

文章编号: 1005-5630(2025)01-0051-07

DOI: 10.3969/j.issn.1005-5630.202312010129

全波段无光学滤波显微镜的研究

游少杰, 戴博, 张大伟

(上海理工大学 光电信息与计算机工程学院, 上海 200093)

摘要: 传统显微镜在生物成像中广泛采用荧光成像技术, 该技术在基础科学和临床研究中具有重要意义。然而, 传统荧光检测系统通常依赖光谱滤波器来分离荧光信号和激发光, 这导致检测速度和灵敏度下降, 同时限制了可检测的荧光范围, 增加了系统的光学复杂性。为解决这一问题, 展示了两种全波段无滤波显微成像技术。第一种技术利用超快超连续白光源, 无需光谱滤波即可激发荧光, 通过时间分辨探测器在时间域中排除激发光, 从而提高了检测速度和灵敏度。第二种技术利用荧光发射的偏振性和相干性, 采用线偏振照明和交叉分析器, 增强了荧光和散射光之间的对比度, 实现了在 450~680 nm 光谱范围内的荧光成像。这两种全波段无滤波显微成像技术简化了光学配置, 为生物成像领域的应用提供了高效、灵敏的解决方案。

关键词: 荧光成像; 光学滤波; 全波段荧光

中图分类号: TH 742 **文献标志码:** A

A study of full-spectrum filterless microscopy

YOU Shaojie, DAI Bo, ZHANG Dawei

(School of Optical-Electrical and Computer Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: Traditional fluorescence microscopy extensively employs fluorescence imaging techniques in biological imaging, playing a crucial role in fundamental scientific research and clinical studies. However, conventional fluorescence microscopic systems often rely on spectral filters to separate fluorescence signals from excitation light, resulting in degradation of detection speed and sensitivity as well as complexity of the systems. To address this issue, we introduce two full-spectrum filterless microscopy imaging techniques. The first technique utilizes an ultrafast and broadband white light source, enabling fluorescence excitation without the need for spectral filtering. A time-resolved detector is employed to exclude excitation light in the time domain, thereby enhancing detection speed and sensitivity. The second technique exploits the polarization and coherence of fluorescence emission, employing linearly polarized illumination and a cross analyzer to improve the contrast between fluorescence and scattering light, facilitating fluorescence

收稿日期: 2023-12-01

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFC3103003)

第一作者: 游少杰(1999—), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物成像。E-mail: ysj865068743@163.com

通信作者: 戴博(1986—), 男, 教授, 研究方向为光学成像、超精密光学制造技术。E-mail: daibo@usst.edu.cn

image acquisition within the 450-680 nm spectral range. These two full-spectrum filterless microscopy techniques offer efficient and sensitive solutions for the field of biological imaging while simplifying optical configurations.

Keywords: fluorescence imaging; optical filtering; full-band fluorescence

引 言

传统显微镜在生物成像中广泛地使用荧光显微成像技术,如细胞表型检测、组织切片检测^[1],其中,多波段荧光三维成像通常需要与共焦、多光子或光学切片显微镜等方法结合使用^[2],以获取更全面的细胞或组织信息。由于激发荧光素的激发光光强往往比荧光素的发射荧光光强大几个数量级,所以需要将充当背景噪声的激发荧光与所需信号的发射荧光分离之后,才可得到理想的荧光图像。传统方法通过组装荧光滤波通道来实现两者的分离,荧光滤波通道通常由一个激发滤光片、一个发射滤光片以及一个相应波段的二向色镜组成,激发滤光片用以筛除生物样品散射的激发光,发射滤光片允许样品的发射荧光抵达探测器。

然而,每种特定的染料只在相对狭窄的光谱范围内被激发,单一的激发波长只能激发有限数量的荧光物质,故传统显微镜无法在单个图像中获得样品的全部激发/发射光谱。同时,若荧光物质的斯托克斯位移没有足够大时,激发带和发射带存在重叠区域,即使使用带宽极小的滤波器筛选掉全部的散射激发光,也会不可避免地损失一些发射荧光信号。传统的荧光检测系统的问题不仅会降低检测的速度和灵敏度,还会限制可检测荧光标记的选择。此外,对于使用多个激发和发射光谱的多色标记染色生物样品,通常需要多波段同时荧光成像。同时检测多色生物标记能够监测复杂生物系统中的不同生理过程和生物细胞功能。为满足多色荧光检测的需求,传统的系统已经扩展到具有多个激发-发射光谱的荧光滤波通道的荧光滤波轮盘,通过切换轮盘中的滤波通道实现多色荧光检测。但是,这种轮盘中的光学配置较为复杂,为更新与改进带来了困难,并且机械切换轮盘耗时较长,不利于同时成像。

因此,本文展示了两种全波段无滤波显微

镜。其一,使用由非线性光子晶体光纤与飞秒激光相结合生成的单一超连续光源充当激发光源同时激发各色荧光团,这种超连续白光为一种宽谱光。然后,条纹相机根据激发光与发射光在时间域上的差异,滤除散射激发光。其二,由于荧光发射通常表现出较大的偏振各向异性,而散射的激发光则保留偏振状态,故使用线偏振照明和光束遮挡器,提高荧光和散射光之间的对比度。本文展示的两种方案无需多个带通滤波器和二向色镜,从而简化了光学配置。

1 基于条纹相机装置模型分析

1.1 基于条纹相机超窄时间窗的无滤波显微镜

图 1 展示了利用超快脉冲激光器(Coherent, Mira 900)产生的超连续白光作为激发光源,在 800 nm 波长和 76 MHz 的重复频率下,将 70 mW 的 50 fs 脉冲耦合到一根长度为 1 m 的非线性光子晶体光纤,光纤零色散波长为 750 nm。非线性相互作用包括自相位调制、自陡峭化、受激拉曼散射和四波混频^[3-5],其中自相位调制导致频率扩展,形成光谱的宽带;自陡峭化是指高强度光在介质中传播时传播速度更快,光波包的前沿会更陡峭;受激拉曼散射会使光谱红移,进一步增加了光的频率范围;四波混频即不同频率的光波在非线性介质中相互作用,产生新的频率成分,导致了频率的组合和扩展,形成更宽的频谱。这些非线性效应相互作用,共同导致了光谱的宽带,产生一个宽的亚皮秒连续体,延伸到 460 nm。如图 2 所示,虽然光谱图显示出一些结构上的变化:在 400~500 nm 范围内,光谱强度较低,并且呈现出一种散乱的模式,但整体上光谱是连续的;在 500~600 nm 范围内,光谱强度开始增加,并在 600~700 nm 之间达到一个峰值;在 700~800 nm 范围内,光谱强度减小,并在 800~900 nm 之间再次达到一个较高的峰值。

因此, 该光源可以激发任何在 460 nm 到近红外波段吸收的荧光物质。在 460~780 nm 之间的平均光谱密度为 130 $\mu\text{W}/\text{nm}$, 能够实现荧光的高

效激发。超连续光源的高重复率能够实现同步检测来探测微弱信号, 并监测快速变化的荧光信号, 例如流式细胞仪中的信号。

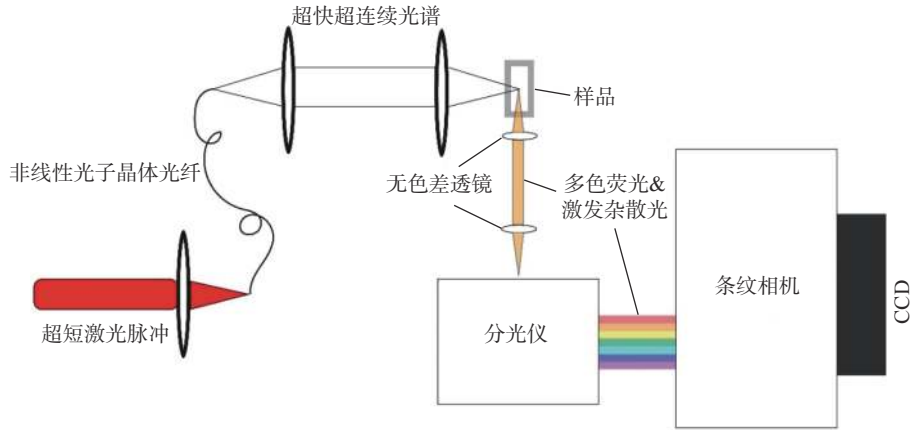


图 1 基于条纹相机超窄时间窗的无滤波显微镜系统原理图

Fig. 1 Schematic diagram of a filterless microscope system based on ultra-narrow time window of fringe camera

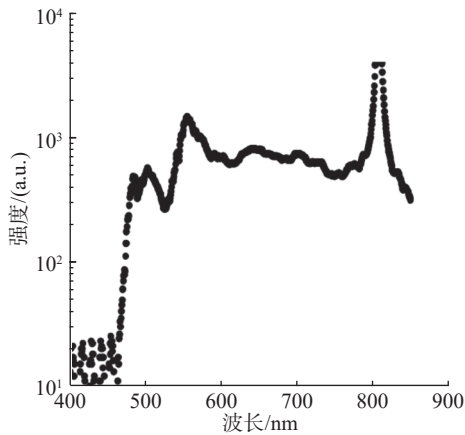


图 2 超快脉冲激光的超连续光谱

Fig. 2 Supercontinuum spectrum of ultrafast pulsed laser

将超连续白光聚焦到一个样品比色皿中, 其中包含不同染料的混合物, 如图 1 所示。使用一个无色差透镜收集样品出射光, 另一个无色差透镜将信号聚焦至分光仪中。其中样品出射光包含激发杂散光与荧光, 而后经由分光仪输出包含荧光和激发杂散光的两个重叠光谱。由于激发杂散光和荧光在光谱上是重叠的, 因此有必要使用时间分辨探测器在时域中分离这两个信号。该研究中使用的全光谱的超连续白光与已有的研究^[6-8]有明显不同, 以前的研究中往往采用窄带通滤波器从超连续谱中选择特定波长范围进行荧光激发。荧光检测采用了与传统方法相同的方法, 使用发射滤波器来滤除激发杂散光, 只允许荧光信

号通过。相比之下, 该方法在不进行光谱滤波的情况下使用全波段超连续白光, 可实现单次激发宽波长范围内的多种染料。

对于采用的时间分辨探测器有以下关键要求: 第一, 具有足够的时间分辨率, 在时间域上分辨散射的激发光和荧光。该方案无需考虑激发光的波段, 只需考虑荧光和激发光的寿命, 从而使散射的激发光不被探测器探测到。第二, 探测器需具有非常高的对比度, 确保即使在散射的激发光可能很强的情况下(例如在组织或细胞培养中), 也能探测到较弱的荧光信号。第三, 使用阵列探测器, 在光谱上区分不同的荧光物质。

本文使用条纹相机(Hamamatsu, M1955), 该相机在同步扫描模式下运行, 相机内的电子束与 76 MHz 的激发脉冲序列同步扫描探测器屏幕。由于条纹迹线与激光脉冲同步, 通过调整条纹相机扫描电压相对于激发光的延迟(相位), 可以使散射的激发光脱离检测时间窗口, 而荧光位于时间窗口内, 从而将散射的激发光滤除。在这种模式下运行的频带相机提供了极高的散射激发光抑制率, 远高于实际检测动态范围, 同时保持了极高的荧光检测灵敏度。

1.2 实验结果与分析

超连续谱具有典型的光纤源高空间相干性, 同时保留激发各种荧光团所需的宽带。此外, 超

连续谱在时域上具有超短脉冲的优点，故能够在时间上实现将激发光与荧光分离，从而不再需要激发滤波器，并实现全光谱的同时激发。为验证超快脉冲激光器生成的超连续光源强度能够充分激发荧光，将超连续光谱聚焦到一个玻璃皿中，玻璃皿中含有两种染料，分别是 6-羧基四甲基罗丹明 (6-TAMRA) 和 Deep Red。6-TAMRA 是一种广泛用于自动 DNA 测序和毛细管电泳的荧光团。其吸收峰在 547 nm 左右，发射峰在 573 nm 左右^[9]。Deep Red 是一种线粒体染色染料，其最大吸收峰为 640 nm，发射峰约为 662 nm^[10]。二者的时间分辨荧光光谱如图 3 所示，尽管它们的吸收光谱明显分开，但两种染料均被超连续光源高效激发。荧光可以通过上文所提及的条纹相机收集并在时间域上进行滤波。由于条纹相机的

条纹迹线的时间延迟被调整以屏蔽掉散射的激发光，检测到的信号仅由两种染料的荧光组成。时间积分信号如图 4(a) 所示，荧光衰减曲线如图 4(b) 所示，该应用易于扩充至多种染料。

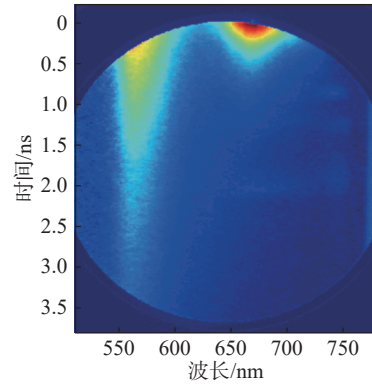
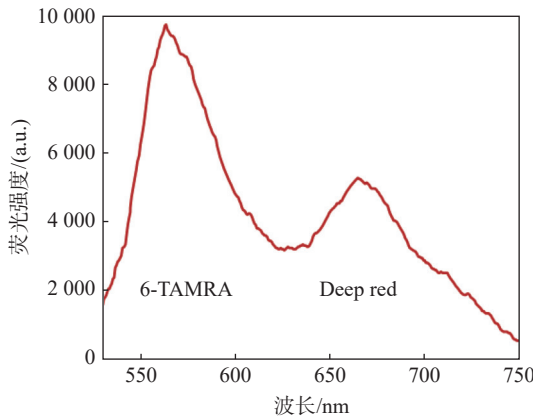
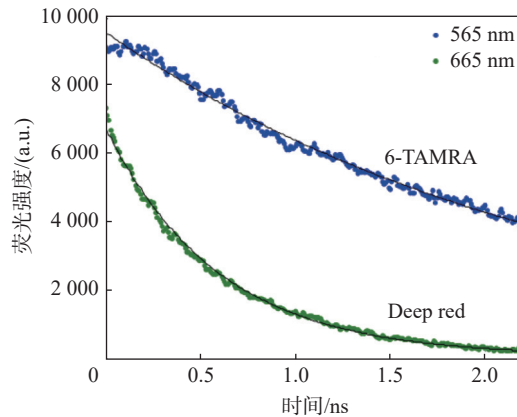


图 3 两种不同染料的时间分辨荧光光谱

Fig. 3 Time-resolved fluorescence spectra of two different dyes



(a) 激发 0.2 ns 后 6-TAMRA 和 Deep Red 的荧光光谱



(b) 6-TAMRA 和 Deep Red 的荧光衰减曲线

图 4 两种不同染料的荧光信息

Fig. 4 Fluorescence information of two different dyes

条纹相机的输出图像如图 4 所示，6-TAMRA 和 Deep Red 两种染料完整的未经滤波的图像如图 4(a) 所示，两者的荧光衰减曲线如图 4(b) 所示。图 4(a) 表明测量出的两种染料的荧光光谱图与预期相符合，且两者的中心波长分离较大，故两者的荧光衰减曲线可被分离并在其中心波长处使用单一指数拟合。由图 4(b) 可知，Deep Red 的荧光寿命约为 0.6 ns，而 6-TAMRA 的荧光寿命为 2.4 ns，二者与其他文献所测量的数据大致相符^[11]。尽管两种染料的光谱重叠很小，但衰减寿命的差异可以使不同的染料分子在光谱重叠的情况下被区分。结果表明，基于条纹相机超窄时间窗的无滤波显微镜可实现对超连续

谱激发的多种染料荧光发射的时间分辨测量，并同时提供光谱和寿命数据。但是，该显微镜仅能实现荧光信号的检测，无法实现荧光图像的生成，与成像系统并不兼容，且光谱区分单独染料的能力不足。

2 基于光挡阻隔装置模型分析

2.1 基于光挡阻隔激发光的无滤波荧光显微镜

本文展示了一种利用荧光发射的偏振性和相干性开发的显微镜，采用 450~680 nm 波长光源获取荧光图像，并同时检测相同范围内完整发射

光谱, 再使用偏振滤波器来区分荧光和背向反射光。荧光发射通常表现出较大程度的偏振各向异性, 而反射光保留了照明的偏振状态^[12]。通过使用线偏振照明和交叉分析器, 可以提高荧光和散射光之间的对比度, 因为分析器削减了相当比例的反射照明。例如, 来自显微镜载玻片或透镜表面的镜面反射具有线偏振特性, 大部分被滤除。虽然来自小特征的散射表现出一定的去极化^[13], 但大部分背向散射光被移除, 两者之间存在一定的关系, 但这种关系牵涉到较多方面, 并不存在直观的比例关系, 显微成像对比度取决于多个因素: 样品的结构特性、偏振滤波器的光学性质、荧光分子的性质、成像系统结构。

照明和荧光的相干性质差异为进一步分离提供了可能性。采用空间相干光源照亮物镜瞳孔中的一点提供均匀宽视场照明, 从平面(如显微镜载玻片)反射回来的照明光将沿着物镜的互逆路径穿过物镜, 形成瞳孔中的一个点, 该点可通过一个小的光束阻挡器来屏蔽。荧光发射主要是非相干和各向同性的。其中只有一小部分会被光束阻挡器屏蔽。因此, 这种空间相干性过滤增加了荧光与照明光之间的对比度。该原理已被用于高速狭缝扫描显微镜中产生线性照明, 但该方案需与激光照明和发射滤光结合使用^[14]。

基于光挡阻隔激发光的无滤波荧光显微镜结构如图 5 所示, 采用 Fianium SC450-2 WLS 源提供显微镜的宽谱照明(450~2000 nm), 输出光通过滤光片, 滤除所有波长超过 680 nm 的光。然后, 光束被扩展并通过 Glan Taylor 偏振器, 由 50 mm 焦距的透镜聚焦。聚焦后的光束被倾斜放置于靠近物镜后方, 孔径直径为 3 mm 的反射透镜(Zeiss PlanNeoFluar, 40×, 1.3 NA, 油浸)反射。该倾斜镜放置的位置是特定的, 以确保照明光束在物镜的瞳孔平面形成一个聚焦斑点, 从而实现样本宽视场照明。样本发出的光线由相同的物镜透镜收集, 通过瞳孔平面的部分光线被光束阻挡器阻挡, 其余部分入射至 400 mm 管状透镜并成像到 CCD 相机上, 也可以通过将光纤替换 CCD 相机的方式将其连接到 Ocean Optics USB2000 分光计进行样本的光谱测量。

理想情况下, 反射镜和光束阻挡器应置于物镜的瞳孔平面。然而, 由于大多数物镜的瞳孔平

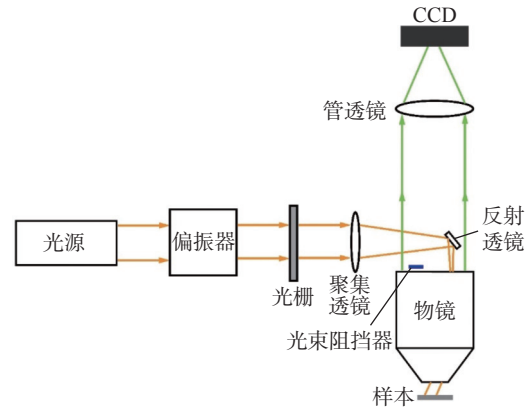


图 5 基于光挡阻隔激发光的无滤波荧光显微镜系统原理图

Fig. 5 The principle of unfiltered fluorescence microscope system based on optical barrier blocking excitation light

面位于镜头筒内, 因此, 反光镜和光束阻挡器应尽量靠近镜头的后孔径。图 6 中标出了两种可能的反射镜位置。如图 6(a)所示, 反射镜被置于光轴上, 同时充当光束阻挡器(假定镜子的支撑物不会遮挡瞳孔)。如图 6(b)所示, 镜子被置于瞳孔边缘, 光束阻挡器(直径 3 mm 的塑料圆盘)被置于相对的位置。如图 6(a)所示, 配置可使透镜组件的反向反射减少, 这是由于光路入射至透镜表面角度较大处。照明光和样品反射由橙色实线表示, 透镜的杂散反射由绿色虚线表示。在图 6(a)中, 照明被聚焦至光轴上的一点; 在图 6(b)中, 照明被聚焦在物镜瞳孔的边缘。本研究比较了照明点位于光轴上与照明点位于透镜外围的光路示意图: 当照明点位于透镜外围时, 透镜表面倾斜导致反射光在高角度偏转, 远离瞳孔, 因此反射光被透壳阻挡; 当光照进入光轴上的透镜时, 反射光穿过瞳孔返回, 有助于增强检测强度。由于遮挡散射光的效果取决于样品的表面性质和内部结构以及光路上遮挡的尺寸, 图 6(a)仅采用单个反射镜可同时起到将光引入路径以及充当光挡的作用。图 6(b)使用反射透镜引入光照, 使用光束阻挡器对散射光进行遮挡, 可采用的遮挡部分的尺寸更大。故两种遮挡方式的散射光误差并不相同。

2.2 实验结果与分析

为验证光挡阻隔激发光的无滤波荧光显微镜可以与任何探测器或光谱仪通道结合使用, 而不

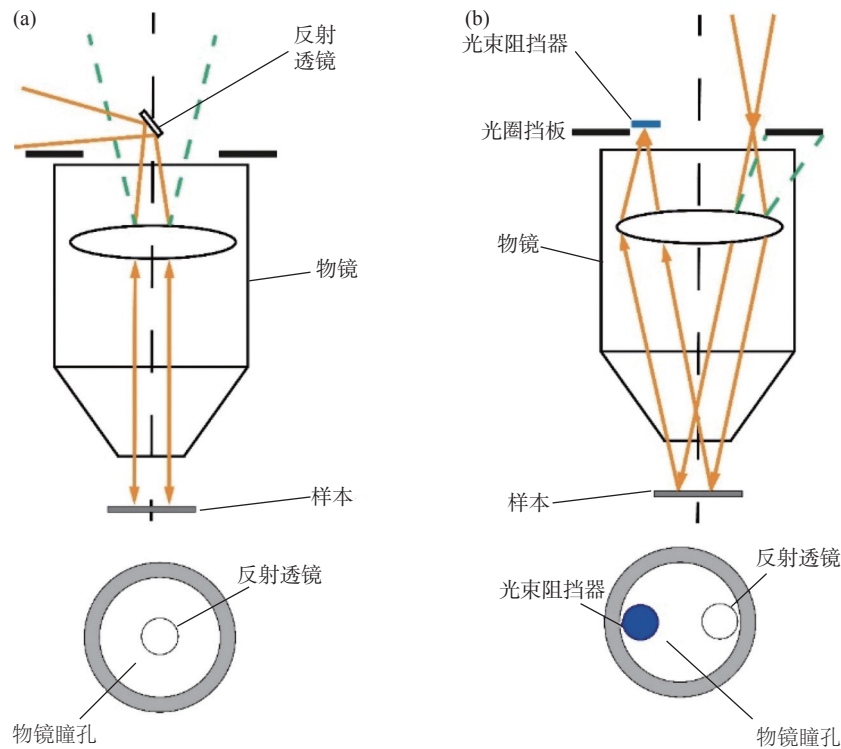


图 6 两种照明配置的效果说明图

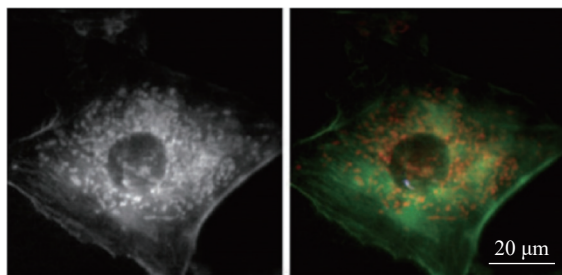
Fig. 6 Illustration of the effects of two illumination configurations

受二向色镜所允许的波段的限制，采用发射滤光片(无激发滤光)验证图像的全光谱性质，该方案具有普适性及多功能性。图 7(a)展示了由全光谱偏振滤波荧光显微镜采集的牛肺动脉内皮细胞的光强图像，该样本由两种不同波段的染料进行荧光标记，分别为 BODIPY FL Phalloidin^[15](其吸收峰值 505 nm，发射峰值 512 nm)和 MitoTracker Red CMXRos^[16](其吸收峰值 579 nm，发射峰值 599 nm)。为了验证该光强图像是否由两种染料的发射荧光组成，将两张对应波长的窄通带发射滤光片分别放置于检测光路中，将波段为

512 nm 绿色通道与波段为 599 nm 红色通道记录的图像合并。由图 7(b)可知，合并的荧光图像与全光谱光强图像对应良好，清晰地表明全光谱光强图像中绝大多数是发射荧光，极少部分为散射激发光。

3 结 论

本文展示了两种全波段无光学滤波荧光显微镜，分别是基于条纹相机超窄时间窗的无滤波显微镜及基于光挡阻隔激发光的无滤波显微镜。针对基于条纹相机超窄时间窗无滤波显微镜，采用超快超连续激发光源，结合激光脉冲时间域滤波技术，实现了无光谱过滤的可见光到近红外全光谱覆盖。该检测机制可以显著改善诸如微孔板阅读器、内窥镜和流式细胞仪等多色荧光仪器的性能。然而，这一检测技术与成像系统并不兼容，无法获取对应的荧光图像。针对基于光挡阻隔激发光的无滤波荧光显微镜，通过结合相干照明和瞳孔平面空间滤波，能够实现无光谱滤波器的全光谱荧光显微成像。采用偏振滤波减弱了荧光强度，但增强了荧光与散射光的对比度。实验结果



(a) 荧光图像

(b) 复合图像

图 7 牛肺动脉内皮细胞的全光谱荧光图像和复合图像

Fig. 7 Full-spectrum fluorescence images and composite images of bovine pulmonary artery endothelial cells

表明, 本研究展示的显微镜在无需滤光器的情况下, 仍可实现全波段荧光成像, 其适用于成像强荧光信号的低散射样本, 该方案的光学系统配置简易, 能够与现有显微镜系统相结合使用。但由于散射过程中的去极化效应, 无法完全滤除散射光, 在弱荧光成像实验中, 聚焦平面若有相对较强的散射光, 则无法实现荧光图像的获取。因此, 后续可以结合一些光谱分离算法, 将得到的图像进行光谱分离, 进一步提高图像对比度, 以应用于更广泛的领域。

参考文献:

- [1] 张浩, 戴博, 张大伟. 面向细胞显微成像的虚拟染色技术的研究[J]. 光学仪器, 2023, 45(1): 18–24.
- [2] PAWLEY J B. Fundamental limits in confocal microscopy[M]//PAWLEY J B. Handbook of biological confocal microscopy. Boston, MA: Springer, 2006: 20–42.
- [3] BRODEUR A, CHIN S L. Ultrafast white-light continuum generation and self-focusing in transparent condensed media[J]. *Journal of the Optical Society of America B*, 1999, 16(4): 637–650.
- [4] GAETA A L. Nonlinear propagation and continuum generation in microstructured optical fibers[J]. *Optics Letters*, 2002, 27(11): 924–926.
- [5] HUSAKOU A V, HERRMANN J. Supercontinuum generation, four-wave mixing, and fission of higher-order solitons in photonic-crystal fibers[J]. *Journal of the Optical Society of America B*, 2002, 19(9): 2171–2182.
- [6] PAULSEN H N, HILLIGSE K M, THØGERSEN J, et al. Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with a photonic crystal fiber based light source[J]. *Optics Letters*, 2003, 28(13): 1123–1125.
- [7] MCCONNELL G. Confocal laser scanning fluorescence microscopy with a visible continuum source[J]. *Optics Express*, 2004, 12(13): 2844–2850.
- [8] GRANT D M, ELSON D S, SCHIMPF D, et al. Optically sectioned fluorescence lifetime imaging using a Nipkow disk microscope and a tunable ultrafast continuum excitation source[J]. *Optics Letters*, 2005, 30(24): 3353–3355.
- [9] KVACH M V, STEPANOVA I A, PROKHORENKO I A, et al. Practical synthesis of isomerically pure 5-and 6-carboxytetramethylrhodamines, useful dyes for DNA probes[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2009, 20(8): 1673–1682.
- [10] CHEN J H, LIU W M, ZHOU B J, et al. Coumarin-and rhodamine-fused deep red fluorescent dyes: synthesis, photophysical properties, and bioimaging in vitro[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2013, 78(12): 6121–6130.
- [11] UNRUH J R, GOKULRANGAN G, WILSON G S, et al. Fluorescence properties of fluorescein, tetramethylrhodamine and Texas red linked to a DNA Aptamer[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2005, 81(3): 682–690.
- [12] REYNOLDS D M. The principles of fluorescence[M]//COBLE P G, LEAD J, BAKER A, et al. Aquatic Organic Matter Fluorescence. New York: Cambridge University Press, 2014: 3–34.
- [13] BORN M, WOLF E. Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light[M]. 7th ed. Elsevier, 2013.
- [14] WOLLESCHEFSKY R, ZIMMERMANN B, KEMPE M. High-speed confocal fluorescence imaging with a novel line scanning microscope[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2006, 11(6): 064011.
- [15] BARBER K, MALA R R, LAMBERT M P, et al. Delivery of membrane-impermeant fluorescent probes into living neural cell populations by lipotransfer[J]. *Neuroscience Letters*, 1996, 207(1): 17–20.
- [16] MINAMIKAWA T, SRIRATANA A, WILLIAMS D A, et al. Chloromethyl-X-rosamine (MitoTracker Red) photosensitises mitochondria and induces apoptosis in intact human cells[J]. *Journal of Cell Science*, 1999, 112(14): 2419–2430.

(编辑: 张磊)