

文章编号 1004-924X(2017)02-0319-06

单分散上转换纳米荧光微粒的荧光寿命测量

李 辉^{1*}, 桂征宇^{1,3}, 梁 永¹, 俞樟森², 吴爱国²

(1. 中国科学院 苏州生物医学工程技术研究所 江苏省医用光学重点实验室, 江苏 苏州 215163;

2. 中国科学院 磁性材料与器件重点实验室 & 功能材料与纳米器件事业部, 浙江 宁波 315201;

3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:为了表征上转换纳米荧光微粒的发光特性,设计了一个可以对单个纳米微粒进行荧光寿命测量的系统。该系统首先使用基于检流计振镜的双光子显微镜系统对单分散状态的上转换纳米微粒样品进行扫描成像。然后,通过单分子荧光纳米定位算法精确找出每个纳米微粒的准确位置,再依次将激光聚焦到每个纳米微粒上,在该点施加一个 500 μs 宽度的激光脉冲,并通过光电倍增管探测随时间变化的荧光强度信号。最后对荧光衰减曲线进行拟合,计算得到该纳米微粒的荧光寿命。实验结果表明:单个上转换纳米荧光微粒的荧光发射曲线符合单指数衰减规律,其荧光寿命为 195.3 μs 。与之相比,聚集状态的纳米微粒的荧光寿命为 358.9 μs 。这表明聚集状态对上转换纳米微粒的发光特性有显著影响。

关键词:光学显微成像;上转换纳米荧光微粒;荧光寿命;双光子显微镜

中图分类号:TH742;O561 **文献标识码:**A **doi:**10.3788/OPE.20172402.0319

Measurement of fluorescence life time of single up-conversion nanoparticle

LI Hui^{1*}, GUI Zheng-yu^{1,3}, LIANG Yong¹, YU Zhang-sen², WU Ai-guo²

(1. Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China;

2. Key Laboratory of Magnetic Materials and Devices & Functional Materials and Nanodevices, Ningbo Institute of Material Technology & Engineering, Chinese Academy of Sciences, Ningbo 315201, China;

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

* Corresponding author, E-mail: hui.li@sibet.ac.cn

Abstract: In order to characterize the photon luminescence properties of up-conversion nanoparticles (UCNPs), a system to measure fluorescence life time of single nanoparticle was established based on a custom-built two-photon microscope scanned with a pair of galvo-mirrors. First, a sample of mono-disperse UCNPs was imaged by the two-photon microscope. Then, the exact location of each nanoparticle was precisely determined through the single molecule fluorescence localization algorithm. The laser was focused on the nanoparticles one by one with a laser pulse with 500 μs duration exerted on the

收稿日期:2016-07-05;修订日期:2016-09-02.

基金项目:国家重大科学仪器设备开发专项资助项目(No. ZDYZ2013-1);国家自然科学基金委面上项目(No. 61475185, No. U1432114)

nanoparticle. A photomultiplier was employed to measure the time-lapse fluorescence intensity which varied with time. Finally, the fluorescence decay curve was fitted to calculate the life time of single nanoparticle. The experiment results show that the fluorescence curves of single nanoparticle fit with single exponential decay, and the fluorescence life time is 195.3 μs . For contrast, the life time of the bulk sample is 358.9 μs . This indicates a dramatic effect of particle aggregation on the photon luminescence properties of UCNPs.

Key words: optical microscopy; up-conversion nanoparticles; fluorescence life time; two-photon microscope

1 引言

近年来,多种荧光材料和标记方法的出现使得生物显微成像技术迅速发展^[1-2]。其中,上转换纳米荧光材料(Up-conversion Nanoparticles, UCNPs)作为新一代生物发光标记,受到了人们的广泛关注^[3]。UCNPs使用近红外激光作为激发光,可有效避免生物样品自发荧光和散射光的干扰^[4],在生物组织内具有较深的穿透力^[5]。该材料在长时间激发光照射下依然能够非常稳定地发光,无闪烁,不易光解和光漂白^[6-7];并且所选用的无机材料化学稳定性好、毒性低,在生物体内不易形成聚集^[8],因此在深度组织成像、活体小动物成像以及肿瘤治疗^[9]等领域都有着广泛的应用。

虽然 UCNPs 在生物医学成像以及材料合成方面取得了很大的进展,但是由于能级结构复杂,其荧光发射过程还不是很清楚。荧光寿命是材料荧光特性的一个重要参数,表征了材料处于激发态的平均时间以及衰减到基态的途径^[10],并且荧光寿命也受到其所处环境特性的影响。因此通过测量荧光寿命可以进行荧光样品微结构及其微环境的研究^[11-12]。

UCNPs 的特点是吸收多个长波长激发光子发射出一个短波长荧光光子,但是其吸收截面比双光子吸收高出几个数量级,主要是由于其荧光寿命较长的原因。因此定量测量和表征不同 UCNPs 的荧光寿命对改善其发光特性具有非常重要的作用。荧光寿命的测量方法从原理上可以分为频域法和时域法两种。频域法通过调制激发光,然后测量荧光与激发光的相位差以及其解调系数来计算荧光寿命^[13]。而时域法则使用短脉冲激光激发荧光样品,然后通过测量荧光的强度衰减曲线来计算荧光寿命^[14]。与频域法相比,时

域法更简单,它通过荧光衰减曲线直观体现了荧光寿命,且分析方法也比频域法更为简便^[15]。时域测量法中,时间相关单光子计数技术(Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC)作为主流方法,与扫描共聚焦显微镜结合紧密,具有准确性好、灵敏度高、系统误差小、易于弱光检测等优点^[16],但是由于 UCNPs 材料的荧光寿命较长,一般能达到数百微秒甚至毫秒量级,目前的 TCSPC 技术并不能测量这一时间量级的荧光寿命。同时,单分散状态和聚集状态的 UCNPs 材料由于微结构和微环境的不同,荧光寿命有所差异,所以需要研究一种能够对单分散状态、长荧光寿命的 UCNPs 材料进行荧光寿命测量的方法。

本文在双光子扫描显微镜^[17]的基础上,搭建了基于时域测量法的荧光寿命测量系统,对单分散状态的 UCNPs 材料进行了荧光成像和荧光寿命测量。实验证明,该系统可以很好地进行荧光成像和有效地测量荧光寿命,并且其数据直观、处理简便。

2 荧光寿命原理

单个 UCNPs 荧光分子受激发射荧光的过程能级如图 1 所示。处于基态 S_0 的电子在吸收一定能量的光子后,被激发到高能级,经过无辐射弛豫振动后,电子积累在 S_1 态,接着再通过辐射跃迁释放光子后,电子重新回到基态 S_0 。而荧光寿命就定义为光子在激发态 S_1 停留的时间,但这个时间并不能直接测量得到,只能通过荧光强度衰减曲线推理得到。荧光寿命可以定义为荧光强度衰减到初始值的 $1/e$ 时所需要的时间。

上述荧光发射过程可以使用数学模型来描述:电子从 S_1 态跃迁回低能级时,其跃迁速率和 S_1 态上积累的电子数量成正比,因此得到微分方

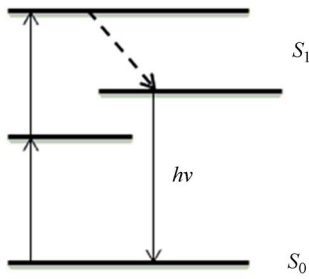


图 1 荧光能级原理图

Fig.1 Schematic diagram of energy levels of fluorescence

程式:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -aN(t), a \geq 0. \quad (1)$$

通过变换得到:

$$N(t) = N(0)e^{-at}, \quad (2)$$

其中: $N(t)$ 为电子瞬间跃迁数量, a 为比例常数。由于瞬时跃迁数量与荧光光强成正比关系,因此设荧光初始光强为 $I(0)$, 令 $a=1/\tau$, 可得到瞬时荧光光强为:

$$I(t) = I(0)e^{-t/\tau}. \quad (3)$$

当 $t=\tau$ 时, 荧光强度衰减到初始强度的 $1/e$, 参数 τ 即为荧光寿命。

3 荧光寿命测量系统的构成及工作原理

3.1 双光子扫描成像显微镜系统的构成

UCNPs 的荧光寿命测量采用自主搭建的基于检流计振镜的双光子扫描成像显微镜系统来完成。980 nm 近红外激光器 (Chameleon Vision II, 140fs, 80MHz) 作为激发光源, 首先由 1/2 波片和偏振分束器 (Polarizing Beam Splitter, PBS) 调节到合适的光强。然后使用 1/4 波片和普克尔盒实现对激光的高速开关, 开关速度的光强比达到 500 : 1。通过双检流计振镜 (Cambridge Technology, 6210H, 6215H)、扫描透镜和镜筒透镜组成的扫描系统实现对样品的二维平面扫描^[18]。实验中使用 60 倍物镜 (Nikon, Plan Apo VC 60x WI), 激发的荧光信号由同一物镜收集后通过二向色镜和滤色片后用光电倍增管 (Photomultiplier Tube, PMT) (Thorlabs, PMTSS) 采集信号。为了避免其他波段荧光对实验的影响, 滤色片包括一个 680 nm 低通滤色片和一个 500~550 nm 的带通滤色片。由

于检流计振镜的偏转角度与施加电压呈线性正比关系, 因此可将激光光束聚焦到视场内任意选择的位置进行荧光信号随时间变化的测量。实验光路图如图 2 所示。

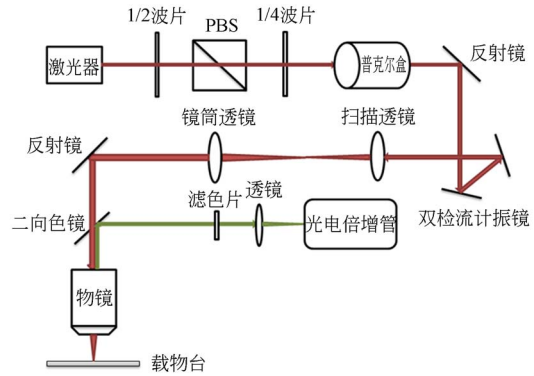


图 2 双光子扫描成像显微镜系统光路图

Fig.2 Optical path of two-photon scanning microscope

3.2 荧光寿命测量电气控制系统的构成

荧光寿命测量装置的控制系统结构框架图如图 3 所示。根据双光子显微镜的总体构成, 电气控制系统主要包括计算机中央控制单元、主机同步控制单元、X-Y 振镜扫描单元、PMT 数据采集单元、信号发生单元及普克尔盒控制单元等。

整个电气控制单元采用分布式设计, 计算机作为上位机, 负责整个控制系统的控制及监控, 主机控制器作为下位机, 接收上位机的控制命令并解析控制指令, 同步系统协调其他子单元工作。X-Y 振镜扫描系统由双检流计振镜构成, 主要实现聚焦激光对样品面的逐点遍历扫描。PMT 实现荧光信号到电信号的转换, 高速数据采集卡实

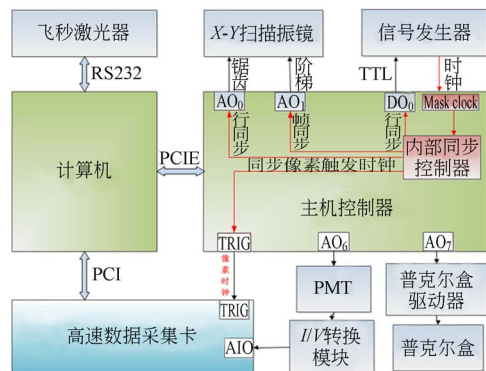


图 3 荧光寿命测量系统电气控制原理图

Fig.3 Principle diagram of electrical control for fluorescence life time measurement system

现电信号的高速采集。计算机接收数据采集卡采集的数据,进行光电信号到图像数据的转换,最终实时显示扫描图像。

3.3 单分散状态 UCNPs 材料的荧光寿命测量原理

荧光寿命测量的整个流程分为 A、B、C 3 个步骤,这里使用流程图 4 加以详细说明。

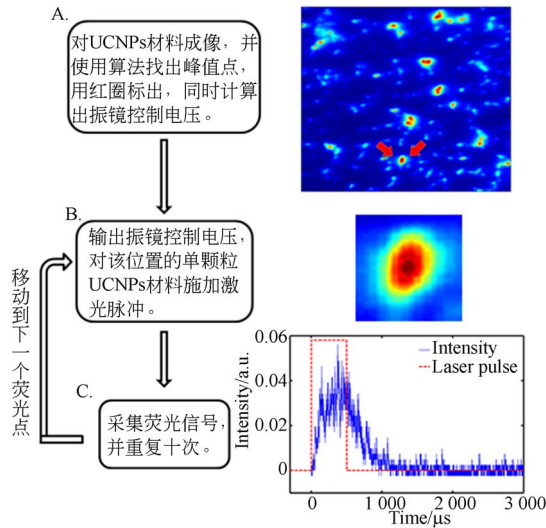


图 4 单分散 UCNPs 材料荧光寿命测量流程图

Fig. 4 Flowchart of life time measurement of single UCNPs

首先,对制作好的样品进行扫描成像,并从成像结果中找到视场中 UCNPs 材料所在的准确位置。从成像结果可以看出,荧光材料处于很好的分散状态。对找到的每个单分散的 UCNPs 的荧光强度分布进行二维高斯拟合,从而找到其准确的中心位置,再计算出此像素位置对应的检流计振镜的控制电压。

然后,通过输出电压将振镜翻转到特定角度,使激光能够聚焦在玻片上单个纳米荧光微粒的位置。接着控制信号发生器发出一个单脉冲方波信号对普克尔盒进行控制,利用普克尔盒的电光调制特性实现激光的脉冲调制,将激光调制为一个 $500 \mu\text{s}$ 的单脉冲方波,用于激发出 UCNPs 材料的荧光信号。

在单脉冲方波发出的同时,信号发生器给计算机发出一个同步信号,在同步信号的触发下,计算机控制数据采集卡开始采集 PMT 的电信号数据。数据采集卡在最高采样频率 5 MHz 的采样速度下,一共采集 $15\,000$ 个数据点后停止采集数据,即数据的采集方式为触发开始,完成采集设定的数据

后自动停止。在脉冲激光的激发下,荧光材料发出的荧光信号强度开始迅速上升,在激光信号关闭后开始衰减。通过控制数据采集卡采集合适的采样点数,记录荧光信号增长和衰减的过程,供后期数据处理。对同一个荧光点重复采集 10 组数据后取平均,便得到该点荧光发射的有效数据。

如果需要测量其他荧光点的信号,只需要调整振镜的位置,将激光聚焦在另一个荧光点,并重复步骤 B 和 C。在重复多次测量后,即可得到多个 UCNPs 的荧光寿命的统计结果。

4 实验与结果评估

由于荧光发射本身的随机特性,单次测量的结果波动较大,所以需要每个荧光微粒重复采集 10 组数据,并对这 10 组数据取平均。

实验中使用的激发光脉冲为 2 kHz ,即激光脉冲的持续时间为 $500 \mu\text{s}$ 。在 $500 \mu\text{s}$ 之后激光关闭,此时荧光强度便开始衰减,由此就得到了荧光开始衰减的准确时间点。数据采集卡的采样频率为 5 MHz ,即每个采样点的时间间隔为 $0.2 \mu\text{s}$ 。所以根据荧光开始衰减的时间点计算,舍弃采集数据的前 $2\,500$ 个点,即舍弃荧光强度的上升过程,并对余下的数据进行非线性最小二乘法的指数拟合。

曲线拟合的目的是以式(3)为数学模型来描述采集得到的数据,通过改变模型中的相关参数使计算衰减曲线 $N_c(t_k)$ 与实际测得的衰减曲线 $N(t_k)$ 尽可能符合,拟合效果可以用下式来评价:

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^n \frac{1}{\sigma_k^2} [N(t_k) - N_c(t_k)]^2, \quad (4)$$

其中: n 为数据的组数, σ_k^2 为第 k 个数据点的方差。由于所拟合的数据为 1 组,所以 χ^2 越接近于 1 ,拟合结果就越理想。

通过拟合得到衰减曲线的拟合结果如图 5 所示,蓝色曲线为荧光强度曲线,红色曲线为拟合得到的曲线,其中插图为荧光增长和衰减的全过程(彩图见期刊电子版)。拟合得到的 χ^2 为 0.9746 ,说明拟合结果理想,该荧光衰减过程符合指数衰减关系。通过计算得到该荧光微粒的荧光寿命为 $191.3 \mu\text{s}$ 。然后选取了 68 个不同区域的单个荧光微粒进行荧光寿命测量,得到的统计图如图 6 所示。

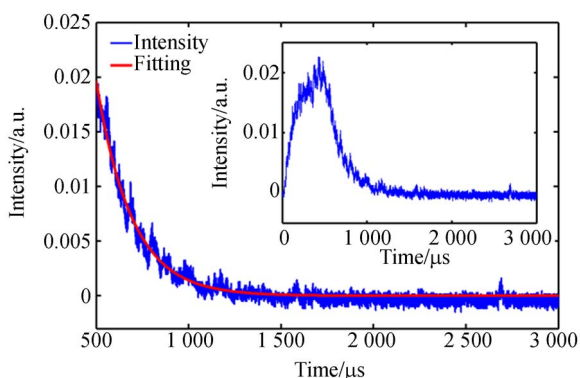


图5 单分散状态 UCNPs 材料的荧光衰减曲线

Fig. 5 Fluorescence intensity decay of typical single UCNP

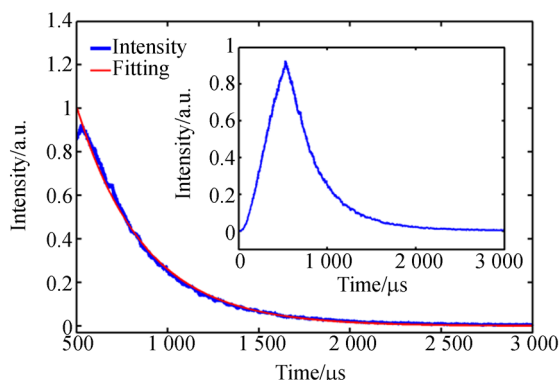


图7 聚集状态 UCNPs 材料的荧光衰减曲线

Fig. 7 Fluorescence intensity decay of bulk UCNP sample

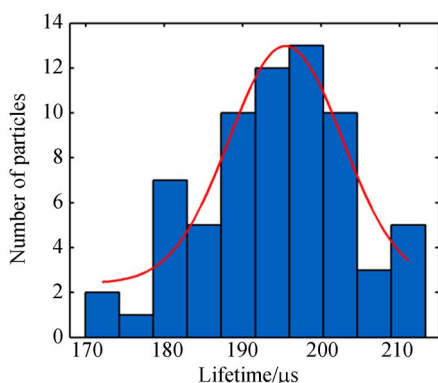


图6 多个单分散 UCNPs 微粒的荧光寿命统计图

Fig. 6 Distribution of fluorescence life time of multiple single UCNP

由图6可以看出,在此数量的统计下,荧光寿命的分布符合高斯分布。通过高斯拟合得到该荧光微粒的荧光寿命为 $195.3 \mu\text{s}$ 。

为了探究荧光样品微结构和微环境对其荧光寿命的影响,使用该系统测量了高浓度、处于聚集状态的 UCNPs 的荧光寿命,结果如图7所示,并与单分散状态 UCNPs 的荧光寿命进行对比。

参考文献:

- [1] HABAZA M, GILBOA B, ROICHMAN Y, *et al.*. Tomographic phase microscopy with 180 rotation of live cells in suspension by holographic optical tweezers[J]. *Optics Letters*, 2015, 40(8): 1881-1884.
- [2] 张运海, 杨皓旻, 孔晨晖. 激光扫描共聚焦光谱成像系统[J]. *光学精密工程*, 2014, 22(6): 1446-1453.

同样采用单指数衰减拟合得到了理想的结果, χ^2 为 0.998 6,但是测得的荧光寿命为 $358.9 \mu\text{s}$,这说明聚集状态的 UCNPs 的荧光寿命是单分散状态的 1.84 倍。这表明上转换纳米微粒的聚集状态可以改变其荧光寿命,影响其发光机制。

5 结 论

本文针对单分散状态 UCNPs 材料荧光寿命测量的需求,设计了一种荧光寿命时域测量系统。首先介绍了测量系统的结构和工作原理,该系统只需对现有双光子扫描成像系统进行简单改进,测量设备简单,数据直观、处理简便,并且可根据需要对成像区域内的单分散荧光点选择性测量荧光寿命。实验分别对单微粒状态和聚集状态的 UCNPs 材料的荧光寿命进行了测量,结果显示,其荧光寿命分别为 $195.3 \mu\text{s}$ 和 $358.9 \mu\text{s}$,由此表明聚集状态对上转换纳米荧光微粒的荧光寿命有着显著的影响。

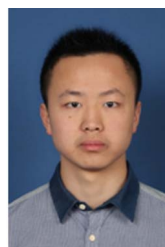
- ZHANG Y H, YANG H M, KONG CH H. Spectral imaging system on laser scanning confocal microscopy[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2014, 22(6): 1446-1453. (in Chinese)
- [3] PARK Y I, LEE K T, SUH Y D, *et al.*. Upconverting nanoparticles: a versatile platform for wide-field two-photon microscopy and multi-modal in vivo imaging[J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(6): 1302-1317.
- [4] WANG M, MI C C, WANG W X, *et al.*. Immunola-

- beling and NIR-excited fluorescent imaging of HeLa cells by using $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}, \text{Er}$ upconversion nanoparticles[J]. *ACS Nano*, 2009, 3(6): 1580-1586.
- [5] BOUZIGUES C, GACOIN T, ALEXANDROU A. Biological applications of rare-earth based nanoparticles[J]. *ACS Nano*, 2011, 5(11): 8488-8505.
- [6] PARK Y I, KIM J H, LEE K T, *et al.*. Nonblinking and nonbleaching upconverting nanoparticles as an optical imaging nanoprobe and T_1 magnetic resonance imaging contrast agent[J]. *Advanced Materials*, 2009, 21(44): 4467-4471.
- [7] SIA S K, LINDER V, PARVIZ B A, *et al.*. An integrated approach to a portable and low-cost immunoassay for resource-poor settings [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, 43(4): 498-502.
- [8] CHATTERJEE D K, RUFAlHAH A J, ZHANG Y. Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(7): 937-943.
- [9] XU C T, ZHAN Q Q, LIU H C, *et al.*. Upconverting nanoparticles for pre-clinical diffuse optical imaging, microscopy and sensing: Current trends and future challenges[J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2013, 7(5): 663-697.
- [10] HOA D Q, UCHIMURA T, IMASAKA T, *et al.*. Fluorescence lifetime measurement of dibenzofuran and monochlorodibenzofuran [J]. *Science and Technology of Advanced Materials*, 2006, 7(7): 714-717.
- [11] KAUR A, HAGHIGHATBIN M A, HOGAN B C F, *et al.*. A FRET-based ratiometric redox probe for detecting oxidative stress by confocal microscopy, FLIM and flow cytometry[J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(52): 10510-10513.
- [12] DATTA R, ALFONSO-GARCÍA A, CINCO R, *et al.*. Fluorescence lifetime imaging of endogenous biomarker of oxidative stress[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:9848.
- [13] PELET S, PREVITE M J, KIM D, *et al.*. Frequency domain lifetime and spectral imaging microscopy [J]. *Microscopy Research and Technique*, 2006, 69(11): 861-874.
- [14] FRUHWIRTH G O, AMEER-BEG S, COOK R, *et al.*. Fluorescence lifetime endoscopy using TC-SPC for the measurement of FRET in live cells [J]. *Optics Express*, 2010, 18(11): 11148-11158.
- [15] SUHLING K, FRENCH P M, PHILLIPS D. Time-resolved fluorescence microscopy[J]. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2005, 4(1): 13-22.
- [16] 徐玲玲. 高精度荧光寿命成像方法及应用 [D]. 武汉:华中科技大学, 2013.
XU L L. *High-precision Fluorescence Lifetime Imaging Method and its Applications* [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2013. (in Chinese)
- [17] 熊大曦, 刘云, 梁永, 等. 共振扫描显微成像中的图像畸变校正 [J]. 光学精密工程, 2015, 23(10): 2971-2979.
XIONG D X, LIU Y, LIANG Y, *et al.*. Correction of distortion in microscopic imaging with resonant scanning[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2015, 23(10): 2971-2979. (in Chinese)
- [18] 肖昀, 张运海, 王真, 等. 入射激光对激光扫描共聚焦显微镜分辨率的影响 [J]. 光学精密工程, 2014, 22(1): 31-38.
XIAO Y, ZHANG Y H, WANG ZH, *et al.*. Effect of incident laser on resolution of LSCM[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2014, 22(1): 31-38. (in Chinese)

作者简介:



李 辉(1978—),男,山西运城人,博士,硕士生导师,2005年于中国科学院物理研究所获得博士学位,主要研究领域为光学显微成像和单分子生物物理。
E-mail: hui.li@sibet.ac.cn



桂征宇(1991—),男,江苏常州人,硕士研究生,2014年于扬州大学获得学士学位,主要研究领域为光学显微成像。
E-mail: guizhengyu14@mails.ucas.ac.cn