

基于数字微镜器件多路频分复用荧光显微镜的实验研究

李云章, 郑继红, 桂坤, 刘悠嵘, 王康妮

上海理工大学光电信息与计算机工程学院, 上海 200093

摘要 设计了基于数字微镜器件(DMD)的荧光显微镜探测系统。该系统不仅能对样品实现荧光成像,而且能探测不同区域样品激发荧光信号能量的实时变化。实验采用 DMD 快速加载多通道不同帧率的视频信息,实现了对激发光束的分割与频率调制。采用光电倍增管采集样品的荧光信息,荧光信息经模/数转换处理后再进行傅里叶变换、滤波和解调操作,得到了不同信道区域荧光信号强度随时间变化的曲线。实验结果表明,将 DMD 加入到荧光显微镜系统中可以加快集成多通道,且计算机可调控 DMD 通道,能有效提高荧光显微镜的探测效率。

关键词 光通信; 数字微镜器件; 频分复用; 荧光显微镜; 多通道

中图分类号 Q336; Q337

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201744.1006007

Experimental Study on Fluorescence Microscope with Multi-Channel Frequency Division Multiplexing Based on Digital Micromirror Device

Li Yunzhang, Zheng Jihong, Gui Kun, Liu Yourong, Wang Kangni

School of Optical-Electrical and Computer Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

Abstract A fluorescence microscope detection system based on digital micromirror device (DMD) is designed. The system not only can realize the fluorescence imaging of the sample, but also can detect the real-time change of the fluorescence signal energy in different regions of the sample. The video information with different frame rates in multi-channel is fast loaded by DMD in the experiment to realize the segmentation of the excitation beam and frequency modulation. The fluorescence information of the sample is collected by photomultiplier tube (PMT) and then is processed by means of analog-to-digital conversion, Fourier transform, filtering and demodulation, and the relationship curve between intensity of fluorescence signal in different channel regions and time. The experimental results show that adding DMD to fluorescence microscope system can accelerate the integration of multi-channel, the DMD channel can be controlled by computer, and the detection efficiency of the fluorescence microscope can be improved effectively.

Key words optical communications; digital micromirror array; frequency division multiplexing; fluorescence microscope; multi-channel

OCIS codes 180.2520; 120.4640

1 引言

20 世纪初, Kuehler 等通过紫外光激发荧光细胞来观察细胞的形态^[1]。随着荧光显微镜的迅速发展, 它

收稿日期: 2017-04-26; 收到修改稿日期: 2017-05-21

基金项目: 国家重大科学仪器设备开发专项(2012YQ15008720)

作者简介: 李云章(1992—), 男, 硕士研究生, 主要从事荧光共焦显微成像技术方面的研究。

E-mail: yunzhangli9527@sina.com

导师简介: 郑继红(1975—), 女, 博士, 教授, 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: jihongzheng@sina.com(通信联系人)

已被广泛应用于生物和医学领域的细胞探测中。诞生于 20 世纪 60 年代的共焦显微镜具有单点式、机械移动式^[2]等扫描方式,随着对其探测速度的要求不断提高,传统的共焦显微镜已不能满足实际需求。2006 年,美国宾夕法尼亚州立大学的 Yin 教授小组提出了频分复用荧光共焦显微系统^[3]的概念,即将通信领域中的波分复用原理引入到荧光显微镜中,利用对光束的频分复用和荧光显微镜相结合的方式对细胞进行多通道探测^[4-6]。目前已报道的多通道荧光显微镜大多以机械斩波调制器或电控调光斩波器作为频分复用器件,以实现多通道的光束频分复用;但这些调制器件存在一些缺陷,如机械斩波调制器的体积较大,容易产生机械噪声等。

近年来,基于微透镜阵列多焦点多光子显微技术的研究促进了国内显微技术的快速发展^[7-11]。数字微镜器件(DMD)作为分束镜可以实现数字光源^[12-13],其表面约由 1×10^6 个数字反射镜面组成,每个镜面都可以通过旋转不同的角度来达到开关的作用,从而实现光的分束,形成阵列型光源^[14-16]。

本文用 DMD 代替机械斩波调制器或电控调光斩波器作为频分复用荧光显微系统中的斩波器进行波前调控,形成可调谐光源。由计算机向 DMD 芯片传输相应的调制视频,控制 DMD 的开关功能,实现不同调制频率的多通道光束。将 DMD 产生的光信号会聚到荧光显微镜中对染色的马铃薯细胞样品进行探测,然后用光电倍增管(PMT)直接获取光信号进行解调,并与 CCD 接收的图像进行对比。采用 DMD 作为斩波器进行波前调控的优点在于可快速集成多通道,实现数字化调控。

2 基本原理

频分复用技术原本指的是在通信技术中,将用于传输信道的总带宽划分成若干个子频带(或称子信道),每一个子信道传输单路信号的技术。频分复用技术使子通道信号在频率位置上错开,能够实现多路信号并行复用。将频分复用技术应用到显微成像领域,能够克服传统荧光显微镜或共焦显微镜不能同时多点探测的缺陷,通过多路信号的调制解调实现实时并行探测。DMD 多路频分复用荧光显微镜的基本原理是通过计算机控制 DMD 上的微镜片开关形成多通道,再分别调制各个通道的开关频率,将光束调制成为不同载波频率的多束光,达到多通道频分复用的效果。经 DMD 多路调制的光源信号再经变倍扩束镜缩小至合适的尺寸后完全进入显微物镜,经显微物镜聚焦的光束再投射到染有荧光染料的切片细胞上,激发出的多路荧光信号与输入调制光束具有相同的调制频率。最后,采用工业相机和 PMT 接收调制后的图像和荧光信号。将 PMT 接收到的荧光信号通过 MATLAB 软件进行傅里叶变换并滤波解调后,就可得到多通道位置的荧光信号强度随时间变化的关系。

本实验数据采集卡所采用的采样频率超过了 DMD 调制频率的 2 倍,满足奈奎斯特抽样定理。实验由计算机控制,通过改变 DMD 的通道数量和开关调制的频率,实现多通道探测,具有无机械噪声和操作性稳定等优点。本实验系统实现了一个可快速并行探测、数字化调控的多通道显微系统。

3 基于 DMD 的频分复用编码原理

本实验采用 0.7 inch(1 inch=2.54 cm)的 DMD,DMD 的分辨率为 $1024 \text{ pixel} \times 768 \text{ pixel}$ 。DMD 由多块微反射镜组成,单个微反射镜的边长为 $13.68 \mu\text{m}$,两块微反射镜间的距离为 $1 \mu\text{m}$,每块微反射镜都可以绕着各自的旋转轴转动,旋转角度范围为 $-12^\circ \sim +12^\circ$ 。将旋转到 $+12^\circ$ 的状态定义为“ON”状态,旋转到 -12° 的状态定义为“OFF”状态。扩束后的激光光源以一定的入射角(与 DMD 芯片垂轴的夹角为 24°)入射到 DMD 表面,如图 1 所示,经“ON”状态的 DMD 反射后垂直于 DMD 表面出射。

通过计算机调节 DMD 的开关,以实现不同频率的多个通道。例如,针对两通道频分复用显微镜,将 DMD 划分为左右 2 个区域,左侧区域加载 3.3 Hz 的调制信号,右侧区域加载 5 Hz 的调制信号,当制作帧率为 $10 \text{ frame} \cdot \text{s}^{-1}$ 的视频时,左侧区域每隔 3 帧切换开关状态,右侧区域每隔 2 帧切换开关状态,每帧的开关效果如图 2 所示。

通过以上的视频编码图可以形成两路调制信号,两路信号的频率分别采用基频 $\sin(\omega_1 t)$ 和 $\sin(\omega_2 t)$ 表示($\omega_1 = 2\pi \times 3.3 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $\omega_2 = 2\pi \times 5 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$),调制后的光信号通过对应的细胞区域,激发出调制后的荧

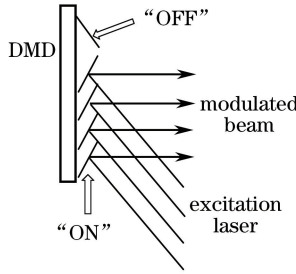


图 1 激光对 DMD 的入射角

Fig. 1 Incident angle of laser to DMD

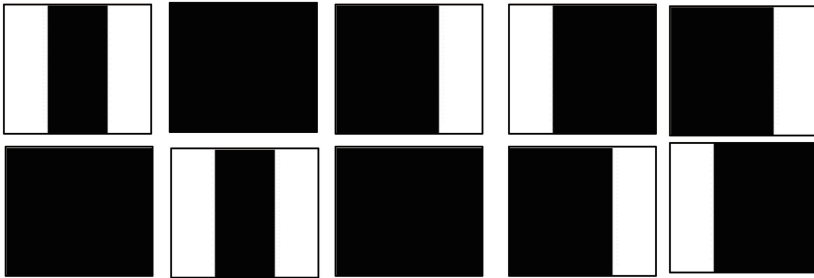


图 2 两路 10 frame·s⁻¹ 视频的 1 s 效果图

Fig. 2 One second rendering of two-channel 10 frame·s⁻¹ video

光信号。假设荧光光照强度为时间函数,分别为 $f_1(t)$ 和 $f_2(t)$,则通过调制后的单路荧光光照强度分别为 $f_1(t)\sin(\omega_1 t)$ 和 $f_2(t)\sin(\omega_2 t)$ 。PMT 检测到混合后的荧光强度信号 $s(t)$ 可记为 $s(t) = f_1\sin(\omega_1 t) + f_2\sin(\omega_2 t)$,信号 $s(t)$ 对应在频域上可表示为 $S(\omega) = F_1(\omega - \omega_1) + F_2(\omega - \omega_2)$,其中 ω 为角频率。激发的荧光混合信号被 PMT 接收后再经过放大和模/数转换处理,然后通过计算机采集信号,并对采集的信号进行傅里叶变换,解调出原始信号 $f_1(t)$ 和 $f_2(t)$ 。

针对四通道频分复用显微镜,将 DMD 划分为上下左右 4 块区域,左上区域加载 8 Hz 调制信号,右上区域加载 10 Hz 调制信号,左下区域加载 13.3 Hz 调制信号,右下区域加载 20 Hz 调制信号。当制作帧率为 40 frame·s⁻¹ 的视频时,左上区域每隔 5 帧切换开关状态,右上区域每隔 4 帧切换开关状态,左下区域每隔 5 帧切换开关状态,右下区域每隔 4 帧切换开关状态,每帧的开关效果如图 3 所示。

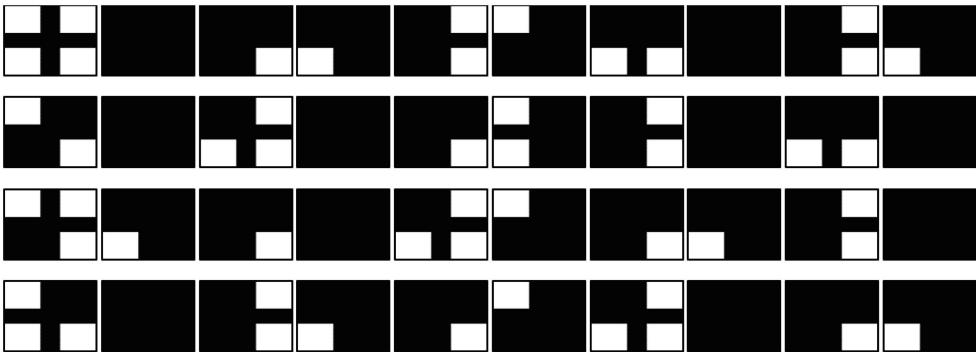


图 3 四路 40 frame·s⁻¹ 视频 1 s 效果图

Fig. 3 One second rendering of four-channel 40 frame·s⁻¹ video

通过以上的视频编码图可以形成四路调制信号,四路信号的频率分别采用基频 $\sin(\omega_1 t)$ 、 $\sin(\omega_2 t)$ 、 $\sin(\omega_3 t)$ 和 $\sin(\omega_4 t)$ 表示($\omega_1 = 2\pi \times 8 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $\omega_2 = 2\pi \times 10 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $\omega_3 = 2\pi \times 13.3 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $\omega_4 = 2\pi \times 20 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$)。调制后的光信号通过对应区域的细胞,激发出调制后的细胞荧光信号。假设荧光光照强度为时间函数,分别为 $f_1(t)$ 、 $f_2(t)$ 、 $f_3(t)$ 和 $f_4(t)$,则通过调制后单路荧光光照强度分别 $f_1(t)\sin(\omega_1 t)$ 、

$f_2(t)\sin(\omega_2t)$ 、 $f_3(t)\sin(\omega_3t)$ 和 $f_4(t)\sin(\omega_4t)$ 。PMT 检测到混合后的荧光强度信号 $s(t)$ 可记为 $s(t) = f_1\sin(\omega_1t) + f_2\sin(\omega_2t) + f_3\sin(\omega_3t) + f_4\sin(\omega_4t)$, 信号 $s(t)$ 对应在频域上可表示为 $S(\omega) = F_1(\omega - \omega_1) + F_2(\omega - \omega_2) + F_3(\omega - \omega_3) + F_4(\omega - \omega_4)$ 。激发的荧光混合信号被 PMT 接收后再经过放大和模/数转换处理, 通过计算机采集信号, 并对采集的信号进行傅里叶变换, 解调出原始信号 $f_1(t)$ 、 $f_2(t)$ 、 $f_3(t)$ 和 $f_4(t)$ 。

4 基于 DMD 多路荧光显微镜成像系统的设计

在搭建的实验光路系统中, 将 DMD 作为斩波器加到荧光显微镜系统中, 形成四路调制的多通道荧光显微镜, 如图 4 所示。一束波长为 405 nm 的紫光经扩束器准直扩束后(扩束镜组的放大倍数为 4), 与 DMD 垂轴方向呈 24°角入射, 通过加载四路帧率为 40 frame·s⁻¹ 的视频后, 形成四路不同频率的调制光信号, 然后通过倒置的扩束镜组(扩束镜组的放大倍数为 3)使光束半径缩小, 经二向色镜后耦合进入到显微物镜(无限远物镜, 数值孔径为 0.65, 放大倍率为 40)中。实验中入射激发光源为 405 nm 的激光, 其激发的是波长为 520~540 nm 的绿色荧光。通过显微物镜的光束聚焦到含有荧光的马铃薯细胞样品上, 返回的荧光信号由分光棱镜(BS)分成分两路, 一路由透镜(孔径为 70 mm, 焦距为 120 mm)会聚到 CCD 接收, 另一路直接由 PMT 接收。将 PMT 探测到的荧光信号进行模/数转换, 采集到计算机中进行信号处理, 然后经傅里叶变换、滤波和解调后得到四路荧光信号强度随时间变化的关系。两路频分复用系统和四路频分复用系统的光路基本相同, 不同之处在于前者只在 DMD 上加载两路帧率为 10 frame·s⁻¹ 的视频。

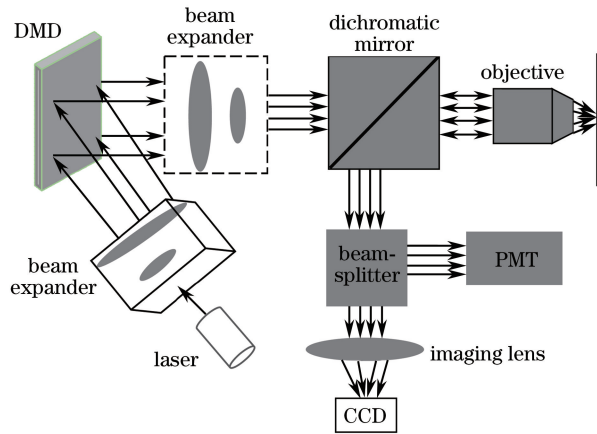


图 4 基于 DMD 的四路荧光显微镜成像系统光路图

Fig. 4 Optical path diagram of four-channel fluorescence microscopy imaging system based on DMD

5 基于 DMD 多路频分复用荧光显微系统的实验结果与分析

5.1 基于 DMD 多路频分复用荧光显微系统的成像

在上述实验系统中, 经显微物镜照射在马铃薯细胞样品上激发出来的荧光, 返回荧光显微镜系统后进入到 CCD 成像设备中, 得到了相对清晰的成像, 如图 5(a) 所示。由于实验分别采用 DMD 实现了两路和四路频分复用系统, 因此可以得到图 5(b) 所示的两路成像(左侧区域加载 3.3 Hz 调制信号, 右侧区域加载 5 Hz 调制信号), 以及图 5(c) 所示的四路成像(左上区域加载 8 Hz 调制信号, 右上区域加载 10 Hz 调制信号, 左下区域加载 13.3 Hz 调制信号, 右下区域加载 20 Hz 调制信号)。

5.2 基于 DMD 多路频分复用荧光显微系统的 PMT 解调结果

在 DMD 上加载两路 10 frame·s⁻¹ 的视频, 将 DMD 分成左右两个区域, 左侧区域加载 3.3 Hz 调制信号, 右侧区域加载 5 Hz 调制信号, 调制后的信号通过 PMT 接收, 然后通过采集卡传输到计算机中存储。采样频率为 250000 Hz, 采集的信号频率满足抽样定理。采集到的信号为两路调制信号的叠加。图 6(a) 为 PMT 采集到的两路混合时域调制信号, 图 6(b) 为模拟得到的两路混合时域调制信号。由图 6 可以看出, 实际探测的信号和模拟信号的强度基本一致。

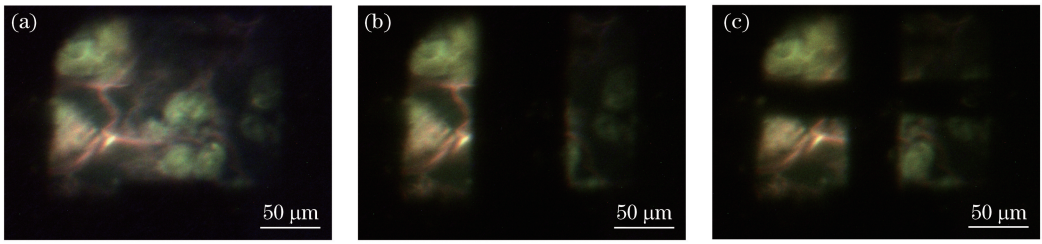


图 5 (a) DMD 全开的荧光显微成像;(b)两路 $10 \text{ frame}\cdot\text{s}^{-1}$ 视频荧光显微成像;(c)四路 $40 \text{ frame}\cdot\text{s}^{-1}$ 视频荧光显微成像
Fig. 5 (a) DMD full-open fluorescence microscopy imaging; (b) fluorescence microscopy imaging of two-channel $10 \text{ frame}\cdot\text{s}^{-1}$ video; (c) fluorescence microscopy imaging of four-channel $40 \text{ frame}\cdot\text{s}^{-1}$ video

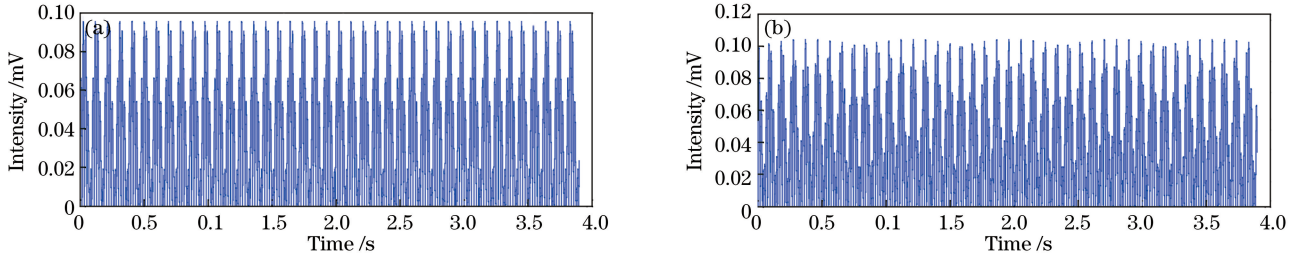


图 6 (a) PMT 采集到的两路混合时域调制信号;(b)模拟得到的两路混合时域调制信号
Fig. 6 (a) Actual two-way mixed-time-domain modulated signal acquired by PMT;
(b) analog two-way mixed-time-domain modulated signal

从图 7(a)所示的频谱图中能够看到 2 个明显的频谱峰值,峰值位置分别为 3.3 Hz 和 5.0 Hz,这与 DMD 上加载的 $10 \text{ frame}\cdot\text{s}^{-1}$ 视频的两路调制信号频率相吻合,从而证实了采用 DMD 可以实现两路显微镜频分复用的功能。将采集到的荧光信号进行傅里叶变换,然后采用带通滤波器进行滤波,再对滤波后的频谱信号进行傅里叶逆变换,就可得到对应调制频率的时域细胞强度信号,如图 7(b)所示。解调后的信号是单频信号,此信号的振幅代表了细胞信号的强度,由于是静态探测,所以解调后的信号振幅变化很小。

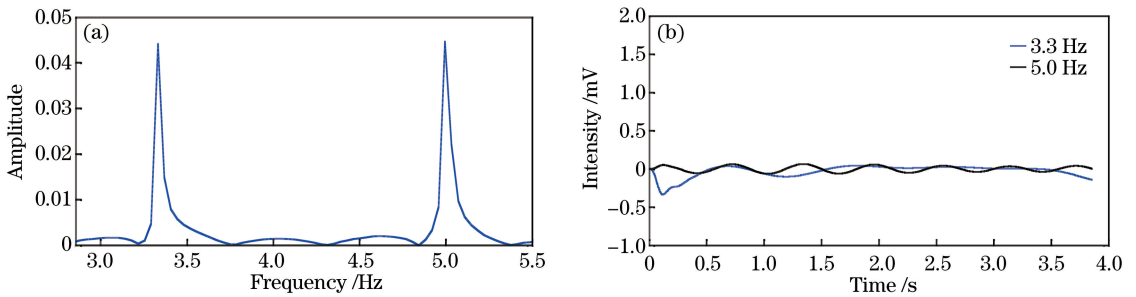


图 7 (a) PMT 采集的两路混合荧光信号频谱图;(b)解调出 3.3 Hz 和 5.0 Hz 的时域细胞强度信号
Fig. 7 (a) Spectrogram of two-way mixed fluorescence signal collected by PMT;
(b) time-domain cell intensity signals corresponding modulation frequency of 3.3 Hz and 5.0 Hz

在 DMD 上加载 $40 \text{ frame}\cdot\text{s}^{-1}$ 的视频形成四通道荧光显微镜系统。四通道荧光显微镜的调制与解调过程如图 8 所示。图 8(a)和图 8(b)分别为实测信号和模拟信号,它们的波形一致。从图 8(c)所示的频谱图中能够看到四路明显的频谱峰值,峰值位置分别为 8, 10, 13.3, 20 Hz,这与 DMD 上加载的 $40 \text{ frame}\cdot\text{s}^{-1}$ 视频的两路调制信号的频率相吻合,从而证实了采用 DMD 可以实现四路显微镜频分复用的功能。将采集到的荧光信号进行傅里叶变换,然后采用带通滤波器进行滤波,对滤波后的频谱信号进行傅里叶逆变换,得到对应调制频率的时域细胞强度信号,即得到了 4 条解调曲线,如图 8(d)所示,曲线的振幅代表细胞信号的强度。由于是静态探测,所以解调后的信号振幅变化很小。

以上的荧光成像图像、PMT 采集的频谱图及解调信号图可以证实,采用 DMD 加载特殊的视频编码可以实现多路频分复用功能。本实验系统不仅呈现了马铃薯清晰的细胞图像,还反映出了马铃薯细胞各分区

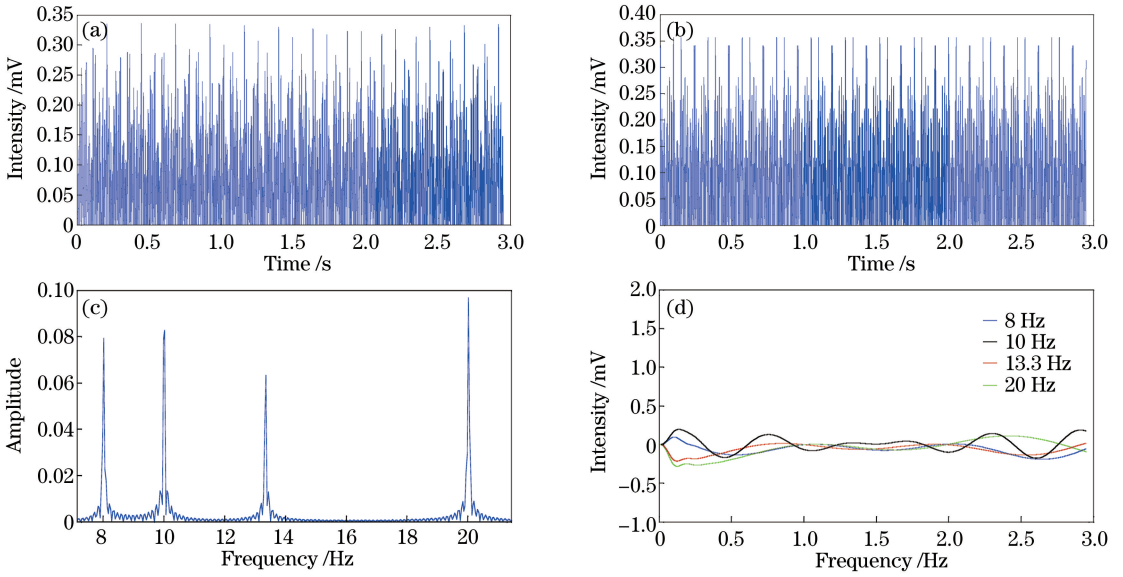


图 8 (a) PMT 采集到的四路混合时域调制信号;(b)模拟得到的四路混合时域调制信号;

(c) PMT 采集到的四路混合荧光信号频谱图;(d)解调 8,10,13.3,20 Hz 的时域细胞强度信号

Fig. 8 (a) Actual four-way mixed time-domain modulated signal collected by PMT; (b) analog four-way mixed time-domain modulated signal; (c) spectrogram of four-way mixed fluorescence signal collected by PMT;

(d) time-domain cell intensity signal corresponding modulation frequency of 8 Hz, 10 Hz, 13.3 Hz and 20 Hz

的荧光能量随时间的变化关系。在医学活体细胞检测中,本系统可以反映出细胞内某些蛋白分子浓度的实时输运及变化过程,对病理研究具有重要意义。

6 结 论

在基于 DMD 的快速集成多通道显微系统中分别加载两路帧率为 $10 \text{ frame} \cdot \text{s}^{-1}$ 和四路帧率为 $40 \text{ frame} \cdot \text{s}^{-1}$ 的视频信号,构建出了两通道和四通道频分复用荧光探测系统,证实了 DMD 快速集成多通道的可行性。实验用 DMD 阵列形成多通道实现并行探测,能够克服传统荧光显微镜或共焦显微镜不能同时多点探测的缺陷,使探测效率成倍增加。相对于传统的机械斩波器或全息聚合物分散液晶(H-PDLC)光栅,采用 DMD 集成的多通道频分复用系统具有易于集成多通道和易于调制信号等优点,该技术为荧光显微探测技术提供了一种更快的集成多通道方式。

参 考 文 献

- [1] Zhu Hao, Guo Hong, Cao Liangcai, *et al.* Design of fluorescence microscope experiments [J]. Research and Exploration in Laboratory, 2011, 30(11): 128-130.
朱昊, 郭宏, 曹良才, 等. 荧光显微镜实验的设计[J]. 实验室研究与探索, 2011, 30(11): 128-130.
- [2] Tiziani H J, Uhde H M. Three-dimensional analysis by a microlens-array confocal arrangement[J]. Applied Optics, 1994, 33(4): 567-572.
- [3] Wu F, Zhang X, Cheung J Y, *et al.* Frequency division multiplexed multichannel high-speed fluorescence confocal microscope[J]. Biophysical Journal, 2006, 91(6): 2290-2296.
- [4] Yang Guanglie. Fluorescence and fluorescence microscope[J]. Optical Instruments, 2001, 23(2): 18-29.
杨广烈. 荧光与荧光显微镜[J]. 光学仪器, 2001, 23(2): 18-29.
- [5] Zheng J, Wang K, Tang P, *et al.* A four-channel frequency division multiplexed fluorescent microscope modulated by holographic polymer dispersed liquid crystal grating array[J]. Liquid Crystals, 2014, 41(4): 585-590.
- [6] Zhang C Y, Li Y P, Ma H, *et al.* Simultaneous multi-parameter observation of Harring tonine-treating HL-60 cells with both two-photon and confocal laser scanning microscopy[J]. Science in China (Series C), 2001, 44(4): 383-391.
- [7] Shi K, Yin S, Liu Z. Wavelength division scanning for two-photon excitation fluorescence imaging [J]. Journal of

- Microscopy, 2006, 223(2): 83-87.
- [8] Tang Pingyu, Zheng Jihong, Sun Guoqiang, *et al.* Experimental study of four-channel frequency division multiplexed fluorescence confocal microscopy[J]. Chinese J Lasers, 2012, 39(11): 1106003.
唐平玉, 郑继红, 孙国强, 等. 四路频分复用荧光共焦显微探测系统实验研究[J]. 中国激光, 2012, 39(11): 1106003.
- [9] Jiang S H, Walker J. Differential high-speed digital micromirror device based fluorescent speckle confocal microscopy [J]. Applied Optics, 2010, 49(3): 497-594.
- [10] 但旦, 雷铭, 姚保利. 基于 DMD 调制和 LED 照明的光学超分辨及光切片显微技术[J]. 光电产品与资讯, 2013, 4(5): 35-37.
- [11] Sheppard C J R, Marthews H J. The extended-focus, auto-focus and surface-profiling techniques of confocal microscope [J]. Journal of Modern Optics, 1988, 35(1): 145-154.
- [12] Jiang Man, Tao Zhenqiang, Jiang Tingjia, *et al.* Development of laser confocal scanning microscopy based on the continuous scanning method[J]. Optical Instruments, 2013, 35(5): 60-65.
姜曼, 陶振强, 蒋庭佳, 等. 基于连续扫描方式的激光共焦扫描显微镜的研制[J]. 光学仪器, 2013, 35(5): 60-65.
- [13] Huang Aiqin, 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.
- [14] Li Dan, Yao Lianfang, Xu Xiyin, *et al.* Design and optimization of a total-internal-reflection prism in the digital micromirror device projection system[J]. Chinese J Lasers, 2012, 39(s2): s216004.
李丹, 姚连芳, 徐西印, 等. 数字微镜器件投影系统的全反射式棱镜设计及系统性能优化[J]. 中国激光, 2012, 39(s2): s216004.
- [15] Adeyemi A A, Barakat N, Darcie T E. Applications of digital micro-mirror devices to digital optical microscope dynamic range enhancement[J]. Optics Express, 2009, 17(3): 1831-1843.
- [16] Refai H H, Sluss J J, Tull M P. Digital micromirror device for optical scanning applications[J]. Optical Engineering, 2007, 46(8): 085401.