

双光子激光扫描荧光显微镜及其应用*

陈德强 夏安东¹⁾ 王克逸¹⁾ 黄文浩¹⁾

(中国科学技术大学精密机械与精密仪器系 合肥 230026)

摘要 文章对双光子激光扫描荧光显微镜的原理及其应用进行了综述.双光子激光扫描荧光显微镜的本征的空间三维成像特性广泛应用于生命科学、半导体和三维高密度数据存储及其微细加工的研究.

关键词 双光子激光扫描荧光显微镜(TPLSM),共焦,三维

TWO-PHOTON LASER SCANNING FLUORESCENCE MICROSCOPY
AND ITS APPLICATIONS

CHEN De-Qiang XIA An-Dong WANG Ke-Yi HUANG Wen-Hao

(Department of Precision Machinery and Instrumentation, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Abstract The principle of two-photon laser scanning fluorescence microscopy and its applications are reviewed. Its intrinsic three-dimensional spatial resolution has been widely exploited in the life sciences, semiconductor technology, optical data storage and lithographic microfabrication.

Key words two-photon laser scanning fluorescence microscopy, confocal, three-dimension

1 引言

近年来,光学显微镜技术中的一个最引人注目的成就是双光子激发现象(two-photon excitation,简称TPE)在共焦激光扫描显微镜(confocal laser scanning microscopy,简称CLSM)中的广泛应用^[1].随着飞秒激光技术和光学显微镜技术的发展,现在人们已经能够比较容易地制造并使用双光子共焦激光扫描显微镜(two-photon laser scanning microscopy,简称TPLSM),对样品在双光子激发后发出的荧光进行观察和三维成像.

目前,双光子共焦激光扫描显微镜已成为半导体制造和检测、生物学、医学研究和三维高密度存储及其微细加工的重要工具,为开拓新学科和促进科学研究领域向更高层次发展起到了非常重要的作用.利用双光子共焦激光扫描显微镜的特点揭示了许多新现象和新规律.本文拟对这一技术的原理、特点和应用进行综述.

2 双光子激发原理简介

在激光照射下,基态荧光分子或原子吸收一个光子后成为激发态,随后又弛豫到某一基态,同时以光子形式释放能量而发出荧光.这一过程就是通常的单光子激发情况.1931年, Maria Göppert-Mayer 预言一个分子或原子可以在同一个量子过程中,同时吸收两个光子而成激发态,这种情况就是双光子激发过程^[2].1961年, Kaiser 等在 $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ 晶体中首次观察到了这种双光子激发现象^[3].图1简单地描述了这种双光子激发的过程.比如在单光子激发情形,NADH 酶在 350nm 的光激发下产生 450nm 的荧光,而在双光子激发情形,NADH 酶则需同时吸收两个 700nm 的光子才能产生 450nm 的荧光.这就是说,双光子技术可以使我们无需使用紫外光源

* 国家自然科学基金和国家教委留学回国人员科研启动基金资助项目

1999-06-04 收到初稿,1999-08-27 修回

1) 中国科学技术大学理化中心选键化学实验室客座人员

就能达到检测紫外荧光探针的目的.由于双光子激发所产生的荧光强度与激发光的光强平方成正比,因而与单光子激发的线性过程相比,双光子激发就需要很强的激发光强,这就使双光子激发具有很高的空间局域特点.图2是单、双光子激发所产生的荧光形貌.从图2可以看出,由于单光子激发的线性过程,在整个激发光路里的样品都由于激发而发出荧光,而对于双光子激发而言,只有在焦点处的微小区域内样品才能吸收足够的双光子而发出荧光.将双光子激发的这一特点应用到 CLSM 而产生的 TPLSM,可以获得比单光子 CLSM 更清晰的三维荧光图像.另外,在此基础上发展起来的三光子激发(荧光分子同时吸收3个光子)的 LSM 也越来越显示出其重要的特点,它具有比 TPLSM 更高的空间局域性^[5],因而具有更高的空间分辨率.

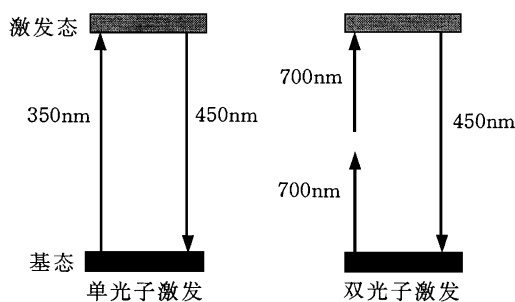


图1 单、双光子激发过程示意图



图2 单、双光子激发所形成的荧光形貌
(样品为罗丹明 B 的水溶液,上为单光子激发,下为双光子激发)

3 材料的吸收截面 δ

吸收截面 δ 是双光子激发现象的重要参数,它的大小反映了分子吸收双光子的本领.对单光子激发中的吸收截面 δ 已有较为准确的文献记载,而对双光子乃至多光子吸收截面 δ ,目前尚缺乏全面、准确的记载.因此,对常用的荧光分子多光子吸收截面 δ 和光谱的进一步研究,将有助于多光子激发共焦激光扫描荧光显微镜的进一步广泛应用.

采用适当阶数的混沌理论可以对多光子吸收截面 δ 做一简单估算^[5].显然,多光子激发要求两个或多个光子被分子同时吸收,因而多光子的吸收截面主要取决于激发光的空间和时间的相干特性.一个分子的“横截面积” A 可由它的偶极跃迁矩来估算.对偶极跃迁矩为 $10^{-8} - 10^{-9} \text{ cm}$ 的分子,典型的 A 值为 $10^{-16} - 10^{-17} \text{ cm}^2$.光子符合的时间尺度由虚拟中间态的持续时间 $\Delta \tau$ 决定,由测不准原理可估计 $\Delta \tau \approx 10^{-16} \text{ s}$,因此,由 $A^2 \Delta \tau$ 得双光子激发吸收截面 δ 大约为 $10^{-49} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} / \text{光子}$.相应地,由 $A^3 (\Delta \tau)^2$ 得三光子激发吸收截面 δ 大约为 $10^{-82} \text{ cm}^6 \cdot \text{s} / \text{光子}^2$.由于在多光子激发过程中,仅有一小部分光子被吸收,所以直接测量多光子吸收截面 δ 往往很困难.为了便于应用,表1列出了几种常见荧光分子的吸收截面 δ 的值^[5].对于一个 n 光子的激发过程,荧光分子的荧光强度正比于 $\delta_n I_{\text{ex}}^n \tau$,因而由表1可见,在相同的激发光强 (I_{ex}) 下,双光子激发吸收截面 δ_2 和三光子激发吸收截面 δ_3 比单光子激发吸收截面 δ_1 要小得多.因此,多光子激发要求的入射光强比单光子激发大得多.

表1 几种常见荧光分子的单光子、双光子和三光子的吸收截面^[5]

荧光分子	$\delta_1 (\lambda/\text{nm})$ / 10^{-16} cm^2	$\eta \delta_2 (700 \text{ nm})$ / $10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s}$ /光子	$\eta \delta_3 (700 \text{ nm})$ / $10^{-83} \text{ cm}^6 \cdot \text{s}^2$ /光子 ²
DAPI free	1.3 (345 nm)	0.16	0.25
Dansyl	0.17 (336 nm)	1	0.3
Fura - 2 + Ca^{2+}	1.2 (335 nm)	12	30
Fura - 2 free	1.0 (362 nm)	11	20
Indo - 1 + Ca^{2+}	1.3 (340 nm)	1.5	6
Indo - 1 free	1.3 (345 nm)	3.5	2

* 表中数据是在 10^{-4} mol/L 的溶液中测得的, η 是荧光分子的荧光量子效率

4 共焦激光扫描荧光显微镜原理

共焦激光扫描荧光显微镜技术的发展是光学显微镜技术的一次革命^[6,7].它是以光学系统的共焦成像为基础,利用光扫描技术和样品扫描技术对样品进行三维动态测量的装置.它利用激光作为光源,在光学设计时,采用共轭焦点(共焦)技术,使光源、被照物点和探测器处在彼此对应的共轭位置.光源经物镜在样品内聚焦成衍射极限的光点,其荧光(或反射光)再次通过物镜或聚光镜到达空间滤波器的共焦针孔内,由靠近针孔后面的探测接收器接受信号.通过扫描聚光点在样品内的位置对样品进行三

维成像.图3为共焦激光扫描荧光显微镜的原理图.它的关键技术是共焦小孔(pinhole)的引入.由于共焦小孔的存在,探测器只接收来自物镜焦点处的信息,焦点以外的光将全被共焦小孔屏蔽.因而共焦激

光扫描显微镜要比常规光学显微镜的分辨率要高些,且图像清晰度也有所增强.而且正是由于共焦小孔的存在使之具有三维成像的特点,这是常规光学显微镜所不能比拟的.

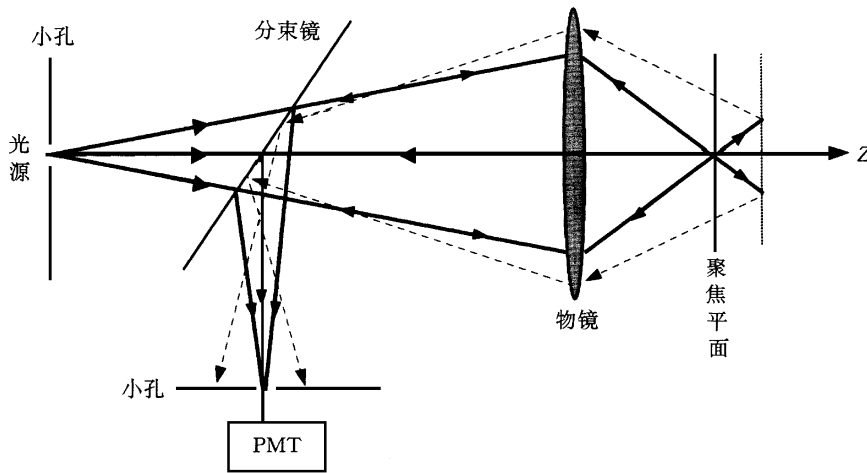


图3 共焦荧光显微镜原理图

自共焦激光扫描显微镜诞生以来,其应用大多集中在生物医学领域.其特点主要体现在样品的反射荧光的观察中.这是因为:(1)反射荧光与常规显微镜相比更容易得到高清晰度和高分辨率的三维图像;(2)便于保持理想的共焦光学系统,移动试样和进行三维扫描.但是在多光子激发应用到共焦激光扫描显微前,由于光损害、光降解、光漂白等原因,以及显微镜本身复杂的紫外光学元件的限制,共焦激光扫描显微镜不能得到更广泛的应用,其特点和潜力没有完全发挥出来.

的双光子吸收强烈地与激发光强的平方相关,因而在紧聚焦的条件下,双光子吸收仅局域于物镜焦点处的空间体积 $\sim \lambda^3$ 的小范围内,使人们可以或甚至不使用共焦小孔,就能得到高清晰的三维图像,使共焦显微镜的设计大为简化,易于操作.这是多光子激发的一大优势.图4是双光子激发共焦激光扫描荧光显微镜的配置图.

1990年,美国康奈尔大学 Denk 等人提出将双光子激发现象应用到共焦激光扫描荧光显微镜中^[1],从而为共焦激光扫描显微镜的更广泛应用开辟了道路.双光子激发共焦激光扫描荧光显微镜较好地克服了单光子激发共焦激光扫描荧光显微镜的缺点,而且有着较高的空间分辨率.由同时吸收2个以上的光子组成的多光子激发激光扫描荧光显微镜超过了常规的单光子共焦荧光显微镜的分辨极限.目前,多光子激发共焦激光扫描荧光显微镜已引起了各国学者的广泛注意和兴趣.

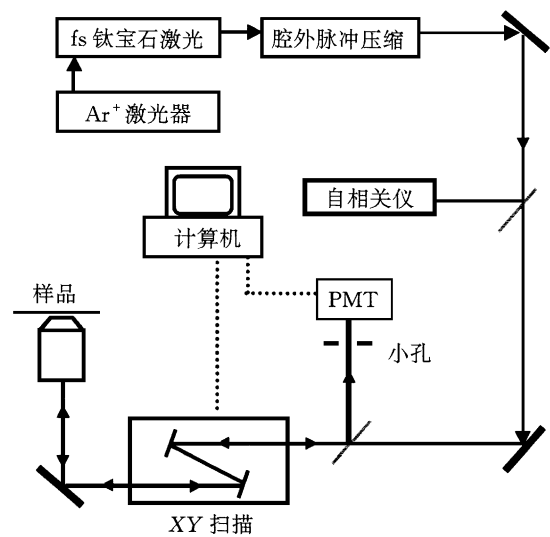


图4 常见的双光子激发共焦激光扫描荧光显微镜的配置图

同常规的单光子激发共焦激光扫描荧光显微镜相比,双光子共焦激光扫描荧光显微镜光源多采用锁模的飞秒钛宝石激光器以得到足够强的激光,保证对样品进行双光子激发.考虑到显微镜内复杂的光学元件对飞秒脉冲的影响,可以在光路中插入腔外脉冲压缩器,对超快激光在物镜焦点处的脉冲展宽和脉冲畸变进行优化和压缩^{8,91}.另外,由于材料

5 双光子激发共焦激光扫描荧光显微镜的特点

正如前述,在单光子激发情况下,荧光波长比激发波长长,而且荧光量子效率与入射光强度成正比,

同时,在透过样品的整个激发光路上都产生了单光子激发现象.另外,在生物医学研究中,为了获得足够精度的数据,以进行定量分析,用作标记的荧光剂或试样本身的激发和荧光波长往往在紫外和近紫外波段.比如 NADH 酶的荧光峰为 450nm,且必须用 350nm 的激光激发.然而,这种波长的紫外光对生物组织常常是有害的.同时,在研究生物体组织的荧光成像时,人们有时必须使用 250—300nm 的激发光,这就要求使用复杂的紫外波段的物镜和紫外光学元件,这给实验带来很大的麻烦.

而对于双光子激发过程,因为每个双光子事件都必须有两个光子同时被吸收,所以可以用温和的红外或近红外激光来激发通常吸收紫外或远紫外波段的荧光分子.例如对 NADH 酶,可用 700nm 的激光来激发得到 450nm 的荧光.这样用较长波长的光来激发样品,可以避免紫外光对样品的伤害和使用复杂的紫外光学元件的许多限制.同时可以延长对活体生物样品的观察时间,这为研究氨基酸、蛋白质和神经递体(neurotransmitter)等提供了独特而重要的方法.

另外,红外激光具有相对较深的传播距离,使得双光子激发共焦激光扫描荧光显微镜可对浑浊的样品表面以下较深($>200\mu\text{m}$)处进行成像观察^[10].而且由于荧光波长比入射的激光波长短得多,所以由瑞利和拉曼散射导致的背景干扰可以忽略,这样就可以进行极其灵敏的测量,如单个分子的检测^[11]和少量荧光标记的神经递体的检测^[4].

同时,使用功率几十毫瓦,脉宽为飞秒量级的锁模钛宝石激光器作为激发光源,可以比较容易产生强度足够强的激光.且在物镜焦点处的激光强度与束腰距离的平方成正比,双光子激发过程被紧紧局域在焦点附近的很小区域(体积数量级为 λ^3),如此小的有效作用体积不仅使双光子荧光显微镜具有极其优越的空间分辨率,而且为在亚微米尺度上进行三维定位的光化学反应^[12]和三维高密度数据存储及其微细加工^[13-18]提供了前所未有的强大工具.

6 双光子共焦激光扫描荧光显微镜的应用

TPLSM 自 1990 年诞生以来已被广泛地应用于生命科学、半导体、化学、医学领域和三维高密度存储及微细加工的研究.由于篇幅所限,这里只作简单介绍,读者可以从近年来已发表的大量文献中获得有关 TPLSM 应用的信息.

6.1 钙离子通道的观察

钙离子作为第二信使具有重要作用,它能通过依赖于钙的蛋白激酶使蛋白质磷酸化,并可以调节其他离子的细胞通透性.目前尚不清楚 Ca^{2+} 离子进入细胞内储存与作用的部位,对神经元中钙离子的研究已成为神经生物学中越来越重要的课题.在电流脉冲的刺激下,钙离子的浓度发生变化,打开钙离子通道,细胞膜或其内部结构释放出钙离子.对钙离子作标记后,钙离子浓度的变化表现为荧光的强弱.康奈尔大学的 Webb 及其合作者^[19]研究了不同细胞钙离子释放的动力学情况,获得了毫秒量级下钙离子浓度的变化的图像.贝尔实验室的 Svoboda 等人^[10]研究了活体大脑皮层神经元细胞内的钙离子动力学情形.对活老鼠大脑作标记后,拨弄老鼠的胡须以产生刺激,观察到发生在大脑细胞神经元间突触的活动,成像深度可深达大脑表面下 $240\mu\text{m}$.他们发现在特定区域的钙离子数与钠离子作用电势成正比,而且钙离子数在最近的枝状体顶端处最大,随着离开触发肌体的距离而急剧下降,从而证明了钙离子的增加依赖于由肌体触发的钠离子作用电势.

6.2 三维高密度存储及微细加工

现代社会是信息社会.飞速发展的信息技术产生了大量的信息,也带来了如何存储它的问题.从某种意义上说,存储技术是信息技术发展的瓶颈.现有的密度最高的存储技术是以光盘为代表的光存储方法.传统的二维光存储方法使用可见光或红外光,在衍射极限内可以实现大约 $10^8\text{bits}/\text{cm}^2$ 的数据密度存储.1989 年,美国科学家 Rentzepis 教授提出了一种三维 bit 数据存储的方法^[13],存储密度高达 $10^{12}\text{bits}/\text{cm}^3$.这种方法主要是在现有二维光盘的基础上将数据存储扩展到三维空间.由于这种方法保持了现有光盘系统的基本特点,易于操作.随着半导体激光的快速发展,三维高密度存储是目前科学界和工业界最为看好的一个发展方向.由于前述双光子激发具有有效作用体积小特点,避免了层与层间的相互干扰,极大地提高了数据存储密度.目前,在共焦激光扫描显微镜基础上发展起来的利用双光子激发现象实现三维高密度数据存储的方法有多种^[13-18].这些方法都是利用超快激光与材料的相互作用后形成的折射率变化(或者荧光的变化)来实现光学数据的存储.由于它容易与现有的旋转圆盘(如光盘)式存储技术兼容,从而为利用现有技术大规模开发和生产这种三维高密度存储设备提供了技术上的可行性,具有开阔的研究和应用前景.

另外,利用双光子激发具有高度局域的特点还可用来实现三维任意方向的微细加工.由于在紧聚焦的条件下,双光子吸收仅局域于焦点处的空间体积 $\sim \lambda^3$ 的小范围内,化学和物理过程就发生在这一局域的体积内,这一局域的体积内的材料吸收双光子后,材料就会变成液体或气体,或收缩或膨胀,以及发生其他可能的变化,而焦点外的其他区域则不发生任何变化.正是由于这一重要作用,人们可以利用通过移动焦点在样品内的位置来进行三维任意方向的微细加工(microfabrication)和海量光学数据存储的工作.Cumpston及其合作者^[9]利用双光子激发的方式成功地制造出具有独特光学特性的光子带隙(photonic bandgap, PBG)材料,重复周期为 $1\mu\text{m}$.同时还加工出锥型波导管,其截面积从 $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ 变化至 $2\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$.其制造原理是利用材料在双光子激发下发生双光子诱导聚合(two-photon-initiated polymerization, TPIP)现象,导致材料溶解度的变化.事先根据需要的三维形状,利用经物镜聚焦的激光点对材料进行三维扫描,激光点扫到的位置,其材料的溶解度提高,将其溶解掉就得到了所需形状的物体.这种方法与常规的2.5维的微细加工不同^[20],它是真正的三维任意方向上的微细加工新方法,它开辟了三维微细加工的新途径.图5为他们利用双光子激光扫描荧光显微镜得到的一些三维微细结构图.

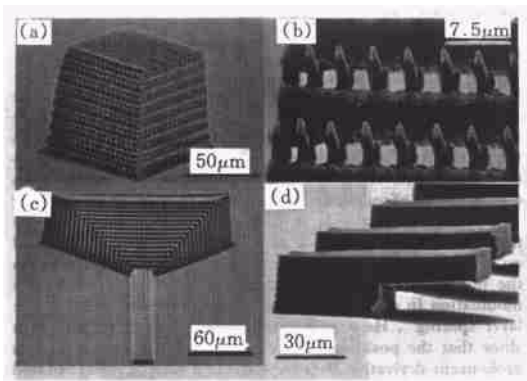


图5 利用双光子微细加工方法得到的三维微细结构图
(a) PBG结构;(b)为(a)图放大的顶视图;(c)锥形波导管;
(d)悬臂结构阵列

7 结束语

双光子共焦激光扫描显微镜已延伸到各个研究和应用领域.它能对处在自然状态下的样品进行三维无损观察,并能提高系统的分辨率和信噪比.利用双光子激发后材料性质的变化,还可以实现三维高度数据存储和三维任意方向的微细加工,具有很高的应用价值.可以相信,随着与双光子共焦显微镜相关的机械、材料、激光技术等进一步发展,双光子共焦激光扫描显微镜将得到更大的发展和更广泛的应用.

参 考 文 献

- [1] Denk W, Webb W W, Strickler J H. *Science*, 1990, 248 : 73 — 76
- [2] Göppert - Mayer M. *Ann. Phys.*, 1931, 9 : 273 — 295
- [3] Kaiser W, Garret C G B. *Phys. Rev. Lett.*, 1961, 7 : 229 — 231
- [4] Maiti S, Shear J B, Webb W W *et al.* *Science*, 1997, 275 : 530 — 532
- [5] Xu C, Zipfel W, Shear J B *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93 : 10763 — 10768
- [6] Anderson S G. *Laser Focus World*, 1994, 30 : 83 — 86
- [7] Cannon J, Armas M. *Laser Focus World*, 1993, 29 : 99 — 104
- [8] Soller C, Cannell M B. *Eur. J. Physics*, 1996, 432 : 555 — 561
- [9] Curley P F, Ferguson A I. *Opt. Quant. Electr.*, 1992, 24 : 851 — 859
- [10] Svoboda, K, Denk W, Kleinfeld D *et al.* *Nature*, 1997, 385 : 161 — 165
- [11] Nie S, Chiu D T, Zare R N. *Science*, 1994, 266 : 1018 — 1021
- [12] Denk W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91 : 6629 — 6633
- [13] Parthenopolous D A, Rentzepis P M. *Science*, 1989, 245 : 848 — 850
- [14] Strickler J H, Webb W W. *Optics Letters*, 1991, 16 : 1780 — 1783
- [15] Kawata Y, Ueki H, Hashimoto Y *et al.* *Appl. Opt.*, 1995, 34 : 4105 — 4111
- [16] Xia A D, Wada S, Tashiro H. *Appl. Phys. Lett.*, 1998, 73 : 1323 — 1325
- [17] Xia A D, Wada S, Tashiro H. *Japan Patent*, 1998, H10 - 81598
- [18] Cumpston B H, Ananthavel S P, Barlow S *et al.* *Nature*, 1999, 398 : 51 — 54
- [19] Dixon G J. *Laser Focus World*, 1997, 33 : 77 — 82
- [20] Bustillo J M, Howe R T, Muller R S. *Proc. IEEE*, 1998, 86 : 1552 — 1574