

荧光成像的原理与方法

荧光成像在基因组学和蛋白质组学等生物学领域应用中的独特优势：高灵敏度：灵敏度超过比色法，在大部分应用中其灵敏度近乎放射性同位素。多组样品一次成像：将不同样品（如：对照、处理）通过不同发射波长的荧光素标记（如 Cy3 或 Cy5 等）可以同时检测多样品荧光信号。

稳定性高：较放射性同位素相比，荧光素标记的抗体、杂交探针、PCR 引物等的信号稳定性优势明显，可稳定存在数月以上，这使需要大规模标记并多阵列之间的标准化比较成为了可能。低毒性成本低：多数情况下，荧光标记和检测的全过程试验用手套即可对实验者提供足够的保护。易于运输和实验后处理，多数情况下实验成本低于放射性同位素。商业可获得性：许多重要的荧光标记型生物大分子如各种单抗、多抗、CAT 等及荧光标记试剂盒都可以方便获得，同时一些公司提供荧光标记的外包服务。

荧光信号的产生及信号捕获原理：荧光物质被特定外界能量激发（如激光等高能射线），引起

其电子轨道向高能轨道跃迁，并最终释放能量回归基态的过程中会产生可被检测的荧光信号。当然不是所有的物质都能被激发产生荧光，只有当该物质与激发光具有相同的频率并在吸收该能量后具有高的荧光效率而非将能量消耗于分子间碰撞过程中，其荧光信号才可被光学设备所检测（Fig.1）。

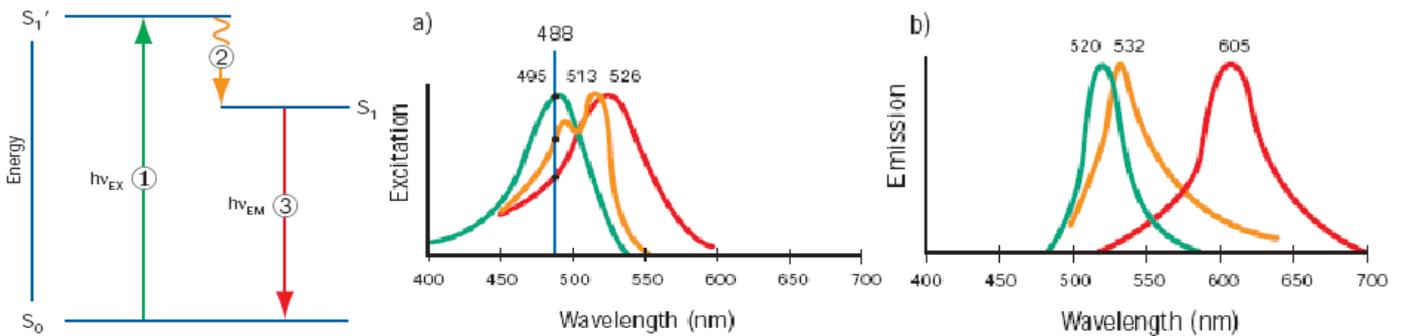


Fig.1 ①激发能②无辐射弛豫能③荧光发射能。三种荧光素（绿色：fluorescein；黄色：DNA-bound TOTOTM；红色：DNA-bound EB）的激发光波长(a)和发射光波长(b)。

荧光成像系统的组件和工作原理：

荧光物质被激发后所发射的荧光信号的强度在一定范围内是与荧光素存在的量成线性关系的，这是荧光成像系统应用于生物学的理论基础，激光扫描系统的性能指标主要有：系统分辨率、线性范围、均一性、灵敏度。

为了实现荧光信号的激发、捕获和放大的检测过程，按照顺序荧光成像系统主要包括以下组件：激发源（Excitation resource）、激光传输组件（Light delivery optics）、荧光收集组件（Light collection optics）、发射滤镜（Emission filter）和信号检测放大组件（Detection and amplification）（Fig.2）。在荧光成像系统工作的过程中，每个组件的性能都关系着最终荧光信号的收集和检测结果。

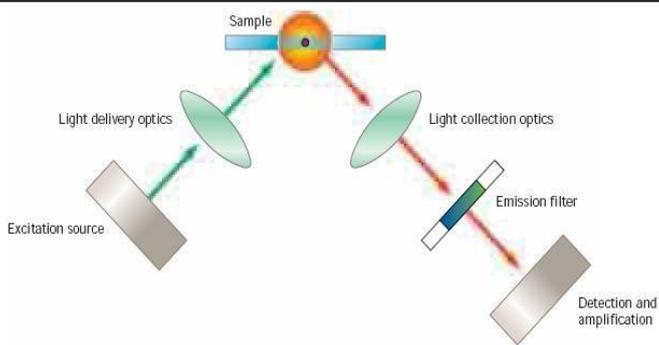


Fig.2 荧光成像系统的基本光学组件和工作原理示意图

1. 现有的激发源主要可分为两大类即：宽波长光源，如紫外、氙灯等；单波长非连续光源，如激光光源。前者主要应用于分光光度计和照相成像系统，可直接照射被检样品。
2. 激光传输组件（Light delivery optics）激光光源还需要一系列透镜和反射镜来导引其完成激发的过程。需要指出的是波长光源也可以通过光栅和滤镜的作用变为窄波长光源。激光传输组件主要在这一过程中起作用。用以将所需波长的光线导向样品，从而保证激发光的单一性。
3. 荧光收集组件（Light collection optics）高质量的光学收集组件应包括透镜、反射镜和滤镜等，负责拟合不同波长的发射光、保证线性关系和透过性。
4. 发射光过滤组件主要通过滤镜来起到收集和过滤杂信号的作用。
5. 信号检测、放大和数字化组件：为了检测荧光光能信号并将其放大、转化成电信号从而进行定量分析，光电倍增管（PMT）、电荷偶联器（CCD）常被人们所选择。该组件的性能通常通过数字化分辨率来表示,它是用来描述在同样信号强度条件下区分不同两个信号的能力，即人们常说的比特（bit），现多为 8-bit, 12-bit 和 16-bit（分别对应为 256 灰阶、4096 灰阶和 65536 灰阶）。

激光光源的选择

现代荧光成像系统的光源选用最多的有两种即：激光（Laser）光源和发光二极管（LED）光源。两者各有各的优势和应用范围，客户应根据实际应用领域选择更合适的光源。

激光光源为单波长非连续光，分辨率和灵敏度较高，如氩离子激光光源能产生 457nm、488nm 和 514nm 的激光，尤其是大家熟悉的 488nm 波长常用来激发蓝色发射光的荧光素物质。除此之外还有氦氖激光（633nm）、Nd:YAG 激光(532nm)等，由于是高能光源所以部分配有制冷装置。二极管激光光源相对其他激光光源要更紧凑简洁，可直接整合到图像扫描设备内，也较经济，一般最长激发波长 635nm。

发光二极管（LEDs）光源作为荧光成像系统的另外一个选择，激发光带宽相对较宽（大于 60nm），能量输出相对较低，所以光源和样品间相聚较近，光程较短。其较激光光源具有更小巧、轻便和经济等特点，应用范围也相当广泛，其激发光最短波长一般大于 430nm。

荧光信号的两种扫描收集系统 振镜式扫描系统：是通过快速摆动反射镜将反射光信号捕获，从而缩短了二维荧光信号的收集时间，同时适用

于收集较厚样品的纵深荧光信号（Fig3）。与此同时，由于收集到的发射荧光信号的角度有一定差别，所以会引起一定的视差偏差效应。通过使用 f-theta 透镜可以使这种视差效应引起的失真影响降到最低。

摆头式扫描系统：该扫描系统的信号接收探头与待扫样品每个点的距离是相等的，通过平移探头来实现等距信号的捕获(Fig.4)。该系统有效避免了捕获信号的视差失真问题，因为是点对点扫描所以信号获取的扫描时间也较长。

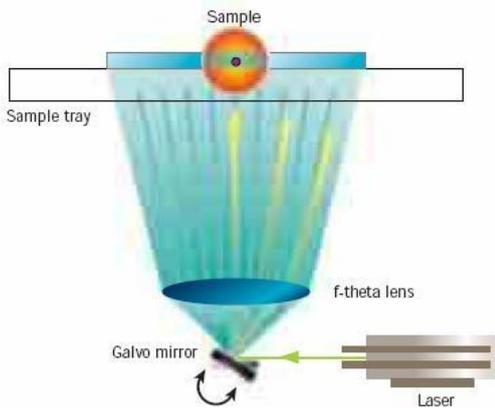


Fig.3 振镜式扫描系统工作示意图。

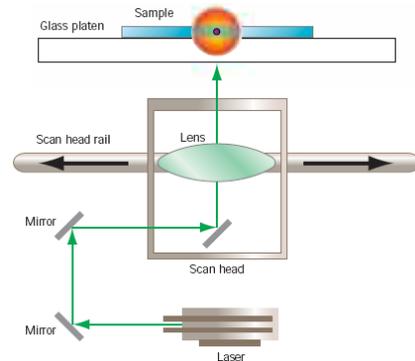


Fig.4 摆头式扫描系统工作示意图

信号的分拣和放大

扫描收集得到的不同波长荧光信号的分拣工作是由分光镜或二向色滤光器配合反射镜完成的，在将不同的波长的荧光信号经过分光器分离、折射后，经过发射滤镜过滤到杂信号后到达光电倍增管（PMT）。PMT 主要是用来放大分拣后的光信号并将其转化成为电信号(Fig.5)。PMT 的放大倍数通常在 10^6 - 10^7 间,转化波长范围一般在 300-800nm 之间。

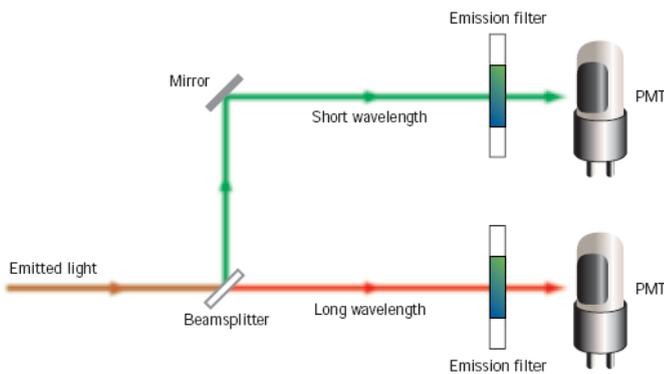


Fig.5 荧光信号的分拣、放大系统工作示意图。

基于 CCD 的成像系统

与激光成像系统不同，基于电荷偶联器（CCD）的照相系统是由聚焦图像到光敏感的 CCD 阵列上的发光系统和透镜组件组成。该系统是整合了来源于连续发光样品区域荧光信号的面积图像采集系统，常被应用于通过调节透镜组件来实现固定或可调焦距，从而达到单次捕捉平面图像信号的目的（Fig.6）。在此过程中光信号将被转变成电信号，通过模数转换器芯片转换成数字信号并放大。

CCD 照相系统的光源多为紫外、白光、光谱氙灯、高能二极管等。针对发射光收集和对于光信号进近不同造成失真可以通过平场校正来修正。

CCD 照相系统的性能好坏取决于系统本身的分辨率、灵敏度、线性和动态范围。现有的 CCDs 上的像素排列范围为 $6\text{-}30\ \mu\text{m}$ ，分辨率在 $512\cdot 512\text{-}4096\cdot 4096$ 之间。CCD 阵列对于光、温度和高能射线都很敏感会影响系统的性能，针对 CCD 进行制冷，将有利于大幅减少背景噪音并改善系统的灵敏度和线性。如温度为 $-35\ ^\circ\text{C}$ 时，CCD 的线性范围将增 2-5 倍，若为了进一步提高其灵敏度还可以在捕获过程中将临近的像素合并，当然这可能会影响图像的分辨率。

动态范围指的是完全饱和电荷水平与背景噪音的比值。例如一个成像系统的像素为 $15\cdot 15\ \mu\text{m}$ 、面积为 $225\ \mu\text{m}^2$ 、饱和度为 180 000 而背景噪音为 10，则该成像系统的动态范围为 18 000:1，由此可见动态范围受到背景噪音的影响。

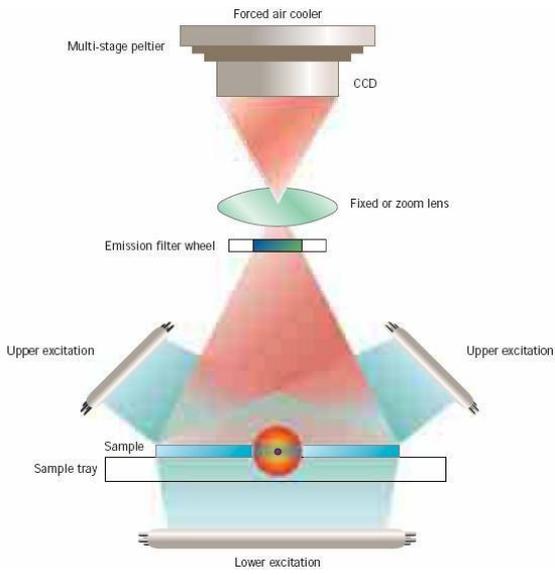


Fig.6 基于电荷偶联器（CCD）的成像原理示意图

----- 以上资料转自 GE Healthcare Life Science