

穆 娇 刘美蓉

(分析测试中心光谱组 Email: mrliu@iccas.ac.cn)

在激光共聚焦显微镜成像实验中,通常使用盖玻片(常规厚度 120~170  $\mu\text{m}$ )来支撑样品。在实验过程中,我们发现盖玻片在特定激发光下会检测到有发光现象。那么共聚焦成像是否会受盖玻片的影响呢?这对共聚焦荧光成像非常重要。

我们通过荧光光谱仪已经证实在 405nm、488nm、559nm 激光作用下,都不能激发盖玻片发光,且在 400nm 以上盖玻片几乎没有吸收。基于上述结果,我们首先观察盖玻片共聚焦三维成像、通过共聚焦对盖玻片进行光谱分析及酸洗前后盖玻片的发光现象进行比较,分析其是否与盖玻片表面可能粘附的物质相关。然后,通过荧光样品与盖玻片的不同贴合方式——荧光样品与盖玻片在同一焦平面和荧光样品与盖玻片不在同一焦平面,来分析盖玻片发光对共聚焦荧光成像的影响。

### 1、盖玻片共聚焦三维成像

我们通过采集纵向荧光强度变化,了解盖玻片在不同 Z 轴位置的发光情况,从共聚焦三维图中可以清晰地看到盖玻片发光现象仅发生在盖玻片与空气的界面,盖玻片内部并没有发光(图 1),说明盖玻片发光现象并非盖玻片自发荧光导致。



图 1、盖玻片的共聚焦三维图像(由 559 nm 激发光,收集发射范围 580~670 nm,在 10 $\times$ 物镜下使用 FV1000 拍摄)

### 2、盖玻片共聚焦发光光谱分析

为了更直观地观察盖玻片发光现象和激发光的关系,我们采集了盖玻片在

580~750 nm 的发光发射光谱（图 2）。结合每幅图像平均荧光强度，可以观察到在 580~600 nm 之间荧光强度骤降（图 2）。当用激光扫描共聚焦显微镜对盖玻片做发光光谱分析时，发现发光位置距离激光波长 559 nm 非常近。推测是因为 559 nm 激光很强，即使收集波长范围在 580 nm 以后，还是有一些在盖玻片表面的激光反射光被检测到。进一步证明观察到的盖玻片发光现象并非盖玻片自发荧光，而是源于激光的反射光，造成了盖玻片发光假象。

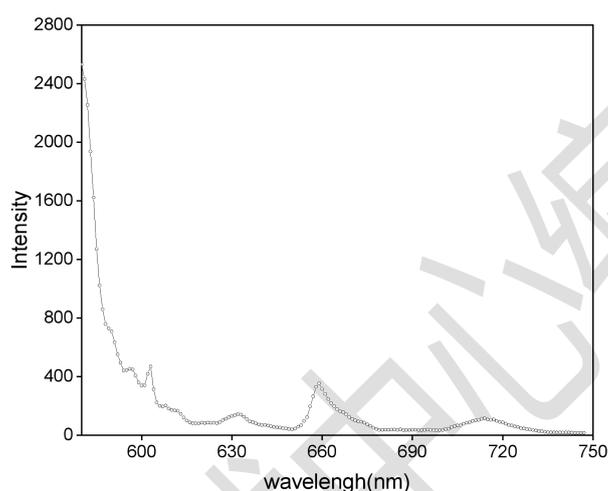


图 2、盖玻片发光现象的发射光谱(由 559 nm 激发,收集发射范围 580~750nm,步进为 1 nm,带宽为 3 nm,在 10×物镜下使用 FV1000 拍摄)

### 3.盖玻片酸洗前后发光假象强度比较

未经酸洗的盖玻片指用 100%无水乙醇擦拭后使用的盖玻片，经酸洗处理的盖玻片指先用 100 %无水乙醇擦拭再用 5 %盐酸浸泡微波震荡 30 min 后用超纯水进行多次擦拭后的盖玻片。从发光图像（图 3a、3c）中可以明显观察到酸洗前后滴水的盖玻片无明显发光强度差异，说明盖玻片表面粘附的杂质或其他物质对发光没有贡献。

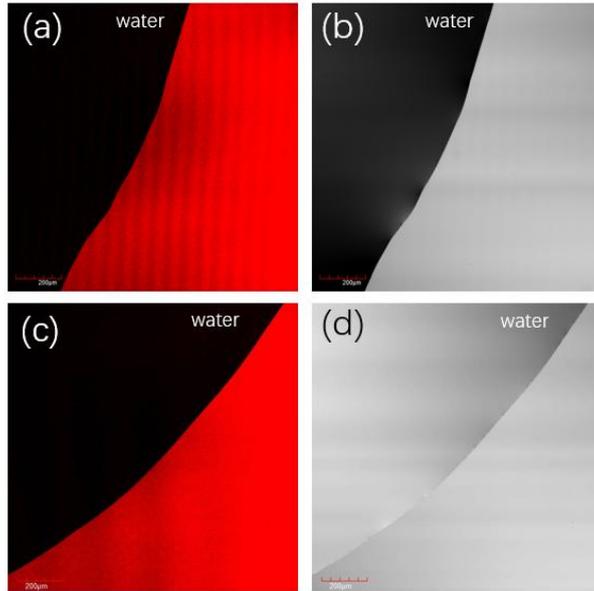


图 3、酸洗前后盖玻片的发光假象：(a、b) 未经酸洗滴水的盖玻片发光假象成像和 DIC 成像，(c、d) 酸洗后滴水的盖玻片发光假象成像和 DIC 成像。图像均由 559 nm 激发光，收集发射范围 580~670 nm，在 10×物镜下使用 FV1000 拍摄。

#### 4. 盖玻片发光假象对样品荧光的影响

对于共聚焦成像，一个基本问题就是：观察到的荧光是否仅来源于样品，还是受到了盖玻片发光假象的污染？为解决这一疑问，我们设计了两个对照实验。

(1) 共平面接触设置：样品与盖玻片保持紧密接触，确保样品面与盖玻片上表面在同一焦平面。(2) 不共面设置：样品被有意放置在距离盖玻片上表面一定距离的位置，从而样品与盖玻片上表面不在同一焦平面上。

##### 4.1 样品与盖玻片共面接触设置

将水滴滴在盖玻片上，这时，水与盖玻片上表面紧密贴合。无论如何调焦，共聚焦成像表明水本身不产生发光，发光源自盖玻片（图 4a、4b）。将盖玻片上的水吸走一部分后，发光只发生在由水覆盖区域以外的位置（图 4c、4d）。水完全蒸发后，整个图像又显示完整的发光成像，较滴水之前并无差异（图 4e、4f）。因此，水覆盖区不发光并非由盖玻片表面荧光物质的溶解引起。相反，这种现象可能是由于水与盖玻片之间的折射率不匹配，导致激光在界面处无法有效聚焦。当用浸油替代水时，无论如何调整焦距，在浸油覆盖区域也未观察到发光现象（图 4g、4h）。

由此可知，盖玻片发光假象并不会影响滴在盖玻片上水滴的荧光成像。

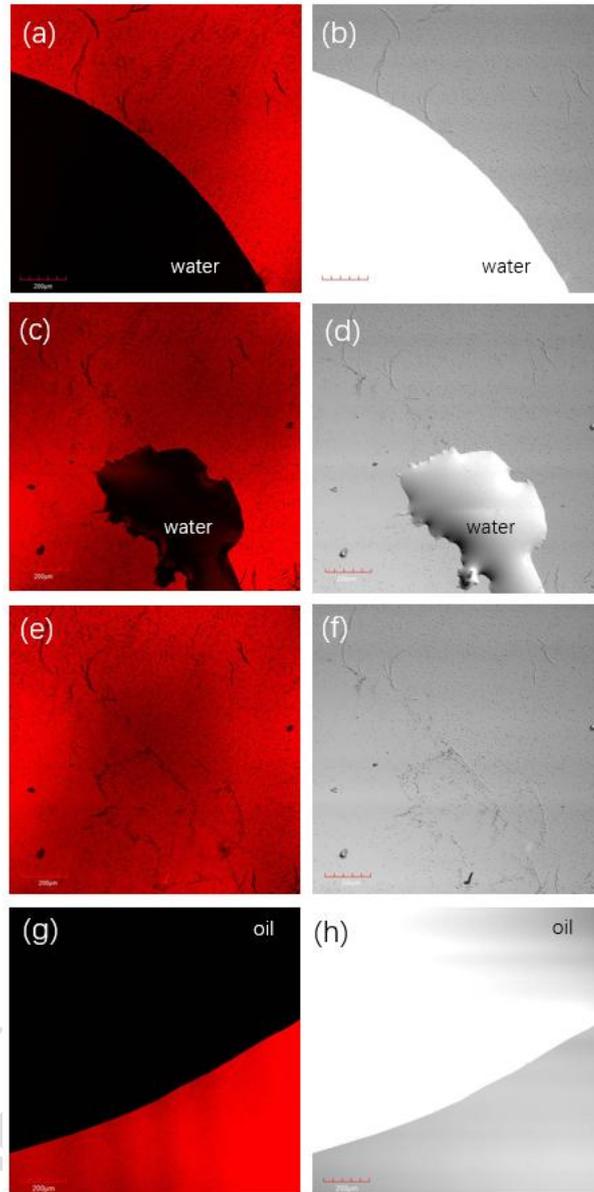


图 4、滴水 and 滴油后盖玻片的发光假象：(a、b) 滴水盖玻片发光假象成像和 DIC 成像，(c、d) 滴水后吸走部分水的盖玻片发光假象成像和 DIC 成像，(e、f) 水完全蒸发后的盖玻片发光假象成像和 DIC 成像，(g、h) 滴油盖玻片发光假象成像和 DIC 成像。图像均由 559 nm 激发光，收集发射范围 580~670 nm，在 10×物镜下 FV1000 拍摄。

#### 4.2 样品与盖玻片不共面设置

发光薄纸夹在两个盖玻片之间，主盖玻片的上表面不与薄纸位于同一焦平面上（图 5g）。实验显示了主盖玻片上表面的发光假象（图 5e、5f）、次盖玻片下

表面发光假象（图 5a、5b）。由于薄纸不透光，激光无法穿透薄纸来照亮次盖玻片被薄纸遮住的部分，因此，在次盖玻片的薄纸遮挡区没有发光（图 5a）。

薄纸本身的发光（图 5c、5d），并不受盖玻片发光假象的影响。根据图 5 所示，盖玻片和薄纸完全位于 10×物镜的共焦景深内，其工作距离为 2.56 mm。因此，当样品和盖玻片不在同一焦面时，来自样品的发光信号代表其真实的发光特性。该信号不受盖玻片发光假象的影响。

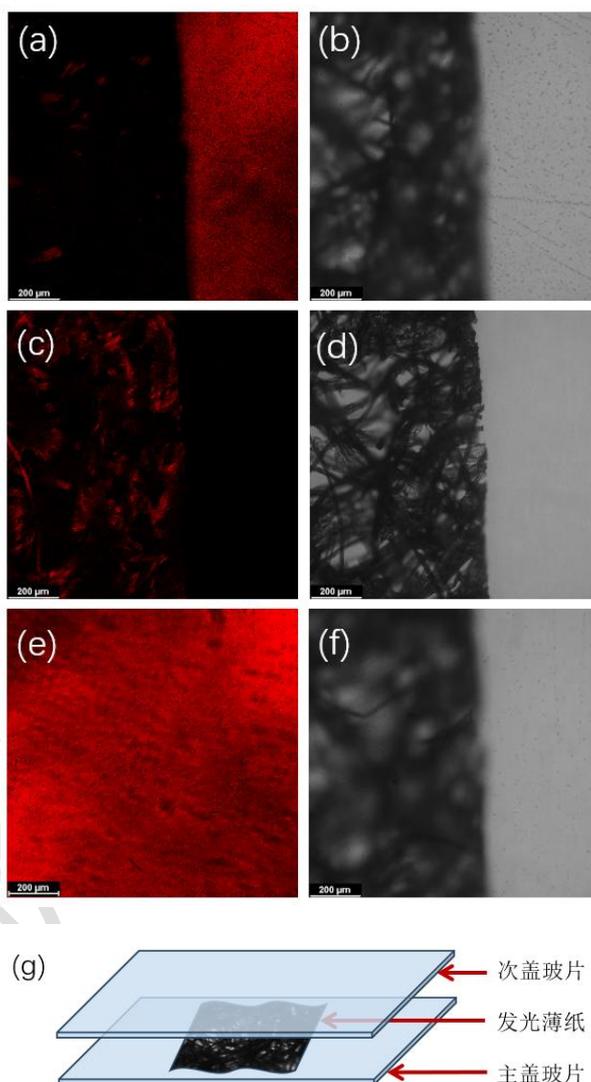


图 5、夹在两个盖玻片之间的薄纸的发光：(a、b) 次盖玻片下表面的共聚焦发光假象图像和相应的 DIC 图像，(c、d) 薄纸的共聚焦发光图像和相应的 DIC 图像，(e、f) 主盖玻片上表面的共聚焦发光假象图像和相应的 DIC 图像，(g) 两个盖玻片和薄纸的位置示意图。以上均由 550 nm 激发光，收集发射范围 580~670 nm，在 10×物镜下使用 Stellaris 8 拍摄。

盖玻片本身在可见波长激光激发下不会产生荧光，共聚焦成像中发现的盖玻片发光仅发生在盖玻片的表面，且来源于激光的反射光。盖玻片酸洗与否并不会影响盖玻片的发光假象。盖玻片上滴水、在两片盖玻片间夹发光薄纸均证明盖玻片无论是否和样品处于同一焦平面上，都不会影响样品荧光。样品与盖玻片在同一共聚焦面时，样品区域显示样品的真实发光情况，在无样品区域显示盖玻片发光假象；样品与盖玻片不在同一共聚焦面时，样品显示本身的真实发光情况。因此，无论样品与盖玻片是否处于同一焦平面，均不会影响样品的荧光成像。

**致谢：**

感谢分析测试中心丁丽萍老师对稿件的多次审读和编辑加工！