

皮秒分辨荧光光谱测量的延时分幅扫描单光子计数技术

任兆玉^{1,2} 王水才² 贺俊芳^{1,2} 白晋涛^{1,2} 侯 洵²

(¹ 西北大学光子学与光子技术研究所, 西安 710068)

(² 中科院西安光机所瞬态光学技术国家重点实验室, 西安 710068)

摘要: 介绍并分析了我們创建的一套以雪崩光电二极管(APD)为探测手段的皮秒分辨延时分幅扫描单光子计数荧光光谱测量装置, 该装置具有高信噪比和高灵敏度, 可对 5ps 的荧光信号快速响应。创新性地采用了延时分幅扫描技术, 最大限度地发挥光电探测器优越性, 将系统的时间分辨率提高了 16.7 倍。该技术可以广泛的应用于光生物和光化学反应中的超快过程研究。

关键词: 皮秒分辨, 延时分幅扫描, 单光子计数, 超快光谱测量

Picosecond-resolving of Fluorescence Spectrum Measurement with delay-frame-scanning Single Photon Counting technique

Ren Zhaoyu^{1,2} Wang Shucai² He Junfang^{1,2} Bai Jintao^{1,2} Huo Xun²

(¹ Institute of Photonics and Photon Technique Northwest University, Xian 710079)

(² State Key Laboratory of Transience Optics Technology Xian Institute of Optics and Academy of Sciences, Xian 710068)

Abstract: A novel method of picosecond-resolving fluorescence spectrum measurement with delay-frame-scanning single photon counting technique was introduced. This spectrum setup was made innovatively. The time resolving power was improved 16.7 times by delay-frame-scanning technique. The advantage of avalanche photoelectric detector (APD) with rapid response was exerted mostly. It also has high property of signal-to-noise ratio and sensitivity (5 ps light could response). The setup was widely applied in ultrafast process of photobiology and photochemistry reaction.

Key words: picosecond-resolving power, delay-frame-scanning, single photon counting, ultrafast spectrum measurement

1 引言

在皮秒时间范围内, 对生物体微弱甚至超弱荧光信号的探测常用的方法主要有: 时间相关单光子计数技术、相位调制技术、条纹照相技术、基于脉冲选通方法的频率上转换技术以及基于脉冲取样方法的闪频 Boxcar 技术^[1~4]。所采用的探测器主要有光电倍增管(PMT)和雪崩光电二极管(APD)。较好的 PMT 灵敏度很高, 电流增益可达 10^6 , 但其响应时间一般在纳秒量级, 无法对皮秒甚至飞秒的信号进行直接测量。更高级的微通道板光电倍增管(MCP PMT), 响应时间可以短至 150ps^[5], 但其价格过高。APD 的响应时间可达 300ps, 价格适中, 是良好的选择。以 APD 为探头的时间相关单光子计数技术是一种具有高度灵敏、高信噪比的荧光测量装置。它是以测量样品所产生的荧光光子到达探测器的时间为基础而建立的, 检测器在某一瞬间接收到荧光光子的几率与该瞬间荧光强度成正比, 通过对单个荧光光子发射的时间进行统计将给出荧光强度随时间变化的规律。但是, 与之配套的单光子计数模板 T914P 多道采集的采样时间间隔最小为 5ns, 这就意味着由其采集的信号对 5ns 内的信息无法做出反应。也就是说, T914P 电路模板无法体现 APD 快速响应的优越性, 鉴于此, 我们创建了一套以锁模 Ar⁺ 激光为激励光源, 以 APD 为探测手段的皮秒分辨延时分幅扫描单光子计数荧光光谱测量装置。将系统的时间分辨率提高 16.7 倍, 最大限度地发挥了 APD 快

速响应的优越性。

2 实验装置及测量原理

2.1 实验装置

皮秒分辨延时分幅扫描单光子计数荧光光谱实验装置见图 1 所示, 以 Beamlok 2085-15 锁模 Ar⁺ 激光为激励光源。输出波长 514nm, 脉冲宽度 120ps, 重复率 82MHz。由于高重复频率的激励光源对具有生命活性的生物样品来说, 容易引起生物体内电荷积累, 造成样品疲劳。为此, 我们对 82MHz 的激光脉冲重复率采用布拉格声光衍射调制技术进行选频处理, 选频后的脉冲重复率为 4MHz。实验时样品池放置在一个能使样品溶液始终保持在 2~3℃ 的恒温装置中, 样品所发出的荧光由具有 30% 收集效率的准直镜收集后, 耦合输入具有高光谱分辨率的 SPEX 270M 光谱仪进行色散分光, 输出后的准单色荧光信号由可对单光子响应的雪崩光电二极管(APD)SPCM-AQR-15 探测, 单光子计数模板 T914P 多道采集(每道之间时间间隔为 5ns~65535s, 同步触发信号由选频激励驱动提供), 送入计算机, 由 MCS software 计数处理。

2.2 测量原理

尽管上述测试系统的探测器 SPCM-AQR-15 具有 300ps 的快速响应, 高灵敏度和高信噪比的特点, 但

* 国家重点基础研究发展规划专项经费资助(G1998010100)

2001年12月10日收稿

后继接收器电路模板 T914P 多道采样的道间隔最小为 5ns, 这就意味着由其采集的信号对 5ns 内的信息无法做出反应。也就是说, T914P 电路板无法体现 APD 快速响应的优越性, 鉴于此, 我们采用了巧妙的设计方法——对 T914P 触发信号加一定的可变延时, 对在不同延时条件下测得的荧光信号进行分幅扫描, 重组再现。其原理如图 2 所示, 图中 a 图为待测荧光信号; b 图为经单次扫描所获取的信息; 由 b 图可见, 由于探测系统获取信息的最小时段为 5ns, 显然采用单次扫描获取的信息产生了严重的失真。为了将 5ns 内的信息细化出来, 给触发信号加可变延时, 分别为 0, 0.3, 0.6, 0.9, ..., 依次在每个延时状况下纪录一组荧光数据, 再对所测的数据重新组合恢复; c 图为延时分幅扫描恢复再现的荧光信号。从图 2 中明显可见, 尽管探测系统

在每个延时状况下所采集的信号与原始信号相比都发生了畸变, 而将所有延时分幅扫描下所得的信号叠加在一起, 可很好地再现原来的信号, 这样可以最大限度地发挥 APD 快速响应的优越性, 使得测量系统的分辨率得到了很大的提高。

之所以在 5ns 内采用间隔为 0.3ns 的延时, 是考虑到光电探测器 SPCM-AQR-15 的响应时间为 300ps, 当然, 所插入的延时还可以进一步变小, 但由于受 SPCM-AQR-15 响应时间的限制, 插入的延时再短也没有意义, 并且插入的延时点太多, 会给测量带来不利, 使得总体测量时间变长, 一方面对激励光源的稳定性提出了苛刻的要求; 另一方面, 长时间激励测量会造成具有生命活性的生物样品疲劳, 使其会在较短的时间内就失去了生物活性。

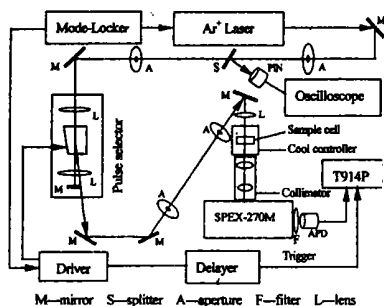


图 1 皮秒分辨率分幅扫描单光子计数荧光光谱实验装置

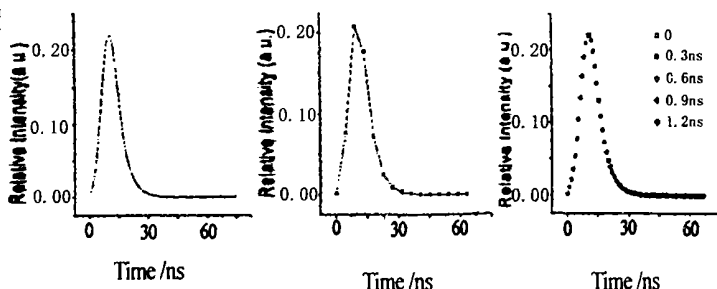


图 2 延时分幅扫描信号恢复原理图。左图为原始信号; 中图为单次扫描信号; 右图为恢复的信号
16.7 倍。

3 性能分析

3.1 系统的时间分辨率

系统的时间分辨率主要由激光光脉冲的宽度, 光电探测器的响应时间, 以及激发光脉冲的晃动, 光电探测器上升时间的晃动和 T914P 触发延时的晃动决定。Ar⁺激光器的输出脉冲宽度为 120ps, 其晃动时间约为 10ps, 光电探头 SPCM-AQR-15 的脉冲上升时间为 300ps, 晃动时间小于 15ps, 触发延时的时间间隔是用 Boxcar4422 采集模板和门宽为 25ps 的 S₄ 采样头测量来确定的, 其晃动时间大约为 25ps。由上述参数可知, 系统的响应函数主要受到光电探头的响应时间限制, 响应函数的晃动主要由触发延时的晃动决定。如果激发的脉宽小于 30ps, 通过对实测荧光信号和系统响应函数的解卷积可得到测量系统获得可信信号的最短时间间隔为 30ps; 如果激发的脉宽大于 30ps, 则其可分辨的最小时间为激光的脉冲宽度。我们这套超快光谱系统的激发光脉宽为 120ps, 为此其分辨率即为 120ps。也就是说, 通过改变激励光源的脉冲宽度, 可以使该光谱系统的时间分辨率达到接近 30ps 的最佳值。

由于创新性地提出延时分幅扫描技术, 并获得了实验上的成功, 为此, 该系统最大可能地发挥了光电探测器器件的优越性, 使系统的时间分辨率比原来提高了

3.2 系统的光谱分辨率

系统的光谱分辨率由光谱仪决定, SPEX-270M 型快速成像光谱仪最小步进量为 0.3125nm, 即为该系统的光谱分辨率。但考虑到被测样品为高等植物光系统 II 蛋白复合物的荧光为宽带连续谱, 所以系统的光谱分辨率不必要求很高, 此外, 高的光谱分辨率是以牺牲信号强度和信噪比为代价的。权衡光谱分辨率与系统信噪比之间的关系, 将光谱仪的光谱带宽设为 2nm。

3.3 与以光电倍增管为探测器的 Boxcar 测量系统^[6]比较

从荧光信号的测量系统来看, SPCM-AQR-15 探头具有快速响应、高增益、高信噪比的性能。其光谱响应范围为 400~1064nm, 暗计数率为 50c/s, 可对 5pw 的荧光信号响应。与 T914P 采集模板组合, 所能达到的信噪比为 500:1; 而以光电倍增管为探测器的 Boxcar 测量系统的信噪比可达 70:1^[7]。T914P 采集数据点的最小时间间隔(5ns)是 Boxcar 的 200 倍, 但光电倍增管的响应时间(2ns)大于 SPCM-AQR-15 的响应时间。由于 T914P 与 Boxcar 采集模板采集数据的方式不同, 所以无法将 SPCM-AQR-15 探头与 Boxcar 结合起来使用。

从激励光源来讲, Ar⁺激光锁模输出波长为 488nm

和514nm,脉宽为120ps,可以实施选频处理,使重复率降至4MHz以下,对于文献[6]中的飞秒输出的钛宝石激光,由于脉冲峰值功率高而不能实施选频方案,只能以82MHz的重复率来激发样品,即每两个相邻激发脉冲之间的间隔约为12ps,这样就使得前一个脉冲激发的荧光还没有衰减完,后一个激发脉冲又来了,由此测得的结果会给数据处理带来相当大的困难。

4 结论

通过上述分析与比较,尽管飞秒钛宝石激光(倍频输出输出120fs,重复率82MHz)的脉冲宽度比锁模Ar⁺激光窄,但选择Ar⁺为激励光源可实施选频操作,有利于对具有生物活性的样品进行测量;尽管T914P采集数据点的最小间隔为5ns,是Boxcar最小采点间隔的100倍,但其与SPCM-AQR-15结合使用可使测量信号的信噪比和响应灵敏度比用光电倍增管与Boxcar结合时得以大大的提高,由于采用了延时分幅扫描技术,弥补了由T914P带来的缺憾,使得时间分辨率比原来的单光子计数系统提高了16.7倍。

我们用文中分析的皮秒分辨延时分幅扫描单光子计数荧光光谱测试系统,对菠菜光系统II核心复合物、核心天线CP43、CP47以及CP47&RC(反应中心)进行超快光谱测量,得到它们的瞬态荧光光谱特性曲线和用延时分幅扫描技术恢复的时间特性曲线。通过高斯光谱解叠法和用非线性最小二乘法分别对所测曲线进行数据

处理^[8],建立多指数模型拟合,可解得能量在各色素之间传递的时间常数 τ_i 和拟合系数 C_i ,根据各色素蛋白复合物的结构功能关系,可以间接地分析激发能在各色素之间传递的超快过程,进一步研究见后续论文。

参考文献

- [1] Spencer D P, Michael W R, Ga'en B K, Normand M L, Photo-counting technique for rapid fluorescence decay measurement[J]. Optics Letters, 1998, 23(15): 1215-1217
- [2] T Ito, M Hiramatsu, M Hosoda, Y Tschiya, Picosecond time-resolved absorption spectrometer using a streak camera[J]. Rev. Sci. Instrum., 1991, 31: 1275
- [3] S Hacke, R A Taylor, I Bar-Joseph, et al, Improving the signal-to-noise ratio of femtosecond luminescence up-conversion by multi-channel detection[J]. J. Opt. Soc. Am. B, 1998, 15(4): 1410-1417
- [4] Douglas R, James, Aleksander S, Stroboscopic optical boxcar technique for the determination of fluorescence lifetimes[J]. Rev. Sci. Instrum., 1992, 63(2): 1710-1716
- [5] TCSPC laser scanning microscopy, Upgrading laser scanning microscopes with the SPC-730 TCSPC lifetime imaging module, Becker & Hickl GmbH, www.becker-hickl.com
- [6] 任兆玉,贺俊芳,王水才,等.光系统II捕光复合物中能量传递动力学研究[J].光子学报,2001,30(5):513-518
- [7] 叶彤,超快速光谱技术在光合作用原初反映研究中的应用,中国科学院西安光学精密机械研究所博士学位论文,1994.7,47
- [8] 任兆玉,贺俊芳,王水才,等.光系统II捕光复合体飞秒时间荧光特性的研究[J].植物学报,2001,43(12)

·激光医用·

半导体激光治疗急性乳腺炎50例分析

刘风云

(广州军区广州总医院康复理疗科,广州 510010)

1 临床资料

本组病例年龄23~30岁,均为初产妇,病程1~3天42例,4天以上8例,其中11例曾用中药或西药治疗。50例患者均有乳房肿块,有13例有2个肿块。触痛,乳汁不易排出。其中12例表面有充血红肿,皮肤温度高,伴有体温增高、头痛、乏力等症状。

2 治疗方法

采用OMEGA半导体激光治疗仪,选用46点束式输出端进行照射,平均功率密度75mW/cm²,照射面积10cm²,每肿块部位照射5~7分钟,每日1次,暗穴、乳中根穴选用820nm波长输出点光束照射,平均输出功率200mW,功率密度1.6W/cm²,脉冲频率根据疗程选用10~20Hz,照射时间每点1~2分钟。

治疗效果:疗效标准:痊愈为乳汁泌出通畅呈白色,乳房无肿块,无疼痛,无复发;显效为乳汁泌出通畅呈白色,乳房肿块明显缩小,疼痛减轻;无效为须切开排脓。治疗结果:本组50例中治疗43例,占86%;显效6例占12%;无效1例,占2%。

3 讨论

本组病人均是产后初产妇,因不会哺乳,哺乳时往往因乳汁吸不尽造成积乳,加之乳头破裂或破裂后细菌侵入淋巴管蔓延至腺叶间和腺小叶的脂肪纤维组织停留在滞乳汁中,扩散至腺实质,产生急性炎症。但此病发病机制往往常被忽略,按其他部位急性炎症同样处理,如用药、封闭或用吸乳方法等等,收不到治疗效果,最后只有切开排脓,因乳腺脓肿多为多房性,所以切开排脓特别困难,疗效不好。本组有1例32岁初产妇病程较长,为2周左右,用药无效,切开排脓后伤口长达4个月久久不愈合,给病人带来很大痛苦。另外OMEGA半导体激光属弱激光的一种,照射可以改变血管通透性减轻炎症及渗出速度和程度,减轻炎症部位充血水肿,通过激活巨噬细胞提高全身及局部免疫力达到消炎抗感染作用,46点束探头6种不同波长,不同波长对不同组起作用,增加治疗渗透力,所以对大面积和一定深度病灶能起到明显激光治疗作用。配合穴位照射起到热解毒、通乳路、宽胸利气、通络消结、疏通乳道之作用。此治疗方法用于乳管闭塞、乳汁郁积、乳腺小叶未被感染之前最好。若瘀积乳汁已被感染、乳腺小叶发炎之初亦可用此方法。若已明显形成乳腺脓肿之病倒禁用此法。