

双光子激发时间分辨荧光光谱测量技术^{*}

刘立新¹⁾²⁾³⁾ 屈军乐¹⁾ 林子扬¹⁾ 陈丹妮¹⁾ 许改霞¹⁾ 胡 涛¹⁾ 郭宝平¹⁾ 牛憨笨^{1)†}

1) 深圳大学光电子学研究所, 深圳 518060)

2) 中国科学院西安光学精密机械研究所, 西安 710068)

3) 中国科学院研究生院, 北京 100049)

(2005 年 11 月 22 日收到, 2006 年 6 月 8 日收到修改稿)

建立了一台基于高重复频率扫描相机的双光子激发时间分辨荧光光谱测量系统, 能够同时测量样品的荧光光谱和寿命. 该系统的时间分辨率为 6.5—200 ps, 光谱分辨率为 1—3 nm, 能够实现快速数据采集以及可靠和可重复的寿命和光谱测量. 利用标准荧光染料(若丹明 6G、香豆素 314)及其混合溶液对该系统进行了测试, 所得到的荧光光谱分布和寿命值与文献报道一致. 实验结果表明, 该系统能有效区分多组分荧光团. 这为鉴别多荧光团或多组分生物组织提供了一种独特的对比方法, 可用于多光谱分辨荧光寿命成像和荧光共振能量转移成像等方面.

关键词: 荧光寿命, 荧光光谱, 双光子激发, 高重复频率扫描相机

PACC: 0760P, 0765, 3580B, 3350D

1. 引 言

荧光光谱技术已经发展成为生物医学领域的强大工具^[1,2]. 为了提高诊断的灵敏度和特异性, 人们总是希望获得尽可能多的特征参数. 荧光寿命测量为光谱测量提供了互补的功能信息, 可以对荧光分子所处微环境(Ca^{2+} , Na^{+} 等离子浓度及 pH 值、氧压等生理生化参数)进行定量测量^[3], 而且对于鉴别光谱严重重叠的多荧光团非常有用. 采用双光子激发(近红外: 700—1000 nm)能够显著提高样品的荧光成像深度和空间分辨率, 减少对活体样品的损伤, 提供更高的图像信噪比^[4,5], 而且一个波长能够同时激发具有不同吸收光谱的多种荧光团. 因此, 双光子激发时间分辨荧光光谱测量能够为生物医学检测和分析提供高时空分辨率的互补功能信息, 并有望在蛋白质间相互作用的研究^[6]、癌症的早期诊断^[7]和组织鉴别^[8,9]等生物学和临床医学领域获得重要的应用.

近年来, 随着高速探测技术以及量子点^[10,11]、荧光蛋白^[12]等新型荧光探针的不断发展, 荧光技术越来越多地应用到生物物理、生物化学以及生物医学等领域^[13,14], 解决样品中多组分荧光的问题也变得

越来越重要^[15,16]. 荧光光谱和寿命测量相结合为解决多组分问题提供了有效手段, 引起了生物医学领域的广泛关注. 多光谱分辨荧光寿命成像显微术 (fluorescence lifetime imaging microscopy) 已经发展了多种方法: 可以由多色仪和时间相关单光子计数 (time-correlated single-photon counting) 成像模块结合^[17,18], 也可以由门控图像增强器 (gated image intensifier) 与色散元件 (如双色镜^[19]、成像摄谱仪^[20] 等) 结合来实现. 扫描相机 (streak camera) 是获取时间分辨荧光光谱的另外一种方法, 与时间相关单光子计数法或门控图像增强器方法相比, 扫描相机能以高时间分辨、高速度和高灵敏度同时获得光脉冲的一维空间和时间结构信息, 当它与分光元件相结合, 就能够只用一个探测器同时获取发射信号的时间和光谱信息^[21,22].

本文建立了一台基于高重复频率扫描相机的双光子激发时间分辨荧光光谱测量系统. 用标准荧光染料(若丹明 6G、香豆素 314)及其混合溶液对该系统进行了测试. 实验结果表明, 该系统能够采用光谱分辨和简单的单组分数据拟合的方法, 有效区分双组分荧光团. 因此它提供了一种解决复杂的多荧光团或多组分问题的简单而有效的途径.

^{*} 国家自然科学基金(批准号: 60138010, 60408011)和广东省自然科学基金(批准号: 5010500)资助的课题.

[†] E-mail: hbnliu@szu.edu.cn

2. 实验系统

双光子激发时间分辨荧光光谱测量系统主要由钛宝石飞秒激光器、脉冲提取器、荧光显微物镜、棱镜分光光谱头、自行研制的高重复频率皮秒扫描相机、光锥耦合的电荷耦合器件(CCD)实时读出系统和计算机等组成,如图1所示.

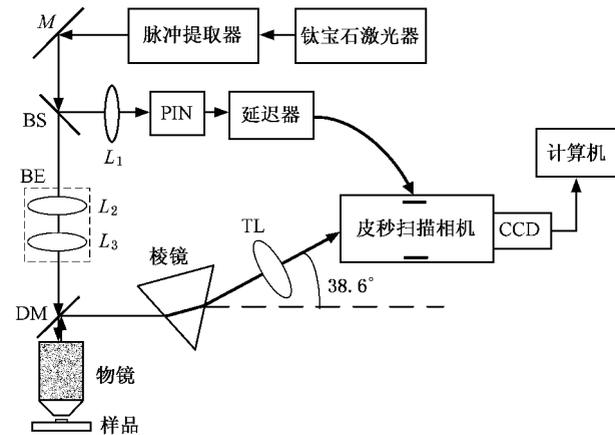


图1 双光子激发时间分辨荧光光谱显微测量系统原理图 M 为全反镜, L_1-L_3 为透镜, DM 为二色镜

钛宝石激光器输出重复频率为76 MHz,脉冲宽度为120 fs的激光,波长在700—980 nm范围连续可调.为了扩张荧光寿命测量范围,扫描相机的工作频率在1 MHz以内,相应的光脉冲重复频率也应与扫描相机一致.为此,采用脉冲提取器把飞秒激光器输出的超短脉冲重复频率由76 MHz降低到1 MHz以内,然后由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光电二极管,通过可变延迟器和脉冲放大器后作为扫描相机的触发信号;主光束首先由扩束器BE扩束,然后通过显微物镜激发样品(如荧光染料或生物组织),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由棱镜分光系统分光,再经过筒镜TL聚焦到扫描变像管的光阴极上.若扫描相机的扫描方向与荧光的光谱展开方向垂直,则通过扫描电路和扫描变像管偏转系统的共同作用,在荧光屏上得到不同光谱的时间分辨扫描图像,最后通过光锥耦合的CCD实时读出系统,记录不同荧光光谱的强度随时间的变化信号.

皮秒扫描相机是该系统的核心部分,采用特殊设计的高重复频率斜坡电压发生器,可在1 MHz以

内的重复频率下工作,扫描电路的触发晃动与触发信号的重复频率及幅度的稳定性有关^[23].另外,为了满足不同荧光染料以及生物组织对荧光寿命测量范围的不同要求,该相机的扫描量程分为1,6,12和60 ns四档.

3. 实验结果及讨论

实验中采用的激光器输出波长为800 nm,脉冲宽度为120 fs,重复频率为1 MHz,输出功率为9 mW.当扫描相机处于静态工作模式时,我们用已知波长的激光对系统做了光谱标定,并测量了若丹明6G和香豆素314两种标准荧光染料的荧光光谱.在扫描相机的动态模式下,同时测量了若丹明6G和香豆素314混合溶液的光谱和寿命,并用Matlab语言编程对荧光衰减进行最小二乘法拟合分析.

3.1. 荧光光谱标定和测量

实验系统采用棱镜作为分光元件,由于色散的非线性,必须对荧光屏上像素位置与光波长的对应关系进行标定.我们把波长为458,476,488,514,532和632.8 nm的激光引入图1所示的实验系统,测量它们在荧光屏上所对应的像素位置,并通过下面给出的三阶多项式拟合来标定光谱分布:

$$y = A + B_1x + B_2x^2 + B_3x^3. \quad (1)$$

利用(1)式得到的拟合曲线如图2所示,其光谱分辨率为1—3 nm.

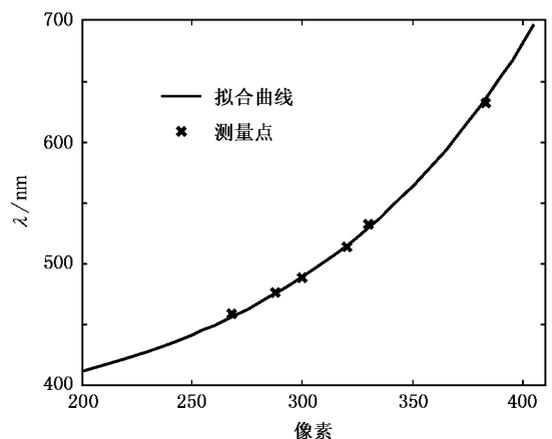


图2 波长与像素的三阶多项式拟合曲线

选取了若丹明6G和香豆素314对系统进行测试,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 μmol/L的溶液.首先在扫描相机处

于静态模式时测量这两种荧光染料的双光子激发荧光光谱,其光谱分辨图像可以直接由 CCD 相机记录,沿色散方向读数并根据光谱标定结果得到两种荧光染料的光谱分布.图 3 和图 4 分别为利用图 1 所示系统测量得到的若丹明 6G 和香豆素 314 溶液

的光谱分辨图像和荧光光谱分布.由图 3(b)可以看出,若丹明 6G 的发射峰值波长为 552 nm,光谱展宽从 520 至 640 nm.由图 4(b)可以看出,香豆素 314 的发射峰值波长为 480 nm,光谱展宽从 450 至 580 nm,均与文献报道的结果一致^[24].

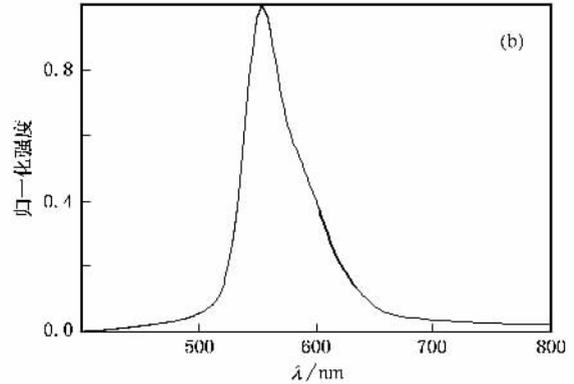
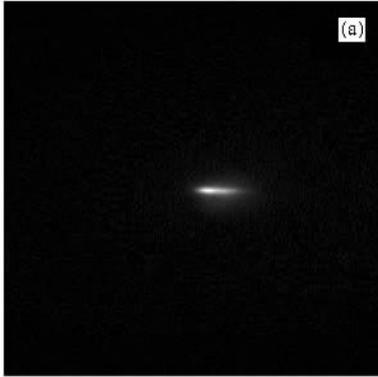


图 3 若丹明 6G 光谱分辨图像(a)和荧光光谱分布(b) 峰值发射波长为 552 nm

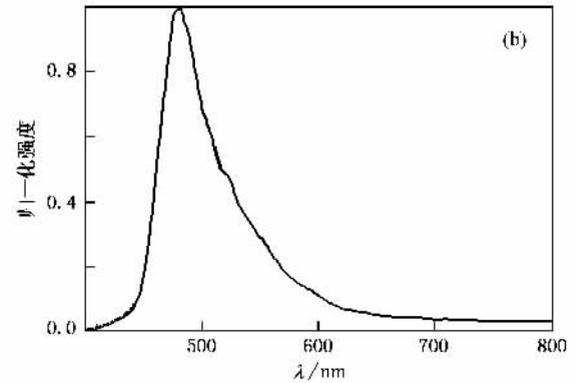
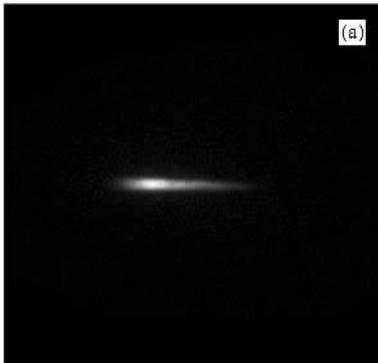


图 4 香豆素 314 光谱分辨图像(a)和荧光光谱分布(b) 峰值发射波长为 480 nm

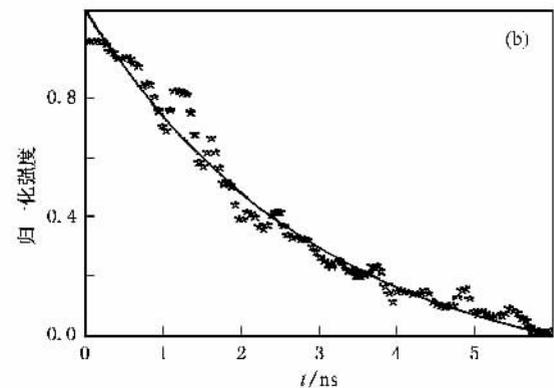
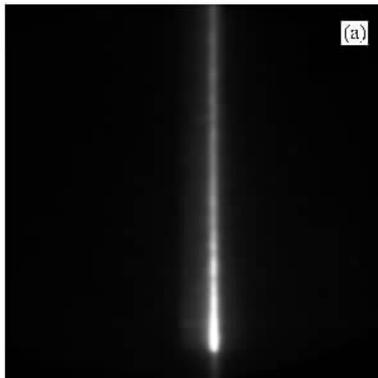


图 5 若丹明 6G 和香豆素 314 混合溶液的荧光扫描图像(a)和荧光强度衰减曲线(b)

3.2. 荧光光谱和荧光寿命同时测量

及相机在扫描方向的动态空间分辨率,可由下式简单表示:

扫描相机的时间分辨率 Δt 取决于扫描速度以

$$\Delta t = \frac{1}{\delta V}, \quad (2)$$

式中 δ 为相机在扫描方向的动态空间分辨率,由变像管的时间弥散等动态性能以及飞秒激光脉冲重复频率稳定度等因素确定; V 是相机的扫描速度.当 δ 一定时 Δt 只与 V 有关.我们研制的相机的扫描量程设置为 1, 6, 12 和 60 ns 四档,对于最快的扫描速度(1 ns 量程),其时间分辨率为 $6.5 \text{ ps}^{[25]}$;对于 60 ns 量程,时间分辨率为 200 ps.实验中所采用的量程为 6 ns,时间分辨率为 20 ps.事实上,扫描相机的

时间分辨率是使用标准具和飞秒激光器等通过实验测量获得的^[25].

荧光光谱和寿命是荧光分子的特征参量.对于单组分荧光团的寿命测量,其荧光强度衰减可以表示为单指数函数,

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau). \quad (3)$$

这里 $I(t)$ 是样品受到光脉冲激发后 t 时刻测量得到的强度, I_0 是 $t=0$ 时的荧光强度, τ 为荧光寿命,

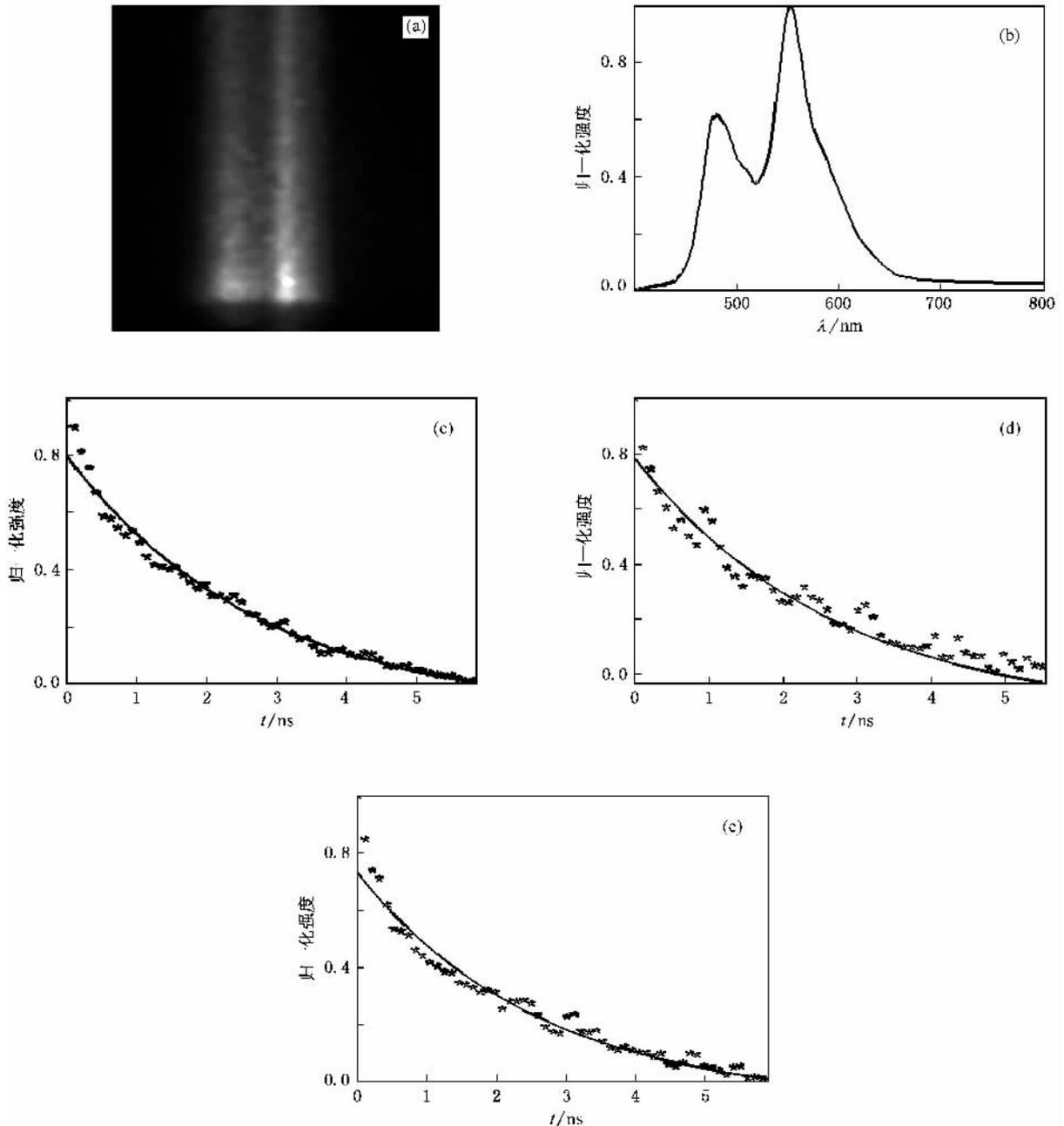


图 6 若丹明 6G 和香豆素 314 混合溶液的光谱分辨荧光扫描图像、荧光光谱分布和荧光强度衰减曲线 (a) 光谱分辨荧光扫描图像 (b) 荧光光谱分布 (c) 混合溶液光谱积分的荧光强度衰减曲线 (d) 香豆素 314 荧光强度衰减曲线 (e) 若丹明 6G 荧光强度衰减曲线

是分子的特征值. τ 定义为荧光强度衰减到初始值 I_0 的 $1/e$ (37%) 时所需要的时间. 实际上, 考虑到荧光团的组分或纯度等因素, 荧光强度通常呈多指数衰减, 因此会有复杂的衰减曲线, 一般表示为

$$I(t) = \sum a_i \exp(-t/\tau_i), \quad (4)$$

式中, τ_i 为不同荧光团的荧光寿命, a_i 为各组分所对应的比例.

把配制的 100 $\mu\text{mol/L}$ 若丹明 6G 和香豆素 314 的乙醇溶液按照 1:4 比例混合, 用来模拟双组分生物样品. 图 5 所示为混合溶液无光谱分辨的荧光扫描图像及沿扫描方向的荧光强度衰减曲线. 由于这两种荧光染料的荧光寿命值非常接近, 根据图 5(b) 所示的衰减曲线难以区分样品的各组分. 尽管利用 (3) 式所给出的数学模型成功地对荧光强度衰减曲线做了最小二乘拟合分析, 并且得到混合溶液的平均荧光寿命为 2.86 ± 0.02 ns, 但由于多组分模型对于测量噪声十分敏感^[26], 因此根据 (4) 式的双组分拟合未能成功得到若丹明 6G 和香豆素 314 各自的荧光寿命.

如果荧光光谱和寿命同时测量就可有效解决上述问题. 图 6 所示为若丹明 6G 和香豆素 314 混合溶液的光谱分辨荧光扫描图像、光谱分布及荧光强度衰减曲线. 由图 6(b) 可以看出, 香豆素 314 和若丹明 6G 的光谱能够很好地分辨开, 峰值发射波长在 480 和 552 nm 附近, 分别与这两种染料对应. 图 6(c) 所示的混合溶液的无光谱分辨荧光强度衰减数据由于受到噪声影响, 很难根据 (4) 式进行拟合分析. 但是如果采用荧光光谱和寿命两种对比机制相结合, 该拟合过程就会极大地简化. 根据图 6(a) 分

别在香豆素 314 和若丹明 6G 对应的不同光谱处读取荧光强度衰减信号, 得到图 6(d) 和 (e) 的荧光衰减数据并根据 (3) 式拟合得到香豆素 314 的荧光寿命为 2.84 ± 0.02 ns, 若丹明 6G 的荧光寿命为 2.92 ± 0.02 ns, 寿命值均与文献报道一致^[27-28]. 因此, 由图 6 可以很直观地看出溶液中所包含的荧光组分, 且根据单指数拟合方法容易计算各组分的荧光寿命. 通过各组分的荧光光谱分布和相应的寿命值就能够快速准确地确定荧光团种类, 为生物医学研究中生物样品及组织鉴别提供了一种有效的途径.

4. 结 论

本文介绍了一种基于高重复频率扫描相机的双光子激发时间分辨荧光光谱测量系统, 时间分辨率为 6.5—200 ps, 光谱分辨率为 1—3 nm. 该系统性能由两种标准荧光染料——若丹明 6G 和香豆素 314 及其混合溶液进行了详细测试, 得到的光谱和寿命测量结果与文献报道值一致. 通过单独寿命测量与光谱分辨寿命测量方法对比, 表明荧光光谱和寿命同时测量系统能够只通过简单的单指数拟合获取不同荧光团或不同组分的荧光寿命, 为区分多荧光团或多组分生物组织提供了一种独特的对比方法, 因此可用于复杂生物样品的组分分析. 该系统能够与单点扫描模式结合实现多光谱分辨荧光寿命成像, 或者嵌入微透镜阵列实现多焦点多光子显微成像, 可应用于组织的自体荧光成像进行癌症早期诊断、荧光共振能量转移成像研究蛋白质分子间相互作用等. 这些工作目前正在实验室中进行.

[1] Andersson-Engels S, af Klinteberg C, Svanberg K et al 1997 *Phys. Med. Biol.* **42** 815

[2] Vo-Dinh T 2003 *Biomedical Photonics Handbook* (Florida: CRC Press)

[3] Herman B 1998 *Fluorescence Microscopy* (New York: Springer-Verlag) p59

[4] Denk W, Strickler J H, Webb W W 1990 *Science* **248** 73

[5] Piston D W 1999 *Trends. Cell Biol.* **9** 66

[6] Ameer-Beg S M, Edme N, Peter M et al 2003 *Proc. SPIE* **5139** 180

[7] Marcu L, Jo J A, Butte P V et al 2004 *Photochem. Photobiol.* **80** 98

[8] Li B H, Xie S S, Lu Z K 2002 *J. Optoelectron. Laser* **13** 1071 (in Chinese) [李步洪、谢树森、陆祖康 2002 光电子·激光 **13** 1071]

[9] Ashjian P, Elbarbary A, Zuk P et al 2004 *Tissue Eng.* **10** 411

[10] Michalet X, Pinaud F F, Bentolila L A et al 2005 *Science* **307** 538

[11] Meng L, Song Z X 2004 *Prog. Biochem. Biophys.* **31** 185 (in Chinese) [孟磊、宋增璇 2004 生物化学与生物物理进展 **31** 185]

[12] Ehrhardt D 2003 *Curr. Opin. Plant Biol.* **6** 622

[13] Wang C, Wang G Y, Xu Z Z 2004 *Acta Phys. Sin.* **53** 1325 (in Chinese) [王琛、王桂英、徐至展 2004 物理学报 **53** 1325]

- [14] Fang Q , Papaioannou T , Jo J A *et al* 2004 *Rev. Sci. Instrum.* **75** 151
- [15] Qu J L , Niu H B 1997 *Acta Biophys. Sin.* **13** 683 (in Chinese)
[屈军乐、牛懋笨 1997 *生物物理学报* **13** 683]
- [16] Liljeborg A , Carlsson K , Andersson R M 1998 *Proc. SPIE* **3568** 82
- [17] Bird D K , Eliceiri K W , Fan C H *et al* 2004 *Appl. Opt.* **43** 5173
- [18] Becker W , Bergmann A , Biskup C *et al* 2005 *Proc. SPIE* **5862** 174
- [19] Siegel J , Elson D S , Webb S E D *et al* 2001 *Opt. Lett.* **26** 1338
- [20] Vereb G , Jares-Erijman E , Selvin P R *et al* 1998 *Biophys. J.* **74** 2210
- [21] Qu J L , Liu L X , Guo B P *et al* 2005 *Proc. SPIE* **5630** 510
- [22] Qu J L , Liu L X , Chen D N *et al* 2006 *Opt. Lett.* **31** 368
- [23] Guo B P , Cunin B , Niu H B 2005 *Acta Photon. Sin.* **34** 442 (in Chinese) [郭宝平、Cunin B、牛懋笨 2005 *光子学报* **34** 442]
- [24] Brackmann U 2000 *Lambdachrome Laser Dyes* (Goettingen : Lambda Physic) p120
- [25] Liu L X , Qu J L , Lin Z Y *et al* 2006 *Acta Opt. Sin.* **26** 373 (in Chinese) [刘立新、屈军乐、林子扬等 2006 *光学学报* **26** 373]
- [26] Lakowicz J R 1983 *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (New York : Plenum Press) p67
- [27] Krishnan R V , Saitoh H , Terada H *et al* 2003 *Rev. Sci. Instrum.* **74** 2714
- [28] Cole M J , Siegel J , Webb S E D *et al* 2001 *J. Microsc.* **203** 246

Time-resolved two-photon excitation fluorescence spectroscopy^{*}

Liu Li-Xin^{1,2,B)} Qu Jun-Le¹⁾ Lin Zi-Yang¹⁾ Chen Dan-Ni¹⁾ Xu Gai-Xia¹⁾ Hu Tao¹⁾
Guo Bao-Ping¹⁾ Niu Han-Ben^{1)†}

¹ *Institute of Optoelectronics , Shenzhen University , Shenzhen 518060 , China*)

² *Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics , Chinese Academy of Sciences , Xi'an 710068 , China*)

³ *Graduate School of Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 , China*)

(Received 22 November 2005 ; revised manuscript received 8 June 2006)

Abstract

A novel time-resolved two-photon excitation fluorescence spectroscopic system based on a high repetition rate streak camera and capable of simultaneous measurement of fluorescence spectrum and lifetime of the samples is presented. The system has high temporal (6.5—200 ps) and spectral (1—3 nm) resolutions and permits rapid data acquisition and reliable and reproducible lifetime and spectrum determinations. The system is tested with standard fluorescent dyes (rhodamine 6G , coumarin 314 and their mixtures) and the lifetimes and spectra obtained agree well with those reported in the literatures. Experimental results indicate that our system provides a unique contrast mechanism for discriminating multi-fluorophore or multi-component of biological tissues through spectrally and temporally resolved information and may find extensive applications in multispectral fluorescence lifetime imaging and fluorescence resonance energy transfer imaging.

Keywords : fluorescence lifetime , fluorescence spectrum , two-photon excitation , high repetition rate streak camera

PACC : 0760P , 0765 , 3580B , 3350D

^{*} Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 60138010 , 60408011) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province , China (Grant No. 5010500).

[†] E-mail : hbnui@szu.edu.cn