

双路频分复用荧光共焦显微探测技术研究

唐平玉 郑继红 曹剑炜 张运波 蒋妍梦 黄爱琴 周增军 庄松林

(上海理工大学光电信息与计算机工程学院, 上海 200093)

摘要 报道了结合频分复用技术来提高荧光共焦生物显微探测系统探测能力的实现原理和方法。通过对双路激发光信号的载频调制,将激发光聚焦到生物样品上产生荧光信号,再通过傅里叶变换、滤波和解调制过程,最后将两路荧光信号强度随时间变化曲线进行还原。实验搭建了紫外波段激励光源的双频复用荧光共焦显微成像系统,并成功探测到了鼠神经海马细胞样品发出的双点荧光信号。频分复用共焦显微成像系统能够多通道、实时、快速地探测生物细胞荧光信号,并具有较高的时间和空间分辨率。

关键词 光学器件;共焦显微;频分复用;荧光显微镜;细胞探测

中图分类号 Q336;Q438 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/LOP48.091801

Two-Channel Frequency Division Multiplexed Fluorescence Confocal Microscopy

Tang Pingyu Zheng Jihong Cao Jianwei Zhang Yunbo Jiang Yanmeng
Huang Aiqin Zhou Zengjun Zhuang Songlin

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

Abstract We present a setup of confocal fluorescence microscopy system combined with frequency division multiplexing so that the detection ability of the system is enhanced. In the proposed frequency division multiplexed confocal fluorescence microscopy (FDMCFM) system, fluorescence is excited on the sample (rat neural cell) by two beams of light modulated individually in two arms of the system. Fourier transform, filtration and demodulation are then carried out to restore the fluorescence intensity signal. The FDMCFM system is experimentally conducted, through which the target cells are detected successfully. The experimental results show that the FDMCFM system is convenient for multiple-channels and real-time detection of biological cells' fluorescence signal. Moreover, it maintains the high spatial and temporal resolution of confocal microscopy.

Key words optical devices; confocal microscopy; frequency division multiplexing; fluorescence microscopy; cell detection

OCIS codes 180.1790; 120.0120; 110.0110; 110.0180

1 引言

激光扫描共焦显微镜(LSCM)是随着光学、视频、计算机等技术的飞速发展而诞生的新一代显微镜,它在研究和分析活细胞结构、分子、离子的实时动态变化过程,组织和细胞的光学连续切片和三维结构重建等方面,具有传统的光学显微镜望尘莫及的能力^[1,2]。频分复用荧光共焦显微镜(FDMCFM)是把频分复用技术应用到荧光共焦显微镜中,采用对激发光信号的载频调制和对荧光信号的分频解调,实现对生物细胞的多

收稿日期: 2011-03-02; **收到修改稿日期**: 2011-04-08; **网络出版日期**: 2011-06-20

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(60801041)、上海市科技启明星项目(10QA1405100)和上海理工大学研究生创新基金(JWCXSL1022)资助课题。

作者简介: 唐平玉(1984—),男,硕士研究生,主要从事信息光学及聚合物分散液晶等方面的研究。

E-mail: longhuitangjia@163.com

导师简介: 郑继红(1975—),女,博士,副教授,主要从事 PDLC 材料及光电器件,信息光学等方面的研究。

E-mail: jihongzheng2002@sina.com

点荧光实时快速探测^[3]。该方法不同于现有的逐点扫描式荧光显微技术,而且不需要昂贵的光电倍增管(PMT)探测器阵列,是用来研究活细胞内部变化的有效工具。

2 基本原理

共焦显微术由 Minsky^[4] 提出并申请了美国专利。在此共焦成像系统中,采用点光源照明样品,并用探测器之前的与光源成共轭关系的孔径来滤去焦外信号,然后利用横向和轴向扫描技术获得整个样品的三维信息,获得了高分辨三维图像。自此以后,共焦显微成像受到人们广泛的关注,新型的共焦成像技术不断涌现。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;1990 年 Strickler 等^[5] 提出将双光子激发现象应用到激光扫描共焦显微镜中,产生了双光子激光扫描显微镜。1992 年 Dabbs 等^[6] 使用单模光纤进行光束传输设计出了反射光纤共焦显微镜。在过去的十几年里又出现了多种类型的共焦显微镜,例如三维数字共焦拉曼显微镜^[7]、光谱编码共焦显微镜^[8]、光纤耦合多路复用共焦显微镜^[9] 以及使用光子晶体光纤产生的超白光作激励光源的彩色共焦显微镜^[10]。这些显微镜的分辨率和反应速度相比之前的显微镜都有很大的提高和改善。近年来国内在显微术领域也有了一定发展,2009 年余卿等^[11,12] 提出基于中心扩散法和光强重组法的激光并行共焦显微系统,2010 年李恒等^[13] 提出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,这些新技术对提高显微系统探测精度、分辨率和反应速度等都有不少贡献。

频分复用荧光共焦显微镜是 2006 年由 Shi 等^[14] 提出的一种新型的显微镜,基本思想就是将通信原理中的频分复用技术运用到显微测量领域,实现快速多信道测量。该技术实现了多通道无扫描多点同时探测,能够实时观察生物活细胞的瞬间动态变化。频分复用技术通常是将用于传输信道的总带宽划分成若干个子信道,每一个子信道传输一路信号,并以并行的方式工作。在荧光共焦显微镜中使用频分复用技术,其基本原理是:将一束激光分为多路,然后这些光束通过光斩波器被调制不同的载波频率(为了在解调的时候能够轻易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,通过傅里叶变换实现荧光信号的解调制,从而区分各点的荧光发射情况。整个过程类似于调频收音机的调制解调。该方法能够有效克服荧光显微镜不能同时多点读取信息的问题,同时还能保持甚至提高荧光显微镜的空间和时间分辨率。根据抽样定理,各信道的时间分辨率主要取决于被调制信号的频率,其极限值取决于荧光信号本身的寿命和光电倍增管的反应时间,最快可能达到纳秒量级。

3 实验系统

最简单的双光路复用荧光共焦实验系统光路图如图 1 所示。首先,激发激光通过扩束准直后通过非偏分光棱镜 BS1 分成两束,每束分别以不同的斩波频率斩波,再用合光棱镜 BS2 合光后进入二向色镜组。激发激光单方向经过物镜会聚于样品两点,产生双点荧光,然后再次被物镜收集,并从二向色镜组出射,进入分光棱镜 BS3,其中一束经过成像透镜将生物细胞成像于 CCD 接收,另外一束经过共焦小孔(本实验用单模光纤代替共焦小孔)后被光电倍增管接收。经过模数转换,信号经数据采集卡后输入电脑并采集和处理数据,解调单路荧光信号强度变化。在该系统中,光电倍增管检测到的实际强度是两个荧光点所发出的荧光光照强度之和,假设荧光光照强度作为时间函数的两个点分别为 $f_1(t)$ 和 $f_2(t)$ 。通过调制后单路荧光光照强度分别为 $f_1(t)\cos(\omega_1 t)$ 和 $f_2(t)\cos(\omega_2 t)$ 。这样光电倍增管检测到的强度信号 $s(t)$ 可以记作

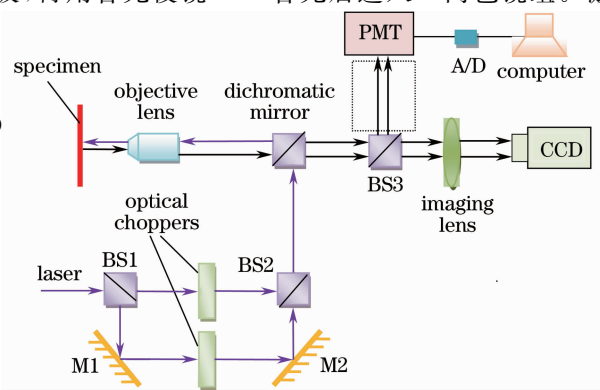


图 1 双路频分复用荧光共焦显微成像光路图

Fig. 1 Optical system of frequency division multiplexed confocal fluorescence microscopy (FDMCFM)

$$s(t) = f_1(t)\cos(\omega_1 t) + f_2(t)\cos(\omega_2 t). \quad (1)$$

信号 $s(t)$ 对应在频域上可表示为 $S(\omega) = F_1(\omega - \omega_1) + F_2(\omega - \omega_2)$ 。光电倍增管输出的信号经过模数转换器,模拟电子信号就被转换为数字信号并传送到数据采集卡上,数据采集卡输出的数字信号被输入电脑,电脑程序对采集到的检测信号进行傅里叶变换,并在频域上使用带通滤波器很容易就把这两路信号分开,最后再通过余弦函数解调制,还原出两点没有被调制的荧光信号。总之,频分复用荧光共焦显微镜是通过对激光光源进行分光调制,然后再对收集到的荧光进行解调来实现对样品的观察和对其发出荧光的测量,实现并行高速探测。

在实验系统中,激发光光源采用了紫外(UV)波段的 405 nm 半导体准直激光器(Dream Laser 公司提供,功率为 20 mW),样品是鼠神经海马细胞切片。激发激光经过准直扩束后产生直径为 10 mm 的平行光束,然后经过局部马赫-曾德尔光路,在光路的两臂中加入双通道斩波器(南京大学微弱信号公司生产的 ND-4 型可变频率双参考光斩波器),将激光分别调制到不同的载波频率,记作 $\omega_1 = 2\pi f_1$ 和 $\omega_2 = 2\pi f_2$,两路频率存在 5 倍关系,即 $f_1 = 5f_2$ 。在马赫-曾德尔光路中,通过调节两个反射镜 M1 和 M2 的微小角度变化,调节两束激发光束的夹角,从而控制样品表面所聚焦的双点荧光之间的距离。双路激发激光信号通过 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),激发激光再通过显微物镜会聚到生物样品上形成双点荧光。所选用的是 40 倍无限远物镜,数值孔径(NA)为 0.65(二向色镜组和无限远物镜均由上海长方光学仪器有限公司提供)。样品所发出的绿色荧光一部分经过成像物镜后所成的像被黑白 CCD 或者彩色 CMOS 摄像接收(由大恒公司提供),另外一部分被高敏感光电倍增管接收(光电倍增管由北京滨松光子生产,型号 CR186,波长范围为 300~650 nm,峰值波长为 420 nm)。荧光信号从 BS3 棱镜分光后在进入 PMT 探测之前,通过了光纤耦合共焦部分,光学系统结构如图 2 所示。由于聚焦到样品上的荧光两点之间距离很小(在微米量级),出射双路荧光首先经过长焦距 300 mm 的傅里叶消色差透镜聚焦,在透镜的频谱面上两聚焦荧光点距离分离至 1~3 mm,然后采用三角光楔棱镜(直角棱镜)将两荧光信号彻底分开(两束光分开的角度约为 65°),再分别通过光纤耦合器。耦合器采用 40 倍聚焦透镜聚焦荧光信号后输入单模光纤,然后将光纤出射端双路信号直接送入光电倍增管探测。在实验中光纤的直径只有 25 μm 左右,相当于小孔的共焦作用。光电倍增管探测后的信号通过数据采集卡完成模数转换(北京阿尔泰科技公司提供的 USB2816),再将数据用 Matlab 软件进行滤波和还原。

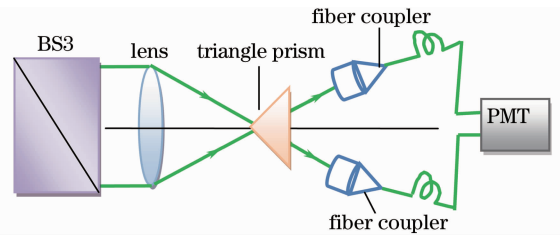


图 2 FDMCFM 系统光纤耦合共焦实现光路图

Fig. 2 Confocal section of FDMCFM

4 结果与讨论

在成像观察部分,由于采用了无限远物镜,平行的荧光光束经过成像透镜聚焦在焦距附近,因此摄像头在成像透镜的焦距附近调节,得到清晰的成像图片。通过对成年鼠神经细胞样品的成像观察,可以得到不同倍率情况下的细胞成像图 3。图中,鼠海马细胞的轮廓清晰可辨,根据常用的分辨率公式,横向分辨率 Δr 表示为

$$\Delta r = 0.61 \frac{\lambda}{NA}, \quad (2)$$

式中 λ 为所激发出的荧光的波长,样品所激发出的荧光中心波长为 530 nm,显微物镜的数值孔径为 0.65,则横向分辨率为 $\Delta r = 0.5 \mu\text{m}$ 。40 倍无限远显微物镜的焦距约为 3.3 mm,光学系统的放大倍率为所采用的成像透镜的焦距同显微物镜焦距的比值,再经过 CCD 成像系统的接收平面的放大可以得到更大的放大倍率。因而,采用相同的 CCD 采集器件,成像透镜焦距越大则系统放大倍率越高。图 3(a)和(b)采用焦距为 250 mm,通光孔径 40 mm 的透镜拍摄。图 3(c)采用焦距为 100 mm,通光孔径为 25.4 mm 的成像透镜拍摄。图 3(d)采用焦距为 120 mm,通光孔径为 70 mm 的大数值孔径(0.583)成像透镜,具备更强大的荧光聚集能力,可以看到箭头所标识的两个明显成像聚焦点。

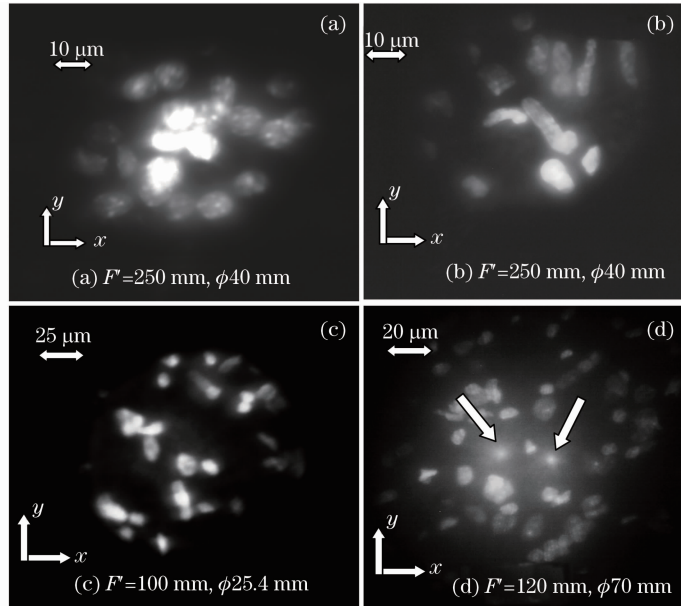


图 3 采用不同成像物镜拍摄的鼠神经细胞显微图

Fig. 3 Rat neural cell pictures taken by FDMCFM system with different imaging lenses

对于共焦探测部分,其横向分辨率同上述描述一致,轴向分辨率则表示为

$$\Delta z = \frac{1.4\lambda\eta}{NA^2}, \quad (2)$$

式中 λ 为所激发出的荧光的波长,样品所激发出的荧光中心波长为 530 nm, η 为所探测样品有效折射率,考虑到 70% 的生物细胞成分是水分子,因此取值为 1.3。显微物镜的数值孔径为 0.65,则系统的轴向分辨率为 $\Delta z \approx 2 \mu\text{m}$ 。

用该系统对两路荧光信号分别以某一载波频率调制后,对生物样品实现双点荧光探测功能。实验中采用了 198 Hz 和 990 Hz 调频信号为例。光电倍增管采集到的应为两路调频信号的叠加。图 4 是双路调频荧光信号的模拟和实验结果图。图 4(a) 是利用 Matlab 软件模拟 198 Hz 和 990 Hz 的正弦和频信号,图 4(b) 是光电倍增管实际测量的荧光强度图。通过比较可以看到,由于机械振动和光电倍增管等噪声信号,实际探测的荧光强度变化与理想强度形状基本一致,但也略有不同。然后对所采集的双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。从图中可见,198 Hz 和 990 Hz 的频谱信号明显,在 198 Hz 的三倍频 600 Hz 左右的位置可见其倍频信号,在其他频谱位置可见一些干扰信号的频谱信号。将采集到的双路荧光信号进行滤波后再进行傅里叶变换,得到频率域的频谱分布如图 5(b) 所示。从图中可见,频谱信号在去除噪声后更加明显。经过对所需要频率信号的挑选滤波,然后做逆傅里叶变换,得到 198 Hz 和 990 Hz 调频位置处的双点荧光强度随时间变化曲线如图 6 所示。从图中可见两条荧光变化曲线幅度不同,但是两点荧光信号强度变化很小。事实上,荧光强度与细胞中激发光聚焦点所在位置的某种蛋白质浓度有关。在激

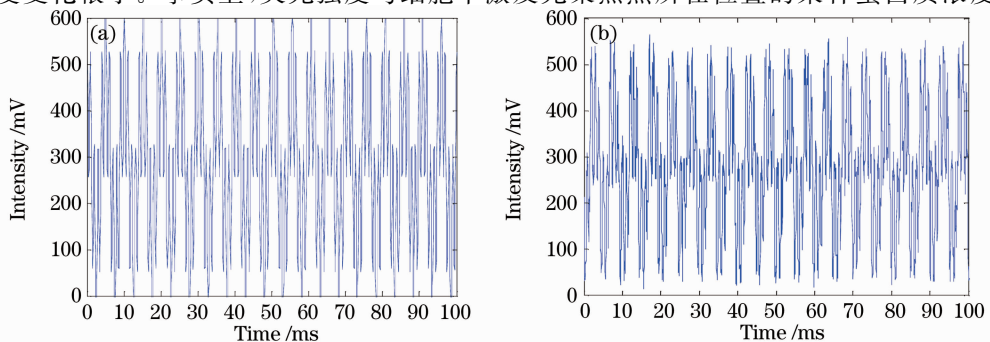


图 4 (a) 对 PMT 采集信号的模拟; (b) 实际采集的信号

Fig. 4 (a) Simulation of signals collected by PMT; (b) signals collected in experiment

发激光能量相同且共焦光纤耦合效率相同的情况下,不同的荧光细胞,甚至同一细胞不同位置,只要该种荧光蛋白浓度存在差异,就会产生荧光强度的不同。假设 FDMCFM 系统中分光棱镜是严格等幅度分光的,则图 6 反映出 198 Hz 荧光点处荧光蛋白浓度比 990 Hz 聚焦点处稍高。另外,鼠神经细胞样品是死细胞,198 Hz 和 990 Hz 两条曲线所反应出来的荧光强度变化都只出现了小幅度起伏,但整体强度变化趋势平缓,这符合荧光变化的实际。如果是活细胞实验,例如探测鼠心肌细胞内的 Ca 离子浓度随时间的变化,多点探测将反应出细胞上各个地方荧光点强度的变化,因此探测将更加有意义。

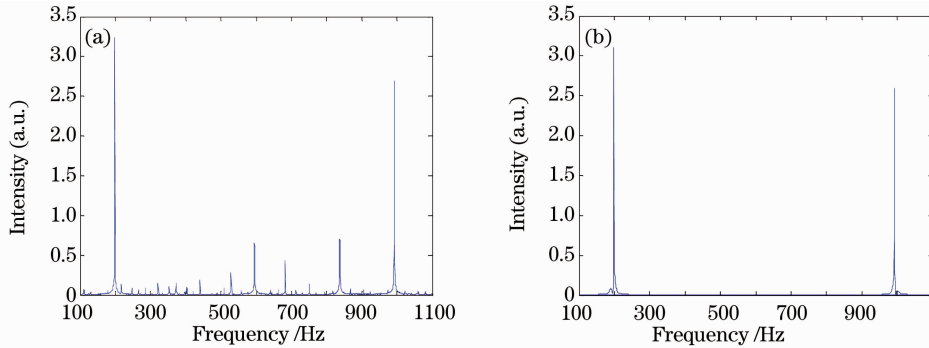


图 5 (a)采集信号的傅里叶变换频谱图(198 Hz 和 990 Hz);(b)采集信号经滤波后的傅里叶变换频谱图(198 Hz 和 990 Hz)

Fig. 5 (a) Detected signals in frequency domain (198 Hz and 990 Hz); (b) filtered signals in frequency domain (198 Hz and 990 Hz)

双路 FDMCFM 实验系统不仅拍摄了鼠神经海马细胞的荧光显微图片,同时还将样品上聚焦两点位置处的荧光能量量化指标随时间的变化用曲线体现出来。图 3 拍摄了不同形态的海马细胞,反映了不同形态的细胞核形貌,如锥形的,圆球型的,叠加在一起的,弥散分开的等。而图 6 则是调制解调得到的两根曲线,分别代表 198 Hz 和 990 Hz 加载频率的两点所发出的荧光强度随时间变化曲线。根据抽样定理,实验系统中单个信道的的时间分辨率分别为 10.1 ms 和 2.0 ms。

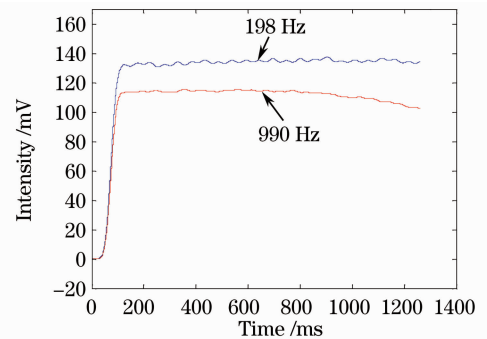


图 6 解调后的双点荧光图谱

Fig. 6 Demodulated curves of fluorescence intensity versus time

5 结 论

频分复用荧光共焦显微镜结合了频分复用技术的优势,能实现多信道并行探测,有效提高荧光共焦显微系统的工作效率。但是,在目前最简单的双通道的实验系统中,仍然存在一些可以改进的地方。例如,采用提高显微物镜数值孔径的方法(最大可以达到 1.4 左右),可以有效提高分辨率;将由棱镜分光改成光纤分光和光纤集光可以更轻松地实现多路分光,有利于荧光信号的收集和处理,并有利于系统的小型化和集成化。对于多光束激发激光的频率调制如果采用电控液晶器件调频代替机械式光斩波,将有利于提高调制和控制的精度。

参 考 文 献

- 1 Paul Davidovits, M. David Egger. Scanning laser microscope[J]. *Nature*, 1969, **223**(5208): 831
- 2 Pawley J.. Handbook of Biological Confocal Microscopy[M]. New York: Plenum Press, 1988
- 3 Fei Wu, Xueqian Zhang, Joseph Y. *et al.*. Frequency division multiplexed multichannel high-speed fluorescence confocal microscope[J]. *Biophys. J.*, 2006, **91**(6): 2290~2296
- 4 Minsky M.. Microscopy Apparatus[P]. US patent: 30133467, 1961
- 5 Denk J. H. Strickler, W. W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, **248**(4951): 73~76

- 6 Tim Dabbs, Monty Glass. Fiber-optic confocal microscope; FOCON[J]. *Appl. Opt.*, 1992, **31**(6): 3030~3035
- 7 Anurag Govil, David M. Pallister, Michael D. Morris. Three-dimensional digital confocal Raman microscopy[J]. *Appl. Spectrosc.*, 1993, **47**(1): 75~79
- 8 G. J. Tearney, R. H. Webb, B. E. Bouma. Spectrally encoded confocal microscopy[J]. *Opt. Lett.*, 1998, **23**(15): 1152~1154
- 9 Charles P. Lin, Robert H. Webb. Fiber-coupled multiplexed confocal microscope[J]. *Opt. Lett.*, 2000, **25**(13): 954~956
- 10 Kebin Shi, Peng Li, Shizhuo Yin *et al.*. Chromatic confocal microscopy using supercontinuum light[J]. *Opt. Express*, 2004, **12**(10): 2096~2101
- 11 Yu Qing, Yu Xiaofen, Bi Meihua. Research on high-precision acquisitive method of surface coordinate information based on parallel confocal microscopy[J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(11): 3058~3060
余 卿, 余晓芬, 毕美华. 并行共焦显微探测高精度表面坐标信息获取方法[J]. *光学学报*, 2009, **29**(11): 3058~3060
- 12 Yu Xiaofen, Yu Qing, Wang Yonghong *et al.*. Parallel Confocal Microscope Detective System with Multiple Light Source [P]. Publication Number: CN 101666620A, 2010
余晓芬, 余 卿, 王永红 等. 多光源并行共焦显微探测系统[P]. 专利公开号: CN 101666620A, 2010
- 13 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): 1241~1244
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): 1241~1244
- 14 Kebin Shi, Shizhuo Yin, Zhiwen Liu. Wavelength division scanning for two-photon excitation fluorescence imaging[J]. *J. Microscopy*, 2006, **223**(2): 83~87