

文章编号: 0258-7025(2010)05-1240-05

# 基于微透镜阵列和振镜扫描的光谱分辨多焦点 多光子显微技术

李 恒<sup>1,2</sup> 邵永红<sup>2</sup> 王 岩<sup>2</sup> 屈军乐<sup>2</sup> 安 莹<sup>1</sup> 牛憨笨<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 西安工业大学光电工程学院, 陕西 西安 710032

<sup>2</sup> 深圳大学光电子学研究所光电子器件与系统(教育部/广东省)重点实验室, 广东 深圳 518060

**摘要** 提出一种具有快速层析成像以及光谱分辨功能的多光子激发荧光显微技术。采用微透镜阵列产生激发光点阵,利用线扫描方式扫描阵列点,对样品进行多线并行多光子激发,利用棱镜色散荧光信号,同时,利用面阵 CCD 并行记录光谱分辨的多线荧光信号。采用  $4 \times 4$  的微透镜阵列,仅需要记录 128 幅图像,即可重构  $512 \text{ pixel} \times 512 \text{ pixel}$  的光谱分辨荧光显微图像。对多色荧光珠、染色铃兰根茎以及花粉颗粒等样品进行实验,得到样品的双光子激发荧光光谱分辨图像,光谱测量范围为  $450 \sim 700 \text{ nm}$ ,光谱分辨率为  $3 \text{ nm}$ 。

**关键词** 生物光子学;多光子激发;荧光光谱;荧光显微;多焦点多光子显微

中图分类号 O433, TB873 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20103705.1240

## Spectrally Resolved Multifocal Multiphoton Microscopy Using Microlens Array and Galvo Mirror Scanning

Li Heng<sup>1,2</sup> Shao Yonghong<sup>2</sup> Wang Yan<sup>2</sup> Qu Junle<sup>2</sup> An Ying<sup>1</sup> Niu Hanben<sup>2</sup>

<sup>1</sup> College of Opt-Electro Engineering, Xi'an Technological University, Xi'an, Shaanxi 710032, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, Institute of Optoelectronics, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China

**Abstract** We present a novel spectrum-resolved multifocal multiphoton microscopy (SR-MMM) that is capable of performing fast 2-dimensional (2D) spectral measurements of fluorescent samples with optical sectioning. Fluorescence emission from the excited lines on the sample is spectrally dispersed with a prism, and a CCD array is used to acquire the spectrally resolved image. Spectrally resolved images of  $512 \text{ pixel} \times 512 \text{ pixel}$  can be obtained by acquiring only 128 raw images when a  $4 \times 4$  excitation foci array is used. Multi-color fluorescent beads, sample slide of a stained lily and pollen particles are used for spectrally resolved imaging experiment. The spectral measurement range is from  $450 \text{ nm}$  to  $700 \text{ nm}$ , and the spectral resolution is less than  $3 \text{ nm}$ .

**Key words** biophotonics; multiphoton excitation; fluorescence spectroscopy; fluorescence microscopy; multifocal multiphoton microscopy

## 1 引 言

多光子激发荧光显微技术利用近红外激光 ( $700 \sim 1000 \text{ nm}$ ) 对样品进行非线性激发,不需要共焦

针孔即可获得样品的三维图像。与采用蓝紫光的单光子激发荧光显微技术相比,多光子激发减少了激发光的散射,提高了成像深度,有效减小了光漂白和光

收稿日期: 2009-12-03; 收到修改稿日期: 2010-01-18

基金项目: 国家自然科学基金(60627003)和广东省高等学校科技创新团队项目(06CXTD009)资助课题。

作者简介: 李 恒(1985—),男,硕士研究生,主要从事荧光光谱、荧光寿命显微成像等方面的研究。

E-mail: liheng1111985@163.com

导师简介: 屈军乐(1970—),男,博士,研究员,主要从事荧光寿命成像、多光子激发荧光显微成像等方面的研究。

E-mail: jlqu@szu.edu.cn(通信联系人)

损伤,可以对生物样品进行实时在体监测,是目前广泛应用的激光扫描共焦显微技术的重要补充<sup>[1-8]</sup>。为提高成像速度和光能利用率,发展了基于声光扫描技术的双光子激发显微技术<sup>[9,10]</sup>、线扫描双光子激发显微技术<sup>[11,12]</sup>和多焦点多光子显微(MMM)技术<sup>[13]</sup>。线扫描双光子激发显微技术的激发效率低,需要提供更高功率的激发光,更重要的是,由于采用线激发,各光点间彼此干扰,导致空间分辨率低。MMM技术的空间分辨率类似于单光束的双光子激发荧光显微技术,但由于采用多路并行激发,显著提高了光能利用率以及成像速度。在阵列点间距大于 $7\lambda$ ( $\lambda$ 为激发光波长)时,阵列点间不存在激发光的串扰,而且阵列点数越多成像速度越快,成像速度可达到视频级,是研究细胞和组织等的重要工具<sup>[14-16]</sup>。

然而,目前所报道的MMM技术仅能对荧光强度成像。我们前期报道了一种具有同时时间和光谱分辨功能的MMM(STSR-MMM)技术<sup>[17]</sup>,但要获得样品二维或三维空间的光谱和寿命信息,必须用阵列点对样品进行步进扫描,成像速度慢。而实际上,在许多应用场合,如多色标记测量<sup>[18]</sup>、荧光共振能量转移(FRET)<sup>[19]</sup>和荧光比率成像<sup>[20]</sup>等,仅需要快速获取样品的光谱信息。针对这种情况,本文提出并研究了一种光谱分辨多焦点多光子显微(SR-

MMM)技术,利用微透镜阵列将样品分成多个子区域,采用棱镜对样品所发出的荧光进行光谱色散,结合二维振镜特殊的扫描模式,实现样品的并行多线激发。

## 2 实验装置

光谱分辨多焦点多光子显微系统的工作原理如图1所示,该系统主要由钛宝石锁模飞秒激光器(Coherent, Mira 900F)、倒置荧光显微镜(Nikon, TE2000U)、分光棱镜(材料K9玻璃,顶角 $60^\circ$ )、微透镜阵列(SUSS MicroOptics)、CCD相机(PI, Coolsnap EZ)和计算机等组成。飞秒激光器输出光脉冲的重复频率为76 MHz,功率约800 mW。微透镜阵列的大小为 $10\text{ mm}\times 10\text{ mm}$ ,子透镜直径为1.03 mm,焦距24 mm。飞秒激光脉冲经扩束和整形后,照射到微透镜阵列上,形成多路子光束,在微透镜像方焦平面束腰处,也就是图1中虚线所示位置的大小约为 $4\text{ }\mu\text{m}$ 。经光学耦合系统和倒置显微镜在样品上形成 $4\times 4$ 的紧聚焦点阵,用于样品的双光子激发。每个阵列点的光功率约为5 mW。光学耦合系统将微透镜产生的点阵成像到样品上,通过改变耦合系统的参数可以改变阵列点数以及激发点之间的距离。

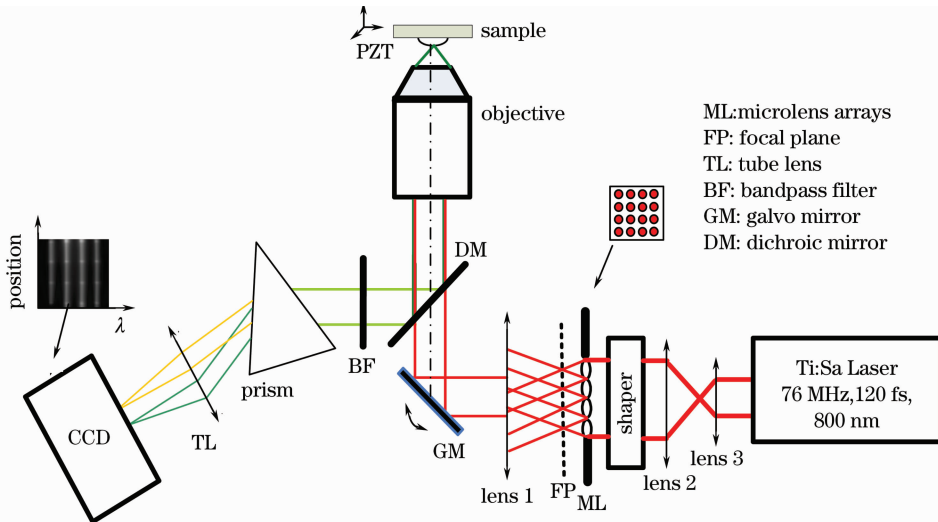


图1 SR-MMM成像装置示意图

Fig. 1 Schematic of SR-MMM system

扫描振镜(Cambridge, 6210HB)沿阵列点的列方向以500 Hz的速率快速扫描,对于 $4\times 4$ 激发点阵,在样品上产生4条阵列线,用于对样品的并行多光子激发。虽然在这4条扫描线上,每一条线上都由4个点扫描而成,但由于每条线上相邻的光点不是同时到达样品,所以有效地抑制了激发光点之间

的信号串扰,有利于提高空间分辨率和信噪比。对于每一点来讲,最大扫描角度减小到原来的1/4,提高了扫描速度。4条扫描线所发出的荧光信号经棱镜色散后由CCD相机记录。为了获得样品的二维图像,采用扫描样品台的方法,振镜每扫描完一个周期,CCD记录一幅多光谱分辨图像,然后样品台沿

阵列点的行方向移动一步。扫描振镜和 CCD 重复上述过程,获得一系列多光谱分辨图像,最后通过图像重构,可以获得样品的光谱分辨荧光显微图像。

### 3 结果与讨论

利用质量分数为 10% 的荧光素 fluorescein27 溶液对 SR-MMM 系统进行了原理实验。没有扫描时,点阵光激发的染料溶液光谱分辨图像如图 2(a)所示,图中横坐标为光谱方向,不同像素对应不同的波长,纵坐标为空间位置。当扫描振镜沿阵列点的列方向

扫描时,CCD 记录到的荧光染料溶液中 4 条激发线的光谱分辨图像如图 2(b)所示。样品台每移动一步,CCD 记录一幅图像,扫描完整个样品后,获得一系列荧光染料溶液的光谱分辨图像,如图 2(c)所示。采用图像重构算法,对所获得的多线多光子激发光谱分辨图像序列进行处理,即将采集图像按照采集顺序进行重构图像的像素对应排序,从而可获得荧光染料样品的全光谱强度图像,如图 2(d)所示。实验过程中,需要仔细调整振镜扫描角度,保证阵列点间扫描区域刚好对接,既没有漏扫,也没有重叠。

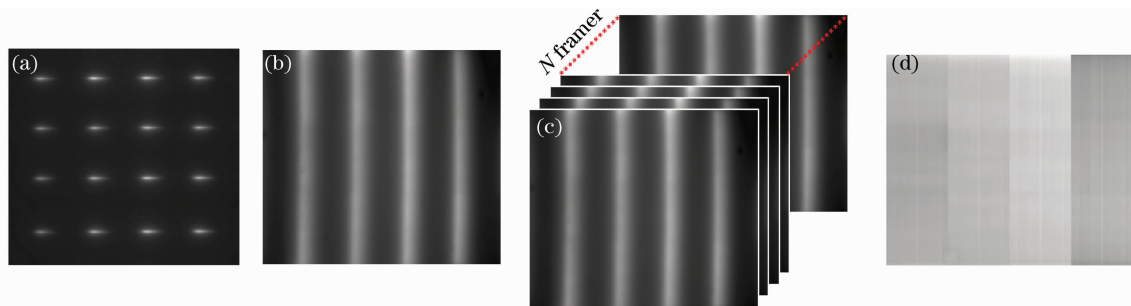


图 2 SR-MMM 成像过程及图像重构

Fig. 2 SR-MMM image acquisition process and image reconstruction

采用多个波长已知的激光束对 SR-MMM 系统的光谱分辨率进行了标定。把波长为 458, 476, 488, 514, 532 和 632.8 nm 的激光引入图 1 所示的实验装置,测量其在 CCD 上所对应的像素位置,并通过

$$y = A + B_1x + B_2x^2 + B_3x^3 \quad (1)$$

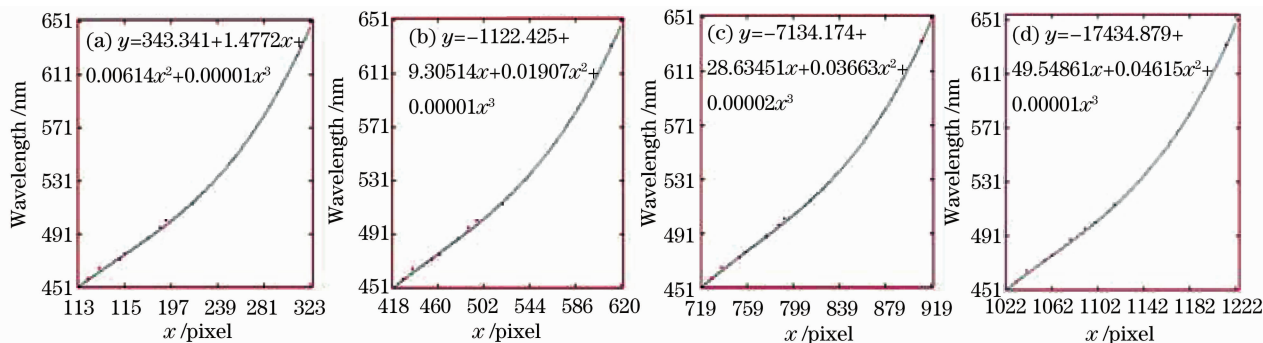


图 3 阵列点的光谱标定结果

Fig. 3 Spectral calibration of the excitation array

用直径约为  $3 \mu\text{m}$ , 发射中心波长分别为 515, 567 和 645 nm 的多色荧光珠的混合溶液对系统的光谱分辨以及成像功能做了进一步的测试。振镜的扫描频率为 500 Hz, 根据样品发射荧光的强度, 将 CCD 的曝光时间设定为 800 ms。样品台的步进长度为  $1 \mu\text{m}$ , 扫完一个子区域所需的总的步数为 44, 由  $4 \times 4$  阵列点产生的整个探测区域为  $176 \mu\text{m} \times$

给出的三阶多项式拟合来标定光谱分布, 式中  $A, B_1, B_2, B_3$  为拟合系数。

由于系统采用  $4 \times 4$  点阵激发, 振镜沿垂直方向快速扫描, 而光谱方向为水平方向, 因此在光谱标定时可以得到 4 列谱线, 对这些谱线沿水平方向拟合所得到的结果如图 3 所示, 光谱分辨率约为 3 nm。

$176 \mu\text{m}$ 。图 4(a) 为 CCD 所记录的一系列光谱分辨原始图像, 该图像的水平方向为光谱信息, 垂直方向为位置信息。图 4(b) 为对所采集的序列图像重构后所得到的荧光珠的光谱分辨图像, 图 4(c) 为图 4(b) 中圆圈所标记区域的光谱曲线。图 4(c) 中的小图为圆圈中三种荧光珠各自的荧光光谱。

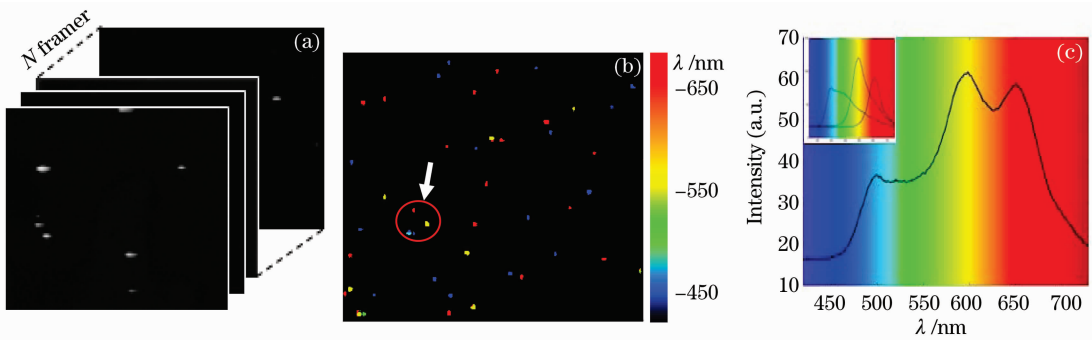


图 4 多色荧光珠的实验结果

Fig. 4 Experimental results of multi-color fluorescent beads

最后,利用 SR-MMM 系统,对两种植物样品进行了实验,振镜扫描的频率为 500 Hz,CCD 的曝光时间为 300 ms,样品台的步进长度为  $1 \mu\text{m}$ ,扫描总步数

为 44,成像区域为  $176 \mu\text{m} \times 176 \mu\text{m}$ 。图 5 所示为染色的铃兰根茎样片多光谱分辨荧光图像,对应的中心波长分别为 570,595 和 650 nm。

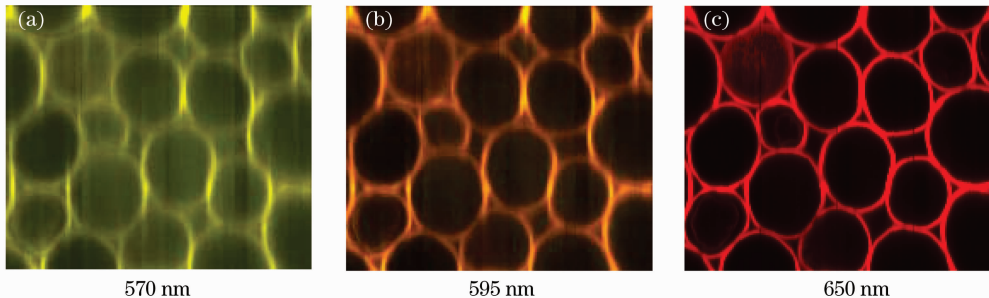


图 5 铃兰根茎样片的光谱分辨多光子激发荧光显微图像

Fig. 5 Spectrally resolved multiphoton excitation fluorescence images of a Lily sample slide

图 6 所示是花粉颗粒的自体荧光成像结果。图 6(a)是样品的双光子激发自体荧光显微图像,图 6(b)是图 6(a)中圆圈区域内的荧光光谱。实验

中,每幅原始图像的采集时间为 0.5 s,因此在 22 s 内即可获得样品在 450~700 nm 范围内的全部光谱信息。

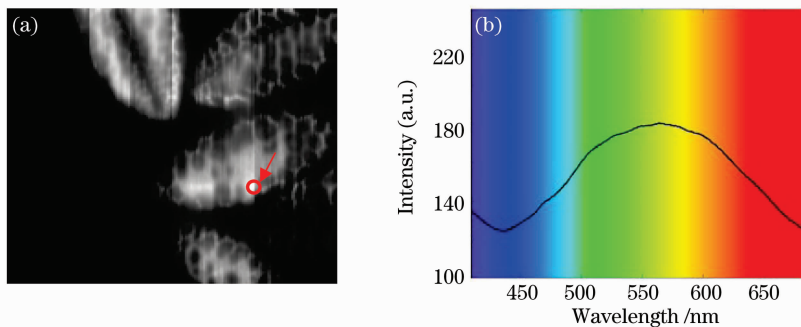


图 6 花粉颗粒自体荧光显微图像(a)及光谱曲线(b)

Fig. 6 Autofluorescence image of pollen grain sample (a) and the spectrum (b)

## 4 结 论

本文的研究目标是为多色标记成像、FRET 以及荧光比率测量等生物学研究,发展一种能够快速获取样品三维空间光谱信息的多光子激发荧光显微测量和成像技术。所研究的 SR-MMM 技术采用棱镜分光,可获得样品的连续谱,结合拟合算法,比采

用干涉滤光片分光更有利于解决光谱重叠问题。SR-MMM 利用多个扫描线对样品并行激发,成像速度快。另外,由于每条扫描线中相邻点之间存在时间延迟,从而消除了常用柱透镜聚焦时产生的线光源相邻点间的干扰,提高了成像对比度和空间分辨率。由于采用振镜扫描时,存在转折静止点,限制

了扫描速度,如果采用多面体转镜,将大幅提高扫描速度。另外,在本系统中采用了普通的 CCD 相机,灵敏度低,为了记录到足够强的荧光信号,增加了曝光时间。在以后的工作中,采用高灵敏度的快速 CCD 相机,可大幅度提高成像速度,结合高发光效率的荧光分子,能够实现视频级的多光谱分辨 MMM 成像。在本实验中,样品上激发光斑的大小和相邻点之间的间距分别为 0.63 和 44  $\mu\text{m}$ ,通过优化光路设计,光学分辨率可进一步提高。

### 参 考 文 献

- 1 Pawley James B. (eds) Handbook of Biological Confocal Microscopy[M]. 2nd Edition, New York: Plenum Press, 1995. 445
- 2 S. W. Hell, K. Bahlmann, M. Schrader *et al.*. Three-photon excitation in fluorescence microscopy[J]. *J. Biomed. Opt.*, 1996, **1**(1): 71~74
- 3 E. Stelzer, S. Hell, S. Lindek *et al.*. Nonlinear absorption extends confocal fluorescence microscopy into the ultra-violet regime and confines the illumination volume[J]. *Opt. Commun.*, 1994, **104**(4-6): 223~228
- 4 Gong Hui, Luo Qingming, Zeng Shaoqun *et al.*. Measuring methods for optical properties of tissue and applications in medicine[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 1999, **8**(1): 12~15  
龚 辉, 骆清铭, 曾绍群等. 生物组织光学特性的测量方法及医学应用[J]. *激光生物学报*, 1999, **8**(1): 12~15
- 5 Lu Qiang, Zeng Shaoqun, Luo Qingming *et al.*. Monte carlo simulation for MPE fluorescence microscopy in turbid media[J]. *Acta Optica Sinica*, 2001, **21**(9): 1073~1078  
鲁 强, 曾绍群, 骆清铭等. 混浊介质多光子激发荧光显微成像的蒙特卡罗模拟[J]. *光学学报*, 2001, **21**(9): 1073~1078
- 6 王建岗, 金国藩, 何庆声等. 超短脉冲激光在生物组织的路径理论和一种新成像方法[J]. *激光与光电子学进展*, 2001, **38**(9): 43
- 7 Yu Yanhua, Xing Da. The laser confocal scanning microscope and its applications in biology and medicine[J]. *Laser Journal*, 1999, **20**(6): 35~38  
于彦华, 邢 达. 激光共焦扫描显微镜及其在生物医学中的应用[J]. *激光杂志*, 1999, **20**(6): 35~38
- 8 X. H. Zeng, J. Plain, S. Jradi *et al.*. High speed sub-micrometric microscopy using optical polymer microlens [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2009, **7**(10): 901~903
- 9 S. Zeng, K. Bi, S. Xue *et al.*. Acousto-optic modulator system for femtosecond laser pulses [J]. *Review of Scientific Instruments*, 2007, **78**: 15103
- 10 S. Zeng, X. Lü, C. Zhan *et al.*. Simultaneous compensation for spatial and temporal dispersion of acousto-optical deflectors for two-dimensional scanning with a single prism[J]. *Opt. Lett.*, 2006, **31**(8): 1091~1093
- 11 G. J. Brakenhoff, J. Squier, T. Norris *et al.*. Real-time two-photon confocal microscopy using a femtosecond, amplified Ti:sapphire system[J]. *J. Microscopy*, 1996, **181**(3): 253~259
- 12 曾绍群, 骆清铭. 飞秒激光的无惯性扫描与显微成像[J]. *激光与光电子学进展*, 2008, **45**(2): 25
- 13 J. Bewersdorf, R. Pick, S. W. Hell. Multifocal multiphoton microscopy[J]. *Opt. Lett.*, 1998, **23**(9): 655~657
- 14 M. Straub, S. W. Hell. Multifocal multiphoton microscopy: a fast and efficient tool for 3-D fluorescence imaging [J]. *Bioimaging*, 1998, **6**(4): 177~185
- 15 Shao Yonghong, He Yonghong, Ma Hui *et al.*. Carotenoid levels measured by resonance Raman in vivo[J]. *Spectrum and Spectrum Analysis*, 2007, **27**(11): 2258~2261  
邵永红, 何永红, 马 辉等. 共振拉曼光谱在体测量类胡萝卜素含量[J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, **27**(11): 2258~2261
- 16 Q. Fang, T. Papaioannou, Javier A. *et al.*. Time-domain laser-induced fluorescence spectroscopy apparatus for clinical diagnostics[J]. *Rev. Sci. Instrum.*, 2004, **75**(1): 151~162
- 17 L. Liu, J. Qu, Z. Lin *et al.*. Simultaneous time and spectrum-resolved multifocal multiphoton microscopy[J]. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, 2006, **84**(3): 379~383
- 18 A. D. Hoppe, S. L. Shorte, J. A. Swanson *et al.*. Three-dimensional FRET reconstruction microscopy for analysis of dynamic molecular interactions in live cells[J]. *Biophysical J.*, 2008, **95**(1): 400~418
- 19 R. E. Pagano, O. C. Martin, H. C. Kang *et al.*. A novel fluorescent ceramide analogue for studying membrane traffic in animal cells; accumulation at the Golgi apparatus results in altered spectral properties of the sphingolipid precursor[J]. *J. Cell Biology*, 1991, **113**(6): 1267~1279
- 20 A. Charruyer, S. M. Bell, M. Kawano *et al.*. Decreased ceramide transport protein (CERT) function alters sphingomyelin production following UVB Irradiation [J]. *J. Biological Chemistry*, 2008, **283**(24): 16682~16692