

显微镜在实验教学和科学研究中的应用与发展趋势

柳亦松^{1,2}, 刘永³, 黄鹏¹, 曾建国^{1,2}

(1. 湖南农业大学 作物种质资源与利用国家重点实验室培育基地, 国家中药材生产(湖南)技术中心, 湖南长沙 410128;

2. 湖南农业大学 分析测试中心, 湖南长沙 410128; 3. 湖南省中药提取工程研究中心, 湖南长沙 410331)

摘要:显微镜已经成为了实验教学和科学研究中不可缺少的一种重要的仪器类型。光学、电子等不同类型的显微镜共同构建成了不同的解决问题的应用体系。针对不同类型显微镜的基本原理、应用领域以及优缺点进行阐述和分析, 对于实验室有针对性根据需求进行显微镜的选择和应用具有指导意义。

关键词:光学显微镜; 电子显微镜; 探针扫描显微镜; X射线显微镜

中图分类号:G482 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-5884(2014)10-0066-04

人类认识世界的开始, 来源于五官对周围事物信息的捕获。其认识水平, 伴随着从肉眼可见的宏观事物, 到通过不同媒介见到的显微和亚显微结构, 人类观察物体的分辨率也从0.2 mm、0.2 μm 发展到0.2 nm, 甚至可以观察到原子结构, 其中显微技术的不断发展起到了关键性的作用。同时在不同的研究领域中, 各种不同的显微镜也起着越来越重要的作用。

1 显微镜的发展历史

显微镜的构想源于13世纪英国的R. Bacon, 但直到1590年, 才由年仅13岁的Z. Janssen在父亲的帮助下, 制成了由两个套管以及各自的透镜组成的显微镜的雏形。到17世纪60年代, 对显微镜进行改造并利用其进行科学研究的A. V. Leeuwenhoek, 被认为是真正意义上的显微镜发明者。18世纪初, 英国仪器设计师对E. Culpeper所发明的三脚架显微镜进行改良, 对焦机制更加精密。19世纪上半叶, 随着玻璃组成的优化以及消色物镜的发展, 显微镜的发展也进入一个新的时期。进入20世纪后, 基于分辨率、对比技术、荧光技术和数字影像等技术的更新, 显微镜在诸多领域如生物学、化学、物理学、材料科学、生物医学等得到了广泛的应用。

由于光学显微镜分辨率极限的限制, 更高分辨率的电子显微镜的产生成为了必然的趋势。第一台电子显微镜的问世是在1931年, 由德国的M. Knoll和E. Ruska发明, 当时的分辨率就达到了50 nm。20世纪80年代初, IBM公司苏黎世实验室诞生了第一台扫描隧道显微镜

(STM)。随着不同工作模式及自身组件的发展, 出现了一系列的与STM相似的显微仪器, 我们称之为“扫描探针显微镜(SPM)”。但是, 非导电样品表面导电膜掩盖了表面的细微结构, 为了弥补这一不足, 1986年, Binnig等人发明了原子力显微镜(AFM)。同时, 若将AFM的探针离开样品表面10~100 nm, 探针与表面间将存在磁力、静电力和范德瓦尔斯力等作用力, 研究者们通过监控这些力产生的被迫振动, 相继发展出了多种扫描力显微镜。

2 显微镜的分类及应用

2.1 光学显微镜

2.1.1 普通光学显微镜

光学显微镜的发明对人类认识微观世界起到了重要的推进作用。从肉眼的0.2mm的分辨水平提高到光学显微镜的0.2 μm, 对于宏观或显微水平基本可以满足大部分的简单要求, 但是对于亚显微结构的观察甚至更小的结构, 是远远不够的。

2.1.2 体视显微镜

体视显微镜是由一个共用的低级物镜, 利用双通道光路, 为左右两眼提供一个具有立体感的图像。其主要特点是具有大直径的视场和焦深, 便于观察样品所有层面; 工作间隔长, 成正立像, 便于实际操作; 具有双通道光路, 且左右两光束具有一定夹角, 因此能形成立体的三维图像。

2.1.3 相差和微分干涉显微镜

相差显微镜与普通光学显微镜最主要的不同是在物

镜后装有相差板,当偏离光与非偏离光相遇时,则会发生干涉现象,振幅减小,因此光线明显变暗。而样品只有非偏离光通过,不发生干涉现象,因此就形成样品较暗而背景明亮的图像。

由于相差显微是以样品的密度差别为基础,因此其样品不需要进行染色处理,就可以观察活细胞甚至细胞核、线粒体等细胞器的动态。而微分干涉显微镜则是以平面偏振光为光源,光线经过棱镜折射之后形成两束光,而这两束光会在不同的时间经过样品增加了样品反差,同样适用于活细胞中细胞器的动态研究。若加上录像装置,便可以实时观察细胞器的运动情况。

2.1.4 荧光显微镜

荧光显微镜是通过特制的滤色系统发出特定波长的光作为激发光照射样品,激发荧光物质发出不同颜色的荧光,从而观察到样品内部结构。

与普通光学显微镜相比,荧光显微镜主要增加了两套滤光镜,第一套为激发光滤色片,位于光源与样品之间,起到控制入射光波长的作用;第二套称之为吸收滤色片,位于物镜与目镜之间,吸收紫外光,它只允许样品发出的荧光通过。研究者们通过免疫荧光技术与荧光素直接标记技术对已经进行荧光标记的样品进行观察,可以观察细胞内不同物质动态变化情况。多种荧光素的运用,还可以用来显示不同成分在细胞内的定位。

2.1.5 激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)

激光扫描共聚焦显微镜是在荧光显微镜成像的基础上,利用激光作为光源,对样品进行二维或三维空间的扫描,最后利用计算机采集和处理光信号而成像。激光扫描共聚焦显微镜的分辨率比光学显微镜提高了约1.5倍。

激光扫描共聚焦显微镜的应用模式包括:单一光切片模式、时间间隔与活细胞成像模式、Z轴系列及三维成像模式、四维(甚至多维)成像模式、X-Z成像模式、反射光成像模式、透射光成像模式等^[1]。LSCM在生物学中的应用十分广泛,例如定量荧光测定、定量共聚焦图像分析、三维重组分析生物结构、动态观察生物结构、荧光漂白恢复技术、质膜流动性测定、光活化技术、激光细胞显微外科及光“陷阱”技术等。

由于激光可以对样品聚焦深度进行调节,因此研究中可以通过对较厚的样品进行逐层的扫描,获得样品的三维图像,甚至在三维成像的基础上加上时间轴,实现样品随时间变化的四维动态效果。因此,激光扫描共聚焦显微镜主要用于亚细胞结构与细胞组织的定位及动态变化的研究。

2.2 电子显微镜

2.2.1 扫描电子显微镜

扫描电子显微镜主要用于对样品表面的形态的观察,具有焦深长、视场大的优点,并且能连续变至几十万倍,既可以看样品整体形态,也可以观察细微结构。但也有明显的缺点:样品必须干净、干燥,导电性好,不能观察发光或高温的样品。针对这些缺陷,开发环境扫描电子显微镜,其最大的优点就是能改变显微镜样品室内的温度、气体成分以及压力大小,解决了常规扫描电镜对样品

室高真空的限制,非导电材料也可以进行扫描观察^[2]。

现在,扫描电子显微镜通过多种方式进行改造升级,其性能和作用均得到了大幅度的提升。采用场发射电子枪的超高分辨扫描电子显微镜的分辨本领已高达0.6 nm,接近TEM的水平;通过配备能谱仪或波谱仪,可制成分析扫描电镜;或改变电压大小,制成专用于生物材料的低压扫描电镜;或改变样品室大小观察不同大小样品,比如德国Visitec捷高公司的超大试样室的Mira型扫描电镜,以及利用新型成像系统的扫描电声显微镜。

2.2.2 透射电子显微镜

透射电子显微镜主要包括4个系统:照明系统、成像系统、影像转换系统和真空系统。通过电子束透过样品后经过电磁透镜的聚焦与放大后所产生的物像,投射到荧光屏上或照相底片上进行观察,从而得到高倍率的放大图像。电子束在穿透样品时,由于样品质量密度不同,透过的电子数量不一样,从而成像的明暗亮度出现差异,这样即可形成一个具有明暗反差对比的、容易辨认的电镜图像。电镜图像的反差是由样品不同部位电子穿透能力差异所决定的,也反应了样品不同部位电子密度的差异。

透射电子显微镜由于其电子束对样品的穿透作用,被广泛用于动植物样品的亚显微结构观察。在材料科学研究领域,可用于晶粒形貌、纳米颗粒大小、界面结构、晶体缺陷、高分辨晶格像、微区成分分析等。但是,由于高速电子束对样品的穿透能力有限,所以对样品的厚度具有极高的要求,而且很难观察样品的三维结构;同时,由于电子加速必须在真空环境中实现,故无法观察活的生物样品。

2.3 近场显微镜

Wickramasinghe^[3]提出近场显微镜的概念,是由扫描探针显微镜的测量原理延伸得到。其基本原理是使用一个非常尖的探针非常近地接近样品,从而在探针与样品表面的近场范围内产生扫描力,这种扫描力的大小包含了丰富的样品表面的信息,因此,通过对扫描力差异的监测即可得到样品表面的形貌信息。近场显微镜最关键的部件就是各式各样的扫描探针,其可以实现原子直径量级的精确探测,因此又常称之为扫描探针显微镜。

2.3.1 近场光学显微镜(SNOM)

由于传统光学显微镜是由光学镜头组成,受光学衍射极限的限制,其分辨率不能超过光波长的一半。Synge于1928年提出了近场光学成像原理^[4]。近场光学显微术是一种新型超高分辨率显微成像技术,是探针技术与光学显微技术相结合的产物。近年来,近场光学显微术在理论和实践上都取得了突破性的发展。近场光学显微镜主要分为近场扫描光学显微镜和光子扫描隧道显微镜^[5]。

(1)扫描近场光学显微镜(SNOM)

1984年,Pohl,Lewis等人在SPM的基础上,分别独立发明了扫描近场光学显微镜。SNOM是根据非辐射场的探测及其成像原理而制成,它能够突破普通光学显微镜所受的光波衍射极限,进行纳米尺度的光学成像。

近场光学显微镜由探针、信号传输器件、扫描控制、

信号处理和信号反馈等系统组成,由光学探针在样品表面逐点扫描、逐点记录后,经信号处理与反馈系统最后形成数字像。随着技术的发展,SNOM的分辨率已经达到18 nm,虽然非光学显微镜的分辨率已经达到0.1 nm的级别,但是SNOM的存在,仍具有重要意义。它是光子利用光子成像,不会对样品造成直接损失,而且对样品环境无特殊要求,是否常温、是否导电、有无生命、是否透明等,均可在SNOM下观察,因此,SNOM受到广大生物医学研究者的极大关注。

SNOM的用途主要包括以下几个方面,首先,由于对材料无直接损伤,广泛用于生物样品纳米尺度的形态观察,包括静态的形态结构观察,以及随时间变化的动力学过程等;其次,由于近场光学显微镜与光盘技术相结合产生的近场光刻技术的发展,可以使信息存储密度达到10-100Gb/平方英尺的超高密度;由于近场光学显微镜所获得的图像集合了样品表面形貌、近场光学及光谱信号等多种信息资料,其中近场光谱弥补了微区光谱无法分辨纳米尺度的发光区域与本征频谱的缺陷;单分子探测的研究,比如DNA、蛋白质分子等,SNOM都具有重要意义^[5]。

(2) 光子扫描隧道显微镜(PSTM)

PSTM的成像技术早在1989年国外科学家就已经提出^[6]。1991年,T. M. Ferrel等人申请到一项美国发明专利,其名称为“光子扫描隧道显微镜”(PSTM)。

PSTM与电子扫描隧道显微镜尽管在功能上具有很多相似之处,但是两者的物理基础和成像原理却有本质的差别^[7]。PSTM的基本原理主要是基于光学中的受抑全反射理论。PSTM不存在与光波长相关的色差、不用求样品具有导电性,可以对样品表面进行三维立体成像、而且不需要真空条件以及对样品的光学特性和敏感等特点,越来越受到人们的重视。PSTM主要用于以下几个方面:生物样品、聚合物、光学材料等的表面形状观察;化学成分与光谱分析;光栅表面参数的标准化;薄胶片表面特征研究;光波导材料的研究等多个方面,相信在将来,PSTM在材料科学、表面科学、医学和生物工程等多学科和产业中将有更加广阔的应用前景。

2.3.2 扫描力显微镜(SFM)

SFM是使用一个一端固定而另外一端装有探针的弹性悬臂来对样品表面进行检测的。当探针针尖进行扫描时,针尖与样品间距离的变化会引起两者之间相互作用力的改变,从而引起微悬臂形状的改变。用激光束照射微悬臂的背面,微悬臂再将激光束反射到一个光电检测器上,通过控制针尖与样品表面距离一定,检测器接收到激光强度的差异就与微悬臂变形形成一定的比率,从而可以间接的反应出样品表面形貌的改变。

当探针针尖与样品表面距离的长短变化时,针尖与样品表面将产生原子间斥力、磁力、静电力和范德瓦尔斯力等不同的作用力。通过监控样品表面性质对受迫振动的力敏元件所产生的影响,而检测表面信息是可以实现的。根据所测力的不同,在ATM的基础上,相继发展起来了多种不同类型的扫描力显微镜,简要介绍下面几种。

(1) 原子力显微镜(AFM)

AFM是Binnig等人STM的基础上,于1986年研制

出的第一种SFM家族显微镜,它通过用隧道电流检测力敏元件的位移来实现针尖端原子与表面原子之间的排斥力的监测,进而得到样品表面形貌信息。不仅可以实现纳米、分子水平的表面形貌观察,而且可以用于分子间弱相互作用力的研究,因此在材料科学及冶金科学中得到极大关注^[8];因为可以实时地观察样品变化、直接在溶液中成像以及样品无需具有导电性等特定,AFM在生物医学中的应用非常广泛^[9]。

(2) 磁力显微镜(MFM)

MFM的原理与原子力显微镜类似,同样是适用受迫振动的探针扫描样品表面,但不同的是探针的材料,它是用磁化了的镍或铁探针,在进行样品扫描时,探针振幅的改变是由于受到样品表面磁力的影响。因此MFM广泛应用与磁性样品磁结构的信息^[10]。

(3) 静电力显微镜(EFM)

EFM与其他扫描力显微镜的特别之处在于,它使用的是带有电荷的探针。当这种探针在进行样品扫描时,针尖电荷与样品表面电荷之间产生静电力,受样品表面电荷的影响,静电力发生改变,从而影响微悬臂的振动特性,激光干涉测微仪可以探测出这种微小的变化。EFM主要用来测量样品的局部电特征,以及研究电荷的捕捉/释放技术。

(4) 摩擦力显微镜(FFM)

摩擦力显微镜的工作模式,即为原子力显微镜的一般接触模式。探针在样品表面扫描时,由于样品表面形貌差异,引起微悬臂形变,通过计算激光在检测器中的强度差异,反馈回路通过调整微悬臂高度来保持样品上力的恒定,从而可以得到表面形貌的变化信息^[11]。FFM主要用于检测聚合物的表面污染、化学组成及摩擦特性等研究,在半导体、高聚物和数据存储器等的研究上具有重要作用^[12]。

(5) 化学力显微镜(CFM)

CFM是在原子力显微镜的基础上发展起来的新型扫描力显微镜。通过对AFM探针进行功能修饰,使针尖表面带上特殊化学官能团,在进行样品扫描时,用来检测样品表面物质与探针之间的粘附性质的差异。对探针进行不同的修饰,可以拓宽CFM的应用途径。将生物分子修饰到探针针尖,可以用来研究生物分子的结合与识别等相互作用。

(6) 扫描离子电导显微镜(SICM)

SICM的探针与其余扫描探针显微镜不同,在于它的探针是一个充满电解液的微型管,而所需要观察的非导电样品放在电解液存储池的底部,可以通过检测微型管内电极与电解池中另一电极之间电导能力的变化。当微型管接近样品表面附近时,允许离子流过的空间减小,离子电导也随之减小。与STM相似,在微型管探针扫描时,通过反馈电路使探针上下移动以保持一定的距离,记录离子电导或反馈电压的变化,则可以获得样品表面的形貌信息^[13]。

扫描离子电导显微镜的分辨率为亚微米量级,与微型管探针尖端内径的数量级相同。若尖端内径为0.1 μm,则获得图像的分辨率优于0.2 μm。虽然分辨率不是

很高,但是 SICM 的工作环境是在电解液中,因此很适合进行生物学和电生理学的研究^[14]。

近场显微镜除了上面介绍的之外,还包括扫描电容显微镜、扫描热显微镜、扫描声显微镜、激光力显微镜等多种新型显微镜,其中的一部分在国内一些新型的实验室部分得到了装备。

2.4 X 射线显微镜(X-ray Microscope)

在 20 世纪 50 年代,出现了一种不用光或电子,而是用 X 射线的显微镜,称之为 X 射线显微镜。X 射线显微镜主要有透射型、扫描型、全息型和光谱显微镜 4 种,而光谱显微镜是将某种光谱与显微镜相结合的技术,主要包括 NEXAFS 显微镜、磁 X 射线显微镜和光电子发射显微镜。

扫描 X 射线显微镜的成像型模拟光学成像的原理,用聚焦系统放大,然后用光电耦合(CCD)探测器实时记录成像,但是其聚焦系统以波带片代替了透镜,这种方法的优点是可以对整个样品进行实时成像,且对样品损伤较小,因此非常实用,其分辨率可达 50~60 nm。全息型主要是基于波的干涉原理,它不需要聚焦系统,但需要强 X 射线光源和高分辨率的记录系统,其最大优点是可获得样品的三维全息影像。扫描型是以 X 射线束聚成一个微点,在样品上逐一扫描,光点的大小决定了分辨率的高低,而 X 射线的透射率决定了像素的灰值,该法虽然扫描费时费力,但是很适合逐个像素的化学分析,而且扫描可以降低对样品的损伤。透射型 X 射线显微镜以波带片作为聚光镜,其中显微波带片作为放大物镜、聚焦波带片聚焦,CCD 为探测器,其分辨率可达 10 nm,若使 CCD 连上计算机,则可直接从屏幕上观察实时观察。光谱显微镜则主要是利用 X 射线吸收光谱、偏振性以及激发样品产生的光电子来进行元素分析或成像的。

虽然 X 射线显微镜具有上面介绍的多种特性,但它最主要的突出特点还是可以在生物活细胞被破坏之前得出其内部结构和表面特征图像,并且解决了普通光学显微镜光波衍射限制、分辨率太低,以及电子显微镜需真空环境等问题,因此,X 射线显微镜在显微技术中具有独特的地位。

3 总结与展望

目前各个学校的实验中心很多都配备有不同类型的光学显微镜和电子显微镜,以上两种类型可以基本满足大部分的基础实验和教学的需要,以湖南农业大学分析测试中心为例,目前中心实验室主要配备有扫描电子显微镜、透射电子显微镜、体视显微镜、正置式显微镜(带相机)各一台,其余小型光学显微镜 4~5 台。以上的组合共同构建成了一个能够基本满足大部分常规研究需要的超微结构分析平台。但部分实验室则会由于需要配置激光扫描共聚焦显微镜或者原子力显微镜等(如中科院植

物所)。因此在实验室建设中,要遵循互补的原则,结合不同类型显微镜的特点,针对本实验室的研究方向和关注的重点,构建适合的结构表征体系,更好地为科研工作服务。

随着计算机技术和工具的进步,光学设计理论方法的不断发展,以及科研工作人员对样品的研究越来越深入,显微镜的分辨率和成像程度得到不断提高。基于多学科的相互交叉,显微技术在新的成像技术的刺激下得到了长足的发展,相信在未来的发展过程中,新型显微镜将得到更大的发展,应用将渗透到各个不同的研究领域。

参考文献:

- [1] 张德添,刘安生,朱衍勇. 电子显微技术的发展趋势及应用特点[J]. 现代科学仪器,2008(1): 6-10.
- [2] 干蜀毅. 常规扫描电子显微镜的特点和发展[J]. 分析仪器,2000(1):51-53.
- [3] Wickramasinghe H K. Scanned-probe microscopes[J]. Scientific American, 1989, 261(4): 98-105.
- [4] Synge E H. A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region[J]. Philosophical Magazine, 1928, 6(35): 356-362.
- [5] 王海潼,刘斐. 近场光学显微技术[J]. 应用光学, 2005,26(3):36-40.
- [6] Reddick R C, Warmack R J, Ferrell T L. New form of scanning optical microscopy[J]. Physical Review B, 1989, 39(1): 767-770.
- [7] 姚春梅,文定忠. 光子扫描隧道显微镜[J]. 大学物理,1996,15(5):42-43.
- [8] 马荣骏. 原子力显微镜及其应用[J]. 矿冶工程, 2005,25(4):62-65.
- [9] 何昆,张德添,张学敏,等. 原子力显微镜在生物医学中的应用[J]. 军事医学科学院院刊, 2002, 26(2): 139-143.
- [10] 韩宝善. 磁力显微镜的发展和应[J]. 物理, 1997, 26(10): 617-624.
- [11] Bennewitz R. Friction force microscopy[J]. Materials Today, 2005, 8(5): 42-48.
- [12] 路新春,王吉会,戴长春,等. 摩擦力显微镜及几种材料的微摩擦特性[J]. 材料研究学报,1997,11(3):259-266.
- [13] Hansma P K, Drake B, Marti O, et al. The scanning ion-conductance microscope[J]. Science, 1989, 243(4891): 641-643.
- [14] 章海军,黄峰. 基于扫描离子电导显微术的电化学微细加工方法[J]. 电子显微学报,1999,18(1): 90-93.

(责任校对 游星雅)