

# 化石研究的新技术——激光扫描共聚焦显微系统\*

杨伟平 张海春 王 冰 徐放鸣

(中国科学院南京地质古生物研究所, 南京 210008)

## 内 容 提 要

激光扫描共聚焦显微技术的根本特性在于任何时候都将照明光与探测到物体表面的光限制在物体某一个相同点上。如果这个点非常小又在极小衍射范围内,那么激光扫描共聚焦成像系统的分辨率要比任何传统显微镜高许多。通过变换焦距,可做一系列虚拟断层切面。利用这个特点,对那些用常规手段无法进行切片磨面的微体化石采用激光扫描共聚焦新技术进行研究,获得了对小壳化石、昆虫、孢粉等化石研究的新成果。

**关键词** 断层切片 激光扫描共聚焦 微体化石

## 1 基本原理

激光扫描共聚焦显微技术可追溯到50年代,美国人Marvin Minsky制作了一台双聚焦分级扫描显微镜。该显微镜只把成焦物体探测到,而在焦距以外的物体全变黑,因此也就不成像。这样就大大地提高了成像物体的分辨率。通过激光的介入,可以对整个物体平面进行扫描成像,再通过变换焦距可以对整个物体进行立体全方位扫描。因此,他利用自制的一台显微镜毫不费劲地把样品“切成”薄片,十分清晰地连续观察样品的深层结构、构造。近年来,科学家们又将激光扫描共聚焦显微镜与可执行数字化图像处理任务的计算机联接起来,对上述采集到的图像作进一步的图像处理。

简而言之,通过以下4个基本步骤,激光扫描共聚焦显微镜可以对一个样品中选择的平面具有高度的分辨率,进而对整个物体扫描获得其立体图像。

1. 光线由物镜聚焦成一股沙漏状的光束。这样,光束明亮的“腰”照到了样品某一选定深度上的一点。
2. 从那一点所反射的光线再聚焦成一点,这点光又全部通过安置在传感器前的一块掩蔽罩上的针眼孔径。与此同时,孔径周围的不透明区域挡住了可能影响图像清晰度的大多数光线,也就是说,挡住了从感兴趣平面上方和下方那些被照亮的样品所反射的光线。
3. 光点迅速地从样品上的一点移动到另一点,直到整个平面被扫描为止。
4. 如果要不同部位(或平面),只需微调焦距就可对样品毫不费劲地“切片”,犹如医学上的CT。而正是利用这个特性,可以对那些很难切片磨面的微体化石进行激光扫描,从而在无需对样品作任何机械破损的情况下,观察到化石内部及深层次的结构。

\* 中国科学院南京地质古生物研究所现代古生物学及地层学开放实验室资助项目。

## 2 激光扫描共聚焦显微技术在化石研究中的尝试

激光扫描共聚焦显微技术在产生清晰的两维或三维光学图像方面是无与伦比的。区别于常规显微镜的一个最大优点,就是它可以观察样本的深部组织和结构。Minsky 是在考虑人类大脑如何工作的过程中开发这项新技术的。他推测如果大脑中所有神经元的联系都能作图记录下来,这样的一张线路图应能揭示大脑动作的本质。如今,激光扫描共聚焦显微技术已被广泛应用在生物化学、细胞生物学、胚胎学、食物学、遗传学、材料科学、神经生物学、寄生生物学、病理学、植物生物学。其中应用最多的是细胞生物学、胚胎学、遗传学、神经生物学。到目前为止,古生物学方面的应用无论在国内还是在海外似乎是空白。本文就是针对这方面的一个尝试研究。

通过激光扫描共聚焦显微高新技术对化石进行扫描,不仅可以清晰地观察到化石表面精细的结构,而且还可以深入观察到化石内部深层次的结构、构造以及进行三维旋转观察。图像处理程序能够把体素(由 3 个坐标定义的点称为体素)汇编成显微物体的三维重构图。这无疑给化石研究增添了新的活力,也是常规显微镜所无法做到的。由于该显微技术是通过荧光激发产生图像,所以样品自身是否具备荧光直接影响到成像的效果。当然,也可以对样品进行荧光染色处理。通过对以下微体化石的初步摸索实践,已经看到了激光扫描共聚焦显微技术在化石应用中的前景。

本文对小壳化石、琥珀中的昆虫,以及孢粉等化石进行了尝试研究,发现效果较理想。可以对小壳化石进行断层扫描,观察其内部深层次结构,这将为正确研究分类位置不定的一些重要小壳类别提供必要手段。还对昆虫大腿进行扫描,似乎有肌肉痕迹存在,这就为分子古生物学研究提供了一个先决条件和参考。

**小壳化石:** 到目前为止在所有研究过的微体化石中,小壳化石是最为理想的一类化石,并且其研究价值也高。这不仅因为小壳化石都或多或少自带荧光,而且在理论上都是具有内部构造的。以往由于个体小难切片磨面,而使小壳化石的内部结构、构造研究在很大程度上受到限制。如今,激光扫描共聚焦显微镜在化石研究方面的应用正好解决了上述这个关键问题。

图版 1 中图 1 和图 2 是两个圆球,在没有做激光扫描切片时很难鉴别它究竟是不是化石。通过激光扫描之后发现,这两个圆球的结构和构造是不同的,图 1 显示的是一个可能为有机成因的生物圆球,而图 2 则是一个无机成因圆球,通过该技术的应用可以轻而易举地在很短时间内将它们区分开来。图 3 和图 4 是笔者对小壳类化石进行激光扫描后的初步结果。其中图 3 是小壳化石的一个虚拟旋切面,它是在保证化石完好无损情况下,清晰地显示出小壳化石的内部构造。目前我们对这些内部构造还没有足够的认识,原因之一是缺乏相同物种足够的标本来探讨这些构造究竟是原生的还是次生的。只有在多数标本均显示有上述构造的情况下,我们才能肯定地得出相应的结构,为探讨其分类位置等生物学基本问题服务。图 4 是与图 3 相近的一个小壳个体,图上显示的是该小壳外观的扫描立体图。尽管其分辨率还达不到电镜扫描精度,但也是常规显微镜所不能及的。

**琥珀中的昆虫:** 由于特异的保存条件,其外部结构常能完好保存下来,并可运用常规方法进行研究。如若研究其内部结构,一般情况下都得破坏珍贵的标本,运用激光扫描共聚

焦显微镜则可弥补这一缺陷。图版 I 中的图 5 是运用共聚焦显微镜对保存在琥珀中的一种蚊子扫描得到的外部形态特征,图 6 是对其内部扫描得到的图像。

**孢粉:** 以下介绍一个第四纪花粉切面的范例。该花粉约  $50\mu\text{m}$ ,对其从近极向远极共作切面 32 幅,图版 I 中的图 1 至图 6 展示的只是其中的 6 幅孢粉切面。其中图 1 至图 5 分别是第 2,4,6,8,12 幅的断层面,而图 6 则是整个花粉的立体照。以上所示很好地显示了可以在对化石不作任何机械破损的情况下,清晰地观察到化石内部各个层次的结构构造。

### 主 要 参 考 文 献

- Lichtman, W., Sunderland, J. W. and Wilkinson, R. S., 1989: High-resolution imaging of synaptic structure with a simple confocal microscope. *New Biologist*, **1**(1):75—82.
- Minsky, M., 1988: Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*, **10**(4):128—138.
- White, W. B., Amos, W. B. and For dham, M., 1987: Versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *Journal of Cell Biology*, **105**(1):41—48.
- Wilson, T. (ed.), 1990: *Confocal microscopy*. Academic Press.

[1996年5月3日收到]

## A NEW TECHNIQUE FOR MICROFOSSIL STUDY BY LASER SCANNING CONFOCAL IMAGING SYSTEM

Yang Wei-ping, Zhang Hai-chun, Wang Bing and Xu Fang-ming  
(*Nanjing Institute of Geology and Palaeontology, Academia Sinica, Nanjing 210008*)

**Key words:** fault-cutting, laser scanning confocal imaging system, microfossils

### Summary

Since the making of a confocal microscope by the American scientist Marvin Minsky in the 1950s, this technique has been significantly updated with the involving of laser measures and digital image-processing computer. This thoroughly new technique, now called the Laser Scanning Confocal Imaging System, is widely used in many fields, especially in medicine/biology-related disciplines. However, there is so far no reports about its application to fossils study.

The laser scanning confocal imaging system has been tentatively applied to the current microfossil studies. Small shell fossils, insects in amber and pollen are the successful examples for such application. In particular, a series of sections of small shell fossils can be virtually made through with laser scanning confocal microscopy. Therefore, it is now very

convenient for micropalaeontologists to observe the internal structure and texture of microfossils without destroying or damaging the fossils themselves.

## 图版说明

### 图版 I

- 1,2. 显示的是在处理小壳类化石过程中所发现的圆球状可疑化石。经过激光共聚焦显微镜扫描之后,发现这两种球内部结构是不同的。图1显示了可能为有机成因的生物圆球,图2则是无机成因圆球。
- 3,4. 螺旋型小壳的两个照片,前者是对该小壳化石进行扫描所获的断层切面,可以清晰地见到其内部的结构构造,后者则是该类小壳化石的全方位立体图。
- 5,6. 琥珀中昆虫 *Sciara* sp. 的激光共聚焦扫描图,图5显示的是全貌图,并作部分图像处理,图6则是该标本的更细致的扫描图,图中隐约可见可能的腿肌痕。

### 图版 II

- 1—6. 花粉的系列断层切面,其中图1,2,3,4,5分别是对该花粉所做32幅切面中的第2,4,6,8,12幅断层切面图,图6是该花粉的立体图。



