

文章编号: 1005-5630(2015)04-0363-04

LED 光源和 CCD 在荧光显微镜上的应用研究

徐 炜, 郎 涛

(上海交通大学 附属第一人民医院, 上海 201620)

摘要: 荧光显微镜是常用的医用光学仪器之一, 分布在各大医院科研、病理、检验等部门。光源是荧光显微镜的主要组成部分, 使用新型的 LED 光源替代传统的高压汞灯, 以及把数码相机改为 CCD 摄像装置, 使现有的荧光显微镜上了一个等级, 达到现代荧光显微镜的水平。

关键词: 荧光显微镜; 高压汞灯; LED 光源; CCD 摄像装置

中图分类号: TH 742.65 **文献标志码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.1005-5630.2015.04.017

Research on the applications of LED light source and CCD used in the fluorescence microscope

XU Wei, LANG Tao

(Shanghai General Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201620, China)

Abstract: The fluorescence microscope is one of the most universal medical optical instruments and is widely applied in the scientific research, pathology and examination in the hospitals. Light source is an essential component of the fluorescence microscope. This paper explains how to use the LED as the light source of the fluorescence microscope instead of the traditional high-pressure mercury lamp and the way of transforming digital cameras into CCD imaging device, such that the existing fluorescence microscope has been greatly improved and reach to a state-of-the-art level of modern fluorescence microscope.

Keywords: the fluorescence microscope; the high-pressure mercury lamp; LED light source; CCD imaging device

引 言

LED(light-emitting diode)发光二极管是一种能将电能转化为可见光的固态半导体器件。由于 LED 这种新型照明光源既节能又环保, 被认为“白炽灯照亮 20 世纪, LED 将照亮 21 世纪”, 也因此发现蓝光 LED 的 3 人获得 2014 年诺贝尔物理学奖。国外很快把 LED 这种新型光源应用到新研制的荧光显微镜中, 但这种产品价格昂贵, 极少有医院购买。目前大量使用的荧光显微镜都是采用老式的汞灯, 为了克服汞灯照明的缺点, 本文根据医院工作的需要, 通过反复实践和改进, 把 LED 新型光源应用到现有的荧光显微镜中, 并取得了满意的结果。同时也将 CCD(charge-coupled device)摄像装置应用到现有的荧光显微镜中, 大大扩展了荧光显微镜的功能。

收稿日期: 2014-12-19

基金项目: 国家自然科学基金(14ZR1433700)

作者简介: 徐 炜(1981-)男, 工程师, 主要从事临床医学工程管理和研究工作。E-mail: xia_guoxin@yahoo.com

在十二五期间,医院获得很多国家级课题和省部级课题。这些课题离不开显微镜的使用,而实际情况是大多数显微镜功能老化,跟不上国外医用光学仪器的发展,同时存在着以下几个问题:(1) 显微镜视场不清晰;(2) 显微镜照明功能障碍,照明不均匀;(3) 观察细胞的光线太弱;(4) 视场切割。因此,必须对在用的仪器进行改造,使显微镜功能可靠和操作简化。经过显微镜性能测试,本文选择对正置荧光显微镜进行改造。

1 荧光显微镜工作原理

荧光显微镜是医院科研、病理、检验等部门常用的医用光学仪器之一。因为普通的显微镜是在明亮的背景上观察暗物,而荧光显微镜是在暗背景下观察彩色的图像,因此它比普通的显微镜分辨力提高100倍,可以观察到普通显微镜看不到的细节^[1]。但是它的调整,校正难度较高,只要解决了荧光显微镜的问题,其它显微镜问题就迎刃而解。

图1是透射式荧光显微镜的光学系统图。由汞灯发出的各种谱线的光线,经激发滤光片后只让某一种波长的紫外光线通过,如波长为404.7 nm蓝紫光,经反光镜后,激发样品产生荧光。激发滤光片将其他波长的光线滤掉,并使样品激发荧光,所以称其为激发滤光片。通常,激发产生的荧光波长比激发样品的光的波长大得多,是可见光。这样产生的荧光和透过样品的一部分激发光(紫外光),经物镜成像后,人眼即可用目镜观察荧光图像。为了防止紫外光进入目镜视场,降低图像衬度和损伤人眼,放置了一块截止滤光片,它只让某一部分波长的谱线通过,如只让500~750 nm的可见光通过,而不让500 nm以下的光通过。

从图中可以看出,光源是荧光显微镜主要组成部分,以前荧光显微镜都采用200 W的超高压汞灯作光源,它是由石英玻璃制作,中间呈球形,内充有一定量的汞,工作时在两极间放电,引起水银蒸发,球内气压迅速升高,当水银完全蒸发时,可达50~70个标准大气压力,这一过程一般约5~15 min。超高压汞灯的发光是电极间放电使水银分子在不断解离和还原过程中发射光量子的结果。它发射很强的紫光,足以激发各类荧光物质,因此被荧光显微镜普遍采用。汞灯的发射光谱如图2所示。

2 高压汞灯使用简介

高压汞灯调整非常复杂,调整步骤如下^[2]。

(1) 开启汞灯后,在显微镜工作台上放1张白纸,并从物镜转换器中转出物镜,即转换器上出现的空孔位于光轴上,卸去转换器上保护盖(如无空孔,可卸掉1个低倍物镜,校正完毕后再旋上)。拉(或转)动显微镜主体内的滤光片座,选用透过绿光的滤光片组,使反射照明有光通过物镜转换器孔,此时在白纸上可看到汞灯照亮的光斑。如光斑太亮,如图3(a)可以插入中性滤光片,或戴上太阳眼镜,以保护眼镜。

(2) 转动聚光镜调焦旋手3,见图4,使汞灯光弧在白纸上成像清晰,因汞灯室内装有1个用来增加亮度的球面反光镜,于是在白纸上看到2个光弧的像,见图3(a)。旋转2个汞灯调节旋手4、8和2个反光镜位置调节旋手5、7,使2个光弧并立,见图3(b),再转动反光镜聚焦调节旋手6,使2个光弧有接近相等的亮度,见图3(c)。

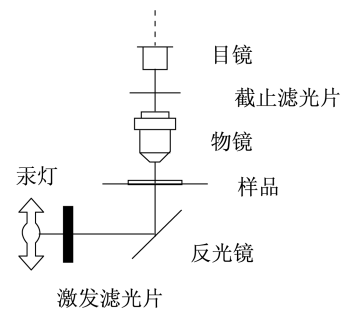


图 1 荧光显微镜光学系统

Fig. 1 Optical system of a fluorescence microscope

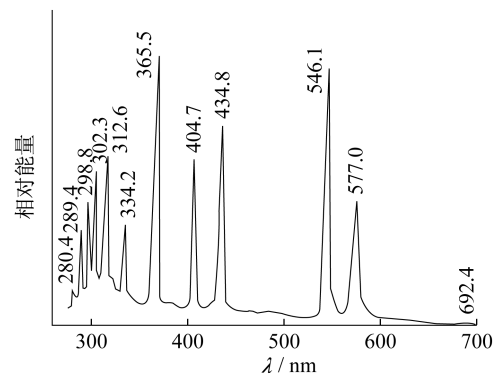


图 2 汞灯的发射光谱

Fig. 2 Emission spectrum of mercury arc lamp

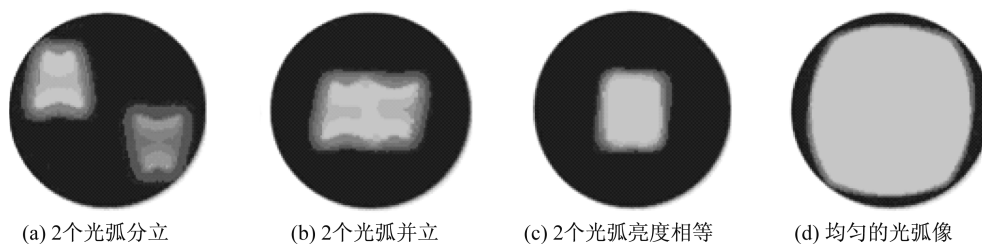


图3 汞灯调焦和校正步骤

Fig. 3 focus and alignment procedure of a mercury arc lamp

(3) 旋转2个汞灯调节旋手4、8和2个反光镜位置调节旋手5、7,使2个光弧重合,再调节聚光镜调焦旋手3,得到放大并且均匀的光弧像,见图3(d),这样汞灯校正工作就完成了。转入物镜后,根据物镜具体倍率,稍微调节一下聚光镜调焦旋手3就可以了。

从开始调整到结束要1h左右,这对非专业人员是很难完成的,所以,更换一个灯就要请专业公司人员来重新调整一次,这样工作量很大,影响科研工作的进度。总之,使用高压汞灯作光源,除了调整复杂外,还具有易损耗、视场不清晰、照明不均匀等缺陷。

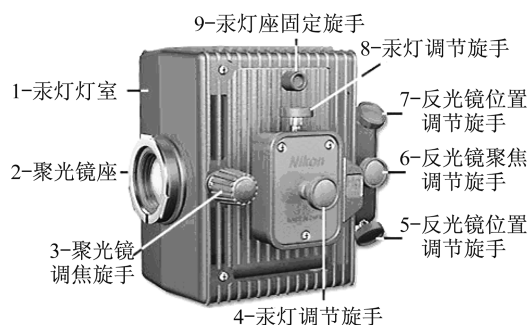


图4 汞灯灯室

Fig. 4 Mercury lamp chamber

3 LED的使用及其特点

3.1 LED和汞灯对比

(1) 汞灯是会发射出对人体有害的紫外波长的光,而LED光源发射特定波长的激发光,能够有效地激发样品,不存在紫外辐射,能有效确保使用安全。

(2) 汞灯寿命一般为200~400h,而LED使用寿命达到50000h,比传统的汞灯提高100倍,极大延长了使用寿命,降低了成本。LED因输出强度高,波长稳定好,能确保激发有效性。

(3) 汞灯开关一般要预热30min,而LED光源为实时开关,不需要预热和冷却。

(4) 汞灯光源一般带一个稳压器,占有相当大体积,而LED光源安全性高,体积小,可随意搬动,不存在汞泄漏污染和发烫问题。

(5) 汞灯在安装时,需要调节光源中心,换另一汞灯也需要重新校正光路,而用LED不需要光路调节。

(6) 汞灯光源亮度是一定的,要通过减光玻璃来减弱其强度,而LED光源则可通过旋钮来调节亮度。

(7) 汞灯100~200W,发热量大,需要激发电源,而LED光源可选配、移动,这样突然停电不会影响使用。

由于使用了LED光源,使仪器具有更多优点^[3],因此应该把新型LED光源用到荧光显微镜中来。

3.2 LED选型和国内外对比

国内外LED的主要参数,如表1所示。

从表对比知,显然是欧美的发光效率高些。由于目前国内LED的功率只有5W,现选用德国LEICA公司的产品,功率为10W,亮度可调。由于价格比较贵,今后发展的方向还应采用国内的LED,以降低成本。

表1 LED发光效率对比

Tab. 1 Comparison of LED luminous efficiency

国家和地区	发光效率/%
中国	60~68
美国、欧洲	70~80

3.3 LED 的结构

用于显微镜中的 LED 外型如图 5 所示。

原仪器带有 2 种波长的激发滤光片:1 号激发滤光片波长为 510~550 nm;2 号激发滤光片波长为 460~490 nm。

为此,配置了 Leica SFL100 型的波长为 530 nm 和 470 nm 的 2 个 LED 光源^[4],如图 5 中 1,它有上下 2 个。分别用 2 个交换式电源供应器 2 供电,通过电源插头 4 插入 LED 光源,插到底,并用螺母 5 拼紧。

这种根据不同的波长,采用磁性定位结构 8 替代弹性片定位结构的 LED 切换机构,克服了弹性片容易变形,定位不明显的缺点,目前在国内还没有见到,这也是在技术上的一种创新。

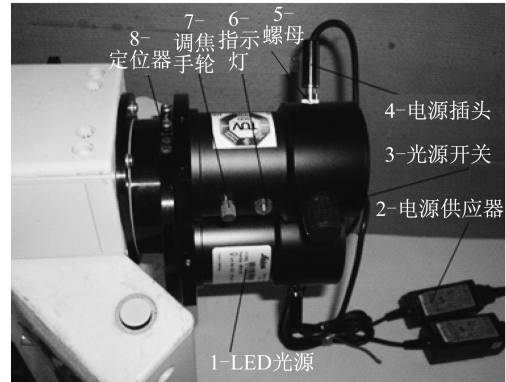


图 5 LED 外型图

Fig. 5 Outline drawing of LED

4 CCD 摄像装置的使用

CCD 是一种半导体成像器件,具有灵敏度高、抗强光、体积小、畸变小、寿命长、抗震动等优点,所以本文又在原有的仪器上,把数码相机改成 CCD 摄像装置,如图 6 所示。

在原有的荧光显微镜 1 上的数码相机接口 2 上,安装成像物镜 3,通过物镜 3 成像到 CCD 4 上,通过图像卡 5 把 CCD 接受的信号传到计算机 7 里,在计算机显示屏上得到要观察的图像。软件 6 用于图像的归档、保存和对图像的亮度、衬度、颜色等进行调整。这种结构设计时,中继物镜必须要有调焦机构,以保证目镜成像和计算机屏幕同时清晰。

图 7 是改制的 CCD 摄像装置照片,是在原仪器上安装了 Leica DFC295 摄像装置,代替了原仪器的数码相机,这是本仪器上第 2 个改制。本摄像装置能通过计算机软件,把 300 万像素扩展到 700 万像素,所以性价比很高。

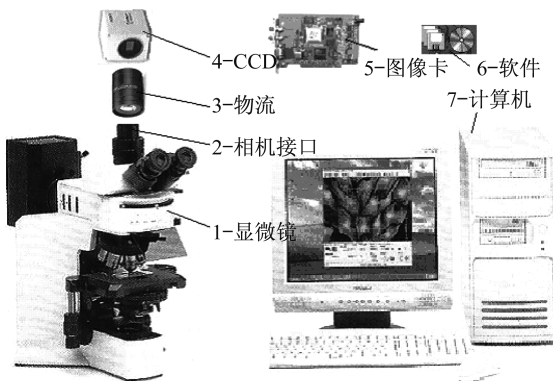


图 6 摄像装置的原理图

Fig. 6 Schematic diagram of photography device



图 7 摄像装置

Fig. 7 Photography device

5 结 论

由于采用了 LED 新光源,这次改制后视场清晰度达到 80%,视场均匀性几乎达到 90%,分辨率也有很大提高,并在我院普外、肿瘤等 6 个学科和 17 个自然科学基金项目中得到了应用。图 8 是仪器改造后所拍摄的荧光试样照片。

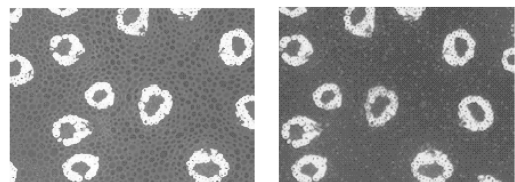


图 8 荧光试样照片

Fig. 8 Photo of fluorescence specimen

Press, 2003.

- [8] SHACKLFORD J F, ALEXANDER W. CRC materials science and engineering handbook [M]. Boca Raton: CRC Press, 1994.
- [9] DURAND N, BADAWI K F, GOUDEAU PH. Influence of microstructure on residual stress in tungsten thin films analyzed by X-ray diffraction [J]. Thin Solid Films, 1996, 275(1/2): 168-171.
- [10] 张慧晶, 张众, 朱京涛, 等. 高反射率 Mo/B₄C 多层膜设计及制备[J]. 强激光与粒子束, 2008, 20(1): 67-70.
- [11] FEDORENKO A I, KONDRATENKO V V, PALATNIK L S, et al. Space test of Mo-Si, MoSi₂-Si, W-Si and WSi₂-Si X-ray multilayer mirrors on Russian orbital station "Mir"[J]. SPIE, 1995, 2453: 11-14.

(编辑:程爱婕)

=====

(上接第 366 页)

近年来,世界上一些经济发达国家围绕 LED 的研制展开了技术竞赛,如日本“21 世纪光计划”,美国“下一代照明计划”,欧盟“彩虹计划”。我国目前 LED 产品还属于中、低端的产品,通过本文介绍,如果各大医院能够把现有的荧光显微镜都进行这样的改制,不但能节省大量的外汇,而且也会推动 LED 工业的发展,为振兴民族工业发挥更大的作用。

参考文献:

- [1] 虞启琰. 医用光学仪器[M]. 天津:天津科学出版社, 1988: 67-98.
- [2] SPRING K R. Focus and alignment of mercury and xenon arc lamp[EB/OL]. [2005-6-30]. <http://www.microscopyu.com/tutorials/java/arclamp>.
- [3] 侯珏, 刘陈. LED 在医学中的应用及展望. 光学仪器 2010, 32(1): 90-94.
- [4] LEICA MICROSYSTEMS. Fluorescence microscopy in a new light with modern LED illumination[EB/OL]. [2008-07-01]. <http://www.leica-microsystems.com>.

(编辑:刘铁英)