

# 细胞显微技术

郑丽沙

82314878

生物与医学工程学院

Lishazheng@buaa.edu.cn

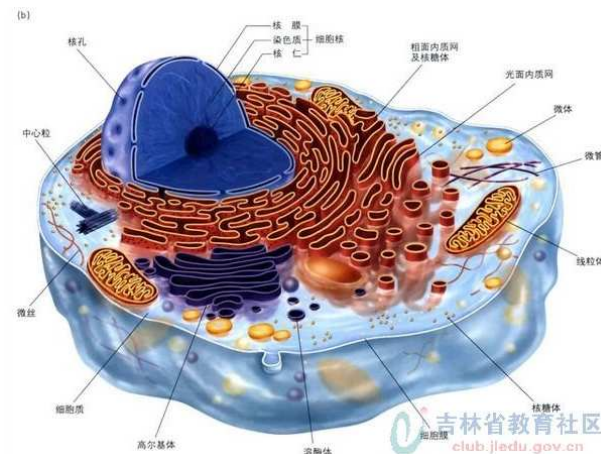
\* 人类从外界获取的信息主要来自视觉，但人类视觉的能力是很有限的。以空间分辨能力为例，人视觉系统的结构，决定了肉眼的空间分辨能力最多不超过 0.073 mm，这是人眼空间分辨能力的局限；人视细胞中的光感受分子能够感受的光只是所谓的可见光，而可见光在光的整个波长范围内只占很小一部分，这是人眼对于光波长范围受能力的局限；人视觉的时间分辨能力也十分有限，对于快或太慢的变化过程，人眼都难以直接感知。



- \* 显微技术直接的作用，是大大提高了人眼的空间分辨能力。同时，显微技术与数字图像等其他技术的结合，也使显微图像技术的时间分辨率比人眼有很大提高。除了空间分辨率和时间分辨率的要求以外，要用显微镜观察我们感兴趣的对象，还要求所观察的对象在显微镜能够区分的某个参数上与周围的环境或背景有差别，这就是对于显微图像**对比度**的要求。



\* 大多数细胞的直径在微米量级，细胞器的尺寸则在 $\mu\text{m}$ 到 $\text{nm}$ 之间，而组成细胞器的生物分子的大小一般只有几到几十 $\text{nm}$ 。因此仅靠肉眼无法进行细胞结构的观察和分析。人类对细胞的认识，细胞生物学的每一个进步，都与显微技术发展紧密相连。



# 内容

- \* 光学显微镜
- \* 电镜
- \* 扫描探针显微镜
- \* 活体分子成像
- \* 显微技术展望

## 一、光学显微镜

- \* 光学显微镜指的是以可见光为光源的显微镜。由于可见光可以透过玻璃，因此，光学显微镜的光学器件主要是各种透镜，都以玻璃为制作原料。光学显微镜技术从一开始就和细胞学紧密相连。可以说，没有光学显微镜技术，就没有细胞学的产生和发展。反过来，也正是生物学以至细胞学观察研究的需要，催生和推动了光学显微镜的发明和发展。



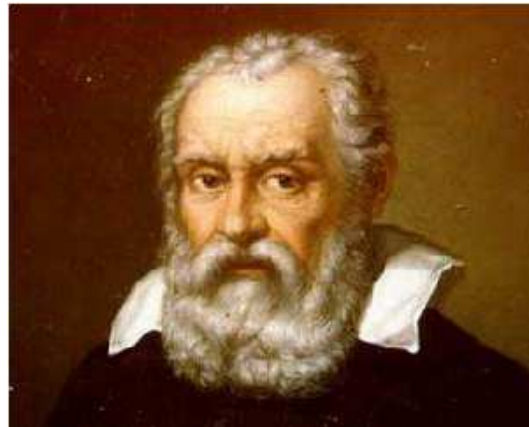
## 光学显微镜的发明和发展

- \* 一种说法是：光学显微镜技术的突破首先是由荷兰的眼镜制造匠Laccharias Janssen和他的父亲Hans在1590年完成的。他们把几个放大镜镜片放进一根管子，发现从管子的一端看去，放在管子另一端的物体要比通过单片放大镜镜片放大后看到的大得多。从采用一片透镜的放大镜到采用两片或片以上的镜片的显微镜，完成了技术上的一次大飞跃，人类历史上第一个复式光学显微镜就这样诞生了！

放大倍数为3-10倍

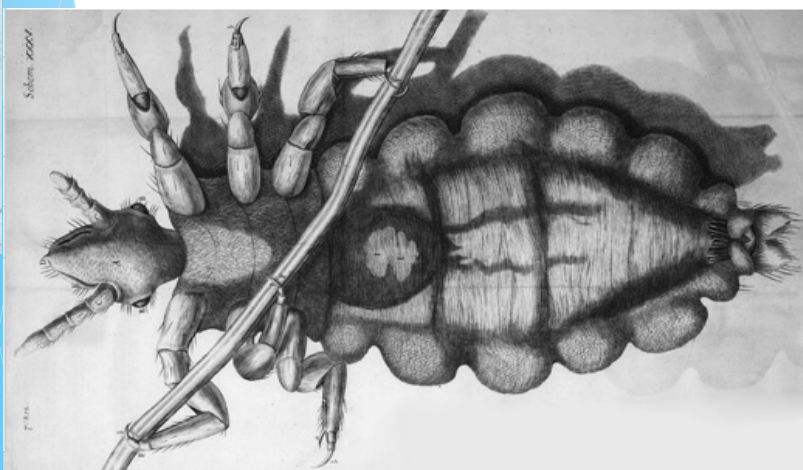
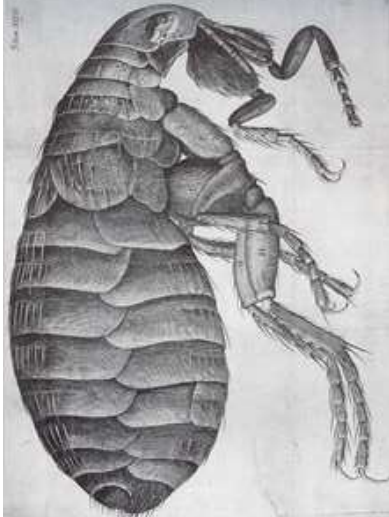


- \* 伽利略听说他们的实验后，也动手自己做了一台光学显微镜，并且阐明了其光学原理。他在显微镜中加入了调焦的部件，大大改进了Janssen父子发明的显微镜。





- \* 对光学显微镜发展做出重要贡献的另一位著名科学家是英国人Robert Hooke (1635-1703)，大家在中学时就熟知他Hooke不仅在他1665年出版的专著《显微图像学》中推出了一些光学显微镜设计的新思想，如三透镜光路系统、侧立柱式显微镜等等，而且用光学显微镜进行了许多生物学的观察。为了弄清软木为什么又轻又结实且被挤压后体积可以大大压缩，他用显微镜观察了软木的微观结构，发现软木具有一种网格式的结构，他把这种结构命名为“cell”，这就是“细胞”这个名词的来源。



- \* 光学显微镜之父的荷兰人Antonie van Leeuwenhoek（大家熟知的中文译名是“列文虎克”）。
- \* Leeuwenhoek是一个布料商，起初他用磨制的放大镜来放大毛料衣物，计算羊毛的数目，但他在显微镜制造方面的成功使他能够看到一个过去人类从未观察到的微观世界。
- \* 他在磨制显微镜镜片等方面的具有高超技艺，他能磨制曲率半径很小的镜片，从而大大提高了筒式光学显微镜的放大倍数，他制造的筒式光学显微镜外形非常美观优雅，放大倍数竟然高达270倍！





18世纪的显微镜（来自巴黎博物馆艺术宫）

\* 这两位“虎克”给我们的一个启示，就是工程技术人员或工程科学家不仅可以在显微镜这样的重大技术的发明和改进方面做出重要的、不可替代的贡献，而且可以利用他们在技术上的优势获得生物学上的开创性成就。工程技术专家在生物学上做出成就的前提，是对生物学的热爱和创造知识的强烈欲望。84岁时的Leeuwenhoek曾在信中写到：“我的这些已经从事了很长时间的的工作，并非是为了追求我现在所获得的赞誉，而主要是为了我对知识的异乎常人的渴望。因为这种渴望，使我无论何时观察到什么不寻常的东西，我都认为有责任把他们记录在纸上，以便让所有具创造才能的人知道。”

- \* 光学显微镜可称为一种“古老”的显微镜技术，但时至今日，光学显微镜仍然应用广泛，不可替代。

- \* 优势：

- \* 结构简单，价格比较便宜

- \* 细胞内分子进行适当的标记后，已经可以观察细胞内分子的活动。

- \* 使用的光源对生物样品基本无损，成像速度快，更适于活细胞的观测。

# 光学显微镜的基本组成部分

- \* 光学放大系统
- \* 照明系统
- \* 支架系统
  - \* 虎克提出的侧柱式支架仍然是至今采用最多的支架系统。

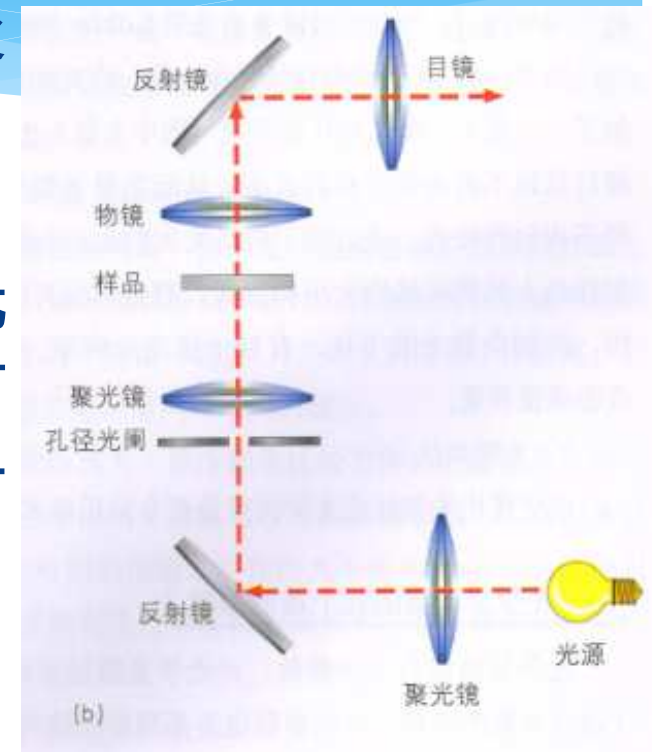


- \* 光学放大系统
- \* 光学放大系统多为由物镜、目镜和场镜(field lens)组成的三透镜光路系统。





- \* 照明系统照明系统包括光源、反光镜和聚光镜等。照明系统的几何配置分为两种，一种是透射式照明(transmission illumination)，其光路图如图所示。从光源发出的光经反光镜反射后改变方向，射向样品台上的样品。这种照明方式适用于透明或半透明的样品。



- \* 另一种照明方式是落射式照明(epi-illumination)或称反射式照明(reflection illumination)，光路图如图所示，这种照明式适用于不透明的样品，是部分荧光显微镜和偏光显微镜中采用的照明方式。在这种照明方式下，光源发出的光经过一个二向色分光镜（下面简称为二向色镜）反射后照射样品，样品反射、散射或发射的光再透过二向色镜进入目镜或相机等检测器。
- \* 二向色分光镜:其特点是对一定波长的光几乎完全透过，而对另一些波长的光几乎完全反射。



## 光学显微镜的几个重要参数

- \* 放大倍数( magnification)
- \* 显微镜的放大倍数又称放大率，是指人从显微镜目镜中所看到的图像中目标的大小与目标实际大小的比值。
- \* 显微镜放大倍数等于物镜和目镜放大倍数的乘积。

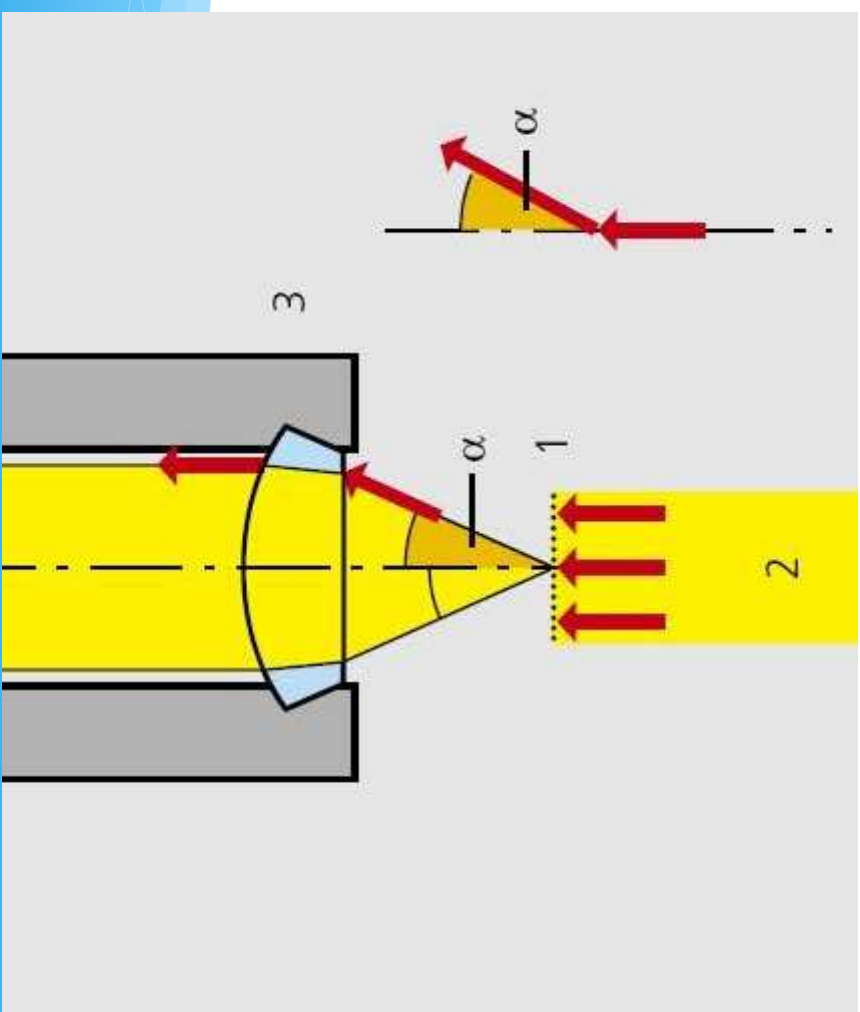
- \* 分辨率

- \* 一般定义显微镜所能分辨的样品上两个点之间的最小空间距离 $d$ 作为显微镜的分辨极限。空间分辨率与分辨极限 $d$ 成反比。

- \*  $d = \lambda / NA$      $d = \lambda / NA$      $NA = n \cdot \sin(\alpha/2)$

- \* 式中 $d$ 为被照明的样品上能够分辨的两个点之间的最小距； $\lambda$ 为光的波长； $NA$ 为numerical aperture的缩写，即显微镜的数值孔径。

- \*  $N$ 是物镜与观察目标样品之间的介质的折射率， $\alpha$ 是处于物镜光轴上的样品点与物镜前透镜的有效直径所形成的角度即孔径角或镜口角。



- \* 从两个公式都可以看出，要提高显微镜分辨率，可以通过以下三个途径：一是选择波长更短的波，例如紫外线、X线或电子束；二是采用折射率 $n$ 较高的介质，例如，空气的 $n$ 是1，水的折射率 $n$ 为1.333，而油镜使用的镜头油的折射最高可达1.6以上；三是增大显微镜的孔径角，采用高NA值的镜头。

$$d=\lambda/NA \quad NA=n*\sin(\alpha/2)$$

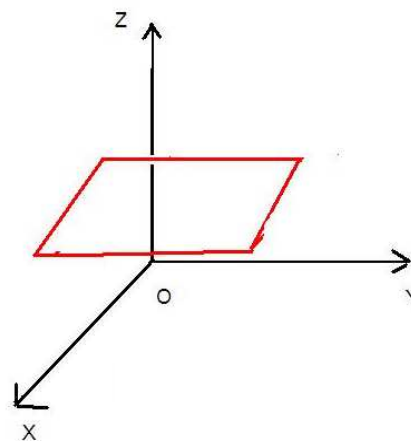
- \* 显微镜的分辨率取决于物镜的分辨率，因此显微镜的成质量主要取决于物镜的分辨率。物镜的分辨率无法分辨的结构，即使配上倍数很高的目镜，也是人眼无法分辨的。目镜的作用是把物镜所能分辨的样品结构放大到人眼能看清的程度。物镜能够分辨的细微结构，如目镜没有足够的放大倍将其放大到人眼能看清的程度，则仍然无法看清。一般认为，显微镜的最佳总放大率是在标准镜筒长度下物镜NA值的500 - 1000倍。
- \* 10倍的目镜是使用最多的目镜。



- \* 工作距离(working distance)
- \* 工作距离也称物距，指的是物镜前透镜的表面到样品上面的距离。用显微镜观察样品时，样品应放在物镜焦距的一倍至两倍之间，所谓“调焦”，实际上调的是工作距离。
- \* 数值孔径大的高倍物镜，工作距离就小。例如，100倍的油镜，工作距离不足0.2 mm。因此使用高倍物镜时要特别注意不要因为调焦不当而压坏样品，损伤物镜镜头。



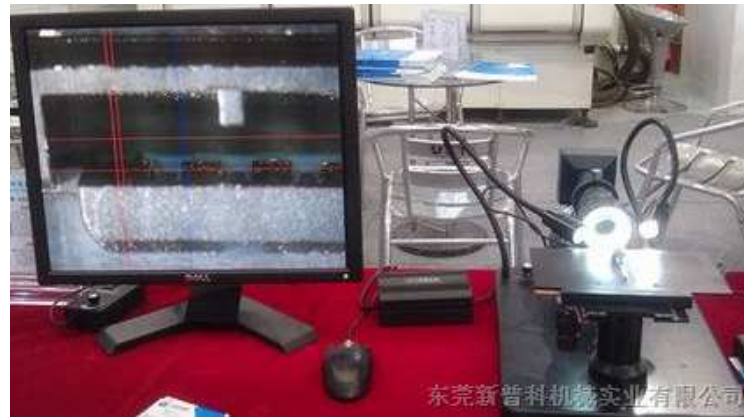
- \* 景深( depth of focus)
- \* 即在显微镜的焦点对准样品上某个点时，在纵深方向即与样品表面垂直的方向上能够清晰分辨出的样品的范围。景深越大，所观察样品的纵向清晰范围就大，能到的纵向结构就多。



- \* 视场直径(field of view)
- \* 视场直径是指显微镜中能够看到的圆形视场的直径，表示我们的视野范围的大小。显然，视场直径越大，能够看到的样品的横向范围就越大。
- \* 视场直径与物镜的放大倍数成反比。



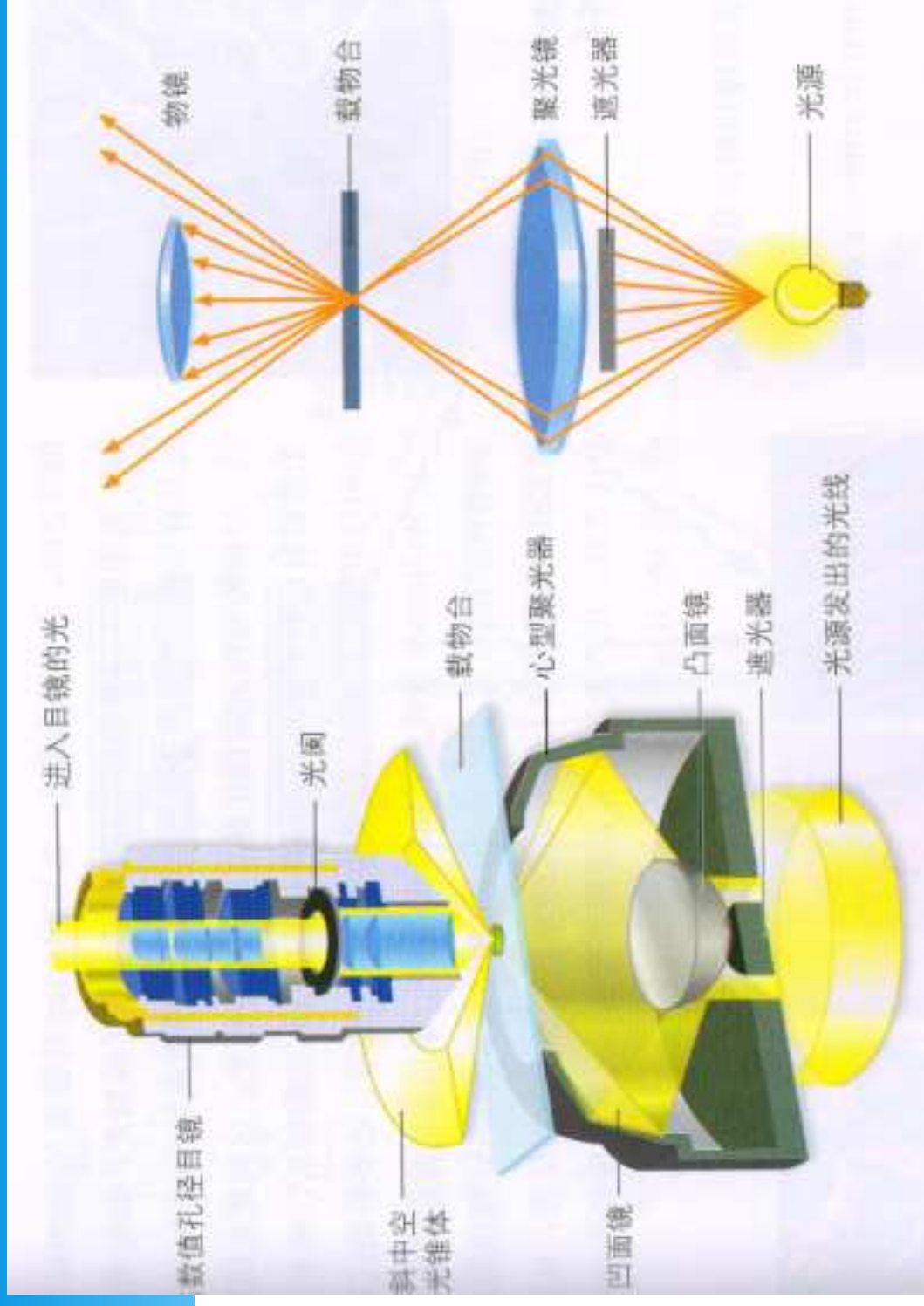
- \* 镜像亮度(image light)镜像亮度是指显微镜下图像的明暗程度，镜像亮度与物的数值孔径的平方成反比，也与总放大倍数的平方成反比。
- \* 如果要进行显微摄像，则希望在保证图像质量的前提下，尽量减小照在样品上的照明光的光照量，以减小光照对样品的光损伤。



## 几种常用的光学显微镜

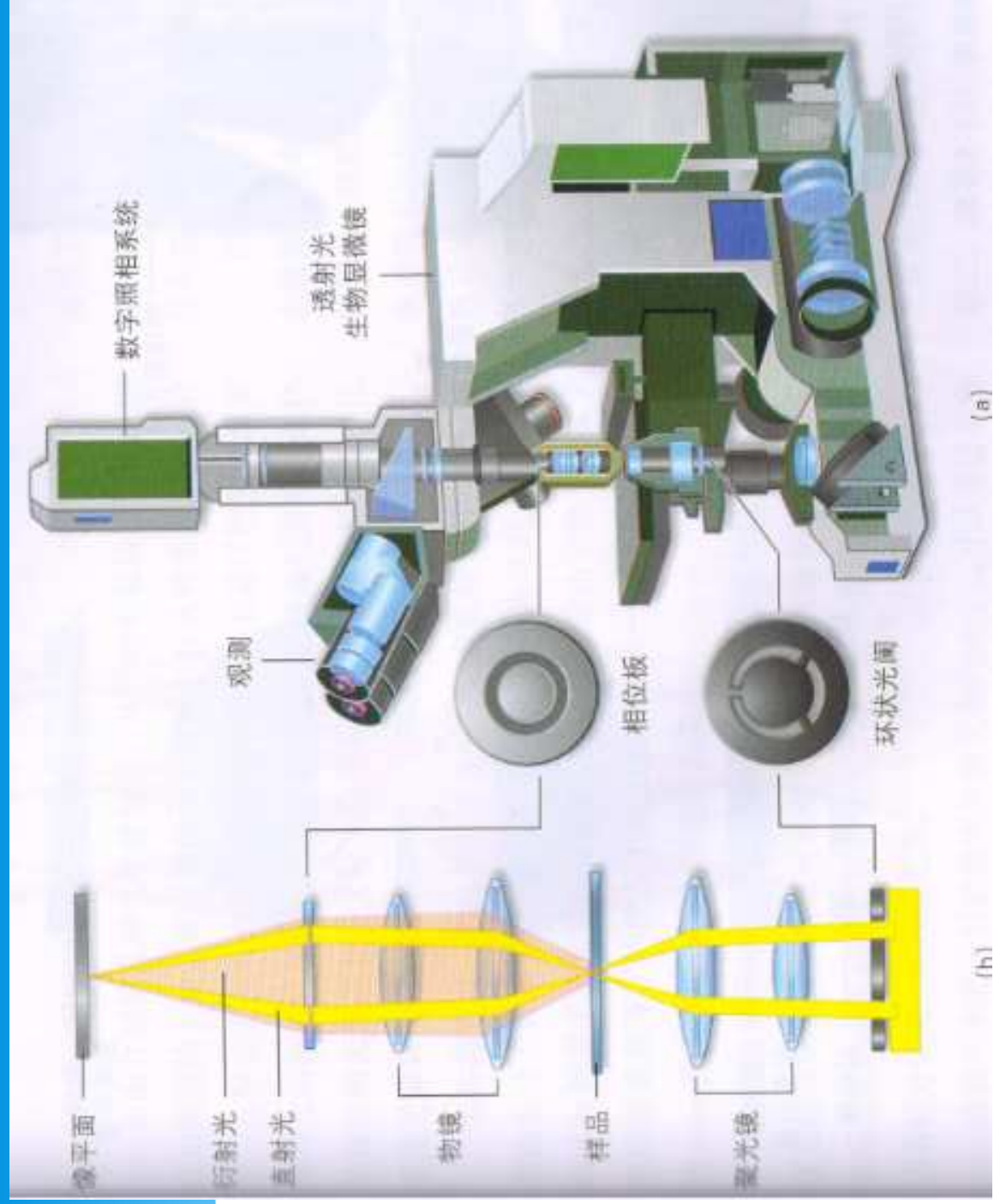
- \* 亮视野显微镜( bright-field microscope)
- \* 使用最普遍的一种显微镜，它的特点是进入物成像的光主要是由光源照射到样品经样品吸收后透射过去的那部分光线。
- \* 如果所要观测的样品中不同结构成分之间在颜色和光强上差别不够大，则使用亮视野显微镜所得到的图像反差就不会令人满意，图像质量会较差。为了提高显微图像的质量，人们发展出多种可以提高图像反差的显微镜技术，暗视野显微镜、相差显微镜、微分干涉差显微镜都属于采用反差增强技术的显微镜。

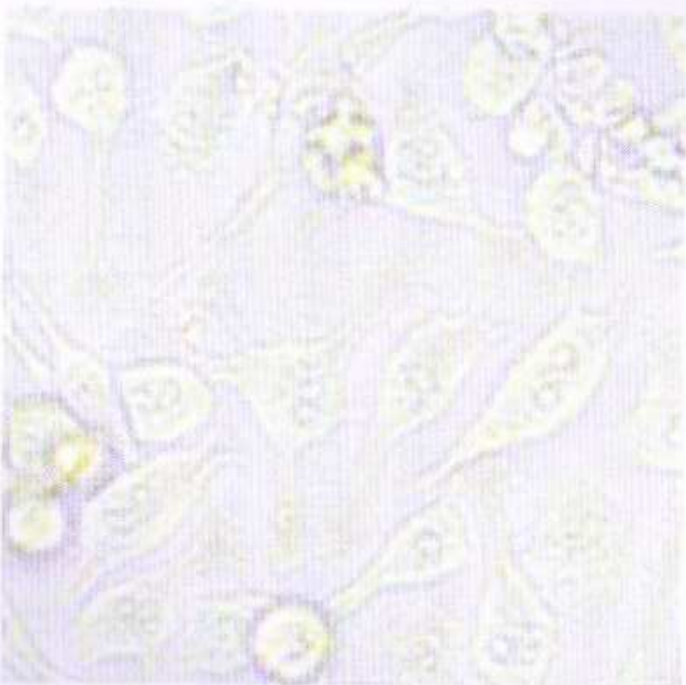
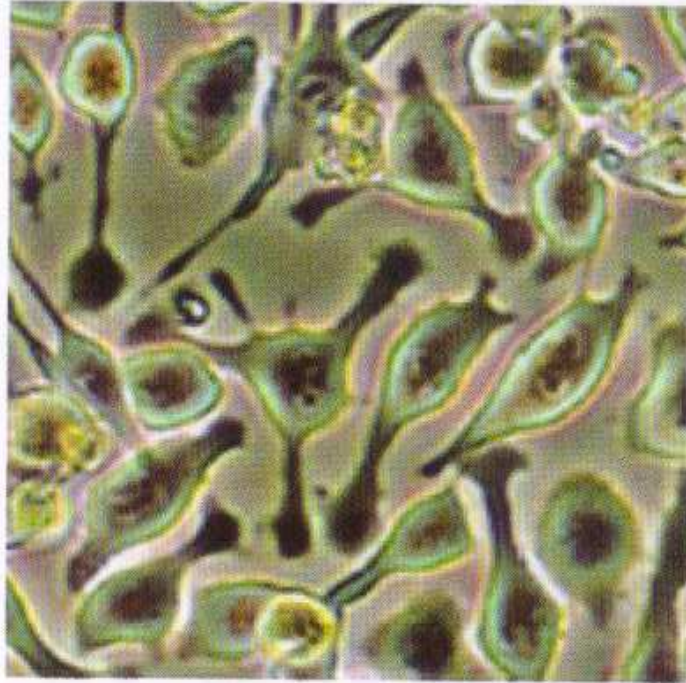
- \* 暗视野显微镜(dark-field microscope)
- \* 进入物镜成像的光主要是样品的**散射光**。
- \* 在光源和聚光镜之间紧靠聚光镜处用不透的物质挡住光源投射到聚光镜中部的直射光线，这样，能照到样品上的光都是斜射进入样品的，而能够进入物镜成像的光都是经样品散射的光，所形成的图像是在黑色背景下反差较强的图像。





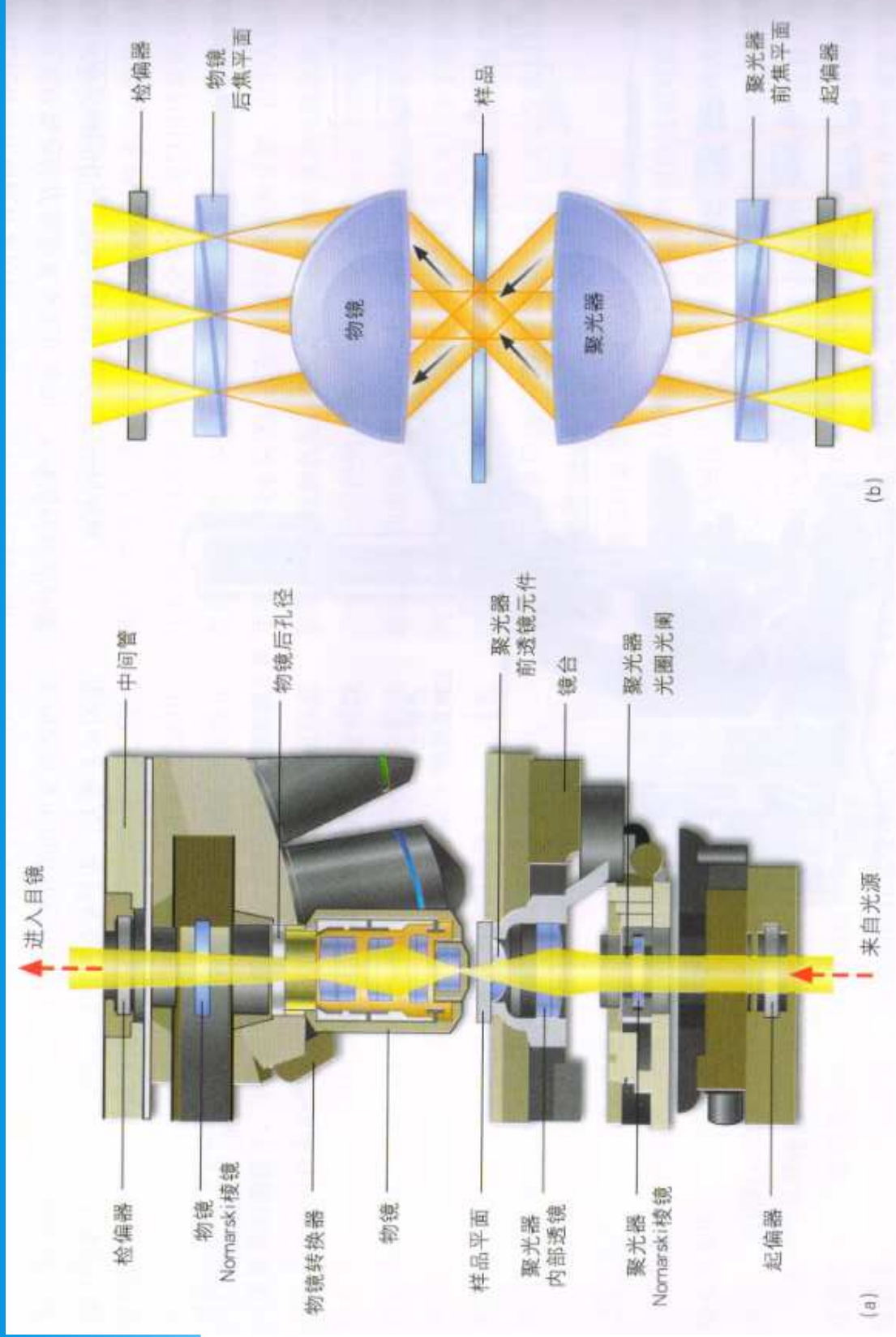
- \* 相差显微镜(phase contrast microscope)
- \* 相差显微镜也称为相衬显微镜。在相差显微镜的聚光镜前设置了环状光阑，物镜的后焦面处设置了相位板。环状光阑的位置设置要保证样品受到来自环状光阑的光线照射后所发出的直射光和衍射光成的像在同一个平面上的相同位置。相位板的作用是改变直射光和衍射光的相位，使直射光与衍射光到达成像平面时相位相同，产生干涉，从而使透明样品图像的反差增大，易于观察。
- \* 相差显微镜特别适合于观察未染色的活细胞。



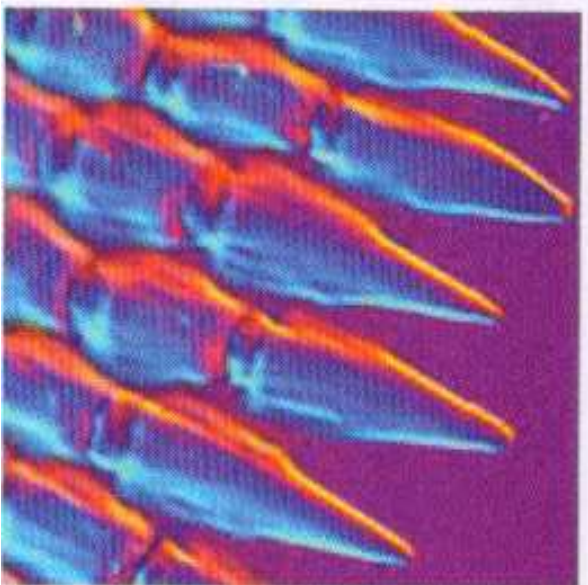
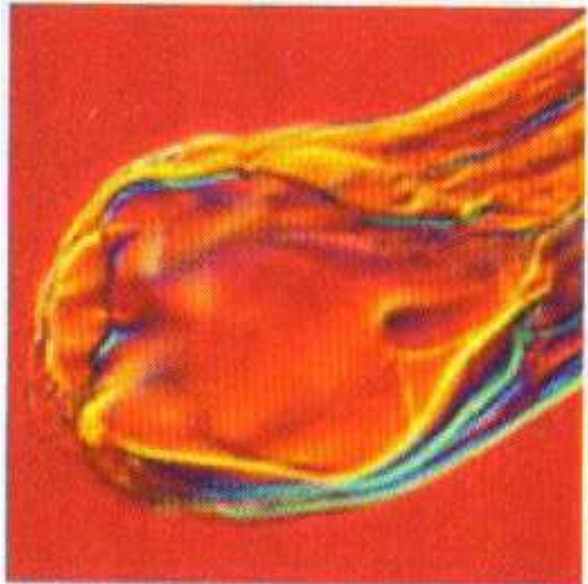
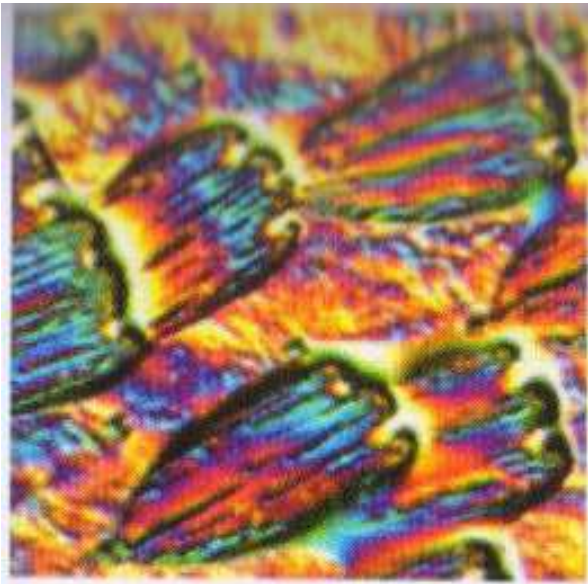


- \* 微分干涉差显微镜(differential interference contrast microscope, DIC)

- \* 微分干涉差显微镜在光源和目镜附近分别设置了一个偏振片，作为起偏器和检偏器。起偏器和聚光器之间，以及物镜与检偏器之间，又分别设置了一个Wollaston棱镜或Nomarski棱。光源射出的光线经过起偏器后变成了偏振光，偏振光通过具有双折射性质的分光器Wollaston棱镜或Nomarski棱镜后，分解为偏振方向相互垂直的两束偏振光。这两束光经聚光镜折射后射到样品上，经过样品的吸收和散射后，两束光的相位出现微小差别。这两束光通过物镜后，还要再通过第二块Wollaston棱镜或Nomarski棱镜，最后通过检偏器。光学设计使得通过第二块Wollaston棱镜或Nomarski棱镜的两束光在检偏器方向上的偏振光分量具有恒定的相位差，从而发生干涉，所产生的图像反差得到增强，且有浮雕般的立体感







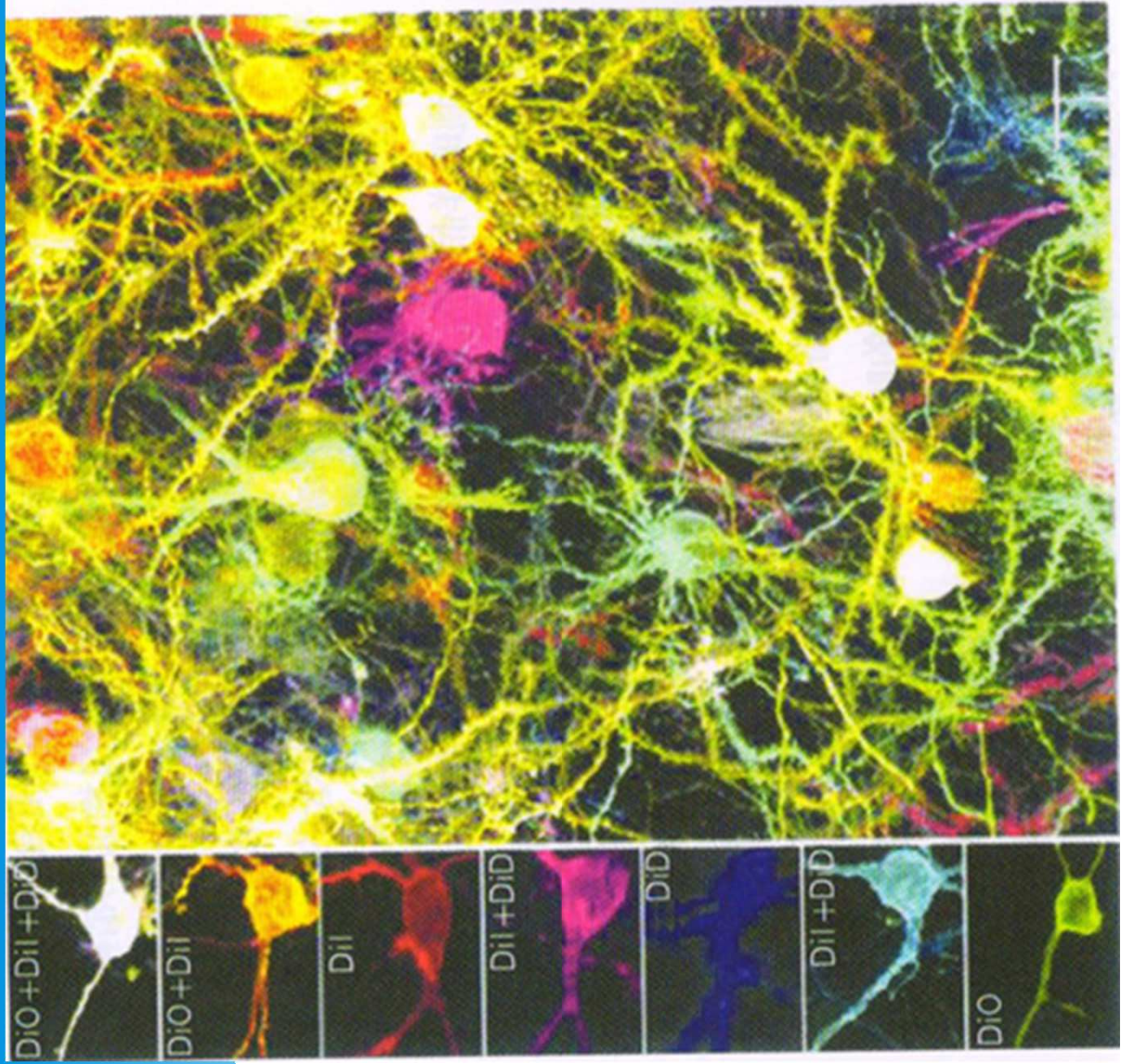
- \* 荧光显微镜( fluorescence microscope)
- \* 而荧光显微镜所观察或纪录到的是样品被照明光源照射后发射出的荧光或样品本身发射的光。
- \* 优势：
  - \* 荧光显微镜图像的信噪比可以达到很高的水平
  - \* 可以用不同的荧光标记物标细胞中不同的细胞器以至不同的分子，
  - \* 荧光特性的变化，可以反映细胞生理、生化或物理性质化，甚至细胞中某种特定分子的结构和功能的变化。

- \* 比较有代表性的荧光标记物有化学合成的荧光探针、基因工程方法标记用的荧光蛋白年来出现的荧光量子点。
- \* 目前使用较多的是所谓荧光染或荧光探针分子。不同荧光探针具有不同的激发波长、发波长和荧光量子产率。
- \* 其中最著名的是荧光蛋白的基因工程标记方法。这种方法可以将生物中一类能发荧光的蛋白质(光蛋白)的基因与所观察的细胞成分内某种特有的蛋白质的基因组合到一起，然后利用转基因技术转入细胞。

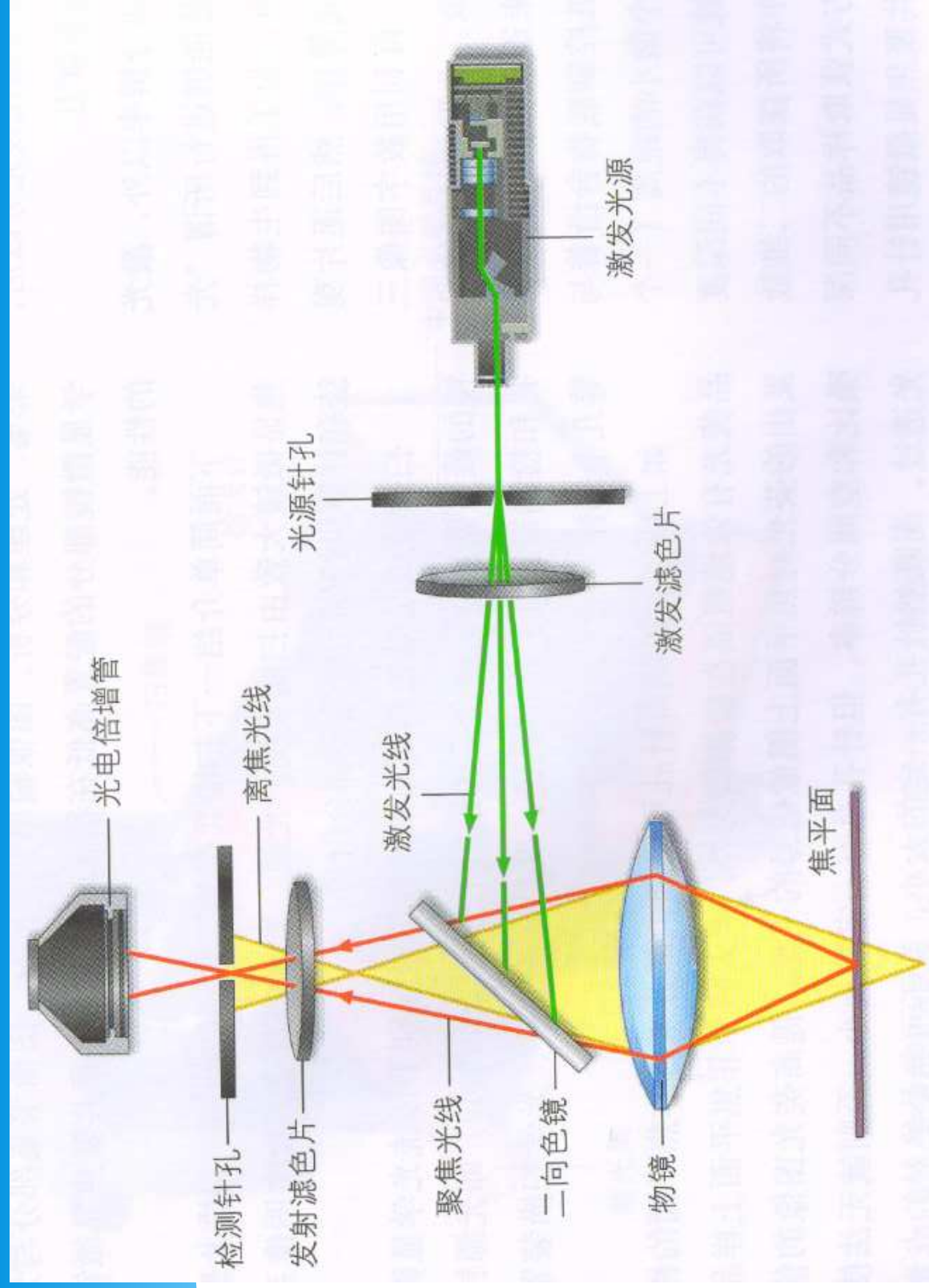


- \* 但如果所观察的细胞是在生物组织中，即使把生物组织样品切成薄片，也有一定的厚度，这时的细胞观察对显微镜的要求就会与平面培养的细胞的观察有很大不同，需要具有三维图像观测功能的显微镜。在活动物的细胞观察中，三维显微成像更是必不可少。而传统的荧光显微镜不具备获取细胞三维图像的能力。

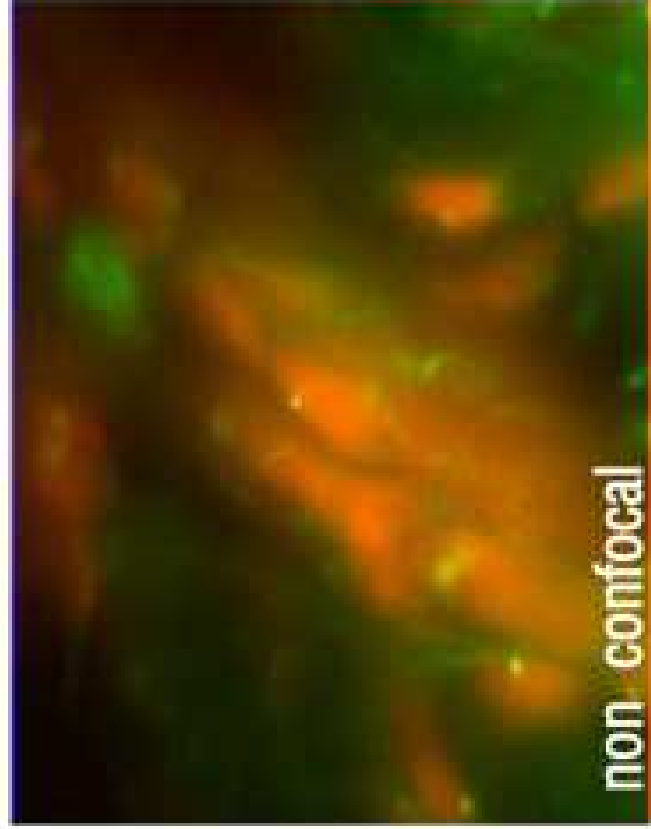
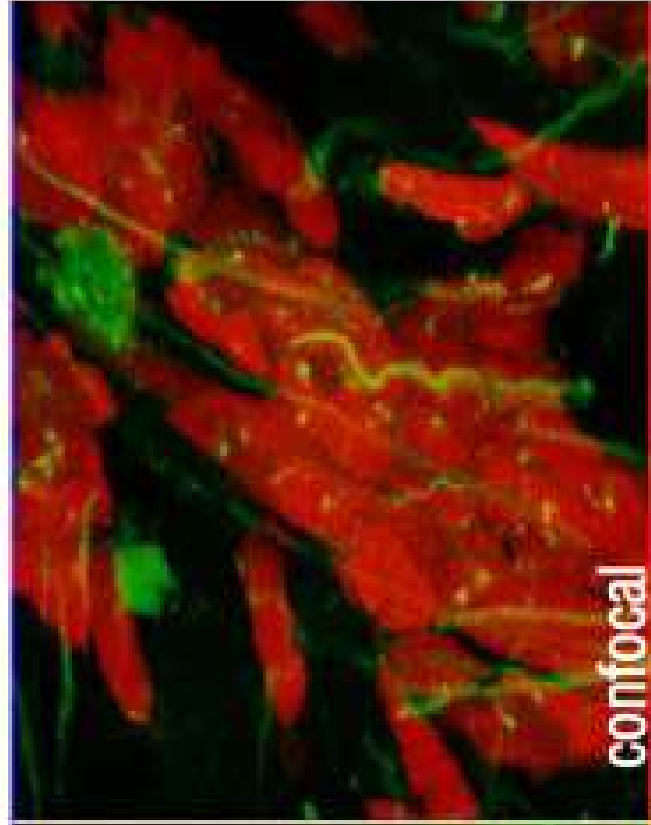
- \* 具备三维显微图像获取功能的光学显微镜主要有激光扫描共聚焦显微镜、多光子显微镜和有去卷积数字图像处理功能与载物台能在计算机自动控制下沿x、y、z三个方向精确运动的荧光显微镜。



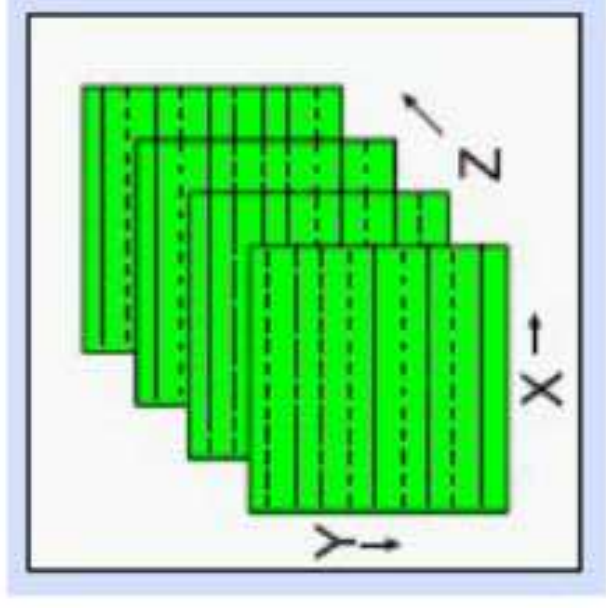
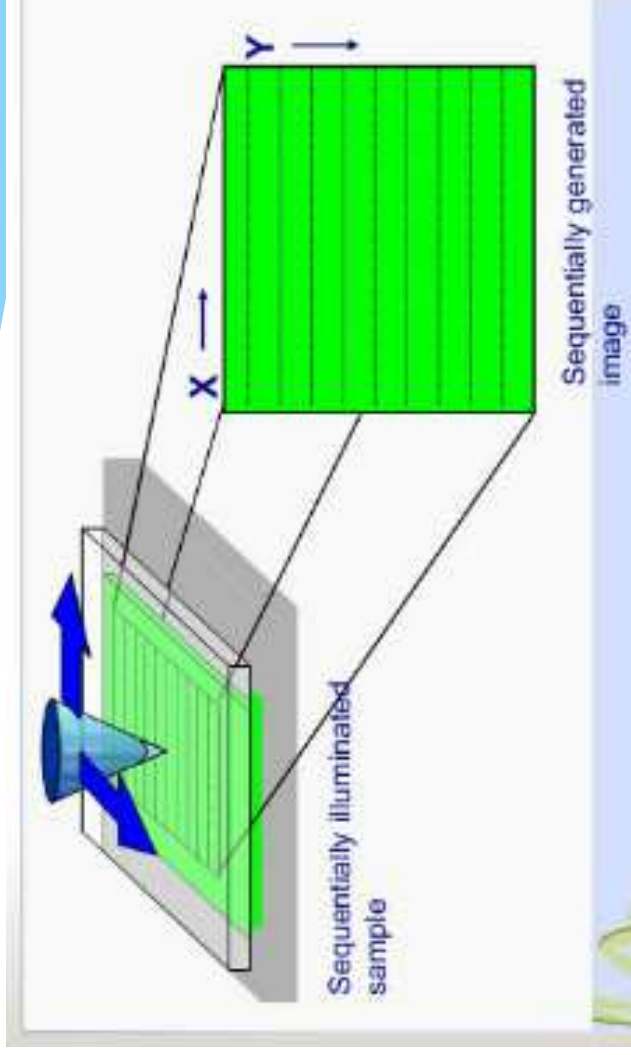
- \* 激光扫描共聚焦显微镜(laser scan confocal microscope, LSCM)
- \* 由荧光显微镜、扫描共聚焦系统和数字图像系统组成。共聚焦显微镜的技术特点之一，是采用了**共聚焦技术**。共聚焦显微镜中设置了两个针孔，一个针孔是在激光源与样品之间，称为光源针孔。激光源发出的激光，经过光源针孔后成为点光源。从光源针孔出来的激光经二向色镜反射到物镜上，再经物镜聚焦后照在样品上。样品上被激光照到的点受到激光的激发发出荧光，经物镜聚焦后透过二向色镜，聚焦在位于二向色镜与光检测器之间的一个针孔上，这个针孔称为检测针孔。所谓共聚焦，**是指光源、样品上的焦平面、检测器所处位置相为共轭关系**，也就是说：如果把光源针孔和检测针孔都作为点光源，那么它们发出的光经物镜聚焦后都会聚焦在样品同一焦平面上。







- \* 除了通过共聚焦技术提高了图像空间分辨率以外，激光扫描共聚焦显微镜技术上的另一个特点是能够进行所谓“光学切片”。在扫描共聚焦显微镜发明之前，为了得到生物样共聚焦显微镜采二维图像，所采用的方法是照明激光束逐点扫描、逐点检方式。扫完一幅二维图像后，计算机控制的载物台沿着与描平面垂直的方向 $z$ 轴方向移动一个微小的距离（一个步长），再扫描下一幅二维图像。这样，就可以获得不同深度之上样品的二维图像。再
- \* 用三维重建的软件将所获取的二维数字图像序列构建成三维图像。

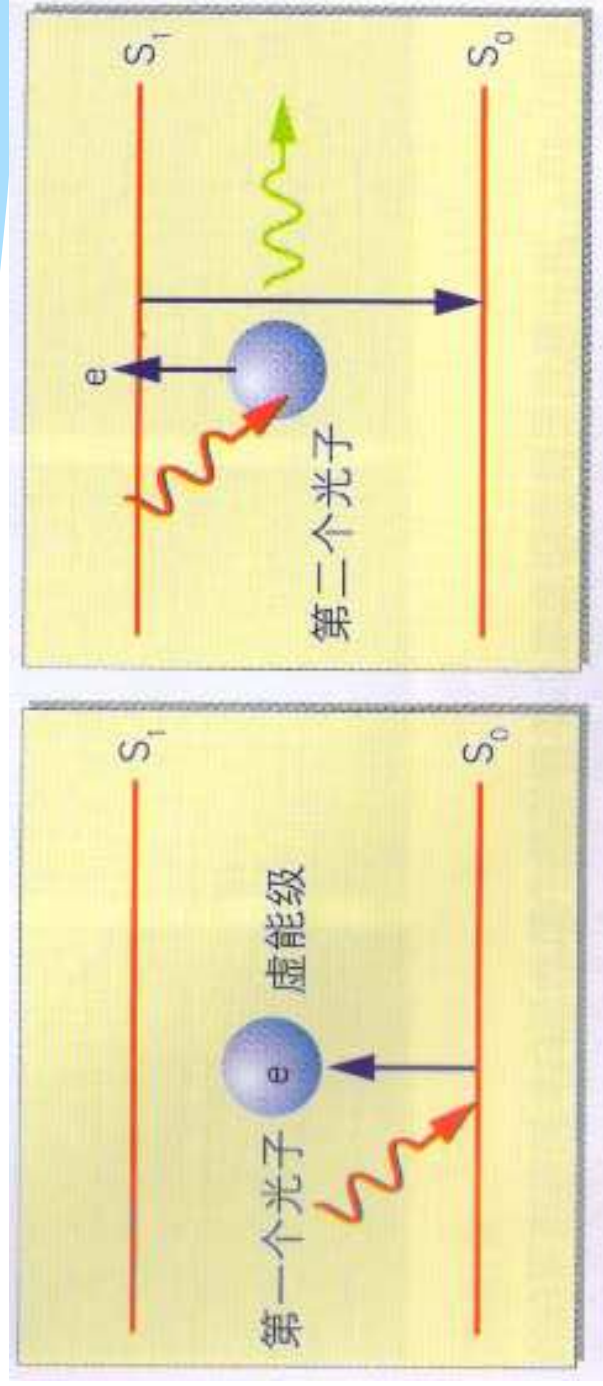




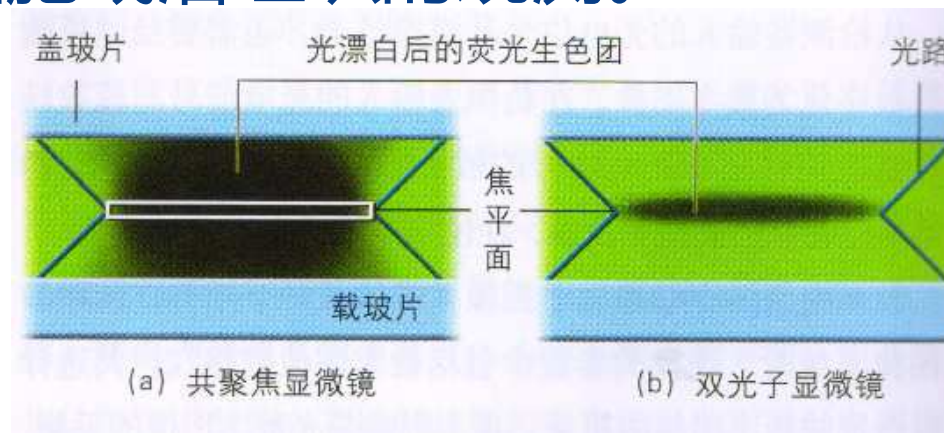
- \* 多光子显微镜

- \* 多光子显微镜特别适用于活体中的活细胞观察和记录。

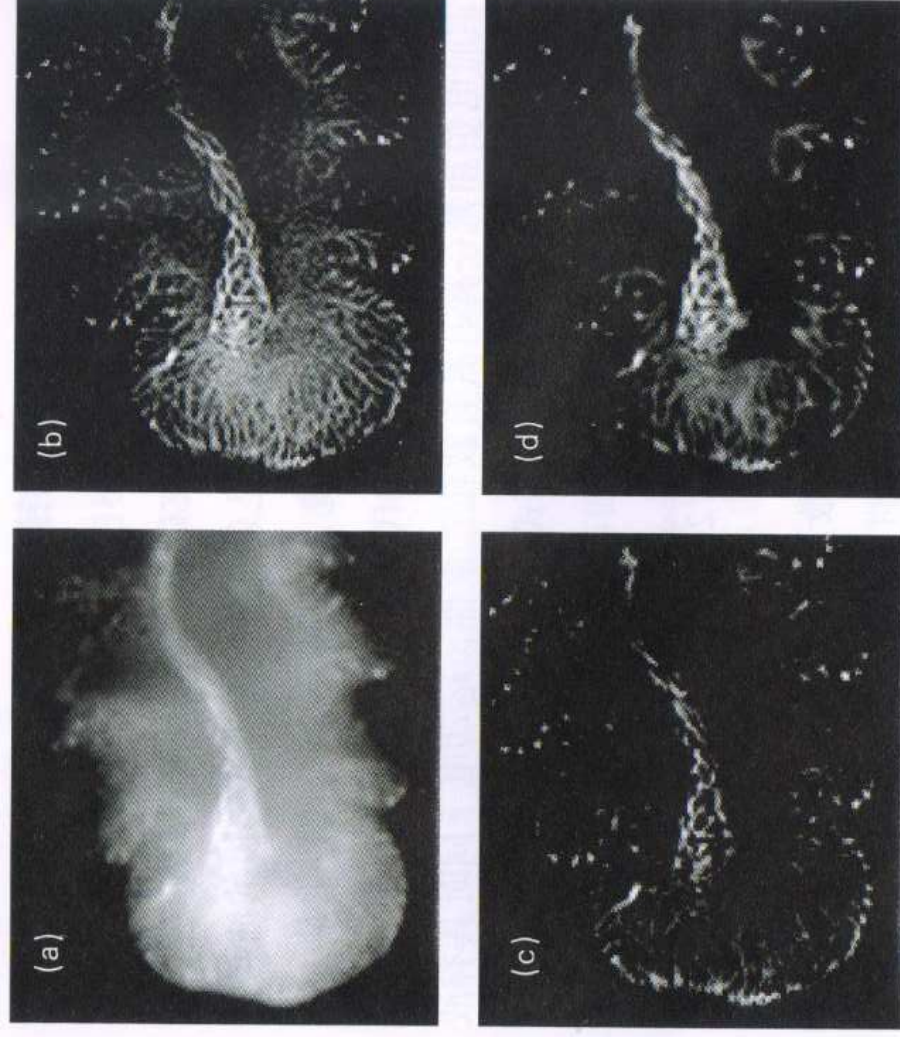
- \* 单光子荧光激发时，荧光生色团每次吸收一个光子的能量，这个光子的能量相当于荧光生色团某个电子激发态与基态能量之差。荧光生色团吸收了这个光子的能量后，发生从基态到激发态的跃迁，为此后的荧光发射准备了条件。而在双光子荧光发射中，所采用的激发光光子的能量不足以使生色团发生从基态到某个电子激发态的跃迁。但当光子的密度足够高时，生色团吸收了第一个光子的能量后，被激发到某个虚能级(pseudo-excited state)。如果在吸收了一个光子的能量后1 fs的时间间隔内该生色团再次吸收一个光子，这两个光子的能量之和相当于该生色团某个电子激发态与基态能量之差，两个生色团的能量就能使该生色团的能级跃迁到这个电子激发态，进而发生后续的荧光发射各个过程，这就是双光子荧光激发的原理。



- \* 高于普通荧光显微镜的空间分辨率。双光子显微镜对样品的光损伤要比普通共聚焦显微镜小得多。
- \* 双光子显微镜有利于保持活体动物内细胞的正常生理状态，有利于动物和细胞的存活和长期观察，因此特别适产活细胞或活组织的观测。



- \* 具有去卷积数字图像处理功能和样品台计算机自动控制功能的荧光显微镜
- \* 除了前面介绍的共聚焦显微镜和多光子显微镜这两种方法以外，还可以采用软件和硬件相结合的办法，即采用带去卷积数字图像处理软件、自动聚焦系统软硬件的普通荧光显微镜。单独采用这种系统，可获得与共聚焦显微镜效果类似的三维荧光图像。在使用共聚焦显微镜或多光子显微镜时，如果采用去卷积数字图像处理软件对所采集的图像进行后处理，可以显著提高图像的质量，或提高图像采集速度、减少图像采集时间。



**图 10-22** 经过去卷积处理后，果蝇胚胎腿切片显微图像清晰度得到改善 (a) 原始图像。(b) 最近邻去卷积算法的效果。(c) 维纳滤波去卷积算法的效果。(d) 迭代去卷积算法的效果。( <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/index.html> )

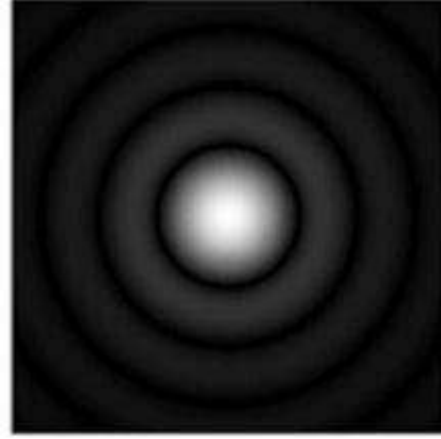
## 墓碑上的公式——衍射极限

- \* 波动性是光的基本特性之一，由此产生的衍射效应始终困扰着包括显微、望远在内的光学成像系统。德国物理学家Ernst Abbe发现了显微镜的衍射极限，并将公式刻在自己的墓碑上。由于衍射极限的存在，显微成像系统的照明光只能在样品上形成有限小的圆形光斑，被称作艾里斑；同样地，样品上的分子只能在成像相机上形成有限小的圆斑。

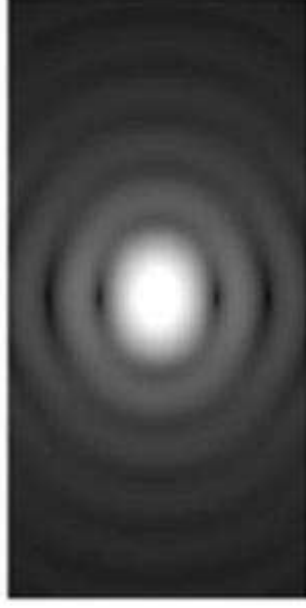
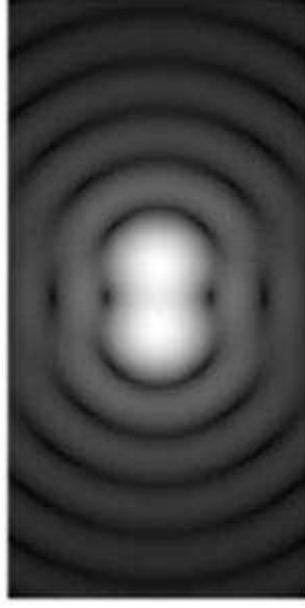
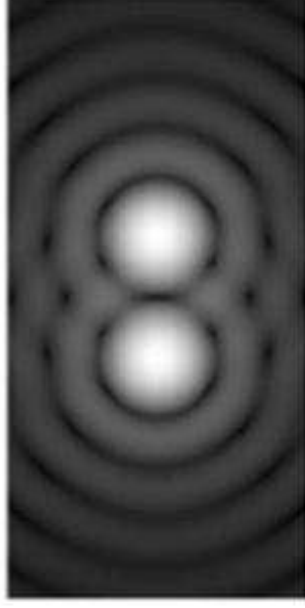




墓碑上的公式



艾里斑



衍射极限降低分辨能力

## 二、电镜

- \* 要突破光学显微镜在空间分辨率方面的局限，一个可能的途径是采用波长比可见光短的波代替可见光作为信息的载体。
- \* 电镜有几种基本的类型，一种是透射电镜(transmission electron microscope, TEM)，一种是扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)，还有一种电镜叫扫描透射电镜(scanning transmission electron microscope, STEM)。

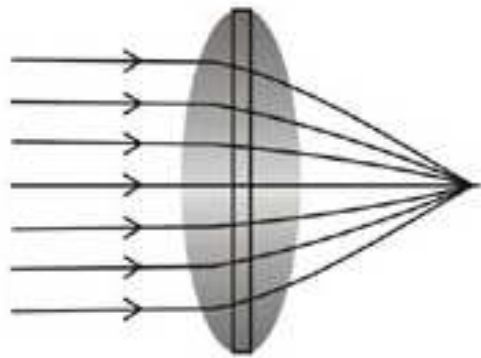


## 电镜的发展历史

- \* 1850年, Heinrich Geissler做出了Geissler放电管。1897年Phlude Nludo Brown发明了阴极射线管, 同年Joseph John Thomson等在用Geisslar管研究气体放电现象时, 发现阴极射线是电子流。这些发现和发明, 连同此后电子束管和高真空技术的一系列发展, 为电镜的发明准备了技术条件。
- \* 20世纪20年代法国科学家德布罗意发现电子流也具有波动性, 其波长与能量有确定关系, 能量越大波长越短, 比如电子经1000伏特的电场加速后其波长是0.388埃, 用10万伏电场加速后波长只有0.0387埃, 于是科学家们就想到是否可以用电子束来代替光波?

- \* 1926年布什 (H.Busch) 发表了一篇有关**磁聚焦**的论文，指出电子束通过轴对称电磁场时可以聚焦，如同光线通过透镜时可以聚焦一样，因此可以利用电子成像。磁场显示出透镜的作用，称为“磁透镜”。

磁聚焦 光聚焦



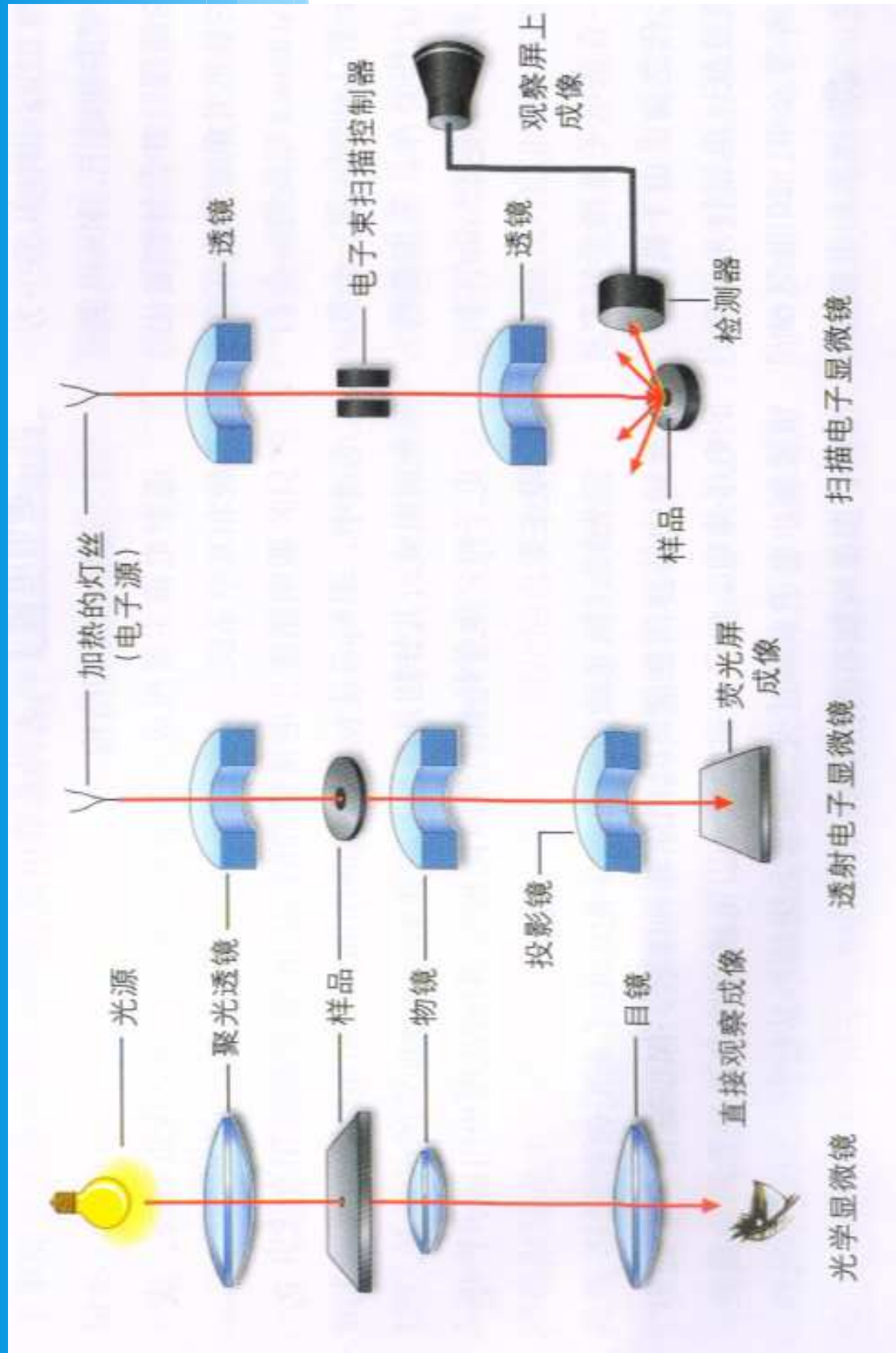
- \* 1928年，德国柏林工科大学的年轻研究员Ernst Ruska用电子代替光制作了一个显微镜，能够把实物放大17倍。尽管放大率微不足道，但它却证实了使用电子束和电子透镜可形成与光学像相同的电子像。经过不断地改进，1933年，他制成了二级放大的电子显微镜，获得了金属箔和纤维的1万倍的放大像。
- \* Ruska终于在1939年研制出世上第一台实用的电镜，分辨率达到10 nm。1945年，德国Siemens-Halske公司以这个仪器为样本，共生产了40多台电镜。电镜的正式问世，实现了从光学显微镜向电镜的划时代。Ruska在电子光学和设计第一台透射电镜方面的开拓性工作，被誉为“本世纪最重要的发明之一”，他因此于1986年获得Nobel物理奖。

## 透射电镜

- \* 透射电镜主要组成部分有照明系统、样品操纵系统、成系统和真空系统。
- \* 透射电镜成像原理透射电镜是利用透过样品的透射电子成像的。电子枪发射出电子射线，经聚光镜后照射在样品上，电子束和样品相互作用后，经透镜成像、放大和处理，最终在屏幕上形成样品图像。

## 扫描电镜

- \* 主要由电子光学系统、样品操纵系统、电子信号的收集、检测、处理、观察、记录和显示系统、真空系统以及供电系统等组成。
- \* 电子探针和样品相互作用，产生各种信号电子，它们可以用相应的探测器接收。经过放大处理后，可以获得各种信号图像。样品表面各点高低、性质不同，所产生的信号强弱就不同，形成的图像就反映了样品的表面形貌和性质。



## 扫描电镜的生物样品制备及应用举例

- \* 扫描电镜以观察样品的表面形态为主。扫描电镜样品的制备，必须满足以下要求：1)保持完好的组织和细胞形态；(2)充分暴露欲观察的部位；(3)良好的导电性和较高的二次电子产额；(4)保持充分干燥的状态。
- \* 大多数的生物材料，则应首先采用化学或物理方法固定、脱水和干燥，然后喷镀碳与金属以提高材料的导电性和二次电子产额。

- \* 化学方法制备样品的一般程序是：清洗-化学固定-干燥-喷镀金属。
- \* 样品干燥扫描电镜样品观察在高真空中进行。无论是水或脱水液，在高真空中都会剧烈地汽化，不仅降低真空度、污染样品，还会破坏样品的微细结构。因此，样品在用电镜观察之前必进行干燥。干燥的方法有空气干燥法、临界点干燥法、冷冻干燥法等。

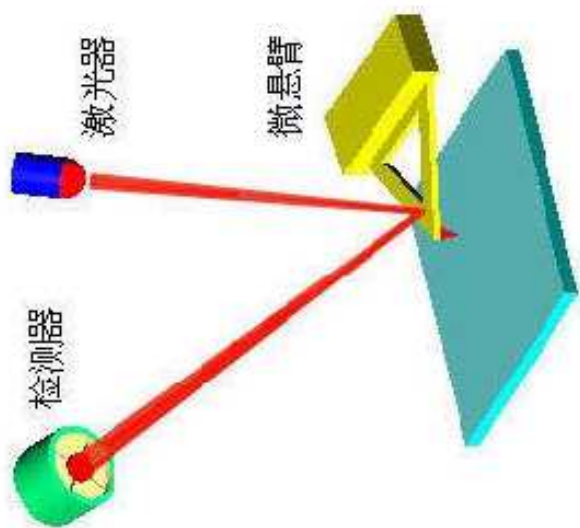
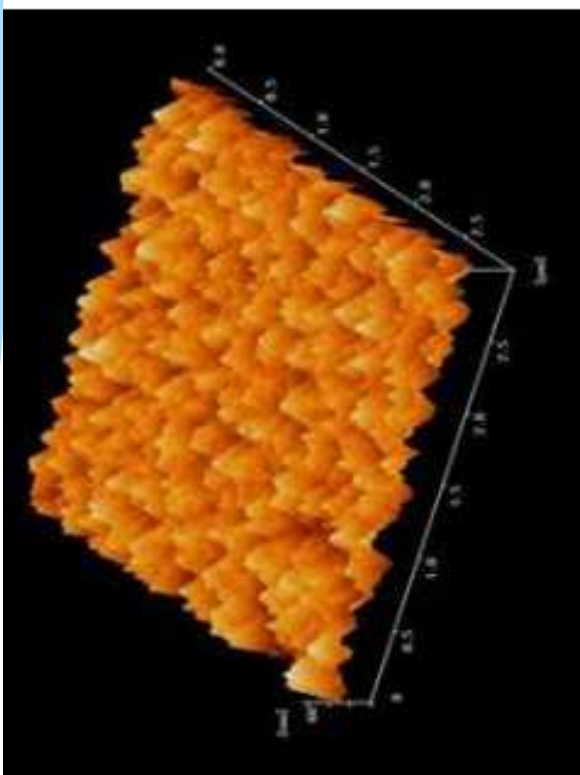


### 三、扫描探针显微镜

- \* 以扫描隧道显微镜为先驱的扫描探针显微镜 (scanning probe microscope, SPM), 不仅可以达到比电镜更高的空间分辨率, 而且对于样品和环境的要求较低, 对样品的导电性、干燥程度、形状、纯度、硬度等都没有特殊的要求, 可以在大气、常温的环境中以至溶液中成像, 对处于生理条件下包括活体条件下的生物品表面进行直接观察, 从分子水平上研究生物样品内的结构和功能。

- \* 用探针的针尖在样品表面扫描来获样品表面的信息。SPM的基本特点，一是探针针尖非常细；二是针尖与样品表面的距离非常近，甚至直接接触样品；三是针尖与样品间的相对位置和相对运动可以精确控制。SPM成像时，通过探针针尖的移动或样品台的移动，实现探针与样品表面之间的相对运动，即进行扫描。
- \* 以原子力显微镜(AFM)为代表的扫描力显微镜(SFM)，就是通过控制、检测针尖与样品间的相互作用力（如原子间的斥力、摩擦力、弹力、范德力、磁力和静电力等），分析研究样品表面的性质。

\* 原子显微镜(AFM)探针装在一个对微弱力极其敏感的微悬臂梁上，微悬臂梁的另一端与压电陶瓷固定在一起。当探针尖一样品的间距接近原子量级时，针尖与样品表面存在极其微弱的作用力( $10^{-8}$ - $10^{-6}$  N)，这种作用力可能是引力，也可能是斥力，这取决于探针尖一样品表面间的距离大小。针尖与样品表面之间的作用力即原子力，是通过激光反射检测微悬臂梁的弯曲形变来间接测量的。微反射镜装在微悬臂梁上，照在微反射镜上的激光束经反射镜反射后进入检测器。由于样品表面原子排列的高低起伏，探针沿水平方向一行一行扫描时，针尖同样品表面的垂直间距会产生变化，变化导致针尖同样品表面间原子力的变化，进而转换成样品表面形貌的图像。



## 四、活体分子成像

- \* 随着固定和染色技术的发展和细胞生物学对细胞图像的空间分辨率要求日益提高，特别是在电镜观察中，生物样品常常需要固定和染色，这就使细胞的活性在显微成像样品制备的过程中丧失。
- \* 生物学研究进入后基因组时代，科学家已经不再满足于对于单一的生物分子进行体外的、静态的研究，而要求对细胞内的分子过程或分子事件在它们本来所处的环境中（即所谓“原位”、“体内”进行系统的（而不是孤立的）、活的、动态的（而不是死的、静态的）观察和研究。

- \* 活细胞分子成像有几个基本要求，一要图像清晰，达到所要求的空间分辨率、对比度；二要使生物分子所在的生物机体处在存活的状态；三要使所研究的细胞器或分子能与体内的其他细胞器或分子区别开来；四要使显微成像的数据采和存储速度能够跟得上所要研究的分子过程的变化速度，这一条是对成像的时间分辨率的要求。

- \* 如果样品是培养的细胞，则保证显微观察时良好的细胞培养条件是必要的先决条件。为了保证良好的细胞培养条件，活细胞分子成像时，显微镜的样品台往往罩在一个密封透明的罩中，罩中的温度、湿度和二氧化碳的浓度都和细胞培养箱中一样保持不变，所观察的细胞放在特制的样品池里，样品池中的培养液自动定时更换，保证培养液的营养成分、pH、渗透压等保持在最适合细胞培养的条件下。

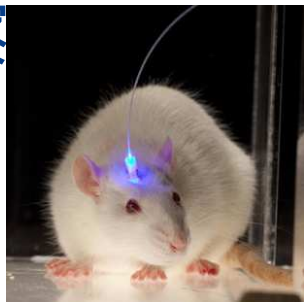
- \* 活生物体内的细胞例如模型动物体内的细胞研究，首先要保证动物的生活条件，使动物活得健康，功能正常。同时，还要保证所研究的细胞在动物体内处于正常的生理状态。要做到这一点并不容易，



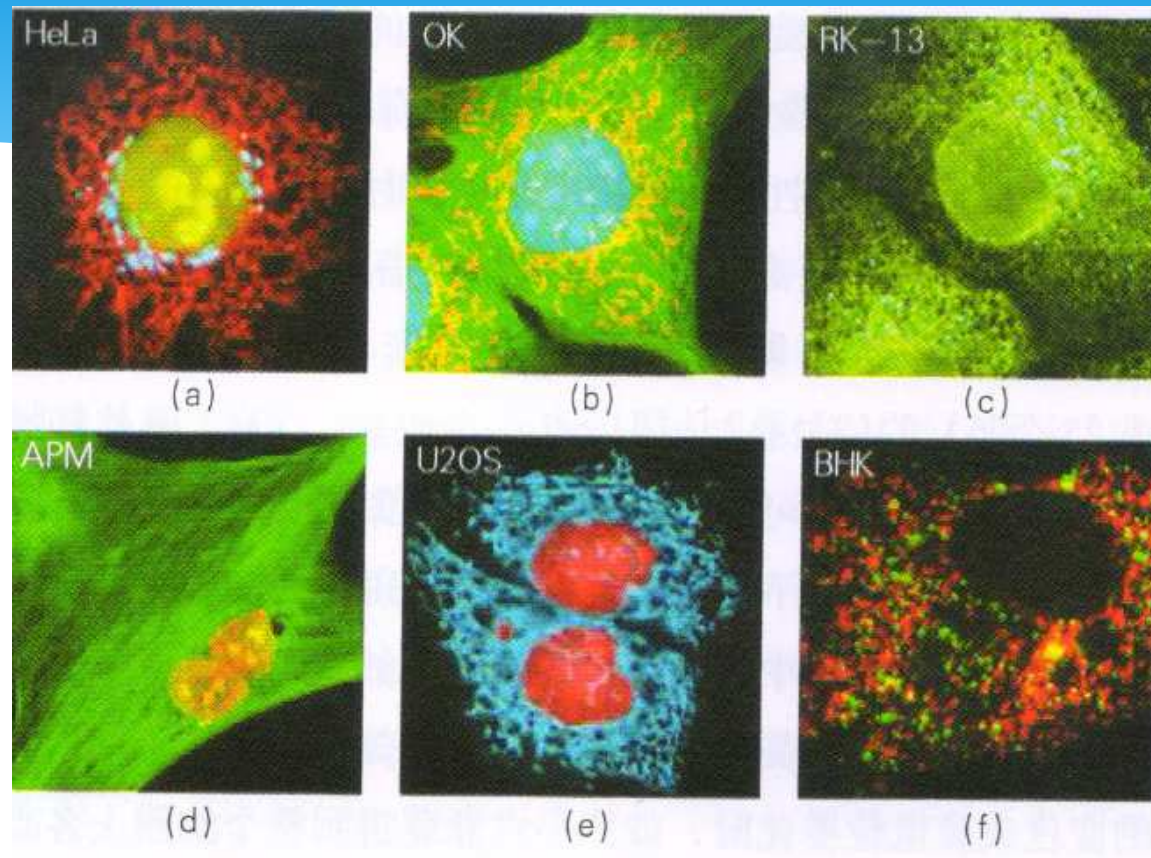


- \* 美国有两个实验室都曾对小鼠皮层神经元的突触可塑性进行活体观察，但有关的结论却大相径庭。来发现，这两个小组对神经元突触可塑性研究结果的差异，是由于采用的方法有细微的差别。一个组是把小鼠颅骨用牙科钻磨薄至透明，然后用双光子显微镜进行皮层神经元突触的观察；另一个组则先在小鼠颅骨上打一个洞，然后将洞口用透明有机玻璃封上，再进行显微成像观测。一个是打开了颅骨，一个没有打开。这个差别造成了完全不同的实验结果和结论。

\* 再如，为了研究动物脑部神经元突触的可塑性，可以用共聚焦显微镜或双光子显微镜来观察神经元树突棘的动态变化。但树突棘的尺度在微米量级。为了监测树突棘的形态，显微镜必须工作在高放大倍数下。而在这样高的放大倍数下，实验动物的微小活动，例如心脏的跳动、肌肉的颤动，可能极大地影响成像的质量。因此，实验往往是在动物麻醉或麻痹的状态下将动物的头部固定后进行的。但麻醉或麻痹状态显行研究，德国科学家研制出了可以固定在大鼠头部的微型光子显微镜，用来观察记录活动中大鼠神经元的各种变化。



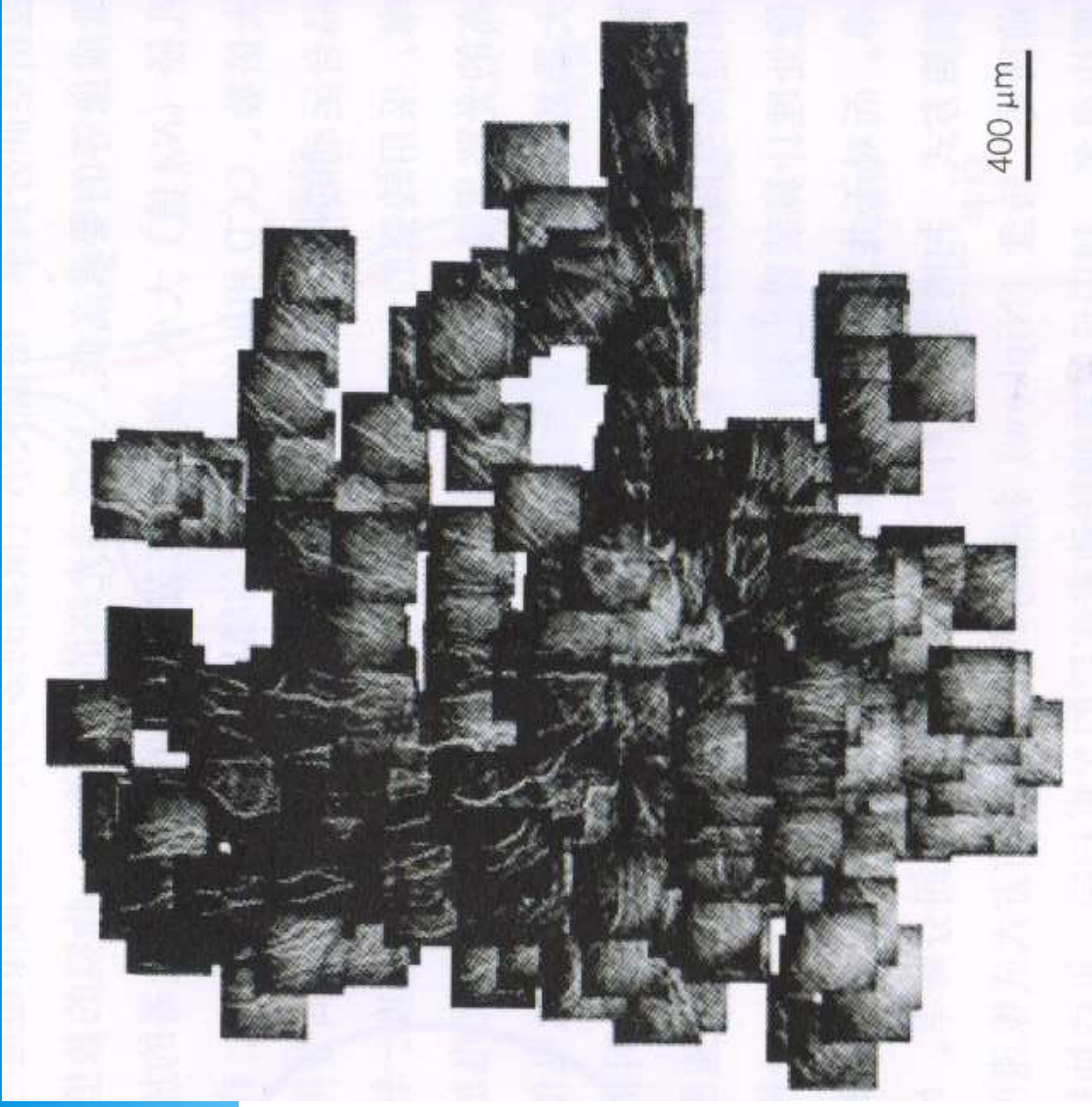
- \* 在前面介绍过的显微成像技术中，很多技术都可以用于活细胞成像。荧光显微成像的方法是应用得最多的活细胞成像方法。配备了数字成像系统的普通荧光显微镜，在活细胞成像方面具有不少优点。首先，荧光显微镜所用的光源对活细胞没有像激光那样强的光毒性和光损伤。第二，和扫描共聚焦显微 / 镜的逐点扫描成像模式相比，采用CCD数字相机的普通荧光显微镜成銜输入，图像采集速度要快得多。



荧光显微镜活细胞成像

- \* 共聚焦显微镜和多光子显微镜更是广泛地用于活细胞的三维成像。多光子显微镜可以对深度距活动物组织表面数百1至上千微米处的活细胞成像。
- \* 图10-33是用激光共聚焦显微镜活体成像得到的人正常角膜基底神经下层神经丛的图像，是由301张图像拼接而成。这个图显示了这些神经束丛呈涡轮放射线状，汇聚于角膜锥顶一个1 – 2 mm的区域。





# 细胞显微技术进步与应用

- \* 2014年的诺贝尔化学奖颁给了三位科学家：Eric Betzig、Stefan W. Hell和William E. Moerner，以表彰他们在超分辨荧光显微镜领域做出的贡献。



Photo: A.  
Mahmoud

**Eric Betzig**



Photo: A.  
Mahmoud

**Stefan W. Hell**



Photo: A.  
Mahmoud

**William E.  
Moerner**



- \* 2006年华裔科学家庄小威研究组开发了一种随机光学重建显微镜 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM) 的技术。使用STORM可以以20nm的分辨率看到DNA分子和DNA-蛋白质复合体分子。这一方法基于光子可控开关的荧光探针和质心定位原理，在双激光激发下荧光探针随机发光，通过分子定位和分子位置重叠重构形成超高分辨率的图像，其空间分辨率目前可达20nm。STORM虽然可以提供更高的空间分辨率，但成像时间往往需要几分钟，同时还不能满足活体实时可视的成像的需要，发展空间很大。

# 追踪干细胞的足迹：4种成像新技术

- \* 光学成像：来自美国生物医药成像与生物工程研究所的陈小元（Xiaoyuan Chen, 生物通）研究组需要进行个性化医疗方面的分析，其中也包括干细胞研究，他们希望能了解移植干细胞的发展变化，以及这些细胞在肿瘤中如何定居的。
- \* 间充质干细胞能定位在肿瘤中，并且在那里进行分裂，这对于组织修复具有重要意义，这也说明了这种细胞也许是一种很好的药物传输中介。研究人员在将小鼠间充质干细胞移植到肺转移的乳腺癌小鼠中之前，先对细胞进行了基因工程改造，让其带上了荧光素酶的表达基因，然后将其和荧光素注射到小鼠中，除此之外，研究人员还加上了绿色荧光蛋白基因，从而能进行双显色。
- \* 这样就实现了干细胞的显色成像，分辨率可以达到3-5mm。这一技术的优点有几个方面：简单，便宜，高通量，陈教授说，“生物发光是小动物成像的主力军，因为这种方法便宜，易于操作，而且能高通量进行分析”，另外这一方法还能进行活体分析，具有高敏感性，能检测最多1000个细胞，背景也很少。
- \* 缺点就是生物发光只能穿透几个毫米距离的组织，因此不能用在大型生物，比如人身上。这种方法得到的成像也是平面的，而不是三维的，除此之外，还会出现假阴性的结果。

# 精确成像：帮助癌症治疗

- \* 来自美国波士顿的贝斯以色列女执事医疗中心的研究人员新开发的一种成像系统，可使体内癌细胞显现，提升医生切除癌细胞的准确度。
- \* 这一系统被称为荧光辅助探查切除器，由近红外荧光成像系统、视频监视器及计算机组成。该系统不含移动部件，由发光二极管替代激光激发，**避免了与患体的直接接触。**
- \* 这项独特的系统采用了一种名为近红外荧光团的特殊化学染料，病体在注射该染料后可对癌细胞等特殊肌体组织进行定位。当病体处于近红外光的环境下，该染料或造影剂将“点亮”癌变细胞并显示在视频监视器上。这些“发光”的癌细胞将有层次地覆盖在正常的可见光影图像上，使医生即使在满是血液及其他解剖结构的情况下也能清晰地**分辨癌细胞的分布。**
- \* 研究人员认为，这一项技术可使晚期乳腺癌、前列腺癌、肺癌等癌变得到良好治疗，避免医生切除健康的重要机体组织，如血管和神经等。研究人员表示，该项技术可使医生看清平时难以辨认的机体组织，使图像引导手术得以真正实现，而辨明癌细胞的分布情况可为治愈癌症患者奠定重要基础。
- \* 研究人员将进行人体临床试验，首次对乳腺癌患者的淋巴结进行定位，并在5年内进一步扩大该项技术的应用范围。在未来的发展中，荧光团可将神经及血管标记为与癌细胞不同的颜色，使医生可以轻松地在同一时间对多种机体组织进行观察。

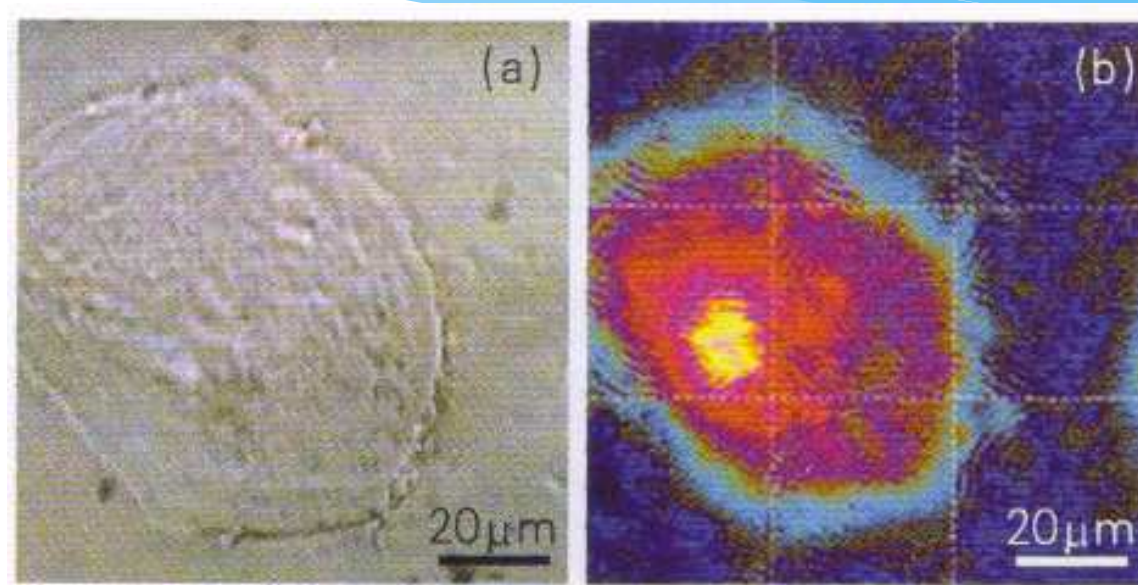
## 显微技术展望

- \* 从16世纪末光学显微镜出现至今，仅仅过去了四百多年时间，而显微镜技术的发展，已经经历了光学显微镜、电镜、扫描探针显微镜三个时代，显微镜的空间分辨率，也从当初的几十微米、几微米提高到了现在的纳米量级。

\* 显微成像技术的发展有三个目标，一是继续提高空间分辨率，二是提高时间分辨率，三是拓展显微成像技术中图像的内涵。

\* 光学显微成像时，图像的内涵与人眼看到的图景是完全一样的，图像上每一个点或像素包含了我们所观察对象相应位置上光的强度和波长（颜色）的信息，这里的光是照射到样品的光经样品的反射、透射或散射后，进入了人眼或检测器，最终形成了光学图像。光学图像最直接的外延或拓展，是将光学成像中所用的光从可见光拓展到可见光以外。现在有不少显微镜，就是采用了可见光以外的光，例如X光、红外光等。由于这类显微成像技术是在相应的光谱学或波谱学技术与显微镜技术结合的基础上发展起来的，因此这类显微像技术也被称为光谱显微镜技术或微区光谱技术。红外光谱、拉曼光谱、荧光光谱、核磁谱等波谱学技术都已经发展出相应的显微成像技术。

- \* 在光谱成像技术中，图像中的每一个像素，代表了样品空间相应位置上相应光谱在一定波长处的值。光谱学中可以得到各种信息都可以以二维以至三维空间分布的形式展示出来。用传统的光谱学技术研究生物分子的结构和功能，需要先分离纯化某种分子，然后用光谱学技术进行分析。运用光谱显微成像技术，把某种分子的某个特征谱峰的强度用显图像中像素的灰度值或伪彩色来表示，就有可能原位甚至活体观察这种生物分子在细胞或组织中的分布和结构功能变化。



人口腔黏膜细胞的普通光镜照片(a)和红外光谱成像照片(b)  
b图中用伪彩色表示该点红外吸收光谱中酰胺I带的强度。



Thank you!