

时域两维荧光寿命显微测量研究

屈军乐 牛憨笨 李 冀 赵慧娟 陈晓颖

(中国科学院西安光学精密机械研究所, 西安 710068)

摘 要 提出了一种新的时域两维荧光寿命显微测量技术, 建立了一套荧光寿命成像显微系统, 介绍了这种测量技术的数据处理方法。用标准样品对该系统进行了测试, 实验表明, 该系统的时间分辨率为 2 ps, 在放大倍率为 100 倍的情况下, 该系统的空间分辨率为 8 μm 。如果在现有的设备下采用更细的网格板和微位移系统, 那么该系统的空间分辨率可小于 1 μm 。

关键词 荧光寿命, 皮秒同步扫描相机, 荧光寿命成像显微技术, 网格板。

1 引 言

时域法在荧光寿命成像显微技术中的应用一般受到很大的限制, 这是因为时域法主要包括时间相关单光子计数法^[1]和脉冲取样法^[2]。对时间相关单光子计数法而言, 由于要将样品在两维平面上移动, 因而系统非常复杂, 测量时间长, 样品在激光辐射下暴露的时间长, 所以很不利于对活体生物样品的测量。脉冲取样法对荧光寿命在数十纳秒的测量比较简单, 但如果荧光寿命只有几个纳秒, 那么就存在很大的困难, 因为大多数商用像增强器^[2]的门脉冲的宽度最短也只能达到几个纳秒。并且对这两种测量方法而言, 如果激发光脉冲的宽度与荧光寿命的值相差不多, 则应对所得到的结果进行解卷积, 所需数据处理的时间也很长。

本文提出了一种新的时域两维荧光寿命显微测量技术, 从而将同步扫描相机引入荧光寿命成像显微技术的研究, 建立了一套基于皮秒同步扫描相机的时域两维荧光寿命显微测量系统。这种测量技术很好地解决了目前在荧光寿命成像显微技术应用领域中所存在的问题。用标准样品对该系统进行了测试, 实验表明, 系统的时间分辨率为 2 ps。在系统的放大倍率为 100 倍的情况下, 该系统的空间分辨率为 8 μm 。并且随着放大倍率的增大, 选用更细的网格板, 采用微位移系统, 空间分辨率可达到小于 1 μm 。

2 时域两维荧光寿命显微测量技术及系统

同步扫描相机是这种时域两维荧光寿命显微测量技术的核心, 为此专门研制了一台皮秒同步扫描相机。该相机的特点是用一网格板代替了扫描相机前的狭缝^[3], 这样完全不用移动样品或相机, 只需经过一次测量, 就可以得到样品的荧光寿命显微图像。我们所建立的时域两维荧光寿命显微测量系统的框图^[4]如图 1 所示。其工作原理如下: 激发光源为 Ar^+ 抽运钛

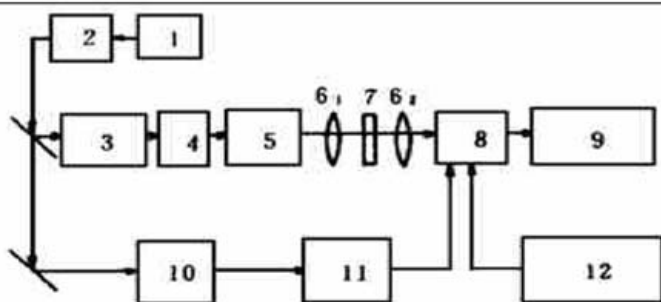


Fig. 1 Time-domain 2-dimensional fluorescence lifetime microscopic measurement system. 1. Argon Laser, 2. Ti:sapphire laser, 3. KDP crystal, 4. sample, 5. optical microscope, 6. relay lens, 7. aperture mask, 8. synchroscan streak tube, 9. CCD real-time readout system, 10. PIN, 11. synchroscan circuit, 12. DC working voltage

宝石激光器, 锁模在 800 nm, 光脉冲重复频率为 85.7 MHz 左右, 脉宽小于 100 fs。出射光被分光镜分为两束, 其中强度较强的一束为主光束, 经倍频后去激发样品。显微镜收集样品的荧光辐射, 并将样品放大的荧光显微像成到中继透镜 I 的物面上。该中继透镜将样品的荧光显微像成到网格板上, 网格板的示意图见图 2, 其中的小孔通光, 其它部分不透光。所采用网格板的小孔尺寸为 0.1 mm, 间距为 0.8 mm。该网格板将样品的荧光显微像离散, 然后经中继透镜 II 转成到扫描相机的光电阴极上, 于是不同的离散点在扫描管的荧光屏上对应一个亮点。当相机处于扫描状态时, 样品的每一离散点都在荧光屏上给出一扫

描线。这个扫描线就对应样品上该点的荧光强度的衰减变化。读出该点的扫描数据, 就可以对该点的荧光衰减进行必要的拟合处理, 如果对各离散点的测量数据逐点进行拟合, 并对所得结果进行插值处理, 那么就可以获得样品的荧光寿命显微像。另一路强度较弱的光束为触发光束, 用于触发 PIN 光电二极管。PIN 光电二极管产生与激发光脉冲重复频率相同的电脉冲序列。该电脉冲序列经选频放大、预放和功放后, 通过阻抗变换器产生一高压正弦波扫描信号, 加到相机的扫描系统上。在正弦波信号过零点的 $\pm\pi/4$ 范围内正弦函数近似为线性函数, 其偏离线性函数的误差小于 5%。在电路中引入一可变延时器以控制荧光信号与扫描信号的同步。经 CCD 实时读出系统对信号进行实时记录, 并用计算机对测量数据进行处理。在测量中, 为了避免不同扫描线之间的重合, 需将网格板旋转一个合适的角度。

在对测量结果进行处理时, 应对网格板上各离散点逐点进行。为此, 编制了特殊用途的数据处理软件^[4], 该软件在处理上分为三步。第一步, 依据扫描线的灰度变化, 对各离散点进行定位, 然后从样品离散的扫描图像上读取数据, 其中对各离散点的定位是一个关键; 第二步, 对读取的数据进行拟合和误差分析, 根据实验样品的不同, 可采用不同的数学模型对测量数据进行拟合, 一般采用负指数函数, 并且一般最多三组分即可满足大多数要求; 第三步, 对所拟合的结果进行插值处理, 将样品各点的荧光寿命以图像的形式显示出来。如果样品中的某个参数如 PH 值、 Ca^{2+} 浓度等与荧光寿命有确定的函数关系, 那么还可显示出样品中该参数的微观分布。另外, 还可动态地显示出样品在受到激发后不同时刻荧光强度的显微图像, 从而对它的衰减情况进行动态观察。这个优点是其它实验方法所不具备的, 它对荧光寿命显微像的理解也是一个很好的补充。因为从强度像上可以反映出样品中染色剂的分布, 该信息在荧光寿命显微像上是无法得到的。

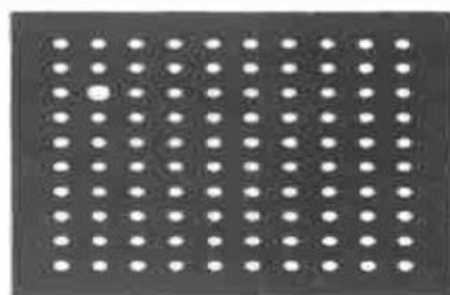


Fig. 2 Aperture mask

3 实验结果及讨论

为了评价这种技术及该系统的性能, 作者用标准样品对系统进行了测试。实验的原理框图如图 1 所示。在实验前对皮秒同步扫描相机进行了标定, 相机的时间分辨率为 2 ps, 沿狭缝方向的动态空间分辨率为 20 lp/mm。

采用奎宁的硫酸溶液作为标准样品。由于奎宁的硫酸稀溶液的荧光寿命长期稳定, 它只受溶液中 Cl^- 浓度的影响(这里我们采用 Cl^- 作为猝灭剂), 并且这种影响有一个定量关系, 满足 Stern-Vomer 关系式^[5], 即:

$$\tau = \tau_0 / (1 + 161C_N), \quad (1)$$

式中, τ_0 是不加猝灭剂时奎宁的荧光寿命(ns), C_N 是 NaCl 的浓度(mol/m^3), τ 是加入猝灭剂 NaCl 时奎宁的荧光寿命。因此可以配制一系列 Cl^- 浓度不同的奎宁硫酸溶液作为具有不同荧光寿命的标准样品^[5]。

实验中, 配制了荧光寿命为 189.04 ps 的溶液, 奎宁浓度为 $5.0430 \times 10^{-3} \text{ mol}/\text{m}^3$, Cl^- 的浓度为 $0.6148 \text{ mol}/\text{m}^3$, H_2SO_4 的浓度为 $0.05 \text{ mol}/\text{m}^3$ 。

图 3 和图 4 分别为样品的静态离散图像及其动态扫描图像。用所编制的数据处理软件对图 4 中的矩形扫描区进行了处理。

图 5 给出了样品在该区域内的荧光寿命显微图像及其三维表示。图 6 是归一化后的荧光强度的显微图像及其三维表示。

从图 5 和图 6 可见, 尽管样品中各点荧光强度的变化范围比较大, 但荧光寿命在某一个平均值左右有一非常小的变化, 反映了样品的实际情况。这里荧光寿命的起伏变化主要是由于 CCD 的统计涨落所引起。样品各点荧光寿命的平均值为 193.0753 ps, 与实际的荧光寿命值非常接近, 计算的标准差为 4.6052 ps。为了直观地看到样品在受到激发光激发后不同时刻荧光强度的衰减情况, 图 7 给出了样品在受到激发后不同时刻的 9 幅荧光强度显微图像, 各图像之间的时间间隔为 20 ps。

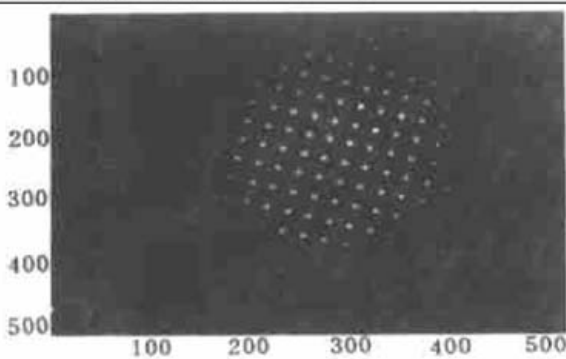


Fig. 3 Static image of the sample

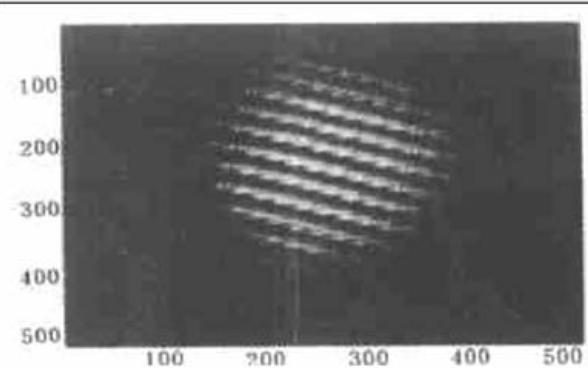


Fig. 4 Dynamic streak image of the sample. (a) Fluorescence lifetime microscopic image of the sample, (b) 3-D demonstration of the fluorescence lifetime image

由于采用了小孔尺寸为 0.1 mm, 小孔间距为 0.8 mm 的网格板, 而系统的放大倍率为 100 倍, 因此折算到样品上, 小孔的大小为 $1 \mu\text{m}$, 间距为 $8 \mu\text{m}$, 表明整个系统的空间分辨率为 $8 \mu\text{m}$ 。如果采用放大倍率更大的显微镜, 采用间距更小(如 $400 \mu\text{m}$)的网格板, 那么整个系统的空间分辨率将更高。

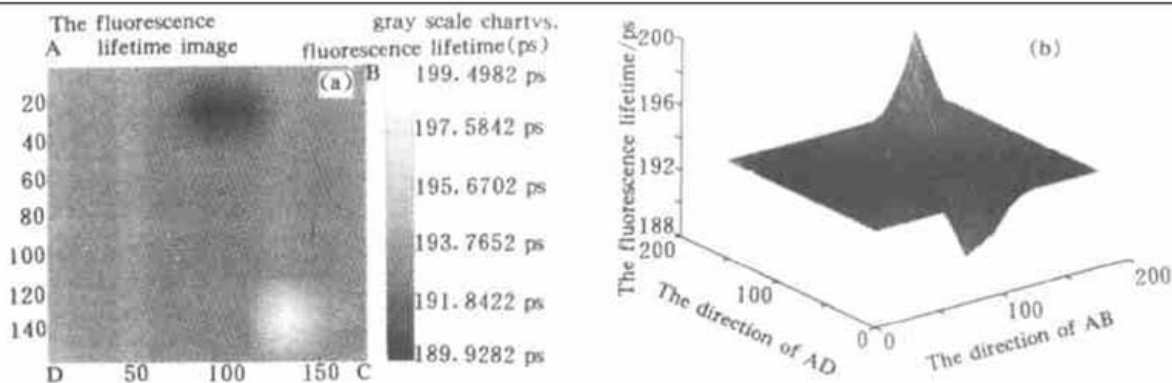


Fig. 5 Fluorescence lifetime image of the sample and its 3-D demonstration. (a) Normalized fluorescence intensity image of the sample, (b) 3-D Demonstration of the fluorescence intensity image

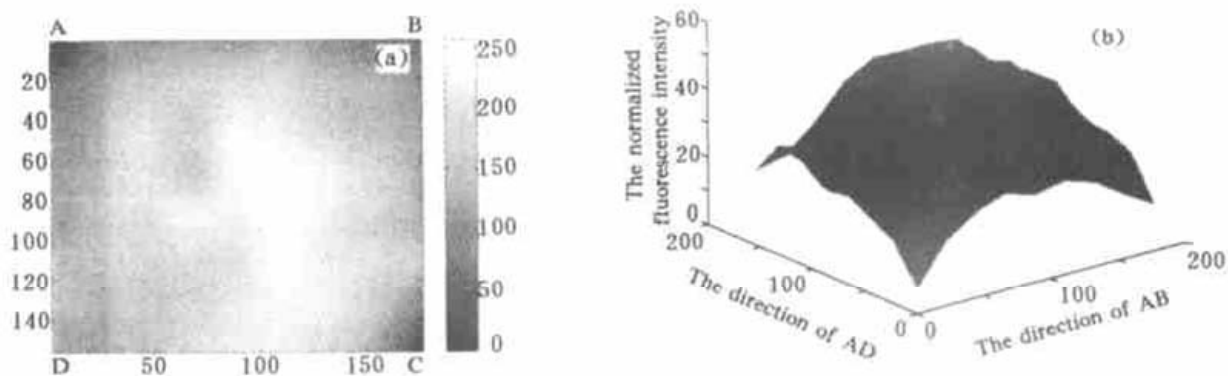


Fig. 6 Normalized fluorescence intensity image of the sample and its 3-D demonstration. (a) Normalized fluorescence intensity image of the sample 3-D demonstration of fluorescence intensity, (b) 3-D demonstration of the fluorescence intensity image

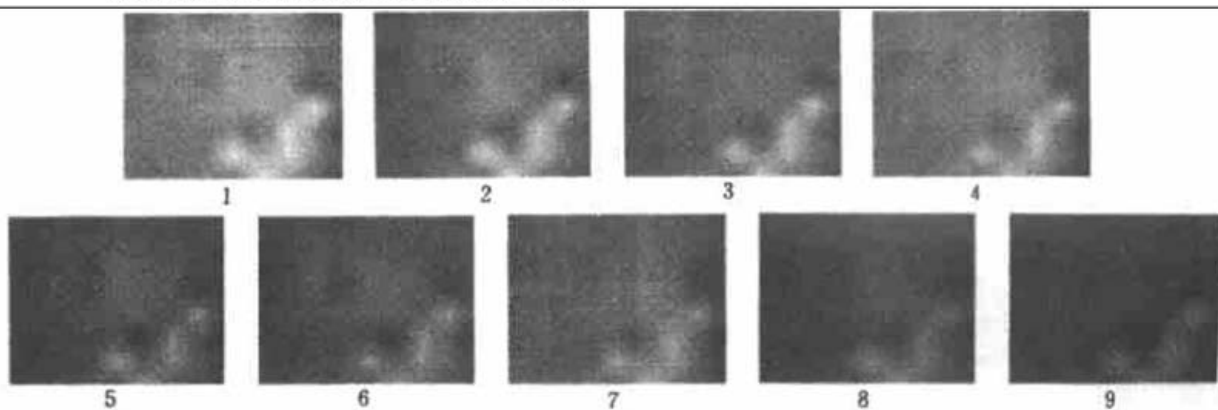


Fig. 7 Decay process of the sample fluorescence intensity (time difference of adjacent images is 20 ps)

结束语 本文所提出的时域二维荧光寿命显微测量技术是实现荧光寿命成像显微技术的一种新方法。与其它的时域法相比，这种测量方法的优点是：

- 1) 测量时间短，非常有利于活体生物组织的测量；
- 2) 对不同荧光寿命值的测量，只须改变相机的扫速，操作非常方便；
- 3) 对系统几乎不做任何改动，就可以很方便地进行光谱测量，这对荧光寿命成像显微技术来说是一个很好的补充；
- 4) 系统的探测灵敏度非常高，尤其是采用双微通道板增强的同步扫描相机，可将系统的探测阈值大大降低；

5) 本文的创新之处在于, 用网格板代替了扫描相机前的狭缝, 这样做虽然牺牲了一部分空间信息, 但却使相机具有二维的空间分辨本领, 同时还具有一维的时间分辨本领, 并且损失的空間的信息可通过插值的方法得以恢复。正因为这一独特的优点, 使得我们可以给出样品在受到激发后不同时刻的荧光强度显微图像, 从而对荧光发射这一动态过程有更深入的了解。

参 考 文 献

- [1] Wang X F, Kitajima S, Uchida T *et al.*. Time-resolved fluorescence microscopy using multichannel photon counting. *Appl. Spectrosc.*, 1990, **44**(1): 25~ 30
- [2] Wang X F, Uchida T, Coleman D M *et al.*. A two-dimensional fluorescence lifetime imaging system using a gated image intensifier. *Appl. Spectrosc.*, 1991, **45**(3): 360~ 366
- [3] Niu H, Chao T, Sibbett W. Picosecond framing technique using a conventional streak camera. *Rev. Sci. Instrum.*, 1981, **52**(8): 1190~ 1192
- [4] 屈军乐. 荧光寿命成像显微技术的理论与实验研究:[博士论文]. 西安: 中国科学院西安光学精密机械研究所, 1998.
- [5] Chen R F. Fluorescence lifetime reference standards for the range 0.189 to 115 nanoseconds. *Analytical Biochemistry*, 1974, **57**(3): 593~ 604

A Study of Time-Domain 2-Dimensional Fluorescence Lifetime Microscopic Measurement

Qu Junle Niu Hanben Li Ji Zhao Huijuan Chen Xiaoying

(Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Xi'an 710068)

(Received 10 May 1999; revised 12 July 1999)

Abstract A new technique of time-domain 2-dimensional fluorescence lifetime microscopic measurement is presented. A fluorescence lifetime imaging microscope system and data processing method of this technique are described. Reference sample is used to test the system. Experimental results show that the temporal resolution of the system is 2 ps. When magnification of the microscope is 100, the spatial resolution is 8 μm . When a finer mask and a micro-shift-mechanical system are used, spatial resolution of less than 1 μm can be obtained.

Key words fluorescence lifetime, picosecond synchroscan streak camera, fluorescence lifetime imaging microscopy, aperture mask.