

使用 VersaChrome® 进行光谱成像

Prashant Prabhat, Ph.D.

Neil Anderson, Ph.D.

Turan Erdogan, Ph.D

索引

1. 介绍	3
2. 技术	3
3. 材料和方法	3
4. 实验结果	4
5. 结语	6
参考文献	7
作者	7
致谢	7

1. 介绍

多色荧光成像技术存在很多的研究和应用中。当在此类应用中使用的荧光团光谱重叠低时，标准滤光片组立方体（具有固定的光谱边缘）就足够了。但是，当串扰高时，光谱成像[1-4]就需要。光谱成像系统提供了波长选择的方便性。当需要使用新的荧光团组合设计实验时，这种方便性也很有用，因为在这些系统中无需更换滤光片。然而，尽管它们具有方便性，但是常规光谱成像系统很少能够提供薄膜干涉滤光片的关键优势，即结合了高透射率、具有陡峭的频谱边缘和高带外阻挡。本文概述了一种基于可调式薄膜光学滤光片的光谱成像新方法。

2. 技术

光谱成像技术的核心是 Semrock 的 VersaChrome® 滤光片技术。这些是广泛可调的薄膜光学滤光片 [5]。与标准的薄膜干涉滤光片不同，VersaChrome® 滤光片的光谱可以进行角度调整 - 滤光片的光谱随入射角的变化而变化 - 光谱的形状没有任何明显的变化。

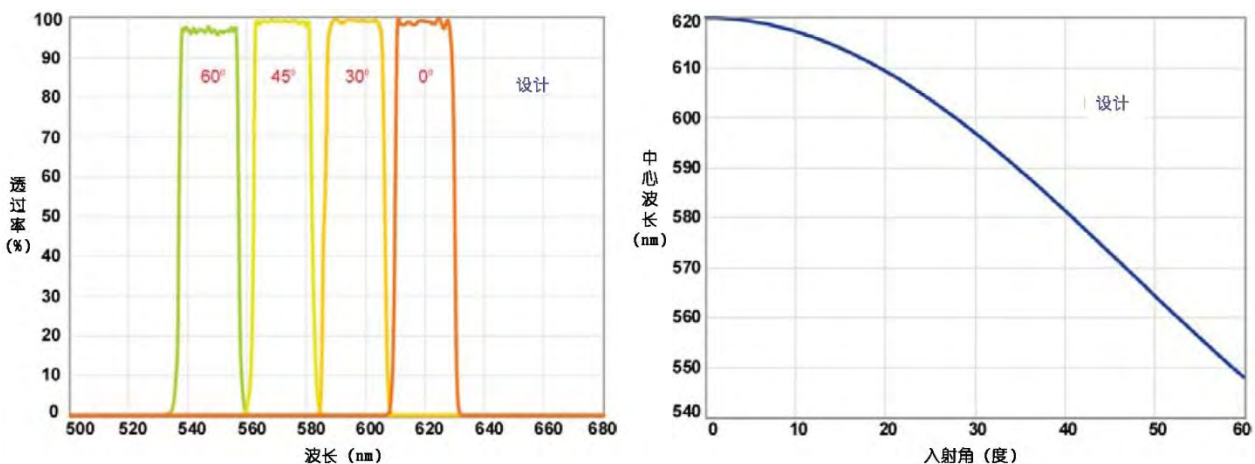


图 1: TBP01-620 / 15 滤光片在几个非常高的角度的（左）透射光谱。（右）此滤光片的 CWL 随入射角的增加而移动。FWHM 带宽保持固定为 20 nm（相当于 15 nm 保证的 GMBW）。请注意，滤光片频谱是在 0 至 60 度 AOI 范围内连续可调。

图 1 显示了 Semrock 的一种 VersaChrome® 滤光片 TBP01-620 / 15 在不同入射角 (AOI) 下的光谱曲线快照。该滤光片的 GMBW 为 15 nm，半高全宽的带宽为 20 nm。如该图所示，滤光片不仅在较高的 AOI 处保持其带宽，而且透过率、陡峭的频谱边缘和高带外阻挡（在此图中未显示）实际上保持不变。

该可调滤光片（实际上是所有 VersaChrome® 滤光片）的 CWL 由以下方程式决定，其中 n_{eff} 是薄膜涂层的有效折射率：

$$\lambda(\theta) = \lambda(0) \sqrt{1 - \frac{\sin^2(\theta)}{n_{eff}^2}}$$

在此， n_{eff} 约为 1.85。请注意，此可调滤光片的频谱是连续可调的。用的垂直入射波长的的大于 12% 的调谐范围（通过改变入射角从 0 到 60°），只有五个滤光片需要覆盖全部可见光范围。

3. 材料和方法

显微镜：用 MitoTracker Red（线粒体），AlexaFluor 568（F-肌动蛋白）和 SYTOX 橙色（细胞核）标记的 BPAE 细胞（样品由 Mike Davidson, Molecular Expressions 提供）成像。奥林巴斯 BX41 显微镜配备了 Hamamatsu ORCA C8484 相机。该显微镜的发射路径已修改为包括计算机控制的可调滤光片模块。在这种显微镜的操作的原理示于图 2 中，为了同时激发所有的样品中的荧光团，一个单一

的激发滤光片（FF01-543 / 22-25）和单边缘分色镜（FF562-Di02- 25x36）被安装在显微镜标准滤镜转盘中的滤光片组立方体中。将可调式发射滤光片 TBP01-620 / 15-25x36 放置在可调滤光片模块中，并通过改变滤光片相对于发射光束的入射角来获取一系列图像（称为 lambda 图像叠）以 1 度的角度变化为增量。

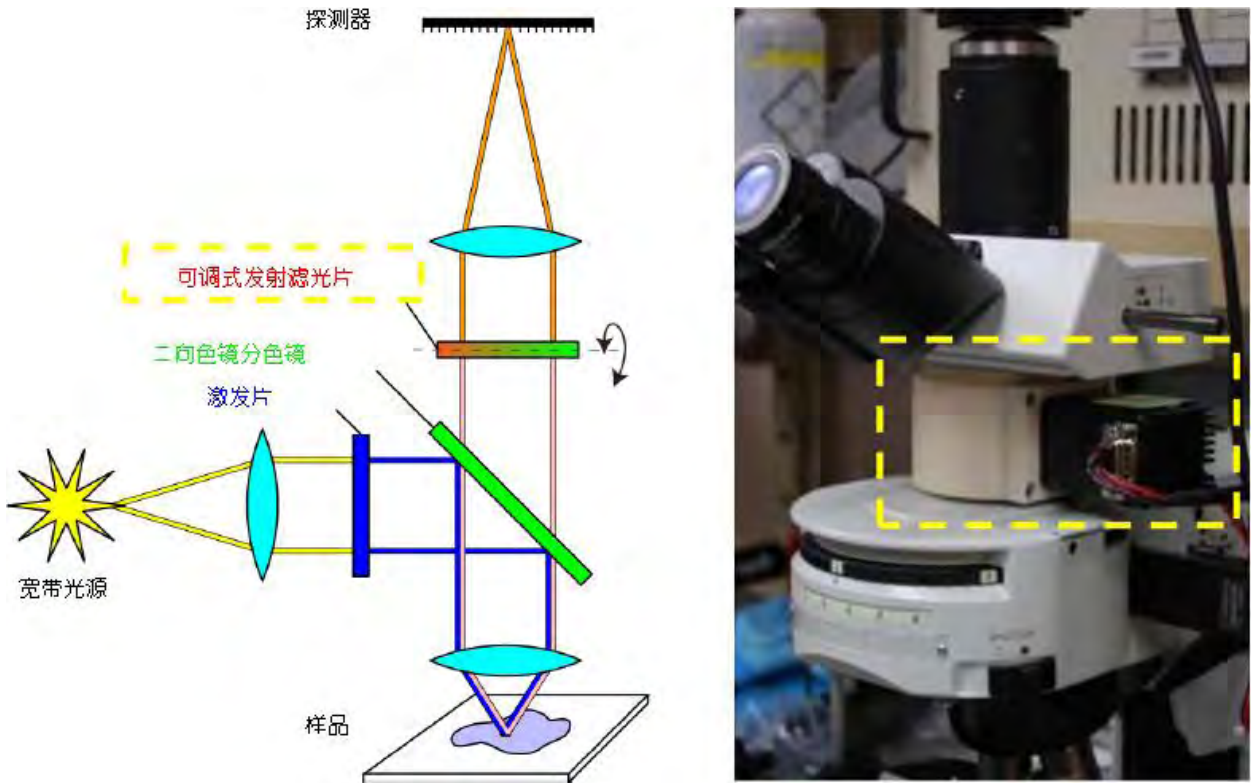


图 2：（左）本研究中使用的显微镜的工作原理。（右）对标准 Olympus BX41 显微镜的发射路径进行了修改，使其包括一个（步进）电机控制的可调滤光片模块。以 1 度为增量调整可调滤光片（TBP01-620 / 15-25x36）的入射角，以获取对应于不同波长的样本图像。可调发射滤光片的位置用虚线矩形标记。

线性分解：为了对数据进行光谱解卷积（称为线性分解，[1-4]），从 Lambda 堆栈图像中提取像素强度值，并将其排列在矩阵中。使用 MATLAB 解决了 Min 线性 Min 二乘 $\|Ax - b\|_2$ 在 x 上具有非负约束，其中 x 是在给定像素处来自每个荧光团的反卷积光谱贡献的矩阵。矩阵 A 包含与每个荧光团相对应的参考荧光团光谱（图 4），矩阵 b 包括来自 lambda 堆栈图像的给定像素的强度值。

4. 实验结果

在本研究中，通过一个示例说明了使用可调滤光片的光谱成像。使用 SemrockVersaChrome®可调滤光片采集标记有 MitoTracker®红色，AlexaFluor®568 和 SYTOX®Orange 的样品的 Lambda 叠层图像（有关详细信息，请参见材料和方法）。图 3 显示了以约 5 nm 的间隔获取的图像。

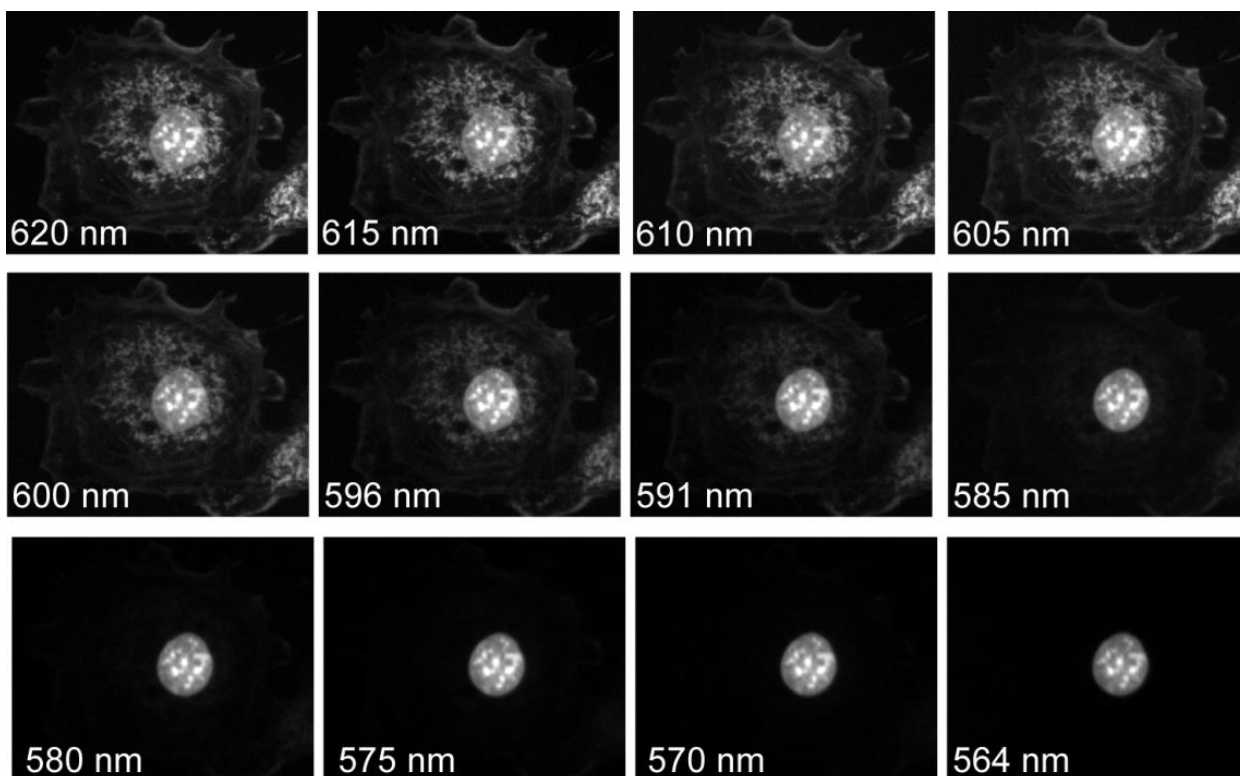
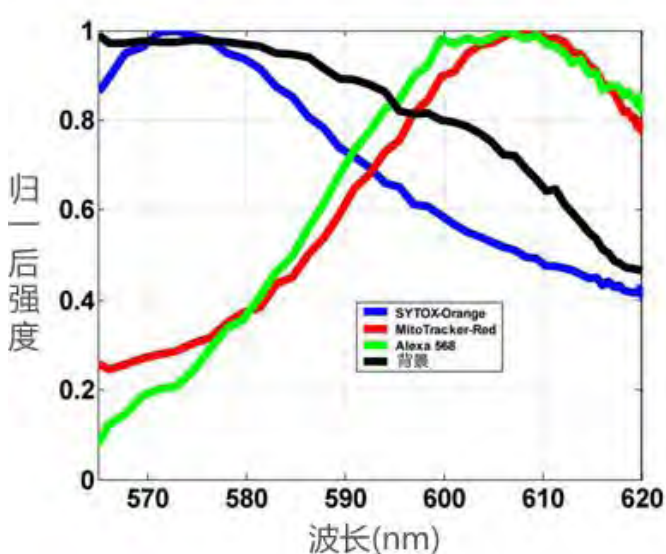


图 3: 使用可调发射滤光片采集的样品的 λ 叠层图。图像以大约 5 nm 的间隔显示 (有关相应的滤光片光谱, 请参见图 1)。标记为具有不同发射光谱的荧光团的细胞成分即使在原始数据中也可以轻松解析, 但是具有相似光谱的荧光团受益于线性解混算法。各个帧代表的物体大小约为 $47\mu\text{m} \times 38\mu\text{m}$ 。

从这些图像中可以明显看出, 用 SYTOX[®]Orange 染色的细胞核可以很容易地与其他细胞结构区分开 - 使用单个可调发射滤光片即可可视化所有荧光团。但是, 由于 F-肌动蛋白和线粒体被具有高度光谱重叠度的荧光团标记 (分别为 568 和 MitoTracker Red), 所以线性分解是区分相应细胞成分所需要的。



图四: 将每个荧光团的参考光谱绘制为对应于样品中每个荧光团的所选区域的归一化强度值。请注意, 荧光团的测量光谱可能与其理想光谱不同。这可能是由于环境条件的变化或由于实验方案的限制而发生的。还绘制了背景信号作为波长的函数

从图 3 所示的 λ 序列图像中选择代表每个荧光团的纯光谱贡献的目标区域。在图 4 中绘制了与每个荧光团相对应的归一化强度值 (经过背景调整)。这些代表参考光谱。分解算法中使用的荧光团的数量。然后将 λ -序列图像与线性解混算法 (请参阅材料和方法) 一起使用, 以得出所有荧光团的光谱去卷积图像 (图 5)。

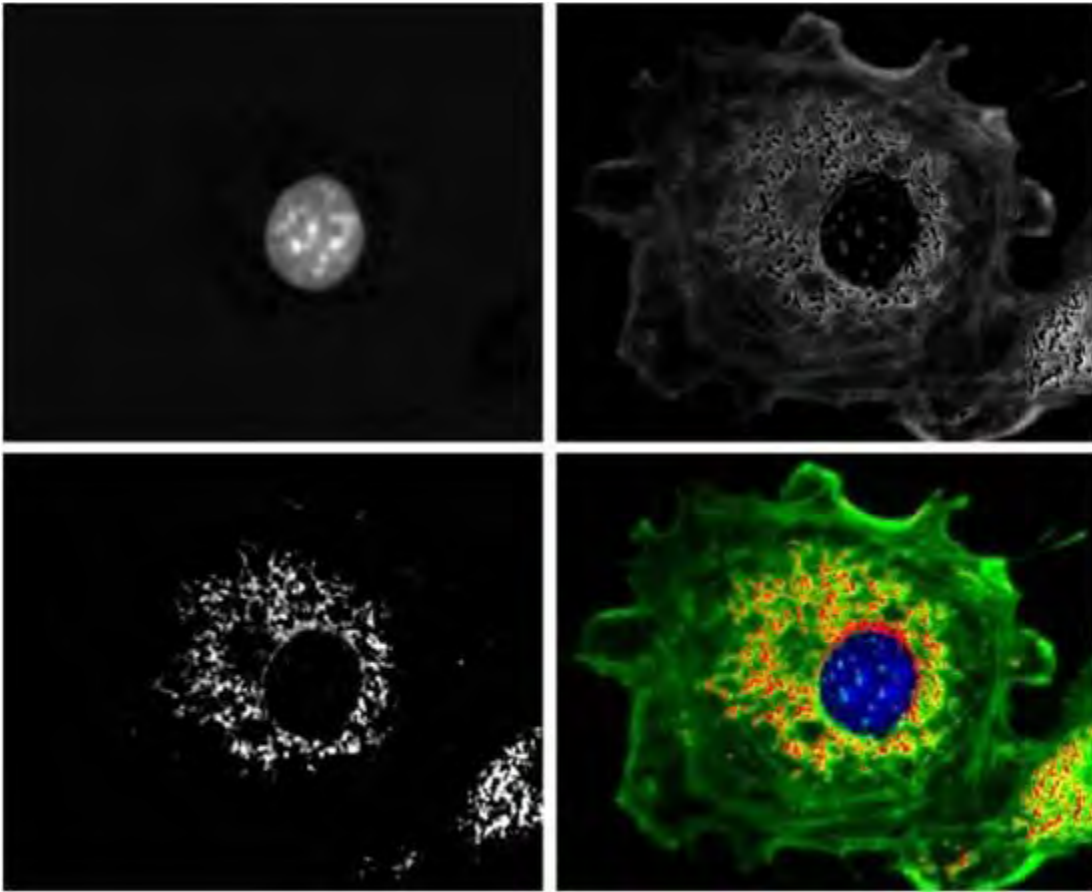


图 5: 光谱未混合的数据。灰度图像对应于用特定荧光团标记的细胞成分: 核 (左上方), F-肌动蛋白 (右上方) 和线粒体 (左下方)。底部右侧是一个颜色叠加的合成图像。各个帧代表的物体大小约为 $47\mu\text{m} \times 38\mu\text{m}$ 。

5. 结语

VersaChrome[®]滤光片可以放置在荧光仪器的激发或发射路径中, 改变滤光片相对于光束的入射角, 即可获得不同的光谱特征。另外, 值得指出的是, 这些可调滤光片的光谱特性对于光的 s 和 p 偏振几乎是相同的 - 使用液晶和声光可调滤光片[2-5]很难轻易获得这一特性。偏振是光谱成像系统非常需要的, 但是电流可调滤光片的偏振限制可能会造成损耗, 在许多光谱扫描仪器中只有一半的信号。另一方面, VersaChrome[®]滤光片不会表现出这种信号损失。因此, 这些滤光片不仅可以提高光谱成像的光通量, 而且可以大大简化仪器的复杂性[5]。

参考文献：

- [1] Visualization of Microscopy-Based Spectral Imaging Data from Multi-Label Tissue Sections, Mansfield JR, Hoyt C, Richard, RM, Current Protocols in Molecular Biology, 84:14.19.1-14.19.15
2008.
- [2] Spectral Imaging: Principles and Applications. Garini Y, Young IT, McNamara G., Cytometry A, 69(8):735-47, 2006.
- [3] Multispectral Imaging Fluorescence Microscopy for Living Cells, Hiraoka Y, Shimi T., and Haraguchi T. Cell Structure and Function, 27: 367-374, 2002.
- [4] <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/>
- [5] Semrock VersaChrome™ - the First Widely Tunable Thin-film Optical Filters, Erdogan T and Wang L, <http://semrock.com/>, 2010.

作者：

Prashant Prabhat, Ph.D., is Applications Scientist, Neil Anderson, Ph.D., is Technology Development Analyst, and Turan Erdogan, Ph.D., is co-founder and CTO of Semrock, Inc., a Unit of IDEX Corporation.
E-mail: pprabhat@idexcorp.com, Tel: (585) 594-7064; Fax: (585) 594-7095.

翻译：

Wang Qi

致谢：

Professor Mike Davidson, at Florida State University