

# 为荧光多路复用选择滤光片

Anne Souchon

Elizabeth Bernhardt, Ph.D.

Michael Delay, Ph.D.

# 摘要

近几十年来，光学薄膜沉积技术稳步发展，从而使得我们能够生产好的多波段滤光片，以满足多色荧光仪器日益增长的需求。现在，Semrock 有很多可用的目录滤光片，专为各种荧光染料而设计。但选择合适的滤光片通常是一个复杂的过程。这里，我们提出了与这种多路复用系统的设计相关的考虑。

## 介绍

在可见光和近红外光谱上，有很多和细胞相容的荧光探针可以使用，这样，我们就可以在一个实验或测定中使用多个荧光染料，同时研究多种细胞成分、分子和/或信号。由于用于这种研究的光学系统通常单次只允许检查一个光通道，因此必须扩展该系统以允许使用光多路复用，也就是说，无论是同时、顺序还是组合地采集多个探测信号中的每一个通道。

如果要达到较好的光学性能，即高的信号噪声比和低的串扰，应该使用单波段滤光片组，使用机械化手段来改变激发滤光片、二向色镜和发射滤光片，但为了提高时间分辨率，以适度降低性能为代价，可以选用多波段滤光片。本文描述了如何选择荧光的复用中使用的滤光片组。

## 荧光仪器中的滤光片

滤光片通过光谱来选择通过光学系统的光，从而可以在适当的浓度下准确地检测样品中每个荧光团的光学输出，以实现足够的灵敏度和特异性。

这反过来要求每个荧光团的效率和特异性激发、以及发射的荧光到检测器的传输率高、损耗低，同时减少对不需要的信号（背景噪声）的检测。

大多数荧光仪器使用三个滤光片的组合（图 1）。每个荧光团都有自己的激发和发射波长带。激发滤光片仅允许荧光团激发带内的有限波长范围内的光到达样品，阻挡该范围外的光以减少其他荧光源的激发，并阻挡发射带上的光。发射滤光片将来自荧光团的光在选定的发射波段上传输到检测器，并阻挡该波段之外的光，特别是任何激发光。

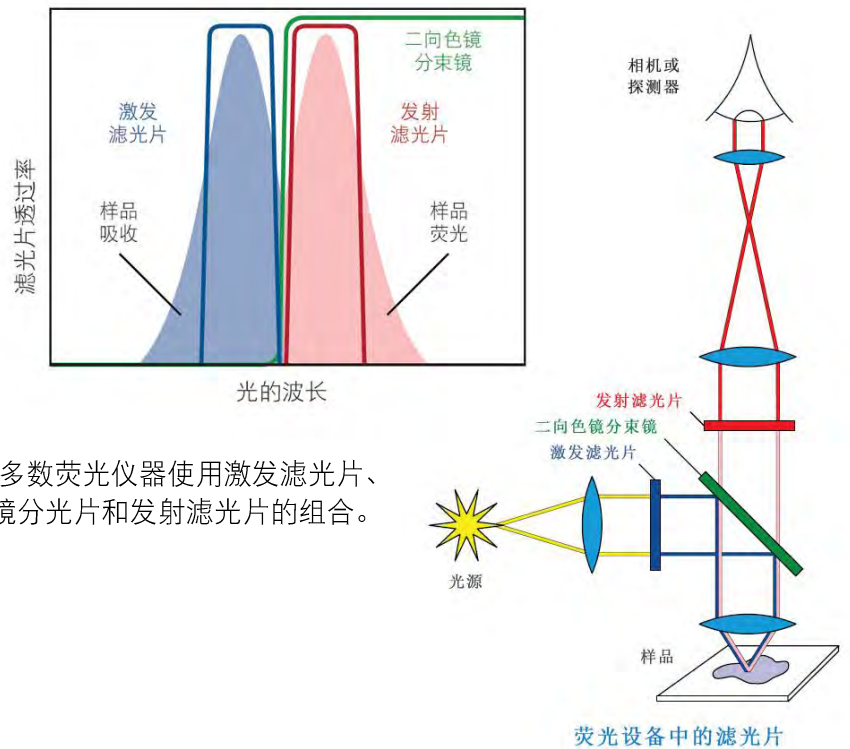


图 1 大多数荧光仪器使用激发滤光片、二向色镜分光片和发射滤光片的组合。

荧光设备中的滤光片

二向色镜分光片是以倾斜入射角定位的边缘滤光片，其有效地将激发和发射频带内的光引导到其各自的目的地。

具有适当规格的好的滤光片对于增加信号背景比值至关重要。激发滤光片应在荧光团的峰值荧光激发光谱处的通带上具有高透射率。

发射滤光片应在适当宽的发射通带上具有高透过率，并扩展带外阻挡。二向色镜分光片应该具有从高反射到高透射水平的适当短的过渡。

荧光检测系统中的滤光片组高度相互依赖。必须仔细选择每个激发滤光片 - 二向色镜分光片 - 发射滤光片，不仅要获得相应荧光团的合适结果，还要获得其他荧光团的适当结果。

由于不同的滤光片供应商在光谱性能方面有不同的标准，因此从多个滤光片供应商中选择一组滤光片需要更加谨慎，使用这种拼凑滤光片组，性能不理想。

因此，在设计阶段早期，就应该开始考虑仪器中的滤光片，同时选择荧光团并定义具有激发源、光学布局和检测器的系统架构。

## 多色检测和串扰

图 1 中的滤光片被称为单带通滤光片。在荧光多路复用中，在样品中检测多个荧光团，可以方便地将两个或多个激发或发射带组合在同一片滤光片上，从而产生多频带滤光片。

然而，当同时激发的荧光团的光谱轮廓重叠时，使用多个荧光团会引入荧光串扰（也称为“串色”），导致一个荧光团发射到不同荧光团的发射通带中，并降低检测特异性。这对于密集复用可能是不可避免的，因为许多荧光团具有宽光谱分布（例如，见图 2）。

在这种情况下，具有较窄通带的滤光片设计是好的选择。通带位置和宽度的选择是为了减少串扰而不减少总的光通量。

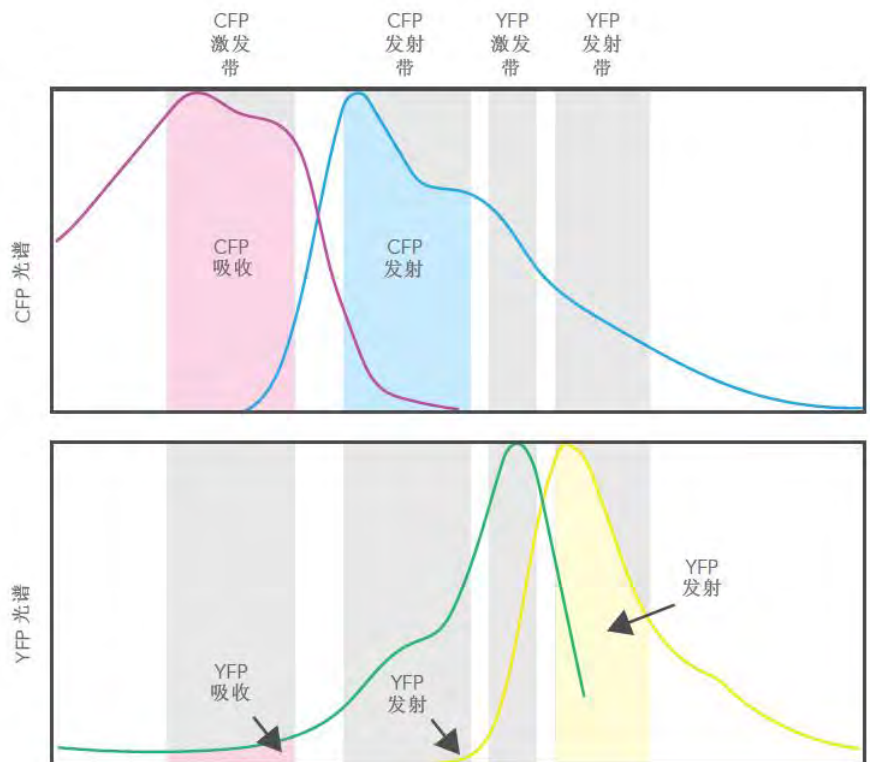


图 2 CFP 和 YFP 的光谱重叠。少量 YFP 发射会对 CFP 通道产生串扰。

## 单带与多带

多路复用情况下，单波段滤光片组为实验设计提供了方便性，通常可以实现高的信号噪声比值和低的荧光串扰，但会限制捕获完整多色图像的速率，从而影响动态样品的捕获。由于成像路径中的滤光片引起的光束方向的小变化，图像偏移会阻碍多个单色图像的精确配准。对于更高数量的荧光团，单波段滤光片还增

加了光学组件的数量和它们的总成本。

好的多带通滤光片允许快的成像而不减少图像真实性。三种类型的多带通滤光片组用于同时进行多色成像（图 3）；每个都采用多波段二向色镜分束镜。

必须使用合适的工具，对候选荧光染料、光源和检测器的预期信号、背景和串扰进行数值建模。这些品质因数可用于选择滤光片和可选的其他组件，例如荧光

为荧光多路复用选择滤光片

团和光源。简单的光谱查看器是不够的，因为它不能计算这些参数。

有人已经开发了几种这样的计算器；SearchLight™系统 [1] 是一种免费可用的替代方案。

单波段和多波段光学滤光片和滤光片组可在市场上买到。可以选择单独的滤光片来形成新的滤光片组，但需要建模来确保正确的功能。

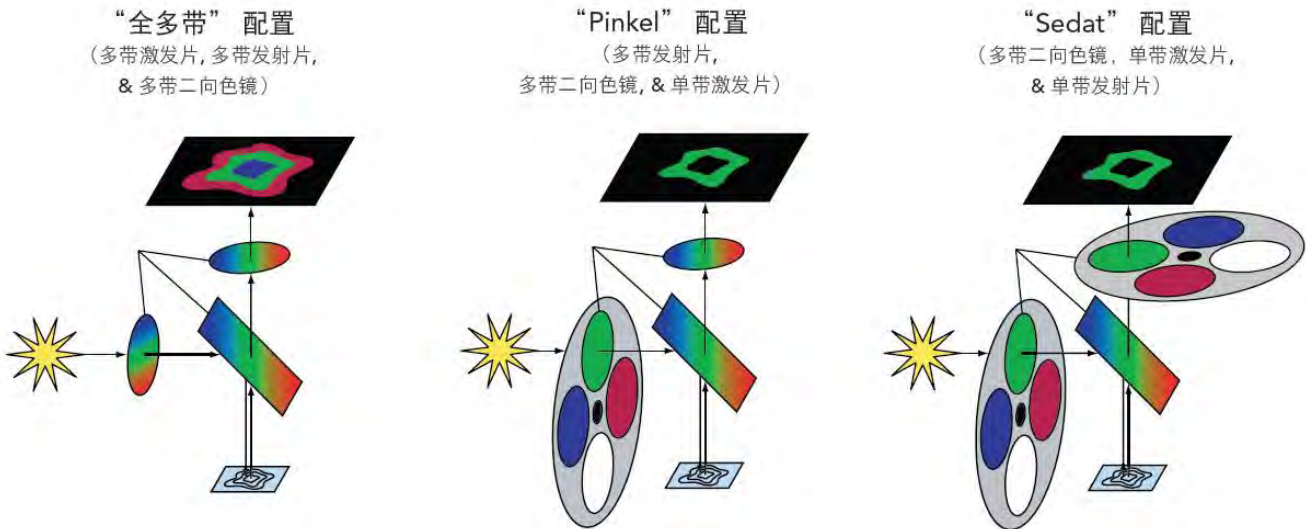


图 3 三种类型的多带通滤光片组。

## 传输、阻挡、边缘陡峭度和边缘放置

硬的溅射电介质镀膜现在是大多数滤光片供应商的标准产品。该技术与先进的沉积控制系统和先进的滤光片设计相结合，以牢靠和可重复的方式进行高度优化的复杂滤光片设计，从而提供新的更好的性能水平的滤光片，尤其是多带通滤光片。（在这方面，我们承认 H.A.Macleod 教授的贡献，1933-2021[2]。）

区分滤光片的关键规范包括通带传输透过率（T%）、阻挡带中的阻挡量（OD）、边缘陡度（Steepness）和边缘波长放置精度。

在“荧光仪器中的光学滤光片”一节末尾，描述了激发、二向色和发射滤光片在通带上的透射和在阻挡范围上的阻挡方面的好特性。

**边缘陡度**描述了在高透射和深阻挡（或二向色镜的高反射率）之间转换所需的波长间隔。

**边缘放置**是在生产批次内和生产批次之间保持光谱边缘位置的波长精度。如下面所讨论的，可以选择这两个参数来减少荧光团的激发滤光片和发射率光谱之间的串扰，并减少从一个荧光团到另一荧光团的串扰，所有这些都不会减少总吞吐量。

具有小的斯托克斯位移的荧光团，应该选择具有紧密定位的激发和发射通带的滤光片组，以更有效地激发荧光团，同时收集大部分荧光。这同样适用于光的多路复用；荧光团光谱重叠，所以紧密定位的通带在控制串扰的同时增强信号。然而，如果在生产阶段，在不同批次的滤光片上发生了这些通带的显著光谱偏移，则激发光串扰到发射的风险可能更高。

在这些情况下，需要具有陡峭边缘和精确边缘放置的好的滤光片来保持信号和背景，同时减少

串扰。从传输到阻断的快的转换，再加上对发生这种转换的波长范围的控制，即使在通带间隔很近的情况下，也能达到通带之间的深度阻断。此外，确保边缘可重复地定位在尽可能接近标称位置的地方，导致系统亮度更高，串扰低且可控。

具有高批次间一致性的精确边缘放置对于牢靠的定量分析也是至关重要的，这样每个仪器都能提供相同的结果。

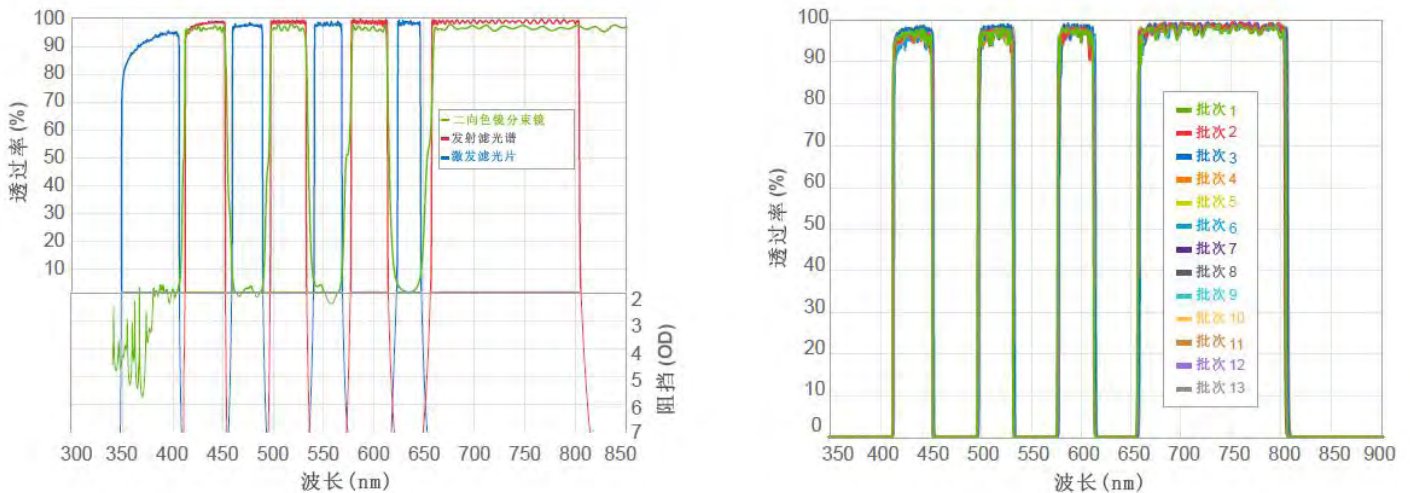


图 4 左图显示了全多色 - 四色滤光片组优化的高透过率、陡峭的边缘、通带之间深邃的阻挡。右图显示了不同批次的发射滤光片的一致性，可以减少变化，带来好性能。

## 其他注意事项

波前质量在成像应用中可能很重要，因为波前失真会通过降低对比度或降低分辨率来降低图像质量。必要时，必须选择在成像路径上具有低透射波前误差 (TWE) 和/或反射光具有低反射波前误差 (RWE) 的滤光片。有关此主题的详细讨论，请参见 [3]。

滤光片的光谱边缘随着入射角 (AOI) 的增加而向蓝色方向移动, 因此, 如果与具有特殊 AOI 值范围的光束一起使用时, 则必须评估滤光片的行为表征; 这在其光束通常具有更大范围的 AOI 值的紧凑光学系统中尤其有用。考虑这种效应可以减少不期望的光谱性能, 特别是在影响信号和噪声的二向色镜分色镜中。

必须考虑滤光片表面的外观质量, 尤其是在滤光片接近共轭焦平面的系统中。

## 结论

当设计任何荧光成像系统, 特别是具有光多路复用的系统时, 上述考虑提供了一个强有力的起点。在没有目录滤光片可用的情况下, 设计自定义滤光片时需要此信息。

## 参考文献

[1] SearchLight™

[2] Macleod, H.A., 《薄膜光学滤光片》, 第五版, CRC 出版社 (2021)。

[3] 通过使用光学滤光片, 控制波前误差, 增加先进显微镜的性能  
[www.semrock.com/Data/Sites/1/semrockpdfs/idx2678-smk-maxperf-wp.pdf](http://www.semrock.com/Data/Sites/1/semrockpdfs/idx2678-smk-maxperf-wp.pdf)