

基于受激增益与自发衰减的激发-探测显微技术

何柏纬, 梁义志, 许哲伦, 德士柏, 高甫仁

(阳明大学 生物医学暨工程学院 生医光电研究所, 台湾 台北 11221)

摘要: 基于激发-探测显微技术研究受激增益与自发衰减现象。采用脉冲二极管激光器($\lambda_{\text{pu}}=635\text{nm}$ 作为激发光束)与锁模掺钛蓝宝石激光器($\lambda_{\text{pr}}=780\text{nm}$ 作为探测光束)。受激增益部分, 发射光束在频率 f_1 被调制, 利用光电二极管作为探测器 (PDA 36A, Thorlabs), 探测光被相应地解调来提取透射方向的信号; 自发损耗部分, 探测光束在频率 f_2 被调制, 从探测荧光由光电倍增管以反射模式解调自发损耗信号。所有情形下使用高性能锁模放大器(HF2LI, Zurich Instruments)。锁模放大器的输出信号接着输入扫描单元的 A/D 通道用于图像重构。扫描速率设为频率 500 Hz, 与锁模放大器 1.99 ms 的时间常数相匹配。由解调荧光信号获取背景大大减少的荧光寿命和光学部分属于散粒噪声的图像。另外, 此技术改善信噪比, 提高类似多光子显微镜的穿透深度, 无须昂贵的飞秒激光器。

关键词: 激发探测显微术; 受激辐射; 锁模探测

中图分类号: TN249 文献标志码: A DOI: 10.3788/IRLA201847.0606004

Stimulated gain and spontaneous loss pump-probe microscopy

Ho Bowei, Liang Yizhi, Hsu Chelun, Das Subir, Kao Fujen

(Institute of Biophotonics, College of Biomedical and Engineering, National Yang-Ming University, Taipei 11221, China)

Abstract: In this work, the pump-probe microscope was used to study the stimulated gain and spontaneous loss phenomenon. A pulsed diode laser, $\lambda_{\text{pu}}=635\text{nm}$ as the pump (excitation) beam and a mode-locked Ti-sapphire laser, $\lambda_{\text{pr}}=780\text{nm}$, as the probe (stimulation) beam were applied. For stimulated gain, the pump beam was modulated at a frequency, f_1 , and the probe beam was demodulated accordingly to extract the signal in the transmission direction with a photodiode as the detector (PDA 36A, Thorlabs). For spontaneous loss, the probe beam was modulated at frequency, f_2 , the spontaneous loss signal was then demodulated from the fluorescence detected in the reflection mode by a PMT. In all cases, a high performance lock-in amplifier (HF2LI, Zurich Instruments) was used. The output signal of the lock-in amplifier was then fed to the A/D channel of the scanning unit for image reconstruction. The scan rate was set at a frequency 500 Hz, to match the time constant (1.99 ms) of the lock-in amplifier. By demodulating fluorescence signal, the fluorescence lifetime and optical section images can be obtained with greatly reduced background, in which shot noise was attributed. Additionally, the signal-to-noise ratio was improve and penetration depth like multiphoton microscopy was enhanced, without expansive femtosecond lasers.

Key words: pump-probe microscopy; stimulated emission; lock-in detection

收稿日期: 2018-01-05; 修订日期: 2018-02-03

基金项目: 国家科学发展研究部一般型研究计划(台湾 MOST 105-2112-M-010-001-MY3)

作者简介: 何柏纬(1992-), 男, 硕士生, 主要从事生物医学光电方面的研究。Email: a9952898@gmail.com

导师简介: 高甫仁(1961-), 男, 教授, 硕士生导师, 博士, 主要从事生物医学光电方面的研究。Email: fjkao@ym.edu.cn

0 引言

激发-探测显微技术常用的光学效应有双光子吸收 (Two-Photon Absorption, TPA)、激态吸收 (Excited-State Absorption, ESA)、受激发射 (Stimulated Emission, SE)、受激拉曼散射 (Stimulated Raman Scattering, SRS)、基态损耗 (Ground State Depletion, GSD) 与跨相调制 (Cross-Phase Modulation, XPM) 等^[1], 例如: 双光子吸收与激态吸收技术在皮肤组织的黑色素观测中均有相关研究^[2-4], 两者信号差异在于, 当两道激光脉冲在空间与时间上完全重叠时所产生的信号为双光子吸收信号 (TPA Signal), 反之, 当两道激光脉冲最大峰值在焦点上有时间差异并且时间差异小于分子的荧光生命荧光寿命周期, 此时所产生的信号为激态吸收信号 (ESA Signal)。而受激发射辐射技术是利用一道激光激发样品并使用另外一道激光强制将样品中受激发电子跃迁回基态, 此方法有助于增加微弱的荧光信号强度, 课题组先前研究利用受激发射辐射信号特性增加样品与物镜之间的工作距离^[5], 或与光学相干断层扫描 (Optical Coherence Tomography) 结合以达到提升信噪比 (Signal-to-Noise Ratio)。

文中研究主要探讨荧光样品经受激发射辐射过程所产生的荧光信号特性, 并运用产生的受激增益与自发衰减现象进行显微成像。基于激发-探测技术, 利用半导体激光、钛蓝宝石激光、电光调变系统、激光扫描显微系统与电子延迟系统, 使用皮秒激光光源作为荧光样品激发探测光源, 进行荧光信号强度与激光功率分析, 研究对于光学调制频率产生激光功率与对荧光信号的影响, 最后对荧光显微影像进行信噪比分析, 检验显微镜系统测量信号的极限与系统稳定性。

1 实验架构

为了使样品中的荧光分子 (ATTO 647N, ATTO-TEC, Germany) 产生受激发射辐射效应, 需使用两道激光, 光源波长分别为 ATTO 647N 的吸收与发射辐射 (λ_{em}) 波段, 如图 1 所示, 产生吸收效应的光源为激发激光, 产生发射辐射效应的光源为探测激光。

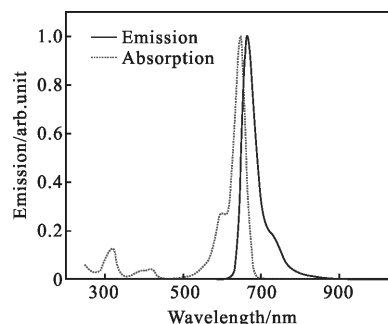


图 1 荧光染料 ATTO647N 的吸收与发射辐射光谱
Fig.1 Absorption and emission spectra of ATTO647N

当两道光源同时合束在聚焦点时, 聚焦点中的荧光团电子会受到激发光源的刺激而跃迁至激发态。之后受到来自于第二道光源即探测光的影响, 有机率地迫使其电子释出能量跳回基态并发出与探测光相同频率、相位、偏振态和传播方向的同调光子, 该过程称为受激辐射, 如图 2 所示。

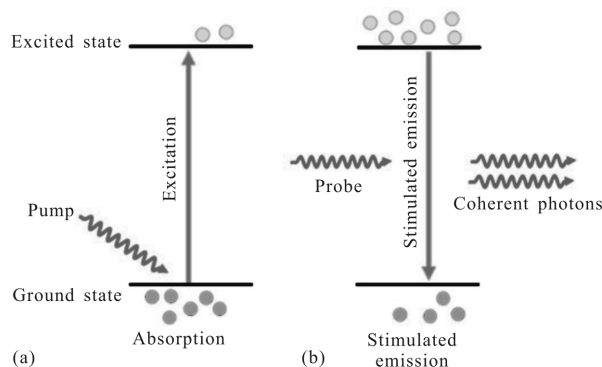


图 2 荧光团中电子吸收(a)与受激辐射(b)

Fig.2 Schematic of electric absorption (a) and stimulated emission (b)

实验系统构成如图 3 所示。激发激光光源使用脉

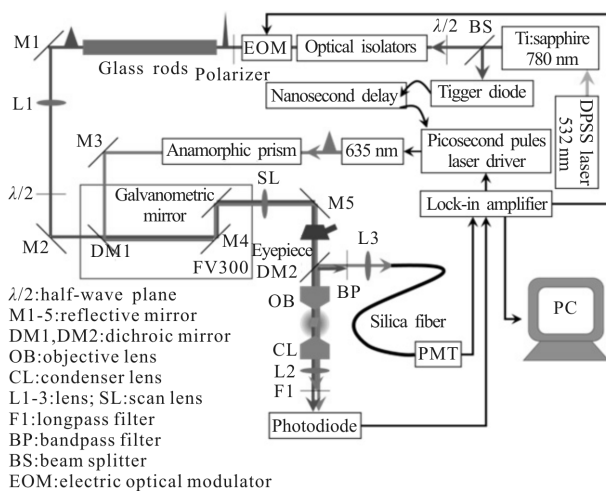


图 3 激发-探测显微技术装置示意图

Fig.3 Schematic of pump-probe microscopy setup

冲激光二极管 (LDH-P-635, PicoQuant, Germany), 波长(λ_{pump})为 $635 \pm 10 \text{ nm}$, 并搭配激光驱动控制器 (PDL 800-D, PicoQuant, Germany) 进行调控, 脉冲重复频率为 76 MHz 的脉冲重复频率, 平均功率为 $32 \pm 1 \text{ mW}$, 脉冲宽度为 100 ps, 由于激光二极管的传输模式为 TEM01, 因此外加一棱镜组去改变传输模式至 TEM00。

探测激光光源使用掺钛蓝宝石激光系统 (Ti:Sapphire Laser, Mira 900, Coherent, USA), 此实验设定探测波长(λ_{probe})为 $780 \pm 10 \text{ nm}$, 脉冲重复频率为 76 MHz, 平均功率为 $450 \pm 10 \text{ mW}$, 脉冲宽度原本为 200 fs, 经由玻璃柱体 (SF6, $n=1.78$) 透过色散延迟脉冲宽度为 $3 \pm 0.3 \text{ ps}$ 。并利用电光调变器 (M350-80, ConOptics, USA) 产生振幅调制使激光光源至 100kHz, 通过光振幅调制可在探测器接收信号范围内运用频率测出实验信号。

实验中使用电子式延迟系统 (Model 425A Nanosecond Delay, ORTEC, USA) 调控激发激光与探测激光的脉冲间相对时间差距, 通过改变延迟时间得到最佳受激发射辐射信号。在实验设计中把 780 nm 激光利用光束分束器把 780 nm 激光导入触发式二极管 (TDA 200, PicoQuant, Germany) 产生同步信号。将同步信号传输至电子式延迟器改变延迟时间, 完成延迟后再将信号传输至 635 nm 激光驱动器以触发激发激光的脉冲, 实现激光时间同步。

激发激光与探测激光在经过反射镜 (M2, M3) 反射后, 到达共轭焦扫描系统 (FV300, Olympus, Japan) 的分色镜中, 使两道激光在空间上重合进行合束, 再通过扫描振镜反射后经由物镜聚焦于样品上。接收影像信号分别为穿透方向上接收透射受激增益信号与利用反射方向获取反射自发衰减信号两个部分。图 4(a) 表示穿透透射信号的探测光路部分, 需使用一枚物镜 (Condenser, 10X/NA0.3) 来收集, 接着安置并搭配高通滤波片 (769 nm Longpass Filter, F1), 并配合聚焦透镜 (L2, $f=30 \text{ mm}$) 将信号聚焦于光电二极管 (PDA36A, Thorlabs, USA)。接着将最后的电信号 (AC and DC Signal) 传输至锁相放大器解调制, 将解调放大信号 (DC Signal) 输入至电脑, 经由 Fluoview 软件进行显微影像的显示, 软件将信号转化成显微影像。

反射信号探测光路部分沿原激光方向, 如

图 4(b) 所示, 因此接收信号将原物镜作为新物镜的接收信号, 通过分色镜 (DM 2) 将 679~715 nm 光反射, 接着经过带通滤波片 (690~710 nm Bandpass Filter, BP) 与聚焦透镜 (L3, $f=50 \text{ mm}$) 将信号光导入石英光纤, 最后由光电倍增管将光信号转换为电信号 (AC and DC Signal), 再由锁相放大器解调后传至电脑组成显微影像。

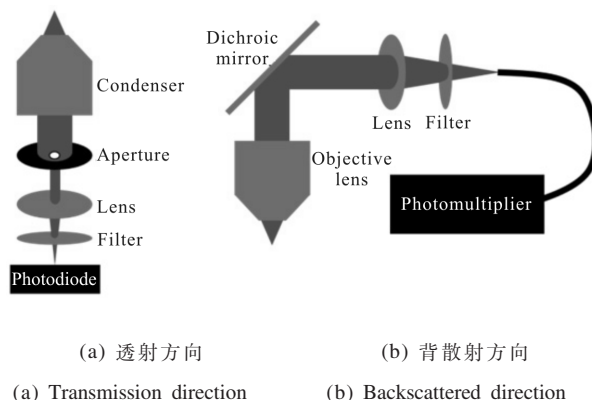


图 4 探测模式示意图

Fig.4 Schematic of detection mode

2 实验结果

2.1 实验样品与理论计算

样品配置: 首先将分子量为 746 g/mol 的 ATTO647N 粉末与去离子水 (DI Water) 依据体积摩尔浓度 (M) (如公式(1)) 调配成 1 mm 的溶液。接着将光学拭镜纸裁切为 5 mm×5 mm 大小并将其放置塑胶夹链袋内, 再将调配完成的溶液用针筒注入塑胶袋内并用封口机将溶液与拭镜纸密封于塑胶袋内, 完成湿式样品的制备。

$$\text{摩尔浓度}(M) = \frac{\text{溶质重}/\text{溶质分子量}}{\text{溶液体积}} \quad (1)$$

2.2 在不同激光强度下的荧光信号

受激增益与自发衰减的荧光信号皆为激发态电子受探测激光刺激所产生, 因此受激增益与自发衰减信号强度主要受探测激光强度的影响, 如图 5 所示, 此为激光强度对信号的影响, 固定激发光束的输出功率为 2.6 mW, 并逐渐增加探测光束的能量, 得到了影像信号与激光关系。

图 5(a) 为受激增益信号与探测激光强度信号关系, 在 0~3.6 mW 受激增益信号与探测激光功率成正比关系, 受激增益信号强度和荧光分子与不同波

长的发射辐射系数、样品浓度以及探测激光的光子数目有关,因此在使用固定波长与样品浓度时,产生受激增益信号强度与探测激光功率呈正比关系,超过 3.6 mW 为受激增益信号因光电二极管受限于输入光强度的极限,造成受激增益信号无法随探测激光功率上升而增加。

图 5(b)为自发衰减信号随探测激光强度改变而变化,在 0 mW 时下自发衰减信号为 0,代表自发衰减信号探测过程为无背景值影响无背景信号干扰,在 0~50.6 mW 之间,自发衰减信号与探测激光功率成正比关系,因自发衰减信号为自发荧光受到受激发射辐射过程影响产生激发态电子被探测激光强制发射辐射,此时使用调制探测激光产生受激发射辐射过程,而产生自发荧光拥有光调制现象,故产生光调制的自发荧光为自发衰减信号,当探测激光带走的激发态电子越多,会造成自发荧光的光调制现象越明显,使得自发衰减信号随之增强,然而,自发衰减信号因探测波段不包含激发与探测激光,因此探测时不受探测器的饱和功率限制,故可以提高探测激光强度以提升自发衰减信号强度,进而提升自发衰减信号之信噪比(SNR)。

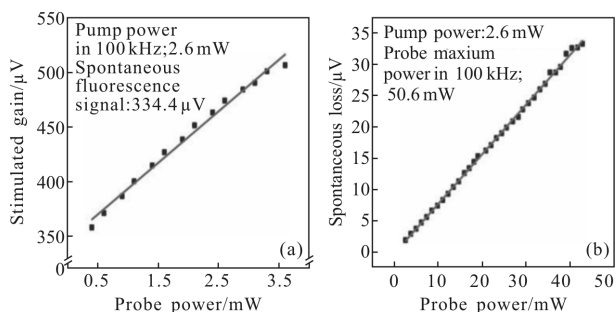


图 5 信号与激光功率关系图。(a)受激增益信号,(b)自发衰减信号

Fig.5 Diagram of signal as function of probe laser power.

(a) stimulated gain, and (b) spontaneous loss

2.3 于不同深度的受激增益与自发衰减信号

如图 6 所示为信号强度沿 Z 轴的变化关系图,图中,虚线为受激增益信号,实线为自发荧光信号,因受激增益信号为非线性光学过程,所以信号强度随激光聚焦点在样品的 Z 轴位置和样品中的荧光分子分布密度而改变。图 6(b)为自发衰减信号随 Z 轴变化的信号强度,利用自发荧光因受激发射辐射过程影响所产生的自发衰减信号。因自发衰减为非线

性光学过程,故信号强度随激光聚焦点在样品的 Z 轴位置而改变,其反应过程与受激增益信号相似。由图 6(a)(b)可知受激增益与自发衰减可适用于获取不同 Z 轴位置的显微影像。

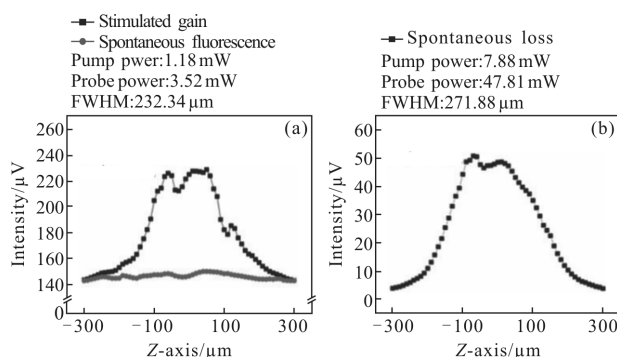


图 6 信号强度。(a)受激增益(虚线)与自发荧光(实线);(b)自发衰减信号在不同位置的变化

Fig.6 Signal response. (a) stimulated emission (dash line) and fluorescence (solid line); (b) spontaneous loss at different position

2.4 受激增益与自发衰减影像

实验使用激光扫描系统进行 256×256 点对点的显微成像,如图 7 所示,观测样品为拭镜纸浸至染剂中经扫描的影像,分别为受激增益影像(图 7(a))、自发荧光影像(图 7(b))与自发衰减影像(图 7(c)),其激光调制分别为 100 kHz 激发激光(图 7(a))、100 kHz 激发激光(图 7(b))及 100 kHz 探测激光(图 7(c))。

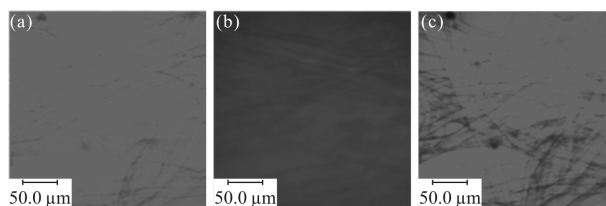


图 7 光学扫描。(a)受激发射;(b)自发荧光;(c)自发衰减影像

Fig.7 Optical scanning images of (a) stimulated emission (b) spontaneous fluorescence (c) spontaneous loss

在图 7(a)使用 3 mW 激发激光与 3.5 mW 探测激光所产生的影像,影像里的黑色区域为样品内的空气与拭镜纸纤维。然而,探测器在捕获受激增益信号时,自发荧光信号因调制频率相同而一起与受激增益信号成像,因此在扫描受激增益影像会伴随着自发荧光影像,称为背景影像,如图 7(b)所示,在图 7(c)使用 3 mW 激发激光与 50 mW 探测激光所产生的影像,自发衰

减影像因由自发荧光信号所产生，故在影像获取过程并无背景信号，因此不会发生受激增益影像的情况。受激发射、自发荧光与自发衰减影像参数如表 1 所示。

表 1 受激发射、自发荧光与自发衰减影像参数

Tab.1 Parameter of stimulated emission, spontaneous fluorescence and spontaneous loss image

Region of interest (256×256)	Stimulated gain	Spontaneous fluorescence	Spontaneous loss
Pump power /mW	3.0	3.0	3.0
Probe power /mW	3.5	NA	50.0
SNR/dB	8.09	3.29	17.34

2.5 荧光生命周期与时间解析影像

在荧光显微技术中，经常使用荧光的寿命周期来测量样品环境中的荧光浓度、pH 值、离子浓度与分子内部的蛋白质或 DNA 之间的交互作用等，在 FLIM 或 FLIM-FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)，使用荧光寿命周期作为测量基础，实验利用两道激光的脉冲间的时间差进行荧光寿命周期量测。

在图 8 中，图 8(a)为受激增益信号在不同延迟时间的变化，图 8(b)为自发衰减信号在不同延迟时间的变化，两者所测得的荧光寿命周期分别为 4.14 ns 与 4.28 ns，其测量误差在 10%以下，接着进行时间解析影像测量，如图 9 所示，以证实此实验系统可实现荧光寿命周期影像观测。

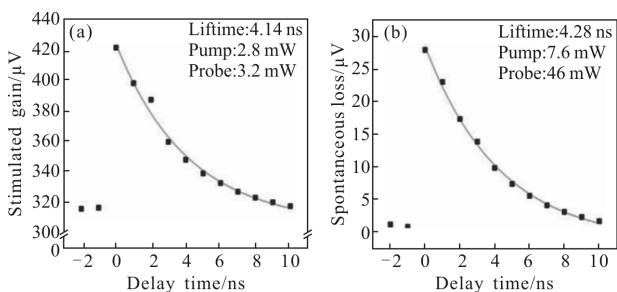


图 8 受激增益信号(a)和自发衰减信号(b)受两脉冲延迟时间影响的变化

Fig.8 Stimulated gain (a) and spontaneous loss (b) signal as a function of delay time between two pulses

图 9 中，图 9(a)为受激增益的时间解析影像，

在 -1 ns 所测量的影像为自发荧光所产生的背景信号，在 0 ns 为激发激光与探测激光完全重合，在此受激辐射过程为最明显，因此可得出最大受激增益信号，接着随两道激光脉冲延迟时间增加造成激发态电子随自发辐射过程而减少，以至于探测激光能产生受激发射过程的激发态电子减少，最后受激增益信号随之降低。图 9(b)为自发衰减时间的解析影像，在 -1 ns 因探测激光无法产生受激辐射过程，因此自发荧光尚未产生衰减故量测信号为 0，既无背景值，在 0 ns 为两道激光完全重合，因此产生最大自发衰减信号，之后随延迟时间增加使得探测激光逐渐离开荧光寿命周期产生激发态电子减少而降低自发荧光衰减过程，使得自发衰减信号随之降低。

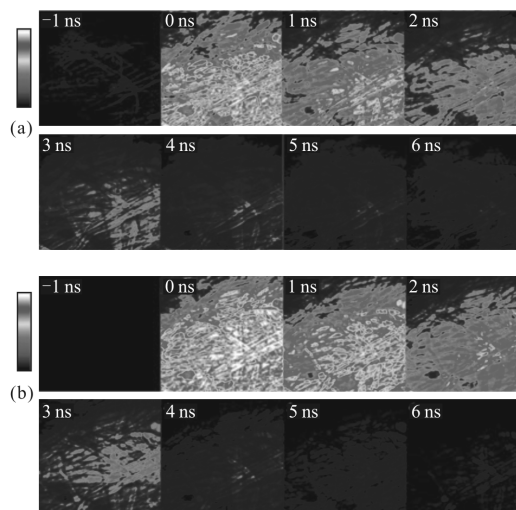


图 9 时间解析影像

Fig.9 Time-resolved images

3 结束语

结合以上实验结果，可以发现由于受激增益信号频率与自发荧光信号相同，故在探测上受激增益信号会伴随着自发荧光信号，造成受激增益影像受背景值影响。

对于自发衰减信号在探测过程中无背景信号产生，且信号可以随探测激光功率提高而增加，其探测过程不超过探测器的饱和和极限，因此自发衰减信号信噪比高于受激增益信号，而目前自发衰减信号受限于光学调制装置造成激光功率损失，无法使样品荧光信号达到饱和状态，因此提高探测激光的功率为主要改进方向。

参考文献:

- [1] Fischer M C, Wilson J W, Robles F E, et al. Invited Review Article: Pump-probe microscopy [J]. *Review of Scientific Instruments*, 2016, 87(3): 031101.
- [2] Tian Peifang, Warren W S. Ultrafast measurement of two-photon absorption by loss modulation [J]. *Optics Letters*, 2002, 27(18): 1634–1636.
- [3] Fu Dan, Tong Ye, Matthews T E, et al. High-resolution in vivo imaging of blood vessels without labeling [J]. *Optics Letters*, 2007, 32(18): 2641–2643.
- [4] Matthews T E, Matthews I R, Selim M A, et al. Pump-probe imaging differentiates melanoma from melanocytic nevi [J]. *Science Translational Medicine*, 2011, 3(71): 71ra15.
- [5] Lin Poyen, Lee Shinshian, Chang Chiaseng, et al. Long working distance fluorescence lifetime imaging with stimulated emission and electronic time delay [J]. *Optics Express*, 2012, 20(10): 11445–11450.