

增強螢光訊號偵測之靈敏度

Enhancing fluorescence detection sensitivity

鍾慎修、鄧嘉卉、林珀琳、高甫仁, 蘇健穎

Shen-Shou Max Chung, Jia-Hui Deng, Po-Lin Lin, Fu-Jen Kao, James Su

因受激輻射之同調性，應用破壞性干涉可大幅增強受激輻射之螢光偵測訊噪比，從而降低染料分子濃度的可偵測極限。我們實現了結合鎖相放大器以及破壞性干涉儀之激發-探測實驗，並以受激輻射為對比，達成了長工作距離的螢光成像功能。實驗結果顯示可經由破壞性干涉將探測光束的強度降低 10 倍，而仍維持良好的訊噪比，這代表可偵測的染料分子濃度亦可以降低 10 倍。受激輻射之同調性，讓此技術具有發展高解析 3D 同調光學相干斷層掃描成像的潛力，於組織成像形成獨特的對比。

Destructive interference greatly improves the signal-to-noise ratio of fluorescence detection based on stimulated emission, and thus decreases the detection dye concentration limit. We established SE-based detection in long-working-distance settings by implementing pump-probe method with lock-in detection and destructive interference. Results show that we were able to achieve 10 times intensity ratio decrease in the probe beam with destructive interference, which corresponds to 10 times decrease of concentration detection limit. We are now developing the technique's potential for high-resolution 3D biological imaging by stimulated emission optical coherence tomography (SE-OCT), using SE fluorescence as a viable and unique contrast.

一、前言

幾個世紀以來，螢光訊號一直是一種神秘而令人好奇的光學訊號。當一個被激發的原子、分子或者是奈米結構經由釋放一個光子使得本身能階躍遷回到基態，即會產生螢光訊號。其廣泛的應用涵蓋螢光標定⁽¹⁾、螢光酸鹼值(pH)感測⁽²⁾以及最常用的螢光照明等。螢光分子的生命期長短與其當下的環境條件具有緊密的關係，因此用以觀察標定細胞染料分子的螢光生命期顯微鏡，可以用來分析重要的生物學資訊，例如細胞質基質黏滯性、酸鹼值及細胞

新陳代謝⁽³⁾等。

螢光訊號屬於自發光 (spontaneous emission)，不過受激發的螢光分子也可以透過受激輻射或者非游離輻射轉化釋放能量。為了有效率地收集自發輻射螢光訊號，因其向四方發射，通常需要高數值孔徑 (numerical aperture) 的光學元件，用以涵蓋更廣大的空間立體角 (solid angle)，以便更有效率地收集奔往四面八方的光子。不過，也因高數值孔徑光學元件的使用，大幅限縮了工作距離以及相對應的焦距長度，致使可觀察的目標物尺寸受到限制。

相較之下，藉受激輻射 (stimulated emission)，

亦是雷射產生的原理，所產生的光子，與外部激發電磁場的光子具有相同行徑，即有相同的相位、頻率、以及極化方向，此一現象稱之為同調性。圖一以及表一分別比較螢光和受激輻射的產生機制以及特性。最近受激輻射已被運用來偵測螢光生命期⁽⁴⁾、改善顯微影像的空間解析度⁽⁵⁾、探測不發光的暗螢光分子⁽⁶⁾以及在長工作距離下偵測螢光分子⁽⁷⁻⁹⁾。

以受激輻射為基礎的螢光偵測工作原理，即為在激發螢光的能量消散成其他輻射或非輻射的衰減過程之前，誘導電子能量轉移成受激輻射。因此受激輻射訊號的強度跟激發態的密度及激發光束的強度成正比關係。當應用於顯微成像時，在未臻飽和效應下，受激輻射訊號與激發光束具有線性關係，整體而言則具有兩者乘積的二次方關係，可以應用於3D光學成像。

先前的研究中，我們藉由鎖相偵測結合激發-探測法建立以受激輻射為基礎的長工作距離螢光成像實驗架設。激發-探測法可以廣泛地適用於各種領域，特別是我們可以藉由控制激發光束與探測光束之間的延遲進一步取得並重建螢光生命期影像。相較於其它螢光生命期影像技術，例如頻域偵測方法 (frequency domain methods)，時間相關單光子計數 (time-correlated single photon counting, TCSPC) 或者使用高速分幅攝影 (gated camera)，以受激輻射為基礎的激發-探測法螢光生命期顯微術 (SE-based pump-probe FLIM) 同時具有簡易、經濟以及直接偵測等諸多優點。

不過，藉由受激輻射偵測的顯微術通常不易分離出強大的激發光束內相對微弱的交流訊號(即受激輻射)。原因是兩者具有相同的波長、極化方向以及脈衝波形。唯一不同者，乃激發光束的空間分布通常為一高斯分布(Gaussian distribution)，但受激輻射的空間分布受染料分子附著於生物組織的影響，其空間分布展現了組織的不規則特性。表現在鎖相放大器處理的偵測器上，激發光束代表一接近直流 (direct current, DC) 的低頻信號，受激輻射則為一交流 (alternating current, AC) 的微弱高頻信號。由於二極體偵測器經常會因較強大的激發光束導致飽和，

以致於所取得的訊噪比 (signal-to-noise ratio, SNR) 往往不甚理想。

二、應用破壞性干涉原理來改善訊噪比

近期的研究顯示，我們可應用破壞性干涉技術有效地減少激發光源的高直流部分背景訊號，因而大幅提升訊噪比⁽¹³⁾。圖二為使用麥克森干涉儀 (Michelson Interferometer) 產生破壞性干涉的實驗架設。其中激發光源為波長 635 nm、脈衝寬度 100 ps 及重覆率 40 MHz 之半導體雷射光源 (PicoQuant)，依序經過 $\lambda/2$ 波片、偏光片及連結鎖相放大器之電光調制器 (ConOptics Model302RM EO modulator)，接著經反射鏡 (M1) 反射至另一個偏光片後，再入射至一組由兩片透鏡和 25 μm 針孔組成之空間濾波器，以改善光束品質。第二道探測光源為波長 705 nm、脈衝寬度 100 ps 及重覆率 40 MHz 之半導體雷射光源，依序經過 $\lambda/2$ 波片、偏光片及機械式時間延遲裝置後，經由反射鏡 (M2) 進入由立方體分光鏡 (cubic beam splitter) 和反射鏡 (M3) 組成之麥克森干涉儀 (Michelson Interferometer)。經過干涉儀之探測光束被反射鏡 (M4) 反射至雙色鏡 (dichroic mirror) 與激發光束會合，此時兩束光源再經透鏡組聚焦於待測樣品後經反射鏡 (M5) 反射回原來的光路徑。受激輻射訊號經反射鏡 (M4) 反射至雙色鏡後，再經一道濾鏡消除波長 635 nm 的激發光束後，由光電二極體 (Thorlab Det 36A photodiode) 偵測受激輻射訊號強度。光電二極體接收的訊號經鎖相放大器 (Stanford Research 830 DSP Lock-in Amp) 處理後由示波器進行逾4000次積分及平均值的計算，而訊號產生器則用以同步示波器以及鎖相放大器。本實驗分別使用不同濃度的染料分子 (ATTO 647N dye) 進行實驗。

三、實驗結果與討論

為了取得最佳化的受激輻射訊號，控制激發光束與探測光束在時間與空間的同步是必要條件。圖三為一系列受激輻射影像的結果，這個是調整時間

延遲裝置後觀察激發光束及探測光束在時間上脈衝重疊的過程而產生的變化情形。當探測光脈衝領先激發光脈衝 1 ns 時，此時並未量測到任何受激輻射螢光訊號，而在 0 ns 處，可以測得最強的訊號。訊號的強度並隨著兩光束脈衝抵達時間差的增加而逐步衰減。由圖三可觀察破壞性干涉的效果，隨著調整反射鏡 (M3) 的位置，破壞性干涉可使探測光束在樣品位置的功率由 2 mW 下降至 0.2 mW (不含來自樣品產生的受激輻射訊號)。

應用破壞性干涉具有增強訊噪比的優點，因此可進一步降低染料分子濃度可偵測的極限(圖四)。利用干涉可以有效降低直流訊號，然而卻不會減少受激輻射訊號，因受激輻射主要發生在處於激發態的染料分子，其空間分布與高斯分布的激發光束不同。在沒有干涉儀的架設下，一般最低可偵測染料分子的濃度約為 10 μM ，不過這個濃度在某些特殊應用上是不敷所需，例如用以偵測被標定的培養細胞，其典型染料分子濃度常少於 10 μM ，以致於無法順利偵測。相對而言，藉由增加干涉儀的架設，其最低可偵測濃度的極限可以低於 1 μM 。

與半導體偵測器有關的雜訊源有熱雜訊 (thermal noise)，閃爍雜訊 (flicker noise)及散彈雜訊 (shot noise)等，不過這些雜訊對於本實驗的影響程度都不如光學雜訊來得大。理論上，破壞性干涉應該可以降低探測光束的強度至接近零的理想範圍，但在實際操作中，有幾項因素使此理想範圍無法達成。一是由於半導體雷射輸出的並非是理想的脈衝波形，以致無法達成這樣的效果。典型的雷射二極體脈衝波形在低功率輸出 (在 PicoQuant 是 < 2.8 mW時) 時其時域波形近似一高斯分佈，但在功率略為增加時，在脈衝波形最高峰值的前端會逐漸出現另一個肩部⁽¹⁴⁾。此脈衝波形的峰值源自於電子雪崩效應，脈衝波形肩部意味著一導電電子流 (conduction electron current) 的產生。因此如果在高輸出功率的範圍操作實驗，脈衝波形峰值與肩部之強度落差所造成的效應將遠超過干涉效應。反之，如果在低輸出功率的範圍操作實驗，受激輻射訊號也會較小，偵測困難度會增高。另一個影響實驗精

確度的重要因素是脈衝的時域抖動 (jitter)，PicoQuant 雷射的抖動約為 2.6 ps，此 2.6 ps 的抖動對 100ps 的脈衝寬度來說並不大，但其在自由空間的等效距離長達 780 μm 。對於使用最小移動距離解析度為 (1-10) μm 的位移平台調整反射鏡 (M3) 而言，此抖動這會造成相當大的影響，然幸運的是抖動也有其時域分布，2.6ps 是最大值，出現機率並不高，平均起來抖動的效應還是小於時間延遲平台的調整，因為調整時間延遲平台可看到其效果。實驗過程使用電光調制器，於 39 KHz 調制頻率可以獲得最佳的結果，此頻率應該跟雷射的脈衝重覆率 (pulse repetition rate) 以及鎖相放大器的濾波設定有關。

四、結論與未來展望

整體而言，我們藉由激發輻射原理達成偵測微弱螢光訊號的目的，激發輻射會轉化非同調螢光訊號與自發射螢光訊號成為同調訊號，應用干涉儀則可藉由降低直流背景訊號值而大幅提升訊噪比。

在目前的實驗架設，因電光調制器會影響光束的光學品質，及機械式的延遲機構在精密度與使用上有些不便，我們計劃在短期內以全數位控制系統來取代。即以高精度數位延遲信號產生器去控制兩座雷射的激發及時間上的同步，與以函數產生器來控制鎖相放大器所需的時域閘門。一個全數位化的雷射控制系統將來可望以一可程序控制的邏輯板(FPGA)取代，整合成一桌上型或可攜式儀器。

未來工作應進一步縮短半導體二極體雷射的脈衝寬度與波長，這個對於使用破壞性干涉法來增強螢光訊號的訊噪比而言會有顯著影響。之前本實驗室已利用飛秒雷射(Ti:Sapphire)作過類似實驗，飛秒雷射雖提供較佳的時域(空間)解析度，但其龐大的體積及高昂的售價，使此技術走出實驗室的可能性變很低，相對的，半導體雷射低廉可靠，且體積小，使用便利性大大提高，這些特點使得此技術實用化的可能性大為增加，犧牲一點時域(空間)解析度換取商品化是值得的。目前半導體雷射已發展出可變波長技術(NCTU)，此技術若能與激發輻射微影術相結合，可嘗試高速拉曼成像。

未來與內視鏡的結合也有可能，因受激輻射具有長工作距離的特性。

中期我們擬發展以這種高解析受激輻射同調光源作3D光學相干斷層掃描成像⁽¹⁵⁾(3D SE-OCT)的技術，進一步發揮同調螢光訊號的獨特性。原則上，這種技術也可以延伸運用到高解析度光達(LIDAR)技術以及合成孔徑顯微術(Synthetic Aperture Microscopy)⁽¹⁶⁾等領域。光學相干斷層掃描成像與微波的脈衝雷達很類似，國內已有數單位(ITRI, NTU)具有此技術。合成孔徑顯微術則與合成孔徑雷達很類似，可藉由多重掃描來提高解析度。另外，最近國外出現了一些以結構光源作照明的微影術⁽¹⁷⁾，可以增強影像清晰度。最近的Fourier Ptychographic Microscopy⁽¹⁸⁾以波前重建的技巧縫合多個影像，基本上與Computed Adaptive Optics技巧類似。激發輻射都可應用在這些技術上，且因激發輻射具有同調性，在處理相位的問題上會比LED光源容易得多。

另一個可能的未來發展，則是微影術與矽光電(Silicon Photonics)技術結合。目前微影術多依賴機械的雙面鏡(galvanic mirror)掃描來形成二維影像⁽¹⁹⁾，形成一個不到百萬畫數的影像約需1分鐘。現在矽光電的積體光學已可做到40Gb/s的高速傳輸，且光在波導裏面前進，沒有困難的聚焦鏡組問題，光的相位尚能精確的計算與控制。若能以矽光電技術進行光束切換掃描成像，形成一幅二維圖像所需時間，應只需幾毫秒的時間。

本研究經費源自國科會計畫(NSC102-2112-M-010-003-MY3)。

參考文獻

1. J. W. Borst, M. A. Hink, A. van Hoek, and A. J. W. G. Visser, Effects of refractive index and viscosity on fluorescence and anisotropy decays of enhanced cyan and yellow fluorescent proteins, *J. Fluoresc.*, **15**, pp. 153 – 160, 2005.
2. H. Szmanski and J. R. Lakowicz, Optical measurements of

pH using fluorescence lifetimes and phase-modulation fluorometry, *Analyt. Chem.*, **65**, pp. 1668 – 1674, 1993.

3. V. V. Ghukasyan and F.-J. Kao, Monitoring cellular metabolism with fluorescence lifetime of reduced nicotinamide adenine dinucleotide, *J. Phys. Chem. C*, **113**, pp. 11532 – 11540, 2009.
4. C. Y. Dong, P. T. C. So, T. French, and E. Gratton, Fluorescence lifetime imaging by asynchronous pump-probe microscopy, *Biophys. J.*, **69** (6), pp. 2234–2242, 1995.
5. V. Westphal, S. O. Rizzoli, M. A. Lauterbach, D. Kamin, R. Jahn, and S. W. Hell, Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement, *Science*, **320** (5873), pp. 246 – 249, 2008.
6. W. Min, S. Lu, S. Chong, R. Roy, G. R. Holtom, and X. S. Xie, Imaging chromophores with undetectable fluorescence by stimulated emission microscopy, *Nature*, **461** (7267), pp. 1105 – 1109, 2009.
7. T. Dellwig, P.-Y. Lin, and F.-J. Kao, Long-distance fluorescence lifetime imaging using stimulated emission, *J. Biomed. Opt.*, **17** (1), p. 011009, 2012.
8. P.-Y. Lin, S.-S. Lee, C.-S. Chang, and F.-J. Kao, Long working distance fluorescence lifetime imaging with stimulated emission and electronic time delay, *Opt. Express*, **20** (10), pp. 11445 – 11450, 2012.
9. J. Ge, C. Kuang, S.-S. Lee, and F.-J. Kao, Fluorescence lifetime imaging with pulsed diode laser enabled stimulated emission, *Opt. Express*, **20** (27), pp. 28216 – 28221, 2012.
10. Sigma-Aldrich, Single molecule Detection with Atto 647N NTA, *BioFiles*, **3**, pp. 8 – 9, 2006.
11. T. Klamp, M. Camps, B. Nieto, F. Guasch, R. T. Ranasinghe, J. Wiedemann, Z. Petr'asek, P. Schwille, D. Klenerman, and M. Sauer, Highly rapid amplification-free and quantitative DNA imaging assay, *Scientific Reports*, **3**, p. 1852, 2013.
12. L. C. Zanetti-Domingues, C. J. Tynan, D. J. Rolfé, D. T. Clarke, and M. Martin- Fernandez, Hydrophobic fluorescent probes introduce artifacts into single molecule tracking

experiments due to non-specific binding, *PLOS ONE*, **8** (9), p. e74200, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0074200

13. Shen-Shou Max Chung, Jia-Hui Deng, Po-Lin Lin, Fu-Jen Kao, Enhancing stimulated emission-based fluorescence detection with interferometric setup, *Proc. SPIE*, **8948**, pp. 8948 – 63, 2014,); doi: [10.1117/12.2042085](https://doi.org/10.1117/12.2042085). Also appears in http://spie.org/x106256.xml?highlight=x2406&WT.mc_id=KNRSENSEMEAE.

14.

<http://www.picoquant.com/products/category/picosecond-pulsed-sources/ldh-series-picosecond-pulsed-diode-laser-heads>.

15. Rui Bernardes and Jose Cunha-Vaz, *Optical coherence tomography: a clinical and technical update*, Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2012.

16. Tyler S. Ralston, Daniel L. Marks, P. Scott Carney and Stephen A. Boppart, Interferometric synthetic aperture microscopy, *Nature Physics*, advanced online publication, 2007.

17. E. Mudry, K. Belkebir, J. Girard, J. Savatier, E. Le Moal, C. Nicoletti, M. Allain and A. Sentenac, Structured illumination microscopy using unknown speckle patterns, *Nature Photonics*, **6**, May. 2012.

18. Guoan Zheng, Roarke Horstmeyer and Changhui Yang, Wide-field, high-resolution Fourier Ptychographic Microscopy, *Nature Photonics*, **7**, Sep. 2013.

19.

<http://www.olympusmicro.com/brochures/pdfs/fluoview.pdf>



鍾慎修先生為美國紐約 Polytechnic University 電子物理博士，現為國立陽明大學生醫光電研究所博士後研究。

Shen-Shou Max Chung received his Ph.D. in Electrophysics from Polytechnic University, USA. He is now a Post Doc Research Fellow in the Institute of Biophotonics Engineering in National Yang Ming University.



鄧嘉卉小姐為國立陽明大學生醫光電工程研究所碩士，目前就職於華亞科技股份有限公司任 晶圓良率分析工程師。

Jia-Hui Deng received her M.S. from Institute of Biophotonics Engineering of National Yang-Ming University; she is currently working in Inotera Memories as a wafer yield engineer.



林珀琳先生為國立陽明大學生醫光電工程研究所碩士，目前服替代役中。

Po-Lin Lin received her M.S. from Institute of Biophotonics Engineering of National

Yang-Ming University; he is currently in military service.

蘇健穎先生為國立交通大學博士候選人，現任國家實



驗研究院儀器科技研究中心副研究員。

James Su is a Ph.D. candidate at National Chiao Tung University. He is currently an associate researcher at Instrument

Technology Research Center, National Applied Research Laboratories.



高甫仁先生為美國紐約州康乃爾大學物理博士，現任國立陽明大學生醫光電研究所教授和中華民國物理學會理事長。

Fu-Jen Kao received his Ph.D. in physics from Cornell University, USA. He is currently a professor in the Institute of Biophotonics, National Yang-Ming University and the President of the Physics Society of Republic of China, Taiwan.

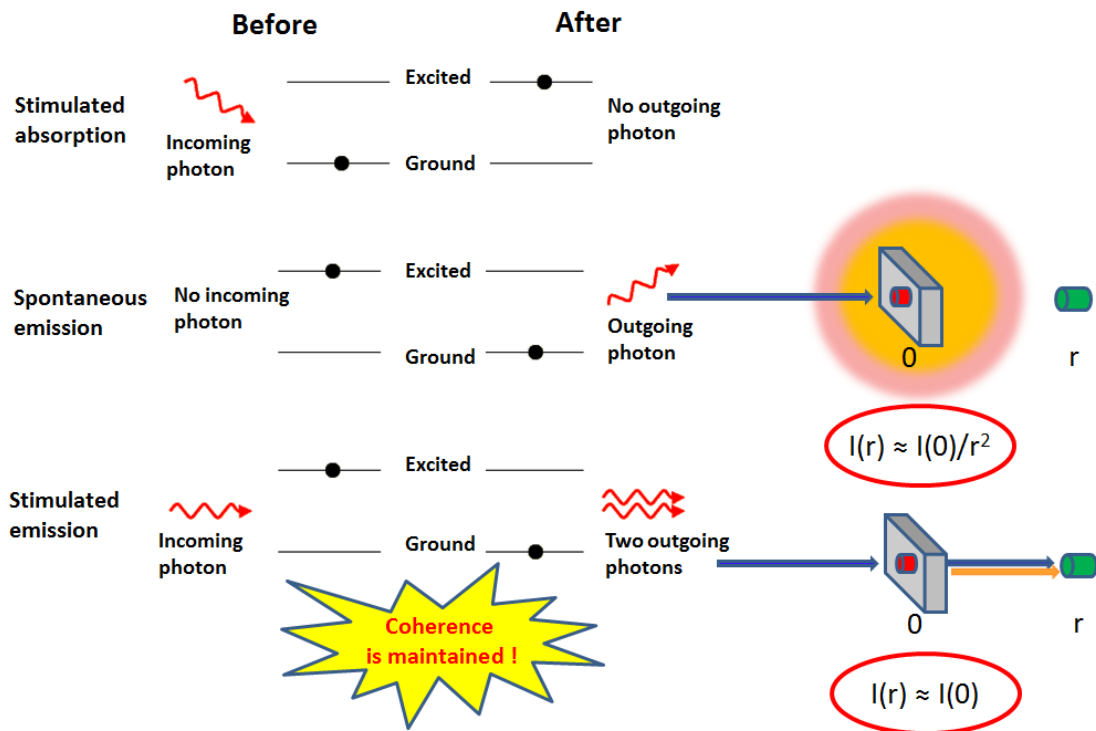


圖 1. 分別顯示自發射 (spontaneous emission) 與受激輻射 (stimulated emission, SE) 的產生機制，而其中SE同調訊號不隨距離而衰減。 $I(r)$ 代表螢光與受激輻射強度隨距離的函數， $I(0)$ 代表位於樣品原點的訊號強度。 $I_{FL}(r)$ 及 $I_{SE}(r)$ 分別代表自發射螢光及受激輻射的強度。

表 1. 螢光訊號與受激輻射訊號比較表。

| | 螢光訊號 | 受激輻射訊號 |
|---------|-----------------------------|-------------------------|
| 產生機制 | 自發 (Spontaneous) | 受激發 (Stimulated) |
| 同調性 | 非同調 | 同調 |
| 收光條件 | 需要高數值孔徑光學元件 | 與數值孔徑無關 |
| 暗螢光分子偵測 | 否 | 可 |
| 生命期 | ~ subnanosecond (由電子迴路速度決定) | ~ picosecond (應用激發-探測法) |

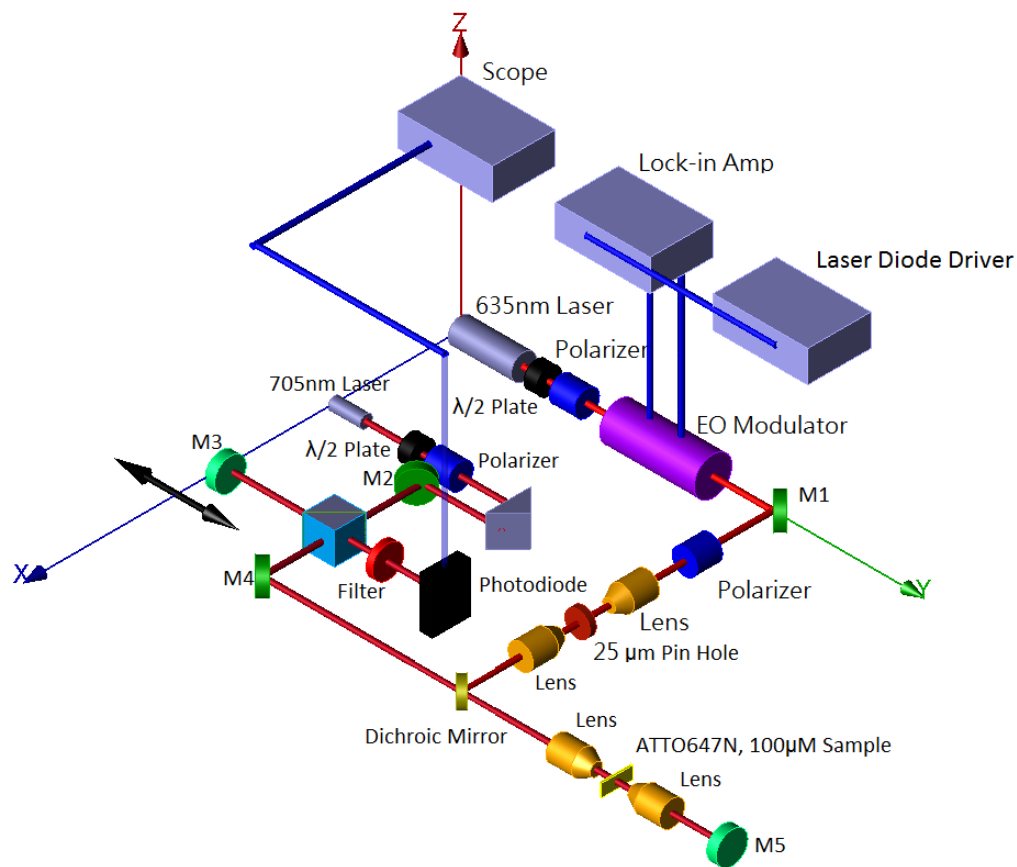


圖 2. 應用干涉儀增強受激輻射螢光訊號偵測靈敏度的實驗架設圖。使用 (635 nm, 100 ps, 40 MHz) 之半導體雷射作為激發光源，另一個具有相近脈衝寬度及重複率之波長705 nm半導體雷射則作為探測光源使用，而探測光源先導入麥克森干涉儀。ATTO647N 代表不同染料分子濃度的樣品⁽¹⁰⁻¹²⁾；M(1-5) 分別代表反射鏡； λ 代表波長；EO Modulator 代表電光調制器，用以調制激發光源的強度。

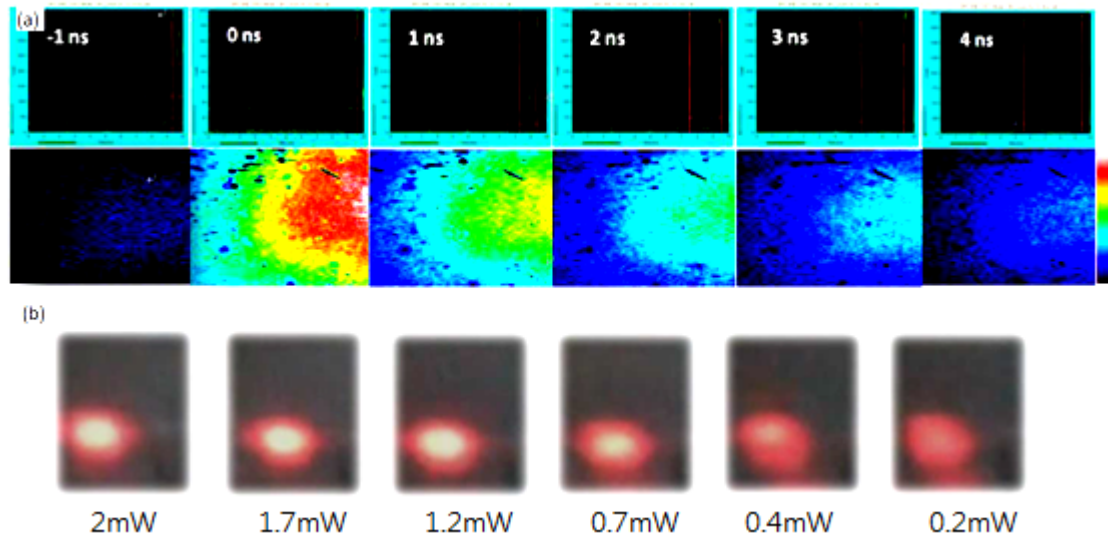


圖 3. (a) 應用時間相關單光子計數系統 (time-correlated single photon counting, TCSPC) 於不同時序之激發光束與探測光束相對位置的受激輻射影像。(b) 不同空間位置上的干涉光斑影像及其功率量測值。

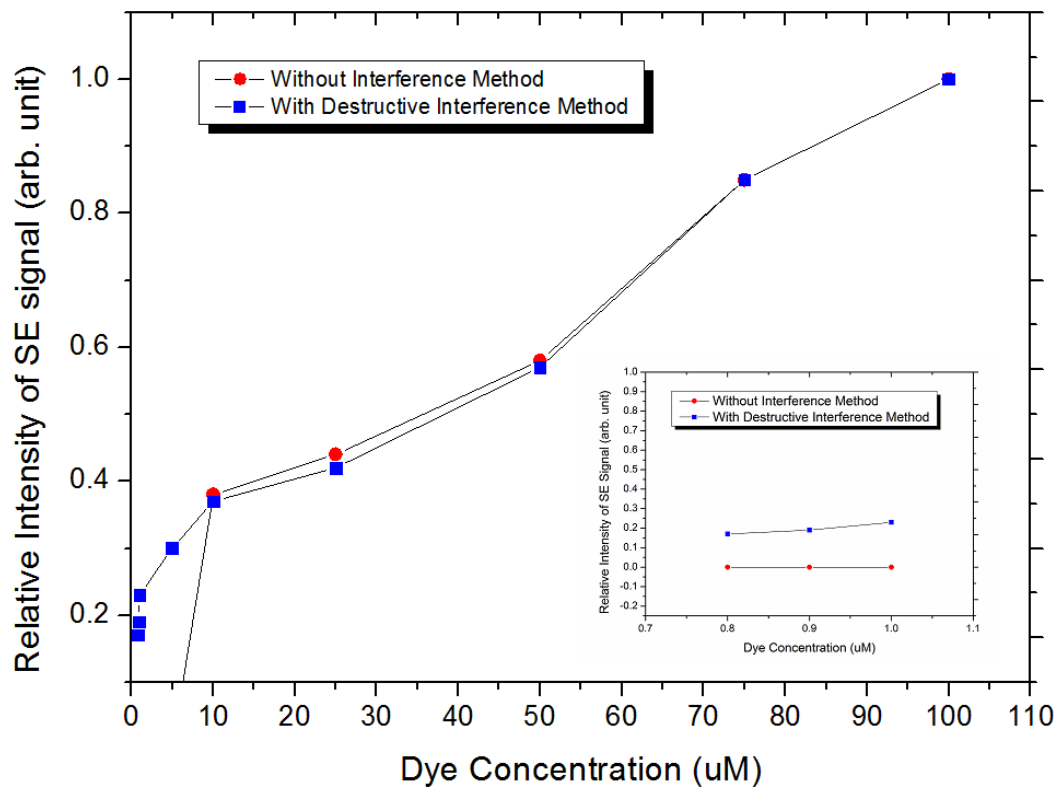


圖 4. 應用干涉儀提升偵測極限的實驗結果。紅色圓點代表未使用干涉儀的結果，藍色方塊代表使用破壞性干涉法的結果。小圖代表低濃度染料分子的受激輻射訊號相對強度，其中使用干涉法的架設可以偵測到染料分子濃度最低可達 0.8 μM 。