

10 fs 脉冲在多光子激发生物成像中的应用

席 鹏¹ 周传清¹ 封晓瑞¹ 王纬超¹ 江旻珊¹ Tobias Braeuler^{1,2} 任秋实¹

¹上海交通大学激光与光子生物医学研究所, 上海 200240

² *University of Heidelberg, Kirchoff Institute for Physics, Im Neuenheimer Feld 227, D-69120, Heidelberg, Germany*

摘要 作为一种非线性光学成像手段,多光子激发已经在生物医学影像学域发挥了重要作用。虽然更短的脉冲可以激发更强的非线性效应,但由于高阶色散的存在,目前国际上的多光子激发成像工作一直采用大于 100 fs 的亚皮秒脉冲激发。通过多光子脉冲间干涉相位扫描法,成功地将 10 fs 脉冲引入到多光子生物成像领域。通过补偿高阶色散后,荧光信号得到了显著增强,探测深度明显增加,且可使多种染料同时被激发。

关键词 多光子; 共聚焦; 显微; 飞秒脉冲

中图分类号 O437.1 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS200929s1.0046

Multiphoton Microscopy with 10 fs Pulse in Biomedical Imaging

Xi Peng¹ Zhou Chuanqing¹ Feng Xiaorui¹ Wang Weichao¹ Jiang Minshan¹
Tobias Braeuler^{1,2} Ren Qiushi¹

¹ *Institute for Laser Medicine and Biophotonics, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240*

² *University of Heidelberg, Kirchoff Institute for Physic Im Neuenheimer Feld 227, D-69120, Heidelberg, Germany*

Abstracts As an important nonlinear optical imaging method, multiphoton excitation has demonstrated its wide application in biomedical imaging. Although shorter pulse can induce a higher nonlinear effect, most applications are still restricted in 100 fs region due to the existence of high-order dispersion. Through the compensation of high-order dispersion with multiphoton intrapulse interference, we successfully introduce 10 fs pulse into multiphoton biomedical imaging. We find that a deeper penetration and a correct excitation of multiple dyes can be obtained with this method.

Key words multiphoton; confocal; microscopy; femtosecond pulse

1 引 言

双光子激发过程是 M. Goppert-Mayer^[1] 于 1931 年首次提出的。其基本概念是将两个低能量光子的能量进行叠加,实现激发一个高能光子的目的。在 1990 年,这一激发方式由美国 Cornell University 的 Denk 和 Webb 等^[2] 在实验上实现并引入到生物显微镜领域。一般来说,光子与光子的相互作用表现为线性作用,即经典光学中的干涉与衍射等。只有在光子能量密度非常高的时候,非线性效应才能发生。在 Webb 的工作中,利用了脉冲宽度约为 100 fs 的飞秒激光。由于飞秒激光在时间上高度集中,焦点处的高峰值功率密度大大增加了双光子吸收到激发态的概率,从而能够观察到荧光。

这个非线性光学过程被称为双光子激发荧光(TPEF)。同样,二次谐波产生(SHG)信号可以从非中心对称结构的生物样品中得到,比如细胞膜和细胞外胶原纤维。同时,超短脉冲的低平均功率保证了生物样品不会被因能量积分而产生光热效应等形成损坏。从理论上讲,由于短脉冲可实现更高的非线性激发效率,因而在应用中更加有优势。但是事实上,在超短脉冲多光子生物医学成像中,至今大多数实验室仍在使用超过 100 fs 的脉冲^[3,4]。

这一事实的原因是,在多光子成像中不可避免地要用到高数值孔径(NA)的物镜。这些物镜通常由多组光学透镜组成。在飞秒脉冲经过透镜后,会形成不同程度的色散。这一色差最终导致脉冲展

宽^[5]。基于这一原因,多光子成像一直推荐使用 100 fs 以上的脉冲^[6]。提出的问题是,如果能够消除色散带来的脉冲展宽,10 fs 的脉冲是否在激发双光子信号方面具有更大优势?

在应用中,多光子成像的一个主要优势在于其内在的光学层析性能,以及由于使用近红外激发光带来的高穿透深度^[7]和小的组织光损伤^[8]。本文展示了通过补偿各种低阶及高阶色散后,利用 12 fs 的脉冲所得到的一系列特性,包括高信号激发效率和深穿透深度。在一个老鼠肾脏的三色染色样品上实现了对三种染料的同时高效激发,这是传统的 100 fs 脉冲不能实现的。

2 双光子成像系统

激光系统和显微镜的配置示意图如图 1 所示。采用带宽为 110 nm,脉冲持续时间为 12 fs,重复率

为 86 MHz 的超短振荡器作为激发光源 (KMLabs)。在入射到脉冲整形器前对光束进行了空间扩束。脉冲整形器的结构为一个 4f 系统,用一个相位调制液晶空间光调制器 (SLM, P-640-CRI) 产生相位延迟。系统采用了一对 SF-11 棱镜产生负色散,以尽量减少二阶色散(SOD)。

双光子显微镜系统的使用是基于一个 Nikon TE-200 倒置显微镜。经过棱镜对后,光束被分光镜 DC(700DCSPXR, Chroma Technologies)反射到一对检流计上。该检流计从一个 3X 望远镜系统到显微镜物镜对光束进行扫描。这台望远镜由一个安放在检流计旁边的 $f=100$ mm 扫描镜头和 1 个安放在物镜旁边的 $f=300$ mm 的管镜头组成。管镜头用以校准并将光束从 8 mm 扩大到 24 mm 用以充满显微物镜的孔径。在望远镜镜头之间,安装了一个展望镜用以提高光束的高度以到达汞灯口。

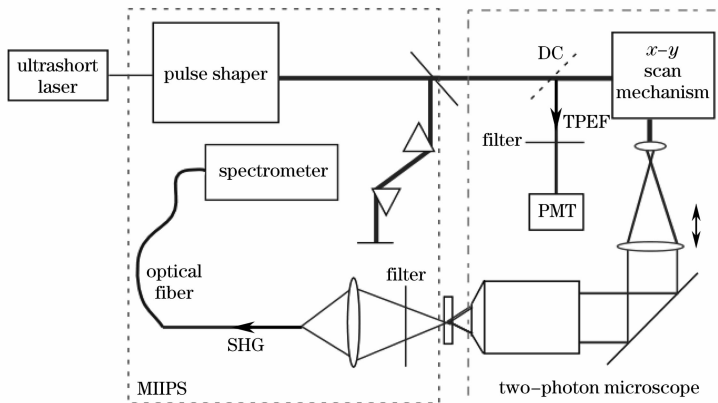


图 1 MIIPS 补偿超短脉冲双光子荧光成像系统示意图

Fig. 1 Ultrashort laser pulse multiphoton microscope with MIIPS compensation

双光子荧光信号由同样的荧光模式的激发物镜收集并通过检流计扫描。DC 将 TPEF 信号反映给光电倍增管探测器。经过用以滤除任何余下的激光的短波滤波器后,用配用 400 μ m 光纤的光纤准直仪来收集荧光信号。然后,光纤将荧光引导到扩增光电倍增管(PMT)。驱动信号由美国国家仪器公司的 PCI 6251 数据采集 (DAQ) 系统为检流计提供,该系统同时作为数模转换器,将类似 PMT 信号转化为 16 位数字信号进行成像。

将一个 50 μ m 的 BBO 晶体(福建福晶)置于显微镜的焦平面上,产生 SHG 信号提供给 MIIPS。一个 $f=75$ mm 的镜头 (Edmund Optics) 被直接置于物镜上,用于通过光纤收集 SHG 信号。用一个分光计 (Ocean Optics, USB4000) 获取 SHG 光谱。MIIPS 的测量及补偿过程如文献所描述的进

行^[9-11]。实验通过棱镜对实现 GDD 补偿,通过 MIIPS 技术来获得傅里叶变换极限的脉冲。当补偿完全时,MIIPS 波形的二次谐波信号随着正弦相位调制将呈现平行线的分布。图 2 展示了经过高阶相位补偿后 MIIPS 波形。

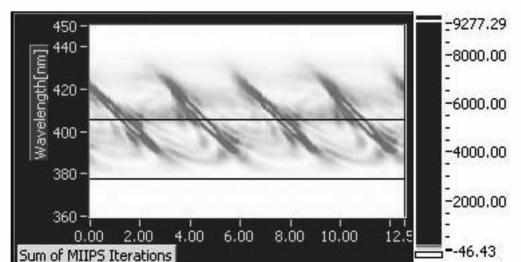


图 2 经过高阶色散补偿后的 MIIPS 轨迹

Fig. 2 MIIPS trace of the ultrashort pulse after chromatic aberration compensation

3 结果与讨论

3.1 双光子荧光与二次谐波信号强度与谱宽关系

飞秒激光器非常适合诱导非线性光学过程,这是因为他们的短脉冲持续时间使得脉冲峰值功率非常高。与单色连续光不同的是,超短脉冲具有频率分布的特性。超短脉冲的时间与频率可由一个傅里叶变换关系获得:

$$I(t) = \left| \int E(\omega) \exp\{i[\omega t + \varphi(\omega)]\} d\omega \right|^2, \quad (1)$$

式中 $I(t)$ 为脉冲时域分布, $E(\omega)$ 为频域电场强度, $\varphi(\omega)$ 为频域分量 ω 的相位。对于傅里叶变换极限(TL)脉冲,其相位为 0。对于一个中心波长为 800 nm 的 TL 脉冲,其时空关系可表示为 $\Delta\omega\Delta\tau \approx 0.44$ 。然而,经过厚的光学介质后,相位色散对脉冲宽度的影响非常严重^[5]。

在 TPEF 信号激发过程中,对于双光子过程

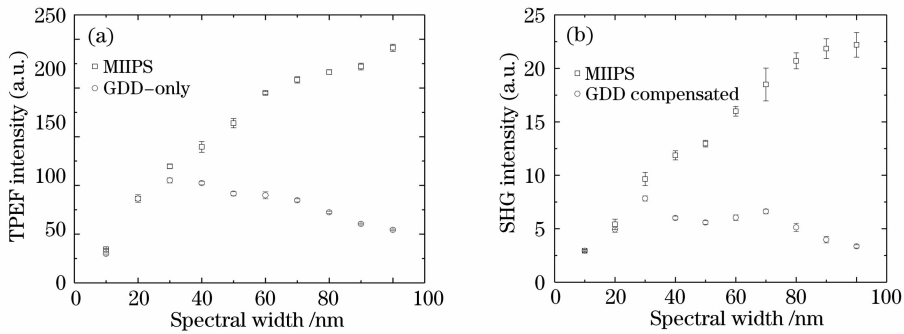


图 3 不同脉冲宽度下的 TPEF(a)和 SHG(b)信号在 MIIPS 补偿和 GDD 补偿情况下的比较。误差条描绘了测量过程中的标准偏差

Fig. 3 The TPEF (a) and SHG (b) intensities with various bandwidths, excited with MIIPS compensated pulse and GDD-only compensated pulse. The error bar plots the standard deviation of the experiments

3.2 穿透深度

与单光子荧光激发成像相比,双光子成像的一个显著优点是其穿透深度很深,因此能够看到更深

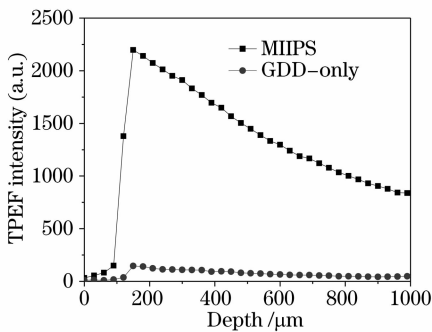


图 4 同一脉冲在 MIIPS 和 GDDonly 补偿情况下,不同深度的荧光信号

Fig. 4 The depth-resolved fluorescence intensity for the same laser pulse at MIIPS and GDD-only compensation

(如 TPEF 和 SHG),信号强度与脉冲持续时间成线性反比^[2];等价于与光谱带宽 $\Delta\lambda$ 成线性正比。将激发光强控制到 2 mW,通过调节 SLM 实现对脉冲光谱宽度的控制,并分别利用 Chroma 的红色荧光波片和 BBO 晶体测量了不同脉冲宽度下的 TPEF 和 SHG 信号强度。我们首先利用 MIIPS 装置测量了系统的低阶与高阶色散,然后通过对脉冲施加 MIIPS 反相位来得到 TL 脉冲,以及对脉冲不加相位补偿(SLM 相位位置 0)来得到 GDD 补偿脉冲。可以看到,在 30 nm 以下,增加谱宽可线性增加 TPEF 和 SHG 信号强度;但是在 30 nm 以上,这一规律对于仅补偿 GDD 色散不能重复。造成这一现象的原因是,当脉冲宽度较大时,高阶色散的影响变得不可忽视。利用 MIIPS 进行高阶色散补偿后,这一规律得到了恢复。因此,通过 MIIPS 色散补偿后,利用短脉冲可实现更高效的 TPEF 和 SHG 信号激发。

层的组织。为了研究 12 fs 超短脉冲在 MIIPS 补偿与 GDD 补偿下的穿透深度,将激发光固定在 3 mW,所用的物镜为 Nikon Plan 20×,其他条件同上。这两种情况都用了同样的棱镜对引入负色散以补偿系统带来的二阶色散。在本实验中,我们使用了 Chroma 的红色荧光波片作为样品,控制焦点深度对其进行荧光强度测量。图 4 显示了在不同脉冲激发下,荧光波片在不同深度的荧光强度。

3.3 多染色动物样品成像

利用一个老鼠肾脏的三色染色样品(Molecular Probe, F-24630),我们研究了 TL 脉冲和 GDD 补偿脉冲对样品的激发成像。样品的染色分别为:为了染细胞核的 DAPI;为了染色高尔基体(Golgi complex)的麦胚凝集素(wheat germ agglutinin) Alexa-488,以及为了染色纤维状肌动蛋白(F-actin)

的鬼笔环肽(phalloidin) Alexa-568。从图 5(a)可见,在仅有 GDD 补偿的情况下,三种染色中只有 Phalloidin Alexa-568 得到很好的激发,其他两种的激发效率很低。这是由于高阶色散带来的双光子激发峰偏离所致^[10]。当经过 MIIPS 补偿后,三种染色都可以被很好地激发[见图 5(b)],揭示了生物体丰富的结构与生化信息。因此,利用高阶色散补偿后的超短 TL 脉冲,对于多光子生物医学成像具有重要意义。

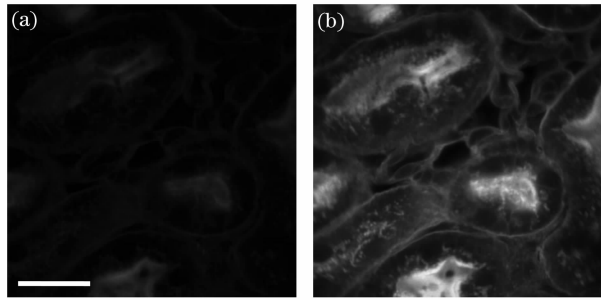


图 5 小鼠肾脏组织三色染色的多光子荧光成像。

(a) GDD 补偿; (b) MIIPS 补偿的结果

Fig. 5 Multihoton microscopic image of a mouse kidney tissue. (a) with GDD compensation; (b) with MIIPS compensation

4 结 论

传统的 100 fs 脉冲自从多光子荧光显微发明后被沿用至今。虽然更短的脉冲可以实现更高效的非线性效应如双光子激发和二次谐波生成,然而由于光学系统的色散,迄今这样的脉冲未被广泛使用。通过测量与补偿这一色散,在焦点处获得了传输极限脉冲。与未经高阶补偿的脉冲相比,实现了高的激发效率和更深的探测深度。利用一个三色染色的

生物样品,用 MIIPS 补偿后的脉冲可实现对三种荧光染料的高效激发,因而可以获得更为丰富的生物信息。

致谢 作者感谢华中科技大学的吴瑞琪同学在暑期实习期间参与本文的部分工作。

参 考 文 献

- 1 Göppert-Mayer M.. Über elementarakte mit zwei quantensprüngen[J]. *Annalen der Physik*, 1931, **401**(3): 273~294
- 2 Denk W., Strickler J., Webb W.. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, **248**(4951): 73~76
- 3 So P., Dong C., Masters B. *et al.*. Two-photon excitation fluorescence microscopy [J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2000, **2**: 399~429
- 4 König K.. Multiphoton microscopy in life sciences [J]. *J. Microsc.*, 2000, **200**(2): 83~104
- 5 Müller M., Squier J., Wolleschensky R. *et al.*. Dispersion pre-compensation of 15 femtosecond optical pulses for high-numerical-aperture objectives[J]. *J. Microscopy*, 1998, **191**(2): 141~150
- 6 Diaspro A., Bianchini P., Vicidomini G. *et al.*. Multi-photon excitation microscopy [J]. *BioMedical Engineering OnLine*, 2006, **5**(1): 36
- 7 Buehler C., Kim K. H., Dong C. Y. *et al.*. Innovations in two-photon deep tissue microscopy [J]. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 1999, **18**(5): 23~30
- 8 So P. T. C., Kim H., Kochevar I.. Two-photon deep tissue ex vivo imaging of mouse dermal and subcutaneous structures[J]. *Opt. Express*, 1998, **3**(9): 339~350
- 9 Xu B., Gunn J. M., Cruz J. M. D. *et al.*. Quantitative investigation of the multiphoton intrapulse interference phase scan method for simultaneous phase measurement and compensation of femtosecond laser pulses[J]. *J. Opt. Soc. Am. B*, 2006, **23**(4): 750~759
- 10 Xi P., Andegeko Y., Weisel L. R. *et al.*. Greater signal, increased depth, and less photobleaching in two-photon microscopy with 10 fs pulses[J]. *Opt. Commun.*, 2008, **281**(4): 1841~1849
- 11 Xi P., Andegeko Y., Pestov D. *et al.*. Two-photon imaging using adaptive phase compensated ultrashort laser pulses[J]. *J. Biomedical Optics*, 2009, **14**(1): 014002