

基于扫描相机的时域荧光寿命测量及分析

王 岩 李 恒 齐 璟 邵永红 屈军乐 牛憨笨

(深圳大学光电工程学院光电子器件与系统(教育部/广东省)重点实验室, 广东 深圳 518060)

摘要 提出一种利用高斯函数来表征基于扫描相机的时域荧光测量系统脉冲响应的方法,建立了数学模型,用以描述系统所采集到的时域荧光衰减曲线。用高斯函数对所建立的时域荧光寿命测量系统的脉冲响应函数进行拟合处理,拟合优度达到 0.995 以上;利用所建立的数学模型对标准荧光染料玫瑰红的测量数据进行拟合处理,拟合优度均值达到 0.996 以上,荧光寿命标准差仅有 1.7 ps。实验表明,利用所建立的数学模型处理基于扫描相机的时域荧光寿命测量数据,具有良好的稳定性和准确性。这种方法提高了系统测量的精度,简化了解卷积运算,只要用多个高斯函数描述脉冲响应函数就可以用于其他时域荧光寿命分析及荧光寿命成像技术中。

关键词 测量;扫描相机;荧光寿命;最小二乘法;数据拟合

中图分类号 TB872;Q-334;Q631

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201138.s108001

Time-Domain Fluorescence Lifetime Measurement and Analysis Using a Streak Camera

Wang Yan Li Heng Qi Jing Shao Yonghong Qu Junle Niu Hanben

(Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education & Guangdong Province, Shenzhen University, College of Optoelectronic Engineering, Shenzhen, Guangdong 518060, China)

Abstract A method which describes the impulse response function of the fluorescence lifetime measurement system that based on a streak camera using Gaussian function is presented, and a mathematical model which is used to fit the fluorescence decay curves in time-domain is established. The data of the impulse response function of the time-domain fluorescence lifetime measurement system built using the Gaussian function are fit. The goodness of the fitting is greater than 0.995. The fluorescence lifetime of the standard fluorescent dye Rose Bengal is measured and the data using the mathematical model are fit. The average goodness of fitting is greater than 0.996 and the standard deviation of lifetime is only 1.7 ps. Experimental results show that the mathematical model is reliable and accurate in processing the time-domain signal obtained by fluorescence lifetime measurement system that is based on a streak camera. The method presented simplifies the deconvolution calculation, improves the precision of lifetime measurement and can be used to process time-domain signals obtained by other systems.

Key words measurement; streak camera; fluorescence lifetime; least-square method; data-fitting

OCIS codes 040.1490; 260.2510

1 引 言

荧光寿命成像 (FLIM) 是近年来发展起来的一种新型生物医学成像技术。荧光寿命是荧光分子在激发态的平均滞留的时间,它是处于特定环境条件下的荧光分子所有的固有特性,其测量不受激发光

强度、荧光分子的浓度和光漂白等因素的影响,而只与荧光分子所处的微环境有关^[1,2],因此荧光寿命的测量和成像可用于对细胞内微环境中的许多生物物理、生物化学参数如 pH 值^[3,4]、离子浓度(如 Ca^{2+} 、 K^{+} 等)^[5,6]、氧压^[6,7]、溶液疏水性及猝灭剂^[8]

收稿日期: 2011-03-21; 收到修改稿日期: 2011-03-29

基金项目: 国家自然科学基金(60627003, 61078067)和深圳市科技研发资金(JC201005250032A, ZYC200903250207A, ZYC200903250199A)资助课题。

作者简介: 王 岩(1986—),男,硕士研究生,主要从事生物医学光子学方面的研究。E-mail: hero-39@163.com

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

E-mail: jlqu@szu.edu.cn(通信联系人)

(如碘化物、丙烯酰胺)等的分布进行定量测量。

荧光寿命的测量方法有两种,即时域法和频域法。由于频域法在测量多组分荧光寿命时具有一定的局限性,近年来,随着超快激光技术和探测手段的不断发展,目前使用较多的是时域法。常见的时域法有时间相关单光子计数技术(TCSPC)^[9]和扫描相机测量法^[10]。其中,扫描相机测量法具有皮秒级的时间分辨率,而且灵敏度高、采集速度快。目前,基于扫描相机的荧光寿命成像技术已成为研究活细胞内蛋白质分子之间相互作用以及细胞微环境变化的重要工具^[10~12]。

利用扫描相机所采集到的信号是荧光强度随时间变化的,但是这个结果并不能真实地反映荧光强度的衰减规律,也就无法通过数据拟合求出真正的荧光寿命。假设测量系统和荧光发射均为线性系统,实际测量得到的曲线则是激发光脉冲、系统响应函数与实际的荧光衰减曲线三者卷积的结果。所以,通常情况下,为了还原出真实的荧光衰减曲线,需要对信号进行解卷积处理。同时,由于某些样品对入射激光有散射作用,也会影响到最终的测量结果,对此也需要用一定的方法进行处理。

常见的解卷积方法包括:最小二乘法、调制函数法、傅里叶变换法、Laplace法和矩量法等。其中最小二乘法预先设定系统的脉冲响应函数,与理论的衰减函数卷积后,再对数据进行拟合。根据文献报道^[13],最小二乘法和调制函数法在双组分拟合中表现较好,而最小二乘法在信号畸变严重的情况下得到的结果最为满意。此外,在实验中发现,基于扫描相机测量系统的脉冲响应函数非常稳定,因而可以预设一个固定的脉冲响应函数。这样,在利用最小二乘法解卷积并拟合时,并不会增加拟合变量。因此,选择最小二乘法解卷积能够提供较高的精度,并且可以简化解卷积的运算。

在对所建立的基于扫描相机的荧光寿命测量系统研究的基础上^[10],本文提出了用于描述该系统脉冲响应函数的数学表达式,并将该表达式与散射效应结合,推导出适用于该系统的荧光寿命分析的拟合表达式。对实际测量到的荧光衰减数据进行处理,验证了算法的精度。

2 公式推导

对于单组分样品,其荧光强度的衰减在理论上可用单指数函数表示为

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau), \quad (1)$$

式中 $I(t)$ 是样品在受到光脉冲激发后 t 时刻的荧光强度, I_0 是 $t = 0$ 时的荧光强度, τ 为荧光分子的荧光寿命,也就是荧光强度衰减到初始值 I_0 的 $1/e$ 时所需要的时间。如果样品是多组分的,则其荧光强度一般可用单指数函数的和表示为

$$I(t) = \sum_{i=1}^n a_i \exp(-t/\tau_i), \quad (2)$$

式中 n 是样品的组分数, τ_i 为第 i 种组分的荧光寿命。

利用扫描相机测量荧光寿命时,要用皮秒或飞秒激光脉冲作为光源激发样品。由于系统响应时间的影响,所采集到的信号是系统的脉冲响应函数与实际的荧光强度曲线的卷积^[14],即

$$F(t) = G(t) \otimes I(t), \quad (3)$$

式中 $G(t)$ 是系统的脉冲响应函数。在实际测量时,脉冲响应函数是由系统的响应速度与激光脉冲形状共同决定的,可以通过实验测量。通过对所建立的基于扫描相机的荧光寿命测量系统^[10]的实际观测和研究,发现其脉冲响应函数可以近似用高斯函数表达为

$$G(t) = A \exp\left(\frac{t-b}{c}\right)^2, \quad (4)$$

式中的 A 、 b 和 c 是系统脉冲响应函数 $G(t)$ 中的参量, b 表示的是系统响应的初始时刻。

如果样品对激发光有散射,那么最终得到的信号还需要加上散射的影响。由于样品发生散射的时间相对于荧光寿命来说非常短,可以忽略不计,因此,散射也可以看作是系统对光脉冲的响应。所以在加入散射效应后,荧光衰减曲线的公式变为^[15]

$$F(t) = G(t) \otimes I(t) + CG(t), \quad (5)$$

式中 C 是散射系数,它表示样品中散射光和激发光强度之比。

(5)式整理后可得:

$$F(t) = \sum_{i=1}^n a_i A c \exp\left(-\frac{4\tau_i t - c^2 - 4b\tau_i}{4\tau_i^2}\right) \cdot \left[\frac{\sqrt{\pi}}{2} + \frac{\sqrt{\pi}}{2} \operatorname{erf}\left(\frac{2\tau_i - c^2 - 2\tau_i b}{2\tau_i c}\right)\right] + CA \exp\left(\frac{t-b}{c}\right)^2, \quad (6)$$

式中,考虑到背景噪声的影响,还需要增加一个参量 f_{offset} 作为修正,修正之后的公式变为

$$F(t) = \sum_{i=1}^n a_i A c \exp\left(-\frac{4\tau_i t - c^2 - 4b\tau_i}{4\tau_i^2}\right) \cdot \left[\frac{\sqrt{\pi}}{2} + \frac{\sqrt{\pi}}{2} \operatorname{erf}\left(\frac{2\tau_i - c^2 - 2\tau_i b}{2\tau_i c}\right)\right] +$$

$$CA \exp\left(\frac{t-b}{c}\right)^2 + f_{\text{offset}}, \quad (7)$$

式中 $F(t)$ 是系统所记录到的荧光强度随时间的变化函数, a_i, τ_i, b, C 和 f_{offset} 等是待定的系数, a_i 是第 i 种组分的初始荧光强度, f_{offset} 系统的背景噪声强度. 对于参量 A 而言, 如果令:

$$f_{\text{offset}} = Af'_{\text{offset}}, \quad (8)$$

那么(7)式变为

$$F(t) = A \left\{ \sum_{i=1}^n a_i c \exp\left(-\frac{4\tau_i t - c^2 - 4b\tau_i}{4\tau_i^2}\right) \cdot \left[\frac{\sqrt{\pi}}{2} + \frac{\sqrt{\pi}}{2} \operatorname{erf}\left(\frac{2\tau_i - c^2 - 2\tau_i b}{2\tau_i c}\right) \right] + C \exp\left(\frac{t-b}{c}\right)^2 + f'_{\text{offset}} \right\}. \quad (9)$$

从(9)式可以看到, A 值不同只会使 a_i 的值成比例变化, 并不影响其他任何参数, 而最终关心的值是各组强度占总强度的比例, 即

$$I_k = \left(a_k / \sum_{i=1}^n a_i \right) \times 100\%. \quad (10)$$

因而 a_i 成比例放大或缩小不会影响最终的处理结果, 所以(9)式可简化为

$$F(t) = \sum_{i=1}^n a_i c \exp\left(-\frac{4\tau_i t - c^2 - 4b\tau_i}{4\tau_i^2}\right) \cdot \left[\frac{\sqrt{\pi}}{2} + \frac{\sqrt{\pi}}{2} \operatorname{erf}\left(\frac{2\tau_i - c^2 - 2\tau_i b}{2\tau_i c}\right) \right] + C \exp\left(\frac{t-b}{c}\right)^2 + f'_{\text{offset}}. \quad (11)$$

值得注意的是, 当把脉冲响应函数 $G(t)$ 中的 A 消除之后, c 就变成了拟合公式中唯一的一个与脉冲响应函数相关的参量, 这个参量可以通过实验测得。

表 1 脉冲响应函数的拟合

Table 1 Fitting of impulse response function fitting

Time	1	2	3	4	5	6	7
First	0.9975	0.9975	0.9987	0.9985	0.9969	0.9961	0.9975
Second	0.9979	0.9980	0.9980	0.9980	0.9981	0.9970	0.9977
Third	0.9974	0.9972	0.9978	0.9971	0.9975	0.9961	0.9970

从表 1 可以看出, 所有的拟合优度都大于 0.995, 每组测量结果的最大偏差小于 0.003, 所有测量结果的最大偏差小于 0.0034, 从而证明了利用高斯函数描述所建立的基于扫描相机的荧光寿命测量系统的脉冲响应函数, 具有很高的精度和稳定性。

3.2 荧光寿命测量数据处理

3.2.1 样品制备

将比色皿放入王水溶液中浸泡 3~5 min, 经去离子水冲洗后使用风机风干。用经去离子水清洗风

3 实 验

3.1 系统脉冲响应函数的测量

3.1.1 实验系统

用于测量系统脉冲响应函数的实验系统如图 1 所示。钛宝石锁模飞秒激光器的输出波长为 800 nm, 激光脉冲经过 30/70 分束镜后, 一部分送入光电探测器(PIN), 用于触发扫描电路, 另一部分进入到标准具, 产生脉冲序列。标准具的腔长为 20 mm, 前反射面对 800 nm 光的反射率为 50%, 后反射面为全反射, 即反射率为 100%, 前、后反射面平行。这样, 进入标准具的激光脉冲在标准具的前后面之间多次反射后, 输出一个强度依次递减 50% 的激光脉冲序列, 经过 50/50 分束镜后送入扫描相机, 并成像到扫描相机的光电阴极上。调节扫描相机的电路延迟, 当触发脉冲和标准具输出的激光脉冲同步时, 就可以在扫描相机的荧光屏上得到强度逐次衰减的光脉冲的扫描图像, 进而得到系统的脉冲响应函数。

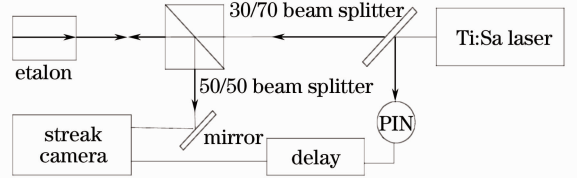


图 1 用于测量系统脉冲响应函数的实验系统
Fig.1 Experimental setup for measuring the system impulse response function

3.1.2 实验结果

实验中采集了 7 组数据, 分 3 次提取脉冲响应函数。分别用(4)式对所测量到的脉冲响应函数进行拟合, 并对拟合优度。所得到的实验结果如表 1 所示。

干的样品勺, 取少量玫瑰红染料放入比色皿中, 加适量去离子水振荡混合均匀, 用封口膜密封后放置在 5 °C 冰箱中避光保存。

3.2.2 实验系统

所建立的基于扫描相机的荧光寿命测量系统如图 2 所示。该系统采用钛宝石激光器作为激发光源, 其所输出的 800 nm 的激光脉冲, 经过 30/70 分束镜后被分为触发光束和激发光束, 触发光束送入 PIN 用以触发扫描相机的扫描电路, 激发光束经双

色镜反射后,被物镜聚焦到样品上,也就是用比色皿盛放的染料中,用于实现对样品的双光子激发。样品所发出的荧光,经物镜收集,透过双色镜成像到扫描相机的狭缝上。调节扫描相机系统的电路延迟,当荧光信号和扫描信号同步时,可在扫描相机的荧光屏上得到荧光信号的扫描图像,沿扫描方向所画出的曲线,就是利用系统所测得的荧光强度衰减曲线,它是实际的荧光信号与系统响应函数的卷积,另外还包括散射和背景信号。

3.2.3 实验结果

利用图2所示的系统,对染料溶液进行了10次

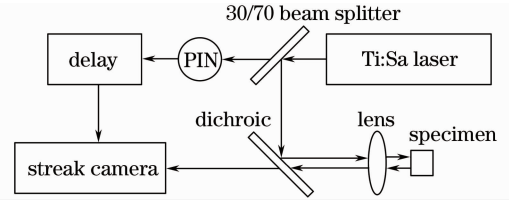


图 2 基于扫描相机的荧光寿命测量系统
Fig.2 Fluorescence lifetime measurement system based on a streak camera

测量,然后用(11)式,对所测量得到的荧光衰减曲线进行最小二乘法拟合,结果如表 2 所示。

表 2 玫瑰红溶液的荧光衰减曲线拟合结果

Table 2 Fitting result of Rose Bengal fluorescence decay curve

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mean value	Std err
τ /ps	533	534	534	536.47	536	534	534	531	531	533	534	1.7
Goodness of fitting	0.9963	0.9962	0.9954	0.9967	0.9967	0.9967	0.9953	0.9962	0.9962	0.9960	0.9962	0.0005

从表 2 可以看出,每次测量的拟合优度(可决系数)都接近于 1,大于 0.995,平均值达到 0.996,拟合效果非常好。同时可以看出,10 次测量结果的标准差只有 1.7 ps,不仅证明系统具有很高的稳定性,同时也证明利用所推导出的(11)式描述系统所测量到的荧光衰减曲线具有较高的准确性。

4 结 论

建立了基于扫描相机的荧光寿命测量系统,在对该系统进行实验研究的基础上,提出一种利用高斯函数来描述系统的脉冲响应方法。考虑到实验中散射以及背景光对测量以及拟合结果的影响,推导并简化了用以对测量数据拟合的数学模型。测量了系统的脉冲响应函数,以及标准染料玫瑰红溶液的荧光寿命,利用所建立的数学模型对实验数据进行了处理和分析。实验结果证明,本文所提出的数学模型可以很好地描述影响系统实验结果的各个因素。利用该模型对实验数据进行处理具有较高的稳定性和准确度。该方法简化了解卷积运算,可用于时域荧光寿命的测量及分析。同时,运用几个高斯函数的和与差就可以描述复杂的脉冲响应函数,这也使得该方法可以拓展到其他时域荧光寿命分析及成像技术中。

参 考 文 献

1 K. Suhling, P. M. W. French, D. Phillips. Time-resolved fluorescence microscopy[J]. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2005, **4**(1): 13~22
2 H. Wallrabe, A. Periasamy. Imaging protein molecules using

FRET and FLIM microscopy [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, **16**(1): 19~27
3 H. J. Lin, P. Herman, J. S. Kang *et al.*. Fluorescence lifetime characterization of novel low-pH probes [J]. *Analytical Biochemistry*, 2001, **294**(2): 118~125
4 T. Nakabayashi, H. P. Wang, M. Kinjo *et al.*. Application of fluorescence lifetime imaging of enhanced green fluorescent protein to intracellular pH measurements[J]. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 2008, **7**(6): 668
5 A. Celli, S. Sanchez, M. Behne *et al.*. The epidermal Ca²⁺ gradient: measurement using the phasor representation of fluorescent lifetime imaging [J]. *Biophysical Journal*, 2010, **98**(5): 911~921
6 R. Cubeddu, D. Comelli, C. D' Andrea *et al.*. Time-resolved fluorescence imaging in biology and medicine[J]. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2002, **35**(9): R61~R76
7 T. Nakabayashi, I. Nagao, M. Kinjo *et al.*. Stress-induced environmental changes in a single cell as revealed by fluorescence lifetime imaging[J]. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2008, **7**(6): 671-674
8 Jr. T. W. J. Gadella, R. M. Clegg, T. M. Jovin. Fluorescence lifetime imaging microscopy: pixel-by-pixel analysis of phase-modulation data [J]. *Bioimaging*, 1994, **2**(3): 139~159
9 W. Becker, A. Bergmann, K. Koenig *et al.*. Picosecond fluorescence lifetime microscopy by TCSPC imaging[C]. *SPIE*, 2001, 19~27
10 Liu Lixin, Qu Junle, Lin Ziyang *et al.*. A high rate picosecond streak camera for two-photon excited fluorescence lifetime microscopic imaging [J]. *Acta Optica Sinica*, 2006, **26**(3): 373~378
刘立新, 屈军乐, 林子扬 等. 用于双光子激发荧光寿命显微成像的高重复频率皮秒扫描相机[J]. *光学学报*, 2006, **26**(3): 373~378
11 R. V. Krishnan, H. Saitoh, H. Terada *et al.*. Development of a multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy system using a streak camera[J]. *Review of Scientific Instruments*, 2003, **74**(5): 2714~2721
12 Wang Yan, Zhao Lingling, Chen Tongsheng *et al.*. Study on cell

- cycle using fluorescence lifetime imaging microscopic system based on a streak camera[J]. *Chinese J. Lasers*, 2011, **38**(3): 0304002
- 王 岩, 赵羚伶, 陈同生等. 利用基于扫描相机的荧光寿命成像显微技术研究细胞周期[J]. *中国激光*, 2011, **38**(3): 0304002
- 13 D. V. O'Connor, W. R. Ware, J. C. Andre. Deconvolution of fluorescence decay curves. A critical comparison of techniques [J]. *Journal of Physical Chemistry*, 1979, **83**(10): 1333~1343
- 14 U. P. Wild, A. R. Holzwarth, H. P. Good. Measurement and analysis of fluorescence decay curves[J]. *Review of Scientific Instruments*, 1977, **48**(12): 1621~1627
- 15 J. Martinho, L. S. Egan, M. A. Winnik. Analysis of the scattered light component in distorted fluorescence decay profiles using a modified delta function convolution method [J]. *Analytical Chemistry*, 1987, **59**(6): 861~864

栏目编辑: 韩 峰