



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111398230 A

(43)申请公布日 2020.07.10

(21)申请号 202010223707.4

(22)申请日 2020.03.26

(66)本国优先权数据

PCT/CN2019/079779 2019.03.27 CN

(71)申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路800号

(72)发明人 杜长庆 陈松良 杨文钊

(74)专利代理机构 上海汉声知识产权代理有限公司 31236

代理人 胡晶

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

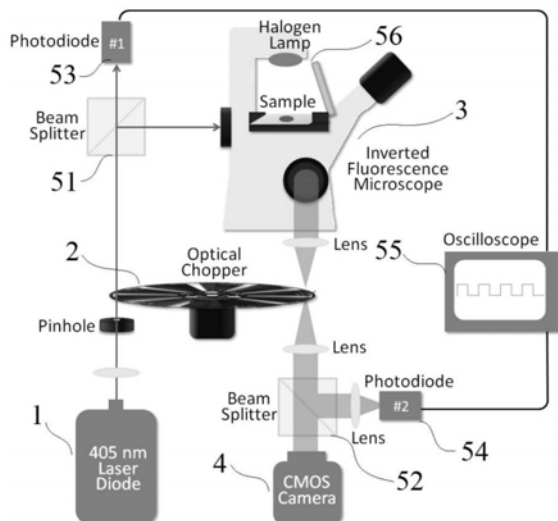
权利要求书1页 说明书9页 附图9页

(54)发明名称

一种时间门控荧光成像系统

(57)摘要

本发明公开了一种时间门控荧光成像系统，包括：连续激发激光器、旋转斩波器、荧光显微镜、成像传感器、辅助校准组件；连续激发激光器的激发光束聚焦于旋转斩波器的第一位置点，并且透过的光束经分束镜分别射向光电探测器、荧光显微镜；荧光显微镜的出射光束聚焦于旋转斩波器的第二位置点，并且透过的光束经分束镜分别射向光电探测器、成像传感器；其中，旋转斩波器用于交替间隔透过激发光束与出射光束；荧光显微镜设有用于发射辅助时间门控校准的光束的辅助光源，光电探测器探测激发光束的激发时间窗口与出射光束的检测时间窗口并在示波器上显示，以辅助荧光系统的时间门控调整，有效提高了时间门控校准的准确度、降低了校准难度。



1. 一种时间门控荧光成像系统,其特征在于,包括:连续激发激光器、旋转斩波器、荧光显微镜、成像传感器、辅助校准组件,所述辅助校准组件包括第一分束镜、第二分束镜、第一光电探测器、第二光电探测器、示波器、辅助光源;

所述连续激发激光器的激发光束聚焦于所述旋转斩波器的第一位置点,并且透过所述第一位置点的所述激发光束经所述第一分束镜分别射向所述第一光电探测器、所述荧光显微镜;

所述荧光显微镜的出射光束聚焦于所述旋转斩波器的第二位置点,并且透过所述第二位置点的所述出射光束经所述第二分束镜分别射向所述第二光电探测器、所述成像传感器;其中,

所述旋转斩波器沿旋转方向均匀设有若干间隔的透过窗口,用于交替间隔透过所述激发光束与所述出射光束;

所述荧光显微镜沿所述出射光束方向设有所述辅助光源,所述辅助光源用于发射辅助时间门控校准的光束,所述第一光电探测器用于探测所述激发光束的激发时间窗口,所述第二光电探测器用于探测所述出射光束的检测时间窗口,所述示波器分别与所述第一光电探测器、所述第二光电探测器信号连接,用于显示所述激发时间窗口与所述检测时间窗口。

2. 根据权利要求1所述的时间门控荧光成像系统,其特征在于,所述荧光显微镜为以硅量子点纳米粒子作为长寿命探针的荧光成像显微镜。

3. 根据权利要求2所述的时间门控荧光成像系统,其特征在于,所述荧光显微镜设有带通激发滤光片、长通二向色镜和长通发射滤光片;

所述带通激发滤光片设于所述荧光显微镜的输入侧,所述激发光束经所述带通激发滤光片照射所述荧光显微镜的待测区域,所述带通激发滤光片用于过滤所述激发光束中的干扰光束;

所述长通二向色镜和所述长通发射滤光片依次设于所述荧光显微镜的输出侧,所述长通二向色镜及所述长通发射滤光片用于滤除经所述待测区域反射后的所述激发光束。

## 一种时间门控荧光成像系统

### 技术领域

[0001] 本发明属于荧光成像技术领域,尤其涉及一种时间门控荧光成像系统。

### 背景技术

[0002] 荧光成像是生物医学研究中必不可少的工具。它有助于将从生物样品中的各种内源性或外源性荧光团发出的荧光信号可视化。当将外源性的探针(例如有机染料和半导体量子点)用于免疫荧光成像时,由于内源性自发荧光信号会像背景噪声一样干扰人们观察实际的荧光探针,降低图像对比度,从而降低诊断的准确性。

[0003] 通常避免这种背景荧光干扰的一种直接方法是将所需的发光光谱移动到近红外(NIR)窗口中,通常在650至900nm范围内,自发荧光最小。但是,近红外荧光有机染料(如吲哚菁绿色,ICG)通常容易发生光漂白,特别是对于长期或延时荧光成像研究而言,其稳定性有问题。抑制背景自发荧光的另一种方法是所谓的时间门控成像,即在每个激发脉冲之后,信号采集不会立即开始。而是会在短暂延迟后,直到短暂的自发荧光(寿命 $<10\text{ns}$ )完全消失,仅探测收集源自外源性探针的长寿命的发光信号用于成像。

[0004] 一方面,在现有技术中,通常采用脉冲激光光源和将光子倍增的图像增强器集成用作超快门,可以将常规的荧光成像系统转换为时间门控荧光成像系统。比如,在将标准的落射荧光显微镜,增强型电荷耦合器件(ICCD)和氩气闪光灯结合使用之后,它可以进行时间门控成像,几乎消除了所有背景发光。这种系统需要使用价格昂贵的增强型电荷耦合器件,通常其成本要比普通电荷耦合器件高得多,并且需要额外的同步电路控制。在其他实现方式中,尽管不需要增强型电荷耦合器件,但脉冲激光光源和高精度的延时控制仍然是必不可少的。值得一提的是,荧光寿命成像方法(FSIM)也可以有效去除背景自发荧光,同时允许时域多路复用。然而,对于每个像素获得时间分辨的荧光衰减,标准的荧光寿命成像方法必须配备多种功能,例如二维图像扫描,与时间相关的单光子计数(TCSPC)和单光子检测。因此,系统不可避免地变得复杂且昂贵,并且图像获取过程相对耗时。

[0005] 另一方面,在现有技术中,基于时间门控成像的荧光成像系统由于荧光还存在衰减现象,使得时间门控都是粗略地进行确定,难以校准,一般需要在保证自发荧光充分完全消失情况下,再探测收集所需的发光信号,如此,虽然可以避免背景荧光干扰,但是一定程度上发光信号也衰减了很多,无法做到避免背景荧光干扰的情况下,还能减少所需的发光信号的衰减量,同时也无法在荧光成像前就可以精准地对时间门控进行校准,以满足荧光成像的所需条件。

### 发明内容

[0006] 为解决荧光成像中时间门控精准度差、难以校准的问题,本发明提供了一种时间门控荧光成像系统。

[0007] 为解决上述问题,本发明的技术方案为:

[0008] 一种时间门控荧光成像系统,包括:连续激发激光器、旋转斩波器、荧光显微镜、成

像传感器、辅助校准组件,辅助校准组件包括第一分束镜、第二分束镜、第一光电探测器、第二光电探测器、示波器、辅助光源;

[0009] 连续激发激光器的激发光束聚焦于旋转斩波器的第一位置点,并且透过第一位置点的激发光束经第一分束镜分别射向第一光电探测器、荧光显微镜;

[0010] 荧光显微镜的出射光束聚焦于旋转斩波器的第二位置点,并且透过第二位置点的出射光束经第二分束镜分别射向第二光电探测器、成像传感器;其中,

[0011] 旋转斩波器沿旋转方向均匀设有若干间隔的透过窗口,用于交替间隔透过激发光束与出射光束;

[0012] 荧光显微镜沿出射光束方向设有辅助光源,辅助光源用于发射辅助时间门控校准的光束,第一光电探测器用于探测激发光束的激发时间窗口,第二光电探测器用于探测出射光束的检测时间窗口,示波器分别与第一光电探测器、第二光电探测器信号连接,用于显示激发时间窗口与检测时间窗口。

[0013] 在其中一个实施例中,荧光显微镜为以硅量子点纳米粒子作为长寿命探针的荧光成像显微镜。

[0014] 在其中一个实施例中,荧光显微镜设有带通激发滤光片、长通二向色镜和长通发射滤光片;

[0015] 带通激发滤光片设于荧光显微镜的输入侧,激发光束经带通激发滤光片照射荧光显微镜的待测区域,带通激发滤光片用于过滤激发光束中的干扰光束;

[0016] 长通二向色镜和长通发射滤光片依次设于荧光显微镜的输出侧,长通二向色镜及长通发射滤光片用于滤除经待测区域反射后的激发光束。

[0017] 本发明与现有技术相比具有以下优点和积极效果:

[0018] 本发明通过辅助校准组件可以实现在荧光成像前对荧光成像系统的时间门控进行辅助校准,其中,通过辅助光源发射辅助时间门控校准的光束,沿发射光束的方向进行发射,由于辅助光源不会有如荧光一样的衰减现象,并可以用来精确模拟荧光成像系统中激发的光束被旋转斩波器间隔透过,如此,克服了原有荧光成像中荧光衰减对时间门控校准的影响,同时,结合分束镜、光电探测器、示波器,对激发光束、出射光束进行探测,得到两路光路的时序信号并在示波器显示时间窗口,就可以精准地检测出时间门控的延迟时间,依据该检测结果就可以精准地对荧光成像系统进行时间门控校准,在荧光成像前就精准达到需要的荧光成像条件,在避免背景荧光干扰的情况下,还能减少所需的发光信号的衰减量。

## 附图说明

[0019] 通过阅读下文优选实施方式的详细描述,各种其他的优点和益处对于本领域普通技术人员将变得清楚明了。附图仅用于示出优选实施方式的目的,而并不认为是对本发明的限制。

[0020] 图1为本发明一个实施例中时间门控荧光成像系统的光路结构图;

[0021] 图2的A与B为本发明一个实施例中时间门控荧光成像系统的时间门控原理图;

[0022] 图3的A与B为本发明一个实施例中时间门控荧光成像系统的示波器展示图;

[0023] 图4为本发明一个实施例中羟基封端的硅量子点纳米粒子(-OH) SiQDNP的合成过程;

- [0024] 图5的A至E为本发明一个实施例中硅量子点纳米粒子SiQDNP的相关测试示意图；
- [0025] 图6为本发明一个实施例中羟基末端和磺酸盐末端的SiQDNP的傅里叶变换红外衰减全反射(FTIR-ATR)光谱示意图；
- [0026] 图7为本发明一个实施例中磺酸根封端的SiQDNP的绝对光致发光量子产率示意图；
- [0027] 图8为本发明一个实施例中磺酸盐封端的SiQDNP水中悬浮液(0.1mg/mL, 375nm激发)的时间分辨光致发光衰减曲线示意图；
- [0028] 图9为本发明一个实施例中用不同浓度的磺酸盐封端的SiQDNP悬浮液处理24小时后SKOV3癌细胞的细胞活力示意图；
- [0029] 图10的A至D为本发明一个实施例中非时间门控和时间门控的荧光图像对比示意图；
- [0030] 图11为本发明一个实施例中GFP、自发荧光、和水中SiQDNP悬浮液的归一化光致发光光谱示意图；
- [0031] 图12的A至T为本发明一个实施例中显微注射了SiQDNP的斑马鱼胚胎和幼虫的明场图像、非时间门控荧光二维与三维图像、时间门控荧光二维与三维图像；
- [0032] 图13为本发明一个实施例中GFP转基因(顶部)和AB菌株野生型(底部)斑马鱼幼虫的明场图像、非时间门控和时间门控荧光图像；
- [0033] 图14为本发明一个实施例中SKOV3癌细胞和CHO细胞的明场图像、非时间门控和时间门控荧光图像。
- [0034] 附图标记说明：
- [0035] 1-连续激发激光器；2-旋转斩波器；3-荧光显微镜；4-成像传感器；51-第一分束镜；52-第二分束镜；53-第一光电探测器；54-第二光电探测器；55-示波器；56-辅助光源。

## 具体实施方式

[0036] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案，下面将对照附图说明本发明的具体实施方式。显而易见地，下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图，并获得其他的实施方式。

[0037] 为使图面简洁，各图中只示意性地表示出了与本发明相关的部分，它们并不代表其作为产品的实际结构。另外，以使图面简洁便于理解，在有些图中具有相同结构或功能的部件，仅示意性地绘示了其中的一个，或仅标出了其中的一个。在本文中，“一个”不仅表示“仅此一个”，也可以表示“多于一个”的情形。

[0038] 参看图1，本申请提供了一种时间门控荧光成像系统，包括：连续激发激光器1、旋转斩波器2、荧光显微镜3、成像传感器4、辅助校准组件，辅助校准组件包括第一分束镜51、第二分束镜52、第一光电探测器53、第二光电探测器54、示波器55、辅助光源56；

[0039] 连续激发激光器1的激发光束聚焦于旋转斩波器2的第一位置点，并且透过第一位置点的激发光束经第一分束镜51分别射向第一光电探测器53、荧光显微镜3；

[0040] 荧光显微镜3的出射光束聚焦于旋转斩波器2的第二位置点，并且透过第二位置点的出射光束经第二分束镜52分别射向第二光电探测器54、成像传感器4；其中，

[0041] 旋转斩波器2沿旋转方向均匀设有若干间隔的透过窗口,用于交替间隔透过激发光束与出射光束;

[0042] 荧光显微镜3沿出射光束方向设有辅助光源56,辅助光源56用于发射辅助时间门控校准的光束,第一光电探测器53用于探测激发光束的激发时间窗口,第二光电探测器54用于探测出射光束的检测时间窗口,示波器55分别与第一光电探测器53、第二光电探测器54信号连接,用于显示激发时间窗口与检测时间窗口。

[0043] 现对本实施例进行详细说明,但不仅限于此:

[0044] 本实施例提出了一种构成简单、经济高效且高性能的时间门控荧光成像系统,仅需使用非增强型成像传感器和连续激光器作为激发光源,如图1所示,由405nm二极管连续激光器产生的激发光束首先穿过聚焦透镜,然后穿过针孔,以在旋转斩波器上产生焦点。在激发时间窗口中,激发光束通过旋转斩波器,并在由分束器反射后进入倒置荧光显微镜,激发时间窗口为激发光束透过旋转斩波器的时间段。

[0045] 如图1所示,从显微镜侧面出口发出的发射光束首先被一个聚焦透镜聚焦在旋转斩波器上,在探测时间窗口中,即发射光束透过旋转斩波器的时间段,激发光束通过旋转斩波器,然后被另一个聚焦透镜准直,穿过另一个分束器,最后进入互补金属氧化物半导体(CMOS)的成像传感器。只要旋转斩波器继续旋转,上述激发-探测周期就会继续重复。同时,互补金属氧化物半导体成像传感器对每个周期在一定时间段内获得的荧光信号进行积分,直到获得良好的信噪比为止。

[0046] 参看图2A,表示在一个激发-探测周期的四个连续时间点处相对于旋转斩波器的激发(Excitation)和发射(Emission)焦点的位置示意图,激发焦点位置即第一位置点,发射焦点位置即第二位置点,参看图2B,表示理想的激发和探测时间窗口,每一激发时间窗口后都设有20 $\mu$ s的延迟再为探测时间窗口。为了说明本实施例的时间门控原理,假设两个焦点(代表激发光束焦点的十字中心和代表发射光束焦点的十字中心)无限小,值得注意的是,图2中两个焦点自始至终没有移动,而是旋转斩波器沿顺时针方向旋转:从T1到T2,只有激发光束可以通过斩波器;从T2到T3,激发光束和发射光束都被阻挡,在此期间,短寿命荧光信号完全衰减;从T3到T4,只有长寿命荧光信号组成的发射光束可以通过斩波器并被收集以进行成像;从T4到T1,激发光束和发射光束再次被阻挡。如此,旋转斩波器持续旋转就可实现如图2B所示的荧光成像的时间门控。基于上述时间门控原理,本实施例可以通过调整上述中的第一位置点和第二位置点就可以实现时间门控的调整,改变激发时间窗口与探测时间窗口之间的延迟时间,具体地,第一位置点可通过调整激发光束的光路使得其发生偏移,第二位置点可通过调整发射光束的光路使得其发生偏移,其中一种实现方式可通过平行设置透镜组就可以实现位置点的移动。

[0047] 参看图2,本实施例采用了10槽(36°)斩波器,相应的角度为T1(0+36n)°,T2(14.4+36n)°,T3(15+36n)°和T4(29.4+36n)°,其中n为整数,在有限的聚焦尺寸下,光束被斩波器阻挡或穿过斩波器的过程以渐进的方式而不是瞬时地发生。假设两个焦点的大小约为1mm,并且旋转斩波器(10槽刀片,占空比40%,直径101.6mm)以5100rpm的速度旋转,那么理论上可以激发光束与发射光束之间产生20 $\mu$ s的延迟,该延迟足以使所有短寿命的发光完全衰减,但是由于20 $\mu$ s延迟后本实施例采用SiQDNP作为探针的荧光强度下降了约75%,因此时间门控荧光图像采集中,成像器使用相对较长的曝光时间(约500至3500毫秒)。

[0048] 为了能够精准地实现时间门控的调整,参看图1,本实施例中提供了一套辅助校准组件,基于该辅助校准组件在荧光成像前就可以精准地检测得到时间门控的延迟时间。其中,荧光显微镜沿出射光束方向设有辅助光源,辅助光源用于发射辅助时间门控校准的光束,其可以采用卤素灯、LED等作为光源,参看图3A,分别由图1中的第一光电探测器和第二光电探测器实验测量的激发和探测时间窗口,为了提取整个探测时间窗口,在旋转斩波器旋转时,发射光束必须保持稳定的光功率,因此,在这里,发射光束是通过将荧光显微镜从荧光模式切换到明场模式,即打开辅助光源来产生发射光束。再者,参看图3B,放大激励时间窗口的下降沿(左侧线)和发射时间窗口的上升沿(右侧线)之间设定了 $20\mu\text{s}$ 延迟,同时,采用SiQDNP作为探针的荧光衰减曲线(中间线)与在完全阻断激发光束时设置的开始时间重叠,可以看到,延迟 $20\mu\text{s}$ 后,SiQDNP荧光强度下降约75%。若以该荧光信号作为发射信号进行光电探测,由于荧光衰减现象,发射信号会成像快速衰减,则对于光电探测器的信号检测会造成严重影响,也就无法提取到整个探测时间窗口,而本实施例采用辅助光源就可以很好地避免了荧光衰减对时间门控的测量的影响,能够完整地检测到发射光束的探测时间窗口。

[0049] 参看图1,本实施例的第一光电探测器设置在第一分束镜位置的一侧,用于探测激发光束的激发时间窗口,第二光电探测器设置在第二分束镜位置的一侧,用于探测出射光束的检测时间窗口,第一、二光电探测器能够探测到激发光束、发射光束的有无得到对应的时序信号,示波器分别与第一光电探测器、第二光电探测器信号连接,以显示激发时间窗口与检测时间窗口,通过示波器就可以直观、精准地确认荧光成像系统时间门控的激发-探测时间窗口,从而可以进行时间门控精准的调整,也就可以做到在避免背景荧光干扰的情况下,还能减少所需的发光信号的衰减量。

[0050] 本实施例中,荧光显微镜设有带通激发滤光片、长通二向色镜和长通发射滤光片;带通激发滤光片设于荧光显微镜的输入侧,激发光束经带通激发滤光片照射荧光显微镜的待测区域,带通激发滤光片用于过滤激发光束中的干扰光束;长通二向色镜和长通发射滤光片依次设于荧光显微镜的输出侧,长通二向色镜及长通发射滤光片用于滤除经待测区域反射后的激发光束。具体地,在显微镜的光源入口处测得的激发光功率约为 $50\text{mW}$ ,荧光显微镜配备了带通激发滤光片( $395\text{-}415\text{nm}$ ),长通二向色镜( $>460\text{nm}$ )和长通发射滤光片( $>475\text{nm}$ ),它们组合起来适用于 $405\text{nm}$ 激发并允许高效的荧光硅量子点纳米粒子SiQDNPs的整个荧光光谱被收集探测用于成像。

[0051] 实施例将高效的荧光硅量子点纳米粒子(SiQDNPs)用作时间门控荧光成像的长寿命探针。与其他由稀土或过渡金属(例如铈,钕和镧系元素络合物)组成的长寿命探针相比,硅基纳米材料通常具有更高的生物相容性。

[0052] 本实施例通过开发的一种新的自顶向下方法合成的SiQDNPs(图4),其总体颗粒大小多数在 $100\text{至}200\text{nm}$ 之间(图5A),它们具有不规则形状和介孔表面(图5B)的特征,附着了大小约为 $5\text{nm}$ 的晶体硅量子点簇。(图5C)。在这里,所有的SiQDNPs都被磺酸盐(图6),从而为斑马鱼胚胎或幼虫的显微注射提供了极好的水溶性。SiQDNP悬浮液显示 $300\text{至}500\text{nm}$ 的宽激发波长范围,并在紫外线范围内具有强吸收性(图5D)。在 $365\text{nm}$ 激发下,SiQDNP悬浮液发出峰值波长位于 $626\text{nm}$ 的强红色光致发光(图5D),测得光致发光的量子效率为 $5.3\%$ (图7)。此外,由于光激发电荷载流子通过与Si-O-Si键相关的氧化物相关表面缺陷的辐射复合,

SiQDNP悬浮液的光致发光寿命约为 $16\mu\text{s}$  (图5E和图8),通常在 $950$ 至 $1300\text{cm}^{-1}$ 处表现强烈的红外吸收(图6)。体外细胞生存力分析表明,磺酸盐封端的SiQDNP具有50%的细胞生存力(IC<sub>50</sub>)大于 $640\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抑制性颗粒浓度(图9),远高于其他基于镉的量子点的IC<sub>50</sub>(约 $10$ 至 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ ),证实了SiQDNP的生物相容性。

[0053] 现结合图4至图9对本实施例将荧光硅量子点纳米粒子(SiQDNPs)用作时间门控荧光成像的长寿命探针进行说明:

[0054] 参看图4,本实施例通过开发的一种新的自顶向下方法合成的SiQDNPs,包括以下步骤:步骤A:在含氢氟酸和甲醇的电解质中进行电化学蚀刻;步骤B:白光诱导的光化学加氢硅化反应,其纯净的10-Undecen-1-ol在无氧条件下进行;步骤C:多孔硅层的机械粉碎;步骤D:在粉碎的硅粉上用氧化锆珠进行高能球磨;步骤E:在经过研磨的硅粉上进行选择性蚀刻由 $\text{HNO}_3$ 和 $\text{HF}$ 组成的水性蚀刻剂,其上被氧化硅覆盖的非辐射体硅部分被蚀刻掉,而具有10-Undecen-1-ol钝化的光致发光SiQD得以保留;步骤F:通过与氯磺酸反应,将羟基封端的SiQDNP进一步转化为磺酸盐封端的(-SO<sub>3</sub>-)。

[0055] 具体地,磺酸盐封端的SiQDNP的合成:羟基封端的SiQDNPs按照先前开发的方法合成,如图4所示。通过使羟基封端的SiQDNP与四氢呋喃(THF)中的5重量%氯磺酸反应3小时,进一步将其转化为磺酸酯封端的SiQDNP。随后,将悬浮液通过离心沉淀,然后将上清液倾析并通过均质化再分散。该过程用THF然后再用去离子水重复至少两次,以除去过量的反应物和其他杂质。生成的磺酸盐封端的SiQDNP形成均匀且稳定的水( $1\text{mg}/\text{mL}$ )悬浮液,并在显微注射之前保存在 $4^\circ\text{C}$ 下。

[0056] 参看图5,图5A通过动态光散射法获得的,磺酸盐封端的SiQDNP悬浮液在水中的粒径分布。图5B具有不规则形状和中孔表面的典型SiQDNP的透射电子显微镜图像。插图显示了整个SiQDNP的电子衍射图。从理论上讲,包括附着在粒子表面的硅量子点在内的SiQDNP由晶体硅组成,因为它们都是从一个晶体硅晶片上收获的。然而,由于高度多孔的表面包含各种晶体取向的复杂晶体结构,因此对于整个SiQDNP观察到多晶状电子衍射图。图5(C)在SiQDNP表面拍摄的高分辨率透射电子显微镜图像。清晰显示了大小约为 $5\text{nm}$ 的晶体硅量子点。图5D磺酸盐封端的SiQDNP悬浮液在水中( $0.1\text{mg}/\text{mL}$ )的吸光度(灰线),光致发光(PL,红线)和光致发光激发(PLE,蓝线)光谱。插图分别显示了在室内光线和 $365\text{nm}$ 紫外线(UV)光线下SiQDNP悬浮液的照片。图5E时间终止的磺酸盐终止的SiQDNP悬浮液在水中的时间分辨光致发光衰减( $0.1\text{mg}/\text{mL}$ , $375\text{nm}$ 激发)。

[0057] 参看图6,上述方法得到所有的SiQDNPs都被磺酸盐,具体地,从右到左的灰色高亮区域表示 $\text{A0-SiH}\delta$  ( $870\text{cm}^{-1}$ ), $\text{BSi-O-Siv}$  ( $950$ 至 $1300\text{cm}^{-1}$ ), $(\text{C})\text{S=Ov}$  ( $1200\text{cm}^{-1}$ ), $\text{DS=Ov}$  ( $1350\text{cm}^{-1}$ ), $\text{ECH}\delta$  ( $1450\text{cm}^{-1}$ ), $(\text{F})\text{Si-Hv}$  ( $2100\text{cm}^{-1}$ ), $(\text{G})\text{O-SiHv}$  ( $2260\text{cm}^{-1}$ ), $(\text{H})\text{CHv}$  ( $2925$ 和 $2855\text{cm}^{-1}$ )和 $(\text{I})\text{OHv}$  ( $2500$ 至 $3700\text{cm}^{-1}$ )。 $\text{CH}\delta$ 和 $\text{CHv}$ 吸收峰主要来自通过光化学氢化硅烷化作用接枝到SiQD表面的10-Undecen-1-ol分子。 $\text{S=Ov}$ 和 $\text{OHv}$ 吸收峰证实了与氯磺酸反应形成的磺酸根。对于表面氧化的SiQD, $\text{O-SiH}\delta$ , $\text{Si-O-Siv}$ , $\text{Si-Hv}$ 和 $\text{O-SiHv}$ 吸收峰是典型的。 $(\nu,$ 拉伸; $\delta,$ 变形)。从而为斑马鱼胚胎或幼虫的显微注射提供了极好的水溶性。

[0058] 参看图7,上述方法得到的磺酸盐封端的SiQDNP测得光致发光的量子效率为5.3%。由配备有预先校准的积分球的荧光计测量的光谱,用于计算分散在水中( $0.1\text{mg}/\text{mL}$ )的磺酸根封端的SiQDNP的绝对光致发光量子产率(PLQY),在这里,仅使用水测量水对应的



曲线,而使用SiQDNP悬浮液测量SiQDNP悬浮液对应的曲线。激发脉冲的中心波长位于365nm,  $PLQY = \text{SiQDNP}s \text{ 发射的光致发光光子} / \text{SiQDNP}s \text{ 吸收的激发光子} = (\text{SiQDNP 悬浮液对应的曲线下方的积分区域} - \text{水对应的曲线下方} 500\text{nm至} 800\text{nm} \text{的积分区域}) / (\text{水对应的曲线下方的积分区域} - \text{SiQDNP 悬浮液对应的曲线下方} 350\text{到} 380\text{nm} \text{的积分区域})$ 。

[0059] 参看图8,磺酸盐封端的SiQDNP水中悬浮液(0.1mg/mL,375nm激发)的时间分辨光致发光衰减曲线(Y:光子计数,X:时间,以微秒为单位)。拟合时间分辨的光致发光衰减曲线和估计的PL寿命( $\tau$ )的线方程式显示在右侧。

[0060] 参看图9,用不同浓度的磺酸盐封端的SiQDNP悬浮液处理24小时后,SKOV3癌细胞的细胞活力。首先,将SKOV3癌细胞均匀分散在含10%FBS的DMEM中,接种到96孔板中,每100 $\mu$ L每孔 $5 \times 10^3$ 个细胞,并在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下孵育24小时以上。其次,将每个孔中的培养基替换为DMEM中具有各自浓度(0、20、40、80、160、320和640 $\mu$ g/mL)的SiQDNP悬浮液,然后孵育24小时。第三,去除SiQDNP悬浮液。每个孔用PBS冲洗一次,并加入100 $\mu$ L新鲜制备的MTT溶液(PBS中500 $\mu$ g/mL,并用0.22 $\mu$ m注射器过滤器过滤),然后孵育4小时。第四,除去每个孔中的MTT溶液,并添加100 $\mu$ L DMSO。将96孔板在室温下轻轻涡旋15分钟。最后,使用ELISA微孔板读数器(ThermoScientificVarioskanFlask),通过相对于对照(0 $\mu$ g/mL)分别用SiQDNP浓度处理的每个孔在570nm的吸光度确定细胞活力。进行三次完整的测定,并对结果取平均值。

[0061] 为了更好地说明时间门控荧光成像系统的控制延时的机制,参看图10,将异硫氰酸荧光素(FITC)和SiQDNP并排制成样本进行成像,二维和三维非时间门控(A和B)和时间门控(C和D)的荧光图像,z轴为FITC和SiQDNP的强度,使用10倍的显微物镜,二维图像的分辨率为1100 $\times$ 1100像素,标记区域的大小为40 $\times$ 40像素,比例尺等于100 $\mu$ m,在非时间门控和时间门控模式下,CMOS成像器的曝光时间分别为5ms和600ms,在时间门控模式下,旋转斩波器的转速保持在5100rpm。该样本将一滴浓缩的磺酸盐封端的SiQDNP悬浮液置于水中,与异硫氰酸荧光素和环氧树脂的混合物相邻。由于该疏水性的树脂耐水,所以形成了将FITC区域与SiQDNP区域分隔开的清晰边界线。在非时间门控成像模式下(图10A和10B),FITC区域显示的平均荧光强度是SiQDNP区域的5倍,可以将其转换为信噪比=0.2(假设SiQDNP荧光被视为信号,FITC荧光被视为背景噪声)。作为比较,在相同的位置但在时间门控模式下(图10C和10D)拍摄图像,图像平均信噪比提高到6.86,相当于提高了约34倍。特别是,如果仅考虑FITC侧的绿色标记区域和SiQDNP侧的红色标记区域,则信噪比将从0.34增加到时间门控模式下的117.68,从而提高了约346倍。此外,在切换到时间门控模式后,最初在非时间门控模式下被超强FITC荧光掩盖的SiQDNP一侧的精细表面特征变得清晰可见。

[0062] 为了更好地说明时间门控荧光成像系统的荧光成像效果,本实施例以斑马鱼胚胎为样本进行荧光成像。斑马鱼胚胎已被广泛用作研究脊椎动物胚胎学的动物模型,这主要是因为它们具有光学透明性,从而可以从外部直接研究活体胚胎的内部发育。但是,胚胎,特别是卵黄囊部位的胚胎,通常带有很强的自发荧光,如图11所示,由于其宽光谱分布,很难用光学滤光片将其去除。

[0063] 具体地,参看图12,(A,F,K,P)为显微注射了SiQDNP的斑马鱼胚胎和幼虫的明视场图像。显微注射部位和方向由红色箭头指示。(B,G,L,Q)二维非时间门控荧光图像,(C,H,M,R)其对应的三维图像,其z轴为显微注射的斑马鱼胚胎和幼虫的荧光信号强度。(D,I,N,S)二维时间门控荧光图像,(E,J,O,T)其相应的三维图像,其z轴为显微注射的斑马鱼胚胎

和幼虫的荧光信号强度。所有图像均使用10倍显微物镜。比例尺等于100 $\mu\text{m}$ 。在面板B和D中，二维图像的分辨率为1280 $\times$ 1280像素，红色和绿色标记区域的尺寸为40 $\times$ 40像素。在非时间门控和时间门控模式下，CMOS成像器的曝光时间分别约为400和3500ms。光斩波器的转速保持在5100rpm。

[0064] 本实施例在成像之前，如图12中的箭头所示，将约5nL的SiQDNP水中悬浮液(1mg/mL)显微注射到活着的AB菌株野生型斑马鱼胚胎的胚胎细胞中。值得注意的是，显微注射后未观察到对胚胎的明显不利影响。在非时间门控模式下(图12B和12C)，显微注射的SiQDNP基本不可见，因为附近的卵黄囊发出的自发荧光占主要地位，在图12B中标记区域之间的信噪比低至0.58，此处估计为平均荧光强度。作为对比，在时间门控模式下(图12D和12E)，可以清楚地观察到显微注射的SiQDNP在胚胎细胞之间的分布，因为时间门控有效去除背景自发荧光。结果信噪比增加至26.07，提高了约45倍。配备了如此出色的背景去除功能，开发的光机械定时门限荧光成像系统可以有前途的成为斑马鱼生物学的平台，例如沿袭追踪和荧光成像，以及用于临床应用，例如前哨淋巴结定位。尽管使用类似的时间门控荧光成像和发光多孔硅纳米粒子对小鼠进行体内的成像信噪比提高了100倍以上已经被证明了，但它采用价格昂贵的成像系统，如ICCD和脉冲激光光源。

[0065] 为了制备AB菌株野生型斑马鱼胚胎样品，将一到四细胞龄的胚胎排列在1.5%琼脂糖底物的凹槽中。将在水中浓度为1mg/mL的磺酸盐封端的iQDNP悬浮液装入微针中，然后将其插入微注射器中。在立体显微镜下，在微米载玻片上预先校准显微注射量。持续向每个胚胎的细胞部分微注射5nL SiQDNP悬浮液。体视显微镜。用E3培养基冲洗后，将显微注射的胚胎立即固定在低熔点琼脂糖中，并置于光机械时控荧光成像系统中进行成像。对于GFP转基因斑马鱼幼虫样品，其制备过程与之前相同，不同的是使用受精后(hpf)的幼体26小时，并将它们暴露于三卡因进行麻醉，然后在显微镜下进行显微注射头部，卵黄囊或尾部。

[0066] 除了去除背景以外，本实施例的荧光成像系统还可以时域多路复用，即通过使用光机械时间门控荧光成像系统将长寿命的荧光信号与短寿命的荧光信号分离。与上例所示的AB菌株野生型斑马鱼胚胎不同，这里我们使用GFP转基因斑马鱼幼虫作为示范模型，绿荧光蛋白使其易于从外部观察其内部结构(如血管系统)。通过分别在幼虫的头部，卵黄囊和尾部进行微量注射(5nL, 1mg/mL)，分别如图12F, 12K和12P中的箭头所示，我们将SiQDNP注射到与具有光致发光寿命(以纳秒为单位)的GFP附近。显微注射不会对活幼虫产生任何重大不利影响。通过比较非时间门控的荧光图像(图12G, 12L和12Q)和时间门控的荧光图像(图12I, 12N和12S)，可以清楚地区分来自SiQDNP的长发光寿命信号与GFP的短发光寿命信号。有趣的是，除了尾部外，发现大多数SiQDNP信号都偏离了头部和卵黄囊的原始显微注射部位(图12I和12N)，这可以归因于SiQDNP通过淋巴系统的扩散和运输。作为对照实验，参看图13，未显微注射SiQDNP的幼虫在延时后的时间门控模式下未显示任何荧光信号，在这里，所有幼虫都没有显微注射SiQDNP。AB菌株野生型斑马鱼幼虫仅表现出自发荧光，主要在卵黄囊部位；GFP转基因斑马鱼幼虫同时显示自发荧光和GFP荧光信号。通过与仅自发荧光的图像进行比较，可以识别GFP荧光信号，如白色箭头所示。最重要的是，如果没有显微注射SiQDNP，则在时间门控模式下没有观察到可检测到的荧光信号。虽然自发荧光也可能包含在非时间门控图像中，但实验上发现其强度比GFP荧光弱，并且主要位于卵黄囊部分。尽管如此，GFP或自发荧光都可以在时间门控模式下被有效去除，而这种完全的信号分离只能通

过时间门控技术在时域内实现,因为在波长解调中,它们的光致发光谱总是小部分重叠(图11所示)。

[0067] 除了斑马鱼模型外,参看图14,还使用SKOV3和CHO细胞对系统进行了细胞成像的验证,所有图像均使用40倍放大物镜。比例尺等于25 $\mu\text{m}$ 。在非时间选通和时间选通模式下,CMOS成像器的曝光时间分别约为500ms和3500ms。在时间门控模式下旋转斩波器的转速保持在5100rpm,结果显示细胞核上染有Hoechst染料的短寿命的荧光信号完全清除,再次证明了系统的时间门控成像的能力。

[0068] 总结,本实施例提供了的时间门控荧光成像系统,该系统可以低成本实现超高对比度的荧光成像。基于常规的落射荧光显微镜,时间门控功能主要由一个旋转斩波器完成,不需要昂贵的增强型电荷耦合器成像设备,脉冲激光光源或精密的同步电路控制。在该系统中,来自405nm连续光电二极管激光器的激发光束和来自荧光显微镜的发射光束都聚焦在一个旋转的旋转斩波器上,并且两个焦点的相位差被定位为使得激发激光光束被阻挡经过20 $\mu\text{s}$ 延迟后,发射光束穿过旋转斩波器,从而由CMOS成像器开始采集图像。其中,本实施例采用具有生物相容性和高度水溶性的SiQDNPs,即一种长发光寿命的探针(荧光寿命在16 $\mu\text{s}$ 左右)和斑马鱼作为活体模型。在时间门控模式下,显微注射了SiQDNPs的斑马鱼胚胎的卵黄囊发出的几乎所有背景自发荧光都被去除,导致信噪比增加了45倍。此外,通过比较非时间门控的荧光图像和时间门控的荧光图像,可以清楚地将转基因斑马鱼幼虫的内在GFP荧光信号与显微注射的SiQDNPs发出的外源荧光信号区分开。由于它的高性价比和与标准荧光成像方法的兼容性,在这项工作中开发的光机械定时门限荧光成像系统有广泛应用于生物学研究和诊断应用的潜在价值。

[0069] 本实施例通过辅助校准组件可以实现在荧光成像前对荧光成像系统的时间门控进行辅助校准,其中,通过辅助光源发射辅助时间门控校准的光束,沿发射光束的方向进行发射,由于辅助光源不会有如荧光一样的衰减现象,并可以用来精确模拟荧光成像系统中激发的光束被旋转斩波器间隔透过,如此,克服了原有荧光成像中荧光衰减对时间门控校准的影响,同时,结合分束镜、光电探测器、示波器,对激发光束、出射光束进行探测,得到两路光路的时序信号并示波器显示时间窗口,就可以精准地检测出时间门控的延迟时间,依据该检测结果就可以精准地对荧光成像系统进行时间门控校准,在荧光成像前就精准达到需要的荧光成像条件,在避免背景荧光干扰的情况下,还能减少所需的发光信号的衰减量。

[0070] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0071] 以上所述实施例仅表达了本发明一些示例性实施例,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

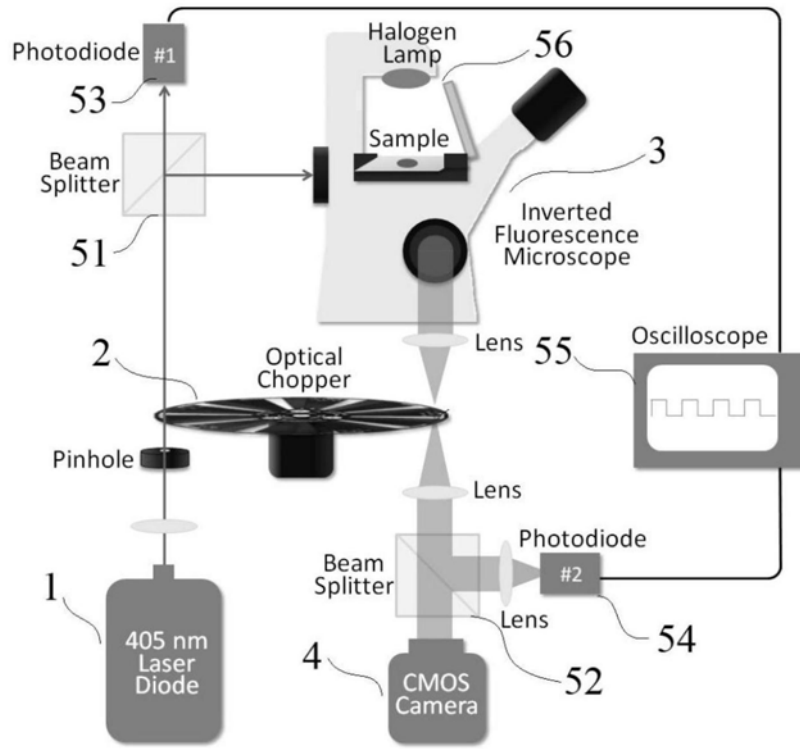


图1

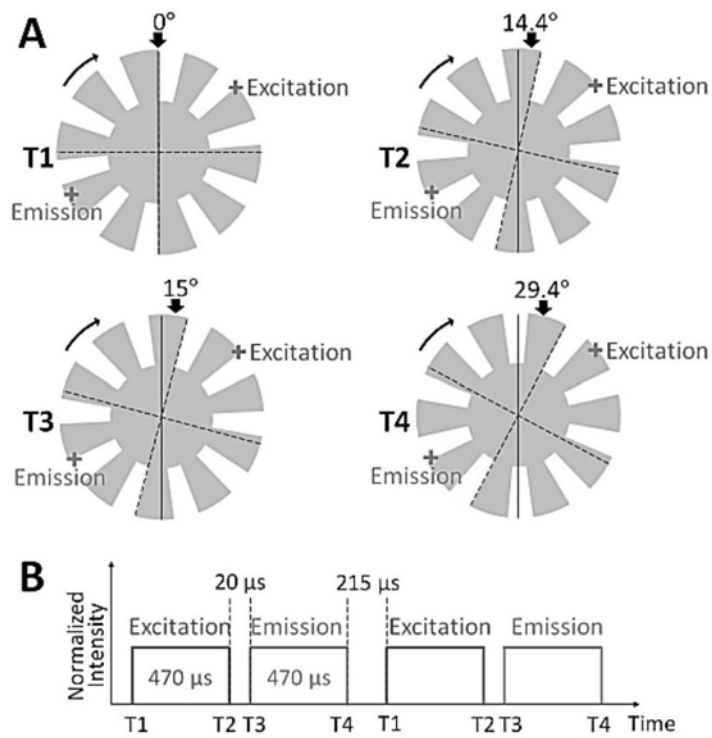


图2

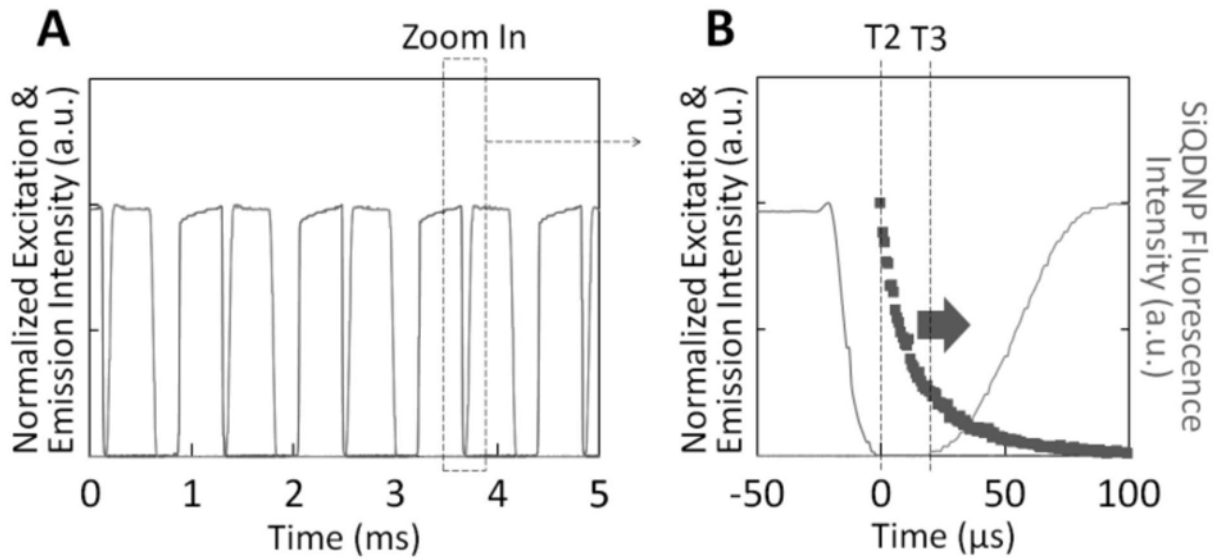


图3

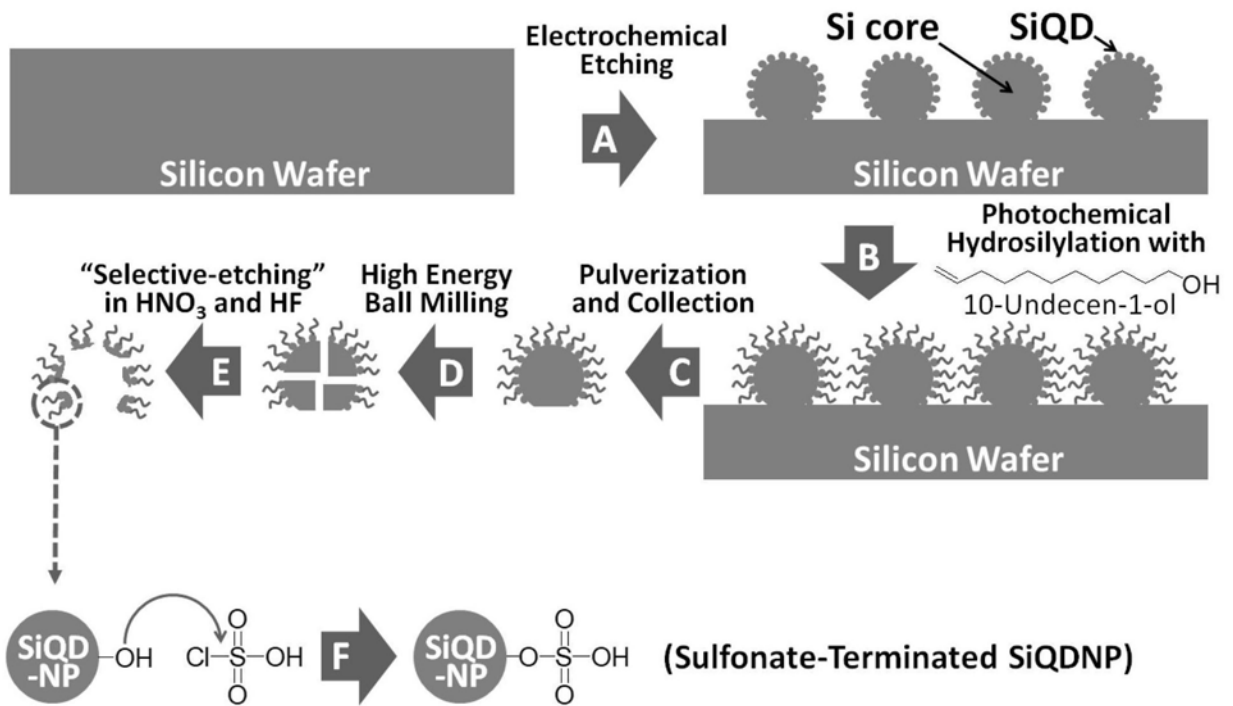


图4

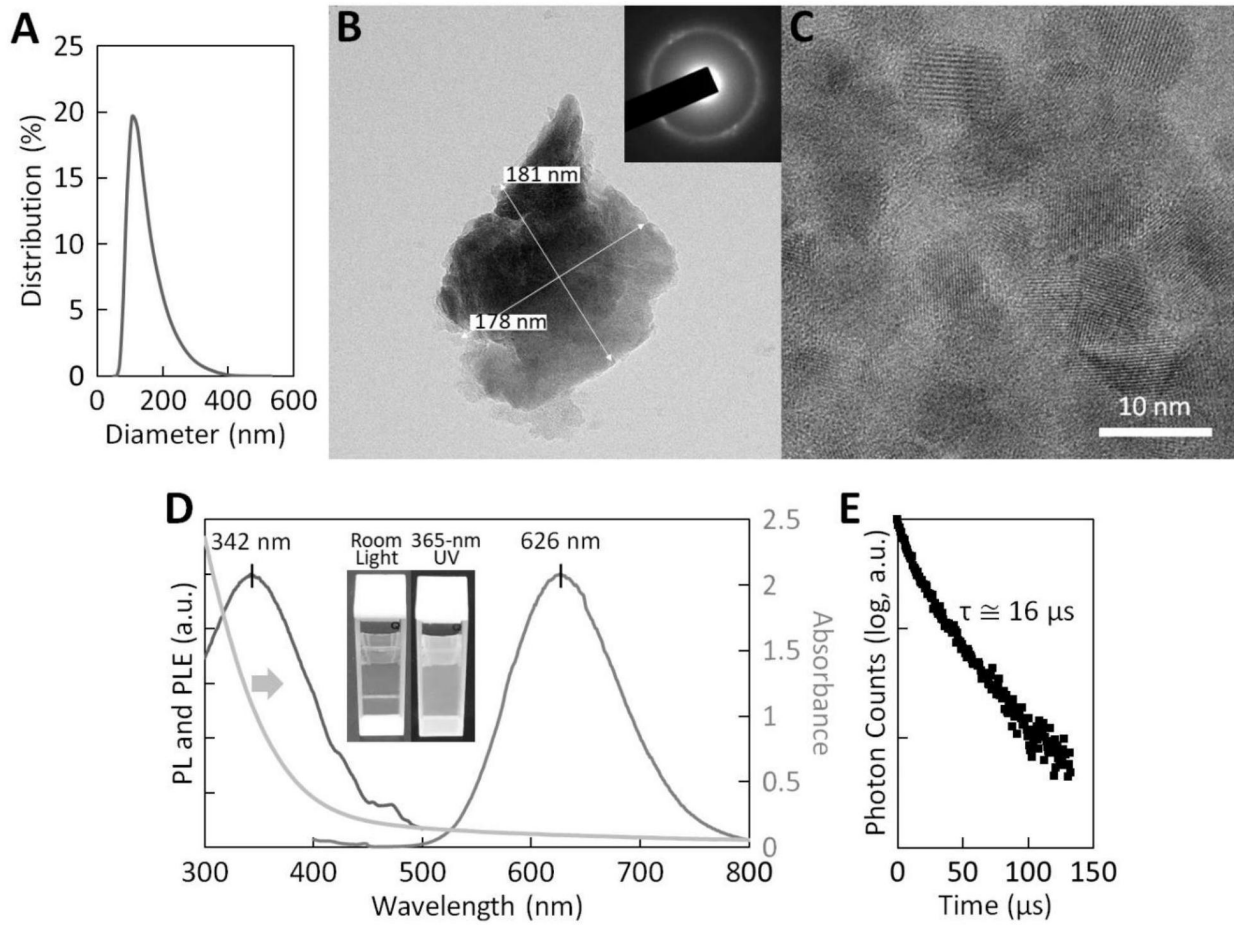


图5

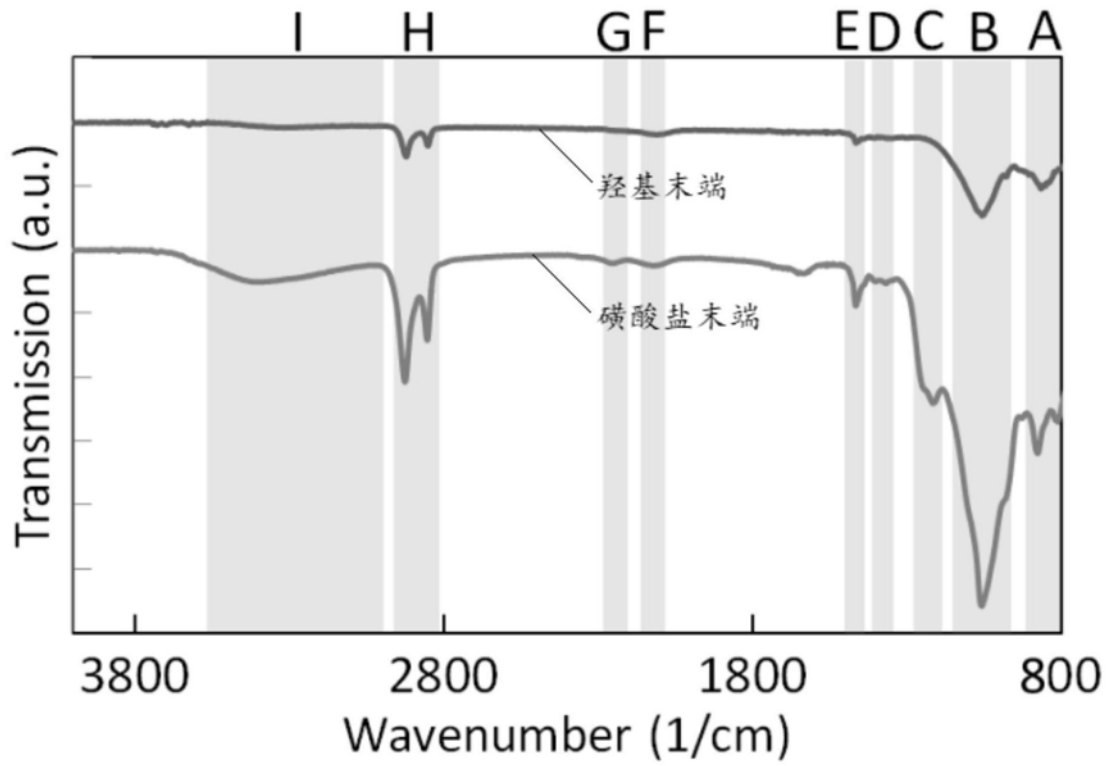


图6

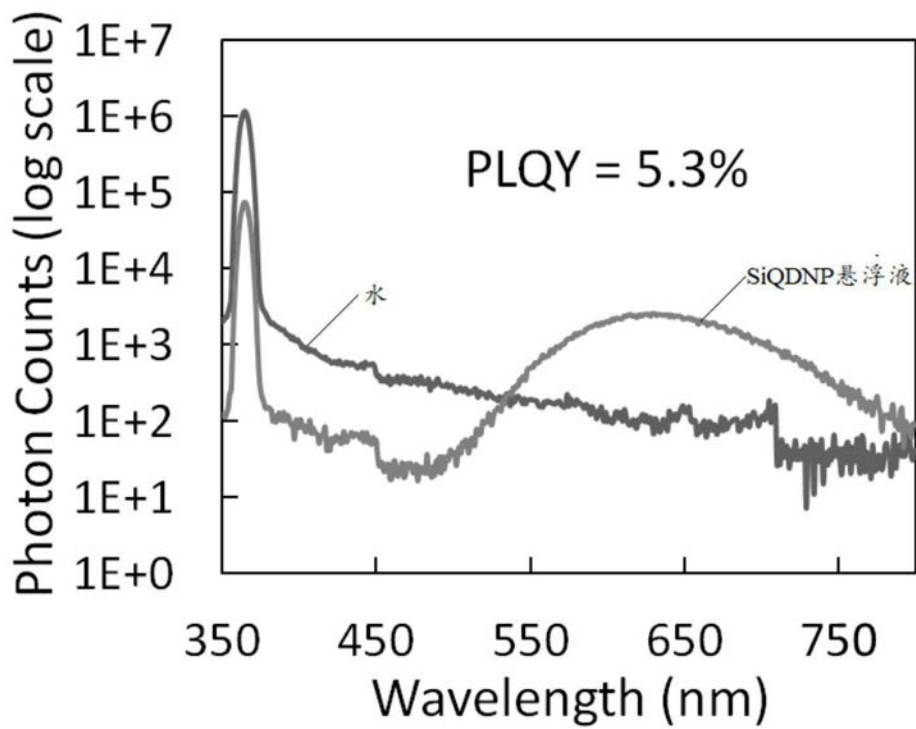


图7

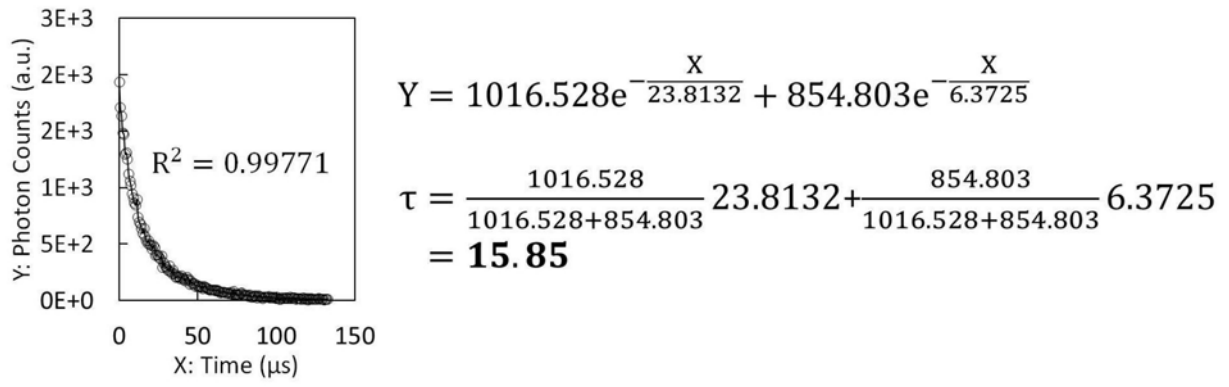


图8

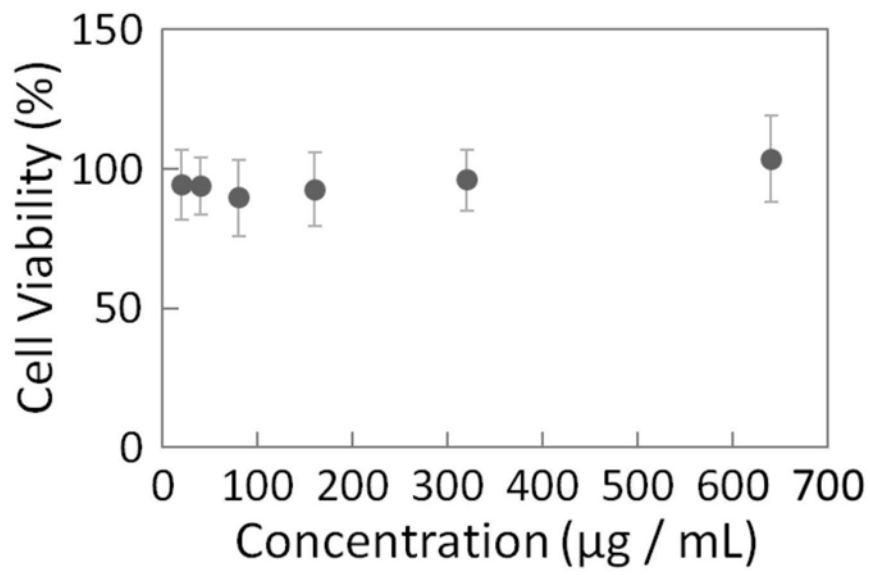


图9



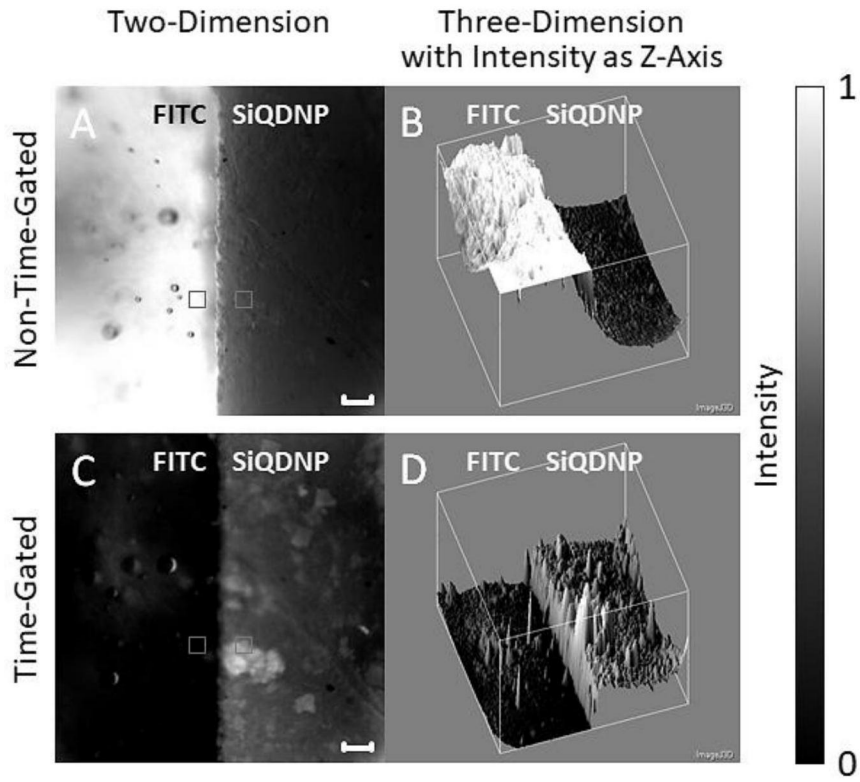


图10

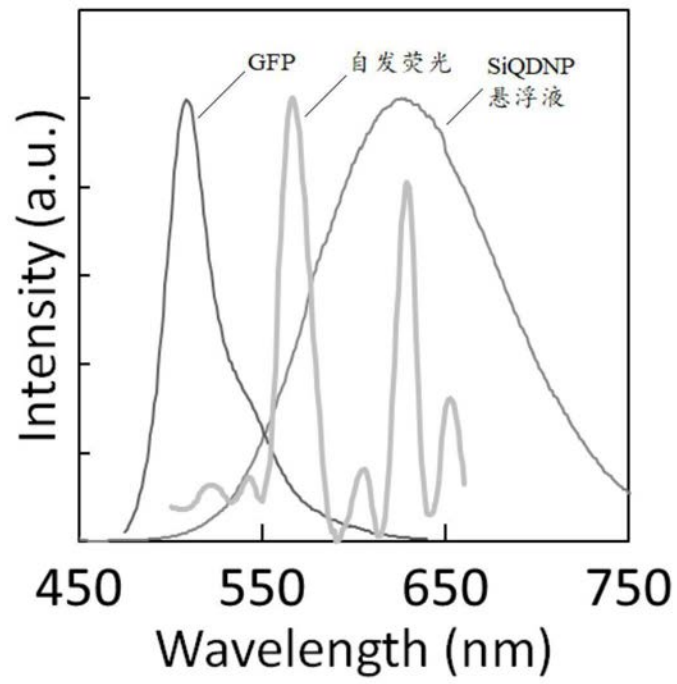


图11

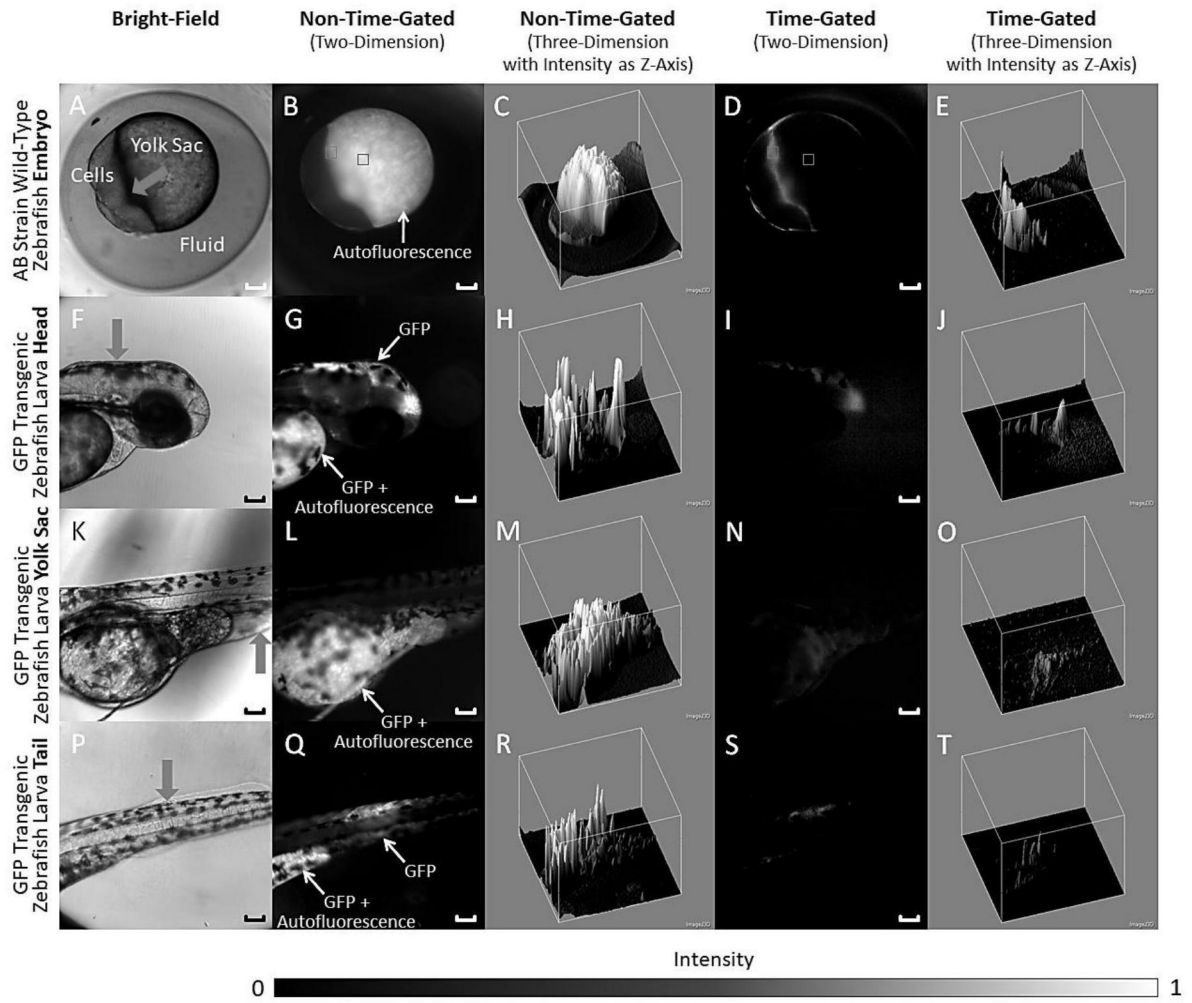


图12

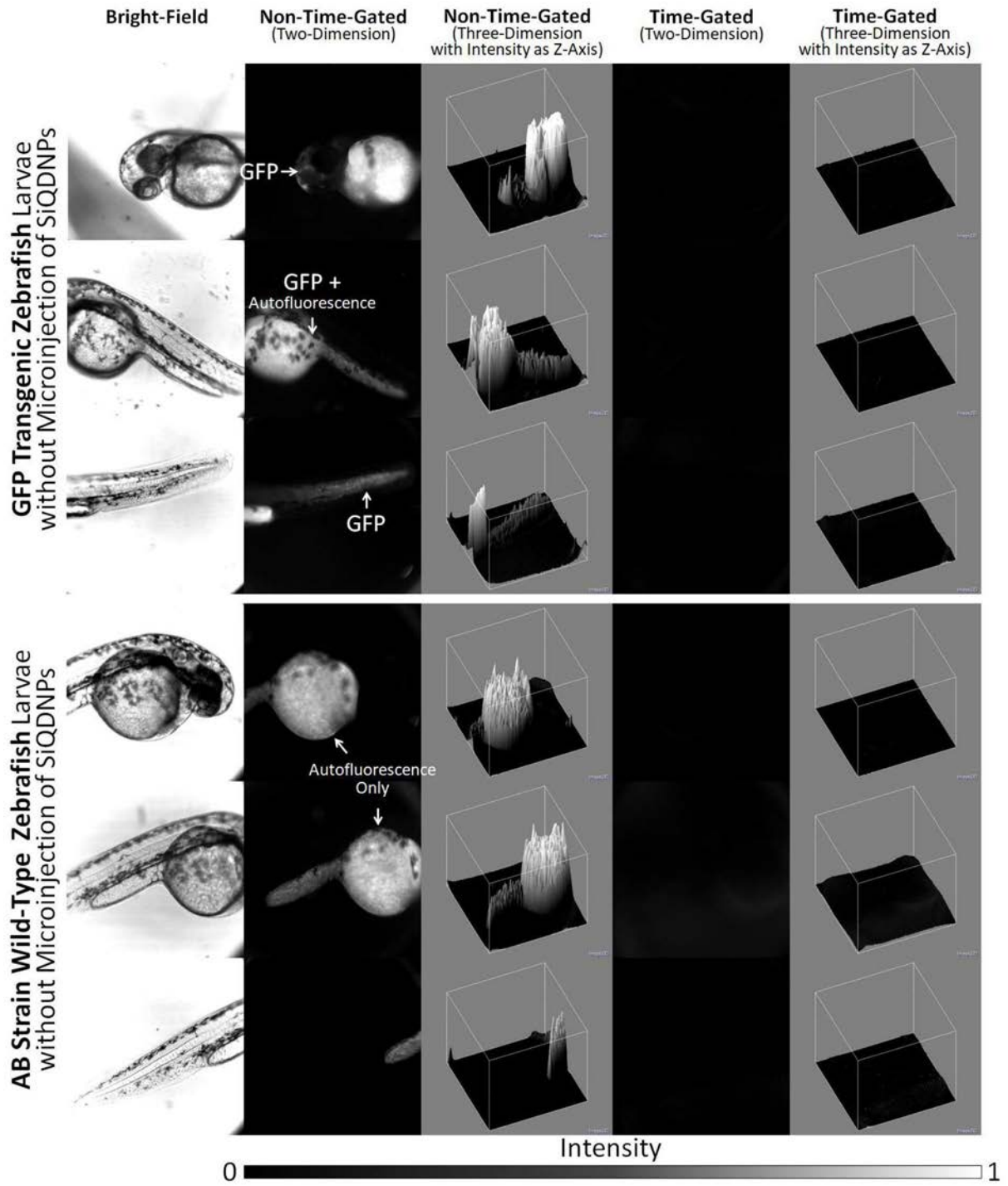


图13

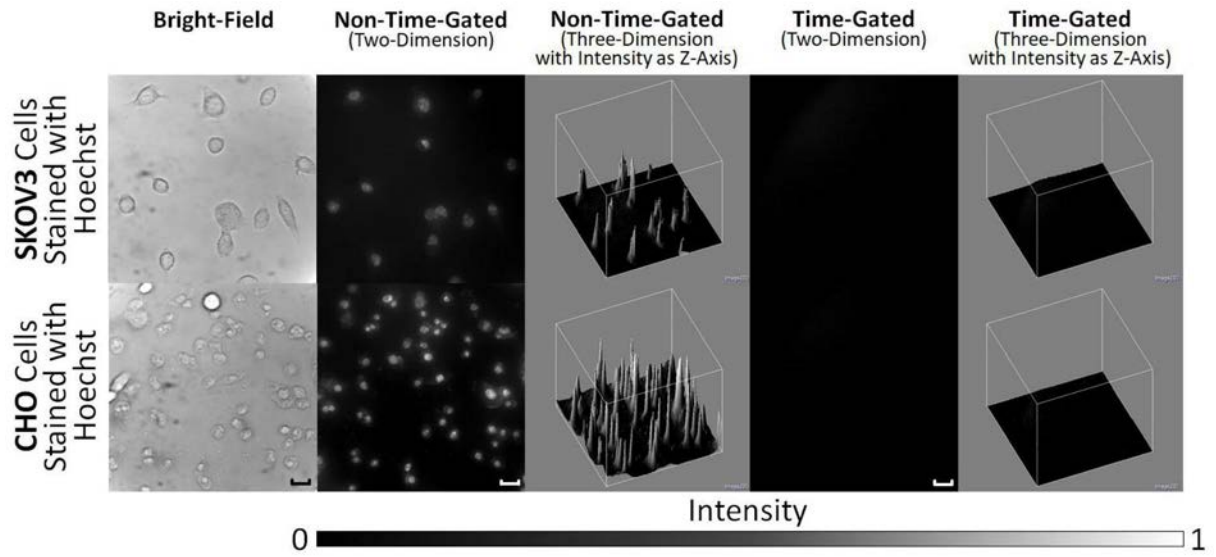


图14