

文章编号 1004-924X(2014)06-1446-08

激光扫描共聚焦光谱成像系统

张运海*, 杨皓旻, 孔晨晖

- (1. 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏 苏州 215163;
2. 江苏省医用光学重点实验室, 江苏 苏州 215163)

摘要:在激光扫描共聚焦显微成像技术基础上引入了光谱成像技术以便区分生物组织中的不同荧光成分。采用分光棱镜对荧光进行光谱展开,在光谱谱面处设置两个可移动缝片形成出射狭缝,两个步进电机带动安装其上的两个缝片设置系统在整个工作波长(400~700 nm)内的光谱带宽,其最小光谱带宽优于5 nm。用488 nm激光和低压汞灯实际测量了几条谱线对应的狭缝位置并和理论值做了比较,结果显示实际狭缝位置和理论值的差值均小于0.1 mm。在全光谱和50 μm 出射狭缝(对应2.5 nm光谱带宽)对老鼠肾脏组织进行了共聚焦光谱成像实验,获得了老鼠肾脏组织中DAPI标定的细胞核图像和Alexa Fluor[®] 488标定的肾脏小球曲管图像,实现了对老鼠肾脏组织不同成分的区别。实验结果表明:提出的系统能够进行共聚焦光谱成像,扩大了共聚焦显微镜的适用范围。

关键词:激光扫描共聚焦显微镜;光谱成像;荧光;分光棱镜

中图分类号:TH742.6 **文献标识码:**A **doi:**10.3788/OPE.20142206.1446

Spectral imaging system on laser scanning confocal microscopy

ZHANG Yun-hai*, YANG Hao-min, KONG Chen-hui

- (1. Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology,
Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China;
 2. Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou 215163, China)
- * Corresponding author, E-mail: zhangyh@sibet.ac.cn

Abstract: A spectral imaging module was added into a laser scanning confocal microscopic system to discriminate different fluorescence components in biological tissues. A prism was used as a beam split part, and two movable slit edges were used to form a slit whose width and position could both be adjusted on the spectral image plane. The two slit edges were installed on a stepping motor. By adjusting two slit edges, the laser scanning confocal spectral microscopy could work at wavelengths of 400–700 nm and its minimum spectral wavelength for confocal imaging was less than 5 nm. The actual slit positions corresponding to spectral lines of 488 nm laser and low pressure mercury lamp were tested and compared with the theory positions. The results show that the differences of the actual slit positions and theory values are all less than 0.1 mm. A laser scanning confocal imaging experiment with a full spectrum confocal imaging and 2.5 nm spectrum bandwidth (50 μm slit width) confocal im-

收稿日期:2013-08-15;修订日期:2013-10-15.

基金项目:中国科学院苏州生物医学工程技术研究所“一三五”规划重大突破项目(No. Y052031205);苏州市应用基础研究计划资助项目(No. SYG201324)

aging was carried out using a mouse kidney tissue slide. The images of nuclei labeled by DAPI and glomeruli labeled by Alexa Fluor[®] 488 were obtained and the different components in biological tissues were distinguished. It concludes that the system can complete the confocal spectrum imaging, by which the application area of laser scanning confocal microscopy has been extended.

Key words: laser scanning confocal microscopy; spectral imaging; fluorescence; splitting prism

1 引言

激光扫描共聚焦显微镜(Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM)是研究微细结构的有效技术手段和必备的大型科学仪器,在生物和工业检测领域^[1-2]有着广泛的应用。该系统采用精密针孔滤波技术,只探测处于焦平面位置上的信息,最大限度地抑制了非聚焦平面的杂散光,具有很高的成像分辨率和信噪比^[3];并能沿 Z 轴方向进行无损光学断层扫描,进而实现对较厚样本的三维成像。目前, LSCM 在组织生物学、细胞生物学、分子生物学、基因学、胚胎学、神经学、病理学、免疫学、流行病学、肿瘤、细菌学、病毒学等生物学研究领域具有大量的应用。

20 世纪 50 年代, M. Minsky 首次提出共聚焦显微技术的概念,直到 1987 年第一台商业化的共聚焦显微镜才问世。此后共聚焦显微技术成为了研究热点,并在理论和实践上不断取得新的进展。在理论上,科研人员更加全面地研究了系统的各种特性,并提出了许多改进成像质量、提高成像分辨率的方案^[4-5];在实践方面,具备各种新功能的共聚焦显微镜不断涌入市场。

当前的生物学研究要求共聚焦显微镜具备多种功能,能够开展各种复杂的生物学实验^[6-9]。由于光谱成像技术能够实现空间图像和光谱数据的统一^[10],人们将它引入共聚焦显微镜^[11],使得共聚焦显微镜在保持高清晰度和层析成像能力的基础上,能对组织样本中的不同荧光成分选择性成像,从而不仅可以避免不同荧光成分之间的串扰,还可以确定各种荧光成分的含量和具体分布。目前,在具有光谱成像功能的商业化共聚焦显微镜中,多数采用光栅分光方案,但该方案的荧光能量利用率较低且杂散光较大。本文参照 Leica 共聚焦显微镜的光谱分光方案,采用棱镜分光结合移动狭缝技术实现了光谱成像,并通过实验证明了该方案的可行性。

2 系统组成和工作过程

激光扫描共聚焦显微光谱成像系统如图 1 所示,它主要包括共聚焦成像部分和光谱探测部分。共聚焦成像部分包括激光光源、二色镜、X-Y 扫描单元、扫描透镜、筒镜、物镜、组织样本、滤色片、针孔透镜、针孔;光谱探测部分包括准直透镜、分光棱镜、聚焦透镜、移动狭缝 1、移动狭缝 2、光电倍增管(Photo Multiplier Tube, PMT)。

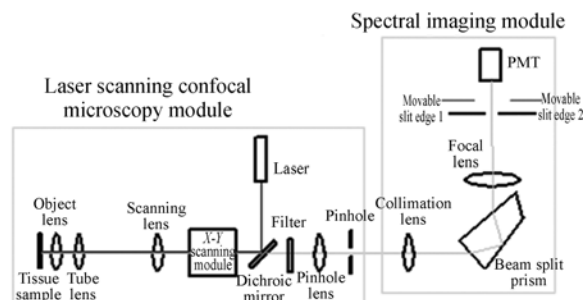


图 1 激光扫描共聚焦显微光谱成像系统示意图

Fig. 1 Schematic diagram of laser scanning confocal spectral imaging system

系统工作时,激光光源发出的准直激光经二色镜反射后进入 X-Y 扫描单元, X-Y 扫描单元在控制系统的控制下改变激光的角度。从 X-Y 扫描单元出射的激光进入扫描透镜,然后进入显微镜中的筒镜和物镜,在组织样本处聚焦。组织样本中的荧光物质被激光激发后沿相同的光路返回,在二色镜处被透射进入滤色片。滤色片滤除激光成分,只允许荧光透过,荧光进入针孔透镜并被针孔透镜聚焦在针孔处。从针孔出射的荧光被准直透镜准直,进入分光棱镜,分光棱镜将荧光进行光谱展开并经聚焦透镜聚焦后形成一条光谱带。在光谱带位置处设有两个可以独立移动的缝片,两个缝片之间形成一个出射狭缝,狭缝的宽度和狭缝相对于光谱带的位置可调。透过狭缝后的

荧光成分进入到 PMT, PMT 将光信号转换为电流信号。在控制系统的控制下,对 PMT 的电信号进行采样同时记录下 X-Y 扫描单元的位置坐标,再进行图像重建就可以生成一幅二维共聚焦图像。

目前,生产销售共聚焦显微镜的厂商主要有德国的 Zeiss 公司和 Leica 公司、日本的 Nikon 公司和 Olympus 公司。在这些公司推出的共聚焦光谱成像显微镜中,光谱成像方案可归纳为两类:一类采用光栅分光,如 Zeiss、Nikon、Olympus 公司,其中 Zeiss 和 Nikon 采用类似线阵 CCD 的多通道探测器(32 通道)实现光谱成像,Olympus 采用狭缝实现光谱成像。该方法的缺点是荧光能量利用率较低且杂散光较大;另一类采用棱镜分光,如 Leica 公司。在实现光谱成像时 Leica 也采用了可变狭缝,和本文的方案相似。但本文在共聚焦针孔和分光棱镜之间增加了一个准直透镜,使得针孔出射的光束在进入分光棱镜前先形成准直光,这样更容易优化狭缝处光谱面的荧光像差,像差校正更彻底,从而减小了不同波长的荧光在谱面处的相互交叠。

在图 1 所示的成像系统中,共聚焦成像部分采用经典的技术方案^[12],本文不再赘述,只对光谱探测部分进行详细地介绍。

3 光谱探测部分的实现方法

如图 2 所示,光谱探测部分主要包括:(1)分光棱镜单元,该单元主要有准直透镜、分光棱镜、聚焦透镜以及相关的机构连接件;(2)移动缝片单元,该单元主要有两个移动缝片,移动缝片分别装在 2 个步进电机上;(3)PMT 单元;(4)连接基座。

3.1 棱镜分光技术

当荧光标本中多种荧光成分同时激发时,为有效区分荧光成分,在设计光谱成像时需要综合考虑荧光光能利用效率、光谱分辨率、色散线性程度、杂散光对光谱成像的影响等。

在生物样品观察条件下,荧光光谱强度较弱,因此在设计荧光光谱仪时必须十分注意系统的通光效率。在可见光波段,光栅光谱仪的通光效率最高才是棱镜光谱仪的 2/3,偏离闪耀波长,而通常情况下效率只有棱镜的 1/4 左右。在探测弱荧光信号时,光栅光谱仪将损失较多的荧光能量。

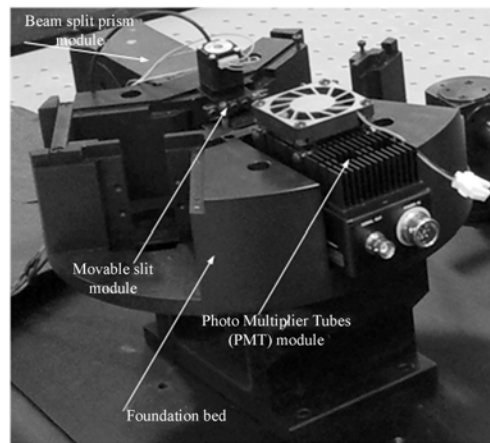


图 2 光谱探测部分实物图片

Fig. 2 Photograph of spectral imaging module

在共聚焦系统中,光栅面积很小,其刻线数 N 为 10^3 量级,因此理论分辨率高于棱镜;但是根据生物学应用的实际需要,光谱成像模块要求最小光谱带宽仅为 5 nm,光栅光谱仪的高分辨率优点得不到发挥。

与光栅光谱仪的色散均匀相比,棱镜光谱仪的色散虽然是非线性的,但是共聚焦显微镜的光谱成像模块要在用户选取所需波段后再采集数据,非线性对系统光谱成像的影响不大。

棱镜光谱仪的杂散光主要来源于棱镜表面反射,在棱镜表面镀增透膜后,可有效减少杂散光,使它达 10^{-3} 量级或更小。而光栅光谱仪有多种杂散光来源,首先是光栅衍射能量的级次重叠,除工作光谱级外,其他各级(零级、高级)光谱的能量往往达 30%~40%;此外,还有光栅刻槽非工作表面的杂散光、光栅刻划误差形成的鬼线等。

综上所述,在荧光光谱成像中,棱镜光谱仪优于光栅光谱仪,因此在课题组设计的共聚焦显微镜系统中采用棱镜分光方案。

光谱探测模块的技术要求为:光谱探测通道可灵活调整接收的光谱范围,工作波长为 400~700 nm,在整个工作波长范围内最小光谱带宽优于 5 nm,光谱带宽为 5~300 nm 可调,入射针孔直径为 0.04 mm,孔径角 $2u=2.25^\circ$,出射狭缝缝宽 0.04~6 mm 可调,调节增量为 0.01 mm。

本文拟采用恒偏向角棱镜分光,光路转折角为 90° ,如图 3 所示。恒偏向角棱镜可等效为两块直角棱镜与反射棱镜,可保证处于最小偏向条件的光线经过棱镜后总偏向角不变。在色散作用

上,所采用的恒偏向角棱镜等效于顶角为 60° 的三棱镜。

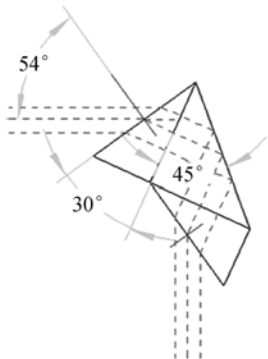


图3 恒偏向角棱镜示意图

Fig. 3 Schematic diagram of constant deflection prism

根据三棱镜的色散原理,当棱镜在最小偏向角下工作时,棱镜的角色散为:

$$\frac{d\delta}{d\lambda} = \frac{2\sin A/2}{\sqrt{1-n^2\sin^2 A/2}} \cdot \frac{dn}{d\lambda}, \quad (1)$$

式中: A 为棱镜顶角, $dn/d\lambda$ 为棱镜的物质色散, n 为棱镜材料的折射率。材料的折射率与波长的关系可由 Cauchy 公式、Schott 公式、Sellmeier 公式等得到。

线色散倒数为:

$$\frac{d\lambda}{dl} = \frac{1}{f \cdot d\delta/d\lambda}. \quad (2)$$

分光棱镜的可选材料有多种,应当按照仪器的实际要求进行筛选。根据布局尺寸,准直透镜与聚焦透镜的焦距为 100 mm。受 PMT 感光面尺寸的限制,谱面长度不宜过长,约为 6 mm,则整个光谱范围的平均线色散倒数不小于 50 nm/mm。当狭缝最小宽度为 $40 \mu\text{m}$,最小光谱带宽为 5 nm 时,要求任意波长下的线色散倒数不大于 125 nm/mm。在冕牌、火石等较常规的光学材料类型中选择棱镜材料,确定大类后再优选最合适的玻璃牌号。根据谱面长度、最小光谱带宽和出射狭缝的宽度调节范围等限定条件,火石玻璃 F2 较接近各项要求,该材料在 400~700 nm 对应的光谱带长度为 6.65 mm,比初设值 6 mm 略大些;当出射狭缝宽度为最小值 $40 \mu\text{m}$ 时,700 nm 荧光波长处的光谱带宽为 4.9 nm,400 nm 荧光波长处的光谱带宽为 0.7 nm,满足最小光谱带宽 5 nm 的要求。

3.2 基于可变移动狭缝的光谱扫描技术

上述棱镜分光方案要求出射狭缝在 0.04~6 mm 可调,狭缝移动增减量在 $10 \mu\text{m}$ 时能保证透过狭缝出射的光谱中心波长增减量在 1 nm。

基于可变移动狭缝的光谱扫描方案如图 4 所示。其主要部件包括直线式步进电机、电机支架、光耦开关、滑块、导轨、直线轴承、狭缝座、狭缝刀片等。棱镜分光狭缝机构的工作过程为:在系统启动时,机构执行初始化操作,步进电机驱动滑块机构移动直至起始位光耦开关被触发,此时出射狭缝刀片复零位。根据软件发送给电控系统的指令,直线式步进电机驱动螺纹传动机构运动到指定光谱带宽对应的距离。通过控制两个步进电机协调工作实现出射狭缝缝宽和出射狭缝中心位置的设定。该光谱扫描模块采用光耦开关来精确定位两个缝片的初始零点位置,采用步进电机和精密螺纹传动来保证缝片的位置精度,步进电机单步移动 $2.5 \mu\text{m}$,缝片位置重复性定位误差在 $10 \mu\text{m}$ 以内。

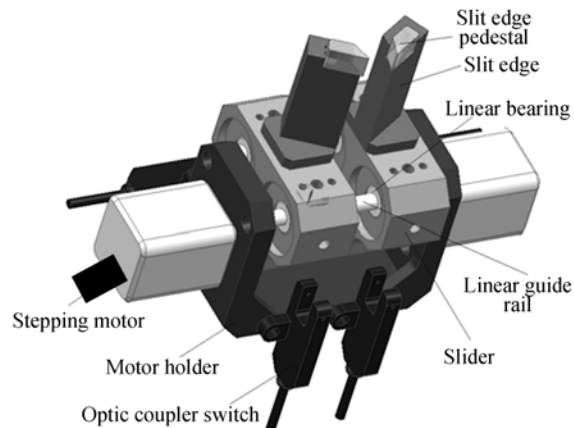


图4 基于可变移动狭缝的光谱扫描机构

Fig. 4 Spectrum scanning mechanism based on movable split

4 测量实验与结果

狭缝中心位置和光谱波长之间的关系是实现基于可变移动狭缝光谱扫描技术的基础。这种关系的理论计算结果见图 5,狭缝中心的实际位置和光谱波长的对应关系和理论曲线存在偏差。用 488 nm 激光和低压汞灯实际测量了 435.8, 488.0, 546.1, 577.0 nm 几条谱线对应的狭缝位置,在图 5 中用“o”标示出,这几条谱线对应的实

测狭缝位置和理论计算位置分别相差 0.045, 0.086, 0.092 mm, 偏差均小于 0.1 mm。由此可知, 实际制作的光谱探测模块较好地实现了理论设计值。

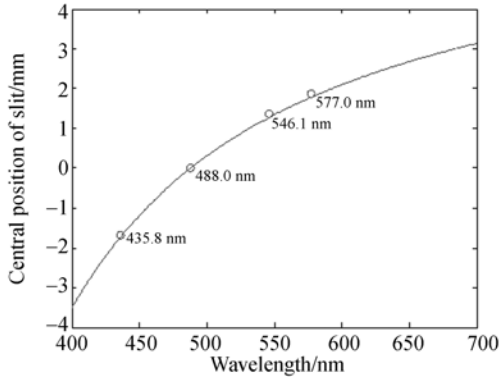


图 5 狭缝中心位置和光谱波长对应关系

Fig. 5 Relationship of slit central position and wavelength

采用该系统开展了共聚焦光谱成像实验。实验采用 Olympus 100×/1.4 物镜, 对老鼠肾脏切片荧光标本中的 Alexa Fluor[®] 488 染料进行激发, 激发照明光为 488 nm 的半导体激光。生物组织切片是 Molecular Probes 公司的 FluoCells[®] prepared slide # 3 切片, 该切片是一个 16 μm 厚的老鼠肾脏组织, 由几种染料染色, 其中 Alexa Fluor[®] 488 麦胚凝集素用于标记肾小球和肾脏曲管, Alexa Fluor[®] 568 和 DAPI 染料用于标记老鼠肾脏组织的其它成分。Molecular Probes 公司提供的 Alexa Fluor[®] 488 染料的激光吸收和荧光发射曲线如图 6 所示。

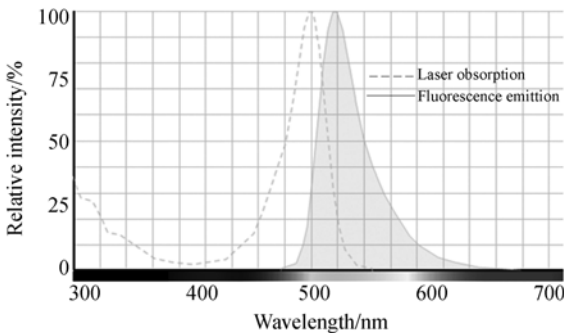


图 6 Alexa Fluor[®] 488 荧光染料激光吸收和荧光发射曲线

Fig. 6 Fluorescence of excitation and spectral emission for Alexa Fluor[®] 488

首先进行了光谱谱带成像实验。实验时将共聚焦成像时用的 PMT 临时去掉并用 CCD 替代,

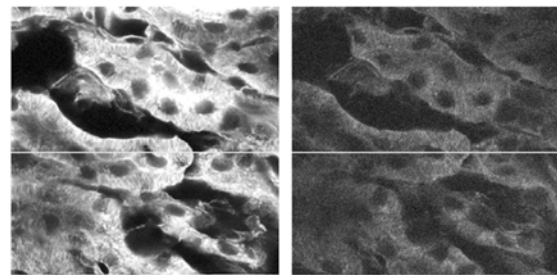
在 CCD 前放置一组镜头将光谱出缝位置成像在 CCD 上, 以拍摄荧光的光谱谱带, 同时使 X-Y 扫描振镜保持静止状态。先将光谱探测部分中的移动狭缝 1 和移动狭缝 2 移动到最外边, 即将光谱探测的出射狭缝完全打开, 此时 CCD 记录的是荧光全光谱能量分布, 如图 7(a) 所示, 谱带对应的荧光波长的有效宽度为 50~60 nm。之后用步进电机控制移动狭缝 1 和移动狭缝 2 移动, 使两个缝片之间形成的狭缝宽度为 50 μm, 此时荧光波长的有效宽度为 2.5 nm, 并将狭缝的位置定位在荧光全光谱谱带的最左端。50 μm 狭缝对应的荧光光谱谱带见图 7(b)。



(a) 全光谱能量分布 (b) 50 μm 出缝(光谱带宽 2.5 nm)
(a) Whole spectra (b) 50 μm slit (bandwidth of 2.5 nm)

图 7 光谱出缝位置的荧光能量分布(Alexa Fluor[®] 488)
Fig. 7 Distributions of spectral energy for Alexa Fluor[®] 488

然后进行共聚焦光谱成像实验, 将光谱谱带成像实验中使用的 CCD 去掉, 用 PMT 替代, 同时 X-Y 扫描振镜正常扫描。分别在全光谱时和光谱出缝宽度为 50 μm 时进行共聚焦成像实验, 两种情况下拍摄的老鼠肾脏组织切片的共聚焦图像如图 8 所示。可以看出, 随着成像光谱带宽的减小, 荧光变得较弱, 图像信噪比变差。



(a) 全光谱图像 (b) 2.5 nm 带宽(50 μm 狭缝)图像
(a) Full spectrum image (b) Image with 2.5 nm bandwidth

图 8 不同光谱带宽下老鼠肾脏组织(Alexa Fluor[®] 488 荧光染料)的共聚焦图像

Fig. 8 Confocal images of rat kidney with various bandwidths for Alexa Fluor[®] 488

图 8 中直线标示的行像素值分布如图 9 所示。图中, 曲线 A 显示了全光谱共聚焦图片的行

像素值分布,该行像素的平均值为 111,最小值为 20,最大值为 255,标准差为 57.7;曲线 B 显示了 50 μm 狭缝(对应 2.5 nm 光谱带宽)荧光共聚焦图片的行像素值分布,其平均值为 47,最小值为 4,最大值为 128,标准差为 21.1。由此可知,在采用光谱分光进行共聚焦成像时,狭缝宽度较小对应的光谱带宽较窄,用于共聚焦成像的荧光能量变得很微弱。在全光谱和 50 μm 狭缝两种情况下,指定位置的行像素平均值从 111 减小到 47,最大值从 255 减小到 128;另一方面图像的信噪比变差,行像素最大值和最小值之间的差值从 235 减小到 124,行像素值的标准差从 57.7 减小到 21.1。

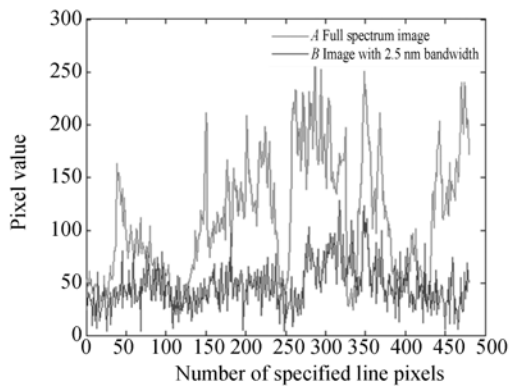
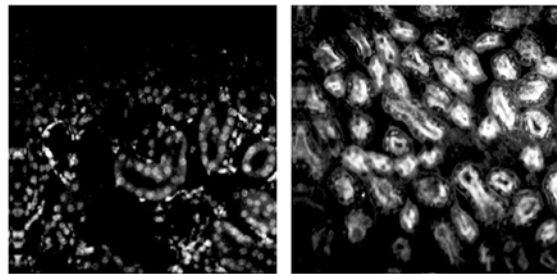


图 9 不同光谱带宽的共聚焦图像指定行像素对应的像素值
Fig. 9 Line pixel values of confocal images with various bandwidths

最后,采用光谱成像技术实现了老鼠肾脏组织中多种荧光素标定成分的区别实验。采用 405 nm 和 488 nm 两种激光激发老鼠肾脏组织切片,其中 405 nm 激光用于激发该组织中用荧光素 DAPI 标记的细胞核成分,488 nm 激光激发 Alexa Fluor[®] 488 标记的肾小球和肾脏曲管成分。根据 Molecular Probes 公司的数据,DAPI 激发后荧光发射的半峰区间为[420 nm, 516 nm], Alexa Fluor[®] 488 激发后荧光发射的半峰区间为[504 nm, 545 nm]。共聚焦光谱成像时先移动狭缝机构使得出射光谱为[460 nm, 490 nm],位于 DAPI 发射谱的半峰区间内,此时获得的是 DAPI 标记的细胞核成分图像,见图 10(a)。之后移动狭缝机构使得出射光谱范围为[510 nm, 540 nm],位于 Alexa Fluor[®] 488 发射谱的半峰区间内,此时获得的是 Alexa Fluor[®] 488 标记的肾小球

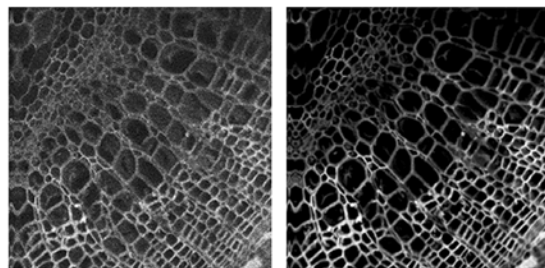
和肾脏曲管成分图像,见图 10(b)。从图中可以看出,两种成分的形态分布完全不同。



(a) 细胞核(DAPI) (b) 肾小球(Alexa Fluor[®] 488)
(a) Nuclei (DAPI) (b) Glomeruli (Alexa Fluor[®] 488)

图 10 光谱成像方法区分老鼠肾脏组织中的不同成分
Fig. 10 Components of mouse kidney discriminated by spectral imaging

在激光共聚焦光谱成像技术中,由于对荧光进行了光谱展开,用于共聚焦成像的荧光能量随着出射狭缝的宽度变窄而变得很低,因此狭缝不能无限变窄,本文采用的最小狭缝宽度为 50 μm ,对应 2.5 nm 的光谱带宽。这样的光谱分辨率可以满足一般的生物学实验。同时为提高微弱荧光成像时共聚焦图像的成像质量,需要对微弱荧光信号进行增强和滤波处理,本课题组采用对 PMT 输出信号积分的方法大幅提高了输出图像的信噪比。图 11 是 PMT 输出信号积分和未积分两种情况下的共聚焦图像,样本是木本双子叶植物茎横切,激发激光波长为 561 nm,图面幅度是 480 \times 480 像素,单个像素的积分时间为 15 μs 。成像速度主要受积分时间的限制,积分成像时的速度是 0.2 frame/s;未积分直接采样时,成像速度仅受到振镜扫描速度和数据采集速度的限制,



(a) 未积分直接采样 (b) 积分后再采样
(a) Sampling without integral (b) Sampling after integral

图 11 PMT 信号积分方法提升图像质量
Fig. 11 Qualities of images improved by PMT signal integral

成像速度是 3 frame/s。积分前图像的信号较弱,最大值只有 0.1 V(图像显示时 0.1 V 对应的最大像素值为 255),噪音比较显著;积分后图像的信号变得较强,最大值达到 5 V(图像显示时 5 V 对应的最大像素值为 255),噪音被抑制。此外,充分地消除对外界环境光形成的杂散光也能有效地提高最终共聚焦图像的信噪比。

如果狭缝出射的荧光直接进入 PMT,则移动狭缝时 PMT 感光面上的照明区域会明显不同,荧光接收效率也会不同。为解决此问题,在狭缝和 PMT 之间设置了一个汇聚透镜(为简化,图 1 中未标示出该汇聚透镜),将狭缝出射的荧光压缩汇聚到 PMT 感光面上,压缩倍率为 3 倍。这就大大减小了移动狭缝时 PMT 感光面照明区域的变动量,有效地解决了因 PMT 照明区域不同引起的光接收效率不同的问题。

参考文献:

- [1] 邱丽荣,李佳,赵维谦,等. 激光共焦透镜曲率半径测量系统[J]. 光学精密工程, 2013, 21(2): 246-252.
 QIU L R, LI J, ZHAO W Q, *et al.*. Laser confocal measurement system for curvature radii of lenses [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2013, 21(2): 246-252. (in Chinese)
- [2] 郭俊杰,邱丽荣,王允,等. 用于惯性约束聚变靶丸测量的激光差动共焦传感器[J]. 光学精密工程, 2013, 21(3): 644-651.
 GUO J J, QIU L R, WANG Y, *et al.*. Laser differential confocal sensor for ICF capsule measurement [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2013, 21(3): 644-651. (in Chinese)
- [3] JENNIFER J H, CHRISTOPHER J C, MARSHA L K, *et al.*. Characterizing image quality in a scanning laser ophthalmoscope with differing pinholes and induced scattered light [J]. *Opt. Soc. Am. A*, 2007, 24: 1284-1295.
- [4] BORUAH B R. Lateral resolution enhancement in confocal microscopy by vectorial aperture engineer-

5 结 论

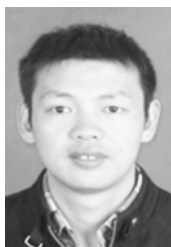
本文在激光扫描共聚焦显微成像技术的基础上引入了光谱成像技术,采用棱镜对荧光光谱进行展开,在光谱谱面处设置两个可移动缝片形成出射狭缝,狭缝宽度和位置可在步进电机的带动下设置,从而实现了不同荧光成分的共聚焦成像。与 Leica 共聚焦显微镜的棱镜分光方式不同,本系统在棱镜分光前,在针孔和棱镜之间设置了一个准直透镜,从而使像差校正更加彻底。对老鼠肾脏组织进行了共聚焦光谱成像实验,获得了全光谱和 50 μm 出射狭缝(对应 2.5 nm 光谱带宽)时的共聚焦图像以及 DAPI 标定的细胞核图像和 Alexa Fluor[®] 488 标定的肾脏小球曲管图像,实现了对老鼠肾脏组织不同成分的区分。实验结果表明,该系统能够进行共聚焦光谱成像,并扩大了共聚焦显微镜的适用范围。

ing [J]. *Appl. Opt.*, 2010, 49: 701-707.

- [5] BUCKERS J, WILDANGER D, VICIDOMINI G, *et al.*. Simultaneous multi-lifetime multi-color STED imaging for colocalization analyses [J]. *Opt. Express*, 2011, 19: 3130-3143.
- [6] MICHAEL B S, DAVID M H, JERILYN A T, *et al.*. Hyperspectral confocal microscope [J]. *Appl. Opt.*, 2006, 45: 6283-6291.
- [7] MAZZA D, CELLA F, VICIDOMINI G, *et al.*. Role of three-dimensional bleach distribution in confocal and two-photon fluorescence recovery after photobleaching experiments [J]. *Appl. Opt.*, 2007, 46: 7401-7411.
- [8] KIM S H, CHOI D S, KIM D S. Single-molecule detection of fluorescence resonance energy transfer using confocal microscopy [J]. *J. Opt. Soc. Korea*, 2008, 12: 107-111.
- [9] EGIDIJUS A, BOSANTA R B, CHRISTOPHER D, *et al.*. Stimulated emission depletion microscopy with a supercontinuum source and fluorescence lifetime imaging [J]. *Optical Society of America*, 2008, 33(2): 113-115.

- [10] 刘玉娟,崔继承,巴音贺希格,等.凸面光栅成像光谱仪的研制与应用[J].光学精密工程,2012,20(1):52-57.
LIU Y J, CUI J CH, BAYANHESHIG, *et al.*. Design and application of imaging spectrometer with convex grating [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2012,20(1):52-57. (in Chinese)
- [11] ZHANG Y H, HU B, DAI Y K, *et al.*. A new multichannel spectral imaging laser scanning confocal microscope[J]. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2013, 2013:1-8.
- [12] JAMES B P. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*[M]. New York:Springer Science Business Media, 2006.

作者简介:



张运海(1975—),男,湖北襄阳人,博士,副研究员,1998年,2006年于南京航空航天大学分别获得学士、博士学位,主要从事激光扫描共聚焦显微成像技术、超分辨受激辐射损耗(STED)显微光学成像技术、自适应光学技术的研究。E-mail: zhangyh@sibet.ac.cn



杨皓旻(1985—),男,江西南昌人,博士,助理研究员,2006年于浙江大学获得学士学位,2011年于中科院长春光学精密机械与物理获得博士学位,主要从事激光扫描共聚焦显微成像、光谱仪器、光谱分析等研究。E-mail: yanghaomin_3@163.com

(版权所有 未经许可 不得转载)