

文章编号: 0253-2239(2006)03-0373-6

## 用于双光子激发荧光寿命显微成像的 高重复频率皮秒扫描相机\*

刘立新<sup>1,2,3</sup> 屈军乐<sup>3</sup> 林子扬<sup>3</sup> 陈丹妮<sup>3</sup> 胡涛<sup>3</sup> 郭宝平<sup>3</sup> 牛憨笨<sup>3</sup>

1 中国科学院西安光学精密机械研究所, 西安 710068  
2 中国科学院研究生院, 北京 100049  
3 深圳大学光电子学研究所, 深圳 518060

**摘要:** 建立了一台基于新研制的高重复频率皮秒扫描相机的双光子激发荧光寿命显微成像系统, 重点介绍所研制的高重复频率皮秒扫描相机。为了在高时间分辨力的同时扩大时间测量范围, 实现大面积二维空间高时间分辨取样测量, 从而提高采样速率和更有效地发挥扫描相机的作用, 设计和研制了一种大面积、高时间分辨力扫描像管和一种重复频率高达 1MHz 的斜坡电压扫描电路。基于上述关键部件所研制的扫描相机具有重复频率高、扫描速度可调、时间分辨力高、工作面积大、非线性低、触发抖动小等优点。用钛宝石飞秒激光器作为激光脉冲源, 通过脉冲提取器将 76 MHz 的高重复频率降低为 1 MHz, 采用可调延时器和标准具对扫描相机的时间分辨力、扫描速度和非线性进行标定。该系统的时间分辨力达到 6.5 ps, 非线性为 2.60%, 可测量的时间范围从十几皮秒到几十纳秒。测量了若丹明 6G 和香豆素 314 两种标准荧光染料的荧光寿命, 取得了与参考文献一致的实验结果。

**关键词:** 成像系统; 皮秒扫描相机; 荧光寿命成像; 时间分辨力; 扫描速度; 非线性; 标准具

中图分类号: TB872; O433 文献标识码: A

## A High Repetition Rate Picosecond Streak Camera for Two-Photon Excited Fluorescence Lifetime Microscopic Imaging

Liu Lixin<sup>1,2,3</sup> Qu Junle<sup>3</sup> Lin Ziyang<sup>3</sup> Chen Danni<sup>3</sup> Hu Tao<sup>3</sup> Guo Baoping<sup>3</sup> Niu Hanben<sup>3</sup>

1 *Xian Institute of Optics and Precision Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Xian 710068*  
2 *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049*  
3 *Institute of Optoelectronics, Shenzhen University, Shenzhen 518060*

**Abstract:** A two-photon excited fluorescence lifetime microscopic imaging system based on a newly-developed high repetition rate picosecond streak camera is presented. The high repetition rate picosecond streak camera is the emphasis for introduction. In order to increase the measurable sweeping range and maintain high temporal resolution as well, and in order to realize high temporally resolved sampling measurement in two dimensions to improve sampling speed and exploit effectively the advantages of the streak camera, authors specially designed and developed a streak image tube with large area and high temporal resolution and a ramp voltage streak circuit with repetition rate up to 1 MHz. The streak camera based on the key components above mentioned is characterized with high repetition rate, tunable sweep rate, high temporal resolution, large effective area of work, low nonlinearity and small triggering jitter. A Ti:sapphire laser provides mode-locked, ultrafast femtosecond pulses with a fundamental frequency of 76 MHz which is reduced to 1 MHz with a pulse picker. The temporal resolution, sweep rate and nonlinearity are calibrated with a tunable delay generator and etalons. Temporal resolution of the system is 6.5 ps, nonlinearity is 2.60%, and the measurable time range is from ten picoseconds to tens of nanoseconds. Streak images of Rhodamine 6G and Coumarin 314 are obtained and the results agree well with those reported in the literatures.

**Key words:** imaging system; picosecond streak camera; fluorescence lifetime imaging; temporal resolution; sweep speed; nonlinearity; etalon

\* 国家自然科学基金(60138010, 60408011)资助课题。

作者简介: 刘立新(1977~), 女, 河北保定人, 中国科学院西安光学精密机械研究所博士研究生, 主要从事生物医学光子的研究。E-mail: lilyliulixin@163.com

收稿日期: 2005-05-23; 收到修改稿日期: 2005-08-15

## 1 引 言

双光子激发荧光寿命测量和成像提供了荧光分子所处微环境的信息,而且测量信号具有高的时间和空间分辨力和好的图像信噪比,该技术已经在生物物理、生物化学以及临床医学诊断等领域获得了广泛的应用<sup>[1,2]</sup>。由于荧光寿命和许多分子过程,如猝灭、扩散等的弛豫时间类似,因此成为研究近代科学许多领域超快现象<sup>[3]</sup>的主要手段,并发展了多种超快速测量技术,如门控探测法(Time-gated detection)<sup>[4]</sup>和时间相关单光子计数法(Time correlated single photon counting, TCSPC)<sup>[5,6]</sup>。最近几年,基于扫描相机的荧光寿命测量和成像方法<sup>[7]</sup>(Streak fluorescence lifetime imaging-streak, FLIM)逐渐发展起来,并显示出强大的优势:扫描相机能同时获得光脉冲的一维空间或一维光谱信息以及时间结构信息,时间分辨力高、信息利用率高、测量时间短、能够记录荧光衰减的全过程,而且适合于高重复频率微弱荧光信号的测量<sup>[8]</sup>。但以往采用正弦波扫描电路的同步扫描相机无法同时满足生物医学研究在扫描量程、时间分辨力、扫描速度可调等方面的要求;还有一些扫描相机时间分辨力很高(优于 2ps),但是重复频率较低(单次或 $\leq 10$  Hz)<sup>[9]</sup>;或者虽然能够以较高的重复频率工作(可达到 1 MHz),但时间分辨力相对较低( $\sim 50$  ps)<sup>[7]</sup>。另外,现有的荧光寿命测量方法一般都是逐点测量的。随着激光功率的提高,人们希望同时实现多焦点荧光寿命测量。

本文报道了一台高重复频率(达到 1 MHz)的皮秒扫描相机以及基于此的双光子激发荧光寿命显微成像系统。该相机具有重复频率高、非线性小、时间分辨力高、工作面积大、扫描速度可调以及灵敏度高等优点。通过对若丹明 6G 和香豆素 314 两种荧光染料的实验表明,该系统的测量精度非常高,所测量结果和文献报道相符。

## 2 实验系统

我们建立了一台基于高重复频率皮秒扫描相机的双光子激发荧光寿命显微成像系统<sup>[10,11]</sup>。该系统主要由钛宝石飞秒激光器、脉冲提取器、荧光显微物镜、样品台、高重复频率皮秒扫描相机、光锥耦合 CCD 实时读出系统以及计算机等几部分组成。其原理图如图 1 所示。

钛宝石飞秒激光器发出重复频率为 76 MHz,

脉冲宽度为 120 fs 的超短光脉冲,其工作波长可以在 700~980 nm 范围连续调谐。脉冲提取器可以把飞秒激光器输出的超短脉冲重复频率由 76 MHz 降为 5 MHz 以下。在系统中,将脉冲提取器的重复频率调为 1 MHz。1 MHz 的激光脉冲由 30/70 分光镜 BS 分成两束,即主光束和触发光束。触发光束用来触发 PIN,它所产生的电脉冲通过可调延时器和脉冲放大器后作为扫描相机的触发信号触发扫描电路,扫描电路产生的斜坡电压脉冲加到变像管的偏转板上形成瞬态偏转场,作用于通过它的电子束,实现线性扫描,从而将变像管荧光屏上对应的空间轴变为时间轴;主光束通过显微物镜激发样品,并通过双光子效应使样品发出荧光,荧光通过显微物镜收集后,再经过一个大口径中继透镜  $L_4$  成像到扫描变像管的光电阴极上,光电阴极将入射的光脉冲转换为时空结构相同的电子脉冲。该电子脉冲经聚焦系统聚焦和偏转系统扫描,再通过 MCP 电子倍增并轰击荧光屏,最后在荧光屏上得到可见光扫描图像。该扫描图像通过光锥耦合的 CCD 实时读出系统转变为电信号,就得到我们所要求的荧光强度随时间的衰减信号。

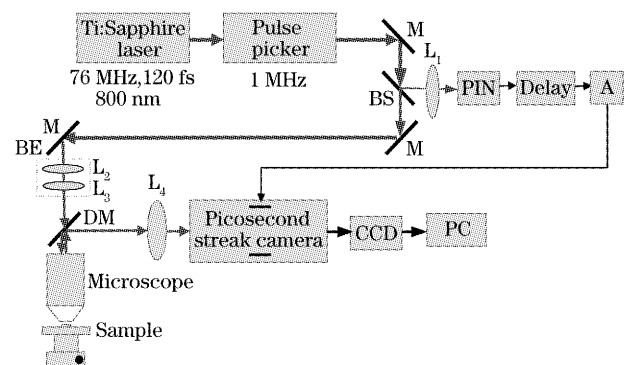


图 1 双光子激发荧光寿命显微成像系统原理图。M: 反射镜,  $L_1 \sim L_4$ : 透镜, BS: 分束镜, BE: 扩束器, DM: 双色镜, A: 放大器

Fig. 1 Experimental setup for the two-photon excitation fluorescence lifetime microscopic imaging system. M: Mirrors,  $L_1 \sim L_4$ : lense, BS: beam splitter, BE: beam expander, DM: dichroic mirror, A: amplifier

与门控像增强器<sup>[4]</sup>相比,扫描相机可提供更高的时间分辨力和信号随时间连续变化的信息;与单光子计数器相比<sup>[5,6]</sup>,扫描相机可提供一维空间逐点而不是空间一点随时间变化的信息,同时其采集信息的效率和速率比单光子计数器要高得多。另外,这种扫描相机既不同于通常的正弦波驱动的同步扫描相机,也不同于通常的单次扫描相机。与前

者相比,它可提供更宽的时间量程;与后者相比,它又可工作在同步工作方式,可对非常微弱的光脉冲进行探测。

高重复频率皮秒扫描相机是双光子激发荧光寿命显微成像系统的重要组成部分,其主要性能指标包括:时间分辨力、扫描速度、扫描非线性和触发晃动等。我们所研制的高重复频率皮秒扫描相机如图 2 所示,其中,扫描变像管和高重复频率扫描电路是其核心部件。为了适应两维空间同时光谱和同时时间分辨,对所用的扫描变像管进行了特殊设计,其中最核心的问题是扩大有效工作面积至  $\phi 30$  mm。由于工作面积的扩大,要同时实现高空间和高时间分辨、小时间畸变、高偏转灵敏度和高灰度均匀性就变

得十分困难。通常的单次扫描电路,为了产生斜率很陡的扫描电压波形,不仅要提供高的电压幅度,还要提供非常大的瞬态电流。对于单次工作模式而言,利用现有的雪崩晶体管上述波形是不难实现的。然而,对于高重复频率扫描电路而言,其电压幅度和瞬态电流仍如单次扫描电路,随着工作频率的提高,电路消耗的平均功率就会越来越高,以至于达到电路不能承受的程度。而且随着重复频率的不断提高,扫描电路还存在频率响应特性的问题,这时还需考虑回扫波形问题。因此,为了解决实现高重复频率皮秒扫描相机所面临的上述种种问题,我们在变像管和扫描电路的设计和研制方面做了大量的改进工作,最终实现了我们的预期目标。

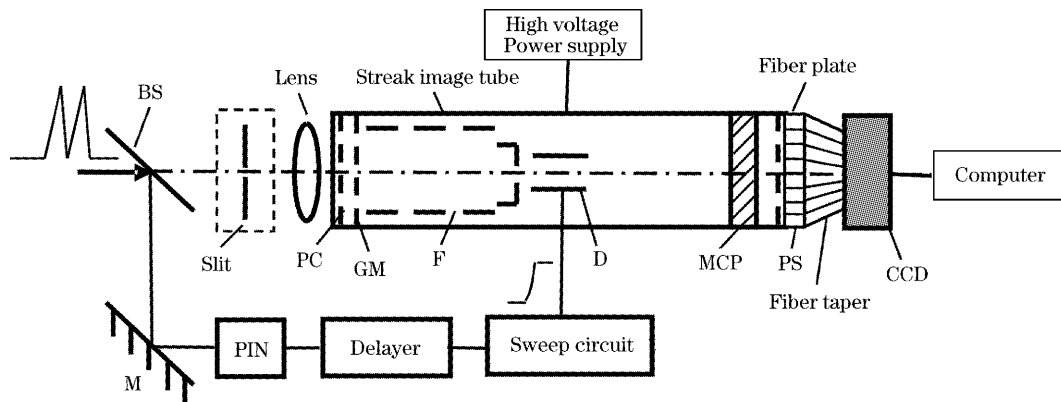


图 2 高重复频率皮秒扫描相机的工作原理图。BS:分束镜,M:反射镜,PC:光电阴极,GM:加速栅网,F:静电聚焦系统,D:偏转系统,MCP:微通道板,PS:荧光屏

Fig. 2 Working schematic diagram of high repetition rate picosecond streak camera. PC: Photocathode, GM: accelerator grid, F: electrostatic focusing system, D: deflexion system, MCP: microchannel plate, PS: phosphor screen

### 3 实验结果及讨论

我们对上述高重复频率皮秒扫描相机的各种主要性能进行了测量,其中包括扫描速度、非线性和时间分辨力等。同时,为了证明其实用性,对基于该扫描相机所建立的双光子激发荧光寿命显微成像系统进行了初步的实验研究,测量了两种标准荧光染料的荧光寿命。

#### 3.1 扫描速度和非线性的标定

皮秒扫描相机共有 1 ns、10 ns 和 60 ns 三个量程,可根据被测信号的脉冲宽度,选择不同量程的扫描电路。这里以中档量程为例说明对相机的标定情况。系统原理如图 1 所示,只是用一半反半透镜代替图 1 中的双色镜,用厚度为 50 mm 的标准具代替显微物镜和样品。从标准具中输出的相邻两个脉冲

之间间隔为 500 ps,通过调节可变延迟器得到不同延时时刻(对应荧光屏上不同位置)的扫描图像,电路的扫描方向由上往下,我们在电路延时分别为 0 ns、2 ns 以及 4 ns 时在荧光屏上不同位置分别得到一幅扫描图像,如图 3 所示,每幅图像中采集到 4 个脉冲,共 3 个时间间隔,由上向下[对应图 3(a)~图 3(c)]对脉冲序列依次编号为:1、2、3、4、...12,相邻脉冲之间的像素间距、局部平均脉冲间距和非线性列于表 1。可以看出,满屏的平均脉冲间距为 48 pixel,平均扫描速度为 3.782 mm/ns,平均非线性为 2.60%。满屏对应像素数 672 pixel,荧光屏扫描程 26.5 mm,该扫描电路的时间量程为 7 ns。根据我们的标定结果并与同类技术报道<sup>[12,13]</sup>相比,该扫描相机具有非常优越的性能参量。

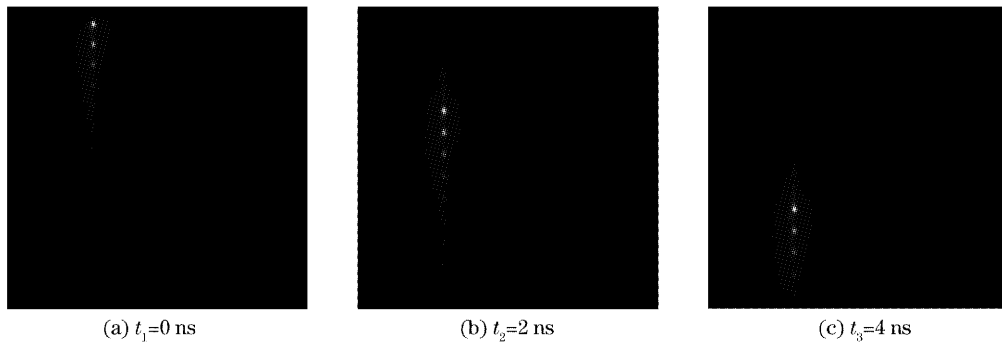


图 3 皮秒扫描相机的扫描速度和非线性标定

Fig. 3 Calibration of sweep speed and nonlinearity of the picosecond streak camera

表 1 标定皮秒扫描相机的扫速和非线性

Table 1 Calibration of sweep speed and nonlinearity of the picosecond streak camera

No.	(a) $t_1=0$ ns				(b) $t_2=2$ ns				(c) $t_3=4$ ns			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Position /pixel	39	85	131	178	235	283	332	381	456	505	554	603
Pulse interval /pixel		46	46	47		48	49	49		49	49	49
Average pulse interval /pixel		46.33				48.67				49		
Average sweep speed /(mm/ns)		3.651				3.835				3.861		
Nonlinearity /%		1.02				0.97				0		

### 3.2 时间分辨力标定

如图 4 所示,采用厚度为 3.5 mm 的镜片作为标准具,并在扫描相机前使用狭缝限制光束,对系统的时间分辨力进行标定。激光通过 50/50 分束镜在镜片的前后两个面反射后,经过扫描相机前的狭缝,成像到光电阴极上。如果相机处于静态工作模式,可在荧光屏上得到这两个脉冲重叠的狭缝图像,如图 5(a)所示。考虑到镜片的折射率,相邻两个脉冲之间的时间间隔为 35 ps。如果扫描相机工作在动态重复触发模式下,在变像管荧光屏上得到这两个激光脉冲序列沿时间方向(自右向左)展开的、多次扫描叠加的结果,如图 5(b)。图 5(c)为动态图像[图 5(b)]沿时间轴

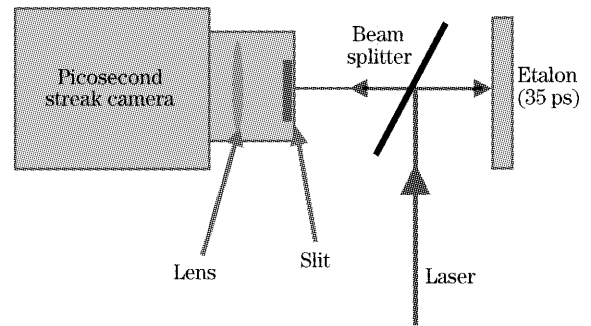


图 4 时间分辨力标定示意图

Fig. 4 Schematic setup of the temporal resolution calibration  
的间距以及最大半峰全宽值得出相机的时间分辨力为 6.5 ps。由图 5(a)可以看出静态图像脉冲宽

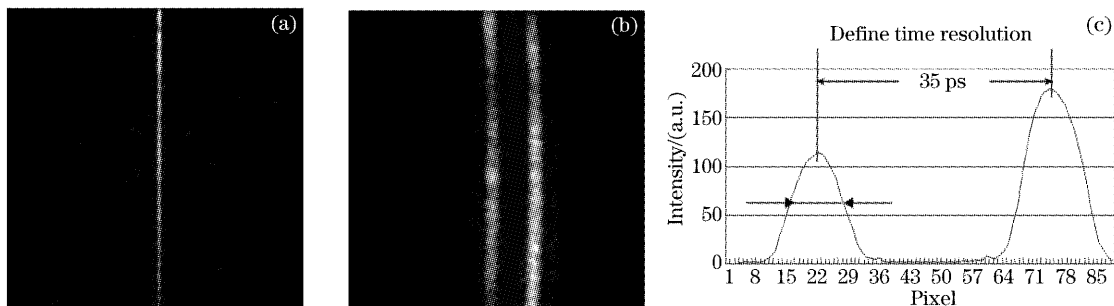


图 5 时间分辨力标定结果。(a)和(b)分别为静态和动态狭缝图,(c)为沿时间轴得到的强度衰减曲线

Fig. 5 Results of the temporal resolution calibration. (a) and (b) are the static and dynamic slit-images of the pulse train respectively. (c) is the time profile plot along the time axis. From the FWHM value of the pulse, a temporal resolution of 6.5 ps was obtained

度明显小于动态图像,即其时间分辨力优于 6.5 ps。因此高重复频率扫描电路的触发晃动在亚皮秒量级,可以忽略<sup>[14]</sup>。

### 3.3 荧光寿命测量

根据扫描相机的标定结果,利用图 1 所示的实验系统,我们选取了适合量程范围的两种标准荧光染料——若丹明 6G 和香豆素 314 进行单点荧光寿命测量,它们的寿命值相对稳定。把若丹明 6G 和香豆素 314 分别溶于乙醇溶剂中配成浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  的溶液。实际上溶液浓度在每升几百 nmol 到几百  $\mu\text{mol}$  之间变化时寿命值没有明显变

化。图 6、图 7 分别为若丹明 6G 和香豆素 314 的荧光寿命图像(a)及沿扫描方向(由上到下)的荧光强度衰减曲线(b)。利用负指数衰减函数模型,对图 6(b)和图 7(b)所示两种染料的荧光强度衰减曲线分别进行了最小二乘拟合分析,可得到若丹明 6G 的荧光寿命为  $2.93 \pm 0.02$  ns,香豆素 314 的荧光寿命为  $2.73 \pm 0.02$  ns,与文献报道<sup>[7,15]</sup>的寿命值相符,测量的精度非常好。对于复杂的多组分问题,可采用多指数函数荧光衰减曲线拟合的方法,分别求出各个组分的强度和荧光寿命<sup>[16]</sup>。

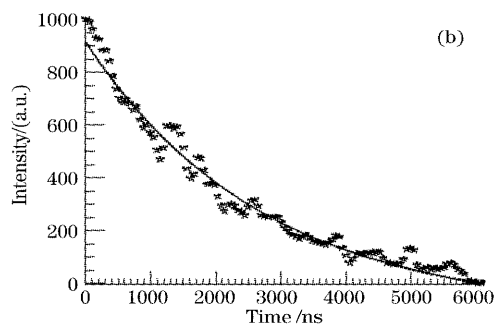
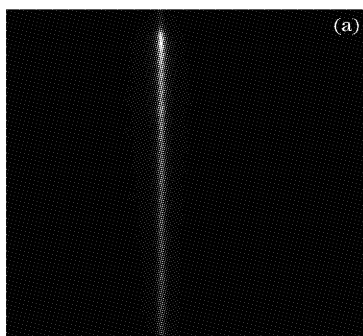


图 6 若丹明 6G 的荧光寿命图像(a)及荧光强度衰减曲线(b)

Fig. 6 Fluorescence lifetime image (a) and intensity decay curve (b) of Rhodamine 6G

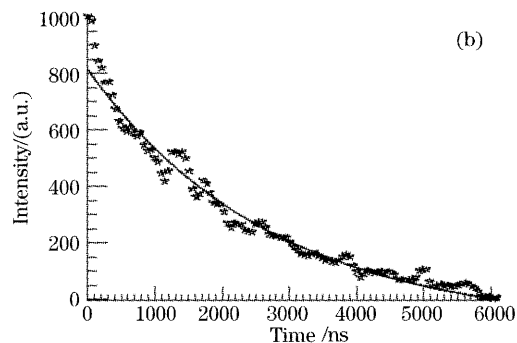
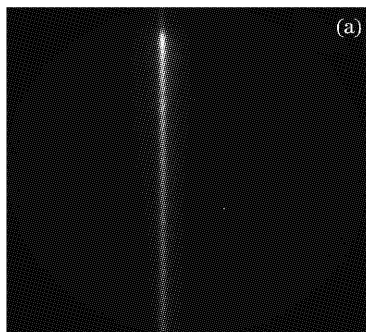


图 7 香豆素 314 的荧光寿命图像(a)及荧光强度衰减曲线(b)

Fig. 7 Fluorescence lifetime image (a) and intensity decay curve (b) of Coumarin 314

## 4 结 论

为了建立一种高效、高性能、多参量双光子激发荧光寿命显微成像系统,本文在新设计和研制的变像管和扫描电路的基础上发展了一台高重复频率皮秒扫描相机。测试结果表明,该扫描相机的时间分辨力 6.5 ps,平均扫描非线性 2.60%,测量时间范围从 10 ps~60 ns 可调,同时可实现二维空间大面积多焦点扫描,能够满足生物医学研究中不同样品的测量和诊断需要。利用基于该高重复率皮秒扫描

相机的双光子激发荧光寿命显微成像系统测量了若丹明 6G 和香豆素 314 两种标准荧光染料的荧光寿命并得到与文献报道一致的结果。该系统可以与其它测量和成像技术如荧光光谱测量、内窥成像等结合,在不影响主光束工作的情况下提取出少量光用作信号的采样分析<sup>[17]</sup>;与光束的扫描系统结合实现双光子激发荧光寿命显微成像;与内窥镜相结合用于癌症检测<sup>[18]</sup>,从而提高诊断的灵敏度、特异性和准确性等。

## 参 考 文 献

- 1 D. Elson, S. Webb, J. Siegel *et al.*. Biomedical applications of fluorescence lifetime imaging[J]. *Optics & Photonics News*, 2002, **13**(11): 26~32
- 2 K. W. Eliceiri, Ching-Hua Fan, G. E. Lyons *et al.*. Analysis of histology specimens using lifetime multiphoton microscopy[J]. *J. Bio. Opt.*, 2003, **8**(3): 376~380
- 3 Jiang Zhiming, Kieffer J C, Xu Zhizhan. Intense ultrafast laser-matter interaction and its application[J]. *Chin. J. Lasers*, 1996, **A23**(6): 513~519 (in Chinese)  
江志明, 让-克劳德·基夫, 徐至展. 超短高功率脉冲与物质相互作用及其应用[J]. *中国激光*, 1996, **A23**(6): 513~519
- 4 K. Dowling, S. C. W. Hyde, J. C. Dainty *et al.*. 2-D fluorescence lifetime imaging using a time-gated image intensifier [J]. *Opt. Commun.*, 1997, **135**(1~3): 27~31
- 5 W. Becker, A. Bergmann, K. König *et al.*. Picosecond fluorescence lifetime microscopy by TCSPC imaging[C]. *Proc. SPIE*, 2001, **4262**: 414~419
- 6 W. Becker, A. Bergmann, C. Biskup *et al.*. High resolution TCSPC lifetime imaging[C]. *Proc. SPIE*, 2003, **4963**: 175~184
- 7 R. V. Krishnan, H. Saitoh, H. Terada *et al.*. Development of a multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy system using a streak camera [J]. *Rev. Scientific Instruments*, 2003, **74**(5): 2714~2721
- 8 Qu Junle, Niu Hanben, Li Ji *et al.*. A study of time-domain 2-dimensional fluorescence lifetime microscopic measurement[J]. *Acta Optica Sinica*, 2000, **20**(12): 1657~1661 (in Chinese)  
屈军乐, 牛憨笨, 李 冀 等. 时域二维荧光寿命显微测量研究[J]. *光学学报*, 2000, **20**(12): 1657~1661
- 9 Wang Jiangang, Yang Lisong, Wang Guiying *et al.*. Study on the characteristics of spectra and time of ultrafast fluorescence[J]. *Chin. J. Lasers*, 2000, **A27**(7): 597~600 (in Chinese)  
王建岗, 杨莉松, 王桂英 等. 超快荧光光谱的光谱特性和时间特性的研究[J]. *中国激光*, 2000, **A27**(7): 597~600
- 10 Qu Junle, Liu Lixin, Guo Baoping *et al.*. Development of a multispectral multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy system using a streak camera[C]. *Proc. SPIE*, 2005, **5630**: 510~516
- 11 Guo Baoping, Tian Jindong, Qu Junle *et al.*. Research on the time resolved multi-spectral detection technology[J]. *China Basic Science*, 2004, (6): 11~14 (in Chinese)  
郭宝平, 田劲东, 屈军乐 等. 时间分辨多光谱技术研究[J]. *中国基础科学*, 2004, (6): 11~14
- 12 Wang Wei, Chang Lihua, Liu Ningwen *et al.*. Calibration of scanning time and scanning velocity for high speed image converter camera[J]. *High Power Laser and Particle Beams*, 2002, **14**(6): 827~830 (in Chinese)  
汪 伟, 畅里华, 刘宁文 等. 高速变像管相机扫描时间和扫描速度的标定技术[J]. *强激光与粒子束*, 2002, **14**(6): 827~830
- 13 Liu Yonggang, Peng Xiaoshi, Tang Xiaoqing. Measuring sweep speed and sweep nonlinearity of optic streak camera[J]. *Nuclear Electronics & Detection Technology*, 2004, **24**(2): 218~220 (in Chinese)  
刘永刚, 彭晓世, 汤小青. 光学条纹相机扫描速度和非线性的测试[J]. *核电子学与探测技术*, 2004, **24**(2): 218~220
- 14 Guo Baoping, B. Cunin, Niu Hanben. High repetition rate trigger mode streak camera[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2005, **34**(3): 442~444 (in Chinese)  
郭宝平, B. Cunin, 牛憨笨. 高重复频率触发模式皮秒扫描相机[J]. *光子学报*, 2005, **34**(3): 442~444
- 15 M. J. Cole, J. Siegel, S. E. D. Webb *et al.*. Time-domain whole-field fluorescence lifetime imaging with optical sectioning [J]. *J. Microsc.*, 2001, **203**(3): 246~257
- 16 R. Cubeddu, D. Comelli, C. D'Andrea *et al.*. Time-resolved fluorescence imaging in biology and medicine[J]. *Appl. Phys.*, 2002, **35**(9): R61~R67
- 17 H. Zeng, M. Petek, M. T. Zorman *et al.*. Integrated endoscopy system for simultaneous imaging and spectroscopy for early lung cancer detection[J]. *Opt. Lett.*, 2004, **29**(6): 587~589
- 18 J. Siegel, D. S. Elson, E. D. Webb *et al.*. Studying biological tissue with fluorescence lifetime imaging: microscopy, endoscopy, and complex decay profiles[J]. *Appl. Opt.*, 2003, **42**(16): 2995~3004