

荧光显微镜应用要点

1、预检查和调节

- (1) 在每次进行荧光观测前，必须例行检查荧光装置的灯丝对中、光路对焦、孔径光阑、视场光阑设置等状况。
- (2) 所需要的荧光激发/发射滤光片组件是否已装在转换器中，物镜配置是否得当，除去物镜前透镜的油渍和灰尘。
- (3) 如同时进行透射光相差观察，要检查聚光镜对中心及相差环与物镜相反的共轭情况。
- (4) 检查样品载体(载玻片、盖玻片和其他器皿)有否挂有液体、灰尘，厚度是否在物镜标定的工作距离范围内。切片样品不能太厚，约 $\leq 10\mu\text{m}$ 为宜。
- (5) 因照明光源含有紫外线，在载物台前上方放一块棕色遮光板，以防紫外线损伤视网膜。
- (6) 电压不稳会降低高压汞灯的使用寿命，光源电源最好加配稳压器。
- (7) 为延长汞灯寿命，在开启后15 min 方可关闭；汞灯荧光电源一旦关闭，再次启动至少需等待10 min，以使水银蒸汽冷却复至原态，否则会影响灯的寿命。

2、荧光镜像观察

- (1) 在开启荧光灯源后约5~10min 激发光强度趋于稳定，装载样品进行观察；为防止在调焦和寻找物像过程中过度激发光照会造成样品荧光淬灭，最好先通过缩小荧光照明器的孔径光阑或加ND滤光片将激发光调节到适度强度，有规律地移动样品台，待确定镜像后，再调节到最佳荧光状态用于拍摄记录。
- (2) 镜像质量不佳的调整。排除样品制备因素外，可进行的必要调节措施是：
 - a 排除成像光路中的遮光或限光器件，如DIC 附件、ND 滤光片等。
 - b 重新调节荧光照明器的收光器对焦和孔径光阑大小。
 - c 细心调节物镜覆盖差校正环。
 - d 复查荧光激发/发射组件是否与所标记的荧光色素对应。
- (3) 在不影响分辨率的前提下，于照相取景框和CCD靶面范围之外，可尽量回缩荧光光路视场光阑和物镜(100X 物镜)的数值孔径光阑调节环，以避免杂散光的影响、提高景深，并可减小激发面积防止附加样品淬灭。
- (4) 暂时不观察时，应阻断激发光路。
- (5) 油镜观察时，须用“无荧光油”，尤其是在U、V 激发时，因常规镜检用的香柏油带有青色荧光。

3、荧光照相和数字CCD 相机图像采集

A、荧光照相

- 1) 尽管肉眼观察荧光镜像亮度与普通明场相差无几，而实际上曝光时间要增加数倍甚至几十倍，应使用快速感光胶片，如ISO200 (24DIN)、ISO400(27DIN) 。
- 2) 根据荧光物像在测光区的分布比例和镜像的明暗程度设置曝光补偿调节，原则上适当增大补偿以获得背景黑暗荧光图像明亮、鲜艳的照片效果。
- 3) 如果没有照明标线取景器，可先选择较明亮的荧光区域进行对焦调整。
- 4) 对点状荧光物像或扑捉某点为主的拍摄，可选择适当的点测光模式。
- 5) 对在同一幅需要同样条件拍摄的分散点状荧光物像，可试用点测光配合自动锁定方式拍摄。
- 6) 曝光过程应避免任何振动，有条件可配置防震台。

B、数字CCD 相机图像采集

- 1) 光学接口的中间倍率要与CCD的芯片尺寸合理匹配。
- 2) 采用合适的荧光拍摄模式，摸索减背景 (Background Subtraction) 处理条件，根据镜像情况设置Binning、Gain、Gamma 等参数。
- 3) 因CCD 芯片灵敏度较高, 如果荧光镜像过于明亮, 为获取对比度较好的采集图像, 可适当缩小荧光照明器孔径光阑或加ND滤光片，特别是在荧光辉光较强影响拍摄样品细节的情况时。

实际工作中, 为获得较好的荧光图像拍摄质量, 需要对上述调节机制综合运用, 反复摸索、优化条件。