

多变视场的多焦点多光子激发荧光显微技术

李 震¹ 屈军乐² 邵永红^{2*} 高 志³

¹ 海军潜艇学院防化教研室, 山东 青岛 266042

² 深圳大学光电工程学院光电子器件与系统(教育部/广东省)重点实验室, 广东 深圳 518060

³ 克莱姆森大学生物工程学系, 美国南卡罗来纳州克莱姆森 29634

摘要 发展了一种新型的多焦点多光子激发荧光显微技术,通过软件控制空间光调制器,在所需要的成像区域产生相应的激发光点阵,通过扫描入射角实现激发点阵快速并行扫描激发,通过 CCD 并行记录所产生的荧光信号,获得任意视场图像。分别实现了 10×10 和 50×50 点阵激发下的全视场双光子荧光图像,并且实现了同时多个区域寻址的多焦点激发成像。对比其他多焦点显微技术,该技术具有明显的灵活性,不但保持了多焦点激发的快速成像的优点,而且还增加了任意数量成像区域同时寻址和阵列点密度变化,所有这些变化只需要通过软件加载相应的相位图案给空间光调制器,而不需要任何硬件更改。

关键词 显微;多焦点;多光子;空间光调制器

中图分类号 O433; TB873 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS201232.1018001

Multiple Variational Field-of-View Multifocal Multiphoton Fluorescence Microscope

Li Zhen¹ Qu Junle² Shao Yonghong² Gao Zhi³

¹ Navy Submarine Academy, Qingdao, Shandong 266042, China

² Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, College of Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China

³ Department of Bioengineering and COMSET, Clemson University, Clemson, SC 29634, USA

Abstract A novel multifocal multiphoton excited fluorescence microscopy (MMM) is presented. The required focus array can be produced in multiple interesting subregions through uploading the accurate phase pattern to the spatial light modulator (SLM) with the software. The focus array can be scanned with a two-mirror galvo scanner by scanning the single beam that is incident on the SLM. The two photon fluorescence signal is recorded directly with an electron-multiplying CCD in parallel. The two photon fluorescence images in the whole field-of-view are obtained under the different modes such as 10×10 and 50×50 arrays, and the multiple subregions of interest are addressably excited simultaneously. Compared with the other MMMs, our MMM has a good flexibility without sacrificing of the imaging speed and spatial resolution and also without hardware changes.

Key words microscopy; multifocus; multiphoton; spatial light modulator

OCIS codes 180.2520; 180.5810; 180.6900; 190.4180

1 引 言

双光子激发荧光显微技术具有高空间分辨率,而且采用近红外光波激发,对生命体的杀伤作用小,

成像穿透深度大,已经成为生命科学研究的重要手段^[1-6]。相比单光子荧光技术,双光子激发荧光技术具有更小的激发截面,因此需要更强的激光功率。

收稿日期: 2012-03-29; **收到修改稿日期**: 2012-05-24

基金项目: 国家自然科学基金(31171372, 60627003, 61078067)、广东省科技计划(2010B060300002)、深港创新圈计划(ZYB200907090128A)、深圳市科技计划(JC201005250032A)、深圳大学应用技术开发项目(201136)和深圳大学光电子器件与系统(教育部/广东省)重点实验室开放基金资助课题。

作者简介: 李 震(1961—),男,教授,主要从事光学检测与生物传感等方面的研究。E-mail: lizhen181@126.com

* **通信联系人**。E-mail: shaoyh@szu.edu.cn

而显微物镜的强聚焦作用,虽然能够实现非线性激发过程,但对生物样品通常会导致光损伤,特别是飞秒激光光源。为了提高成像速度和光能利用率,发展了快速扫描双光子显微技术和多焦点并行扫描显微技术。快速扫描技术包括声光扫描技术^[7~10]、共振镜扫描技术^[11]等,但声光扫描器具有大的空间色散和时间色散,而且扫描角度小,通常为 44 mrad,使其在显微镜中应用受到限制。多焦点并行扫描多光子显微(MMM)技术是利用分光器件将一束光分成多束子光束,通过光学系统引入到显微镜,最终在样品处形成紧聚焦的阵列点,利用扫描器并行扫描阵列点,并利用 CCD 相机并行记录荧光信息,其空间分辨率类似于单光束双光子激发荧光显微技术。MMM 技术实现多路并行激发,还提高了光能利用率,同时提高了成像速度和单点驻留时间。目前报道的方案包括采用 Nipkow 转盘^[12]或微透镜阵列^[13,14]和衍射光学元件^[15]等分光技术。由于通常激光器发射高斯分布的激光束,因此 Nipkow 转盘和微透镜技术存在阵列点光强分布不均匀的问题,阵列中心点光强约为阵列边缘点光强的两倍,且光能利用率仅为 25%^[12]。Sacconi 等^[15]报道了基于衍射光学元件的 10×10 点阵激发的多焦点显微技术,光能利用率达到了 75%,阵列点不均匀性小于 1%。然而,这些多焦点多光子显微方法,不具有灵活性,无法根据激发光源功率大小实现阵列点密度变化以及选择性多区域多焦点激发。

本文利用空间光调制器(SLM)灵活地动态产生激发点阵,通过扫描振镜实现阵列点快速扫描激发,克服了空间光调制器刷新频率慢的缺点。基于同一显微装置且不改变任何硬件条件,分别实现了 10×10 和 50×50 激发点阵的全视场的并行扫描成像以及多个不同形状区域的多焦点扫描成像,分别获得了荧光珠和生物样品图像。

2 技术原理

本文所建立的多变视场的多焦点多光子激发荧光显微系统原理如图 1 所示,该系统主要包括相位型空间光调制器、二维扫描振镜、钛宝石锁模飞秒激光器(光谱物理公司, Tsunami)和利用 Olympus 公司显微元件搭建的显微镜(60×水镜,数值孔径 NA=1.0)。飞秒激光束经准直扩束后入射到空间光调制器,入射角约为 8°,空间光调制器采用 Holoeye 公司的 Pluto 近红外波段的纯相位空间光调制器(8 bit),像素数为 1920 pixel×1080 pixel,相位调制深度为

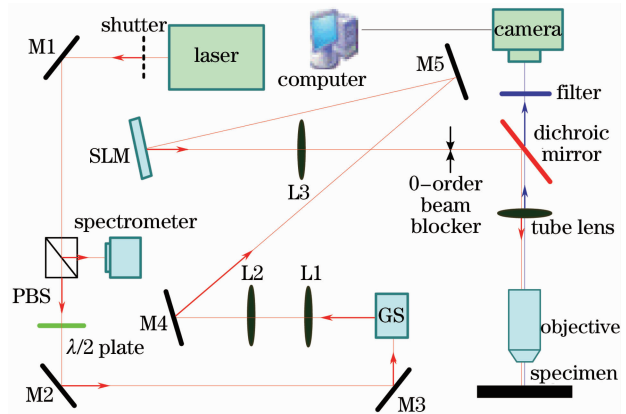


图 1 多变视场的多焦点多光子激发荧光显微系统原理图

Fig. 1 Schematic of the multiple variational field-of-view multifocal multiphoton microscope

刷新频率为 60 Hz。为了保证最佳的衍射图像对比度,要求入射光束刚好充满空间光调制器,实验中扩束后光束直径约为 10 mm。根据所需要的任意的激发点阵图案,利用 Gerchberg-Saxton(GS)算法计算出相应的相位图案^[16],通过 Holoeye 公司的控制软件写入空间光调制器,形成相位调制光波,再由傅里叶透镜变换形成所需要的阵列点图案,傅里叶透镜与显微镜管镜构成 4f 系统,管镜前焦面位于显微物镜后孔径,空间光调制器位于管镜的后焦面,阵列点图案经显微物镜在样品内形成激发点阵。傅里叶透镜的焦距为 200 mm,在管镜后焦面处最大点阵图案尺寸约为 15 mm,刚好对应显微镜完整视场。样品发射的荧光经双光子激发荧光滤光片滤除激发光后由 CCD 相机并行记录。

商用的空间光调制器刷新频率较低,无法实现高速阵列点扫描。以本实验采用的刷新频率为 60 Hz 的空间光调制器为例,对于 10×10 的激发点阵而言,如果要获得 512 pixel×512 pixel 的图像,需要给空间光调制器最少写入 2601 幅相位图,总共需要 43 s,这对于动态观测生物学过程是不够的。本文采用二维振镜改变光束入射角实现样品中的阵列点扫描,扫描速度由扫描振镜的扫描频率决定,而不受空间光调制器的刷新频率限制。具体扫描原理如图 2 所示,假设空间光调制器位于 $z=0$ 的平面内,如图 2 所示,入射平面光波 E_{in} 可以写为

$$E_{in} = \exp[i(kx \cos \alpha + ky \cos \beta)], \quad (1)$$

式中 k 为光波波数, x 和 y 分别为平行于空间光调制器表面的坐标轴, $\cos \alpha$ 和 $\cos \beta$ 为方向余弦, α 和 β 是入射角的函数。空间光调制器的相位调制函数可以表示为 $E_{mod} = \exp[i\phi(x, y)]$, ϕ 为需要产生的点阵

图案对应的相位函数,是 x 和 y 的函数。经由空间光调制器调制后的出射光波可以写为

$$E_{\text{ref}} = E_{\text{in}} E_{\text{mod}}, \quad (2)$$

因此,经过傅里叶变换后的光波可以表示为

$$G(u, v) = F(u, v) * \delta\left(u - \frac{\cos \alpha}{\lambda}, v - \frac{\cos \beta}{\lambda}\right) = F\left(u - \frac{\cos \alpha}{\lambda}, v - \frac{\cos \beta}{\lambda}\right), \quad (3)$$

式中 $F(u, v)$ 为空间光调制器的相位调制函数 F_{mod} 的傅里叶变换, $u = \frac{x}{F\lambda}$, $v = \frac{y}{F\lambda}$, u 和 v 为空间频率, f 为透镜焦距, λ 为光波长。根据(3)式可知,当改变 α 和 β 时,阵列点的空间频率将随之改变,又因为当入射角很小时, $\cos \alpha = \sin \theta_x \approx \theta_x$ 和 $\cos \beta = \sin \theta_y \approx \theta_y$, 因此,在小角度入射条件下,通过改变入射角能够线性地改变阵列点的空间频率,实现阵列点线性扫描。

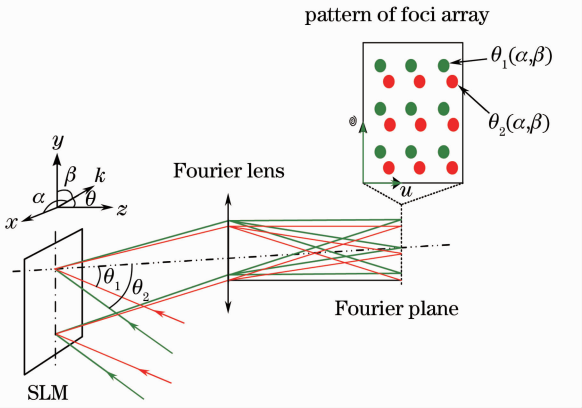


图2 多焦点阵列扫描原理图

Fig. 2 Schematic of scanning a multifocus array

3 结果与讨论

实验中调节飞秒激光输出中心波长为 800 nm, 功率为 1.8 W, 通过 Holoeye 公司控制软件将需要的阵列点的相位信息写入空间光调制器, 利用 LabVIEW 软件通过 NI 公司数据采集卡 (NI-PCI6115 DAQ) 控制 Cambridge 公司正交的二维扫描振镜改变光束入射角 (空间光调制器的法线与入射光线的夹角), 实现阵列点快速扫描。滤波片滤出的双光子激发荧光信号由 Andor 公司电子倍增电荷耦合器件 (EMCCD) (DU-888E-C00-# DZ) 记录。图 3 是 α -actinin 染色的大鼠心肌细胞的双光子激发荧光图像, 激发点阵为 10×10 , 视场大小为 $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$, 栅扫描速度为每秒 500 线, EMCCD 电子增益系数为 0。心肌细胞的肌节清晰可见。为了满足不同功率光源的情况, 该技术可以根据光源功率和

成像速度要求, 通过软件更改阵列点数量, 既达到快速成像的目的, 又能满足样品激发对光功率的要求, 例如 3×3 , 5×5 , 10×10 等, 而不需要更改任何硬件。设计产生了 50×50 的密集点阵并进行了荧光珠成像实验。图 4 为 50×50 密集点阵情况下获得的直径为 $40 \mu\text{m}$ 荧光珠的双光子荧光图像, 视场大小为 $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$, 由 NI 采集卡产生白噪声信号控制振镜实现随机扫描, 曝光时间 10 ms, EMCCD 电子增益系数为 1000。随机扫描有效地消除了栅扫描出现的图像栅格现象 (如图 3 所示)。因此, 该技术的阵列点密度的灵活性对于快速生物成像具有潜在的应用价值。

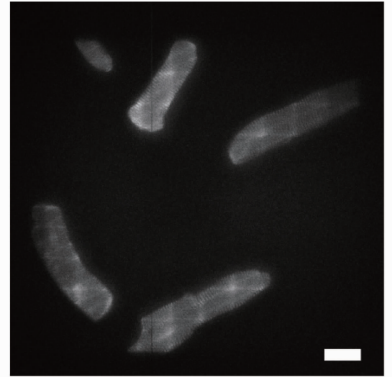


图3 10×10 点阵激发下, α -actinin 染色的大鼠心肌细胞的双光子荧光图像

Fig. 3 Two-photon fluorescence image of the sarcomere structure in several adult cardiomyocytes stained for α -actinin under 10×10 array

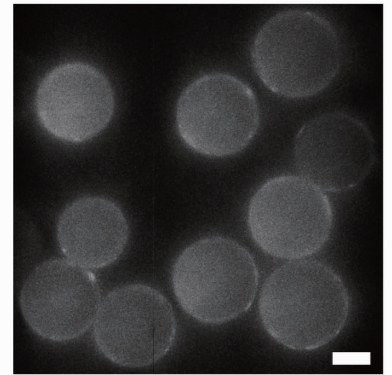


图4 50×50 点阵激发下荧光珠的双光子荧光图像

Fig. 4 Two-photon fluorescence image of the fluorescence beads under 50×50 array

在生物学成像应用中, 很多情况下感兴趣的是几个区域, 而不是整个视场, 通常的显微技术都是一次激发整个视场, 不具有选择性的激发。空间光调制器能够根据写入的任意所需要的相位图案产生对应的光强分布图案。我们根据感兴趣的区域的个

数、大小和形状,在不改变任何硬件的条件下,计算出对应的多个区域的激发点阵图案,利用 Matlab 软件产生相应的激发点阵图案,再通过 G-S 算法计算产生相应的相位图案,写入空间光调制器,产生多区域寻址的激发点阵图案,如图 5(a)所示。图 5(b)为通过多区域寻址激发获得的荧光珠双光子荧光图像。通过选择性多焦点激发,保证了只有感兴趣的

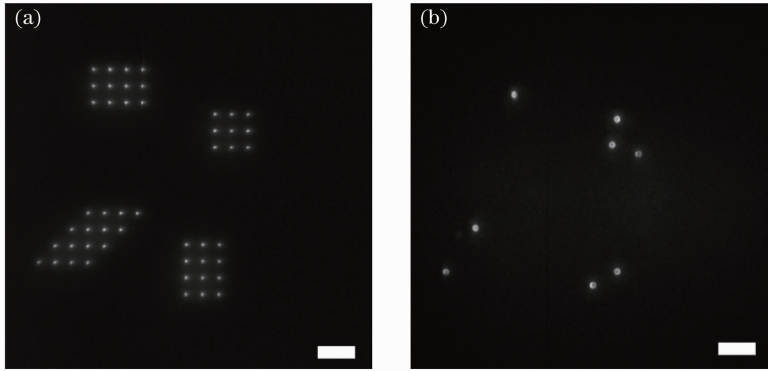


图 5 (a)多区域多焦点阵列图;(b)多区域寻址激发的荧光珠的双光子荧光图像

Fig. 5 (a) Image of the multifocus arrays in the multiple subareas; (b) two-photon fluorescence image of fluorescence beads in the multiple subareas addressed

4 结 论

发展了一种新的多焦点多光子激发荧光显微技术,通过软件控制写入空间光调制器所需要的任意激发点阵的相位图案,不但可以产生各种密度的点阵,而且可以产生寻址点阵,有效地增加了显微系统的灵活性和实用性,同时具有多焦点多光子显微技术的快速并行成像的优点。通过扫描入射角实现阵列点的快速扫描,克服了利用空间光调制器刷新频率慢的缺点。实验中为了消除 0 级光的影响,采用空间滤波的方法,在载波片上粘贴一个小的方形黑铝箔构成空间滤波器,放置于傅里叶透镜的焦平面上阻挡 0 级光,而光学衍射图案不受影响。利用荧光珠测量了系统的空间分辨率,解卷积后横向分辨率达到 $0.55 \mu\text{m}$,纵向分辨率 $1.3 \mu\text{m}$ 。因此,该显微技术的灵活性将使其成为生物医学研究中重要的成像工具。

参 考 文 献

- 1 W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, **248**(4951): 73~76
- 2 Chen Wang, Lingling Qiao, Zhengle Mao *et al.*. Reduced deep-tissue image degradation in three-dimensional multiphoton microscopy with concentric two-color two-photon fluorescence excitation[J]. *J. Opt. Soc. Am. B*, 2008, **25**(6): 976~982
- 3 Chen Deqiang, Xia Andong. Two-photon laser scanning

区域被激发,而其他区域不被照明,有效地消除了这些区域的光损伤和光漂白。对比声光寻址激发荧光显微技术,该技术实现了多个区域同时多焦点激发,而且通过构造不同的阵列点图案实现了不同形状的多个区域同时多焦点激发。据我们所知,这种多变视场的多焦点多光子显微技术还未见报道。

fluorescence microscopy and its applications[J]. *Physics*, 2000, **29**(4): 232~236

陈德强,夏安东. 双光子激光扫描荧光显微镜及其应用[J]. *物理*, 2000, **29**(4): 232~236

- 4 Zhang Chunyang, Gong Yixuan, Ma Hui *et al.*. Studying the effect of trichosanthin on choriocarcinoma cells with both two-photon and confocal laser scanning microscopy[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2001, **28**(5): 717~721

张春阳,贡宜萱,马 辉等. 双光子及共聚焦激光扫描显微技术研究天花粉蛋白对人绒毛癌细胞的作用机制[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28**(5): 717~721

- 5 Wei Xunbin, Guo Jin, Li Yan *et al.*. Progress of *in vivo* optical imaging[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2009, **46**(8): 41~47

魏勋斌,郭 进,李 延等. 光学活体成像技术进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2009, **46**(8): 41~47

- 6 Li Zheng, Zhang Zhenxi. Two-photon fluorescence imaging of cationic gold nanoparticles labeled fibroblasts and its application [J]. *J. Shenzhen University Science and Engineering*, 2008, **25**(3): 248~251

李 政,张镇西. 纳米金标记活细胞双光子荧光成像研究[J]. *深圳大学学报理工版*, 2008, **25**(3): 248~251

- 7 Lü Xiaohua, Zhan Cheng, Zhang Hongmin *et al.*. Construction of random-access scanning multiphoton fluorescence microscope system[J]. *Acta Optica Sinica*, 2006, **26**(12): 1823~1828

吕晓华,占 成,张红民等. 随机扫描多光子荧光显微成像系统[J]. *光学学报*, 2006, **26**(12): 1823~1828

- 8 A. Bullen, S. S. Patel, P. Saggau. High-speed, random-access fluorescence microscopy: high-resolution optical recording with voltage-sensitive dyes and ion indicators[J]. *Biophys. J.*, 1997, **73**(1): 477~491

- 9 Vijay Iyer, Bradley E. Losavio, Peter Saggau. Compensation of spatial and temporal dispersion for acousto-optic multiphoton laser-scanning microscopy[J]. *J. Biomed. Opt.*, 2003, **8**(3): 460~471

- 10 Shaoqun Zeng, Xiaohua Lü, Chen Zhan *et al.*. Simultaneous compensation for spatial and temporal dispersion of acousto-optical deflectors for two-dimensional scanning with a single prism [J]. *Opt. Lett.*, 2006, **31**(8): 1091~1093
- 11 J. M. Larson, S. A. Schwartz, M. W. Davidson. Resonant Scanning in Laser Confocal Microscopy [OL]. MicroscopyU: The Source for Microscopy Education. <http://www.microscopyu.com/articles/confocal/resonantscanning.html>
- 12 J. Bewersdorf, R. Pick, S. W. Hell. Multifocal multiphoton microscopy[J]. *Opt. Lett.*, 1998, **23**(9): 655~657
- 13 A. H. Buist, M. Muller, J. Squier *et al.*. Real time two-photon absorption microscopy using multipoint excitation [J]. *J. Microsc.*, 1998, **192**(2): 217~226
- 14 Y. Shao, J. Qu, H. Li *et al.*. High-speed spectrally resolved multifocal multiphoton microscopy[J]. *Appl. Phys. B*, 2010, **99**(4): 633~637
- 15 L. Sacconi, E. Froner, R. Antolini *et al.*. Multiphoton multifocal microscopy exploiting a diffractive optical element[J]. *Opt. Lett.*, 2003, **28**(20): 1918~1920
- 16 Z. Zalevsky, D. Mendlovic. Gerchberg-Saxton algorithm applied in the fractional Fourier or the Fresnel domain[J]. *Opt. Lett.*, 1996, **21**(12): 842~844

栏目编辑：韩 峰