

双光子阵列点激发同时多维荧光信息的处理^{*}

林子扬 付 哲 刘立新 胡 涛 屈军乐 郭宝平 牛憨笨

(深圳大学光电子学研究所, 光电子器件与系统教育部重点实验室, 广东省光电子器件与系统重点实验室, 深圳 518060)

(2006 年 1 月 18 日收到, 2006 年 8 月 15 日收到修改稿)

五维同时荧光信息显微成像方法是一种新的荧光信息获取技术, 它采用了双光子阵列点激发方式. 这一方法可同时获取激发阵列点每点荧光的位置信息、荧光光谱信息和荧光寿命信息, 弥补了现有荧光检测技术的不同功能信息不具有同时性的缺陷. 给出了从这种技术的复合信息中提取复合光谱几何强度结构图像、不同光谱几何强度结构图像、不同光谱寿命图像的方法. 提出了一种激发荧光强度修正系数矩阵方法, 消除阵列点激发光强不均匀对激发荧光强弱产生的不利影响, 取得明显效果. 实验对实际样品做了数据采集和处理, 给出图像结果, 表明处理的效果良好. 对存在的问题也作了讨论.

关键词: 荧光信息处理, 双光子, 荧光光谱, 荧光寿命

PACC: 8732L, 4230

1. 引 言

荧光分析和检测技术已应用于材料、生物医学和临床诊断等领域, 其中荧光光谱技术和双光子荧光效应得到了较广泛的应用^[1-4], 可以显示样品中荧光分子团的组分和分布. 荧光寿命成像提供了一种定量获取样品功能信息的手段^[5,6], 已在生物物理、生物化学以及临床医学诊断等领域获得广泛的应用. 双光子激光扫描显微技术以其高空间和时间分辨率三维荧光成像的特征成为深入生物体功能与现象的新工具^[7,8], 特别是在活细胞的研究方面, 双光子对活细胞的杀伤力与光毒性都较小, 适合长时间观察. 双光子技术结合荧光蛋白标记方法可用于研究活细胞中蛋白质的形貌、运动和化学特性等, 如跟踪、量化单一蛋白和复合蛋白, 探测蛋白质分子之间的相互作用, 作为一种传感器描述生物事件和信息, 为理解蛋白质的功能提供了一个重要的方法^[9]. 随着荧光标记技术的进一步发展和研究的深入, 对荧光检测的要求也会越来越高. 在现有的荧光检测分析技术中, 荧光分子的几何信息、光谱和寿命等功能信息是不能同时获取的, 这对研究活细胞中的生物医学问题是个不足, 使获取的不同功能信息不具有同时性. 五维同时荧光信息显微成像技术

是我们近期提出的一种新的荧光检测技术^[10], 它利用双光子阵列点激发, 能同时获取每点荧光三维位置信息、荧光光谱信息和荧光寿命信息. 这种新的荧光检测技术弥补了现有荧光检测技术对不同功能信息不具有同时性的缺陷. 由于从这种新的荧光检测技术获取的是一个复合信息, 因此如何将复合信息中的位置、光谱和寿命等信息直观地显示出来是一个信息处理问题. 本文的目的就是要找到从新的荧光检测技术获得的复合信息中提取复合光谱几何强度结构图像、不同光谱几何强度结构图像和不同光谱寿命图像的方法.

2. 五维同时荧光信息显微成像技术原理简介

建立基于同步扫描相机的五维同时荧光信息显微成像系统原理如图 1 所示. 该系统主要由飞秒激光器、脉冲提取器、准直装置、微透镜阵列、显微镜物镜、三维微位移系统、棱镜分光系统、同步扫描相机及光电荷耦合器件 (CCD) 读出系统和计算机组成. 飞秒激光器输出的光经脉冲提取器后变成 1 MHz 的飞秒脉冲序列, 通过分束镜 BS1 分为两束光, 一路由 PIN 光电管接受作为同步扫描相机的同步信号, 另一路光经准直装置后入射微透镜阵列, 再

^{*} 国家自然科学基金重点项目 (批准号: 60138010) 资助的课题.

经透镜 L 变为平行光入射显微物镜,成为阵列点激发光.激发出的荧光由显微物镜收集,经透镜 L 变为平行光,再由双色分光镜选出荧光信号.经棱镜分光系统分光进入同步扫描相机,扫描后得到光谱分辨荧光寿命信号.图 1 中,垂直纸面向下方向为 y 方向,而纸面为 xz 平面.光谱沿 x 方向展开,同步扫描相机的扫描方向与 y 同方向,即荧光寿命沿 y 方向衰减.从光锥 CCD 获取的信息如图 2 所示.

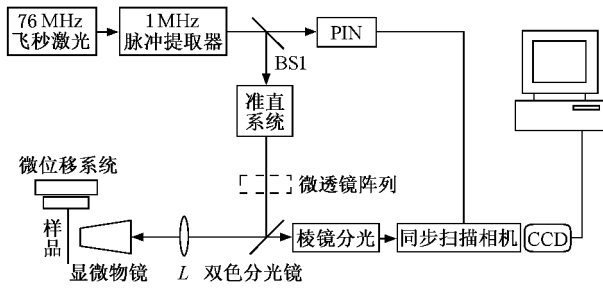


图 1 五维同时荧光信息显微成像技术原理示意图

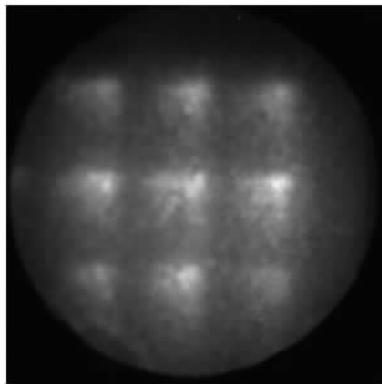


图 2 3×3 点阵同时荧光位置、光谱、寿命信息图

从图 2 可看出,每一点的信息中包含了荧光强度、几何位置、光谱和寿命的信息.微位移系统每移动一步就获得类似图 2 的结果.当微位移系统带动样品以合适的精度在 xy 平面内移动一定区域后,就得到有几何位置顺序并包含了荧光强度、光谱和寿命信息的点阵序列图.这样的复合信息需要经过计算机的合理处理,才能直观地显示出需要的信息.

系统光学显微镜、微透镜阵列、分光棱镜和同步扫描相机是自行设计的.微位移系统由美国 Newport 公司制造,横向空间分辨率高达 $0.2 \mu\text{m}$.通过三维微位移系统在 xy 平面内移动,获得样品某一 xy 平面的信息,再通过 z 方向的微位移,获得样品的三维空间信息.因此,系统可以获得双光子阵列点激发五

维荧光显微功能图像信息,即三维空间信息、光谱信息和寿命信息,提高了信息的获取速率和信息获取的同时性.系统中使用了同步扫描相机,更适用于高重复频率荧光信号的测量,它具有 6.5 ps 的高时间分辨率,可记录荧光衰减的过程.这种多参量复合测量和多参量同时测量技术,能够适应生物学研究中不同层次的需要,是一种新型的光谱分辨荧光显微功能成像技术.

3. 五维同时荧光信息的处理方法

五维荧光序列信息同时包含了样品的几何信息、光谱信息和寿命信息.下面就以双光子 3×3 阵列点激发为例,阐述从复合信息中获取样品的复合光谱几何强度结构图像、不同光谱几何强度结构图像以及不同光谱寿命图像的方法.

3.1. 复合光谱几何强度结构图像的提取

要获取复合光谱几何强度结构图像,需知道每一取样点的几何位置和相应的荧光强度.从上述原理可知,光锥 CCD 相机获得的 3×3 阵列荧光复合信息在每幅取样图中的位置是不变的,改变的是样品的位置.由于是点阵图,不必知道每一取样点的几何坐标,只需知道不同取样点间的拓扑关系.我们采取对每一幅取样图的左上点 xy 作矩阵元的标识,并命名这一幅取样图的文件名,这样每一幅取样图的第一取样点间的拓扑关系就得以确定.当微位移系统在 x, y 方向移动的距离不大于采样阵列点在相应 x, y 方向的间距时,取样的数据就不会发生重叠.在取样步数确定后,其他 8 个取样点在图像中的位置拓扑关系就可确定.设 x, y 表示采样序列图像左上取样点在图像阵列中的位置和序列图像的序号, k 为 x, y 方向位移的步数 (n_x, n_y) 表示取样阵列点,若用 $D[i, j]$ 表示复合光谱几何强度结构图像矩阵,则它与采样序列图像点阵 $P[x + n_x, y + n_y]$ 的位置关系可表示为

$$D[i, j] = P[x + n_x k, y + n_y k] \quad (n_x, n_y = 0, 1, \dots, m_{\max})$$

式中, $x = 0, 1, \dots, k; y = 0, 1, \dots, k; i = 0, 1, \dots, x + n_x k; j = 0, 1, \dots, y + n_y k; n_x$ 和 n_y 的最大值为阵列点行列数减 1,如 3×3 阵列点时 $n_{\max} = n_{x\max} = n_{y\max} = 3 - 1 = 2$.

从系统原理可知,采样序列图像中每一取样点

的位置和信息记录的区域在系统校准后是固定的,记录的信息内容也是相同的,所以对每一取样点荧光强度的处理方法是相同的。 3×3 阵列点激发使用 3×3 区域模板确定 9 个荧光信息的区域与位置,每个区域是一个矩形区域。在每个矩形的限定区域内,对每一像素的强度求和取平均值,得到取样点荧光强度,并保存于 $D[i, j]$ 相应的矩阵元中。当处理完点阵采样序列图像后,在 $D[i, j]$ 中就记录了要显示的图像。为了得到合理的强度值,应当对采样图像序列做背景噪声的去除。

由于是阵列点激发,每一点的激发光光强不能保证完全一样,这对激发的荧光强度带来激发强度误差。为了修正这一误差,引入激发荧光强度修正系数矩阵。为得到激发荧光强度修正系数矩阵,用一均匀染料样片置于样品位置,采集 3×3 阵列点激发的荧光光强。例如,若丹明 6G 染料的荧光强度分布情况如图 3 所示,其中的数字表示光强计数率。

3017	6035	3862
9775	12069	10862
6035	8448	7241

图 3 3×3 阵列激发若丹明 6G 染料荧光强度分布

以中心最亮点的光强为“1”,归一化得到激发荧光强度修正系数矩阵见图 4。

0.25	0.50	0.32
0.81	1.00	0.90
0.50	0.70	0.60

图 4 若丹明 6G 激发荧光强度修正系数矩阵

修正时,将点阵采样序列图像的每一幅图 3×3 区域模板中的强度值除以相应修正系数,就得到修

正后的荧光强度,经过重建后的强度结构图像 $D[i, j]$ 也得到了修正。

通过增强系数只能提高各区域的整体亮度,在有效图像信息得到增强的同时,噪声信息也会随之增强。为了去除噪声,引入强度阈值噪声和中值滤波方法去除噪声。

3.2. 不同光谱几何强度结构图像的获取

光谱信息在点阵采样序列图像的每一幅图的水平方向(x 方向),亦即 3×3 区域模板每个区域水平方向的位置变化表示了不同的光谱。由于采用了棱镜分光,光谱的展开不是线性的,因此需要标定波长与像素位置的对应关系。用 632 nm 谱线的半导体激光、532 nm 谱线的 YAG 激光倍频光、四条谱线分别为 514, 488, 476, 458 nm 的氩离子激光作为激发光源。在样品位置放一平面玻璃片,分别测得每一区域中光谱线与像素位置的离散对应关系,再通过拟合获得像素位置与光谱的对应关系。从棱镜分光原理可知,光谱仅在 x 方向展开,所以沿 y 方向同一列区域中光谱线与像素的对应位置关系相同。对 3×3 区域模板实验测得沿 y 方向同一列区域中光谱线与像素的对应位置见表 1。

表 1 实验光谱线与像素的对应位置

参 数	取 值						
波长/nm	632	532	514	488	476	458	
第一列像素位置	177	221	226	241	253	267	
第二列像素位置	322	369	376	396	405	422	
第三列像素位置	467	520	527	551	558	577	

每一列的拟合公式为

$$\lambda = A \exp(-x/t) + B, \quad (1)$$

式中, λ 为波长(单位为 nm), x 为像素值。每一列对应的拟合系数见表 2。

表 2 (1) 式中的拟合系数取值

位 置	A	t	B
第一列	1815.46841	96.26786	343.65568
第二列	6635.85383	101.60377	353.21259
第三列	13457.11088	122.12824	338.16894

通过标定获得 3×3 区域模板每个区域像素位置与光谱的对应关系后,就可用提取复合光谱几何强度结构图像的方法构建不同光谱的强度结构图。这时每个区域的中心位置由所选取的波长对应的像

素位置确定,而区域宽度由设定的光谱宽度波长对应的像素位置确定.这样确定了 3×3 区域模板后,强度的构建与提取复合光谱几何强度结构图像的方法完全相同.可称此时的区域模板为光谱区域模板.

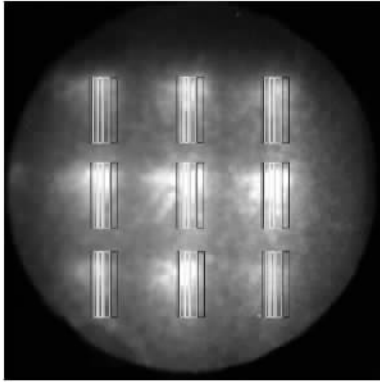


图 5 光谱区域模板示意图

在图 5 所示的像素与光谱的对应关系中,5 种灰度色的矩形框分别对应 5 种不同的波长范围.由于像素与波长之间存在着非线性对应关系,所以即使波长范围的宽度相同,其模板所取的矩形框宽度也是不同的.由短波长到长波长(图 5 从右向左)相等波长宽度对应的像素数逐渐减少,矩形框的宽度也变窄.要生成某一个波长范围的光谱分辨图像,就用相应灰度色的矩形框划分原始图像的信息提取区域.

3.3. 不同光谱寿命图像的获取

利用光谱区域模板,将区域中强度计算改为荧光寿命的计算,就可获得不同光谱的寿命图像.

在每个矩形的限定区域内,先对每一行像素 x 方向分别求和取平均值,得到 y 方向上的强度分布,即寿命衰减方向的强度分布,保存到数组 $[h]$ 中.然后搜索 $[h]$ 中强度最大点的位置 h_{\max} .荧光寿命的定义是强度从峰值衰减为峰值的 e^{-1} 所经历的时间,所以在 $[h]$ 数组中搜索强度最接近最大峰值强度 e^{-1} 的像素位置 $h_{e^{-1}}$,并计算 h_{\max} 与 $h_{e^{-1}}$ 之间的像素差 d .系统中采用的是同步扫描相机记录荧光的衰减,当同步扫描相机的扫描速度标定后,就知道每个像素代表的时间 T ,于是荧光寿命 τ 为

$$\tau = T \times d. \quad (2)$$

获得矩阵 $D[i, j]$ 每一矩阵元的寿命值后,用数字图像伪彩色方法表示寿命图.

将上述方法与调用 Matlab 软件拟合模块中的

负指数拟合函数计算寿命方法作了比较.调用首先改写 Matlab 中的 `lsqcurvefit` 函数(任意曲线拟合函数),使其满足负指数拟合的要求,并将改编后的函数保存为文件 `M`.然后使用 `mathTools` 公司的 `Matcom` 工具,将 `M` 文件转化成可供调用的 `C++` 代码文件,就可以在主程序中调用此 `C++` 代码文件.实验对纯若丹明 6G 染料样品上任取一点,用两种方法处理,处理结果如图 6 所示,得到的寿命值较为一致.

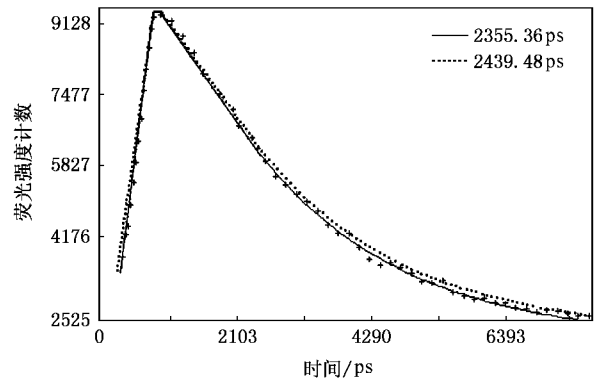


图 6 纯若丹明 6G 染料样品上任取一点的荧光寿命计算结果

图 6 为若丹明 6G 染料样品任取一点的荧光寿命计算结果,其中虚线表示的是 Matlab 负指数拟合函数计算寿命的结果.从图 6 可以看出,若丹明 6G 染料荧光寿命在纳秒级.利用(2)式计算得到的荧光寿命的相对误差为 1.12%,调用 Matlab 曲线拟合模块计算荧光寿命的相对误差为 0.87%.通过比较可知,本文的方法是可行的.

4. 实验与数据处理结果

对两种样品在五维同时荧光信息显微成像系统上作了成像实验,按五维同时荧光信息处理方法中的三种处理方法对实验数据做了处理.一种样品是徕卡显微镜带的样片,是一种植物茎的横断面,另一种是植物芦荟叶染若丹明 6G 和 6B 染料样片.双光子激发波长为 800 nm,取样阵列点在样品上 x 和 y 方向的间距为 $63 \mu\text{m}$,微位移系统在 x 和 y 方向移动的步距为 $3 \mu\text{m}$,同步扫描相机的扫描速度是每像素 84.12 ps .

4.1. 复合光谱几何强度结构图像的提取结果

两种样品复合光谱的几何强度结构图像信息处理结果如图 7 所示.图 7(a)和(b)是徕卡植物样片

结果 图 7 (c) 和 (d) 是植物芦荟叶染若丹明 6G 和 6B 染料样片结果 其中图 7 (b) 和 (d) 是使用激发荧光

强度修正系数矩阵后再经阈值噪声滤波和中值滤波降噪后得到的图像.

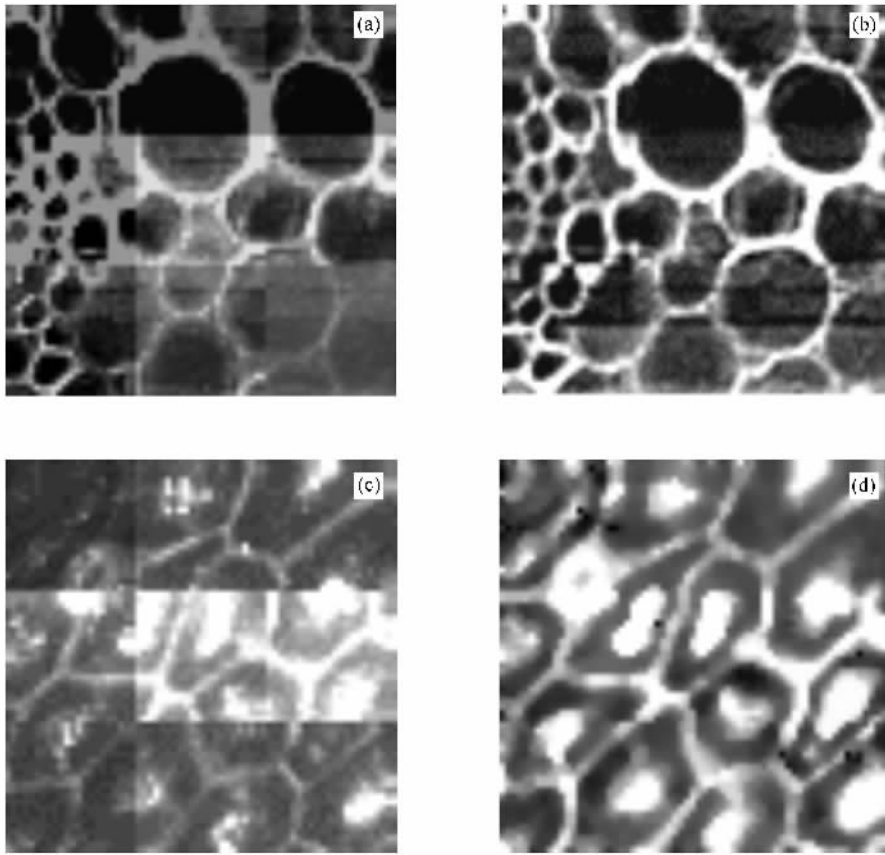


图 7 两种样片复合光谱几何强度图像 (a) 和 (b) 是徕卡植物样片, (c) 和 (d) 是植物芦荟叶样片 其中 (b) 和 (d) 是激发荧光强度修正系数矩阵处理后的结果

4.2. 不同光谱几何强度结构图像的实验处理结果

样片分光谱几何强度结构图像信息处理的结果, 在分光谱处理之前先使用激发荧光强度修正系数矩阵和阈值滤波降噪做了处理.

图 8 所示是植物芦荟叶染若丹明 6G 和 6B 染料

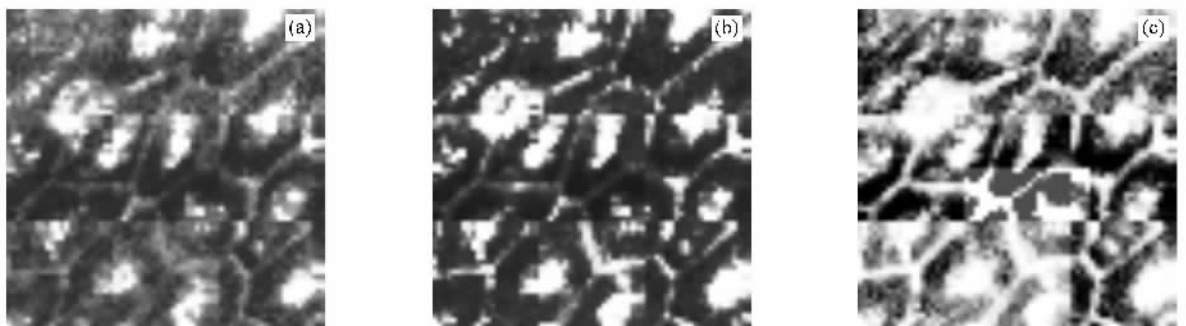


图 8 植物芦荟叶样片分光谱处理结果 光谱范围均取 10 nm (a) 445 nm (b) 665 nm (c) 885 nm

4.3. 不同光谱寿命图像的实验数据处理结果

植物芦荟叶染若丹明 6G 和 6B 染料样片分光

谱寿命图像实验处理结果见图 9, 光谱范围均取 10 nm. 与不同光谱几何强度结构图像的实验处理相同, 在分光谱处理之前也先使用激发荧光强度修正

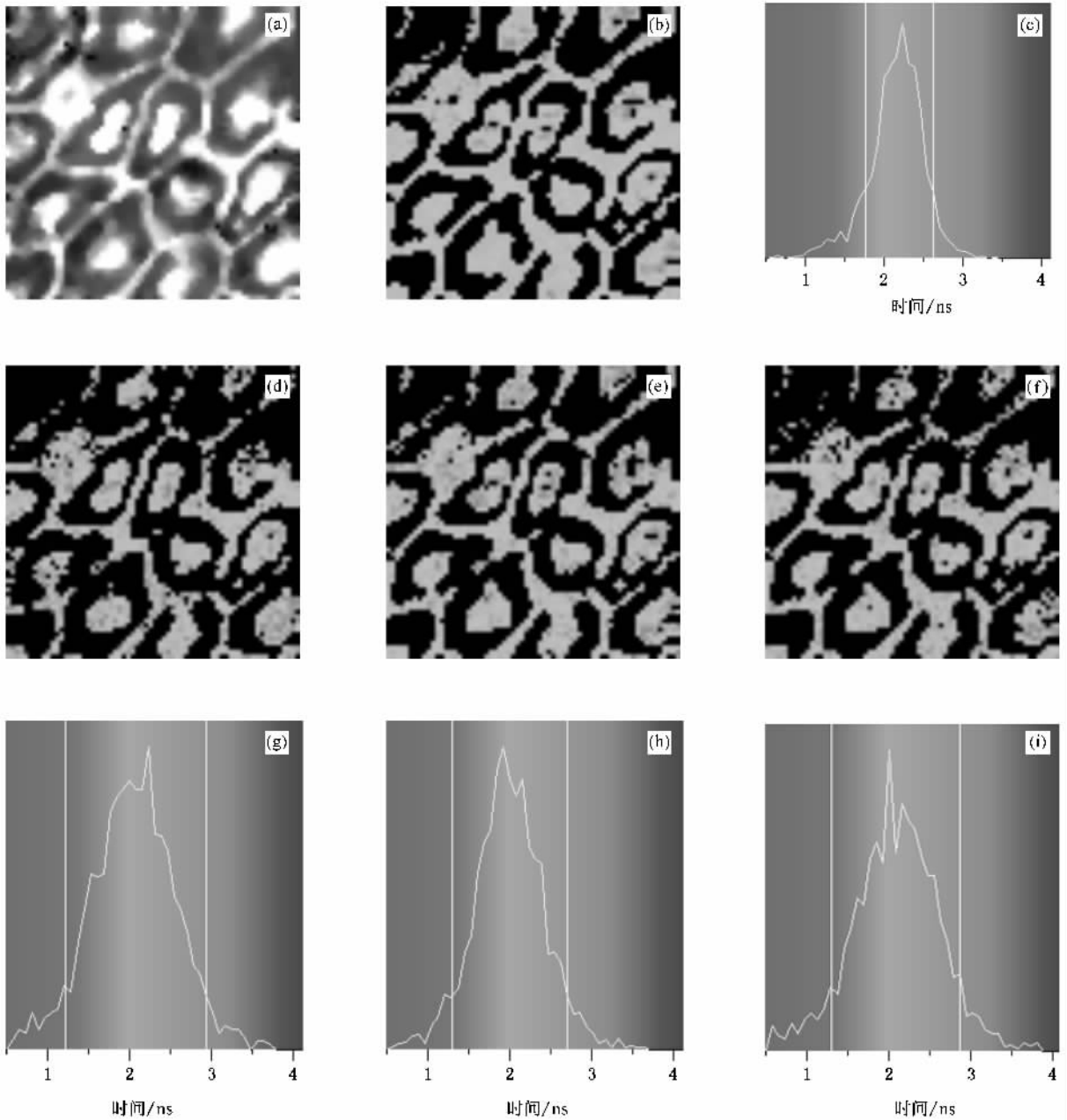


图9 植物芦荟叶样品分光谱寿命处理结果. 寿命图和寿命分布图中不同的灰度表示不同的寿命.(a)不分光谱的几何强度图,(b)和(c)是(a)图相应的寿命图和寿命分布图.(d)(e)(f)分别为535,565,595 nm光谱的寿命图.(g)(h)(i)分别为对应(d)(e),(f)图的寿命分布图.

系数矩阵和阈值滤波降噪做了处理.

5. 结 论

本文给出从多维同时荧光信息显微成像技术获取的复合信息中提取复合光谱几何强度结构图像、不同光谱几何强度结构图像、不同光谱寿命图像方法,并对两种样品做了相应的实验研究,实验结果表

明,本文提出的处理方法是可行的.虽然所提方法和实验中只给出三种图像信息的获取,但在此基础上做进一步的分析计算还能获取其他信息,如光谱分布统计、样品上任意点的寿命曲线和光谱的寿命分布等.

实验虽然取得了希望的结果,但仍然有一些有待进一步改进之处.尽管激发荧光强度修正系数矩阵对修正激发光点不均匀的影响效果明显,但对

不同的荧光标记物需要做相应的激发荧光强度修正系数矩阵, 所以, 应使系统激发光点光强尽量均匀. 当测量的荧光寿命较短时, 在荧光寿命的计算中应考虑系统响应对测量荧光寿命的影响, 通过测量系统的响应函数, 解卷积消除影响. 文中实验测量的荧

光寿命在 2 ns 以上, 系统响应的影响可忽略.

本文以 3×3 区域模板为例讨论了处理方法, 而对 3×3 区域模板如何确定未作详细讨论, 这属系统定标问题, 已超出本文所讨论的范围.

- [1] Liu Y , Peng C D , Lan X F *et al* 2005 *Acta Phys. Sin.* **54** 5455
(in Chinese [刘莹、彭长德、兰秀凤等 2005 物理学报 **54** 5455])
- [2] Su Y , Wang C K , Wang Y H *et al* 2004 *Acta Phys. Sin.* **53** 2112
(in Chinese [苏燕、王传奎、王彦华等 2004 物理学报 **53** 2112])
- [3] He G H , Zhang J X , Ye L H *et al* 2003 *Acta Phys. Sin.* **52** 1929
(in Chinese [何国华、张俊祥、叶莉华等 2003 物理学报 **52** 1929])

- [4] Huang L L , Fu Y B , Wu L N 2003 *Chin. Phys.* **12** 1417
- [5] So P T C , French T , Yu W M *et al* 1995 *Bioimaging* **3** 1
- [6] Tuan V D 2003 *Biomedical Photonics Handbook* (Florida : CRC Press) p9
- [7] Squier J , Muler M 2001 *Rev. Sci. Instrum.* **72** 2855
- [8] Wokosin D L 2001 *Proc. SPIE* **4262** 1
- [9] Jennifer L S , George H P 2003 *Science* **300** 87
- [10] Qu J , Liu L X , Chen D N *et al* 2006 *Opt. Lett.* **31** 368

Information processing of multidimensional simultaneity fluorescence with two-photon array excitation^{*}

Lin Zi-Yang Fu Zhe Liu Li-Xin Hu Tao Qu Jun-Le Guo Bao-Ping Niu Han-Ben

(Institute of Optoelectronics , Key Laboratory of Opto-electronics Devices and Systems of Ministry of Education ,

Key Laboratory of Parts of Optoelectronic Apparatus and Optoelectronic System of Guangdong Province , Shenzhen University , Shenzhen 518060 , China)

(Received 18 January 2006 ; revised manuscript received 15 August 2006)

Abstract

Microscopical imaging method of five-dimensional simultaneity fluorescence information is a new technology for acquiring fluorescence information , which makes use of two-photon array excitation to acquire information of fluorescence position , fluorescence spectrum and fluorescence lifetime for each array element. It removes the limitation on existing fluorescence detection technology in which different functional informations are not obtained simultaneously. In this paper , the methods for deriving geometrical intensity image , different spectral intensity images and different spectral life-time images from the complex information of the new technology are presented. Because of array excitation , there is asymmetry in the array excitation intensity , which influences the excited fluorescence intensity. A method based on the excitation fluorescence intensity correction coefficient matrix is put forward , which eliminates effectively the influence of the asymmetry of array excitation intensity. Data collection and processing for actual samples are made and imaging results are got. The experimental results show the validity of the processing methods and some unsolved problems in the processing methods are discussed.

Keywords : fluorescence information processing , two-photon , fluorescence spectrum , fluorescence lifetime

PACC : 8732L , 4230