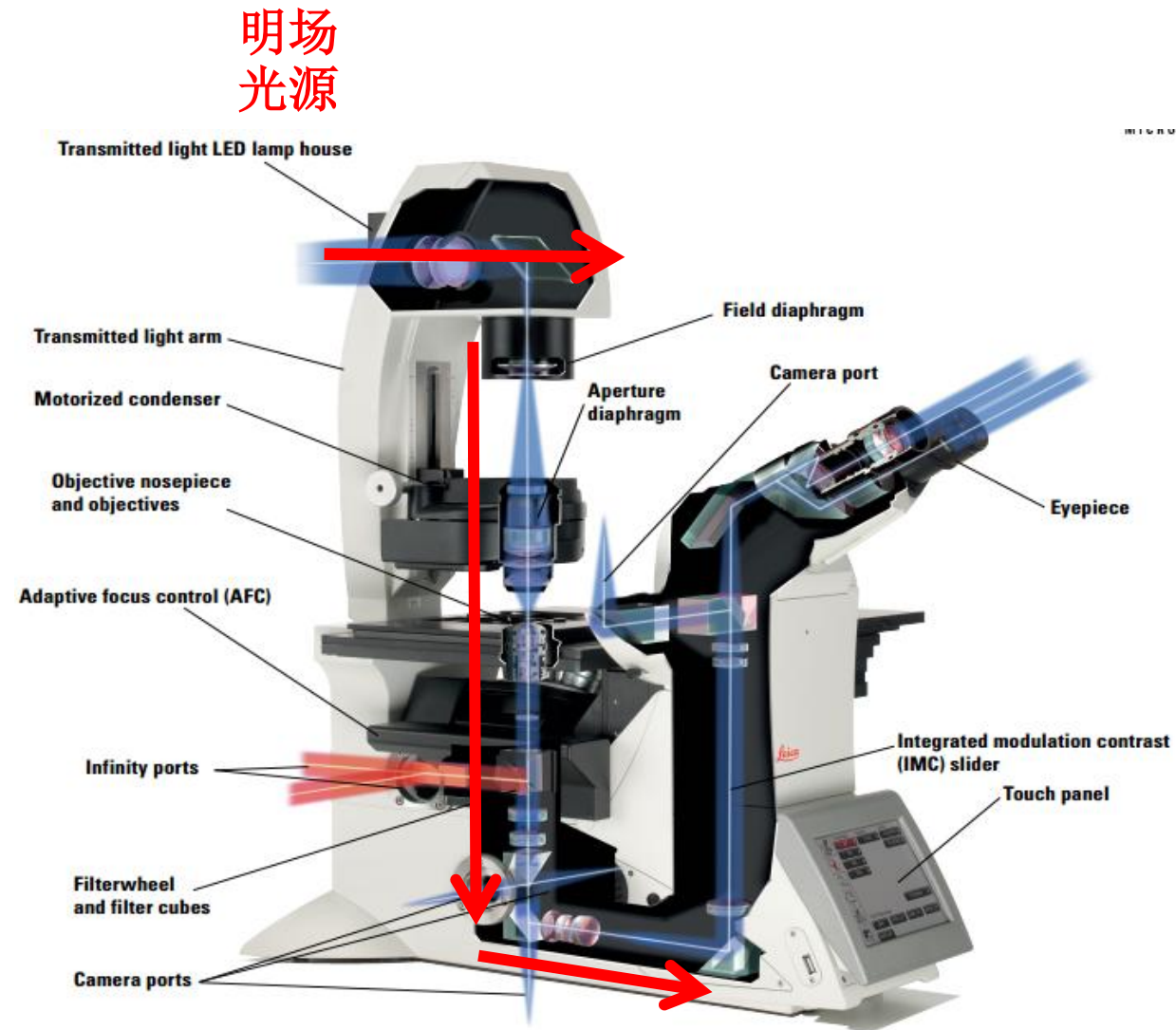
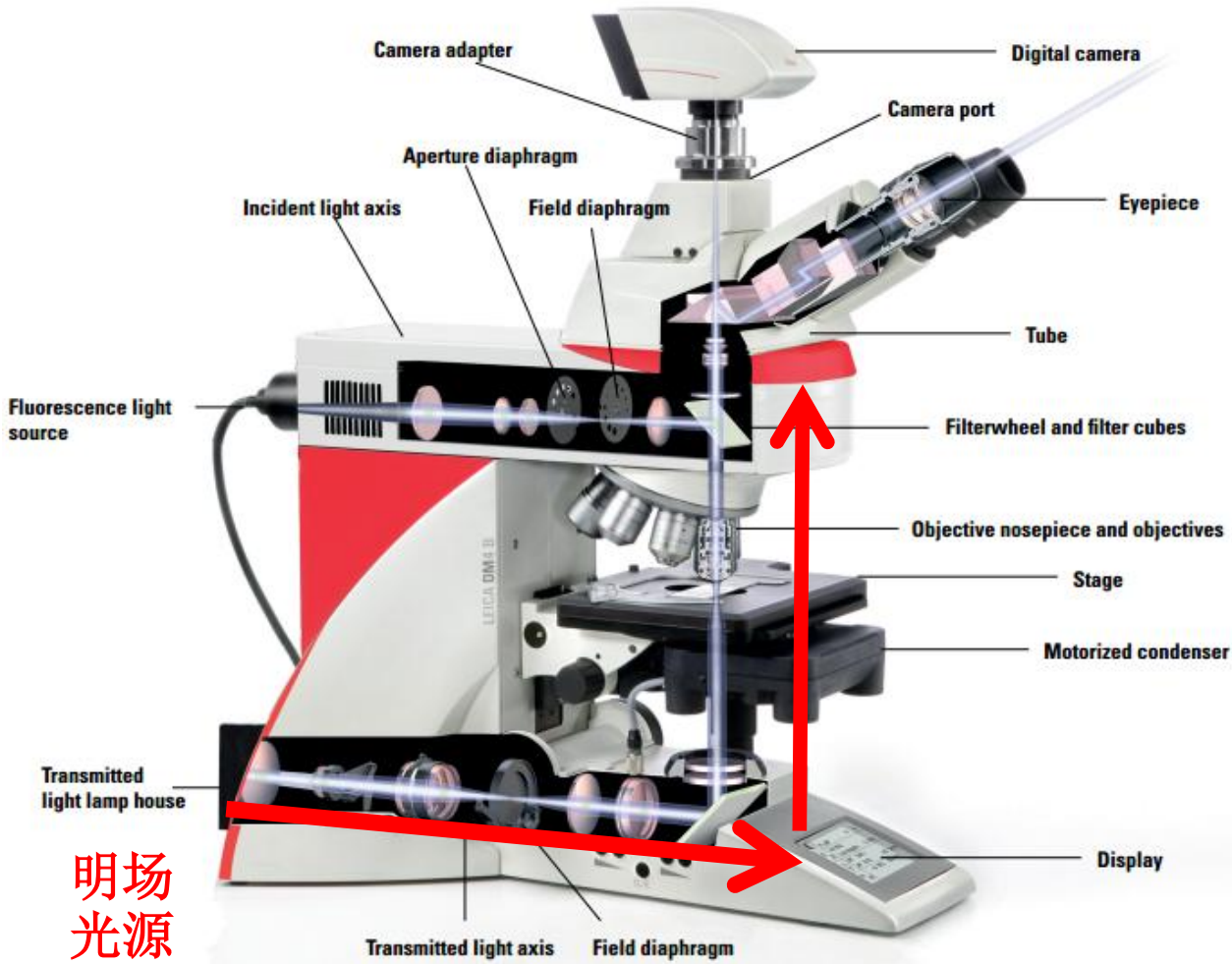
正置显微镜构造



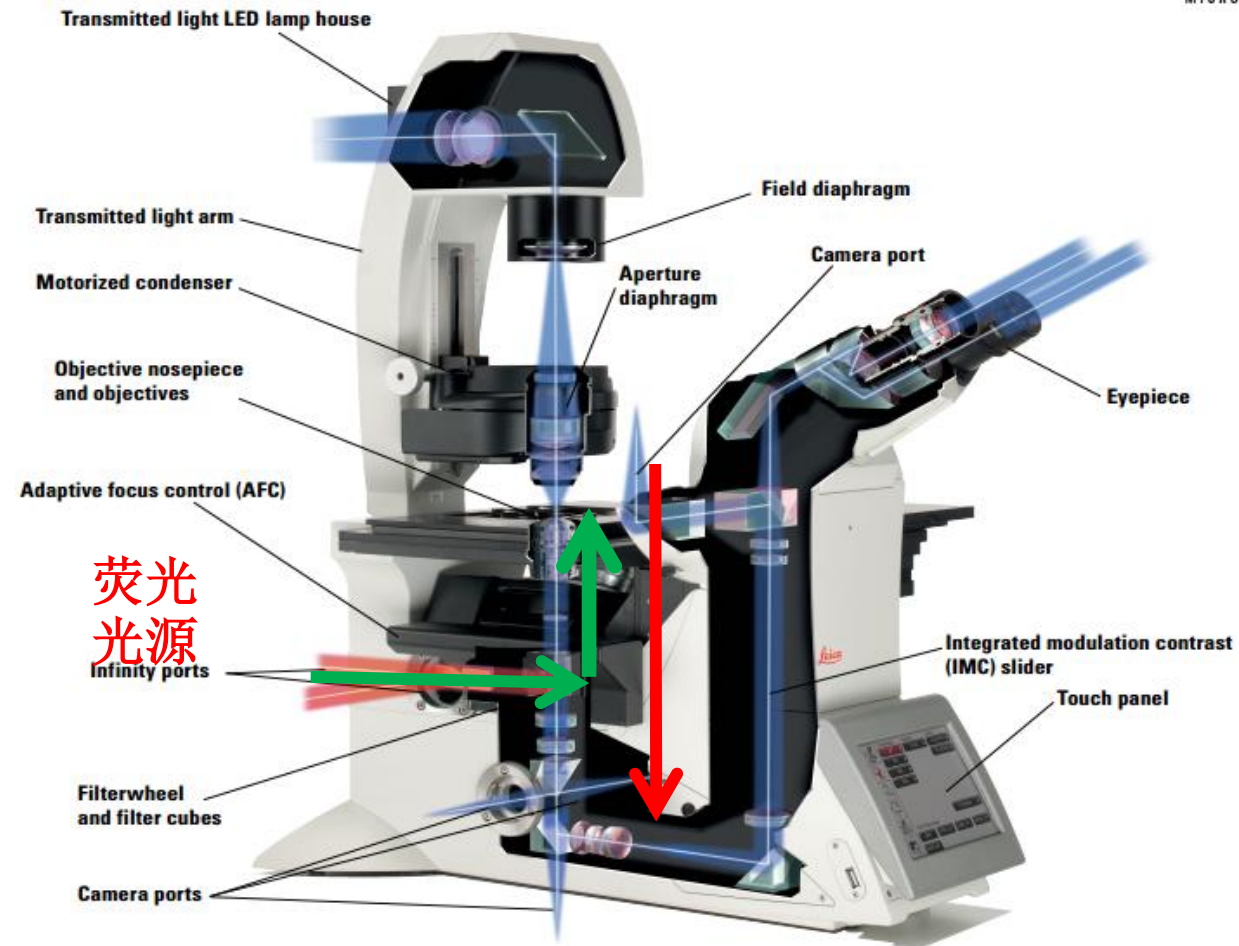
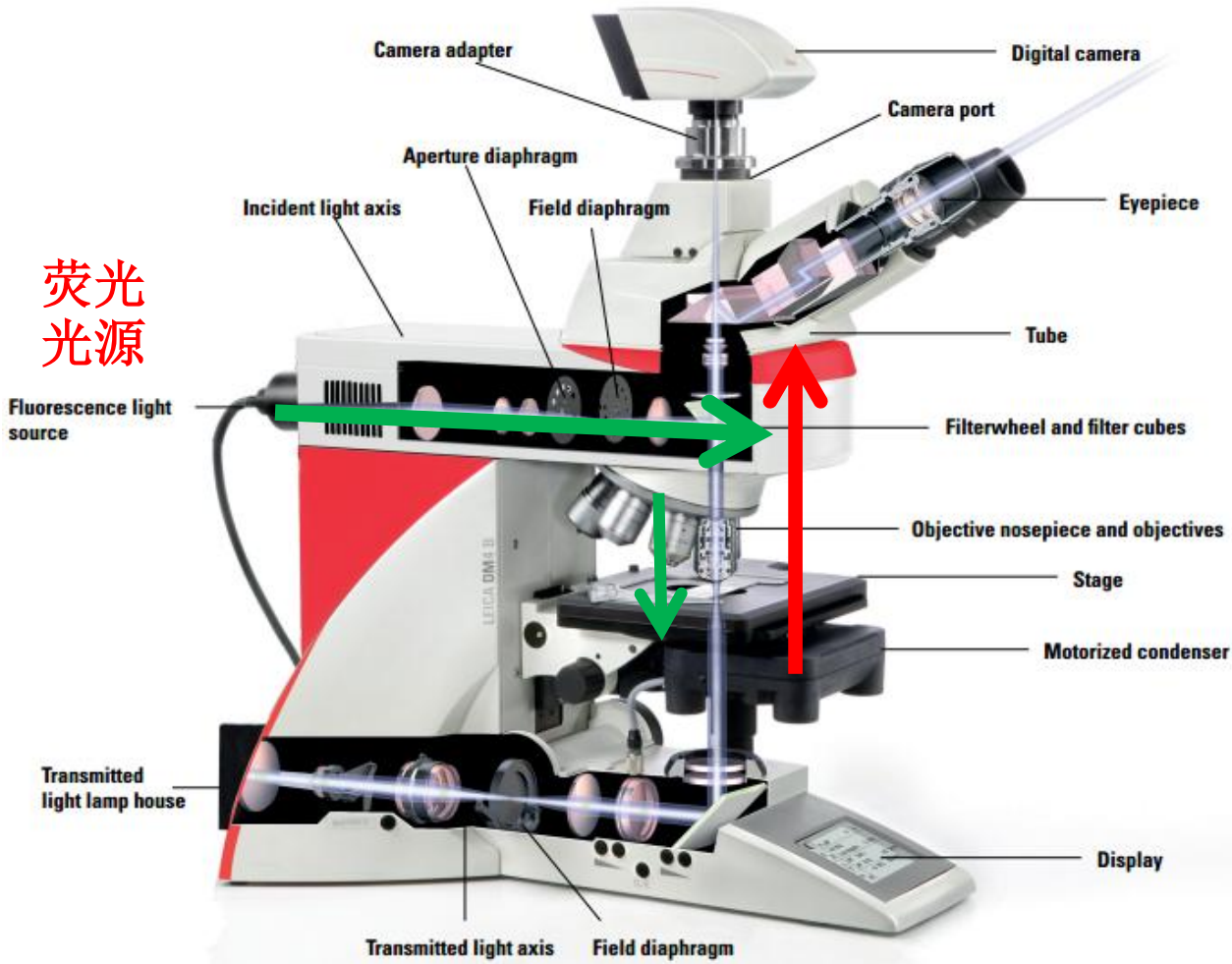
Confocal 显微镜构造



显微镜明场光路示意图



显微镜荧光光路示意图



显微镜部分组件的认识

• 物镜（聚光镜）的标识

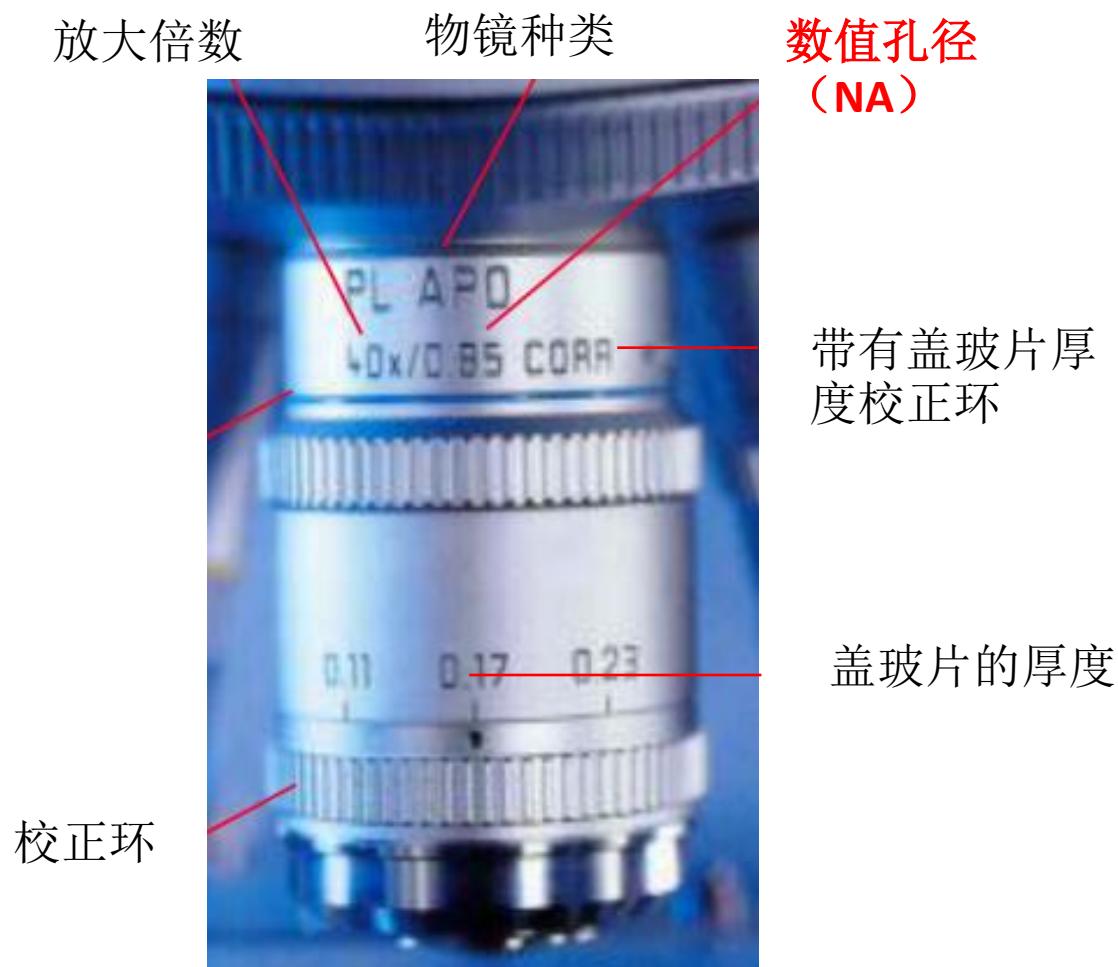
介质

Oil 油镜，需镜油作为介质

W 水镜

IMM 浸镜，需水，油或甘油

DRY 干净，不需任何介质



物镜的分类

一般物镜种类：消色差物镜，萤石（半复消色差）物镜，复消色差物镜



Manufacturer 生产厂家

Olympus: 奥林巴斯 Nikon: 尼康 Zeiss: 蔡司
Leica: 徕卡

Flat-Field correction 平场校正

Plan: 平场 校正场曲, 提高视场边缘成像质量

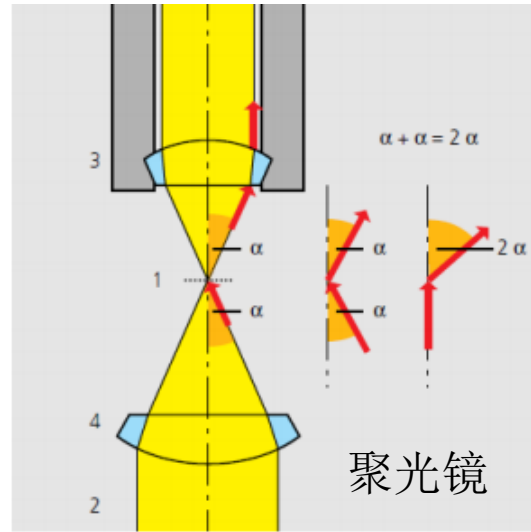
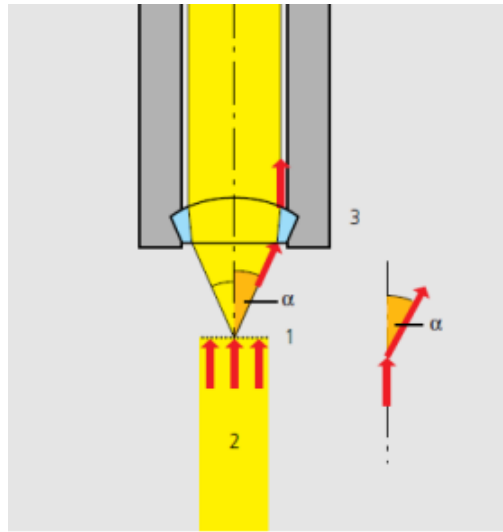
Aberration correction 象差校正

Ach: 消色差 校正光轴上的位置色差（红和蓝光）、球差（黄绿光）和正弦差

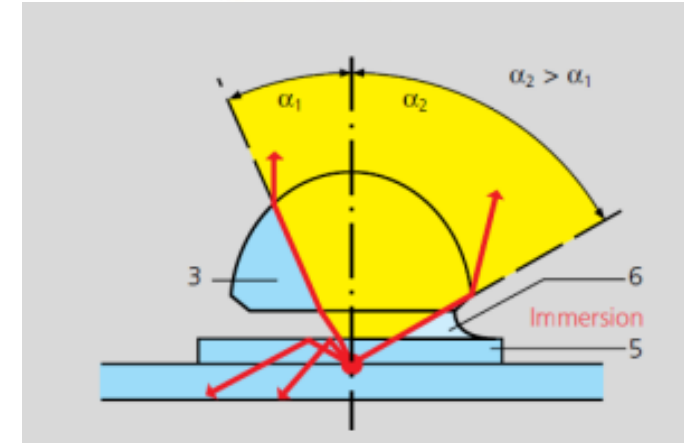
Apo: 复消色差 校正光轴上的位置色差（红和蓝）、球差（红和蓝光）和正弦差, 以及二级光谱（校正绿光的位置色差）

Fluor: 萤石（半复消色差） 成像质量介于消色差物镜和复消色差物镜之间

数值孔径（Numerical Aperture, NA）



$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$



数值孔径（**NA**）：由物镜所覆盖的角度的量度。
表征物镜的聚光能力。

$$\text{Numerical Aperture} = \text{N.A.} = n \cdot \sin \alpha$$

α is half the opening angle of the objective.

n is the refractive index of the immersion medium used between the objective and the object.

($n = 1$ for air; $n = 1.51$ for oil or glass)

此外，可以在物镜前端和盖玻片之间加入浸液来提高分辨率。

分辨率（Resolution）：

$$d_0 = \frac{1.22\lambda}{\text{N.A.}_{\text{obj.}} + \text{N.A.}_{\text{Cond}}} \quad \text{or more simply } d_0 = \frac{\lambda}{2\text{N.A.}}$$

λ = wavelength of light, e.g. 550 nm (green)

数值孔径越大，物镜的分辨率就越高！

某些显微镜物镜分辨率

$$d_0 = \frac{1.22\lambda}{N.A._{\text{obj.}} + N.A._{\text{Cond}}} \quad \text{or more simply } d_0 = \frac{\lambda}{2N.A.}$$

λ = wavelength of light, e.g. 550 nm (green)

Resolution table using green light with
 $\lambda = 0.550 \mu\text{m}$:

Magnification	/	NA	Resolution (μm)
10x	/	0.30	1.10
40x	/	0.75	0.45
63x	/	1.40 Oil	0.24
100x	/	1.30 Oil	0.26

图像分辨率 VS 景深

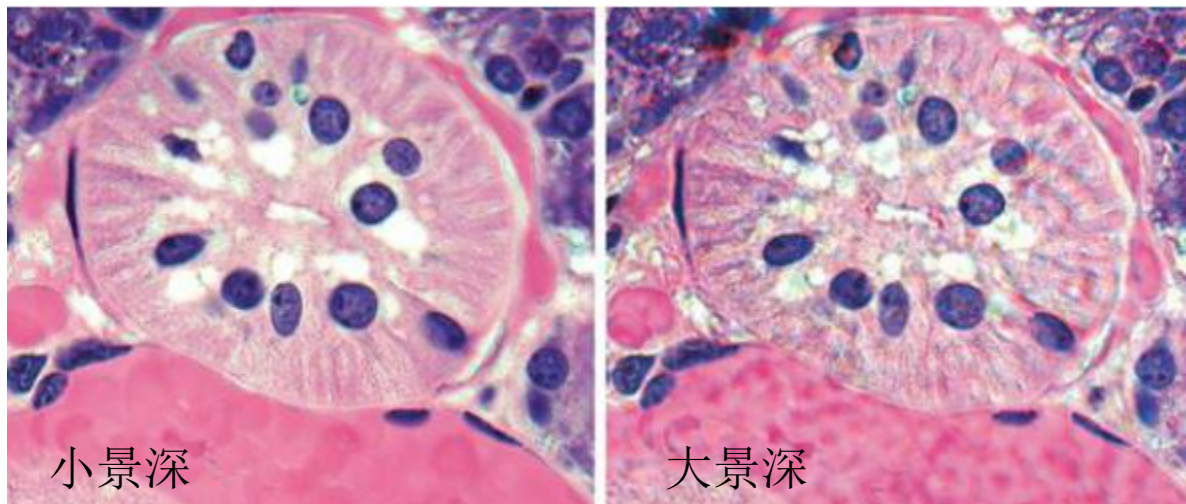
1. 景深

在聚焦完成后，在**焦点前后的范围**内都能形成清晰的像，这一前一后的距离范围，叫做景深。

2. 图像分辨率

指图像中存储的**信息量**，是每英寸图像内有多少个像素点，分辨率的单位为PPI (Pixels Per Inch)，通常叫做:像素每英寸。

数值孔径越大，景深越小；物镜的分辨率越高。



景深和分辨率
按经验值设定

像素（pixel）与分辨率（resolution）

1. 像素（点）：

相机感光器件上的**感光最小单位**。

就像是光学相机的感光胶片的银粒一样。

记忆在数码相机的“胶片”（存储卡）

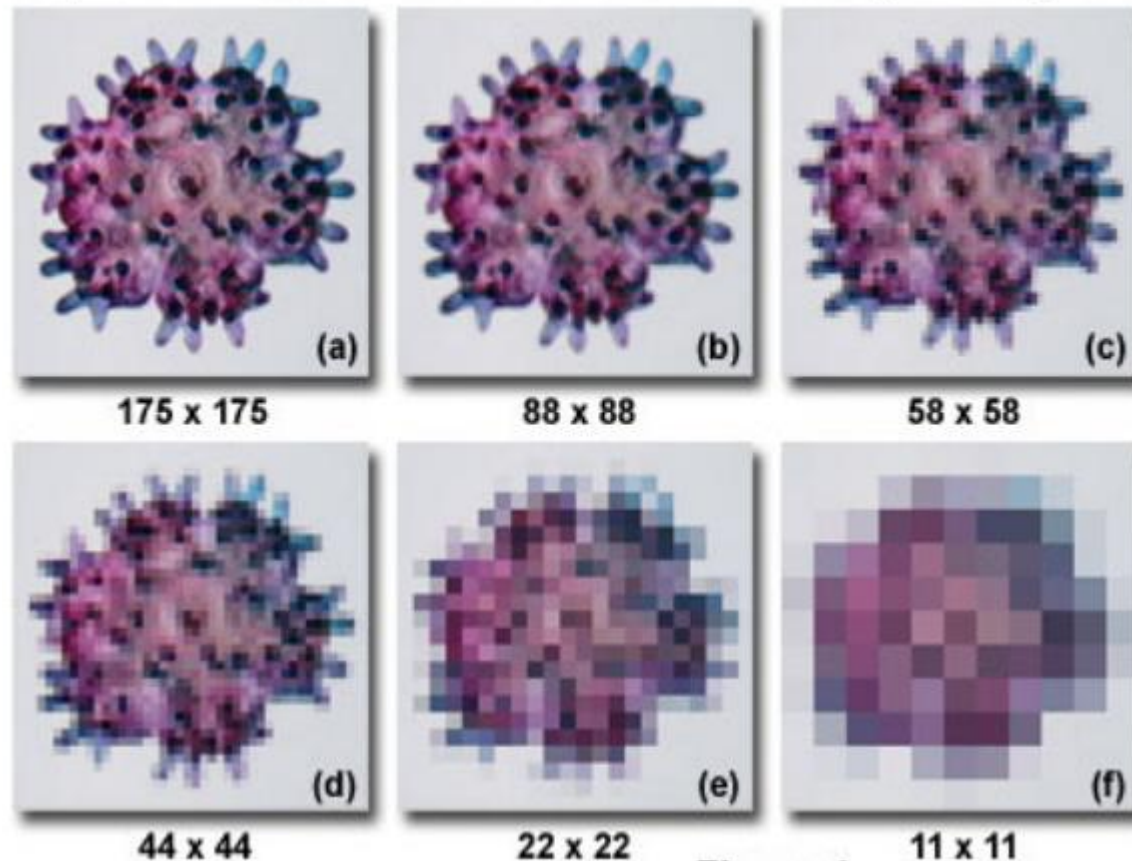
上的**感光点**就是“像素”；没有固定大小

2. 图像分辨率：

单位面积上的像素数，即“点密度”

单位：像素/英尺，PPI

Spatial Resolution Effect on Pixelation in Digital Images



目镜的标识

1.屈光度设定

2.目镜类别

Pl: 标准, W-Pl: 平面宽场, E-Pl: 超平面

3.放大倍数

10x, (16x, 20x)

4.视野

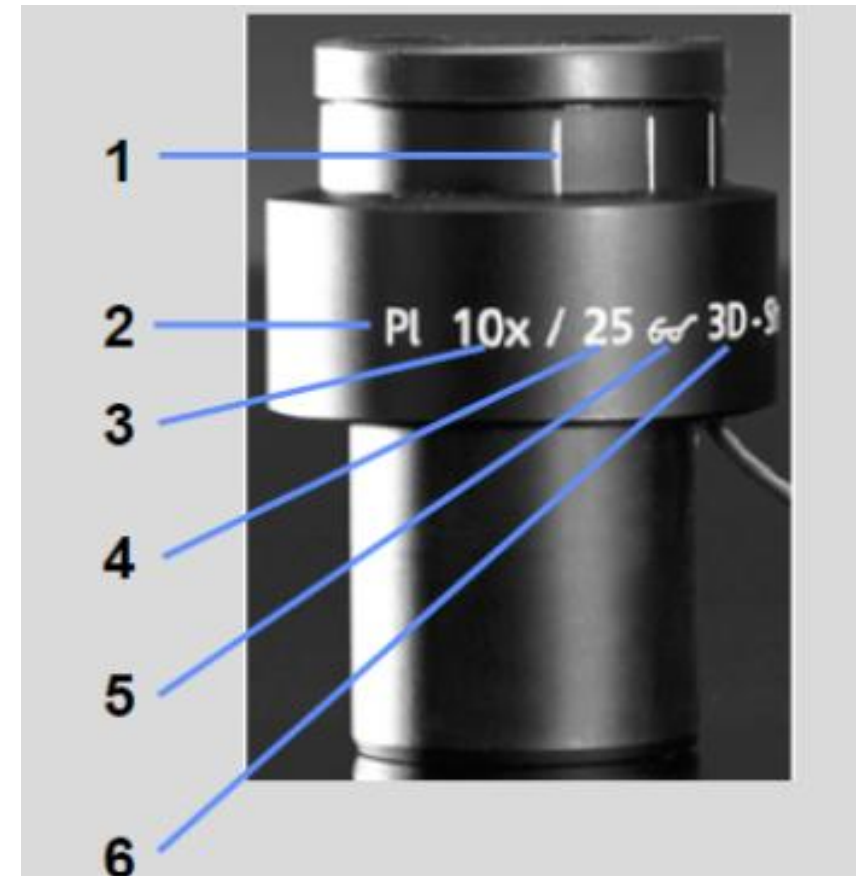
(16,) 18, 20, 23, 25 mm 中间图像直径

5.适合带戴眼睛的观察者

目镜上射出瞳径为17mm

6.其他信息

反差方式Pol, 3D



显微镜荧光滤色块

1. 滤色片组成份的典型光谱曲线

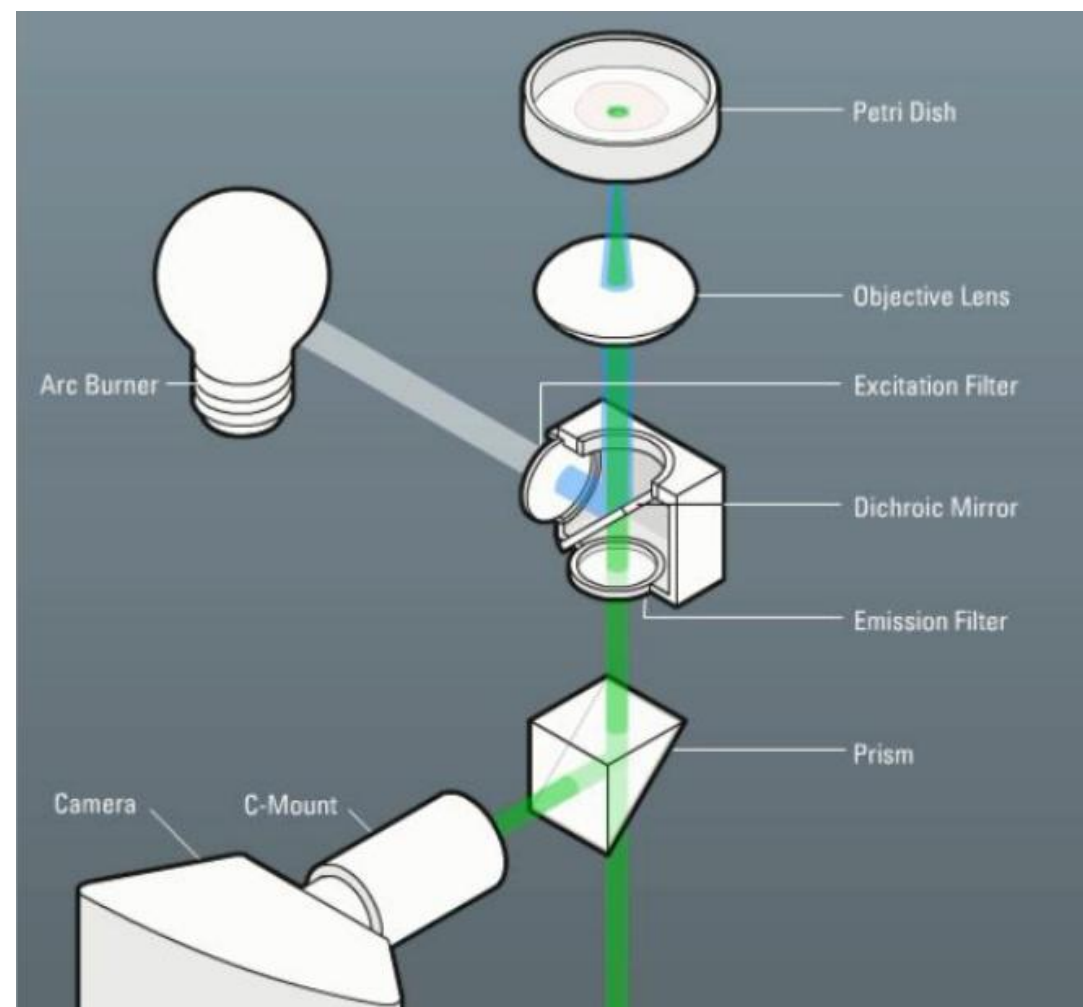
A. 激发滤色片

B. 发射滤色片

C. 半透半反滤光片（又称二向色镜）

2. 按透过光谱特性曲线分为

- 短波通过滤色片
- 长波通过滤色片
- 波段通过滤色片又可分为宽波段型和窄波段型



显微镜荧光滤色块

激发光 发射光

紫光 蓝
光 光



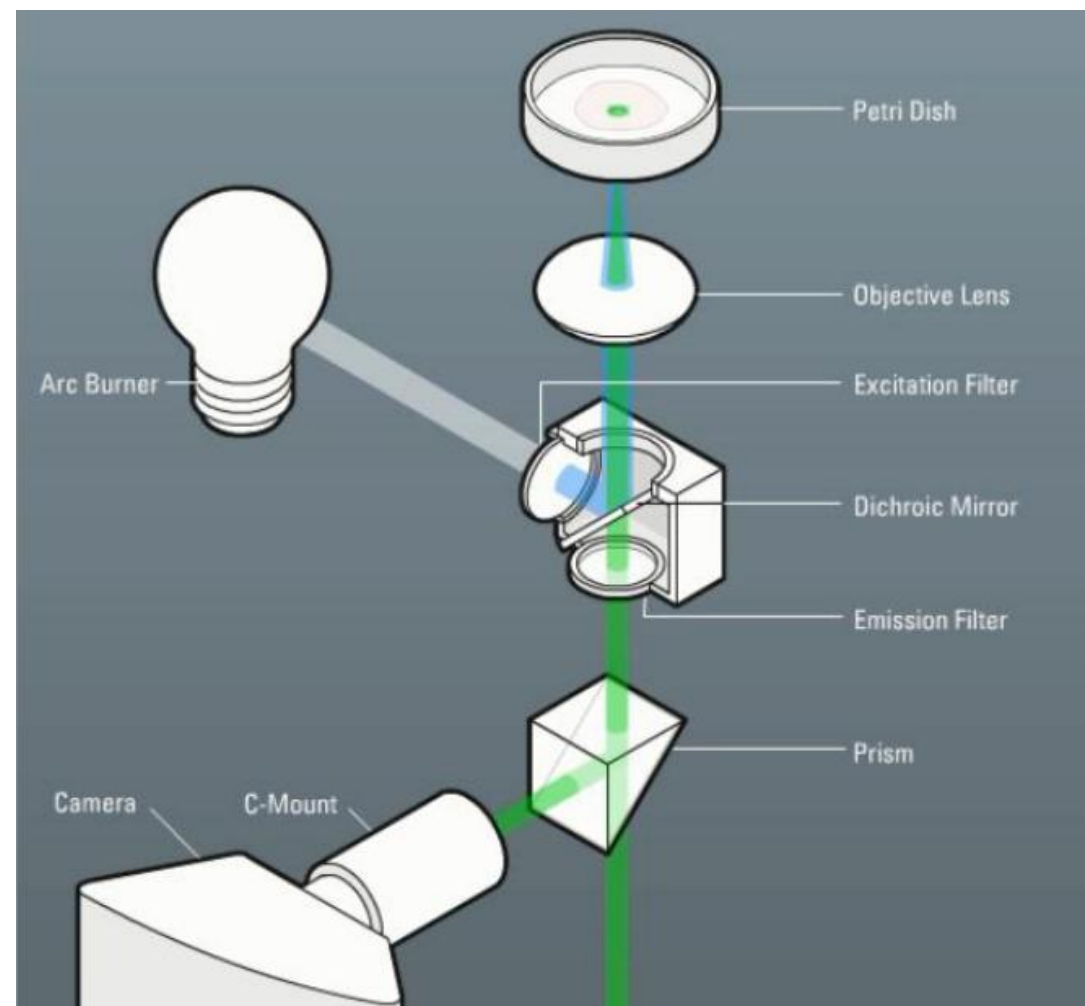
蓝光 绿
光 光



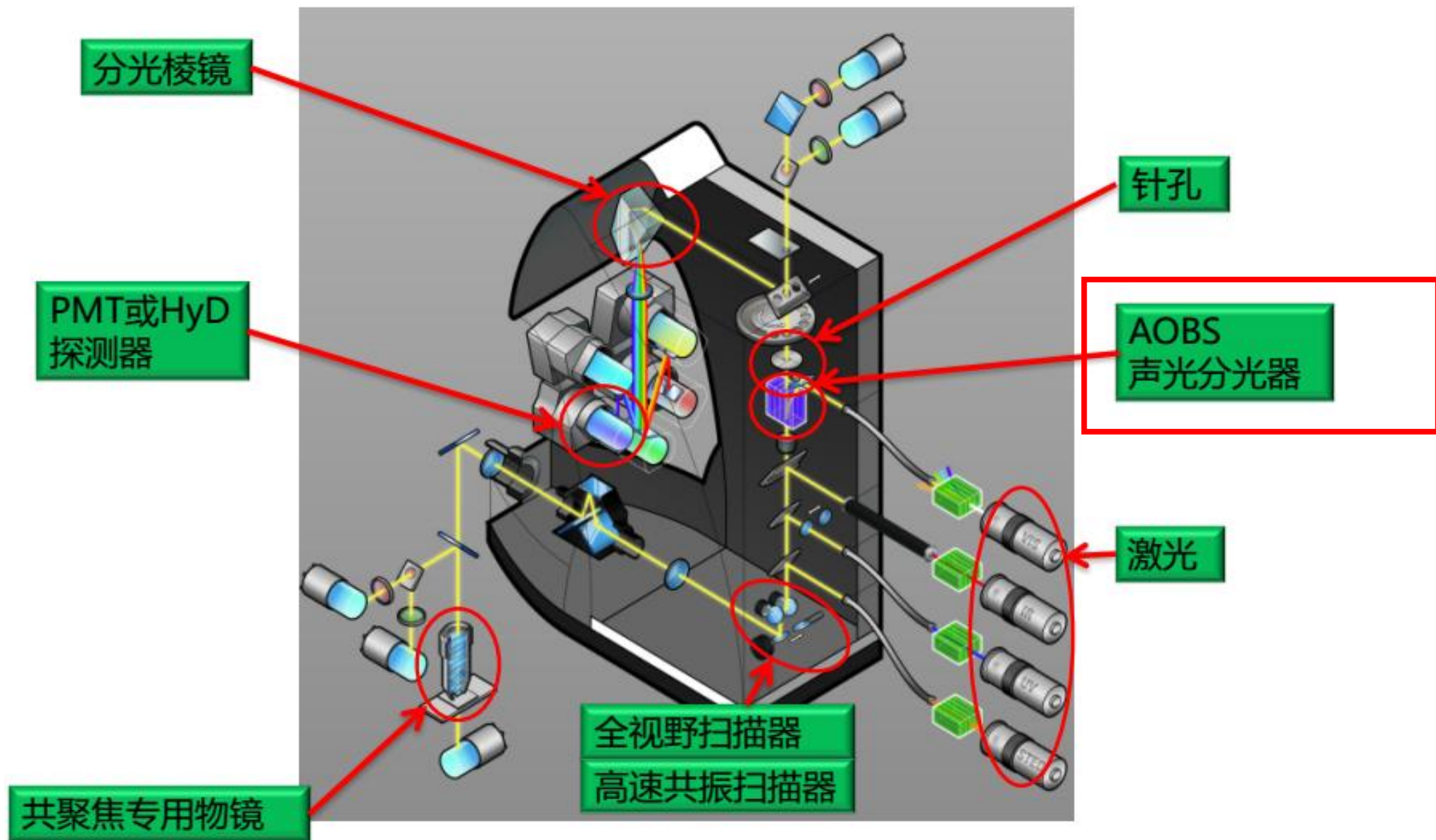
绿光 红
光 光



紫外光 蓝色
(淡蓝色)



Leica SP8 光路图



探测器——光信号转换成电荷信号

1. 单分子荧光显微镜最常用的探测器主要有以下三种：

光电倍增管（photomultiplier, **PMT**）

雪崩光电二极管(avalanche photo diode, APD)

电荷耦合装置（Charge-coupled Device, **CCD**）

2. 工作原理

PMT和**APD**：一级光电子被级联放大

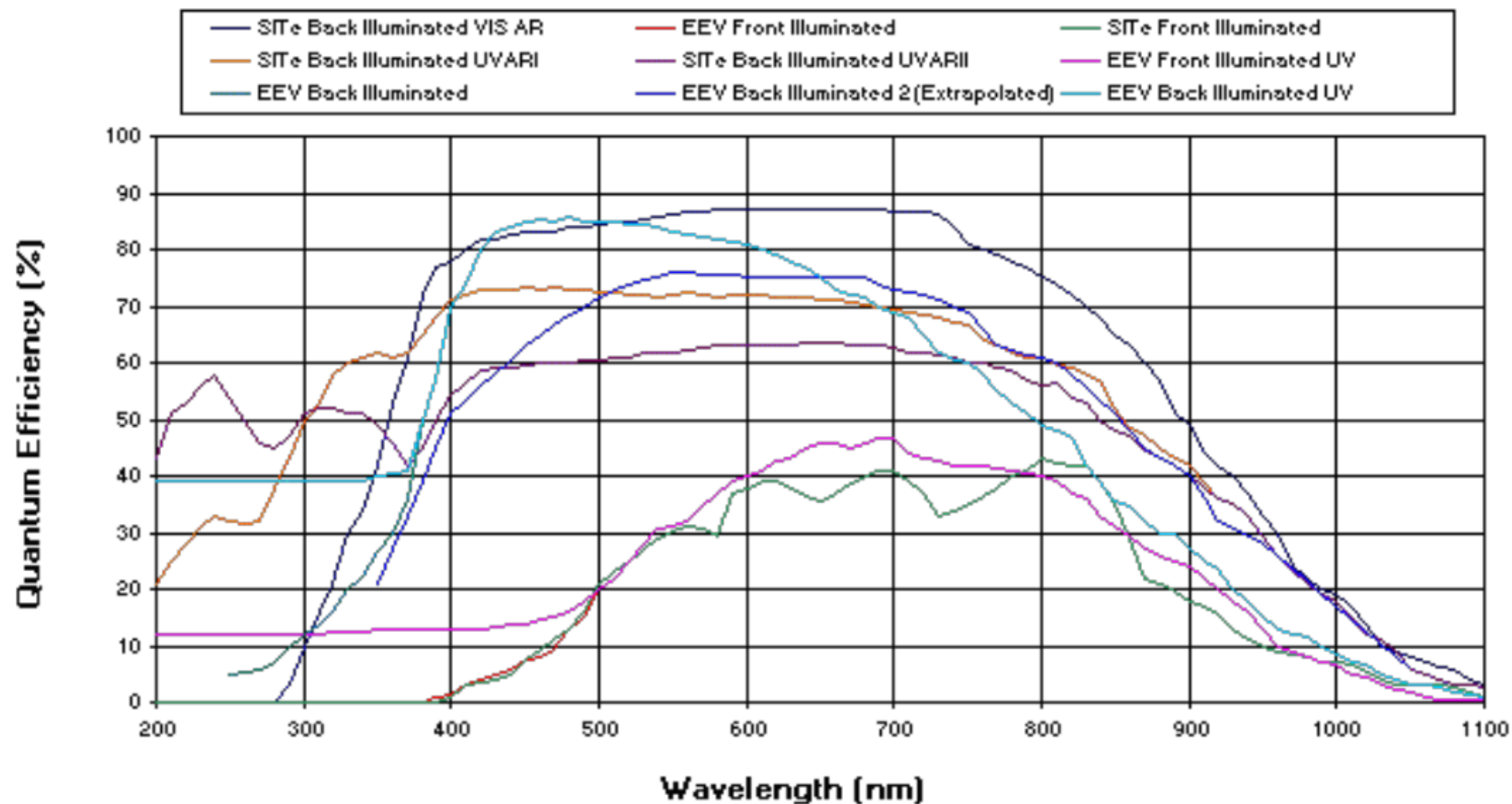
适用于**共聚焦**显微镜

CCD：可以同时多个目标（多个分子）
进行同时探测，从而得到二维图像

适用于**宽场**显微镜

光谱敏感度

CCD Quantum Efficiency Curves



光学显微镜的观察方法

——反差增强

- 明场 (Bright Field)
- 相差 (PH)
- 微分干涉相差 (DIC)
- 荧光
- 暗场 (Dark field)
- 霍夫曼调制相差

明场（Bright Field, BF）

- 通过对样品染色给予反差

如：H&E染色，尼氏染色，DAB染色等

- 染色的或者天然具有颜色的样品

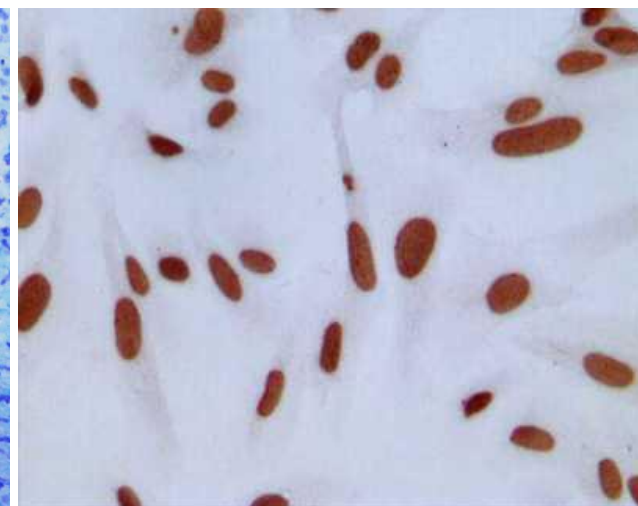
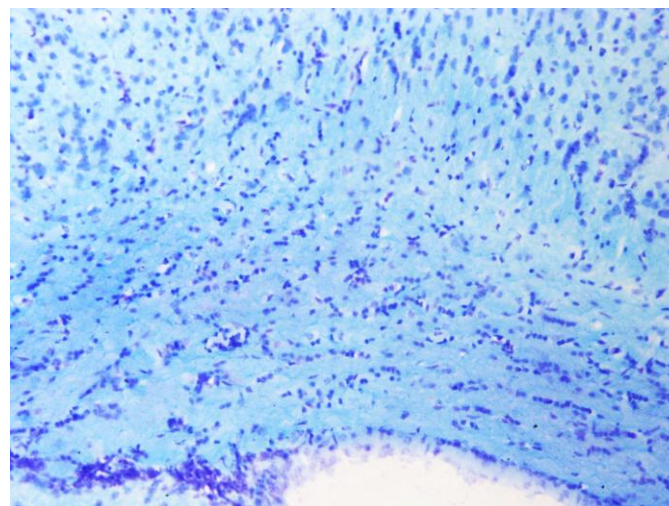
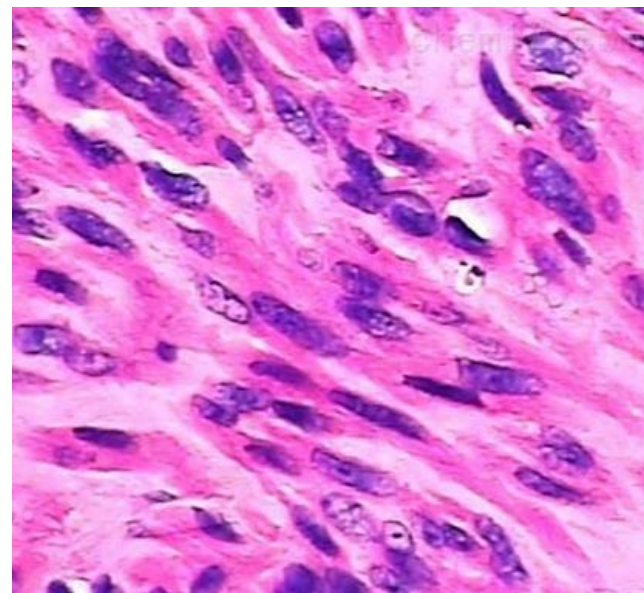
1. 染色组织切片

2. 染色的细菌等微生物

3. 经染色的细胞器、染色体

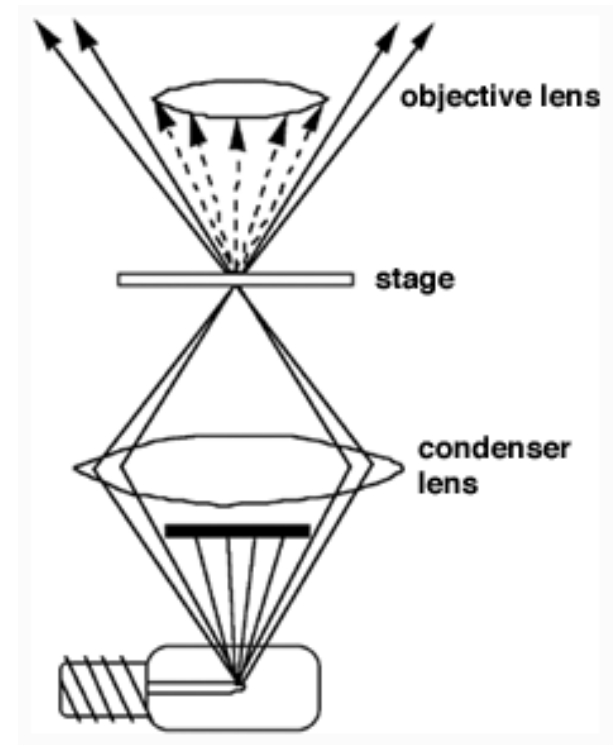
4. 血液涂片

应用：常规镜检、病理、染色标本



暗场(Dark field)

- 光的散射效应
- 暗背景，样品闪亮
- 分辨率降低，但优异的外部形态
- 用于观察细小的物体，如：细菌（密螺旋体），血液或鞭毛的细微结构等

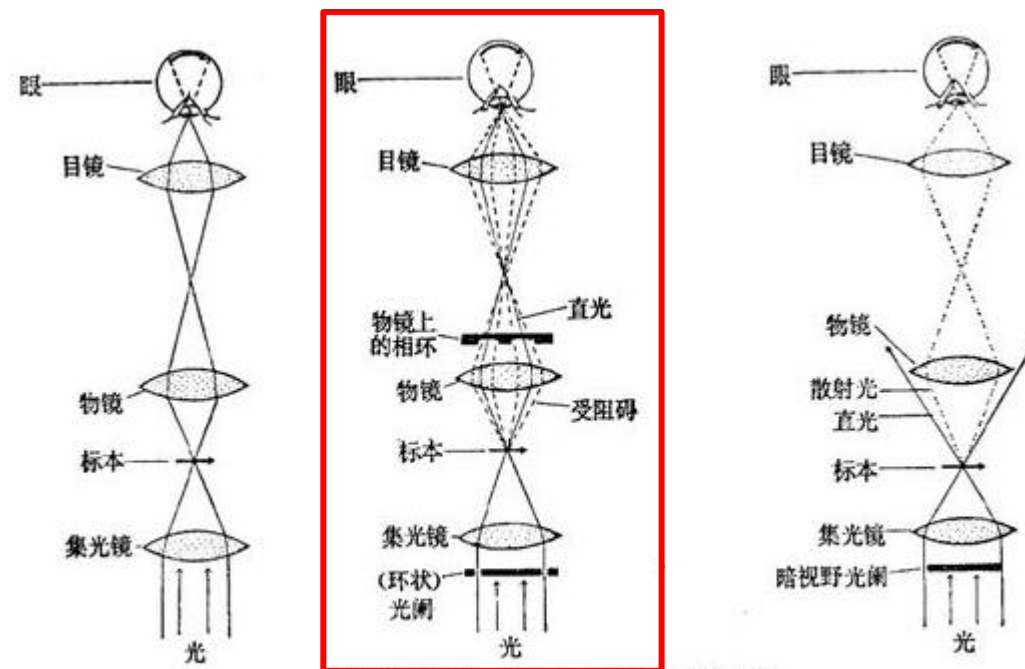
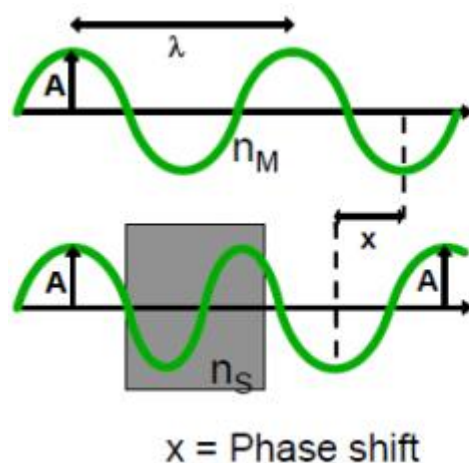


相差 (Phase Contrast)

- 当光线穿过样品时会被延迟, 造成**相位差别**
- 把这种差别转化为**光强度上的改变**, 使之可见
- 观察**活细胞透明样品**的好方法
- 细胞周围有光环 (随细胞厚度增加)
- 一般可以观察到 $6\mu\text{m}$ 的厚度
- 增强反差的最常用和便宜的方法
- **注意事项:**

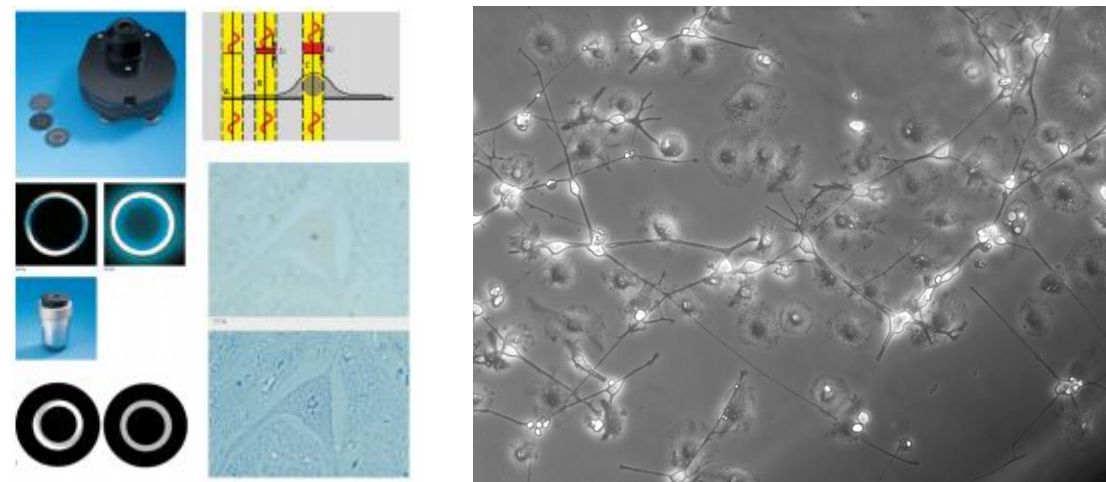
不同相差物镜用对应的

的相差环: 5; 10/20; 40



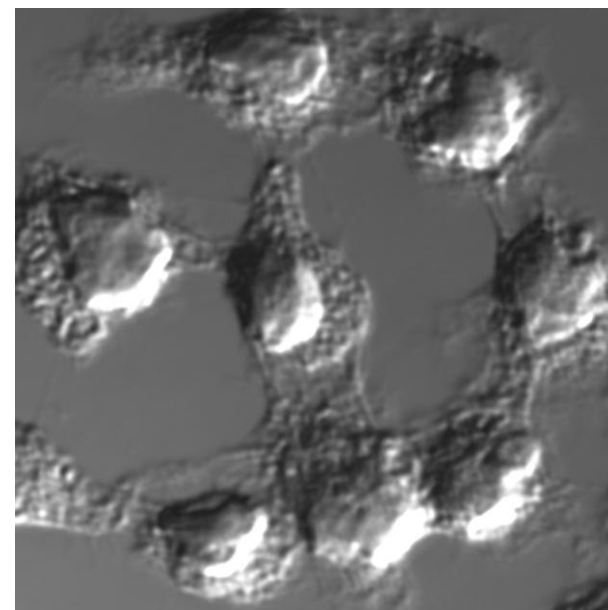
上海光学仪器厂—不同显微镜的光路图

(a) 明视野, (b) 相差, (c) 暗视野。这三种光学系统所见的图象见图 2.5。



微分干涉相差（DIC）

- 漂亮的3D图像（非真实三维图像）
- 无光晕。适用厚标本（ $> 6\mu\text{m}$ ）
- 分辨率大于相差
- 不适合塑料器皿（影响偏光）
- 主要看细胞表面结构
- DIC镜头和荧光拍摄镜头不一样，焦面稍有偏差
- 以平面偏振光为光源，光线经棱镜折射后分成两束,在不同时间经过样品的相邻部位,然后经过另一棱镜将这两束光汇合,从而样品中厚度上的微小差别就会转化成明暗区别,增加了样品反差，通常是一侧亮，而另一侧暗，造成了标本的人为三维立体感。

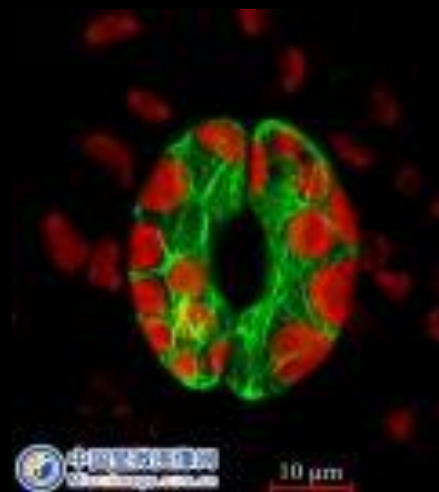
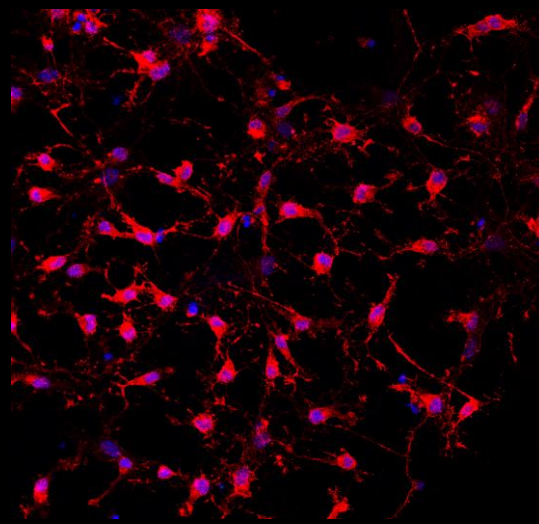
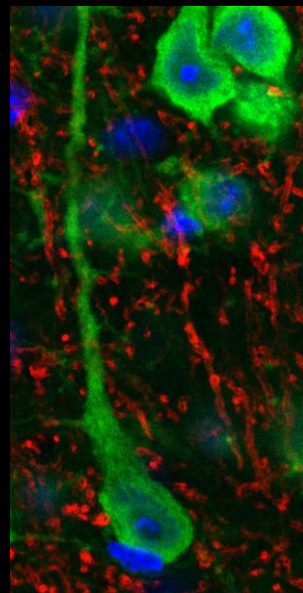
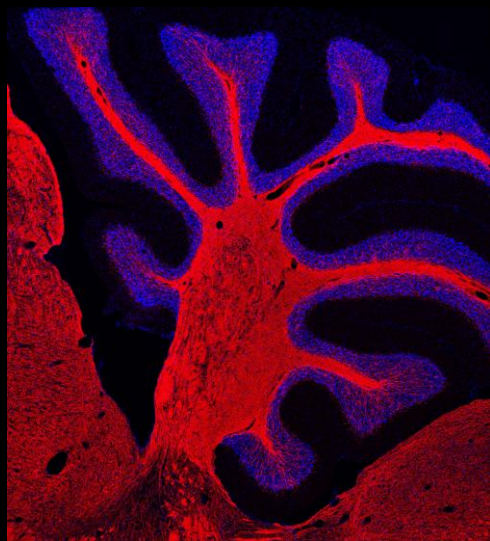
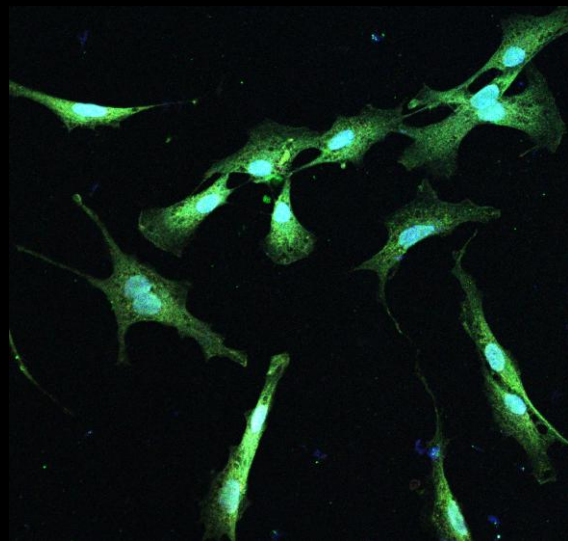
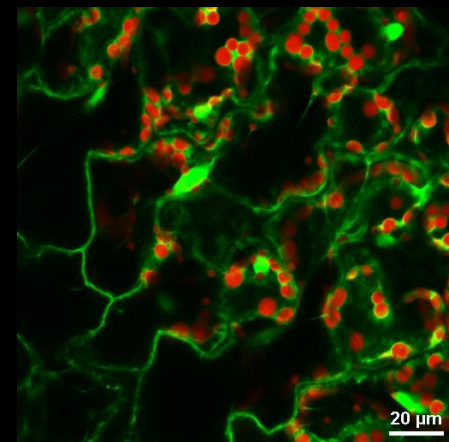


荧光 (Fluorescence)

1. 荧光现象:

最初传教士Brewster首次肉眼观察到叶绿素自发红色荧光。

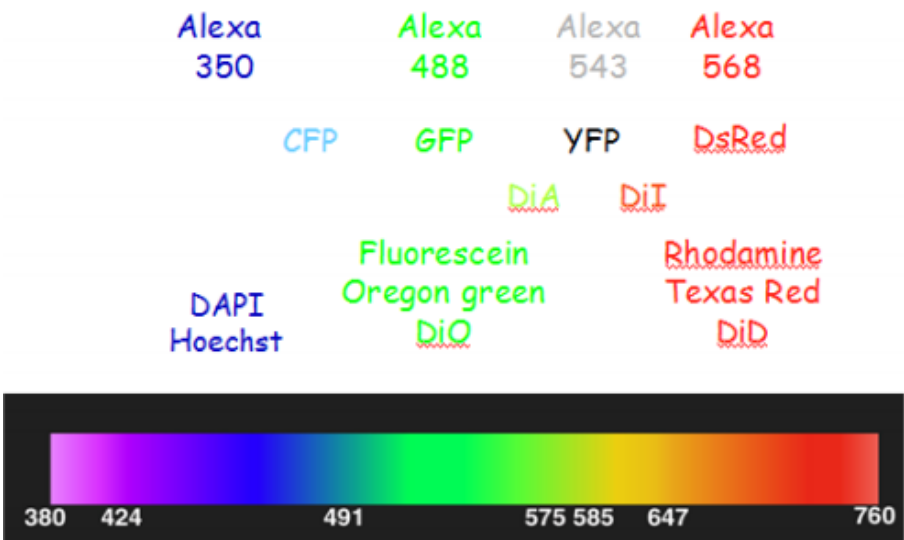
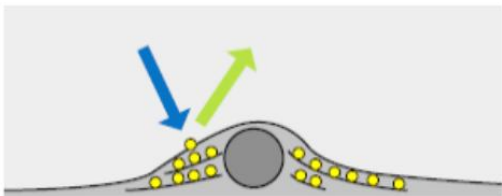
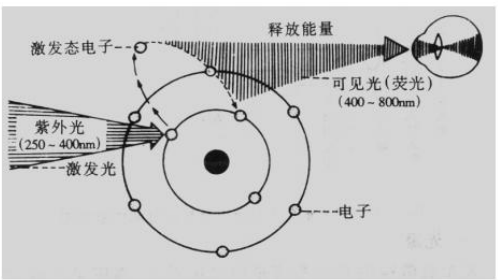
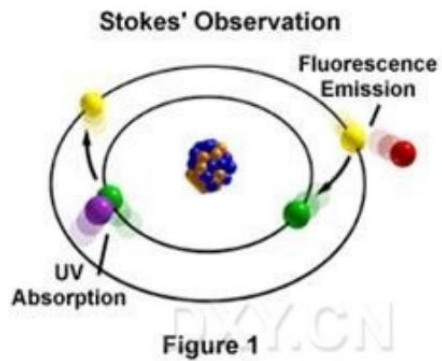
2. 叶绿素提取液在透射光下为绿色，而在反射光下为火红色的现象，这红光就是叶绿素受光激发后发射的**自发荧光**。



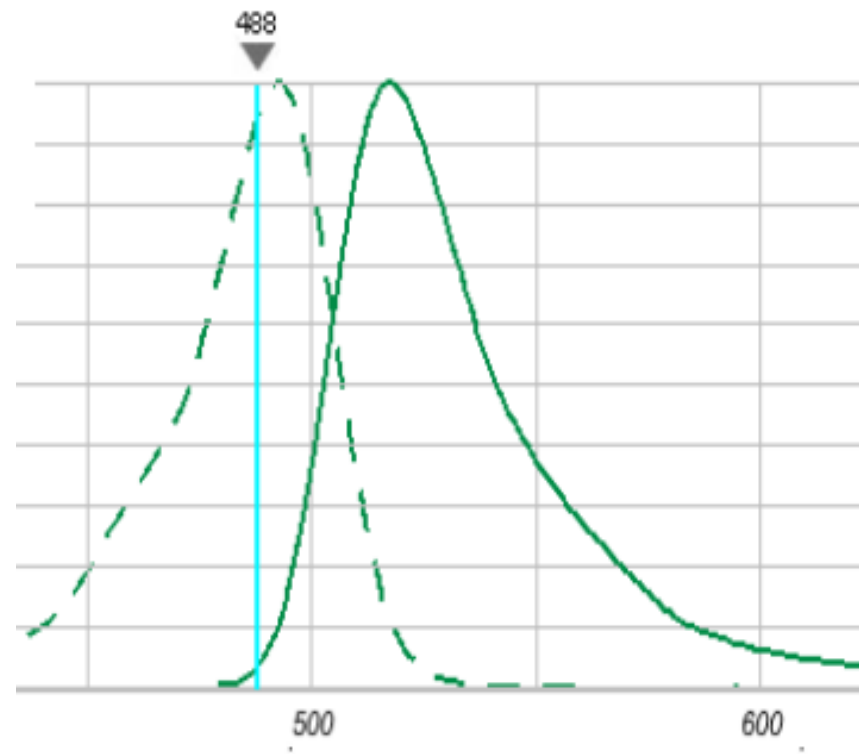
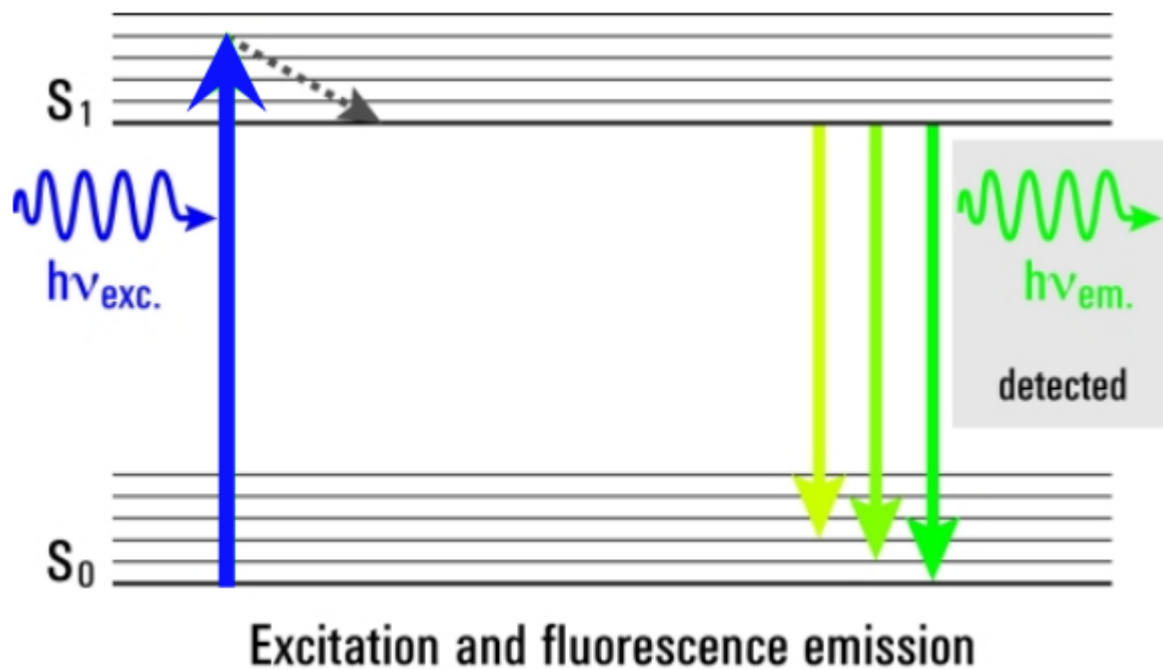
荧光（Fluorescence）

1. 荧光物质的荧光基团吸收一定的光量子后，电子就由最稳定的、能量的最低状态—**基态**跃迁到不稳定的高能状态—**激发态**，而激发态不稳定，迅速向较低能级状态转变，可重新放出一个光子，**回到基态**，即产生**荧光**。

2. 荧光物质的最大激发波长和发射波长



Fluorochrome	Excitation	Emission
DAPI (DNA)	359	461
Hoechst 33258 (Bisbenzimid)	365	480
Ludifer Yellow	428	540
GFP green	471	503
Cyanine Cy2	489	505
Alexa 488	495	505
FITC Fluoresceinisothiocyanat	490	525
TRITC, Rhodamin	540	580
Alexa 546	556	573
Dil Indocarbocyanine	540-560	556-575
DiO Carbocyanine	550	580
Cyanine Cy3	575	605
Texas red	595	620



3. 激发光谱和发射光谱

激发光谱（吸收光谱）	外来激发光的波长（光源波长）	短
------------	----------------	---

发射光谱（荧光）	被激发物质发射的波长	长
----------	------------	---

4. 荧光探针

生物学中应用的荧光探针

荧光基团类型	优点	缺点	例子
自发荧光	天然存在，自发	无法控制	叶绿体
荧光染料	明亮，光谱范围大，相对光稳定，大的行程移动，尺寸小，可以做成对环境敏感	特异性标记细胞内蛋白质比较困难； 抗体介导标记； 细胞通常要被固定	Alax-488 DAPI
荧光蛋白	通过融合目标蛋白可以在活细胞内表达；可以作为结构破坏的靶；对一些环境参数敏感	波长选择有限，低光稳定性，不是很亮，光谱有交叉，相对庞大（5μm）	GFP EGFP

荧光探针的使用

- 定位（蛋白质，DNA，脂类）
 - 互相作用，空间结构改变
 - 细胞环境报道（pH, Ca⁺⁺ 酶活性）
 - 基因表达报道
-
- 选择荧光探针
 - 光谱分离性
 - 毒性
 - 光稳定性
 - 光亮度

荧光图像常见问题和解决方法

问题	拟解决问题的办法
噪声（颗粒状图像）	增强照明；增加曝光时间；优化检测器； 图像处理
漂白	减少曝光时间；减弱照明；荧光物质要合理； 抗淬灭剂
分辨率（XYZ）	共聚焦显微镜；使用油镜；特殊图像处理；STED
图像模糊或者背景 （非焦面的光线被接收到）	共聚焦显微镜；特殊图像处理，如反卷积
厚样品成像	反卷积；共聚焦拍摄；特殊图像处理

荧光光源

荧光显微镜的光源：汞灯，氙灯，LED灯，金属卤素灯等。

1. 超高压汞灯(HBO)：发光是电极间放电使水银分子不断解离和还原过程中发射光量子的结果。

➤它发射很强的紫外光和蓝紫光，足以激发各类荧光物质。

➤灯的寿命与启动次数和工作时间有关。启动次数愈多, 每次工作时间愈短, 寿命愈短。

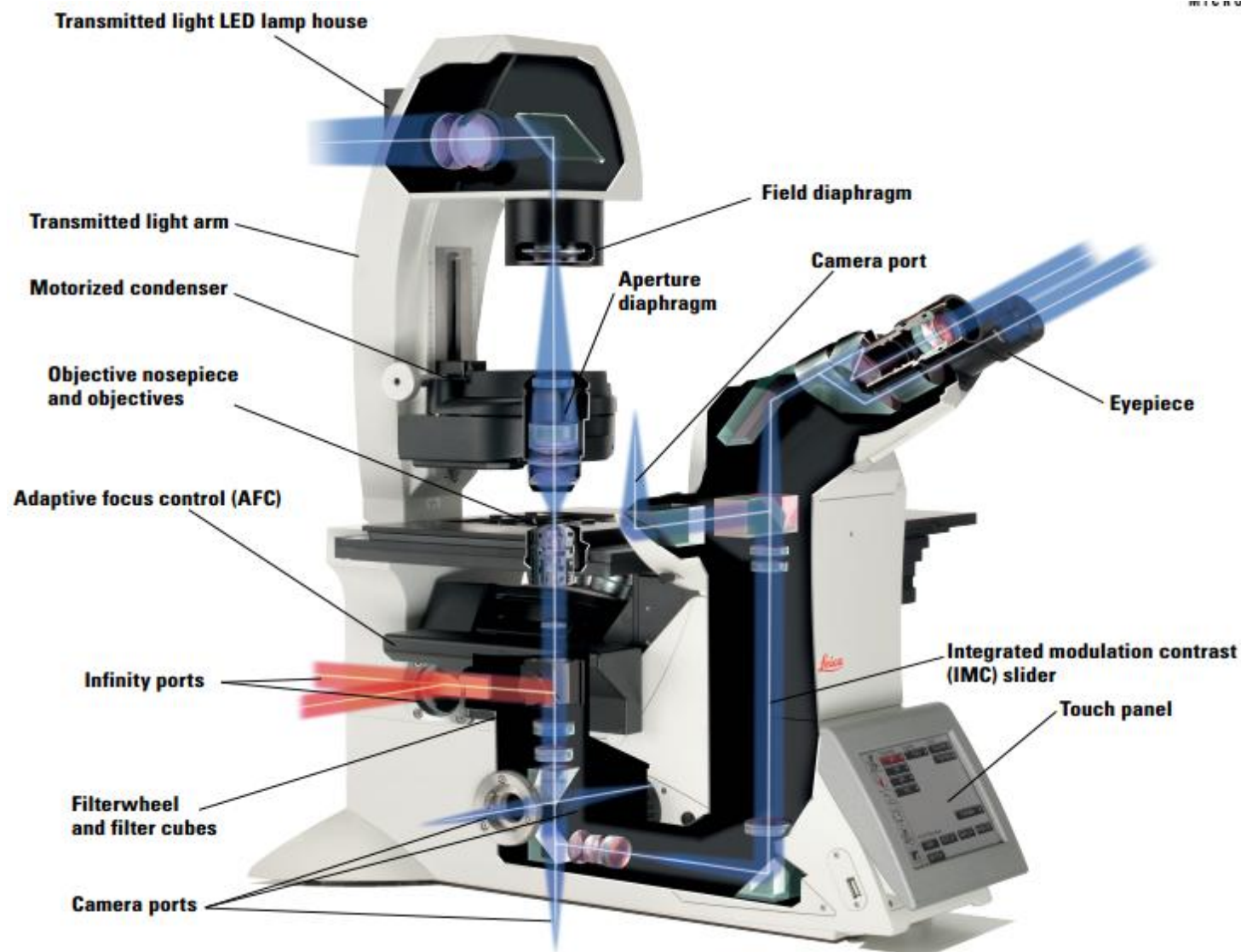
➤熄灭时一般约30 min方完全冷却，否则因热灯泡内压力很大，聚冷会引发爆炸。

2. 超高压氙灯(XBO)

3. LED灯

4. 金属卤素灯：常用，即开即用；但也需要约30 min后可关闭。

Confocal 显微镜构造



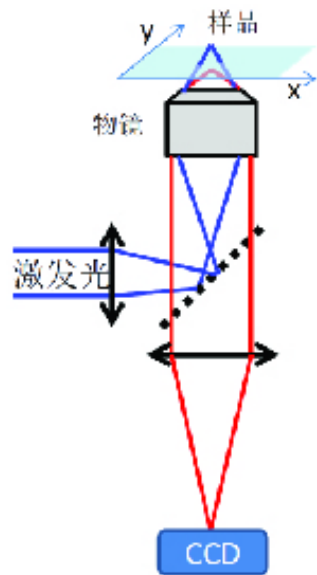


图2.3.4 宽场显微镜原理示意图

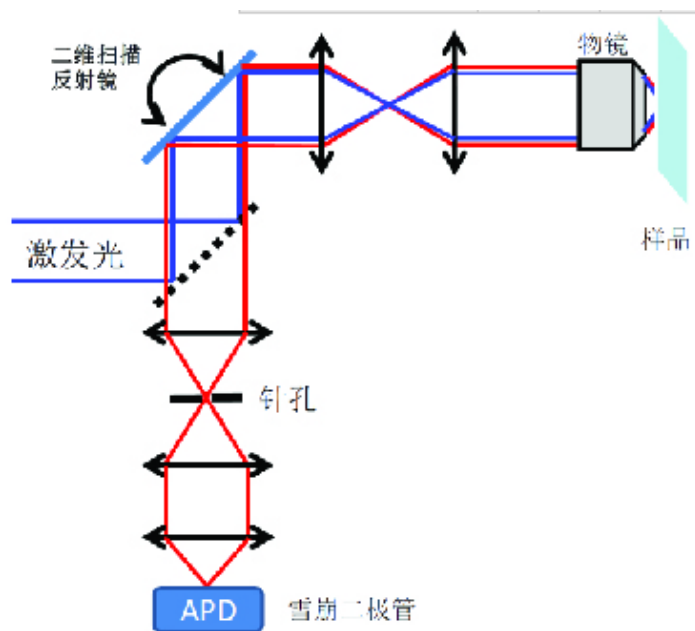


图2.3.2 激光扫描共聚焦显微镜示意图

- **宽场荧光显微镜**：指激发光在样品上平面上并不聚焦成衍射极限的光斑而且较大面积且有一定的厚度。

- **激光扫描共聚焦显微镜**：共聚焦显微镜+激光扫描。

指将激发光聚焦的染料分子上，同时染料分子发射的荧光通过同一物镜收集后聚焦到探测器上进行检测。但是在此显微镜下只能**激发**和**检测**样品的一个**点**。

以激光作为激发光源，采用**光源针孔与检测针孔共轭聚焦装置**，对样本进行断层扫描（依靠**激光扫描装置**），以获得高分辨率光学切片的荧光显微镜系统。

激发光扫描是通过改变激发光的角度，从而使激发光聚焦在样品的不同位置，实现样品成像。

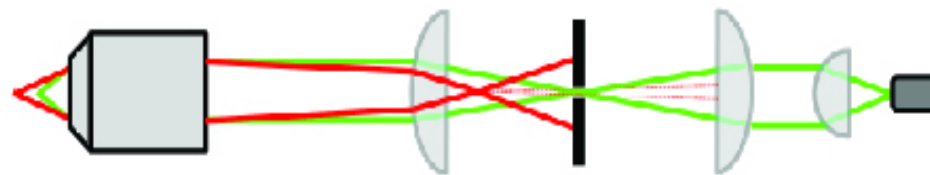
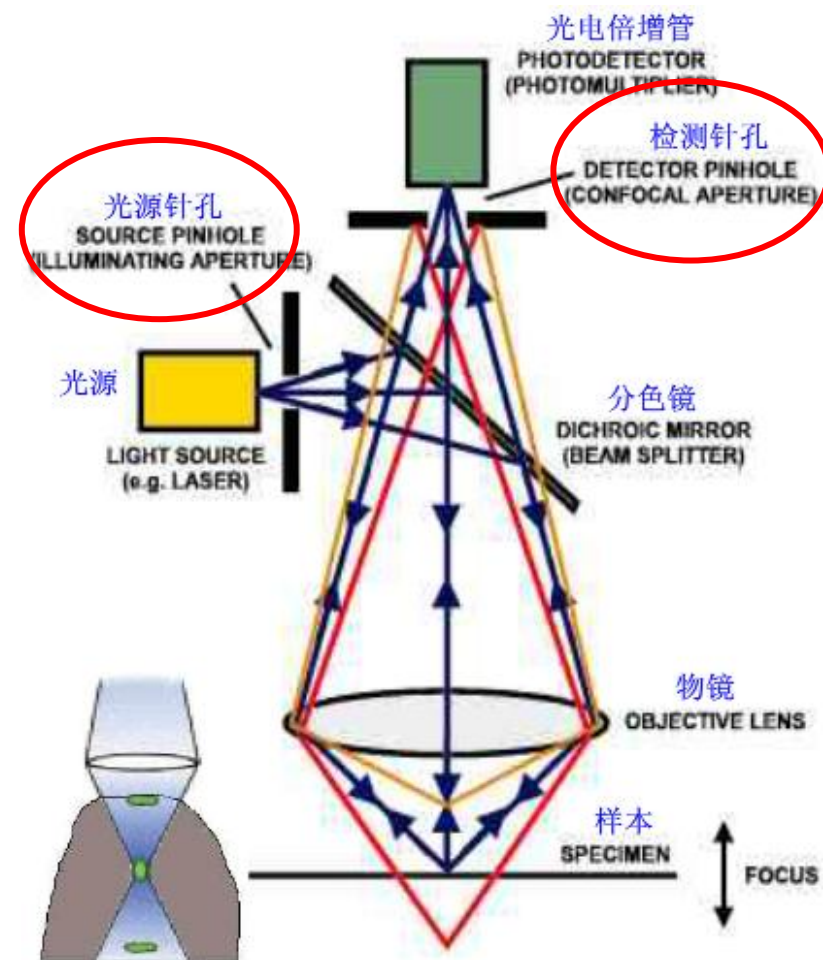
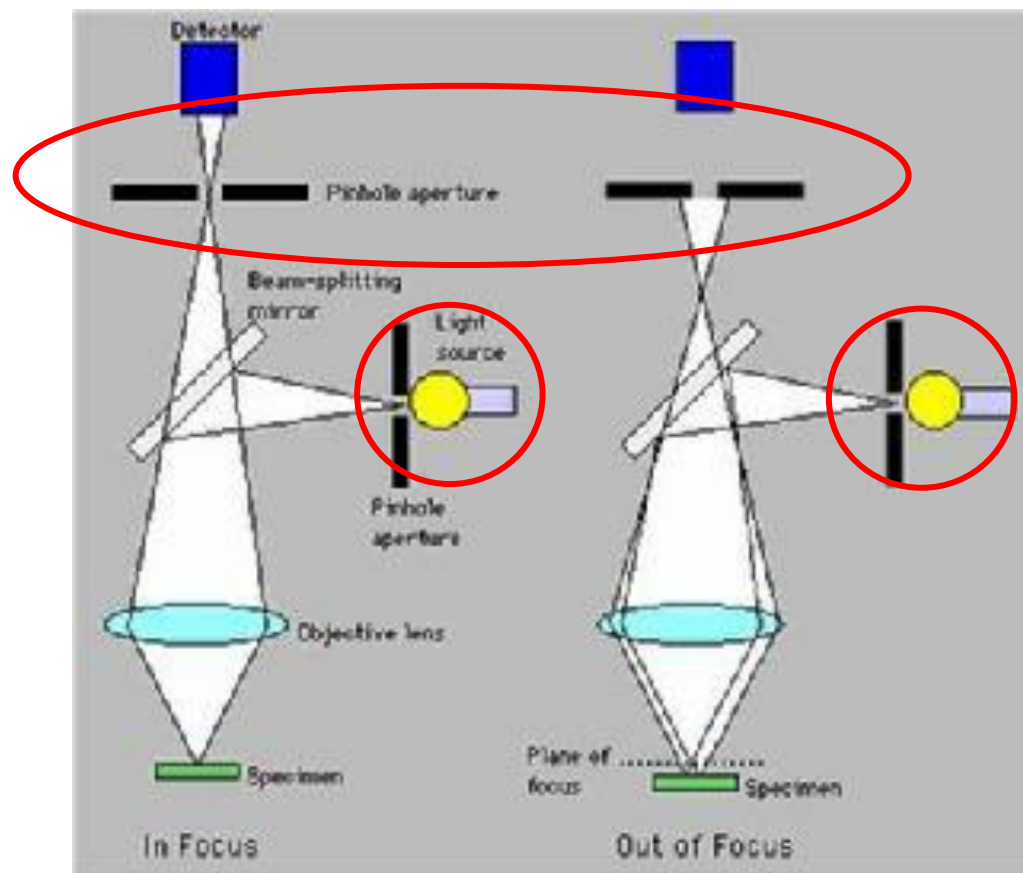


图2.3.3 具有针孔装置的共聚焦显微镜示意图。绿色代表在物镜聚焦点上的染料分子所发射的荧光；红色代表不在物镜焦点上的染料分子所发射的荧光。

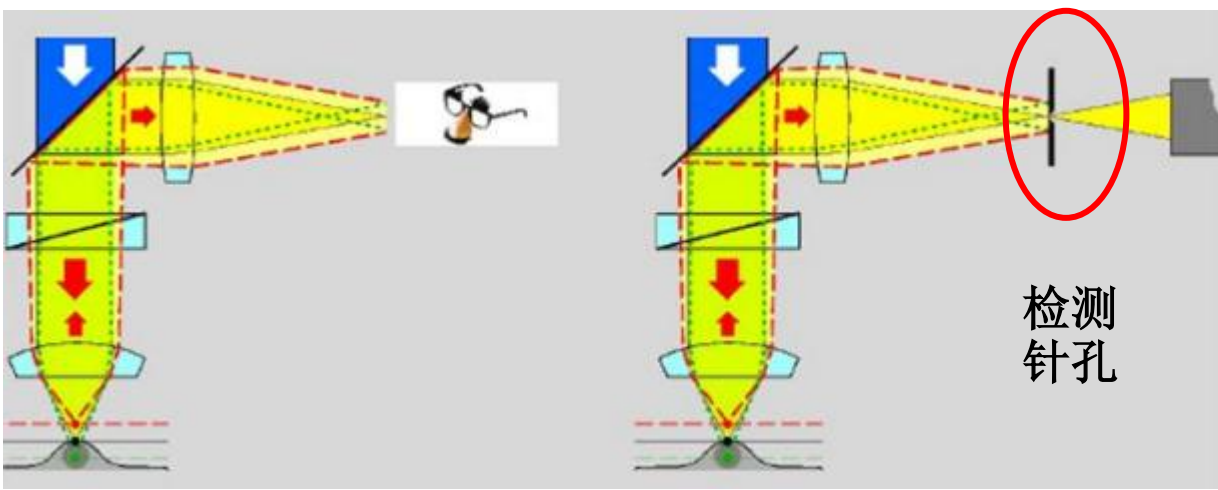
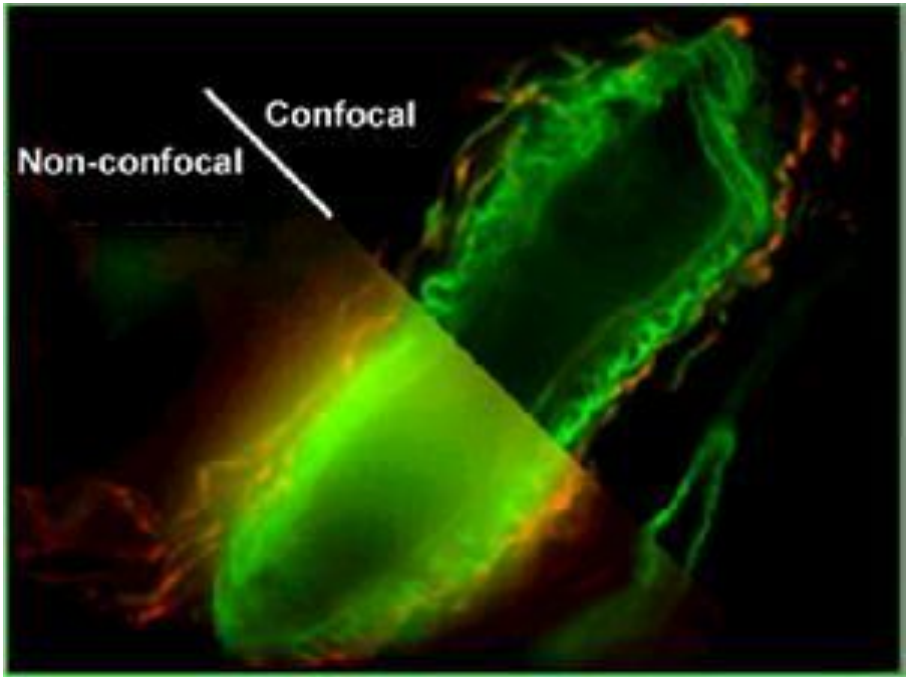
共轭聚焦



光源针孔/照明针孔：激发光源变成点光源，使之在样本上形成小光点（突破衍射极限）

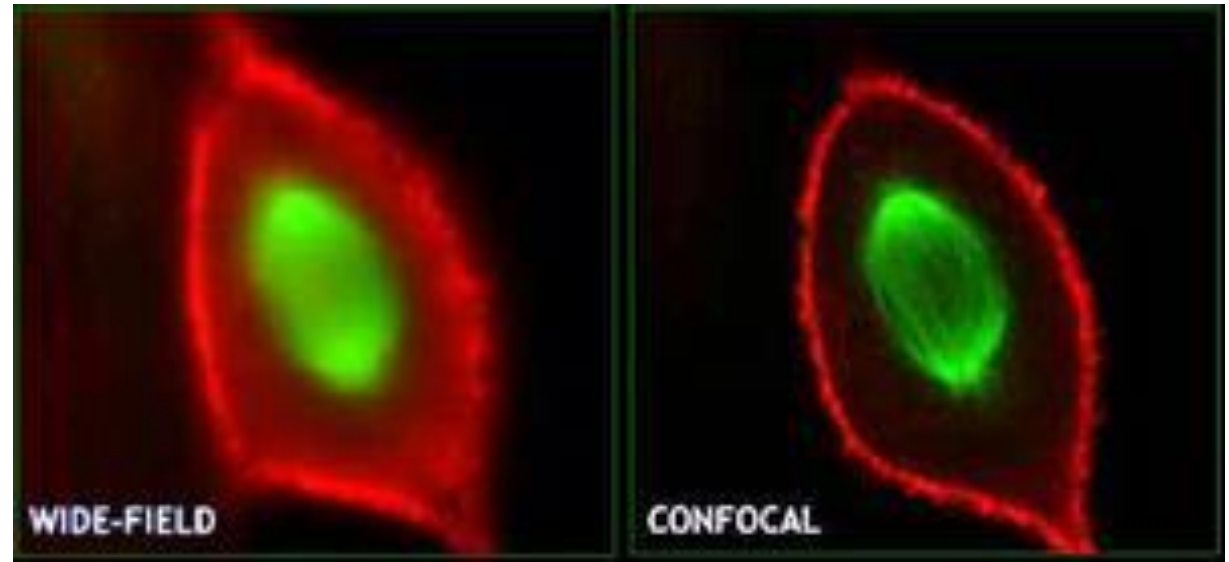
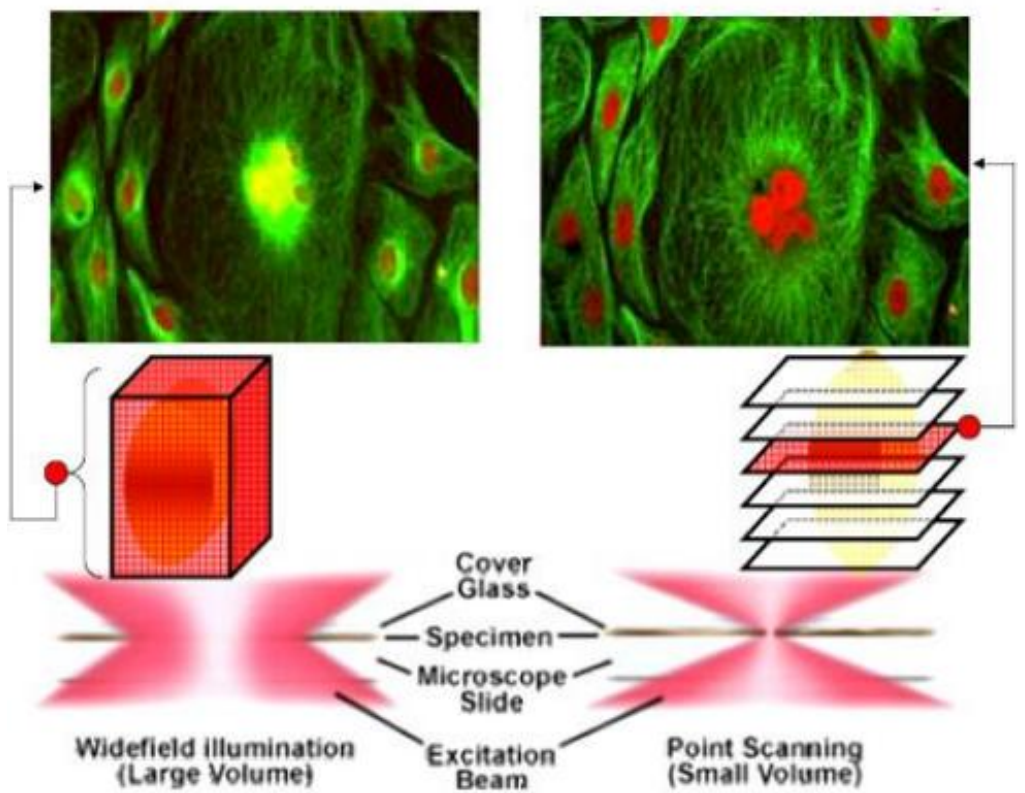
探测针孔：遮挡非焦平面光信号

宽场与共聚焦图像的比较



宽视场显微镜

共聚焦显微镜 **z 轴厚度近似为零**



宽场与共聚焦激光扫描显微镜的区别

	Wide Field Microscope	Laser Scanning Microscope
Light Source	Mercury Lamp	Laser
Illuminated Field	Wide Field	Diffraction limited (by pinhole) Spot
Image Acquisition	Parallel, Frame at Once	Sequential, Pixelwise
Detector	Eye or CCD Camera	Photomultiplier
Signal Separation	Dichroic Beam Splitter, Emission Filter	Beam Splitter Cascade, Emission Filter

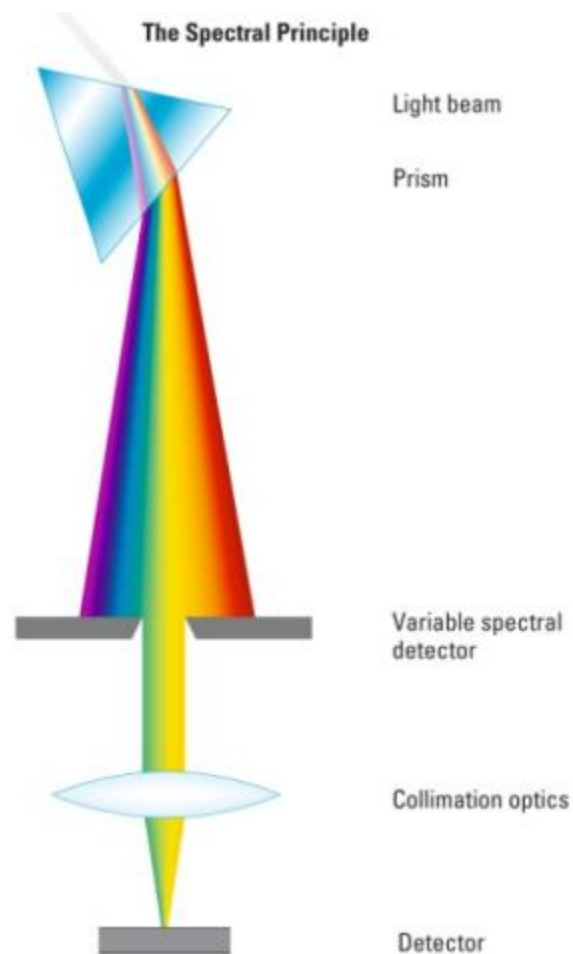
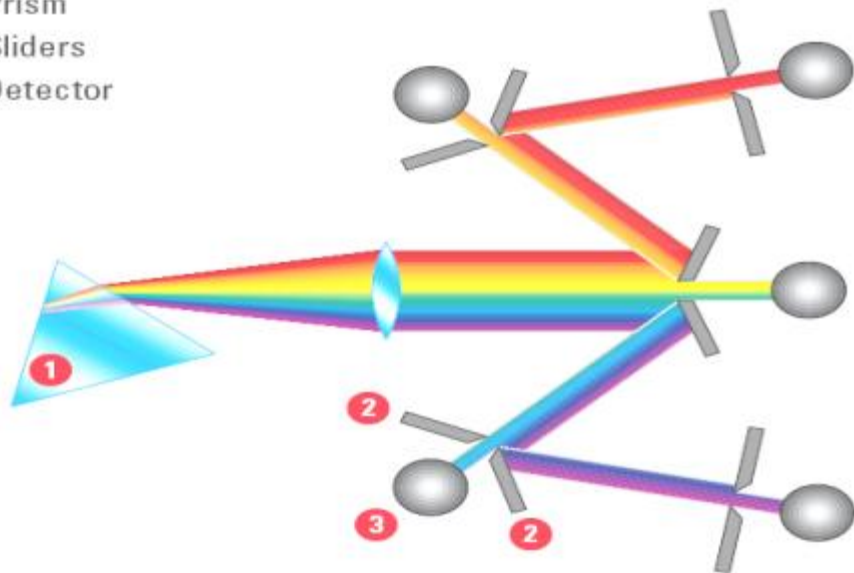
光谱检测器



SP检测器（光谱检测器）

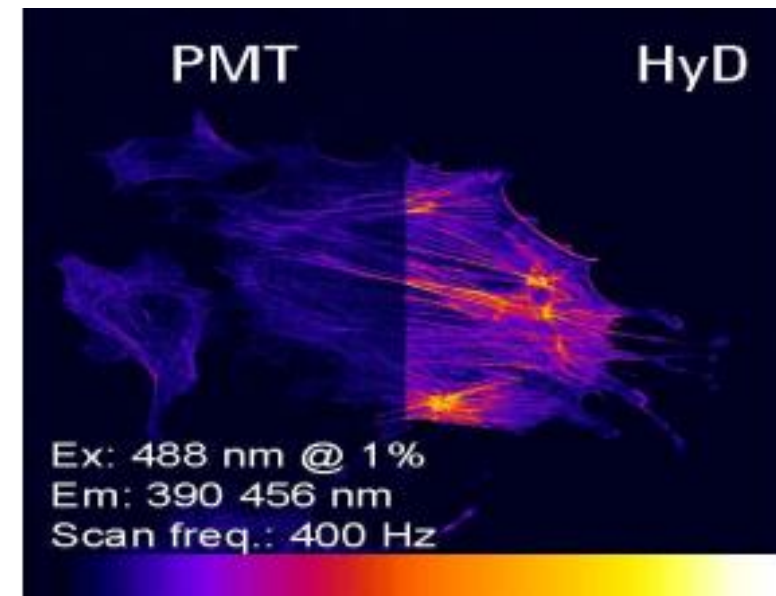
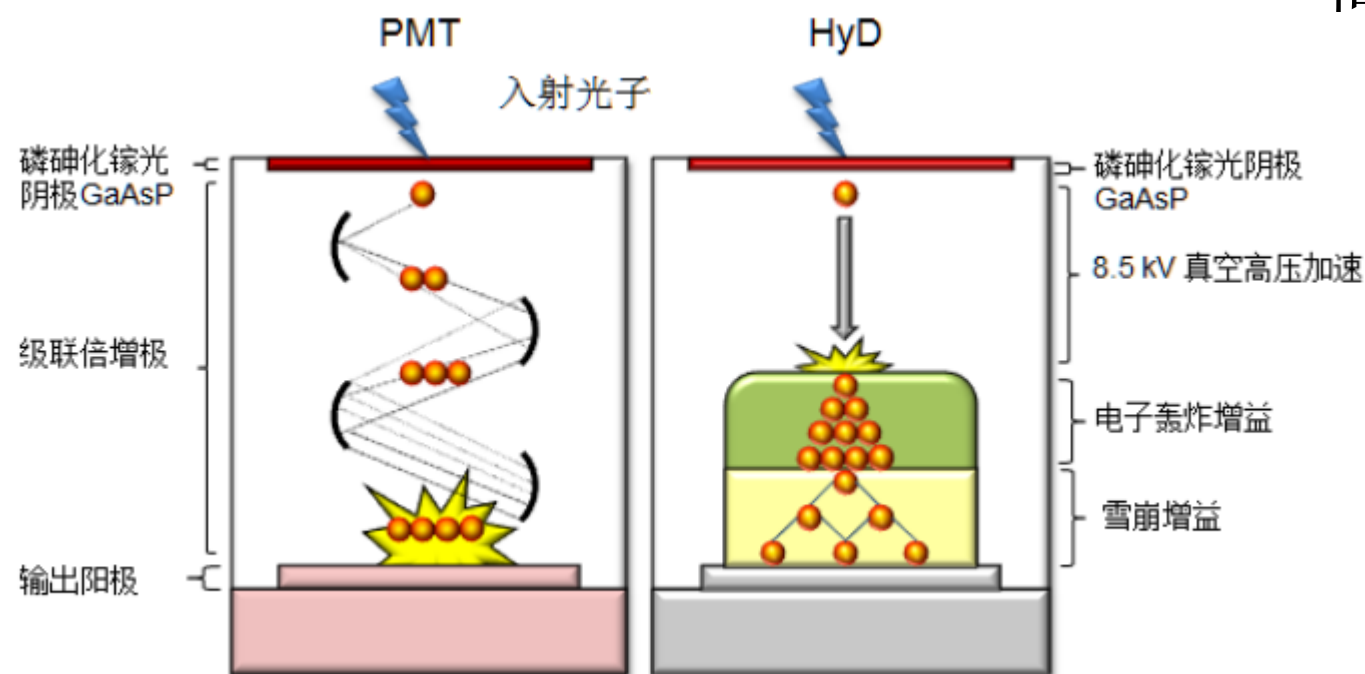
- › 荧光光谱准确可靠演绎的无间隙反射光谱带
- › 多波段光谱分光计
- › 最大效应的棱镜色散
- › 无光子消耗

- 1 Prism
- 2 Sliders
- 3 Detector



LeicaHyD™

--高灵敏探测器



HyD是Hybrid Detector的简写，指的是整合了PMT和APD结构的混合型检测器。

PMT：动态范围大，但是灵敏度较低，背景噪音较高

APD：灵敏度很高，噪音很低，常用于单分子荧光检测

HyD综合了以上两者的优点：**高灵敏度**，**低噪音**和大动态范围

LeicaHyD™

--高灵敏探测器

- HyD检测器的三种模式：
- 1. Standerd模式：与PMT一样，可通过SmartGain值调节图像亮度；
- 2. Counting模式：光子计数模式，以每个像素点所检测到的光子数显示为该像素点的亮度，此时检测器的Gain值是定值，通过长时间检测使显示出来。
- 用于非常弱的荧光样本信号，需要累加功能才可达到合适的亮度。
- 3. BrightR模式：视野中有非常亮和非常暗的结构同时出现，但同时也需要都显示出来，可使用此模式。
- 注意：HyD很灵敏，不可接收过强的信号，否则影响寿命。

使用HyD检测器时，603房间不可以使用手机。

传感器大小与图像采集区域

