



任意数量离散不规则感兴趣区域的快速荧光寿命显微成像

牛敬敬 刘雄波 陈鹏发 于斌 严伟 屈军乐 林丹樱

Fast fluorescence lifetime microscopy imaging of any number of discrete irregular regions of interest

Niu Jing-Jing Liu Xiong-Bo Chen Peng-Fa Yu Bin Yan Wei Qu Jun-Le Lin Dan-Ying

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 70, 198701 (2021) DOI: 10.7498/aps.70.20210941

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.70.20210941>

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

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

微分相位衬度计算机层析成像的感兴趣区域重建方法

Method of reconstructing region of interest for differential phase contrast computed tomography imaging

物理学报. 2021, 70(11): 118702 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20202192>

荧光寿命显微成像技术及其应用的最新研究进展

Recent progress of fluorescence lifetime imaging microscopy technology and its application

物理学报. 2018, 67(17): 178701 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180320>

基于数字微镜器件的数字线扫描荧光显微成像技术

Digital line scanning fluorescence microscopy based on digital micromirror device

物理学报. 2020, 69(23): 238701 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200908>

荧光寿命数据的相量分析及其应用

Phasor analysis of fluorescence lifetime data and its application

物理学报. 2020, 69(16): 168703 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200554>

基于电动可调焦透镜的大范围快速光片显微成像

High-speed and large-scaled light-sheet microscopy with electrically tunable lens

物理学报. 2020, 69(8): 088701 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20191908>

基于行扫描测量的运动目标压缩成像

Moving target compressive imaging based on improved row scanning measurement matrix

物理学报. 2017, 66(1): 014201 <https://doi.org/10.7498/aps.66.014201>

任意数量离散不规则感兴趣区域的快速荧光寿命显微成像*

牛敬敬[#] 刘雄波[#] 陈鹏发 于斌 严伟 屈军乐 林丹樱[†]

(深圳大学生物医学光子学研究中心/物理与光电工程学院, 光电子器件与系统重点实验室, 深圳 518060)

(2021年5月18日收到; 2021年5月31日收到修改稿)

荧光寿命显微成像 (fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM) 技术在细胞微环境传感中具有特异性强、灵敏度高、可定量的优点, 被广泛应用于生物医学研究. 其中, 基于时间相关单光子计数 (time-correlated single photon counting, TCSPC) 进行荧光寿命探测的方法是目前最常用的技术之一, 但受成像原理和条件限制, 该技术存在数据采集时间较长、成像速度不够快的不足. 本文开发一种能对生物样品中任意数量离散的、形状不规则的感兴趣区域 (region of interest, ROI) 进行快速 FLIM 成像的技术. 该技术利用声光偏转器 (acousto-optic deflector, AOD) 实现快速灵活的寻址扫描, 并通过 ROI 形状特征的简单在线分析, 实现 AOD 与 TCSPC 同步策略的优化及寿命图像的准确重构, 对于生物样品中常见的存在多个离散不规则 ROI 情形, 可大幅节省数据采集时间, 从而实现对这些 ROI 的快速 FLIM 成像. 采用该技术, 对氯化铵刺激下活细胞中溶酶体探针 LysoSensor Green DND-189 的荧光寿命变化进行了动态 FLIM 成像, 以监测溶酶体管腔内 pH 值的实时变化情况. 结果表明, 该快速 FLIM 技术可用于动态监测生物样品中微环境的变化, 将在活细胞微环境传感中发挥重要作用.

关键词: 快速荧光寿命显微成像, 寻址扫描, 离散目标, 不规则感兴趣区域**PACS:** 87.64.-t, 87.64.M-, 87.64.kv, 87.85.Pq**DOI:** 10.7498/aps.70.20210941

1 引言

荧光寿命显微成像 (fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM) 技术在测量细胞微环境的离子浓度、黏度、折射率、温度和 pH 值等生化参数时具有特异性强、灵敏度高、可定量的优点^[1-3], 因而在生物医学领域中有较为广泛的应用, 成为生物医学研究的重要工具. 在各种 FLIM 技术中, 采用时间相关单光子计数 (time-correlated single photon counting, TCSPC) 的方法实现荧光寿命

探测是目前最常用的做法, 其原理是采用高重复频率的脉冲激光激发样品, 同时由高灵敏度的探测器如光电倍增管 (photomultiplier tube, PMT) 探测单光子荧光信号, 通过获取每个激发周期内荧光光子到达探测器的时间并进行计数, 得到近似荧光强度衰减曲线的光子数-时间分布直方图, 从而拟合或计算得到荧光寿命值^[4-8]. 一般而言, 为了得到准确的荧光寿命值, 该方法要求激发光不能太强以避免一个周期产生多个荧光光子的“光子堆积”效应, 但同时又要求每个像素点累积足够多的光子数用于寿命拟合^[9-11], 因此实际应用中通常将 TCS-

* 国家重点研发计划 (批准号: 2017YFA0700500)、国家自然科学基金 (批准号: 61775144, 61975131, 61620106016) 和深圳市基础研究项目 (批准号: JCYJ20200109105411133, JCYJ20170412105003520) 资助的课题.

[#] 同等贡献作者.

[†] 通信作者. E-mail: dylin@szu.edu.cn

PC-FLIM 与激光扫描共聚焦显微术^[12] (laser scanning confocal microscopy, LSCM) 或双光子激发荧光显微术^[13] (Two-photon excited fluorescence microscopy, TPEFM) 结合, 通过重复多次的逐点扫描来累积光子数, 实现 FLIM 成像.

传统的扫描成像系统通常采用振镜对成像视场进行栅扫描, 扫描方式不够灵活, 且扫描时存在机械惯性, 成像速度受到限制. 声光偏转器 (acousto-optic deflector, AOD) 利用声光晶体的声光效应, 可通过加载不同的声波频率改变其出射光的衍射角, 从而实现光束的线性偏转, 代替振镜作为扫描器件. 相比振镜扫描, AOD 扫描不存在机械惯性问题, 扫描速度快, 重复精度高, 并且由于两个维度的偏转可独立控制, 扫描方式很灵活, 可实现跳跃性的快速寻址扫描^[14,15]. 2013 年, 深圳大学屈军乐课题组^[16] 首次将 AOD 寻址扫描应用于 TCSPC-FLIM, 实现了对任意形状感兴趣区域 (region of interest, ROI) 的 FLIM 成像. 在该工作中, AOD 扫描与 TCSPC 数据采集之间只有一个同步信号, 控制方式简单, 成像灵活. 但这种方法由于需要逐点存储寿命数据再进行下一个像素点的采集, 因此即使是对较小视场进行成像通常也需要很长的采集时间 (如 10×10 像素需要 3 min), 成像速度较慢, 并不适用于快速生物医学过程的研究. 2014 年, 该课题组改用像素、行、帧三个信号对 AOD 扫描和 TCSPC 采集进行同步控制, 从而大幅节省了采集和存储时间, 提升了成像速度, 实现了坏死因子 (TNF- α) 诱导癌细胞凋亡过程的 FLIM 成像, 以监测其黏度和 pH 值的变化过程, FLIM 成像速度达到了 10 s/帧^[17]. 然而, 实际应用

中这种同步控制方式仅适用于单个矩形区域的扫描成像, 否则后期数据重构将过于复杂耗时, 从而使 AOD 快速寻址扫描的优势不能很好发挥出来, 失去了对任意形状 ROI 寻址扫描的灵活性, 对存在多个 ROI 的情形更加无能为力. 针对生物医学研究中常见的存在多个离散不规则 ROI 的情形, 本文在上述工作的基础上, 通过对 ROI 的形状特征进行简单的在线分析, 对 AOD 扫描与 TCSPC 采集之间的同步控制方式进行优化, 并发展相应的寿命图像数据处理方法, 可方便地实现对视场中任意数量的离散、不规则 ROI 的快速 FLIM 成像, 为 FLIM 技术在活细胞微环境传感等领域的应用提供了一种新的手段.

2 系统与方法

2.1 快速 FLIM 系统的搭建

图 1 为搭建的快速 FLIM 系统示意图. 以商用倒置荧光显微镜 (Ti2-U, Nikon) 为框架, 采用钛宝石可调谐飞秒脉冲激光器 (Chameleon Ultra II, Coherent) 作为双光子激发光源, 常用波长为 800 nm, 峰值功率为 3.8 W, 重复频率为 80 MHz. 激光经半波片 HWP 和偏振分束棱镜 PBS 调节功率、扩束镜 BE1 扩束准直和光束提升镜 BL 提升后进入二维 AOD 扫描器 2D-AOD. 但由于 AOD 中的声光晶体为大色散介质, 需在 AOD 前引入一个色散棱镜 DP 对其引起的空间和时间色散进行预校正^[18]. 2D-AOD 由一对正交放置的 AOD (DTSXY-400-640, AA Opto-electronic) 组成, 激光经 AOD 产生的衍射光偏转角由加载在声光晶体上的声波频

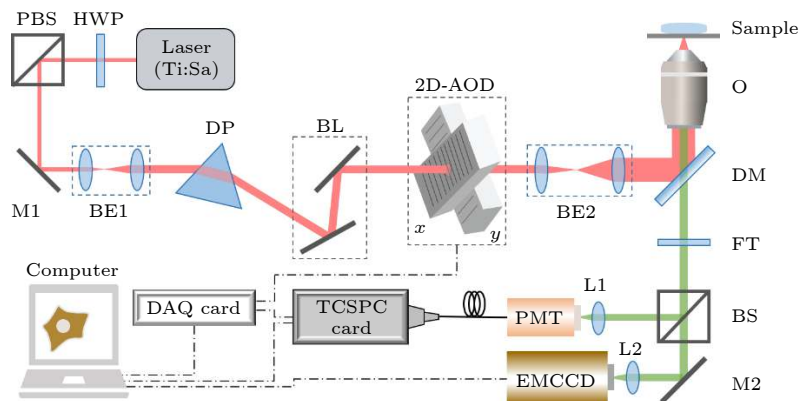


图 1 快速 FLIM 系统示意图

Fig. 1. Schematic diagram of fast FLIM system.

率决定, 因此采用衍射光作为扫描光时, 通过加载不同的声波频率, 就可以实现 X - Y 二维平面内任意点的跳跃性扫描. 声波频率信号由数据采集卡 (USB-6353, National Instruments) 输出的数字信号转换而成. 扫描光经扩束镜 BE2 扩束准直后进入显微镜, 经物镜 O ($100\times/1.45$ NA, Nikon) 聚焦激发样品. 产生的荧光经二向色镜 DM、滤光片 FT 和反射/透射比 7:3 的分束镜 BS 同时被 PMT (PMC-100-0, Becker & Hickl GmbH) 和 EMCCD (DU897, Andor) 收集. EMCCD 采集的荧光信号用于选取 ROI; PMT 采集的荧光信号经放大后传输给 TCSPC 采集卡 (SPC-150, Becker & Hickl GmbH) 处理得到寿命数据, 并在计算机上由采集和分析软件 (SPCM, Becker & Hickl GmbH) 存储并实时显示为荧光强度图像, 随后可在该软件 (或其他寿命分析软件) 中分析得到各像素点的荧光寿命并显示为荧光寿命图像.

2.2 同步信号的产生策略

AOD 扫描与 TCSPC 寿命数据的采集和存储之间的同步控制, 是上述快速 FLIM 系统得以正常工作并获得正确的荧光寿命图像的关键. 采用同一数据采集卡输出的 3 个脉冲信号作为像素 (pixel)、行 (line)、帧 (frame) 同步信号, 分别控制寿命数据存储时的像素与像素、行与行、帧与帧之间的切换^[19], 其中像素信号需要与控制 AOD 扫描的数字信号保持严格同步, 行信号由扫描区域中每行的像素个数决定, 帧信号则由扫描区域的总像素数决定. 通常情况下, 三路同步信号均为周期信号, 周期长度

可根据扫描区域的行列数提前设定好. 以扫描一个 5×2 像素的矩形 ROI 为例, 控制 AOD 扫描的数字信号和三路同步信号如图 2(a) 所示, AOD 扫描区域如图 2(b) 所示, 而 TCSPC 数据采集和存储如图 2(c) 所示, 其中数字代表数据存储顺序, 不同颜色代表不同寿命值.

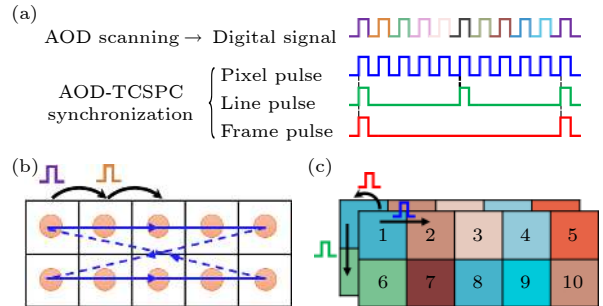


图 2 AOD 扫描信号及其与 TCSPC 的同步原理示意图 (a) 数字信号及三路同步信号; (b) AOD 扫描过程; (c) AOD-TCSPC 同步过程

Fig. 2. Schematic diagram of AOD scanning signal and its synchronization principle with TCSPC: (a) Digital signal and three synchronization signals; (b) AOD scanning process; (c) AOD-TCSPC synchronization process.

但显然这种同步信号的产生策略只适用于单个矩形 ROI, 对于形状不规则的或者多个离散的 ROI 则不适用. 为了实现对任意数量离散不规则 ROI 的快速 FLIM 成像, 需要对同步信号的产生策略进行优化, 使其能够与所选 ROI 的形状特点相对应, 以得到正确的荧光寿命图像. 以图 3(a) 所示的 3 个离散不规则 ROI 为例, 为了产生与其尽量匹配的同步信号, 同时便于后期数据处理, 需要对 ROI 的形状特征进行在线分析. 首先, 找出包含

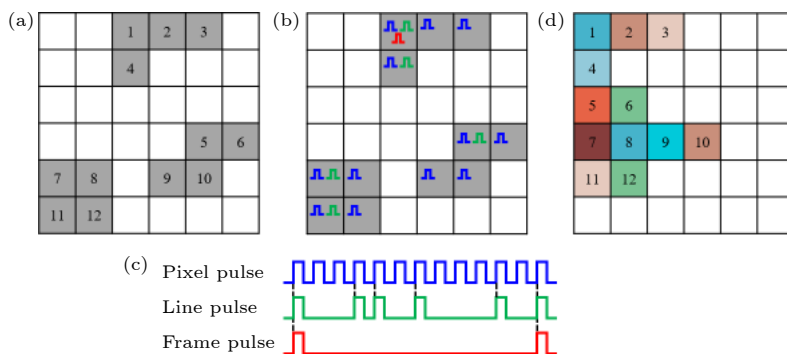


图 3 针对任意数量离散不规则 ROI 的同步信号产生新策略示意图 (a) 三个离散的不同形状 ROI (灰色); (b) 每个扫描点所需的同步信号; (c) 按新策略产生的三路同步信号; (d) 已分行存储但仍未准确映射的荧光寿命数据

Fig. 3. Schematic diagram of a new strategy for generating synchronization signals for any number of discrete irregular ROIs: (a) Three discrete ROIs of different shapes (gray); (b) the synchronization signals required for each scan point; (c) three synchronization signals generated according to the new strategy; (d) fluorescence lifetime image data that has been stored in rows before mapping.

所有 ROI 的外接矩形区域 (即图中所示的 6×6 像素区域), 保存该外接矩形区域像素点的坐标信息, 用于后期数据处理; 然后, 计算每一行需要扫描的像素数 (如第一行为 3 个像素), 用于调整行信号的输出, 即产生的同步信号应如图 3(b) 和图 3(c) 所示, 其中行信号不再是周期信号, 相邻行信号脉冲的间距由当前行需要扫描的像素数决定. 根据这种策略产生的三路同步信号与所选 ROI 的形状是相对应的, 因此对于任意数量任意形状的 ROI 都是适用的, 也包括前面提到的单个矩形 ROI. 值得指出的是, 对于没有像素点需要扫描的“空行”, 实际上并不会产生行信号, 同时由于 TCSPC 数据存储是顺序无结构的, 因此存储下来的荧光寿命数据并不完全与 ROI 中各像素点的实际扫描位置相对应, 如图 3(d) 所示, 即存储下来的寿命数据仍存在未关联到准确空间位置的问题, 需要进一步映射处理以得到准确的寿命图像.

2.3 寿命图像的重建

结合前面 ROI 形状分析得到的外接矩形区域信息, 可以方便地对已分行存储的寿命数据进行映射处理, 即将每个像素点得到的寿命数据移位到其实际的扫描位置处, 以重构出准确的荧光寿命图像. 具体过程如图 4 所示.

首先, 如图 4(a)—(c) 所示, 将扫描 ROI 的坐标信息与其外接矩形区域的坐标信息进行比较 (取交集), 可得到一个二值化矩阵 (图中数字表示非零元素, 对应 ROI 内的扫描像素). 然后, 如图 4(d)—图 4(f) 所示, 将该二值化矩阵中非零元素的列坐标 (图 4(d) 中数字所示) 与 TCSPC 顺序存储时的列坐标 (图 4(e) 中数字所示, 参考图 3(d)) 进行比较 (相减), 可计算得到每个像素的横向相对位移 (图 4(f) 中数字所示), 称图 4(f) 的矩阵为 X 方向的移位矩阵. 同理, 通过比较行坐标 (图 4(g) 和图 4(h)) 可得到 Y 方向的移位矩阵, 如图 4(i) 所示. 利用这两个移位矩阵, 就可以对寿命数据矩阵 (图 4(j)) 进行移位操作, 从而得到准确的寿命图像, 其中 X 方向移位操作结果如图 4(k) 所示, 继续进行 Y 方向的移位操作后, 可得到如图 4(l) 所示的寿命图像.

这样, 通过在线分析所选 ROI 的形状特征并获取其外接矩形区域的像素信息, 不仅优化了同步信号的产生策略, 使得 TCSPC 采集和存储的寿命数据分行存储, 还可以通过简单的运算对寿命数据

进行映射处理得到准确的寿命图像, 从而实现对任意数量任意形状 ROI 的快速 FLIM 成像.

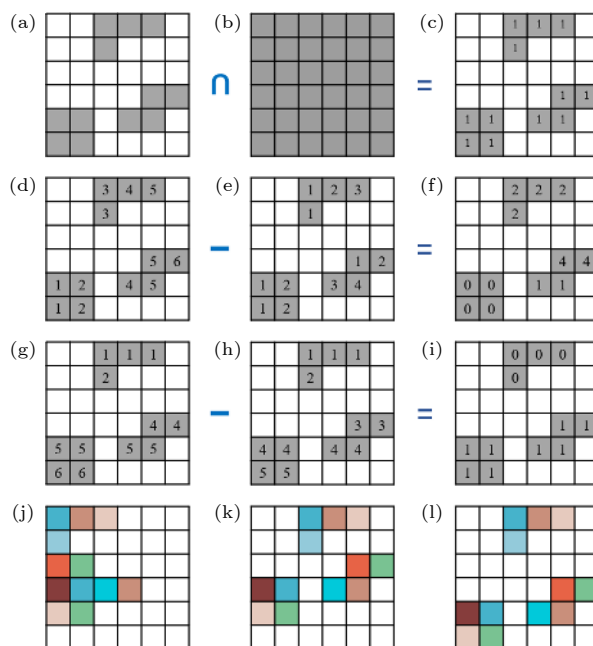


图 4 寿命数据处理方法示意图 (a) 扫描 ROI; (b) 外接矩形; (c) 二值化矩阵; (d) 二值化矩阵非零元素列坐标; (e) 寿命数据顺序存储列坐标; (f) X 方向移位矩阵; (g) 二值化矩阵非零元素行坐标; (h) 寿命数据顺序存储行坐标; (i) Y 方向移位矩阵; (j) 未移位的寿命图像; (k) X 方向移位后的寿命图像; (l) Y 方向移位后的准确寿命图像

Fig. 4. Schematic diagram of the processing method for the lifetime image data: (a) Scanned ROIs; (b) circumscribed rectangle; (c) binarized matrix; (d) column coordinates of non-zero elements in the binarized matrix; (e) column coordinates of the lifetime data before mapping; (f) shift matrix in X-direction; (g) row coordinates of non-zero elements in the binarized matrix; (h) row coordinates of the lifetime data before mapping; (i) shift matrix in Y-direction; (j) lifetime image before mapping; (k) lifetime image after shift in X-direction; (l) correct lifetime image after shift in Y-direction.

3 结果与讨论

3.1 任意数量离散不规则 ROI 成像验证

为了验证上述方法对任意数量离散不规则 ROI 的成像能力, 以铃兰根茎切片 (从 Leica 公司采购的标准样片) 为例进行成像, 结果如图 5 所示. 其中图 5(a) 为 EMCCD 采集的样品明场图像, 通过 LabVIEW 编写的控制程序可在其上根据需要选取 ROI (也可以在 EMCCD 采集的宽场荧光图像上选取), 选取时可采用预设的形状, 也可以直接用鼠标圈选任意不规则形状, 如图中绿色图形所

示. 完成选区后, 数据采集卡产生对应 ROI 坐标信息的数字信号, 控制 AOD 对激光进行偏转, 实现对选定 ROI 的扫描和激发; 同时, 程序自动完成如前文所述的 ROI 形状特征在线分析, 并控制数据采集卡按照新策略产生对应的三路同步信号, 控制 TCSPC 开始采集和存储相应的寿命数据. 图 5(b) 为扫描过程中 EMCCD 拍摄的荧光强度图像, 可以看到只有所选 ROI 以内的样品被激发出荧光, 其余部分没有信号. 图 5(c) 为利用 TCSPC 采集的数据直接分析得到的荧光寿命图像, 可以看出寿命数据已分行存储, 但由于未将寿命信息关联到准确的位置, 图像不能反映样品的真实结构. 图 5(d) 为移位处理后的荧光寿命图像, 可以看到图像中四个 ROI 的结构均与图 5(b) 所示的荧光强度图像符合得很好.

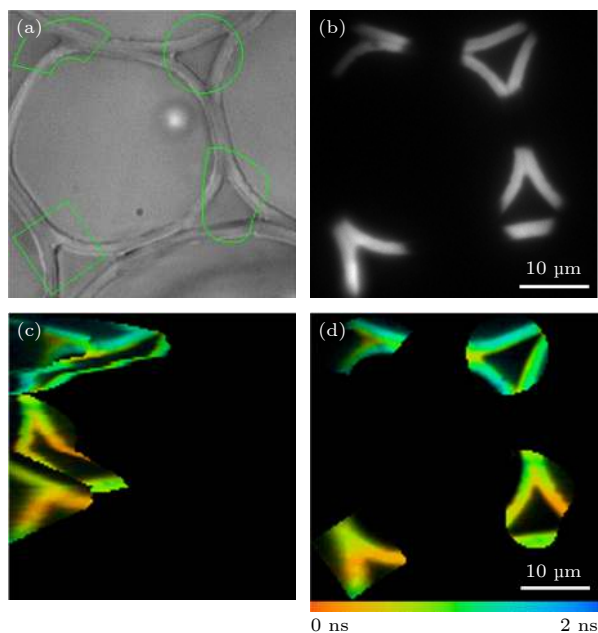


图 5 铃兰根茎切片样品多个离散的不同形状 ROI 的 FLIM 成像 (a) 明场图像及 ROI 的选取; (b) EMCCD 采集的荧光强度图像; (c) TCSPC 采集得到的寿命图像; (d) 准确重构的荧光寿命图像

Fig. 5. FLIM imaging of multiple discrete ROIs of different shapes in *convallaria* slice sample: (a) Bright field image collected by EMCCD and selection of ROIs; (b) fluorescence intensity image collected by EMCCD; (c) lifetime image collected by TCSPC; (d) corrected fluorescence lifetime image.

3.2 成像速度对比分析

本文所提的方法能够实现对 ROI 的快速 FLIM 成像, 本质上是因为采用了寻址扫描方式, 对于多个离散的、形状不规则的 ROI 而言, 可以大幅减少

非感兴趣像素点的数量, 从而间接提高成像速度. 以铃兰根茎切片样品为例, 假设有生物学意义的 ROI 为图 6(a) 所示的环形区域, 采用本文方法进行 FLIM 成像得到的结果如图 6 所示, 其中图 6(b) 为 EMCCD 采集的荧光强度图像, 图 6(c) 为 TCSPC 采集的光子计数累积得到的荧光强度图像, 图 6(d) 为利用 TCSPC 采集的光子计数进行分析和重构后得到的荧光寿命图像. 作为对比, 图 7 所示为扫描包含该环形 ROI 的矩形区域时得到的结果. 可见, 当感兴趣的结构只是图中环形 ROI 部分时, 采用本文的寻址扫描成像方式可以只采集环形 ROI 中的数据, 而传统栅扫描方式则至少需要对包含该 ROI 的整个矩形区域进行扫描, 因而将许多原本不需要的像素包括在内, 既增加了数据采集时间, 也增加了数据处理负担. 定量地, 可统计得到图 6 中环形 ROI 包含的像素数为 6164, 而图 7 中矩形 ROI 包含的像素数为 15625, 在保证单像素采集的最大光子数基本一致 (分别为 841 和 824) 的前提下, 图 6 和图 7 的采集时间分别为 3.0 s 和 7.8 s, 即由于环形 ROI 像素数仅为矩形的约 39%, 相应的采集时间缩短为矩形的 38%, 采集时间随着扫描像素数的减少而成比例地减少.

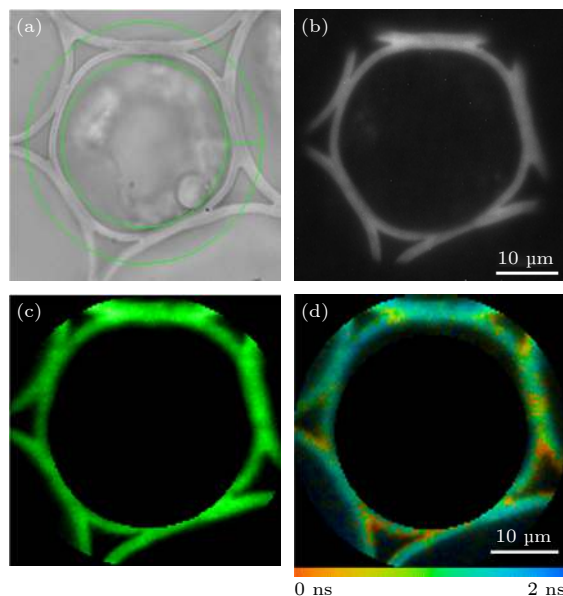


图 6 铃兰根茎切片样品环形 ROI 的 FLIM 成像 (a) 环形 ROI 的选取; (b) EMCCD 采集的荧光强度图像; (c) TCSPC 采集的荧光强度图像; (d) 荧光寿命图像

Fig. 6. FLIM imaging of a circular ROI in *convallaria* slice sample: (a) Selection of the circular ROI; (b) fluorescence intensity image collected by EMCCD; (c) fluorescence intensity image collected by TCSPC; (d) fluorescence lifetime image.

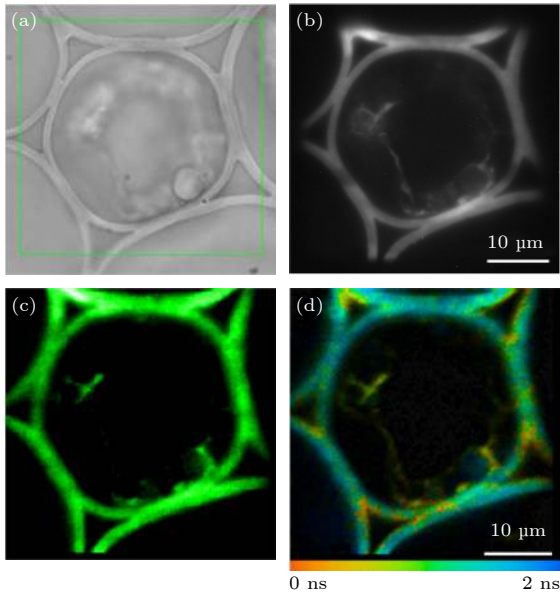


图 7 铃兰根茎切片样品矩形 ROI 的 FLIM 成像 (a) 矩形 ROI 的选取; (b) EMCCD 采集的荧光强度图像; (c) TCSPC 采集的荧光强度图像; (d) 荧光寿命图像

Fig. 7. FLIM imaging of a rectangular ROI in *convallaria* slice sample: (a) Selection of the rectangular ROI; (b) fluorescence intensity image collected by EMCCD; (c) fluorescence intensity image collected by TCSPC; (d) fluorescence lifetime image.

在生物医学成像实验中, ROI 呈离散不规则分布的情况是非常多见的, 例如对于细胞核或者细胞中其他细胞器的研究等. 因此, 对于这些情形, 采用本文的方法可以大幅缩短数据采集时间, 提高 FLIM 成像速度. ROI 越小、越分散, 采用这种方法的优势就越明显. 特别地, 当感兴趣区域是一些离散点时, 采用本文的方法不仅方便, 而且可以达到非常快的成像速度. 为了验证这一点, 采用平铺在盖玻片上的罗丹明 6 G 溶液为样品, 选取视场内构成“FAST FLIM”图样的 87 个离散点进行成像, 结果如图 8 所示. 由于扫描的像素数量非常少, 荧光寿命图像采集时间仅为 52.2 ms, 成像速度非常快. 而传统成像方式很难做到这一点, 这是因为虽然 TCSPC 采集时也有单点探测模式, 但其探测的点是不能根据需求任意指定的, 只能是视场中央的一个点, 一般用于调试采集参数. 而采用本文的成像方式, 即 AOD 寻址扫描结合 TCSPC 三路同步信号产生的新策略和图像数据处理方法, 就可以方便地做到任意离散点的快速 FLIM 成像.

3.3 活细胞成像应用

利用本文的快速 FLIM 成像方法, 对氯化铵刺

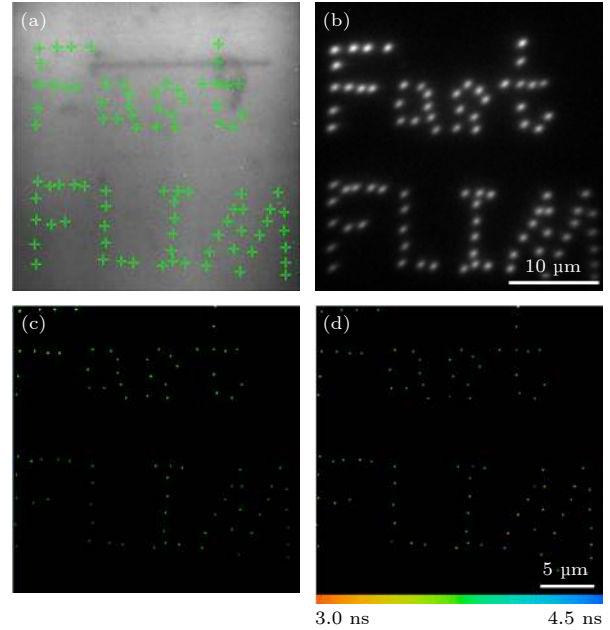


图 8 罗丹明 6G 溶液样品中离散点的快速 FLIM 成像 (a) 离散像素点的选取; (b) EMCCD 采集的荧光强度图像; (c) TCSPC 采集的荧光强度图像; (d) 荧光寿命图像

Fig. 8. Fast FLIM imaging of discrete pixels in rhodamine 6G solution: (a) Selection of the discrete pixels; (b) fluorescence intensity image collected by EMCCD; (c) fluorescence intensity image collected by TCSPC; (d) fluorescence lifetime image.

激下活细胞中溶酶体探针的荧光寿命变化进行动态成像, 以监测溶酶体管腔内 pH 值的变化情况. 实验采用对 pH 敏感的探针 LysoSensor Green DND-189 标记人肉骨瘤细胞 (U2OS, 37 °C、5% CO₂ 孵育) 中的溶酶体 (标记浓度 1 μM (1 M = 1 mol/L), 孵育时间 30 min). 首先如图 9(a)—(b) 所示, 选取一个感兴趣细胞并拍摄其明场图像和宽场荧光强度图像, 发现溶酶体的荧光信号比较集中, 进而选择“1”和“2”两个 ROI 进行快速 FLIM 成像, 单幅采集时间为 200 ms. 成像过程中加入 10 μL 浓度为 1 μM 的氯化铵溶液对活细胞进行刺激, 并记录加入氯化铵溶液后 5 min 内 ROI 中的荧光寿命图像, 结果如图 9(c)和图 9(d) 所示, 其中图 9(c) 表示加入氯化铵溶液刺激后两个 ROI 中溶酶体探针平均荧光寿命的变化, 图 9(d) 为部分时间点的荧光寿命图像, 时间点“0”对应尚未加入氯化铵溶液时的结果. 可以看到, 在氯化铵的刺激下, 两个 ROI 中溶酶体探针的荧光寿命都是先急剧变短, 然后再缓慢变长. 根据文献 [20] 报道的探针 LysoSensor-DND189 的荧光寿命与 pH 值的关系 (即 pH 值越高, 探针的荧光寿命越短; 反之亦然),

该过程中溶酶体探针的荧光寿命变化代表的是其管腔内 pH 值的变化情况, 即在弱酸性溶液氯化铵的刺激下, 活细胞中溶酶体管腔内的 pH 先急剧增大, 然后再缓慢回落. 该动态结果很好地记录了对于外界的突然刺激溶酶体管腔内 pH 值的实时变化过程. 而这种实时监测结果, 利用传统的 TCSPC-FLIM 是无法获得的.

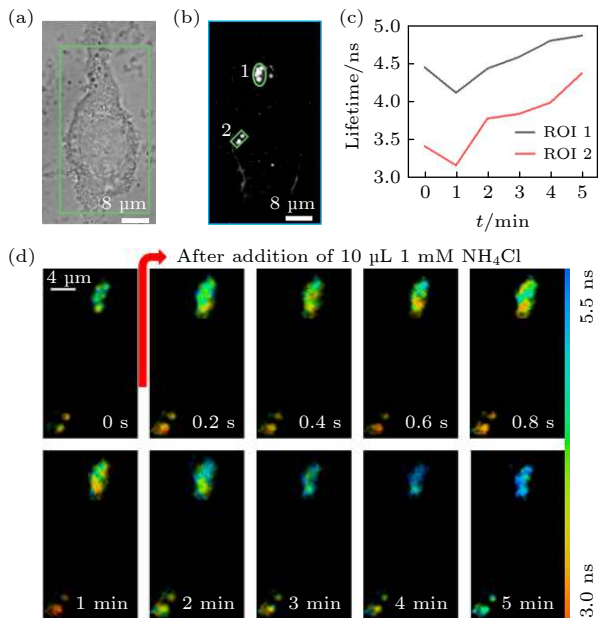


图 9 活细胞中 LysoSensor-DND189 标记溶酶体的快速 FLIM 成像 (a) 明场图像; (b) EMCCD 采集的荧光强度图像及 ROI 的选取; (c) ROI 平均荧光寿命随氯化铵刺激时间的变化; (d) 部分时间点的荧光寿命图像

Fig. 9. Fast FLIM imaging of LysoSensor-DND189 labeled lysosomes in living cells: (a) Bright field image; (b) fluorescence intensity image collected by EMCCD and selection of ROIs; (c) the change of the average fluorescence lifetime in the ROIs with the stimulation time of ammonium chloride; (d) the fluorescence lifetime image of selected time points.

4 总结与展望

针对传统 TCSPC-FLIM 受成像原理和条件限制, 存在数据采集时间长、成像速度不够快的问题, 本文开发了一种利用 AOD 进行寻址扫描, 并通过对 ROI 形状特征的在线分析和 AOD-TCSPC 同步策略的优化重构出准确寿命图像的方法, 从而实现了任意数量的离散不规则 ROI 的快速 FLIM 成像. 本文详细阐述了该快速 FLIM 成像方法的原理和实现过程, 并对该成像方法进行了实验验证和性能分析. 结果表明, 利用该方法对任意数量的离

散不规则 ROI 进行 FLIM 成像均能够得到正确反映样品真实结构的荧光强度图像和寿命图像, 并且由于避免了对非感兴趣像素点的扫描, 可大幅节省采集时间, 实现快速 FLIM 成像. 采用该技术, 对氯化铵刺激下活细胞中溶酶体探针 LysoSensor-DND189 的荧光寿命变化进行了动态 FLIM 成像, 实现了溶酶体管腔内 pH 值变化情况的动态监测. 该方法将为动态监测生物样品中某些感兴趣对象 (如细胞器等) 的快速微环境变化提供很好的工具.

参考文献

- [1] Becker W 2012 *J. Microsc.* **247** 119
- [2] Liu X B, Lin D Y, Wu Q Q, Yan W, Luo T, Yang Z G, Qu J L 2018 *Acta Phys. Sin.* **67** 178701 (in Chinese) [刘雄波, 林丹樱, 吴茜茜, 严伟, 罗腾, 杨志刚, 屈军乐 2018 物理学报 **67** 178701]
- [3] Bower A J, Li J, Chaney E J, Marjanovic M, Spillman D R, Boppart S A 2018 *Optica* **5** 1290
- [4] Datta R, Heaster T M, Sharick J T, Gillette A A, Skala M C 2020 *J. Biomed. Opt.* **25** 071203
- [5] Hirvonen L M, Suhling K 2020 *Front. Phys.* **8** 161
- [6] Suhling K, Hirvonen L M, Levitt J A, Chung P H, Tregidgo C, Marois A L, Ruskov D A, Zheng K, Ameer-Beg S, Poland S, Coelho S, Henderson R, Krstajic N 2015 *Med. Photon.* **27** 3
- [7] Liu X B, Lin D Y, Becker W, Niu J J, Yu B, Liu L W, Qu J L 2019 *J. Innov. Opt. Health Sci.* **12** 1930003
- [8] Ranjit S, Malacrida L, Stakic M, Gratton E 2019 *J. Biophotonics.* **12** e201900156
- [9] Lin D Y, Niu J J, Liu X B, Zhang X, Zhang J, Yu B, Qu J L 2020 *Acta Phys. Sin.* **69** 168703 (in Chinese) [林丹樱, 牛敬敬, 刘雄波, 张潇, 张娇, 于斌, 屈军乐 2020 物理学报 **69** 168703]
- [10] Cominelli A, Acconcia G, Peronio P, Ghioni M, Rech I 2017 *Rev. Sci. Instrum.* **88** 123701
- [11] Vallmitjana A, Torrado B, Dvorbikov A, Ranjit S, Gratton E 2020 *J. Phys. Chem. B* **124** 10126
- [12] Hirmiz N, Tsikouras A, Osterlund E J, Richards M, Andrews D W, Fang Q 2021 *Opt. Lett.* **45** 69
- [13] Wang L, Liang X, Mohammed Y H, Thomas J A, Bridle K R, Thorling C A, Grice J E, Xu Z P, Liu X, Crawford D H G, Roberts M S 2015 *Biomed. Opt. Express* **6** 780
- [14] Grewe B F, Langer D, Kasper H, Kampa B M, Helmchen F 2010 *Nat. Methods* **7** 399
- [15] Gershow M H, Karagyozov D, Yamaguchi A 2021 *Opt. Lett.* **46** 1644
- [16] Qi J, Shao Y H, Liu L X, Wang K G, Chen T S, Qu J L, Niu H B 2013 *Opt. Lett.* **38** 1697
- [17] Yan W, Peng X, Qi J, Gao J, Fan S P, Wang Q, Qu J L, Niu H B 2014 *J. Biomed. Opt.* **19** 116004
- [18] Zeng S, Lv X, Bi K, Zhan C, Li D, Chen W R, Xiong W, Jacques S L, Luo Q 2007 *J. Biomed. Opt.* **12** 024015
- [19] Wu Q Q, Qi J, Lin D Y, Yan W, Hu R, Peng X, Qu J L 2017 *Proc. SPIE* **10069** 1006922
- [20] Lin H J, Herman P, Kang J S, Lakowicz J R 2001 *Anal. Biochem.* **294** 118

Fast fluorescence lifetime microscopy imaging of any number of discrete irregular regions of interest*

Niu Jing-Jing[#] Liu Xiong-Bo[#] Chen Peng-Fa Yu Bin
Yan Wei Qu Jun-Le Lin Dan-Ying[†]

(Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems, Center for Biomedical Photonics & College of Physics and
Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

(Received 18 May 2021; revised manuscript received 31 May 2021)

Abstract

Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) has been widely used in biomedical research due to its high specificity, high sensitivity and quantification ability in cell microenvironment sensing. The fluorescence lifetime detection method based on time-correlated single photon counting (TCSPC) is one of the most commonly used techniques at present. However, due to the limitation of imaging principles and conditions, this technique has the disadvantages of long data acquisition time and consequently low imaging speed. In this paper, a fast FLIM technique for any number of discrete and irregular regions of interest (ROIs) in biological samples is developed. The technology uses acousto-optic deflectors (AODs) to achieve fast and flexible addressing scanning, optimize the synchronization strategy between AOD and TCSPC, and reconstruct the lifetime image through simple online feature analysis of the ROI shapes. For the case of multiple discrete irregular ROIs in biological samples, it can greatly save the time of data acquisition, thus realizing the fast FLIM imaging of these ROIs, which is beneficial to the study of the heterogeneity of biological events in biological system. In particular, the fast fluorescence imaging result for 87 discrete points in the field of view shows that this method can obtain a fluorescence lifetime image in a very short acquisition time (only 52.2 ms) and thus achieving a very fast imaging speed in such a situation. Dynamic FLIM imaging of lysosome probe LysoSensor Green DND-189 in living cells stimulated by ammonium chloride is carried out to monitor the real-time change of pH value in lysosome lumen. The acquisition time for a single fluorescence lifetime image of lysosomes in two ROIs is only 200 ms. The results show that the rapid FLIM technology can be used to dynamically monitor the changes of microenvironment in biological samples, and will play an important role in the microenvironment sensing in living cells.

Keywords: fast fluorescence lifetime imaging microscopy, addressing scanning, discrete target, irregular regions of interest

PACS: 87.64.-t, 87.64.M-, 87.64.kv, 87.85.Pq

DOI: [10.7498/aps.70.20210941](https://doi.org/10.7498/aps.70.20210941)

* Project supported by the National Key R&D Program of China (Grant No. 2017YFA0700500), the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 61775144, 61975131, 61620106016), and the Shenzhen Basic Research Project, China (Grant Nos. JCYJ20200109105411133, JCYJ20170412105003520).

[#] These authors contributed equally.

[†] Corresponding author. E-mail: dylin@szu.edu.cn