光电技术及应用

DOI：10.16818/j.issn1001－5868.2022041301

罗丹明 B 的飞秒双光子荧光显微成像研究

张　宁[1,2]，侯国忠[3]，邓岩岩[1,2]，张　泽[1,2]，
张德林[1,2]，王雨雷[1,2]，吕志伟[1,2]，夏元钦[1,2*]

（1. 河北工业大学 先进激光技术研究中心，天津 300401；2. 河北省先进激光技术与装备重点实验室，天津 300401；
3. 哈尔滨工业大学 可调谐激光技术国家重点实验室，哈尔滨 150080）

摘　要： 利用宽带飞秒振荡器作为激发光源搭建了双光子荧光显微成像系统，在飞秒脉冲的宽带激发下，测量了罗丹明 B 溶液的双光子荧光光谱，开展了罗丹明 B 固体样品的双光子荧光显微成像研究。在双光子荧光显微成像研究中，通过调节激发脉冲的功率，分析了双光子荧光强度和激发脉冲功率之间的关系，并且利用半波片改变线偏振激发光场的偏振方向，研究了双光子荧光强度随激发脉冲偏振方向的变化趋势，实现了双光子荧光强度的类正弦调制。

关键词： 宽带激发；双光子荧光显微成像；罗丹明 B；类正弦调制

中图分类号： O437　**文章编号：** 1001－5868(2022)05－1005－06

Research on Femtosecond Two-Photon Fluorescence Microscopy of Rhodamine B

ZHANG Ning[1,2], HOU Guozhong[3], DENG Yanyan[1,2], ZHANG Ze[1,2],
ZHANG Delin[1,2], WANG Yulei[1,2], LV Zhiwei[1,2], XIA Yuanqin[1,2]

(1. Advanced Laser Technology Research Center, Hebei University of Technology, Tianjin 300401, CHN;
2. Hebei Key Laboratory of Advanced Laser Technology and Equipment, Tianjin 300401, CHN;
3. State Key Laboratory of Tunable Laser Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150080, CHN)

Abstract: With broadband femtosecond (FS) oscillator as the excitation light source, a two-photon fluorescence (TPF) microscopy imaging system was built. Under the broadband excitation of FS pulses, TPF spectrum of Rhodamine B solution was measured and TPF microscopy imaging study of solid Rhodamine B samples was performed. In the study of TPF microscopy, the relationship between TPF intensity and excitation pulses power was analyzed. Besides, the trend of the two-photon fluorescence intensity with the polarization direction of the excitation pulse was studied through changing the polarization direction of the linearly polarized excitation light field by using a half-wave plate, and the sinusoidal-like modulation of the two-photon fluorescence intensity was realized.

Key words: broadband excitation; two-photon fluorescence microscopy; Rhodamine B; sinusoidal-like modulation

0　引言

基于双光子荧光现象的双光子荧光显微成像是非线性光学显微成像的重要分支之一，它具有成像对比度高、3D 分辨率性能优异的优势[1]。相比于单光子荧光显微成像，双光子荧光显微成像具有更低的光毒性和更深的成像深度，这些优点使得双光子荧光显微成像技术在荧光显微成像领域扮演着重要角色，并且广泛应用于生物医学研究[2-4]。

1990 年，Denk 发明了第一台双光子荧光显微镜[5]。经过三十多年的发展，双光子荧光显微成像

收稿日期：2022－04－13.
基金项目：国家自然科学基金项目(61675057)；河北省自然科学基金资助项目(F2021202055).
* **通信作者：**夏元钦　**E-mail：** xiayq@hebut.edu.cn

技术在很多方面得到了优化和发展，这项成像技术越来越成熟和完善，尤其是在高速成像、深度成像和超分辨率成像方面。首先，在成像速度方面，成像速度的提升可以捕捉活体成像中的动态进程，通过优化双光子荧光显成像系统的扫描单元可以很大程度提升成像速度[6-8]。相比于传统的单光束扫描双光子荧光显微成像系统，采用多光束系统的双光子荧光显微成像系统可以成倍提升成像速度[9,10]，高动态范围的光电倍增器件的应用也能够明显提升成像速度[11]；成像深度的提升可以在不破坏生物组织的情况下，对组织深度位置进行成像，采用长波长光源对样品进行激发是实现双光子荧光显微成像系统成像深度的主要途径[12]。除了这种长波长激发的途径，长波长探测的方法也可以提升成像深度[13]，通过调节和优化激发光束直径，并提取浸没物镜的浸没液体来增加成像深度[14]。成像空间分辨率的提升可更清晰观察样品的微观结构，Cheng 等在 2014 年将双光子荧光显微成像的横向分辨率和纵向分辨率分别提升到 168 nm 和 1.22 μm[15]。自适应光学双光子荧光显微成像被提出来[16,17]，可以实现近衍射极限的亚微米轴向分辨率，利用多重阶次的贝塞尔光束产生优化的扫描激光光束也可以在一定程度上提升分辨率[18]。除了成像指标的提升，双光子荧光显微成像还被应用于多模式光学显微成像[19-21]，同时探测多个目标分子，从而提供更多关于样品的微观信息。

本文介绍了利用飞秒振荡器作为激发光源的双光子荧光显微成像系统，利用宽带的飞秒脉冲对罗丹明 B 分子的双光子荧光信号进行激发，测量了罗丹明 B 溶液的双光子荧光光谱，开展了固体罗丹明 B 样品的双光子荧光显微成像研究，在双光子荧光显微成像研究中，通过调节激发脉冲的功率，分析了双光子荧光强度和激发功率之间的关系。利用半波片改变线偏振激发脉冲的偏振方向，研究了双光子荧光强度随激发脉冲偏振方向的调制趋势。

1 双光子成像系统

实验中搭建的双光子荧光成像系统如图 1 所示，在完成双光子荧光显微成像的同时，还测量了样品的双光子荧光光谱。

成像系统采用钛蓝宝石飞秒激光振荡器（Mai Tai，Spectra-Physics）作为激发光源，飞秒激光振荡器输出的激光脉冲（中心波长 800 nm，脉宽 40 fs，半高宽 60 nm，重频 42 MHz，550 mW，水平偏振）经 2∶8 分束片分为两束，功率较弱的反射脉冲经过焦距为 200 mm 的透镜聚焦在盛有罗丹明 B 溶液的比色皿上，用于激发罗丹明 B 溶液的双光子荧光光谱。在比色皿的侧向对罗丹明 B 溶液产生的双光子荧光光谱进行采集，以减少激发背景产生的干扰，利用焦距为 50 mm 的透镜将侧向出射的双光子荧光聚焦在光谱仪（Kymera 328i-B2，Andor）的光纤头之上，经光纤传到光谱仪之中，由深度制冷的 iCCD（iStar，Andor）进行探测，探测到的双光子荧光光谱由控制电脑显示和记录；而功率较高的透射脉冲经过可调的中性密度功率衰减片，调节至合适的功率，经过包含 X 轴扫描镜和 Y 轴扫描镜的扫描振镜（GVSM002，Thorlabs）以及焦距为 97 mm 的扫描透镜，注入到倒置显微镜（Olympus，IX71）中，经过焦距为 175 mm 的管透镜后，由物镜（Olympus，40/0.65 160/0.17）聚焦在罗丹明 B 固体样品之上，用于激发罗丹明 B 分子的双光子荧光信号。扫描透镜和管透镜的透镜组合可以实现激光光束在小角度扫描过程中不偏离物镜的数值孔径，成像过程中对样品反射形成的后向双光子荧光信号进行探测，在显微镜中内置合适的二向色镜（Chroma，680dcspxr）可实现透射激发脉冲的同时反射双光子荧光信号，从而实现双光子荧光信号与激发背景分离。选取出来的双光子荧光信号再经过显微系统配置的滤波片组合（NC212066-ET670sp 及 BP580-70K）后，选取双光子荧光信号中特定的波长成分，由光电倍增管（R3896，Hamamatsu）进行探测，实现

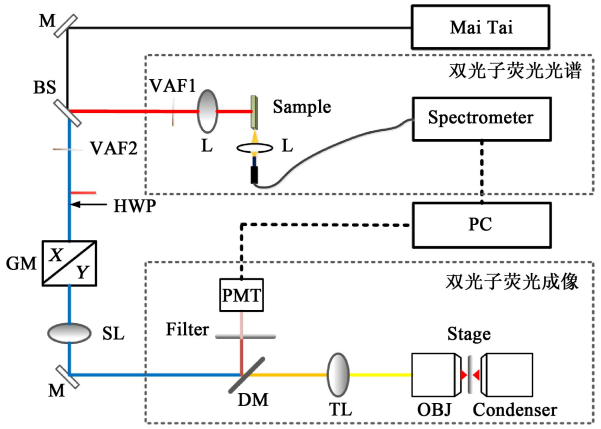


图 1 双光子荧光显微成像系统示意图。BS：分束片；HWP：半波片；VAF：可调衰减片；M：反射镜；GM：扫描振镜；X-/Y-Mirror：X/Y 轴扫描镜；SL：扫描透镜；DM：二向色镜；TL：管透镜；OBJ：物镜；PMT：光电倍增管；PC：控制电脑

双光子荧光显微成像。在开展双光子荧光显微成像研究时，还在激发光路中选择性地插入半波片（@808 nm，Thorlabs），通过旋转半波片，改变半波片光轴与激发脉冲偏振方向的角度，调节激光脉冲的偏振方向，以研究激光脉冲偏振方向对罗丹明 B 样品的双光子荧光强度的调制趋势。

罗丹明 B 样品具有高荧光特性，已用作双光子荧光显微成像样品[13,22]。实验中分别选用罗丹明 B 溶液和罗丹明 B 固体作为双光子荧光光谱测量和双光子荧光显微成像的样品。在配制罗丹明 B 溶液时，以无水乙醇作为溶剂，取少量罗丹明 B 粉末于容量瓶中，滴加足量的无水乙醇至罗丹明 B 粉末完全溶解，取适量溶液至比色皿，用于测量罗丹明 B 溶液的双光子荧光光谱；在制作罗丹明 B 固体样品时，首先以蒸馏水为溶剂配制过饱和罗丹明 B 溶液，适当摇匀，使未溶解的罗丹明 B 粉末均匀悬浮在过饱和溶液中，再取适量溶液滴在盖玻片上，在溶剂（蒸馏水）蒸发后，罗丹明 B 粉末随机分布在盖玻片上。

2　双光子荧光光谱及显微成像

2.1　双光子荧光光谱

本文中介绍的双光子荧光显微成像系统可以同时实现罗丹明 B 溶液的双光子荧光光谱的测量和罗丹明 B 固体样品的双光子荧光显微成像。以罗丹明 B 溶液为样品，双光子荧光光谱的测量能够验证飞秒振荡器输出的飞秒宽带脉冲可以有效激发样品的双光子荧光信号，并可以验证双光子荧光显微成像系统选取的滤波系统可以在有效抑制激发背景的同时，有效滤波出罗丹明 B 固体样品产生双光子荧光信号。

飞秒振荡器出射的宽带脉冲光谱如图 2 中的蓝色实线所示，光谱经过归一化处理，可见输出光谱中心波长为 800 nm，半高宽为 60 nm，波长成分覆盖 750～850 nm。利用可调衰减片（VAF1）调节比色皿前宽带脉冲的功率为 80 mW，在此宽带光谱的激发下，测得罗丹明 B 溶液的双光子荧光光谱如图 2 中的红色实线所示。同样经过归一化处理，荧光光谱覆盖 550～700 nm，可见飞秒振荡器输出的宽带飞秒激光脉冲可有效激发罗丹明 B 分子的双光子荧光信号，成像系统采用的探测窗口如图 2 中的黑色虚线所示，探测窗口包含双光子荧光光谱的峰值波长，覆盖 570～610 nm，如此的探测窗口设置可有效抑制激发背景，并探测双光子荧光光谱中强度较强的波长成分，从而实现较高的成像对比度。

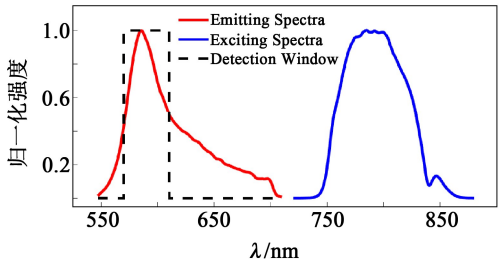


图 2　飞秒振荡器的输出光谱（蓝色实线）、罗丹明 B 的发射光谱（红色实线）和成像系统的探测窗口（黑色虚线）

2.2　双光子荧光显微成像

通过目镜观察到成像范围内罗丹明 B 样品如图 3(a)所示。由于罗丹明 B 粉末随机地分布在载玻片上，视野中罗丹明 B 样品的厚度和密集程度可大致分为 4 个级别，对应的典型区域如图 3(a)中 R1，R2，R3，R4 标记区域所示。其中区域 R1 为样品中气泡，含有极少量的罗丹明 B 或者几乎不存在罗丹明 B；区域 R2 的样品颜色比区域 R1 的样品颜色稍微深一些，相应的罗丹明 B 相较区域 A 有所增加；而区域 R3 则有较多的罗丹明 B 聚集，凝聚成片状的罗丹明 B 样品；最后，区域 R4 具有最多的罗丹明 B，对应的样品厚度也比区域 R3 的样品更厚。因此，就罗丹明 B 密集程度而言，区域 R1 小于区域 R2 小于区域 R3 小于区域 R4。图 3(a)中所示样品的双光子荧光显微成像结果如图 3(b)所示，宽带激发脉冲在显微镜入口处的功率为 30 mW，图中成像结果包含 900×900 像素点，对应样品尺寸 270 μm×270 μm，搭建的成像系统采用振镜作为扫描单元，可以实现微秒级单像素停留时间，单帧成像结果采集时间在 5 s 左右。

在图 3(b)所示的成像结果中，可以明显观察到区域 R1，R2，R3，R4 位置的罗丹明 B 样品激发出了不同强度的双光子荧光信号，而且双光子荧光信号水平呈现出区域 R1 小于区域 R2 小于区域 R3 的变化，这和样品中罗丹明 B 分布是一致的。但是区域 R4 激发出的双光子荧光信号水平要略微低于区域 R3 中的信号水平，这是因为在区域 R4 中样品厚度更厚且罗丹明 B 更密集，双光子荧光信号不易穿透样品，从而不能被探测到，导致双光子荧光信号水平降低，这种现象可以通过切换成长波长的探测窗口来改善[10]。

为了研究双光子荧光强度与激发功率之间的关

系，调节成像光路中的可调衰减片(VAF2)，将激发脉冲的功率依次调节为 20，30，40，50，60，70，80，90，100 和 110 mW。在不同激发功率下，对图 3(a)所示样品进行双光子荧光显微成像。其中 90 和 110 mW 激发功率下的双光子荧光显微成像结果如图 3(c)、(d)所示，随着激发功率的升高，成像对比度有明显的提升。在成像结果中随机选三个目标像素点，分别标记为 A，B 和 C，如图 3(b)所示。在不同激发功率下，三个目标像素点的双光子荧光强度变化趋势如图 3(e)所示。图中离散的三角形、圆圈和五角星分别对应像素点 A，B 和 C。可以看到，随着激发功率的提升，三个像素点的双光子荧光信号均有明显的升高。利用二次函数拟合三个目标像素点的信号强度变化，拟合结果同样呈现在图 3(e)中，由图可见拟合曲线和双光子荧光强度呈现出一致的变化趋势，有效地说明了双光子荧光信号的二阶非线性光学本质，其强度与激发功率的平方呈线性关系。

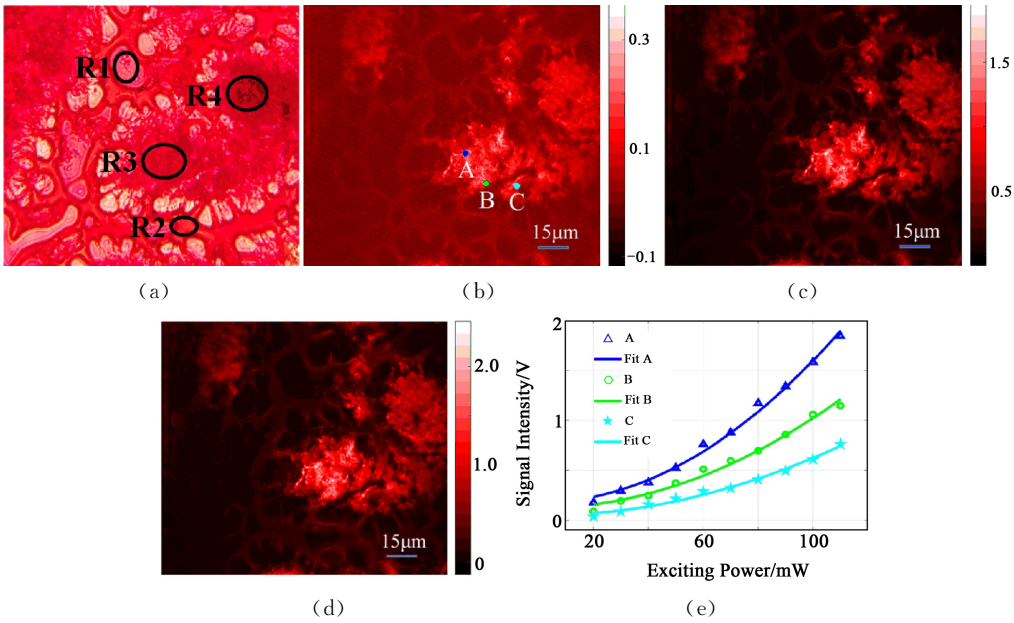


图 3 (a)成像区域样品图片(目镜观测)；(b～d)激发功率分别为 30，90 和 110 mW 时，图 3(a)所示样品的双光子荧光显微成像结果；(e)在不同激发功率下，图 3(b)中像素点 A 的双光子荧光强度(蓝色三角形)及拟合曲线(蓝色曲线)，像素点 B 的双光子荧光强度(绿色圆圈)及拟合曲线(绿色曲线)，像素点 C 的双光子荧光强度(浅蓝色五角星)及拟合曲线(浅蓝色曲线)

为了研究激发脉冲的偏振特性对双光子荧光强度的影响，激发脉冲功率在显微镜入口处的功率调节为 100 mW，并在成像光路中插入半波片(HWP)。由于激发脉冲为水平方向的线偏振光，其偏振方向可以通过调节半波片实现改变。比如，当激发脉冲偏振方向与半波片光轴的夹角为 θ，激发脉冲经过半波片，偏振方向产生 2θ 角度的旋转。因此，可以通过旋转半波片改变其光轴位置和角度，调节激光的偏振方向。为方便叙述和讨论，半波片光轴为水平方向，即与激光脉冲的偏振方向重合时，其角度定义为 0°，在 0°位置。激光脉冲经过半波片，偏振特性不发生改变。为了确定该 0°位置，调节半波片角度，使双光子荧光显微成像结果中双光子荧光强度与未插入半波片时最为接近，此时即是半波片光轴的 0°位置。随后在 0°～350°范围内旋转半波片，旋转步长为 10°，采集固体罗丹明 B 样品在不同半波片光轴角度下的双光子荧光显微成像结果。其中，半波片光轴角度为 0°，40°，70°及 100°时，对应的双光子荧光显微成像结果如图 4(a)～(d)所示。

选取 D，E，F 三个像素点作为目标像素点，如图 4(a)所示。半波片光轴角度在 0°～350°范围改变时，D，E，F 三个目标像素点的双光子荧光强度随半波片光轴角度的变化曲线如图 4(e)所示。可以看出，通过调节半波片光轴角度，进而改变激发脉冲偏振方向，实现了双光子荧光强度的调制，三个目标像素点的双光子荧光强度均出现类正弦的近周期性变化趋势。随着半波片光轴角度在 0°～350°范围内变化，D，E，F 三个像素点的双光子荧光强度曲线均出现均匀分布的四个峰值和谷值，双光子荧光强度的近周期性变化表现出 90°的调制周期。这也可以得

到合理的解释：当半波片光轴角度为 0°时，激发脉冲经过半波片，其偏振方向并不发生改变。当半波片的光轴由 0°调节至 90°，此时半波片光轴与激发脉冲偏振方向的夹角为 90°。激发脉冲经过半波片，其偏振方向发生 180°旋转，依旧是水平方向的线偏振光。可见半波片的光轴角度每旋转 90°，激发脉冲的偏振方向并未发生改变，对罗丹明 B 分子的激发不会产生影响，对应的双光子荧光强度也不会发生改变。因此，双光子荧光强度随半波片光轴角度的变化曲线会出现调制周期为 90°的近周期性变化趋势。

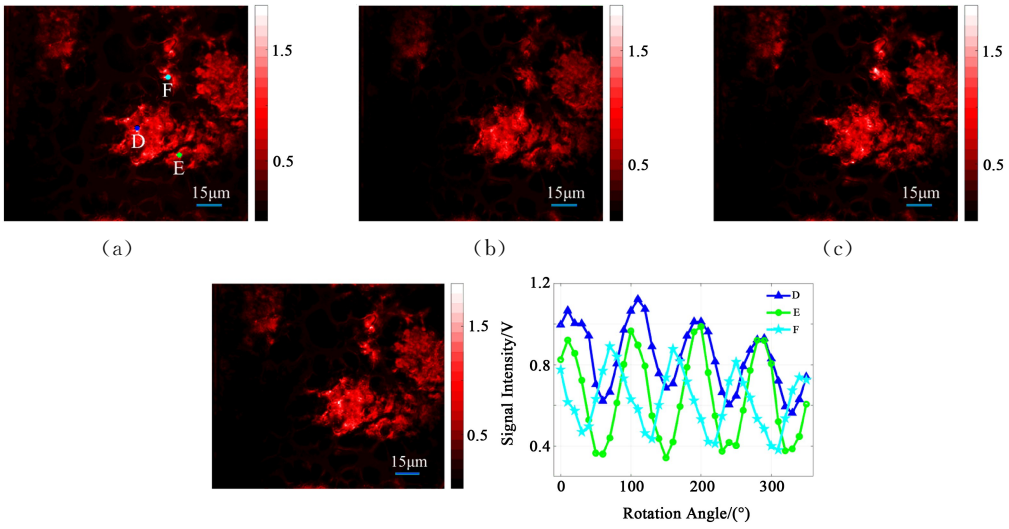


图 4　(a～d)半波片光轴角度分别为 0°，40°，70°及 100°时，图 3(a)所示样品的双光子荧光显微成像结果；(e)在不同半波片光轴角度下，图 4(a)中像素点 D，E，F 的双光子荧光强度曲线

不过，在图 4(e)中，D，E 和 F 三个像素点的双光子荧光强度变化曲线并未表现出严格的周期性。一部分原因是在利用 PMT 测量双光子荧光信号的过程中，有一定程度的噪声影响。并且，固体罗丹明 B 样品在较长时间的激光照射和激发下，会出现轻微的光漂白现象，这种现象也会影响双光子荧光强度变化曲线的周期性。在实验中也观察到样品轻微的光漂白现象，比如，在 D，E 和 F 三个像素点的双光子荧光强度变化曲线中，三条强度曲线的四个峰值强度呈现轻微的下降趋势，尤其以像素点 D 表现明显。

3　结论

本文介绍了基于飞秒脉冲宽带激发的双光子荧光显微成像系统，选取罗丹明 B 作为样品，测量了罗丹明 B 溶液的双光子荧光光谱，开展了固体罗丹明 B 样品的双光子荧光成像，完成了不同激发功率和不同偏振光场激发下的双光子荧光显微成像。成像结果表明，双光子荧光强度随激发功率的变化和二次函数拟合呈现出一致的变化趋势，有效地说明了双光子荧光信号的二阶非线性光学本质；在不改变激发脉冲激发功率的情况下，通过调节激发脉冲的偏振方向，双光子荧光强度得到类正弦的周期性调制，激发脉冲的偏振特性是双光子荧光激发效率的重要影响因素。

参考文献：

[1] Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy [J]. Nature Methods, 2005, 2(12): 932-940.

[2] Bird D, Gu M. Two-photon fluorescence endoscopy with a micro-optic scanning head[J]. Opt. Lett., 2003, 28(17): 1552-1554.

[3] Flusberg B A, Jung J C, Cocker E D, et al. In vivo brain imaging using a portable 3.9? gram two-photon fluorescence microendoscope[J]. Opt. Lett., 2005, 30(17): 2272-2274.

[4] König K, Riemann I, Ehlers A, et al. In vivo multiphoton tomography of skin cancer[J]. Proc. SPIE, 2006, 6089: 118-124.

[5] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy [J]. Science, 1990, 248 (4951): 73-76.

[6] Kim K H, Buehler C, So P T C. High-speed, two-photon scanning microscope[J]. Appl. Opt., 1999, 38(28): 6004-6009.

[7] Ota K, Oisi Y, Suzuki T, et al. Fast scanning high optical invariant two-photon microscopy for monitoring a large neural network activity with cellular resolution[J]. bioRxiv, 2020: doi. org/10. 1101/2020. 07. 14. 201699.

[8] Sakaki K D R, Podgorski K, Dellazizzo Toth T A, et al. Comprehensive imaging of sensory-evoked activity of entire neurons within the awake developing brain using ultrafast AOD-based random-access two-photon microscopy [J]. Frontiers in Neural Circuits, 2020, 14: 33.

[9] Cheng A, Gonçalves J T, Golshani P, et al. Simultaneous two-photon calcium imaging at different depths with spatiotemporal multiplexing[J]. Nature Methods, 2011, 8 (2): 139-142.

[10] Tsai Y H, Liu C W, Lin W K, et al. Two-photon microscopy at ＞500 volumes/second[J]. bioRxiv, 2020: doi. org/10. 1101/2020. 10. 21. 349712.

[11] Ching-Roa V D, Olson E M, Ibrahim S F, et al. Ultrahigh-speed point scanning two-photon microscopy using high dynamic range silicon photomultipliers [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 1-12.

[12] Kobat D, Horton N G, Xu C. In vivo two-photon microscopy to 1. 6-mm depth in mouse cortex[J]. J. of Biomedical Optics, 2011, 16(10): 106014.

[13] Hou G, Dong Z, Zhang S, et al. TPF imaging of Rhodamine B at different detection windows[J]. Modern Phys. Lett. B, 2019, 33(23): 1950268.

[14] Yamaguchi K, Kitamura R, Kawakami R, et al. In vivo two-photon microscopic observation and ablation in deeper brain regions realized by modifications of excitation beam diameter and immersion liquid[J]. Public Library of Science (PLOS), 2020, 15(8): e0237230.

[15] Cheng L C, Lien C H, Da Sie Y, et al. Nonlinear structured-illumination enhanced temporal focusing multiphoton excitation microscopy with a digital micromirror device[J]. Biomedical Opt. Express, 2014, 5(8): 2526-2536.

[16] Ye S, Yin Y, Yao J, et al. Axial resolution improvement of two-photon microscopy by multi-frame reconstruction and adaptive optics[J]. Biomedical Opt. Express, 2020, 11(11): 6634-6648.

[17] Qin Z, He S, Yang C, et al. Adaptive optics two-photon microscopy enables near-diffraction-limited and functional retinal imaging in vivo[J]. Light: Science & Applications, 2020, 9(1): 1-11.

[18] He H, Kong C, Chan K Y, et al. Resolution enhancement in an extended depth of field for volumetric two-photon microscopy[J]. Opt. Lett., 2020, 45(11): 3054-3057.

[19] Pope I, Langbein W, Watson P, et al. Simultaneous hyperspectral differential-CARS, TPF and SHG microscopy with a single 5 fs Ti：Sa laser[J]. Opt. Express, 2013, 21 (6): 7096-7106.

[20] Rakhymzhan A, Reuter L, Raspe R, et al. Coregistered spectral optical coherence tomography and two-photon microscopy for multimodal near-instantaneous deep-tissue imaging[J]. Cytometry Part A, 2020, 97(5): 515-527.

[21] Xu D, Liang S, Xu L, et al. Widely-tunable synchronisation-free picosecond laser source for multimodal CARS, SHG, and two-photon microscopy[J]. Biomedical Opt. Express, 2021, 12(2): 1010-1019.

[22] Wang S, Qin Y, Guo M, et al. High speed 3D two-photon fluorescence microscopy by femtosecond laser pulses[C]// LIDAR Imaging Detection and Target Recognition 2017 Inter. Society for Optics and Photonics, 2017, 10605: 106053J.

作者简介：

张　宁(1996－)，男，山东省济南市人，硕士研究生，主要研究方向为非线性光学显微成像；

夏元钦(1968－)，男，博士，教授，博士生导师，主要从事飞秒激光及应用研究。