

四路频分复用荧光共焦显微探测系统实验研究

唐平玉 郑继红 孙国强 张梦华 郭彩虹 庄松林

(上海理工大学光电信息与计算机工程学院教育部光学仪器与系统工程研究中心,
上海市现代光学系统重点实验室, 上海 200093)

摘要 报道了采用全息聚合物分散液晶(H-PDLC)布拉格光栅阵列斩波调制的四通道频分复用荧光共焦显微探测系统的实验研究。通过高衍射率 H-PDLC 布拉格光栅将单束激光分成四束激发光并进行不同频率的载频调制,将激发光聚焦到生物样品上产生荧光信号并采集后,再通过傅里叶变换、滤波和解调,最后将采集到的信号还原成四路荧光信号强度随时间变化的曲线。实验搭建了激发光中心波长为 405 nm 的四路频分复用荧光探测系统,并成功探测到鼠神经海马细胞样品中激发的四点荧光信号的图像以及强度变化信息。

关键词 显微;共焦显微;频分复用;荧光信号;细胞探测;布拉格光栅

中图分类号 Q336;Q438 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL201239.1106003

Experimental Study of Four-Channel Frequency Division Multiplexed Fluorescence Confocal Microscopy

Tang Pingyu Zheng Jihong Sun Guoqiang Zhang Menghua
Guo Caihong Zhuang Songlin

(Engineering Research Center of Optical Instrument and System, Ministry of Education, Shanghai Key Laboratory of Modern Optical System, School of Optical-Electrical and Computer Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract We report an experimental study of four-channel frequency division multiplexed fluorescence confocal microscopy (FDMFCM) detection system modulated by holographic polymer dispersed liquid crystal (H-PDLC) Bragg grating array chopper. In the system, fluorescence signal is excited by the exciting light focused on the biological sample, and then is detected. Fourier transform, filtration and demodulation are then carried out to restore the fluorescence signal with a curve of four-channel fluorescence signal intensity versus time. The four-channel FDMFCM system is experimentally set up with 405 nm laser as the excitation light, and the image and intensity information of the fluorescence signal, which are excited from the mouse neural hippocampus cell sample, are successfully detected.

Key words microscopy; confocal microscopy; frequency division multiplexing; fluorescence signal; cell detection; Bragg grating

OCIS codes 180.1790; 180.2520; 120.1880; 110.2970; 110.0180

1 引言

20 世纪 60 年代 Minsky^[1] 在其专利中首次阐述了共焦显微技术的基本原理。1984 年出现了第一台激光扫描共焦显微镜实用产品,真正实现了三

维立体成像^[2,3],共焦扫描显微镜也就逐渐成为生物学、医学研究等领域一种非常重要的工具。此后,在共焦扫描显微镜的基础上,经过不断地发展和改进,各类新型共焦显微镜相继出现^[4~8],其分辨率和

收稿日期: 2012-06-26; 收到修改稿日期: 2012-07-19

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(60801041),上海市科技启明星项目(10QA1405100),上海理工大学研究生创新基金项目(JWCXSL12020)和上海市重点学科项目第三期项目(S30502)资助课题。

作者简介: 唐平玉(1984—),男,硕士研究生,主要从事材料及其应用等方面的研究。E-mail: pingyutang021@126.com

导师简介: 郑继红(1975—),女,副教授,硕士生导师,主要从事聚合物分散液晶材料及电光器件、信息光学等方面的研究。E-mail: jihongzheng2002@yahoo.com.cn(通信联系人)

反应速度相比之前的显微镜都有很大的提高。近两年来,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^[9]、共焦显微系统中光学超分辨光瞳滤波器的设计^[10]、具有自适应成像功能的荧光显微内窥术^[11]等研究对国内在显微技术领域的提升有着突出贡献。其中,在波分复用共焦成像概念^[12]的基础上,2006年又诞生了多点并行频分复用荧光共焦显微探测的概念——利用频分复用技术和荧光共焦技术的结合实现多点并行快速多通道实时细胞探测^[13]。双路频分复用显微成像系统是最简单易行的实现系统,初步构建的实验系统表明了其具有空间和时间分辨率高、图像信噪比高并且双通道并行调制和解调等优点^[14,15]。但是,已报道的双路频分复用荧光共焦显微(FDMFCM)系统仍然存在两个明显的不足之处:一是通道数目少,对提高共焦扫描探测速度作用不大;二是采用机械斩波调制器件,系统体积庞大,机械振动噪音大。

为了克服双路系统的不足,有效扩大通道数目,在大量实验研究全息聚合物分散液晶(H-PDLC)电控光栅斩波器性能的基础上^[16,17],设计并构建了以电控 H-PDLC 斩波阵列调制的四路频分复用共焦探测系统,实现了对鼠神经细胞的四点共焦并行探测,减小了系统体积,消除了机械噪音,并有效提升了系统探测速率,改善了系统探测能力。

2 基本原理

多路频分复用荧光共焦显微技术的基本思路就是将单束激光分为多路,并通过光斩波器调制为不同的载波频率。为了在解调的时候能够方便地将多路荧光信号区分开,防止多路信号相互重叠,两个相邻信号的载波频率及它们的差必须要大于或等于荧光信号最高频率的两倍,即满足抽样定理。这样多点激光聚焦在生物样品上产生多点荧光,所反射的荧光也具有相应的调制频率,再将反射荧光信号收集输入单像素高敏感光电倍增管(PMT),通过傅里叶变换实现荧光信号的解调制,以区分各点的荧光发射情况,从得到的荧光信号信息中可了解生物细胞的相关信息。四路频分复用荧光共焦显微系统就是按照四通道分光设计,通过采用快速电控 H-PDLC 光栅阵列的分光和调制实现对生物样品细胞四个通道的并行探测与成像。通常的点共焦扫描探测系统是逐点扫描,在时间上,每次都只能得到某个探测点荧光点强度随时间变化的一根曲线。而本文所提的四路系统能够同时探测四根曲线,通过同一

个 PMT 探测器件解调出四个点的变化情况曲线,因此,原理上探测速度将提高四倍。该系统能够为生物细胞信息的实时多路并行探测提供一种更为高速的手段和方法。

3 H-PDLC 阵列式光斩波器的设计与制作

在四路频分复用荧光共焦显微镜系统中,高性能的集成式斩波调制器件是关键。如延续双路系统的设计,从二通道到四通道至少需要 2 个分光棱镜和 2 个机械斩光调制器,这不仅增加了系统体积,也给后续的共焦部分的实现带来技术困难。为此,设计了集分光和调制于一体的基于 H-PDLC 布拉格光栅的四通道阵列式斩波器,其结构如图 1 所示。

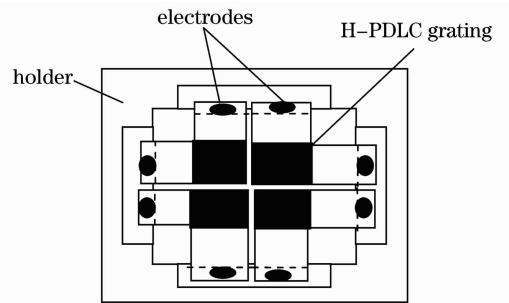


图 1 H-PDLC 光栅组合成的 2×2 光斩波器阵列结构图

Fig. 1 Structure diagram of the 2×2 optical chopper array combined by H-PDLC gratings

该斩波器由四片 H-PDLC 布拉格光栅按照 2×2 排列方式组合成一个阵列式结构,固定在一个专门制作的有机玻璃架上,支架是由四个相同的部分组成的整体,但又不是绝对固定的,每个部分都可以根据需要灵活调节对应光栅的布拉格角度,而且还通过铜片电极给 H-PDLC 供电。斩波器中的 H-PDLC 布拉格光栅采用聚合物分散液晶全息材料,在 532 nm 激光的全息干涉光场中曝光,其中光场中光源功率约为 107 mW,曝光光斑半径约为 1 cm,平均光功率密度约为 34 mW/cm^2 ,曝光时间为 50 s,光栅空间频率为 1000 lp/mm。H-PDLC 光栅在 He-Ne 激光下有 85% 以上的高衍射效率;系统中采用的是光栅的一级布拉格衍射光,传播方向是一致的,这样斩波器就可以将单束原激光分成四束光,起到了分光作用;同时通过施加一定波形和频率的驱动电压对其进行调制,实现四通道的分频调制。集成式结构将分光和载波调制集成到同一个器件上,既缩小了整个系统的体积,也消除了机械噪音的干扰。

4 四路频分复用荧光共焦实验系统的构建

所搭建四路频分复用荧光共焦显微系统图如图 2 所示。激发光源采用了紫外 (UV) 波段的 405 nm 半导体准直激光器 (Dream Laser 公司, 功率为 60 mW), 激发激光经过准直扩束后得到直径约为 20 mm 的平行光束, 照射在 H-PDLC 集成斩光器上分成四束光, 同时借助驱动电路驱动对每束光进行不同频率的调制。被调制的四束光以 H-PDLC 光栅的一级布拉格衍射角平行出射, 再经共焦的两个透镜 (Lens1 焦距为 120 mm, 孔径为 70 mm, Lens2 焦距为 50 mm, 孔径为 30 mm) 将四束光的光斑直径缩小到可以通过二向色镜组的通光口径; 光

斑直径缩小后的激发激光信号通过 UV 波段二向色镜组 (激发激光为紫外到紫光光源, 滤出荧光为 520~540 nm 的绿色荧光), 再通过无限远显微物镜 [数值孔径 (NA) 为 0.65, 50 倍] 会聚到生物样品上形成四点荧光。样品所激发出的绿色荧光经显微物镜收集后经二向色镜组的滤光, 由分光棱镜 (BS) 分成两部分, 一部分经过成像物镜, 所成的像被 CCD 摄像头接收, 另外一部分荧光信号经耦合聚焦进入多模光纤 (其纤芯直径为 50 μm), 相当于小孔的共焦作用, 再输入高敏感 PMT (北京滨松光子, 型号为 CR186)。PMT 探测后的信号经模数 (A/D) 转换, 输入电脑并采集和处理数据, 解调后得到四路荧光信号强度随时间变化关系图。

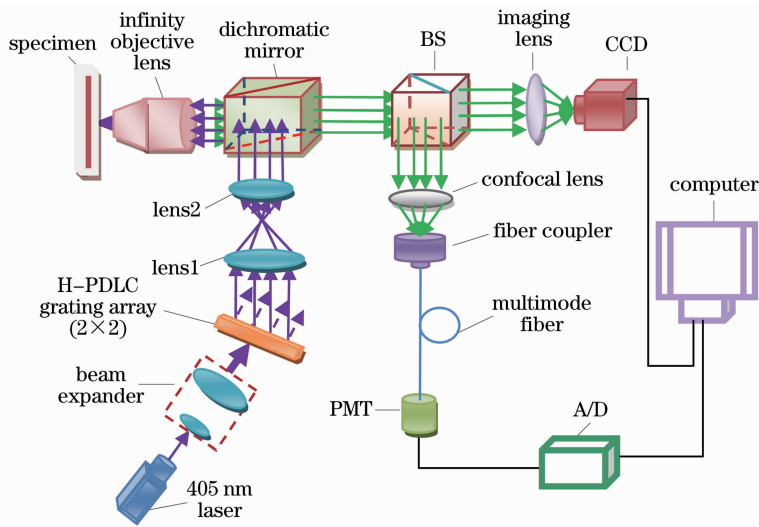


图 2 四路频分复用荧光共焦显微系统的原理光路图

Fig. 2 Optical system of four-channel FDMFCM

在该系统中, PMT 检测到的实际强度是四个荧光点所发出的并进入 PMT 的荧光光照强度之和。假设荧光光照强度作为时间函数的四个点分别为 $f_1(t)$ 、 $f_2(t)$ 、 $f_3(t)$ 、 $f_4(t)$, 通过调制后单路荧光光照强度分别为 $f_1(t)\cos(\omega_1 t)$ 、 $f_2(t)\cos(\omega_2 t)$ 、 $f_3(t)\cos(\omega_3 t)$ 、 $f_4(t)\cos(\omega_4 t)$ 。这样 PMT 检测的强度信号 $s(t)$ 可记为

$$s(t) = f_1(t)\cos(\omega_1 t) + f_2(t)\cos(\omega_2 t) + f_3(t)\cos(\omega_3 t) + f_4(t)\cos(\omega_4 t), \quad (1)$$

信号 $s(t)$ 对应在频域上可表示为

$$S(\omega) = F_1(\omega - \omega_1) + F_2(\omega - \omega_2) + F_3(\omega - \omega_3) + F_4(\omega - \omega_4). \quad (2)$$

实验系统中, PMT 接收的信号经放大、模数转换, 然后被传送到数据采集卡上进行采集并输入计算机, 利用电脑程序对采集到的被检测信号进行傅里叶变

换, 并在频域上使用带通滤波器把这四路信号分开, 最后再解调制, 还原出四点没有被调制的荧光信号。

5 实验结果与数据分析

5.1 成像情况

在实验系统中, 经过二向色镜的荧光信号再经过成像物镜 (焦距为 50 mm, 孔径为 30 mm) 聚焦后, 进入 CCD 摄像头, 通过调节摄像头与成像透镜间的相对距离, 得到比较清晰的成像图片。在实验中, 样品采用成年鼠神经细胞样品, 得到如图 3 所示的成像图像, 从图中可以看到箭头所标识的四个成像明显的聚焦点区域, 能反映出激发光聚焦在样品的不同位置区域。

对于显微镜系统, 其横向分辨率 Δr 表示公式为 $\Delta r = 0.61 \frac{\lambda}{NA}$, 其中 λ 为所激发出的荧光的波长,

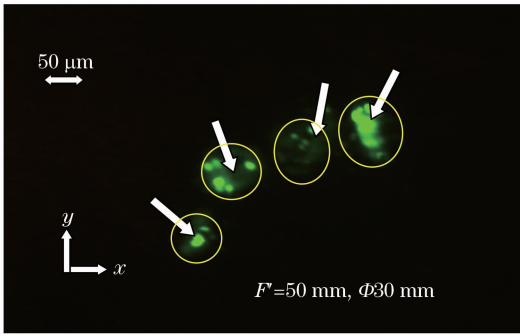


图 3 频分复用荧光共焦显微系统拍摄的老鼠神经细胞显微图

Fig. 3 Mouse neural cell pictures taken by FDMFCM system

NA 为显微物镜的数值孔径。样品所激发出的荧光中心波长为 530 nm, 显微物镜的 NA 为 0.65, 则横向分辨率为 $0.5 \mu\text{m}$ 。其轴向分辨率 Δz 可以表示为 $\Delta z = \frac{1.4\lambda n}{NA^2}$, 其中 n 为所探测样品有效折射率, 考虑到生物细胞约 70% 成分是水, 故取值为 1.3, 则 $\Delta z \approx 2 \mu\text{m}$ 。

5.2 解调制情况

用该四路系统对四路荧光信号分别以某一载波

频率调制后, 实现系统对生物样品四个荧光点的探测功能。实验采用 50, 80, 100, 200 Hz 四个频率调制信号, 并采集到数据, 而 PMT 采集到的应为四路调频信号的叠加, 由于实验中采用的样品细胞是死细胞, 激发的被调荧光信号频率为 0, 所选的四个载波频率满足抽样定理, 所以解调时不会发生因为相互重叠而解调不出来的现象。图 4 所示为 PMT 采集到的四路调频荧光信号和对信号模拟得到的数据图。图 4(a) 为 PMT 实际测量的荧光信号强度图, 图 4(b) 为模拟的 50, 80, 100, 200 Hz 的四个余弦和频信号图。由图 4 可知, 由于有 PMT 和光斩波器噪声的影响, 实际探测的荧光强度变化与模拟的理想强度形状有一定的差异, 但是总体基本一致。对所采集到的四路荧光信号进行傅里叶变换, 得到频率域的频谱分布如图 5(a) 所示。从图 5(a) 可知, 50 Hz 和 100 Hz 的频谱信号强度比 80 Hz 和 200 Hz 的要高, 这是由于斩光器中有两片 H-PDLC 光栅的再现光照方向与制作曝光时的光照方向相反, 引起了一定的衍射效率降低。将采集到的荧光信号进行滤波后, 得到频率域的频谱分布如图 5(b) 所示。再对滤波后的频谱信号进行傅里叶逆变换, 得到对应

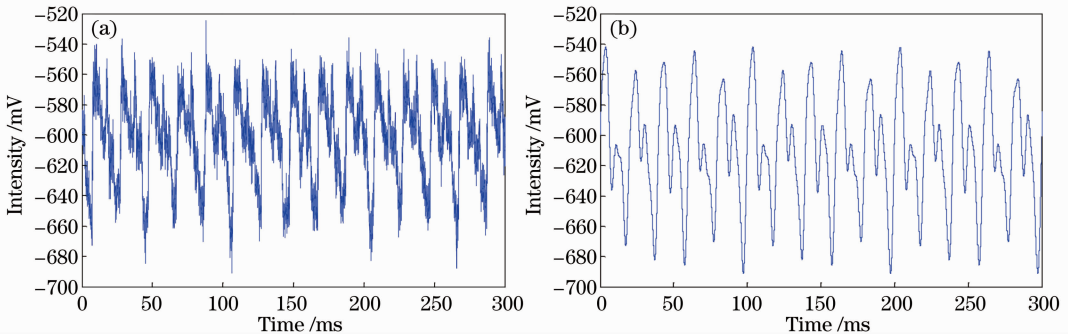


图 4 (a) PMT 实际采集到的原始信号; (b) 对 PMT 采集信号的模拟

Fig. 4 (a) Original Signals collected by PMT in experiment; (b) simulation of signals collected by PMT

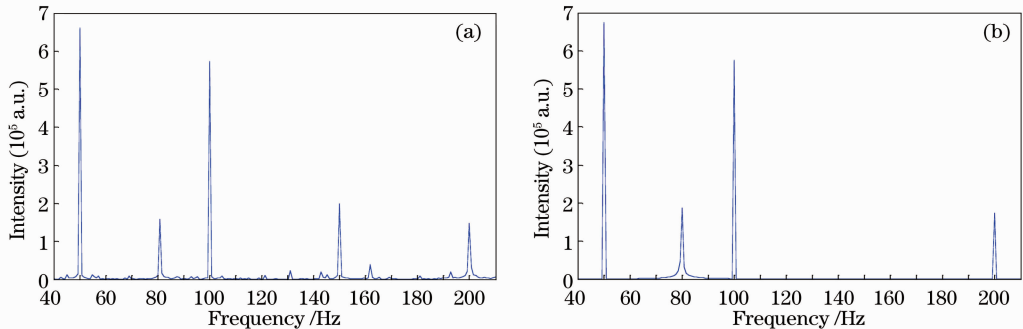


图 5 (a) 采集信号的傅里叶变换频谱图(50, 80, 100, 200 Hz); (b) 采集信号经滤波后的傅里叶变换频谱图(50, 80, 100, 200 Hz)

Fig. 5 (a) Fourier transformed spectra of collected signals in frequency domain (50, 80, 100, 200 Hz); (b) Fourier transformed spectra of filtered signals in frequency domain (50, 80, 100, 200 Hz)

调频位置处的四点荧光强度随时间变化曲线,如图 6(a)所示。图中从上至下四条强度随时间变化曲线所对应的频率分别是 50、100、80、200 Hz。由图 6(b)可知,噪声频率 150 Hz 对应的强度随时间变化曲线,其强度幅值几乎为零,目前还不清楚噪声

产生的原因。从图中解调情况可以看出,四点荧光信号的强度幅度变化除 80 Hz 的稍大外其他的都很小,整体强度变化趋势平缓,这符合探测的鼠神经细胞样品的荧光变化实际情况。

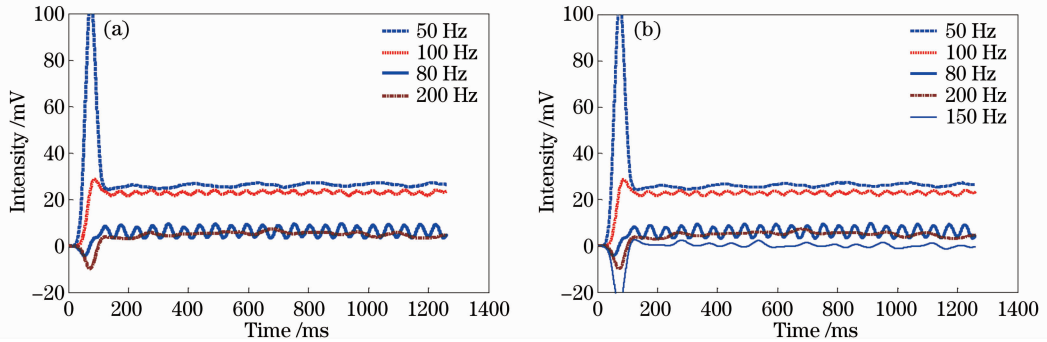


图 6 (a)解调后的四点荧光信号图谱;(b)有噪声信号曲线的信号图谱

Fig. 6 (a) Curves of demodulated four-point fluorescence intensity; (b) curves with noise signal

四路 FDMFCM 实验系统不仅拍摄到了鼠神经海马细胞的荧光显微图片,同时还用强度与时间曲线将样品上四个聚焦位置处的荧光能量量化指标随时间的变化情况体现出来。如果用在医学检测中,实现多点活体细胞探测,反映出细胞内部某些蛋白分子浓度的实时输运及变化过程,对于病理研究有较大的意义。

6 结 论

实验构建了四通道频分复用荧光探测系统,验证了实现多路频分复用荧光共焦并行探测技术的可行性。利用所构建的基于 H-PDLC 电控阵列调制的四路频分复用荧光共焦显微镜,实现多通道并行探测,将共焦探测的工作效率成倍提高。但是,目前的四路系统还有很多需要改进和完善的地方,如在 405 nm 波段下 H-PDLC 材料的吸收率太高,需要改善材料的光谱特性,减少损耗;另外,系统及斩波调制器的结构需要改进设计,使得多点位置调节准确,方便信号的耦合共焦。该技术有望为医学、生物等领域的细胞研究提供一种高效有用的方法。

参 考 文 献

- 1 M. Minsky. Microscopy Apparatus[P]. US Patent 30133467, 1961-12-19
- 2 P. Davidovits, M. D. Egger. Scanning laser microscope[J]. *Nature*, 1969, **223**(5208): 831
- 3 J. Pawley. Handbook of Biological Confocal Microscopy[M]. New York: Plenum Press, 1988
- 4 W. Denk, J. H. Sticklers, W. W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, **248**(4951): 73~76

- 5 T. Dabbs, M. Glass. Fiber-optic confocal microscope; FOCON [J]. *Appl. Opt.*, 1992, **31**(6): 3030~3035
- 6 A. Govil, D. M. Pallister, M. D. Morris. Three-dimensional digital confocal Raman microscopy[J]. *Applied Spectroscopy*, 1993, **47**(1): 75~79
- 7 G. J. Tearney, R. H. Webb, B. E. Bouma. Spectrally encoded confocal microscopy[J]. *Opt. Lett.*, 1998, **23**(15): 1152~1154
- 8 C. P. Lin, R. H. Webb. Fiber-coupled multiplexed confocal microscope[J]. *Opt. Lett.*, 2000, **25**(13): 954~956
- 9 Wang Mei, Yun Maojin, Liu Liren *et al.*. Design of the super-resolution pupil filter in the confocal system[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(6): 0618001
- 王 美, 云茂金, 刘立人等. 共焦显微系统中光学超分辨光瞳滤波器的设计[J]. *光学学报*, 2011, **31**(6): 0618001
- 10 Feng Zhifeng, Wang Liqiang, Lu Zukang *et al.*. Fluorescence endomicroscopy with adaptive imaging function[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(12): 1218001
- 冯志锋, 王立强, 陆祖康等. 具有自适应成像功能的荧光显微内窥术[J]. *光学学报*, 2011, **31**(12): 1218001
- 11 Li Heng, Shao Yonghong, Wang Yan *et al.*. Spectrally resolved multifocal multiphoton microscopy using microlens array and galvo mirror scanning[J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37**(5): 1240~1244
- 李 恒, 邵永红, 王 岩等. 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[J]. *中国激光*, 2010, **37**(5): 1240~1244
- 12 K. B. Shi, P. Li, S. Z. Yin *et al.*. Chromatic confocal microscopy using super continuum light[J]. *Opt. Express*, 2004, **12**(10): 2096~2101
- 13 K. B. Shi, S. Z. Yin, Z. W. Liu. Wavelength division scanning for two-photon excitation fluorescence imaging[J]. *Journal of Microscopy-Oxford*, 2006, **223**: 83~87
- 14 Zhang Yunbo, Zheng Jihong, Jiang Yanmeng *et al.*. Near UV-band frequency division multiplexing detecting technique with fluorescence microscopy[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(6): 0618002
- 张运波, 郑继红, 蒋妍梦等. 近紫外波段频分复用荧光显微探测技术研究[J]. *光学学报*, 2011, **31**(6): 0618002
- 15 Tang Pingyu, Zheng Jihong, Cao Jianwei *et al.*. Two-channel frequency division multiplexed fluorescence confocal microscopy [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2011, **48**(9): 091801
- 唐平玉, 郑继红, 曹剑炜等. 双路频分复用荧光共焦显微探测技

- 术研究[J]. 激光与光电子学进展, 2011, **48**(9): 091801
- 16 Jiang Yanmeng, Zheng Jihong, Huang Aiqin *et al.*. Optical chopper based on polymer dispersed liquid crystal gratings[J]. *Acta Optica Sinica*, 2010, **30**(s1): s100312
蒋妍梦, 郑继红, 黄爱琴等. 基于聚合物分散液晶光栅的电控光斩波器[J]. 光学学报, 2010, **30**(s1): s100312
- 17 Huang Aiqing, Zheng Jihong, Jiang Yanmeng *et al.*. Design and study of holographic polymer dispersed liquid crystal grating based electrically controlled optical chopper [J]. *Optical Technique*, 2011, **37**(5): 566~570
黄爱琴, 郑继红, 蒋妍梦等. 电控全息聚合物分散液晶斩光器的设计与研究[J]. 光学技术, 2011, **37**(5): 566~570

栏目编辑: 韩 峰