

多色双光子激发荧光显微技术实验研究

邱骏鹏 梁闰富 彭晓 李亚晖 刘立新 尹君 屈军乐 牛憨笨

Experimental study on multicolor two-photon excited fluorescence microscopy

Qiu Jun-Peng Liang Run-Fu Peng Xiao Li Ya-Hui Liu Li-Xin Yin Jun Qu Jun-Le Niu Han-Ben

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 64, 048701 (2015) DOI: 10.7498/aps.64.048701

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.048701>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2015/V64/I4>

---

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

高精度实时主动轴向防漂移系统研究

[A real-time axial active anti-drift device with high-precision](#)

物理学报.2015, 64(2): 028701 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.028701>

基于法布里-珀罗调谐滤波器的傅里叶域锁模扫频激光光源

[Fiber Fabry-Perot tunable filter based Fourier domain mode locking swept laser source](#)

物理学报.2013, 62(6): 068703 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.068703>

## 多色双光子激发荧光显微技术研究\*

邱骏鹏<sup>1)</sup> 梁闰富<sup>1) #</sup> 彭晓<sup>1)</sup> 李亚晖<sup>2)</sup> 刘立新<sup>2)</sup>  
尹君<sup>1) †</sup> 屈军乐<sup>1) ‡</sup> 牛憨笨<sup>1)</sup>

1) (深圳大学光电工程学院, 广东省光电子器件与系统重点实验室, 深圳 518060)

2) (西安电子科技大学物理与光电工程学院, 西安 710071)

(2014年8月22日收到; 2014年9月26日收到修改稿)

双光子激发荧光 (two-photon excited fluorescence, TPEF) 显微是一种非线性光学显微技术, 具有高的时间分辨率和空间分辨率、高的信噪比和固有的三维层析分辨能力等优点. 传统的 TPEF 显微一般采用波长可调谐的超短脉冲激光器作为光源. 在实际应用中, 利用 TPEF 显微技术研究含有多种荧光团或未知成分的待测样品, 往往需要多次改变激发光的波长以获得对各种荧光团的最佳激发. 为了同时获取不同荧光团的荧光信号, 利用超连续谱激光光源实现了多色 TPEF 显微成像, 实验中无需调节波长, 能够同时获得具有两种不同发射波长的荧光标记的铃兰根茎切片样品的 TPEF 图像. 实验结果表明, 与传统的 TPEF 显微相比, 该方法能够同时获取含有多种荧光团的待测样品的高对比度 TPEF 图像, 具有系统结构简单、操作简便、信息量大等优点, 在生物医学和材料科学等领域具有广阔的应用前景.

**关键词:** 显微技术, 双光子激发荧光, 超连续谱, 光子晶体光纤

**PACS:** 87.64.-t, 87.64.M-, 87.64.mn, 87.64.kv

**DOI:** 10.7498/aps.64.048701

## 1 引言

双光子激发荧光 (two-photon excited fluorescence, TPEF) 显微是一种基于双光子吸收过程<sup>[1,2]</sup>、利用超短激光脉冲快速扫描样品获取待测样品三维结构图像信息的非线性光学显微技术. 1990年, 美国康奈尔大学的 Denk 等<sup>[3]</sup>首次报道了激光扫描 TPEF 显微技术. 与传统荧光显微成像方法相比, 双光子激发只发生在焦点附近极小的区域, 减少了对焦点外样品的光漂白和光损伤, 而且使用近红外波段的激发光对于生物组织具有很好的穿透性, 因此在 TPEF 技术中, 无须使用共焦针孔即可获得高空间分辨率的深层三维层析图像. 此外, 生物样品的荧光发射峰一般在 400—600 nm,

可以简单地通过滤光片的方法消除近红外激发光对荧光信号的干扰, 提高系统的信噪比. 随着超短脉冲激光技术、荧光标记技术、弱信号探测技术的发展, TPEF 显微技术已发展为生命科学等领域一个重要的研究工具<sup>[4-9]</sup>.

在 TPEF 显微中, 通常使用波长在近红外波段的超短脉冲激光作为激发光源, 具有高的峰值功率的超短脉冲激光紧聚焦在待测样品中, 样品中特定的荧光团分子同时吸收两个入射光子后, 发射特定波长的荧光信号, 通过探测荧光信号即可获得待测样品中该荧光团的空间分布信息, 从而获得待测样品的三维结构图像. 在实际应用中, 由于各种荧光团具有不同的激发波长, 对于同时含有多种荧光团或未知成分的待测样品, 为获得各种荧光团的荧光信号, 往往需要依次改变激发光波长以获

\* 国家重点基础研究发展计划 (批准号: 2012CB825802)、国家重大科学仪器设备开发专项 (批准号: 2012YQ150092)、国家自然科学基金重点项目 (批准号: 61235012)、国家自然科学基金 (批准号: 11204226, 61378091)、陕西省自然科学基金 (批准号: 2014JM8324) 和中央高校基本科研业务费专项资金 (批准号: K5051305002, NSIY051405) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: jlqu@szu.edu.cn

‡ 通信作者. E-mail: yinjun666@163.com

# 本文共同第一作者

得最佳激发效率. 近年来, 将超短脉冲激光耦合进光子晶体光纤 (photonic crystal fiber, PCF) 可以产生光谱覆盖范围达到两个倍频程以上的超连续 (supercontinuum, SC) 谱激光输出<sup>[10,11]</sup>. SC 激光的产生是由于多种非线性光学效应共同作用的结果, 具有光谱覆盖范围广、峰值功率高等特点. 利用 SC 激光作为激发光源, 通过选取 SC 激光中特定光谱成分可实现多色 TPEF 显微技术<sup>[12,13]</sup>. 但是当样品中含有多种荧光团或含有某些未知成分时, 无法同时获取各荧光团的 TPEF 信号.

本研究将钛宝石锁模飞秒激光器输出的飞秒激光脉冲耦合进全正色散 PCF 中, 产生光谱覆盖范围为 820—910 nm 的 SC 激光, 经 800 nm 长波通滤光片后输入一台倒置荧光显微镜. 利用扫描振镜实现样品中聚焦光斑的快速扫描, 在无需调节激发波长的情况下, 同时获得了含有两种不同荧光标记的铃兰根茎切片的荧光图像, 实现了激光扫描多色 TPEF 显微成像. 实验结果表明, 基于 SC 激光的激光扫描多色 TPEF 显微技术可以同时有效激发具

有不同激发峰的多色荧光团, 产生 TPEF 信号. 在相同的平均功率条件下, 能够快速获取待测样品中不同荧光团的图像信息. 与传统的激光扫描 TPEF 显微技术相比, 该方法具有系统结构简单、操作方便、大数据通量、高激发效率和图像对比度等优点, 在分析含有复杂荧光成分的生物样品中具有独特的优势.

## 2 实验系统

我们所用的激光扫描多色 TPEF 显微系统的结构如图 1 所示. 系统中使用一台平均输出功率为 1.2 W、脉冲宽度为 120 fs、重复频率为 76 MHz、波长在 700—980 nm 范围内可调谐的钛宝石锁模飞秒激光器作为光源. 激光器输出的中心波长为 850 nm、平均功率为 350 mW 的飞秒激光脉冲经光隔离器后由非球面透镜耦合进几何长度为 20 cm 的全正色散 PCF, 产生平均功率为 130 mW、光谱覆盖范围为 820—910 nm 的 SC 激光, 其光谱如图 2

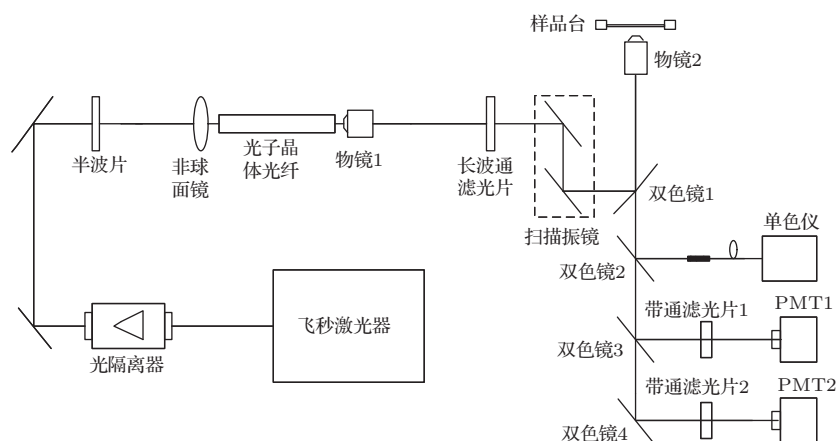


图1 激光扫描多色 TPEF 显微镜系统结构示意图

所示. SC 激光由物镜 1 收集准直后, 经长波通滤光片后, 送入一台倒置荧光显微镜. 系统中使用 800 nm 长波通滤光片以避免 SC 激光中可能存在的蓝移的光谱成分对 TPEF 信号产生干扰. SC 激光经双色镜 1 反射后由数值孔径为 0.75、放大倍率为 40 倍的消色差物镜 2 聚焦在待测样品中, 通过扫描振镜系统实现样品中聚焦光斑的快速扫描. 激发样品产生的 TPEF 信号由同一物镜收集, 经双色镜 3, 4 分别送入不同的信号探测通道. 不同波长的荧光信号经过光谱透过范围可调的带通滤光片 1 和 2 后, 分别由光电倍增管 PMT1 和 PMT2 接收. 系统中使用一台宽带单色仪实现指定区域内的光谱扫描.

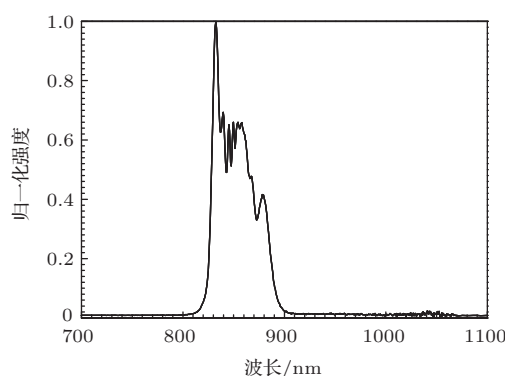


图2 850 nm 飞秒脉冲激光输入 12 cm 长的全正色散 PCF 所产生的 SC 激光光谱

### 3 实验结果与讨论

选取 Leica 公司的铃兰根茎切片作为样品, 对基于 SC 激光的多色 TPEF 显微系统进行了实验研究. 实验中, 首先设定信号通道 1 中光谱范围可调的带通滤光片的通光范围为 500—700 nm, 光电倍增管的增益设定为 450, 通过扫描振镜获得的图像结果如图 3(a) 所示. 由所获得的图像可以看出, 荧光图像中在不同区域内荧光信号的强度不同, 该样品中至少含有两种激发和发射波长均不同的荧光染料. 对图 3(a) 中方框框出的区域进行光谱扫描,

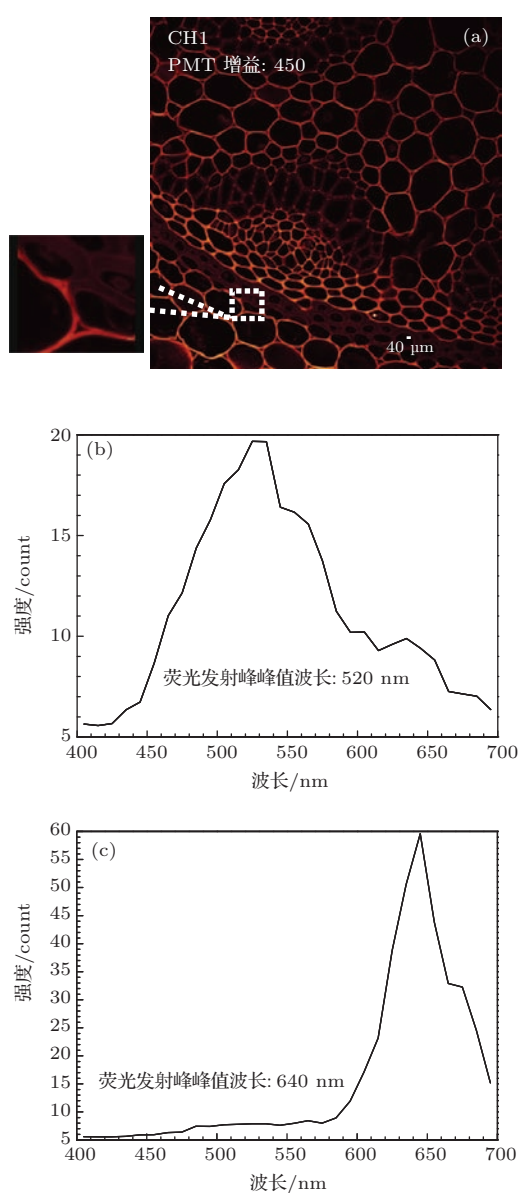


图 3 (网刊彩色) (a) 设定信号通道 1 的光谱透过范围为 500—700 nm, PMT 的增益为 450, 通过激光扫描获得的荧光图像; 对图 (a) 矩形框中的区域进行光谱扫描, 获得的荧光光谱暗区 (b) 和亮区 (c) 分布

光谱扫描的结果如图 3(b) 和 (c) 所示. 通过光谱扫描发现, 暗区和亮区的荧光发射峰峰值波长分别为 520 nm 和 640 nm. 由于所使用的 SC 激光的光谱覆盖范围为 820—910 nm, 说明所获得的图像是 TPEF 图像.

接下来, 我们将两个信号通道 1 和 2 中波长可调滤光片的通光范围分别设定为 500—550 nm 和 625—675 nm, 当 PMT1 和 PMT2 的增益分别设定为 500 和 450 时, 通过不同的通道获得的荧光图像如图 4(a) 和 (b) 所示, 两通道所获得的荧光图像合成后的结果如图 4(c) 所示.

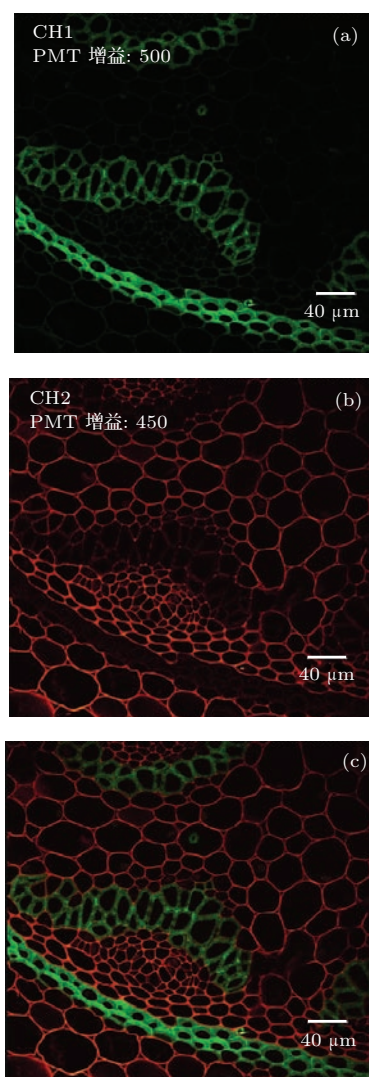


图 4 (网刊彩色) (a) SC 激光激发铃兰根茎切片, 信号通道 1 获得的 TPEF 图像; (b) 信号通道 2 获得的 TPEF 图像; (c) 两个通道获得的 TPEF 图像的合成图像

实验中, 进入倒置荧光显微镜的 SC 激光的平均功率为 130 mW, 光谱覆盖范围为 820—910 nm. 为了进行实验系统光谱探测能力的验证, 在避免入射激发光对样品造成损伤的前提下, 将钛宝石锁模

飞秒激光器输出的平均功率为 60 mW、中心波长为 850 nm 的飞秒激光脉冲送入显微镜系统进行了单波长激发的对比实验. 两个信号通道 1 和 2 中波长可调滤光片的通光范围分别设定为 500—550 nm 和 625—675 nm, 当 PMT1 和 PMT2 的增益分别设定为 750 和 650 时, 经信号通道 1 和 2 获得的荧光图像如图 5(a) 和 (b) 所示, 两通道获得的荧光图像合成后的结果如图 5(c) 所示.

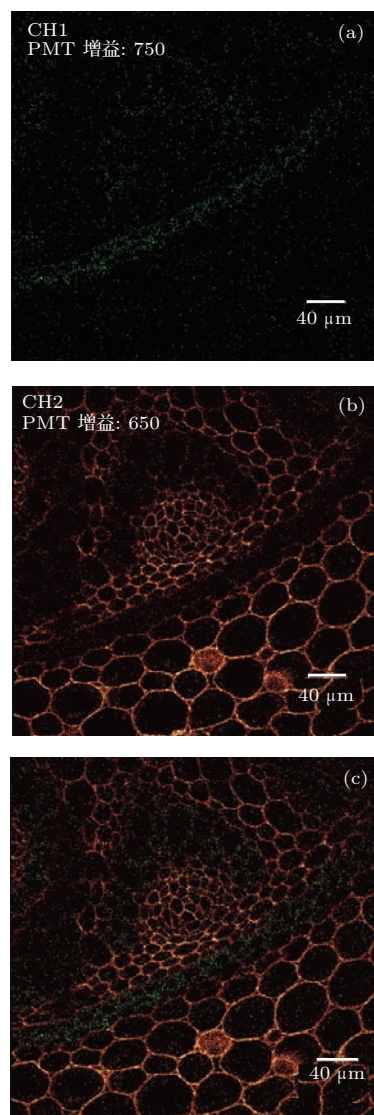


图 5 (网刊彩色) (a) 飞秒脉冲激光激发铃兰根茎切片, 信号通道 1 获得的 TPEF 图像; (b) 信号通道 2 获得的 TPEF 图像; (c) 两个通道获得的 TPEF 图像的合成图像

该对比实验的结果说明, 在检测含有多种荧光团的样品时, 由于钛宝石锁模飞秒激光脉冲的光谱覆盖范围有限, 无法同时激发不同的荧光团. 当激发光具有相同的平均功率时, 使用宽光谱覆盖范围的最佳激发波长, 从而获得最佳的荧光激发效率.

较之传统的 TPEF 显微系统, 激光扫描多色 TPEF 显微系统具有同时激发不同荧光团, 获取其 TPEF 荧光图像的能力, 以及更高的探测灵敏度和信噪比等优点.

## 4 结 论

使用一台波长可调谐的钛宝石锁模飞秒激光器抽运全正色散 PCF 产生光谱覆盖范围为 90 nm 的 SC 激光, 经消色差物镜聚焦在待测样品中, 通过扫描振镜系统实现样品中聚焦光斑的快速扫描. 激发产生的不同波长的荧光信号由相同的物镜收集, 同时由不同信号通道的光电倍增管探测接收, 实现了同时获取待测样品中不同荧光团的空间分布图像信息的多色 TPEF 显微成像. 实验结果表明, 在相同的平均功率下, 由于 SC 激光具有更宽的光谱覆盖范围, 因此, 可以无需调节激发波长而更有效地激发样品中种类不同的荧光团, 获得含有复杂成分的待测样品的 TPEF 图像信息. 与传统的 TPEF 显微技术相比, 该方法系统结构简单、操作简便、具有更高的图像对比度、高信噪比和更大的信息通量等优点, 在生命科学和材料科学等领域具有十分重要的应用价值.

## 参考文献

- [1] Goepfert-Mayer M 1931 *Ann. Phys.* **401** 273
- [2] Kaiser W, Garrett C G B 1961 *Phys. Rev. Lett.* **7** 229
- [3] Denk W, Strickler J H, Webb W W 1990 *Science* **248** 73
- [4] Denk W 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91** 6629
- [5] Strickler J H, Webb W W 1991 *Opt. Lett.* **16** 1780
- [6] Kawate Y, Ueki H, Hashimoto Y, Kawata S 1995 *Appl. Opt.* **34** 4105
- [7] Krasieva T B, Stringari C, Liu F, Sun C H, Kong Y, Balu M, Meyskens F L, Gratton E, Tromberg B J 2013 *J. Biom. Opt.* **18** 031107
- [8] Tang Z L, Liang R S, Chang H S 2000 *Acta Phys. Sin.* **49** 1080 (in Chinese) [唐志列, 梁瑞生, 常鸿森 2000 物理学报 **49** 1080]
- [9] Liu L X, Qu J L, Lin Z Y, Chen D N, Xu G X, Hu T, Guo B P, Niu H B 2006 *Acta Phys. Sin.* **55** 6281 (in Chinese) [刘立新, 屈军乐, 林子扬, 陈丹妮, 许改霞, 胡涛, 郭宝平, 牛憨笨 2006 物理学报 **55** 6281]
- [10] Chen H W, Jin A J, Chen S P, Hou J, Lu Q S 2013 *Chin. Phys. B* **22** 084205
- [11] Liu S L, Chen D N, Liu W, Niu H B 2013 *Acta Phys. Sin.* **62** 184210 (in Chinese) [刘双龙, 陈丹妮, 刘伟, 牛憨笨 2013 物理学报 **62** 184210]
- [12] Unruh J R, Price E S, Molla R G, Stehno-Bittel L, Johnson C K, Hui R 2006 *Opt. Express* **14** 9825
- [13] Li D, Zheng W, Qu J Y 2010 *Proc. SPIE* **7569** 75692D

# Experimental study on multicolor two-photon excited fluorescence microscopy\*

Qiu Jun-Peng<sup>1)</sup> Liang Run-Fu<sup>1)</sup># Peng Xiao<sup>1)</sup> Li Ya-Hui<sup>2)</sup> Liu Li-Xin<sup>2)</sup>  
Yin Jun<sup>1)</sup>† Qu Jun-Le<sup>1)</sup>‡ Niu Han-Ben<sup>1)</sup>

1) (*Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, College of Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China*)

2) (*School of Physics and Optoelectronic Engineering, Xidian University, Xi'an 710071, China*)

( Received 22 August 2014; revised manuscript received 26 September 2014 )

## Abstract

Two-photon excited fluorescence (TPEF) microscopy is a nonlinear optical microscopy technique. The advantages of TPEF microscopy include high temporal and spatial resolutions, high signal-to-noise ratio and inherent three-dimensional sectioning. In traditional TPEF microscopy, a wavelength tunable ultrashort pulsed laser is used as an excitation source. In practical applications, sample usually contains various fluorophores or unknown components. Therefore the excitation wavelength of the ultrafast laser has to be tuned to achieve optimal excitation efficiencies of various fluorophores. In order to acquire the fluorescent signals of different fluorophores simultaneously, we develop a multicolor TPEF microscope system based on a supercontinuum laser source. In experiments, TPEF images of Lily rhizome sample slide stained by two fluorescent dyes with different excitation and emission wavelengths are obtained without tuning the wavelength. Experimental results show that the high-contrast TPEF images of the sample with various fluorophores can be obtained simultaneously by using the multicolor TPEF microscope compared with by using traditional TPEF microscopy. The system is simple in structure, easy in operation, and can provide rich information about the sample, which allows it to be widely used in life and material sciences.

**Keywords:** microscopy, two-photon excited fluorescence, supercontinuum, photonic crystal fiber

**PACS:** 87.64.-t, 87.64.M-, 87.64.mm, 87.64.kv

**DOI:** 10.7498/aps.64.048701

---

\* Project supported by the National Basic Research Program of China (Grant No. 2012CB825802), the Special Funds of the Major Scientific Instruments Equipment Development of China (Grant No. 2012YQ150092), the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 61235012), the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 11204226, 61378091), the Natural Science Foundation of Shaanxi Province, China (Grant No. 2014JM8324), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (Grant Nos. K5051305002, NSIY051405).

† Corresponding author. E-mail: [jlqu@szu.edu.cn](mailto:jlqu@szu.edu.cn)

‡ Corresponding author. E-mail: [yinjun666@163.com](mailto:yinjun666@163.com)

# Equal contribution for this paper