

荧光相位成像的光束扫描法*

丁 刚 景春阳 肖 玲 蒋建华 张桂燕 林福成
(中国科学院上海光学精密机械研究所, 上海 201800)

摘 要 利用计算机控制振镜进行光束扫描, 用锁相放大器进行增益调制与相位调节, 最后再用计算机重建图像, 实现钛宝石和红宝石的相位成像。分别完成了激发光和荧光相移为 $\pi/12$ 、 $\pi/4$ 和 $7\pi/12$ 的成像, 分析了系统的时间分辨率和空间分辨率, 提出了实用化发展的方向。

关键词 荧光相位成像, 振镜扫描, 图像重建。

荧光相位成像^[1]是 90 年代发展起来的新技术, 它在许多领域中有着重要的应用。例如, 利用荧光相位成像可以实时地分析细胞中 Ca^{2+} 的浓度^[2]; 利用液晶调制器加工业电视机进行实验, 可以得到微秒量级的时间分辨率的像。本文则利用计算机控制振镜进行光束扫描, 用锁相放大器进行增益调制与相位调节, 最后再用计算机重建图像, 完成相位成像。

1 荧光波形和锁相接收

设激发光为余弦调制, 其波形为 $p(t) = p_0[1 + \cos(\omega t)]/2$, 荧光波形为 $f(t)$, 则有

$$df(t)/dt = kp(t) - f(t)/\tau \quad (1)$$

其中 τ 为弛豫时间。其解为

$$f(t) = [pok\tau/2(1 + \omega^2\tau^2)^{1/2}] \cos[\omega t - \arctan(\omega\tau)] + pok\tau/2 \quad (2)$$

其幅度 $pok\tau/2(1 + \omega^2\tau^2)^{1/2}$ 随 ω 的增加而减少, $\arctan(\omega\tau)$ 反应了荧光对激发光的位相滞后, 在 $\omega\tau \sim 1$ 时为弧度的量级。不同荧光寿命的样品, 荧光有不同的位相滞后。

锁相放大器的输出结果为:

$$V_o = R \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T V_i(t) V_r(t - \tau) dt \quad (3)$$

R 为锁相放大器的放大系数。 V_i 、 V_r 和 V_o 分别为输入、参考和输出信号。当参考信号为与输入同频率的方波时, 锁相放大器输出为

$$V_o = 2RV_i' \cos(\varphi - \varphi_0)/\pi \quad (4)$$

V_i' 为输入信号幅度值, φ 为参考信号与输入信号的相位差, φ_0 为锁相放大器引入的相位差, 可在 $0 \sim 2\pi$ 之间连续可调。调节 φ_0 便可测出 φ 的大小, 对不同的 φ 也可通过调节 φ_0 使得特

* 国家自然科学基金资助课题。

收稿日期: 1998-01-09; 收到修改稿日期: 1998-03-23

定 φ 对应的信号得到放大。这就是位相成像的基本原理。

2 实 验

图1为实验框图。斩波器对激发光进行调制,并将同步信号作为参考信号引入锁相放大器。

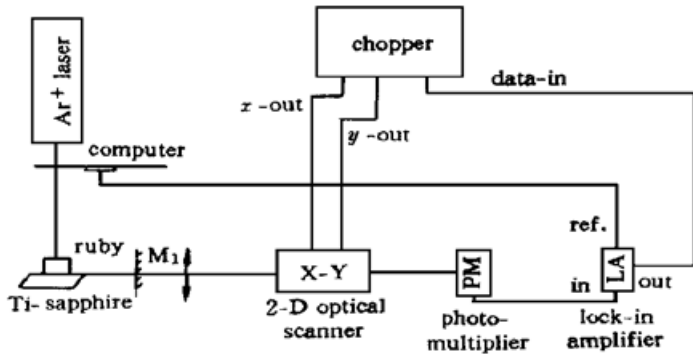


Fig. 1 Schematic diagram of experiment

器。光电倍增管的窗口为 1 mm^2 的小孔。振镜系统使荧光所成的像在光电倍增管的接收面上作二维扫描,即相当于以 1 mm^2 为采样单元对荧光的像进行采样。实际实验中样品经过透镜成的像大小约为 $10\text{ cm} \times 10\text{ cm}$,因此采样数目为 100×100 。锁相放大器输出的信号被采集到计算机中进行图像重建,并对扫描产生的畸变进行修正。 M_1 为 $480\sim 520\text{ nm}$ 的 0° 全反镜,用于取消氩离子杂散光的影响。

实验采用的样品为红宝石($\text{Cr}^{3+} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$)和钛宝石($\text{Ti}^{3+} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$)激光晶体,它们的荧光寿命分别为 4 ms 和 $3\ \mu\text{s}$,两者相差三个量级。斩波器的频率为 130 Hz ,则红宝石的位相滞后约为 0.4π ,而钛宝石约为 0.001π 。因钛宝石的荧光效率比红宝石要大几个量级,实验中泵浦光是经过红宝石和衰减片注入到钛宝石中的。

图 2 至图 5 为实验结果。图 2 至图 4 是计算机重建的三维曲线图 (z 轴表示光强)。

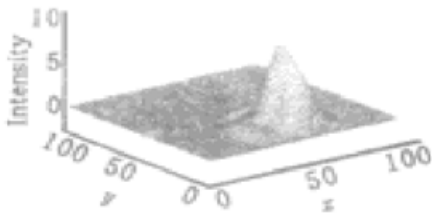


Fig. 2 Phase shift: $\pi/12$

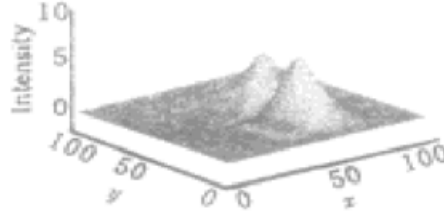


Fig. 3 Phase shift: $\pi/4$

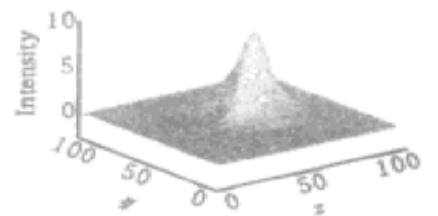


Fig. 4 Phase shift: $7\pi/12$

图 5 为对应的灰度图。上方为红宝石像而下方为钛宝石像。从图中可以看出,红宝石像和钛宝石像的变化正如所期望那样,当锁相放大器引入相移逐渐变大时,钛宝石像变亮而红宝石像则变暗。得到的相位与理论计算的差值缘于斩波器输出的同步信号与激发光的调制之间的相位差。



Fig. 5 Gray-level image

结 论 作为原理性实验,本实验已很好地验证了荧光相位成像的原理,并有着一定的应用前景。比如,本实验室对成像光束进行扫描已期得到一定的空间分辨率,但实用中也可对泵浦激光进行扫描,而可用于分析大面积宏观目标,得到其各组份的空间分布信息。本实验通过测量荧光的位相滞后来测量弛豫时间,即:

$$\varphi = \arctan(\omega\tau), \quad \text{或} \quad \tau = (\tan \varphi) / \omega \tag{5}$$

因此,

$$d\tau = d \tan \varphi / \omega = \frac{\sec^2 \varphi}{\omega} d\varphi \geq \frac{1}{\omega} d\varphi \tag{6}$$

锁相放大器最小相移刻度为 5° , 即 $\pi/36$, 斩波器的调制频率为 130 Hz, 代入到(6)式中, 可得能分辨的时间约为 0.1 ms, 即亚毫秒量级。从实用角度来看这显得略差一点, 实际中可以使用高速开关来代替斩波器, 例如用克尔开关和像增强器便可轻易地得到微秒量级的分辨率。

参 考 文 献

- [1] Lakowicz J R, Berndt K W. Lifetime-selective fluorescence imaging using an rf phase-sensitive. *Rev. Sci. Instrum.*, 1991, **62**(7): 1727~ 1734
- [2] Lakowicz J R. Fluorescence lifetime sensing generates cellular images. *Laser Focus World*, 1992, **28**(5): 60~ 80

Fluorescence Phase-Sensitive Imaging with Beam Scanning

Ding Gang Jing Chunyang Xiao Ling Jiang Jianhua
Zhang Guiyan Lin Fucheng

(Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

(Received 9 January 1998; revised 23 March 1998)

Abstract Employing computer to control optical scanners and lock-in amplifier to modulate gain and shift phase, a fluorescence phase-sensitive imaging system has been investigated for ruby and Ti-sapphire experimentally. The images with phase shift of $\pi/12$, $\pi/4$, and $7\pi/12$ were obtained. The time resolution and the space resolution, as well as the practicality, of the system are analyzed.

Key words fluorescence phase-sensitivity imaging, optical scanner, image reconstruction.