

基于时间相关单光子计数的离线式 g-STED 超分辨显微术

郝翔 匡翠方 顾兆泰 李帅 刘旭

(浙江大学现代光学仪器国家重点实验室, 浙江 杭州 310027)

摘要 提出了一种离线式基于时间门的荧光受激发射损耗(g-STED)显微方法。基于在强光照条件下荧光寿命缩短的理论模型,在常规 STED 架构基础上,使用时间相关单光子计数(TCSPC)算法获取图像的荧光寿命信息,离线设置合理的时间门阈值,丢弃短寿命信号数据,对荧光信号有效点扩展函数(PSF)进行压缩,达到超分辨显微的目的。与传统 STED 显微术相比,此方法所需光功率大幅度降低,减少了荧光漂白及光毒性;离线式处理则同时增加了时间门设置的灵活性。在实验中,使用 45 mW 的连续 STED 光,最终获取了约 80 nm 的图像空间分辨率。进一步对时间门的设置对获取图像信号的分辨率和信噪比的影响进行了讨论。

关键词 显微;荧光寿命成像;时间相关单光子计数算法;时间门荧光受激发射损耗显微

中图分类号 O436 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL201340.0104001

Super Resolution Microscopy of Offline g-STED Microscopy Based on Time-Correlated Single Photon Counting

Hao Xiang Kuang Cuifang Gu Zhaotai Li Shuai Liu Xu

(State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation, Zhejiang University,
Hangzhou, Zhejiang 310027, China)

Abstract The offline time-gated stimulated emission depletion (g-STED) microscopy, which is based on time-correlated single photon counting (TCSPC) algorithm, is proposed. As STED beam can eliminate the ratio of spontaneous fluorescent emission while reducing the fluorescence lifetime, the lifetime of fluorescent signals in the center of excitation focal spot and that in the surrounding doughnut area which are overlap by the STED focal spot are significant different. Based on this principle, in a general continuous wave STED (CW-STED), the fluorescent lifetimes of the whole imaging region are calculated by TCSPC, and the signals with shorter lifetime are discarded after all data recorded. The effective point spread function (PSF) of each fluorescent labels are shrunked in order to enhance the resolution. Compared with traditional ones, this offline g-STED not only decreases the incident intensity of laser to avoid the risk of fluorescence photobleaching and optical toxicity, but also increases the flexibility of time-gate manipulation. A spatial resolution of 80 nm is obtained in the experiment when only 45 mW STED beam is introduced. The potential influences of time-gate selection to the resolution and signal-to-noise ratio (SNR) are further discussed.

Key words microscopy; fluorescent lifetime imaging; time-correlated single photon counting algorithm; time-gate stimulated emission depletion microscopy

OCIS codes 170.2520; 170.3650; 350.5730

收稿日期: 2012-07-23; 收到修改稿日期: 2012-09-09

基金项目: 国家自然科学基金(61205160), 浙江省钱江人才计划基金(2011R10010), 教育部博士点基金(20110101120061), 中央高校基本科研业务费专项资金(2012FZA5004)和教育部博士研究生学术新人奖资助课题。

作者简介: 郝翔(1984—), 男, 博士研究生, 主要从事超分辨显微成像方面的研究。E-mail: caesarhx@gmail.com

导师简介: 匡翠方(1977—), 男, 博士, 副教授, 主要从事超分辨显微成像方面的研究。E-mail: cfkuang@zju.edu.cn (通信联系人)

1 引 言

尽管对于大部分光学系统而言,阿贝衍射极限^[1]仍然是追求高分辨的瓶颈所在,但在某些特定领域,这种限制已经被从根本上打破。在医学显微图像领域,特别是荧光显微成像领域^[2,3],随着多种超分辨显微成像技术^[4,5]的提出,人们已经成功地将系统的极限分辨能力推进到数十纳米量级。其中,在1994年提出的荧光受激发射损耗(STED)显微方法^[6~10],作为其中的杰出代表,在动态图像获取能力、理论分辨力极限、三维超分辨成像等方面,拥有其他类似方法难以比拟的优势。STED显微术通过一束高功率的激光对荧光标记的受激荧光辐射进行压制,达到压缩系统有效点扩展函数(PSF)^[11],提高系统分辨能力的目的。正是由于上述特点,常规STED系统性能非常依赖于荧光标记的非线性效应,因此往往需要很大的输入功率,这很容易造成观察样品的荧光漂白和光毒效应^[12],这一点在观察样品为活体生物细胞时表现得尤其明显,从而也成为STED显微术面临的重大缺陷所在。

为了克服上述问题,Vicidomini等^[13]在2011年提出了基于时间门技术的STED(g-STED)显微术。该技术利用STED光照射荧光样品在抑制其受激荧光辐射的同时会缩短其荧光寿命的特点,在系统中设置时间门对荧光信号进行实时过滤,从而极大地减少了所需要的荧光强度。但是,实时时间门的控制电路非常复杂,需要精准的时间同步,因此在无形中增加了系统的复杂性和搭建成本。

本文提出了一种离线式g-STED显微术以期解决实时时间门造成的困境。基于常规连续光STED(CW-STED),通过时间相关单光子计数(TCSPC)算法获取图像信息后,对各像素点的荧光信号进行荧光寿命分析,设置合理的时间门阈值,丢弃短寿命信号数据,对荧光信号有效点扩展函数进行压缩,达到超分辨显微的目的。在完成理论模型的基础上,进一步进行了实验论证,并对时间门设置的最优值及其对系统性能如分辨、信噪比的影响进行了讨论。

2 理 论

基于STED显微术的基本原理,当多纳圈状的STED光聚集光斑与实心的激发光嵌套照射在样品表面时,两聚集光斑重叠区域的荧光标记受激辐射将会减弱,其衰减率由STED光强 I_{STED} 决定。特别

地,在荧光标记受激辐射减弱的同时,相应区域的荧光寿命也会降低,其对应的荧光寿命可以表示为^[13]

$$\tau'_n = \frac{1}{k_n + \sigma I_{STED}}, \quad (1)$$

式中 $k_n = 1/\tau_n$, τ_n 为荧光标记原始寿命, σ 为非线性系数。通常情况下, $\sigma \gg 1$ 。这意味着相比于荧光寿命的非线性效应远比光强非线性效应明显;换句话说,使用较低的光强即可以产生很明显的荧光寿命差异。这也是所有g-STED显微术可以采用较低的输入功率获取超分辨显微能力的理论前提。

目前,常用的荧光寿命^[14]测定方法^[15]包括TCSPC法^[16]、相调制法(PMM)^[17]、频闪法(Strobe)^[18]等。其中,TCSPC法是目前最为成熟、测量数据最为精确的方法,因此得到了广泛应用。其基本原理如图1所示,通过一个脉冲激光器产生脉冲激光照射在荧光样品上并激发出相应的荧光单光子信号,被雪崩式光电二极管(APD)捕获后,通过时幅转换器(TAC)计算脉冲与光子到达的时间差作为荧光分子寿命,再通过多通道分析仪(MCA)按不同寿命进行分子数累积,在经过反复多次测量后即得到了对应荧光标记的荧光寿命曲线。

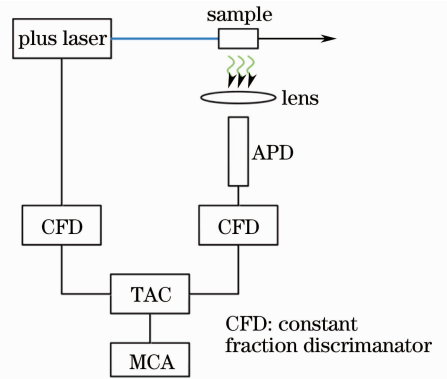


图1 TCSPC原理图

Fig.1 Principle of TCSPC

3 实验与结果

图2为提出的离线式g-STED的系统架构图。与传统STED类似,本架构也包括激发光(Exc.)、STED光、显微物镜、探测器等主要部件,其中STED光将通过 $0 \sim 2\pi$ 的涡旋相位编码板(RPC Photonics, VPP-1,美国)进行相位编码,并最终在样品表面形成中空的多纳圈状聚集光斑;单个浸油数值孔径1.4的显微物镜(Leica Microsystems, HCX PL APO 100 \times /1.40-0.7 Oil,德国)用于聚集输入光线并收集荧光信号。但与一般STED不同的是,基于g-STED架构

中,STED 光(MPB Communications, VFL-P-1000-592,加拿大)为 592 nm 的连续激光;激发光则为 40 MHz 的 488 nm 脉冲激光(PicoQuant GmbH, LDH-488 with PDL-800-D,德国)。

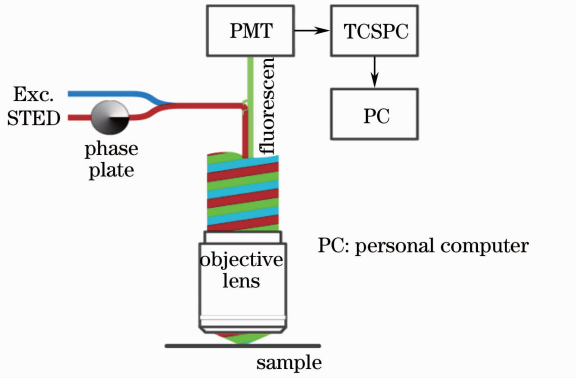


图 2 离线式 g-STED 系统架构图

Fig. 2 Configuration of offline g-STED

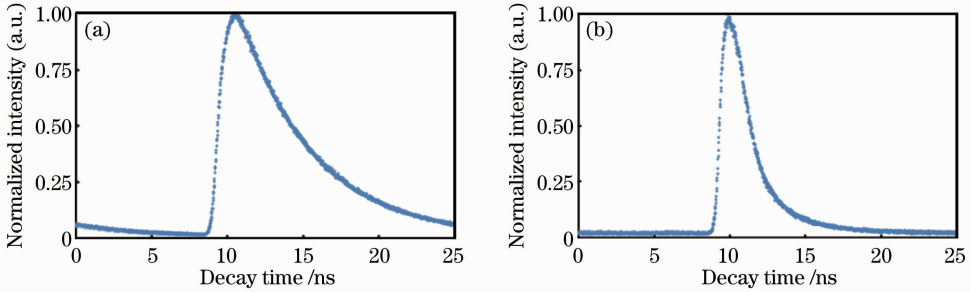


图 3 当 $I_{\text{STED}} = 45 \text{ mW}$ 时 (a) 不加和 (b) 加 STED 光对于荧光寿命的影响

Fig. 3 Fluorescent lifetime (a) without and (b) with STED beam illumination when $I_{\text{STED}} = 45 \text{ mW}$

随后利用上述系统对于荧光样品进行扫描成像,以确定其分辨能力。在使用传统 STED 方法获取荧光样品光强信号图像的同时,使用 TCSPC 对相应区域的荧光寿命进行分析记录。将记录下来的结果全部保存后,进行后期软件处理,丢弃短荧光寿命的强度信息,最终得到相关的图像。实验中,激发光和 STED 光平均输入光功率分别 $30 \mu\text{W}$ 和 45 mW 。为考虑到之前所述 STED 光对于荧光寿命的影响,将时间门人为设置在 3 ns ,所得结果如图 4(a) 所示。以单个标记荧光成像的半峰全宽 (FWHM) 作为系统的分辨能力来看,该系统的极限空间横向分辨能力约 80 nm 。作为对比,在不对荧光寿命进行处理时,所得结果如图 4(b) 所示;而当使用一般共焦系统进行成像时,所得结果如图 4(c) 所示。从特征区域的分析上就可以看到,离线式 g-STED 对于系统分辨能力的提高非常显著。

在实验中,所用的样品为直径 20 nm 的黄绿色荧光颗粒 (Molecular Probes, 515 nm Yellow-green FluoSpheres, 美国)。为了验证 STED 光对于荧光标记荧光寿命的影响,首先对样品的荧光寿命进行了测试。其中,在 STED 光测试时,将 STED 光路中原有的涡旋相位板撤去,以使激发光与 STED 完全重合,测试结果如图 3 所示。在标准共焦状态 (不加 STED 光) 下,当输入激发光功率为 $30 \mu\text{W}$ 时,测试得到的样品平均荧光寿命约为 5.0 ns [图 3(a)]; 保持激发光功率不变的前提下,在引入 STED 光以后,荧光寿命将明显缩短,其缩短趋势随着 STED 光平均输入功率的增强而愈发显著。特别地,当 STED 光平均输入功率分别为 5 mW 和 45 mW 和大于 260 mW 时,样品平均荧光寿命分别约为 3.3 ns 、 1.9 ns 和小于 1 ns , 相对荧光寿命缩短量大于 40% , 如图 3(b) 所示。

4 讨 论

相比较于传统 STED 系统, g-STED 最大的优势在于采用了低功率的连续激光作为 STED 光, 该技术可以极大地减少荧光漂白和其他光毒作用对于样品的非可逆性破坏, 这一点在样品为生物活体细胞时表现得尤为明显^[13,19]。以本文所述系统为例, g-STED 的 STED 光输入功率可以比传统脉冲 STED 显微系统 (p-STED) 小 1 个数量级。另外, 由于本系统采用了离线式数据处理的方法代替了原有 g-STED 实时处理方式, 因此取消了电子快门延迟装置, 简化了原有系统的复杂性并降低了成本。更为重要的是, 使用离线式处理方式, 可以针对不同样品的荧光寿命变化, 采用对应的时间门设置, 增加了系统的灵活性。但是需要指出, 时间门的设置并不是任意的, 应由荧光标记前后的荧光寿命相互关系决定。当时间门设置过小时, 重叠部分发出的荧光还没有完全消失, 系统的 PSF 不能得到有效压缩,

浪费了系统分辨能力;反之,过大的时间门则会由于所积累荧光分子数不足而造成信噪比过低的现象,

造成有用信息的丢失。这两种情况都应在实际应用中加以避免。

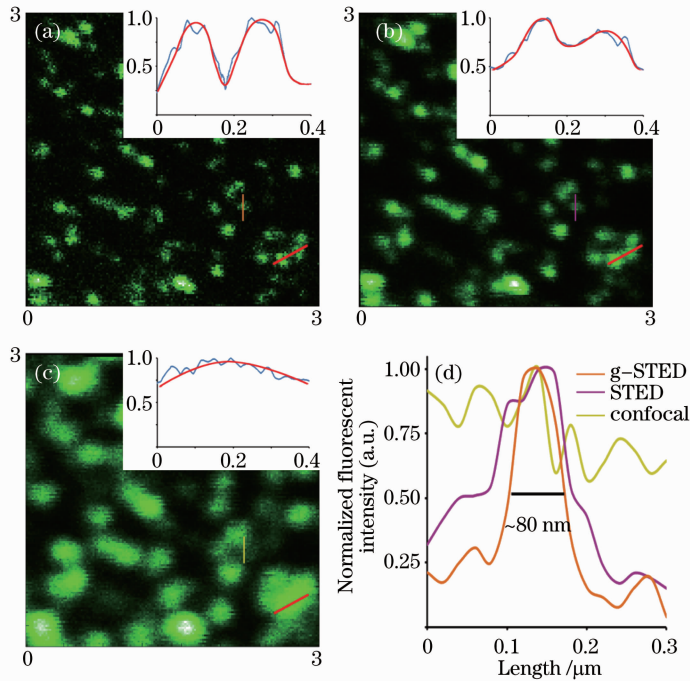


图 4 荧光样品成像。(a)离线式 g-STED;(b) STED;(c)共焦系统;(d)三种成像方式在同一点的 PSF

Fig. 4 Imaging of fluorescent sample. (a) Offline g-STED; (b) STED; (c) confocal system; (d) corresponding PSF

5 结 论

本文提出了一种基于 TCSPC 的离线式 g-STED 显微术。基于在强光照条件下荧光寿命缩短的理论模型,在常规 STED 架构基础上,在获取荧光光强信号的同时,使用 TCSPC 分析图像的荧光寿命信息,同时记录荧光标记的光强和寿命信号。离线对其进行分析,设置合理的时间门阈值,丢弃短寿命信号数据,对荧光信号有效点扩展函数进行压缩,达到超分辨显微的目的。与传统 STED 显微系统相比, g-STED 的优势在于可以极大地减少 STED 光的输入功率,避免了样品的荧光漂白和光毒作用;而采用离线处理的方式,与实时 g-STED 相比,简化了结构,降低了系统成本。同时,时间门设置也更加灵活,从而增加了系统的适用性。在理论模型的基础之上,使用 45 mW 的 STED 光功率,成功地实现了约 80 nm 的系统空间分辨率,并对时间门的合理设置及其对系统性能的影响进行了讨论。

参 考 文 献

1 E. Abbe. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung[J]. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 1873, **9**(1): 413~418
 2 Liu Yan, Xu Shengqi, Liu Weiwei. Application of two-photon

fluorescence measurement on pulse characterization during femtosecond laser filamentation in air[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(7): 0719002

刘 岩, 徐圣奇, 刘伟伟. 基于双光子荧光原理的空气中飞秒激光成丝区域脉冲特性的测量[J]. *光学学报*, 2011, **31**(7): 0719002

3 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

4 S. W. Hell. Far-field optical nanoscopy [J]. *Science*, 2007, **316**(5828): 1153~1158

5 Hao Xiang, Kuang Cuifang, Li Yanghui *et al.*. Reversible saturable optical transitions based fluorescence nanoscopy [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2012, **49**(3): 030005

郝 翔, 匡翠方, 李阳晖等. 可逆饱和光转移过程的荧光超分辨显微术[J]. *激光与光电子学进展*, 2012, **49**(3): 030005

6 S. W. Hell, J. Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated-emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy[J]. *Opt. Lett.*, 1994, **19**(11): 780~782

7 Hao Xiang, Kuang Cuifang, Wang Tingting *et al.*. Optimization of $0/\pi$ phase plate in stimulated emission depletion microscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(3): 214~217

郝 翔, 匡翠方, 王婷婷等. 受激发射损耗显微技术中 $0/\pi$ 圆形相位板参数优化[J]. *光学学报*, 2011, **31**(3): 214~217

8 S. Galiani, B. Harke, G. Vicidomini *et al.*. Strategies to maximize the performance of a STED microscope [J]. *Opt. Express*, 2012, **20**(7): 7362~7374

9 S. W. Hell, K. I. Willig, B. Harke *et al.*. STED microscopy with continuous wave beams[J]. *Nat. Methods*, 2007, **4**(11): 915~918

- 10 P. Bingen, M. Reuss, J. Engelhardt *et al.*. Parallelized STED fluorescence microscopy [J]. *Opt. Express*, 2011, **19** (24): 23716~23726
- 11 Wang Huaying, Wang Guangjun, Zhao Jie *et al.*. Imaging resolution analysis of digital holographic microscopy[J]. *Chinese J. Lasers*, 2007, **34**(12): 1670~1675
王华英, 王广俊, 赵洁等. 数字全息显微系统的成像分辨率分析[J]. *中国激光*, 2007, **34**(12): 1670~1675
- 12 D. Wildanger, R. Medda, L. Kastrup *et al.*. A compact STED microscope providing 3D nanoscale resolution[J]. *J. Microsc.*, 2009, **236**(1): 35~43
- 13 G. Vicidomini, G. Moneron, K. Y. Han *et al.*. Sharper low-power STED nanoscopy by time gating[J]. *Nature Methods*, 2011, **8**(7): 571~575
- 14 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): 132~137
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): 132~137
- 15 Liu Chao, Zhou Yan, Wang Xinwei *et al.*. Fluorescence lifetime imaging microscopy and its research progress [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2011, **48**(11): 111102
刘超, 周燕, 王新伟等. 荧光寿命成像技术及其研究进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2011, **48**(11): 111102
- 16 E. Fiserova, M. Kubala. Mean fluorescence lifetime and its error [J]. *J. Lumin.*, 2012, **132**(8): 2059~2064
- 17 T. Iwata, H. Kiyoto, Y. Mizutani *et al.*. Comparison of pulsed-excitation and phase-modulation methods for estimating fluorescence lifetime values using a convolved-autoregressive model and a high-gain photomultiplier tube[J]. *Opt. Rev.*, 2010, **17**(6): 513~518
- 18 N. Joshi, V. O. de Joshi, S. Contreras *et al.*. Fluorescence lifetime measurements of native and glycated human serum albumin and bovine serum albumin [C]. *SPIE*, 1999, **3602**: 124~131
- 19 C. Eggeling, A. Honigmann, M. Schulze. gSTED microscopy with an OPSL: cutting edge super-resolution [J]. *Optik & Photonik*, 2012, **7**(2): 44~46

栏目编辑: 韩峰