

文章编号:1005-4642(2020)08-0024-04



专题

简易荧光显微镜的制作及其在生物医学中的应用

翟家振^a, 张元龙^b, 孔令杰^a

(清华大学 a. 精密仪器系; b. 自动化系, 北京 100084)

摘要:用光学元器件制作了简易荧光显微镜. 采用笼式结构, 荧光显微镜的系统结构更紧凑. 采用背向探测方式, 方便对小动物成像. 采用不同放大倍率的物镜观察含荧光蛋白标记的脑组织切片, 展示了所搭建荧光显微镜系统的性能, 同时证实实际成像中需要在成像视场与空间分辨率之间进行折中选择.

关键词:荧光显微镜; 生物成像; 视场; 分辨率

中图分类号:TH742.65

文献标识码:A

DOI:10.19655/j.cnki.1005-4642.2020.08.004

荧光显微在生物医学研究、新型材料表征等领域有着重要的应用^[1-2]. 荧光显微具有可特异性标记, 可对活体细胞进行实时动态成像等优势, 已经成为当前生物科学研究必备的技术手段, 是生物医学光子学等课程^[1]的重要内容. 但是, 商用荧光显微镜的结构复杂、价格昂贵, 这不仅为开设相关实验课程设置了很高的经济门槛, 而且由于大部分商用荧光显微镜不支持用户自行拆装, 不利于开展实验教学. 本文结合在神经光子学课程的教学实践, 介绍了简易荧光显微镜的制作方法及其在生物医学中的应用. 通过自行设计并且组装光学元器件, 可以加深学生对荧光显微原理的认识. 将自行搭建的荧光显微镜应用于观察含荧光蛋白标记的脑组织切片, 检验了系统的性能.

1 荧光显微镜的原理

传统的光学显微镜是基于样品的光吸收、相位梯度和双折射等进行成像, 成像对比度低. 荧光是当分子受到光激发时, 电子从基态跃迁到激发态, 经弛豫后再回到基态所辐射出的光. 由于荧光物质的激发光谱与辐射光谱之间存在着斯托克斯位移, 可采用滤光片滤出发射荧光. 荧光显微技术通过利用样本发射荧光的特性对单个分子

物质的时空分布进行成像, 可显著地提高成像对比度. 此外, 可特异性荧光标记这一性能使得监测细胞内部含特定荧光团标记成分的位置及其扩散系数、转运特性、环境因素或与其他生物分子的相互作用等成为可能^[1-2].

常见的荧光标记物质主要有荧光染料、荧光蛋白和量子点等. 其中, 荧光蛋白作为活体荧光材料, 具有良好的生物兼容性, 被广泛应用于生物动态过程研究. 尤其是自2008年诺贝尔化学奖授予绿色荧光蛋白(GFP)的发现之后, 人们发展了丰富多彩的荧光蛋白. 当前, 随着基因工程技术的进步, 采用荧光蛋白标记技术不仅可以研究特定细胞或细胞器的结构及其动态变化, 还可以基于钙信号或电压信号等研究生物动态过程. 对于不同的细胞或细胞器, 采用不同光谱特性的荧光蛋白分别进行特异性标记, 还可以研究它们之间的动态相互作用.

2 简易荧光显微镜的制作

图1为所设计荧光显微镜的系统结构图, 主要由光源、透镜、滤光片、二色镜、物镜、目镜和三维精密载物台等组成. 上述各元件均可直接从光电器件供应商采购, 参考型号如表1所示. 通过

收稿日期:2020-02-13; 修改日期:2020-02-20

基金项目:2019年清华大学研究生教育教学改革项目(No. 201905J003)

作者简介:翟家振(1999-), 男, 山东商河人, 清华大学精密仪器系2019级硕士研究生, 研究方向为光学工程.

通讯作者:孔令杰(1986-), 男, 山东费县人, 清华大学精密仪器系副教授, 博士, 主要研究方向为生物光子学. E-mail:konglj@tsinghua.edu.cn



采用笼式结构,使得所设计的荧光显微镜的系统结构紧凑,相对于商用产品大大降低了成本.此外,考虑到小动物成像等应用,设计中采用了背向探测的方式.

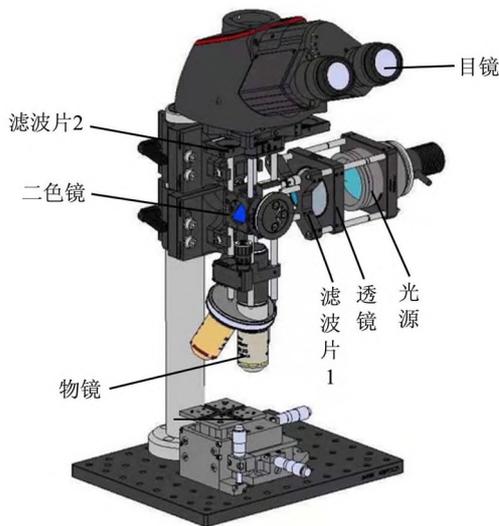


图 1 简易荧光显微镜的系统结构图

表 1 简易荧光显微镜的主要器件列表

器件名称	数量	建议厂家	型号
面包板	1	Thorlabs	MB810
1.5 英寸减震接杆	1	Thorlabs	DP14A/M
夹持式安装架	2	Thorlabs	CV1530/M
笼板 A	1	Thorlabs	LCP08/M
二向色笼式立方体	1	Thorlabs	CM1-DCH
笼板转接件	2	Thorlabs	LCP02/M
ER 装配支杆(笼杆)	12	Thorlabs	ER3
ER 装配支杆(笼杆)	12	Thorlabs	ER1.5
滑动滤光片安装座	1	Thorlabs	CFS1/M
Z 轴平移安装座	1	Thorlabs	SM1Z
显微物镜转盘	1	Thorlabs	OT1
笼板 B	2	Thorlabs	LCP01/M
透镜套管间隔块	1	Thorlabs	SM1S20
笼式立方体平台	1	Thorlabs	B4CRP/M
俯仰旋转台	1	大恒光电	GCM-1911M
三维组合平移台	1	大恒光电	GCM-901604M
三目镜	1	Thorlabs	LAURE1
LED 驱动器	1	Thorlabs	LEDD1B
LED 光源	1	Thorlabs	M470L3-C1
双胶合透镜	1	Thorlabs	AC508-150-A
滤光片套装	1	Thorlabs	MDF-YFP

与明场显微镜不同的是,典型的荧光显微镜还需要引入滤光系统.如图 1 所示,光源所发出的光透过透镜,经滤波片 1 选出所需的激发波长后被二色镜反射,再经物镜聚焦后照在生物样本上.所激发出的荧光经物镜收集透过二色镜,再经滤波片 2 滤出所发射的微弱荧光后传至目镜.图像记录可采用智能手机的摄像头完成^[3].

考虑到黄色荧光蛋白(YFP)已被广泛应用于生物样品的标记,本文选择蓝色 LED 光源(M470L3-C1, Thorlabs)作为照明光源,其中心发射波长为 470 nm;相应地,激发、发射滤光片和二向色镜选择 Thorlabs 公司的 MDF-YFP 套装.为了确保照明均匀,调整透镜的位置以实现科勒照明.

3 简易荧光显微镜的应用

采用搭建的荧光显微镜观察脑组织切片,检验系统的性能.生物样品为 Thy1-YFP(H)成年转基因小鼠(JAX Stock No. 003782)的脑切片,其中 YFP 主要表达在脑皮层的第 5 层及海马区的锥形神经元^[4].YFP 的峰值发射波长为 529 nm,与上述所选择的滤光片套装相匹配.

3.1 大视场、低分辨率成像

首先使用低倍率物镜进行大视场观察.图 2 所示为采用 4×、数值孔径 0.13 的物镜(Nikon, CFI Plan Fluor 4×)和 10×目镜组合所拍摄的小鼠脑组织冠状切片荧光图像,图 3 为图 2 中虚线框区域的放大显示图.

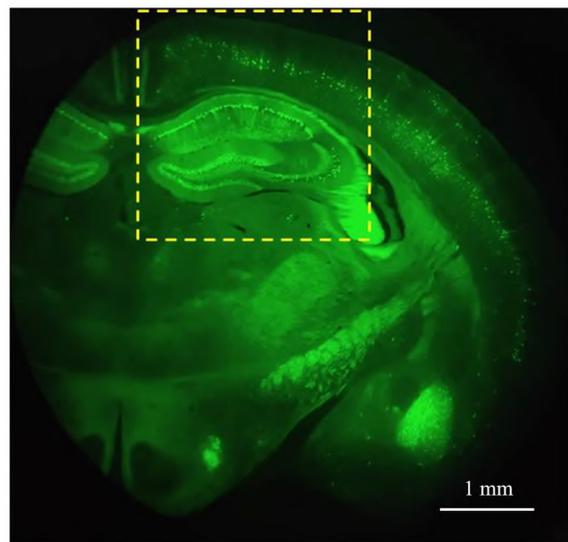


图 2 用 4×、数值孔径 0.13 的物镜和 10×目镜组合所拍摄的小鼠脑组织冠状切片的荧光图像

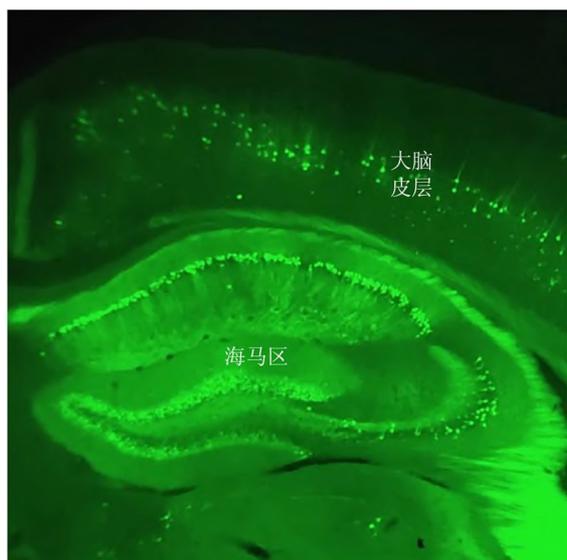


图 3 图 2 中虚线框区域的放大显示图

可见,其视场范围可以涵盖小鼠的整个半脑,但是成像空间分辨率低,仅仅能分辨神经元胞体(图 3),对于更精细的神经元结构(例如树突、轴突)则难以分辨.实验中可进一步验证,仅通过对图像进行数字放大,无法提高成像的空间分辨率.

3.2 小视场、高分辨率成像

将物镜切换至高倍率、高数值孔径物镜,可实现小视场、高分辨率成像.图 4 所示为采用 $10\times$ 、

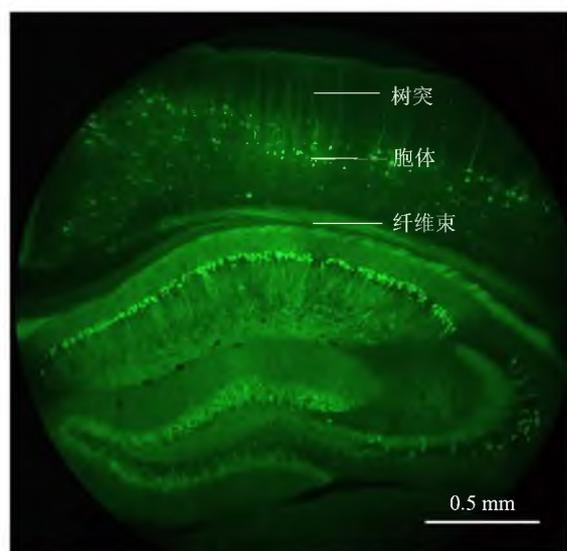


图 4 采用 $10\times$ 、数值孔径 0.5 的物镜和 $10\times$ 目镜组合所拍摄的小鼠脑组织冠状切片的荧光图像

数值孔径 0.5 的物镜(Nikon, CFI Super Fluor $10\times$)和 $10\times$ 目镜组合所拍摄的荧光图像(与图 3 所示区域相同).

相对于图 2,其视场范围减小,但是,图 4 所示神经元的树突以及由轴突构成的纤维束都清晰可见^[5].

综合上述实验可见,实际成像中需要在光学显微系统中成像视场与空间分辨率之间进行折中选择.为了获得高分辨率的图像,成像视场往往受到限制;反之亦然.此外,通过引入高速图像记录器件,所搭建的荧光显微镜还可以用于研究生物动态过程,如小动物在体神经网络活动的动态观测.

4 结束语

针对商用荧光显微镜价格高昂、结构复杂等不利于实验教学的缺点,制作了简易荧光显微镜.通过采用商用可得的光电元器件,设计搭建了简易荧光显微镜系统.将上述系统应用于观察含荧光蛋白标记的脑组织切片,分析讨论了不同物镜放大倍率下成像视场与空间分辨率的关系.上述系统可用于普通高校相关专业的荧光显微镜教学,并可应用于生物医学研究.

参考文献:

- [1] 骆清铭,张镇西. 生物医学光子学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2018:49-54.
- [2] 刘东奇. 荧光显微镜自组实验设计[J]. 物理实验, 2018,38(9):21-23.
- [3] 李维晖,张宏,陈新. 物理实验中的显微摄影实验[J]. 物理实验,2010,30(4):30-32.
- [4] Porrero C, Rubio-Garrido P, Avendano C, et al. Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice [J]. Brain Research, 2010,1345:59-72.
- [5] Feng G, Mellor R H, Bernstein M, et al. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP [J]. Neuron, 2000, 28(1):41-51.

Fabrication and biomedical application of custom fluorescence microscope

ZHAI Jia-zhen^a, ZHANG Yuan-long^b, KONG Ling-jie^a

(a. Department of Precision Instrument; b. Department of Automation, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: A simple fluorescence microscope was fabricated with commercial opto-electrical parts, the structure was more compact using cage structure, and back-facing detection was adopted to facilitate the imaging of small animals. The system performance was demonstrated by observing fluorescence protein labelled brain slices with different objective lens of various magnifications. At the same time, it was proved that it was necessary to make a compromise between the field of view and the spatial resolution in practical imaging.

Key words: fluorescence microscope; bioimaging; field of view; resolution

[责任编辑:任德香]

(上接 13 页)

Ferroelectric domain engineering of lithium niobate and its applications

WANG Xiao-jie, ZHANG Guo-quan

(School of Physics, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Lithium niobate crystal is one of the most important artificial crystals at present, which is known as “silicon of photonics”. Lithium niobate crystal thin film is regarded as one of the most promising integrated optoelectronic matrix materials. In the past few decades, great progresses have been made in material growth, basic research and device applications of lithium niobate crystals. Periodically poled lithium niobate, waveguides, and conductive domain walls fabricated using domain engineering of lithium niobate have important applications in the fields of light frequency conversion, optical switching, optical modulation and nano-electronic devices. In this paper, the fabrication technologies, the characterization techniques and the application progresses of lithium niobate micro- and nano-domain engineering were briefly reviewed.

Key words: lithium niobate; ferroelectric domain engineering; nonlinear optics; conductive domain wall

[责任编辑:尹冬梅]