



荧光显微光谱成像系统及教学设计

刘东奇 鄢小卿 惠王伟 王 瑾 孔勇发

(南开大学物理科学学院, 天津 300071)

摘 要 本文介绍了一种自组荧光显微光谱成像系统。该系统性能稳定、功能多样,可以实现空间显微分辨和光谱探测功能的有机结合,具有白光照明成像、激光激发荧光成像、显微光谱成像、荧光光谱探测和应力调控等功能。实验结果表明,该系统的光学分辨率385nm,光谱分辨率小于1nm,可以完成量子点和单层二维材料的荧光光谱探测、白光照明成像和显微光谱成像等。依托该系统设计开展的实验内容充足、层次分明,可满足不同学生的学习需求,为目前国内荧光光谱相关的物理实验教学提供思路。

关键词 荧光光谱;显微成像;光谱成像

FLUORESCENCE MICROSCOPIC SPECTRAL IMAGING SYSTEM AND TEACHING DESIGN

LIU Dongqi YAN Xiaoqing HUI Wangwei WANG Jin KONG Yongfa

(School of Physics, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract In this paper, a home-built fluorescence microscopic spectral imaging system is introduced. The system has stable performance and diverse functions, and realizes the combination of spatial microscopic resolution and spectral detection. It has the functions of white light illumination imaging, laser excitation fluorescence imaging, microscopic spectral imaging, fluorescence spectrum detection, strain control and so on. The experimental results show that the optical resolution of the setup is 385nm, and the spectral resolution is less than 1nm. It can complete the fluorescence spectrum detection, white light illumination imaging and microscopic spectral imaging of quantum dots and monolayer two-dimensional materials. The abundant and multi-leveled experiment content based on the system can meet the learning needs of different students and provide helpful ideas for fluorescence spectrum related physics experiment teaching.

Key words fluorescence spectrum; microscopic imaging; spectral imaging

显微光谱成像技术可以用于分析待测样品的光谱成分,并对该样品选定区域直接进行光谱图像的采集,给出该样品的光谱成分信息和空间位置信息的一一对应关系,可以为细胞成像、生物组织

成像、药物筛选和癌症检测等领域提供光学显微分辨率下待测样品的光谱信息和空间定位信息^[1-8]。

随着国家强基计划的实施,国内众多高校聚焦于通过研究型物理实验提高学生的科研能

收稿日期: 2021-11-17; 修回日期: 2022-01-13

基金项目: 高等学校教学研究项目(DJZW201909hb, DJZW202010hb); 港澳与内地高等学校师生交流计划项目(202111120070); 南开大学自制实验教学仪器设备滚动培育项目(2018NKZZYQ25); 国家基础科学人才培养基金项目(J1210027); 南开大学物理基地能力提高项目(J1103208)。

作者简介: 刘东奇,男,实验师,研究方向为物理实验、光子学与光学成像。

通讯作者: 王瑾,女,高级实验师,研究方向为物理实验、仪器仪表及生物医学光子学, wangjin8208@nankai.edu.cn。

引文格式: 刘东奇,鄢小卿,惠王伟,等. 荧光显微光谱成像系统及教学设计[J]. 物理与工程, 2022, 32(6): 5-10, 20.

Cite this article: LIU D Q, YAN X Q, HUI W W, et al. Fluorescence microscopic spectral imaging system and teaching design[J]. Physics and Engineering, 2022, 32(6): 5-10, 20. (in Chinese)

力^[9-11]。目前,我国大学物理实验教学中对于显微光谱探测等内容尚不普及。我们在学校自制实验教学仪器设备项目和后续滚动培育项目等的支持下,前期在物理实验教学中心已完成了荧光显微装置的设计搭建^[12]、光谱成像功能的引入^[13]等工作。在后续工作中,我们进一步优化了装置的光路,拓展了显微多光谱成像功能、透射和反射两种方式白光照明成像功能、样品应力调控功能等。目前,该自制的荧光显微光谱成像实验系统实现了空间显微分辨能力和光谱探测能力的优势互补,不仅可以完成光学分辨率下的空间成像和位置定位,还可以对柔性样品施加可控应力,提供样品的多光谱成分分析,对不同光谱成分进行微区成像。该实验系统在今年举办的第56届中国高等教育博览会上荣获全国高校教师教学创新大赛——第六届全国高等学校教师自制实验教学仪器设备创新大赛自由设计类二等奖。同时,我们依托该实验系统开展了多种适宜的荧光材料的测试表征和研究,进一步扩展了基于该实验系统的物理实验内容。本文主要根据这些研究进展在物

理实验教学中设计了分层次的教学内容。

1 实验系统及功能

荧光显微光谱成像实验系统的装置实物图和光路图如图1所示。图中的光源包括白光照明光源和激光激发光源。白光光源有两种放置位置,可以分别实现透射式和反射式白光照明成像。激光激发光源经过双色镜、扫描振镜、物镜聚焦在样品上,通过振镜控制激光光束的照射位置,样品受激发射的荧光经同一个物镜收集进入后方的光谱仪或成像相机,获取荧光光谱或监测激光光斑的照射位置。通过计算机控制光谱仪和振镜的联动,可以获取光谱图像。

目前,该实验系统具有白光照明成像、激光激发荧光成像、荧光光谱探测、显微光谱成像、应力调控等五大功能,如图2所示。其中,白光成像可以对透明样品进行透射式成像,也可以对不透明样品实现反射式成像;显微光谱成像通过有序控制振镜和光谱仪可以对单一荧光样品实现微区光谱成像,

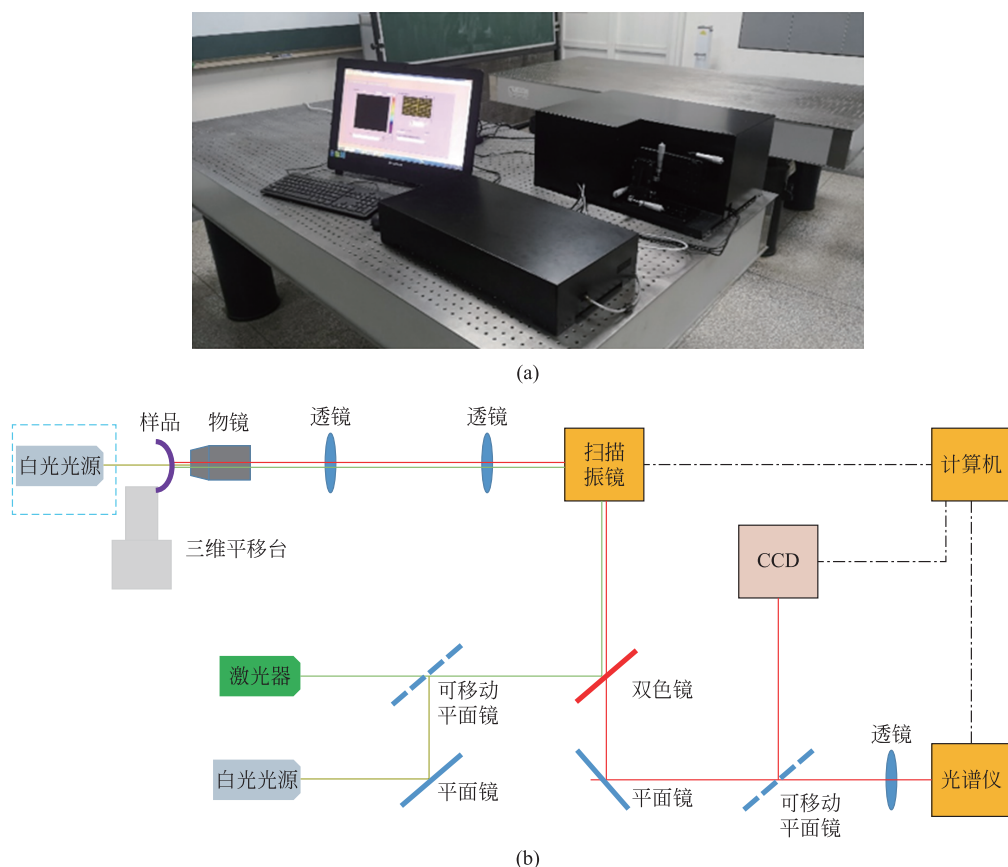


图1 荧光显微光谱成像实验系统

(a) 实物装置图; (b) 光路示意图

也可以对多种荧光样品进行显微多光谱成像;应力调控可以对柔性样品进行弯曲应变和拉伸应变等。

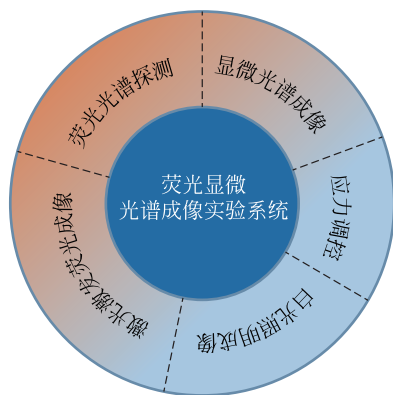


图2 荧光显微光谱成像实验系统的功能

在样品处,放置样品的三维平移台可以调节样品成像区域和激光光束的聚焦状况。同时,三维平移台上安装了可以对样品施加应力的装置,应力装置示意图和实物图如图3所示。实验时,将二维层状荧光样品放置在柔性衬底上,通过控制平移台移动实现对柔性衬底施加可控应力,衬底发生形变,引起二维样品的拉伸或收缩,实现对样品的应力调控。

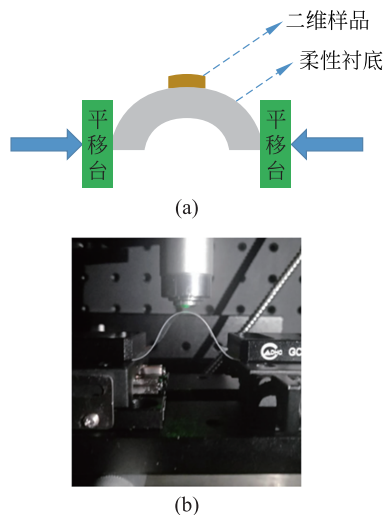


图3 应力装置

(a) 装置示意图; (b) 装置实物图

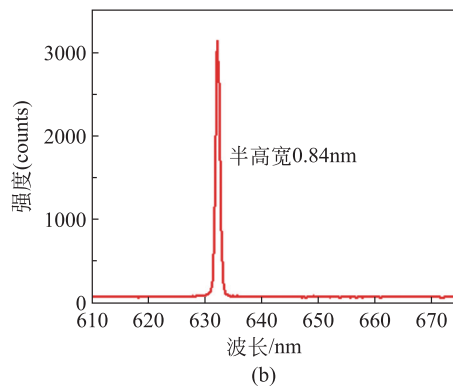
2 系统性能和应用

利用标准光学分辨率板对该实验系统进行测试,测试结果表明,在数值孔径为0.8的60×物镜下,该实验系统可以分辨1300lp/mm的线对,如

图4(a)所示,光学分辨率385nm,表明该实验系统可以清晰分辨微米级样品。图4(b)是该实验系统测试的632.8nm氦氖激光器的光谱,从图中可以看到,光谱谱线半高宽为0.84nm,表明该实验系统的光谱分辨率小于1nm。另外,该实验系统的光谱范围可以覆盖400nm至1050nm^[12]。



(a)



(b)

图4 实验系统分辨率测试

(a) 标准光学分辨率板图像; (b) 激光光谱

以三种核壳量子点为荧光测试样品,所用衬底为石英衬底,分别标记为QD1、QD2和QD3,对应的量子点分别为CdSe/ZnS、CdTe/CdSe/ZnS、CdTe/CdSe/ZnS,其中QD2和QD3的粒径不同。所选取的量子点样品均可以被532nm激光激发发出荧光。图5(a)(b)(c)分别是三种量子点QD1、QD2、QD3样品的荧光光谱曲线,光谱采集时间1s,激光功率200μW。从图中可以看到,三种量子点样品的荧光峰值分别位于585nm、652nm、808nm处,半高宽分别为52nm、35nm、84nm。表明该自制系统可以完成不同荧光样品的荧光光谱测试。

为了验证该实验系统的显微多光谱成像功能,进一步对混合有上述三种量子点的荧光样品进行了测试。首先,将白光光源切入主光路,通过显微成像系统对样品进行白光照明成像,选定合适的样品区域;接着,将激光光源切入主光路,通

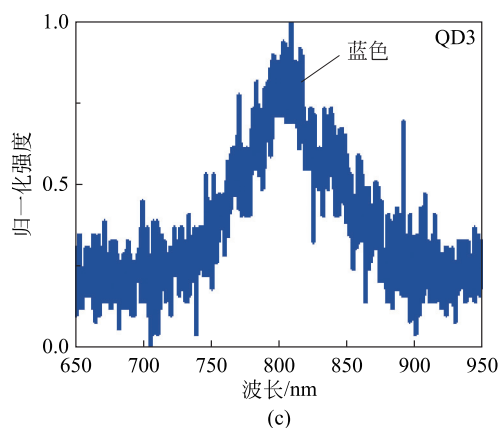
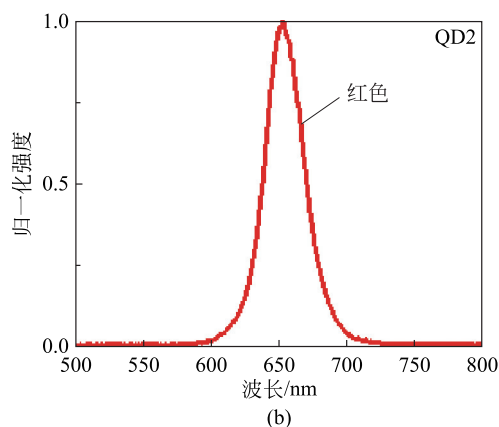
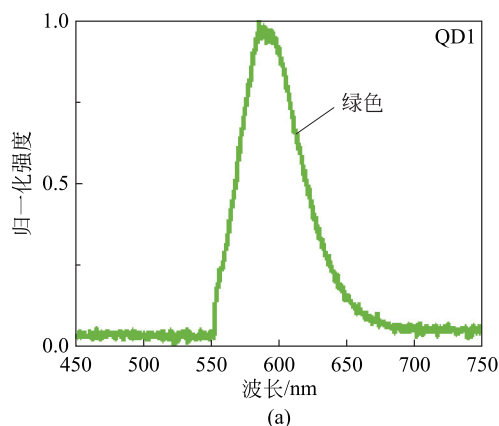


图5 三种量子点的荧光光谱
(a) QD1; (b) QD2; (c) QD3

过程序控制扫描振镜和光谱仪之间的联动,逐点扫描选定区域的荧光样品,光谱仪采集相应的光谱数据,单点的光谱数据采集时间为10ms;采集得到的数据通过编写的自动存储和数据处理程序模块进行实时的光谱图像呈现。

图6(a)是样品选定区域的整体光谱图像,图中绿色区域显示含有QD1样品,红色区域为QD2样品,蓝色区域为QD3样品。进一步结合同一样品区域的白光照明图像,如图6(b)所示,可以看到

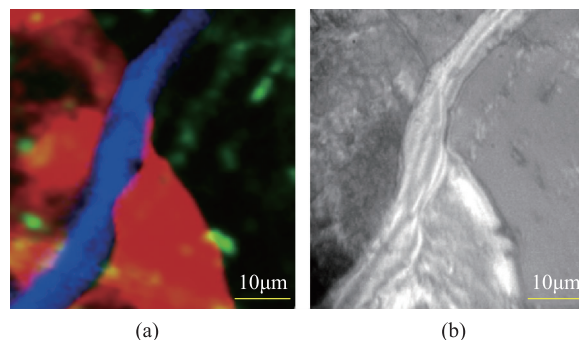


图6 同一区域三种量子点的图像
(a) 光谱图像; (b) 白光照明图像

该区域所采集的光谱图像和白光照明图像的整体形貌是相互吻合的,并且所得的光谱图像可以进一步给出更多的样品成分信息。比如,从图6(a)中可以看到该区域右侧主要为绿色区域,表明含有QD1量子点样品;而红色区域内有部分绿色区域,表明含有QD2量子点样品的区域内某些特定区域也含有QD1量子点样品。这表明该实验系统可以完成选定区域的白光成像和显微多光谱成像,并且给出样品光谱信息的空间分布情况。

为了进一步拓展荧光显微光谱成像系统的应用范围,我们以 WSe_2 为例,展示该实验系统在二维荧光材料中的实际应用效果。图7是在532nm激光激发下单层 WSe_2 样品的荧光光谱曲线,采集时间1s。从图中可以看到,单层 WSe_2 样品的荧光峰处于745nm,与文献报道结果一致^[14,15]。随后,对该区域样品进行显微光谱成像,如图8(a)所示。从图中可以看到,该单层 WSe_2 样品呈三角型,尺寸约14μm。这与白光照明成像结果图8(b)是相互对应的。这些结果表明,该实验系统可以完成微米级尺寸的二维荧光样品荧光光谱采集和显微光谱成像,基于此可以进一步研究不同样

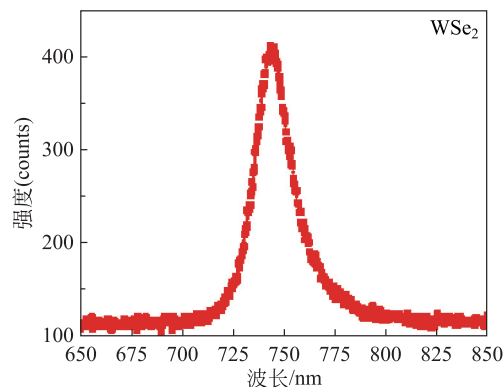


图7 单层 WSe_2 的荧光光谱图

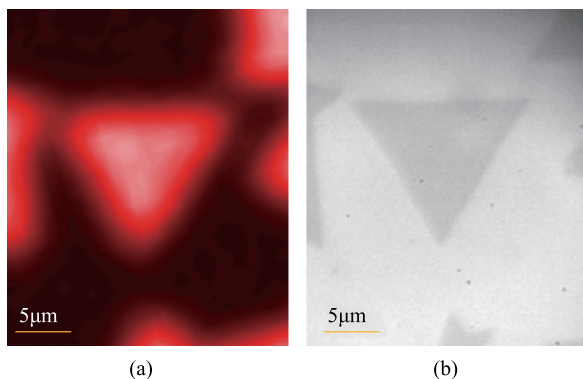


图 8 单层 WSe₂ 的图像
(a) 光谱图像; (b) 白光照明图像

品或不同条件下,比如应力作用下,二维材料的荧光性能、激子行为和分布情况等^[16,17]。

3 实验教学设计

目前,该荧光显微光谱成像实验系统功能多样,运行稳定,结果可靠,且可以与前沿科学研究紧密联系,已在我们的物理实验课程中进行了初步尝试。实际教学中发现不同学生的知识储备、动手能力、教学需求等都不尽一致,针对不同学生需要设计不同水平的实验内容,以期实现教学效果的提升。

结合前期的教学经验和现在的实验结果,我们对依托该实验系统的实验教学课程进行了分层次的实验教学设计。具体的实验内容设计和课程设计如表 1 和表 2 所示。我们将实验教学内容设

表 1 分层次的实验教学内容设计

分层次实验教学	具体课程内容
基础内容	A1. 荧光显微镜的设计思想、光路结构、程序编程控制等; A2. 荧光显微光谱成像实验系统的调节方法和操作; A3. 荧光显微光谱成像实验系统的光学显微分辨率测量; A4. 荧光显微光谱成像实验系统的光谱指标测量; A5. 荧光染料等样品的白光照明成像、荧光成像、荧光光谱测量等。
应用内容	B1. 荧光显微镜在生物、医学、材料等领域的应用介绍; B2. 细胞、组织等染色样品的光学成像和光谱观测; B3. 量子点和色心缺陷等零维材料的光学成像和光谱观测; B4. 金属纳米线和碳纳米管等一维材料的光学成像和光谱观测; B5. 二硫化钼及其他过渡金属硫化物和钙钛矿等二维材料的光学成像和光谱观测; B6. 各类荧光晶体等三维材料的光学成像和光谱观测。
拓展内容	C1. 荧光样品的显微光谱图像采集方法和操作; C2. 多种荧光样品的显微多光谱成像; C3. 显微多光谱图像的数据处理; C4. 荧光样品随激光功率变化的特性; C5. 一维样品或二维样品在应力作用下的光谱和荧光特性; C6. 自行拆装荧光显微光谱成像装置; C7. 改装装置,提升装置性能指标,比如显微分辨率、荧光收集效率、光学成像质量等。
创新内容	D1. 二维样品随激光功率、波长变化的激子行为研究; D2. 二维样品的激子显微图像处理; D3. 应力作用下二维材料的激子行为研究; D4. 应力对二维材料的能带结构的影响; D5. 应力作用下一维样品的光谱特性研究; D6. 光谱探究一维样品或零维样品与二维样品之间的耦合作用; D7. 改进、完善实验系统的功能模块,比如多路激光激发、偏振光路、超分辨显微成像光路、温度调控台等。

表 2 实验课程设计

荧光显微光谱成像实验系统			
可服务实验课程	基础物理实验	近代物理实验	创新物理实验或毕业设计
教学对象	物理本科生	物理本科生	物理本科生、理工科伯苓班本科生、研究生
实验内容	分为基础内容、应用内容、拓展内容、创新内容等 4 个层次		
实验课时	开课比较灵活,可以是单次 4 课时,也可以是多次 N 课时		

为 4 个层次,分别为基础内容、应用内容、拓展内容和创新内容。基础内容主要包括装置的原理、调节和基本的性能指标测试等内容;应用内容主要包括各类荧光材料的成像和光谱测试。这两类内容与目前物理实验课程中的光谱仪相关教学内容可以直接衔接,有机地将光谱探测技术和荧光显微技术整合起来引入物理实验教学中。实验可以实现光谱探测和空间显微分辨功能的有效结合,并且应用到零维、一维、二维和三维等的荧光材料中,获取各类样品的空间位置信息和光谱信息,实现光学分辨率下的空间成像和位置定位,以及光谱成分分析和微区光谱成像等。

拓展内容主要包括显微多光谱成像、荧光性能调控以及装置的性能指标改善等;创新内容主要包括新样品或新条件下的能带调控、激子行为等的研究以及装置功能模块的扩展等。拓展内容和创新内容对学生的实验装置熟悉程度和知识储备都有较高的要求,且一般需要较多的实验时间才能完成,尤其是创新内容,更需要课前相关文献的搜集整理和课后实验数据的处理和研究报告撰写。该实验课程的部分内容可以开设为物理本科生的基础物理实验和近代物理实验,或者物理本科生、理工科伯苓班本科生或研究生的创新物理实验,也可以开设成本科生的毕业设计。循序渐进的实验内容设计有利于学生对新装置和新内容的理解、掌握。实验内容可以针对不同学生进行选取,实验课时可灵活设置。

4 结语

该自制的荧光显微光谱成像系统结构紧凑、性能稳定,实现了空间显微分辨和光谱探测功能的有机结合,具有白光照明成像、激光激发荧光成像、荧光光谱探测、显微光谱成像、应力调控等功能,可以对零维、一维、二维、三维荧光材料进行空间定位和光学成像,以及荧光光谱探测和显微光

谱成像等。依托该自制荧光显微光谱成像实验系统设计了分层次的实验教学内容,可以将荧光显微技术和光谱成像技术引入物理实验教学中,所开展的实验内容既包含基础和应用内容,也包含拓展和创新内容,实验设计层次清晰,可满足不同学生的学习需求。同时,与前沿科学研究联系紧密,可以直接用于热点荧光材料和新荧光材料的相关荧光性能的研究。

参 考 文 献

[1] 肖功海,舒嵘,薛永祺. 显微高光谱成像系统的设计[J]. 光学精密工程, 2004, 12(4): 367-372.
XIAO G H, SHU R, XUE Y Q. Design of microscopic hyperspectral imaging system[J]. Optics and Precision Engineering, 2004, 12(4): 367-372. (in Chinese)

[2] 范世福,肖松山,赵友全,等. 显微荧光光谱成像仪的研究与设计[J]. 仪器仪表学报, 2005, 26(10): 1056-1059.
FAN S F, XIAO S S, ZHAO Y Q, et al. Research and design of microscopic fluorescent spectral imager[J]. Chinese Journal of Scientific Instrument, 2005, 26(10): 1056-1059. (in Chinese)

[3] YUN H Z, BIAN H, YA K D, et al. A new multichannel spectral imaging laser scanning confocal microscope [J]. Computational and Mathematical Methods in Medicine, 2013, 2013: 1-8.

[4] 张运海,杨皓旻,孔晨晖. 激光扫描共聚焦光谱成像系统[J]. 光学精密工程, 2014, 22(6): 1446-1453.
ZHANG Y H, YANG H M, KONG C H. Spectral imaging system on laser scanning confocal microscopy[J]. Optics and Precision Engineering, 2014, 22(6): 1446-1453. (in Chinese)

[5] 齐敏珺,王新全,于翠荣,等. 静态显微光谱成像系统的研制[J]. 光学精密工程, 2015, 23(5): 1240-1245.
QI M J, WANG X Q, YU C R, et al. Development of static microscopic spectral imaging system[J]. Optics and Precision Engineering, 2015, 23(5): 1240-1245. (in Chinese)

[6] 廖乘胜,曾立波,吴琼水. 一种多波段光源的显微多光谱成像系统研究[J]. 光子学报, 2017, 46(11): 1130001.
LIAO C S, ZENG L B, WU Q S. Reaserch of a microscopic spectral imaging system with multi-band illuminants[J]. Acta Photonica Sinica, 2017, 46(11): 1130001. (in Chinese)

- 出版社, 1993.
- [7] 谷超豪, 李大潜, 陈恕行, 等. 数学物理方程[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2012.
- [8] 梁昆森. 数学物理方法[M]. 5 版. 北京: 高等教育出版社, 2019.
- [9] 胡海岩. 机械振动与冲击[M]. 北京: 航空工业出版社, 1998.
- [10] 刘延柱, 陈文良, 陈立群. 振动力学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1998.
- [11] 郑兆昌. 机械振动(上)[M]. 北京: 机械工业出版社, 1980.
- [12] 季文美, 方同, 陈松淇. 机械振动[M]. 北京: 科学出版社, 1985.
- [13] THOMSON W T, DAHLEH M D. Theoy of Vibration with Applications[M]. 5th ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 1997.
- [14] KELLY S G. Mechanical vibrations: Theory and applications[M]. Mason, OH: Cengage Learning, 2011.
- [15] INMAN D J. Engineering Vibration[M]. 4th ed. Upper Saddle River, NJ: Pearson Education, Inc., 2014.
- [16] RAO S S. Mechanical vibrations[M]. 6th ed. Hoboken, NJ: Pearson Education, Inc., 2017.
- [17] 吴崇试, 高春媛. 数学物理方法[M]. 3 版. 北京: 北京大学出版社, 2019.
- [18] 王怀磊. 关于 Duhamel 积分的进一步讨论[J]. 力学与实践, 2022, 44(1): 155-158.
- WANG H L. Some further discussion on Duhamel integral [J]. Mechanics in Engineering, 2022, 44(1): 155-158. (in Chinese)
- (上接第 10 页)
- [7] 荣新, 刘国超, 栾弘义, 等. 二维材料的变温拉曼光谱研究[J]. 物理实验, 2019, 39(7): 1-10.
- RONG X, LIU G C, LUAN H Y, et al. Temperature-dependent Raman spectra of 2D materials[J]. Physics Experimentation, 2019, 39(7): 1-10. (in Chinese)
- [8] 翟家振, 张元龙, 孔令杰. 简易荧光显微镜的制作及其在生物医学中的应用[J]. 物理实验, 2020, 40(8): 24-27.
- ZHAI J Z, ZHANG Y L, KONG L J. Fabrication and biomedical application of custom fluorescence microscope[J]. Physics Experimentation, 2020, 40(8): 24-27. (in Chinese)
- [9] 张朝晖. 发展研究型基础物理实验教学的理念与实践[J]. 物理实验, 2021, 41(7): 37-41.
- ZHANG Z H. Ideas and practice on development of research-type teaching of the basic physics experiments[J]. Physics Experimentation, 2021, 41(7): 37-41. (in Chinese)
- [10] 赵伟, 王中平, 韦先涛, 等. 拔尖人才培养背景下开展英才物理实验教学试点的总结和展望[J]. 物理实验, 2021, 41(9): 23-28.
- ZHAO W, WANG Z P, WEI X T, et al. Pilot teaching of elite physics experiment under the background of top-notch talent training[J]. Physics Experimentation, 2021, 41(9): 23-28. (in Chinese)
- [11] 孙腊珍, 张增明. 研究型大学物理实验教学平台建设的实践与探索[J]. 实验技术与管理, 2008, 25(10): 18-20.
- SUN L Z, ZHANG Z M. Practice and exploration on construction for platform of experimental teaching in research universities[J]. Experimental Technology and Management, 2008, 25(10): 18-20. (in Chinese)
- [12] 刘东奇. 荧光显微镜自组实验设计[J]. 物理实验, 2018, 38(9): 21-23.
- Liu D Q. Experimental design of self-assembled fluorescence microscope[J]. Physics experimentation, 2018, 38(9): 21-23. (in Chinese)
- [13] 刘东奇, 孔勇发. 显微光谱成像装置研制与实验设计[J]. 实验技术与管理, 2020, 37(2): 104-106.
- Liu D Q, Kong Y F. Development and experimental design of microscopic spectral imaging device[J]. Experimental Technology and Management, 2020, 37(2): 104-106. (in Chinese)
- [14] YAN T, QIAO X, LIU X, et al. Photoluminescence properties and exciton dynamics in monolayer WSe₂[J]. Appl. Phys. Lett., 2014, 105: 101901.
- [15] ROSS J S, KLEMENT P, JONES A M, et al. Electrically tunable excitonic light-emitting diodes based on monolayer WSe₂ p-n junctions[J]. Nat. Nanotech., 2014, 9: 268-272.
- [16] LIU D Q, YAN X Q, GUO H W, et al. Substrate effect on the photoluminescence of chemical vapor deposition transferred monolayer WSe₂ [J]. J. Appl. Phys., 2020, 128: 043101.
- [17] PARK S, MUTZ N, SCHULTZ T, et al. Direct determination of monolayer MoS₂ and WSe₂ exciton binding energies on insulating and metallic substrates[J]. 2D Mater., 2018, 5: 025003.