



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104204779 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201380016595. 3

(22) 申请日 2013. 03. 25

(30) 优先权数据

2012-068686 2012. 03. 26 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 09. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2013/060255 2013. 03. 25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/147317 EN 2013. 10. 03

(71) 申请人 奥林巴斯株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 藤田克昌 永井健治 齐藤健太

山中真仁 泷本真一

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 吕俊刚 刘久亮

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006. 01)

G02B 21/00 (2006. 01)

G01N 33/58 (2006. 01)

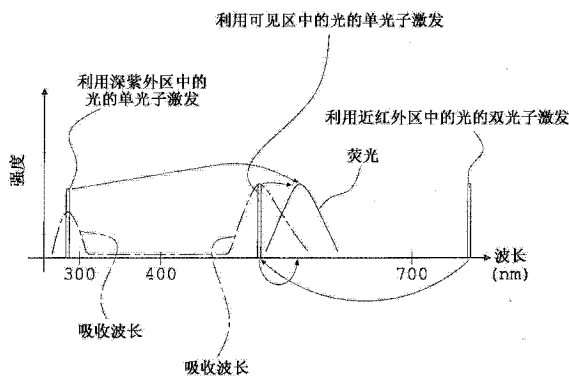
权利要求书1页 说明书12页 附图10页

(54) 发明名称

荧光观察方法和荧光观察设备

(57) 摘要

本发明提供了一种荧光观察方法,其中可在不需要多种激发波长的情况下并且利用简单光学结构同时观察从多种荧光分子发射的多种荧光,荧光分子用作其荧光标签的被观察对象几乎不受损伤,并且可使用通常用于荧光观察的光学材料的玻璃,并且提供了一种荧光观察设备。根据本发明的用于检测从两种或更多种荧光分子发射的多种荧光的荧光观察方法包括以下步骤:利用可见区中的具有等于或小于 700nm 的激发激发波长的光使两种或更多种荧光分子的每种经受多光子激发,以在利用两种或更多种荧光分子的每种的深紫外区中的吸收波长带时产生荧光;以及同时检测在激发光的激发波长的较短波长侧或较短波长侧和较长波长侧二者上产生的多种荧光。



1. 一种用于检测从两种或更多种荧光分子发射的多种荧光的荧光检测方法,其特征在于,该荧光观察方法包括以下步骤:

通过可见区中的具有等于或小于 700nm 的激发波长的激发光对两种或更多种荧光分子的每种进行多光子激发,以利用所述两种或更多种荧光分子的每种的深紫外区中的吸收波长带产生荧光;以及

同时检测在激发光的激发波长的短波长侧、或短波长侧和长波长侧二者上产生的多种荧光。

2. 根据权利要求 1 所述的荧光检测方法,其特征在于,用于荧光检测对象的所述两种或更多种荧光分子的每种具有深紫外区和可见区中的吸收波长带。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的荧光检测方法,其特征在于,所述激发光是超短脉冲激光束。

4. 根据权利要求 1 至 3 的任一项所述的荧光检测方法,其特征在于,利用短通滤波器仅检测在所述激发波长的短波长侧产生的荧光。

5. 根据权利要求 1 至 4 的任一项所述的荧光检测方法,其特征在于,检测在所述激发波长的短波长侧产生的具有 400nm 或更长的波长的荧光。

6. 根据权利要求 1 至 5 的任一项所述的荧光检测方法,其特征在于,以光谱选择的方式检测通过所述多光子激发产生的多种荧光。

7. 根据权利要求 1 至 6 的任一项所述的荧光检测方法,其特征在于,通过共焦检测来检测通过所述多光子激发产生的多种荧光。

8. 根据权利要求 1 至 7 的任一项所述的荧光检测方法,其特征在于,同时检测通过所述多光子激发产生的源于一个光子的荧光和源于两个光子的荧光。

9. 一种荧光观察设备,其特征在于该荧光观察设备包括:

光源,其以高密度发射具有预定波长的光;

二次谐波产生元件,其使用来自所述光源的光产生可见区中的具有 700nm 或更短的波长的二次谐波;以及

显微镜,其被构造成利用由所述二次谐波产生元件产生的光对多种荧光分子进行多光子激发,使得能够同时观察到在所述激发光的波长的短波长侧、或短波长侧和长波长侧二者上产生的多种荧光。

10. 一种荧光观察设备,其特征在于,该荧光观察设备包括:

激发光产生单元,其一体地设置有

光源,其以高密度发射具有预定波长的光,以及

二次谐波产生元件,其使用来自所述光源的光产生可见区中的具有 700nm 或更短的波长的二次谐波;以及

显微镜,其被构造成利用由所述激发光产生单元产生的光对多种荧光分子进行多光子激发,使得能够同时观察到在所述激发光的波长的短波长侧、或短波长侧和长波长侧二者上产生的多种荧光。

11. 根据权利要求 9 或 10 所述的荧光观察设备,其特征在于,所述二次谐波产生元件被构造成可插入源自所述光源的光路上并可从所述光路上移除。

## 荧光观察方法和荧光观察设备

### 技术领域

[0001] 本发明涉及观察从像例如多种荧光蛋白质这样的荧光分子发射的荧光的荧光观察方法,并且涉及荧光观察设备。

### 背景技术

[0002] 利用荧光分子观察生物分子是在医学或生命科学领域的标准观察方法。已开发了荧光波长不同的各种荧光分子,并且可以利用这些荧光分子彼此结合地观察多种生物分子。

[0003] 在观察由荧光分子发射的荧光的常规方法中,例如,存在:一种方法,其中利用可见区中的光通过单光子激发来激发荧光分子并且检测激发光的波长的较长波长侧产生的荧光(斯托克司频移);以及一种方法,其中利用近红外区中的光通过多光子激发来激发荧光分子并且检测在激发光的波长的较短波长侧产生的荧光(参照例如非专利文献1)。

[0004] 在要观察多种荧光分子的情况下,这些荧光观察方法需要将要根据每种荧光分子的吸收光谱来选择激发光的最佳波长,因此具有以下问题:

[0005] (问题1) 在要同时观察多种荧光分子的情况下,为了利用波长彼此不同的多种激发光同时照射试样,需要用于多种激发光混合在同一路径中的的光学系统,以至于光学构造复杂;

[0006] (问题2) 当使用波长彼此不同的多种激发光来进行荧光观察时,将被收集在试样表面上的多种激发光由于当它们通过位于它们的路径上的光学系统时发生的色差而导致它们的焦点位置随着它们的波长变化,以至于破坏了空间重合性。结果,这个问题可导致在多种生物分子之间的交叠或生物分子的定位的分析中的伪像;以及

[0007] (问题3) 虽然在顺序地改变波长不同的多种激发光时针对每种荧光分子逐个执行荧光观察,但该过程不允许同时观察从各个荧光分子发射的荧光。具体地说,在观察诸如活细胞这样的活试样中在需要同时观察多种生物分子的运动的情况下产生不方便。

[0008] 另一方面,在作为能够解决上述问题1和问题2的现有技术文章的以下非专利文献2中公开了利用深紫外区中的光通过单光子激发激发荧光蛋白质的方法。非专利文献2公开了荧光分子(蛋白质)具有在深紫外区中的吸收波长带,并且尽管这些荧光分子彼此不同,但是这些荧光分子仍在深紫外区中具有公共吸收波长带。

[0009] 结果,如果用深紫外区中的光通过单光子激发来激发荧光分子并且检测激发光的波长的较长波长侧产生的荧光(斯托克司频移),则能够同时观察到多种荧光。

[0010] 然而,在其中用深紫外区中的光通过单光子激发来激发荧光分子并且检测激发光的波长的较长波长侧产生的荧光(斯托克司频移)的情况下,具有以下问题:

[0011] (问题4) 为了将深紫外区中的光收集和引导到荧光分子上,则几乎没有可用的光学构件,并且在光学系统的构造中存在许多限制条件,因此,难以制造满足期望规格的光学系统。通常用作诸如光学窗和透镜这样的光学构件的玻璃在紫外线波长范围内显著地吸收系数增大并且透射率急剧地减小。结果,这种方法需要使用了诸如石英玻璃、氟化钙和氟化

镁的特殊材料的特殊光学系统;以及

[0012] (问题5)与可见光或红外光相比,深紫外区中的光具有较大的光能量,对活体造成大的光损伤。结果,在其中待观察的对象是像活细胞这样的活试样的情况下,深紫外区中的光不适于作用于观察从试样上标记有的荧光分子发射的荧光的激发光。

[0013] 现有技术文献列表

[0014] 非专利文献

[0015] 非专利文献 1

[0016] Science-1990, vol. 248, Winfried Denk et al., "Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy", Science, New Series, Vol. 248, No. 4951 (April 6, 1990), pp. 73-76

[0017] 非专利文献 2

[0018] Biochemistry. 2004Nov 30, 43, 14913-14923, Turoverov et al., "Comparative studies on the structure and stability of fluorescent proteins EGFP, zFP506, mRFP1, "dimer2" and DsRed1"

## 发明内容

[0019] 技术问题

[0020] 鉴于这些传统问题提出本发明。本发明的目的是提供荧光观察方法和荧光观察设备,其可在省去了多种激发波长的情况下利用简单的光学构造同时观察从多种荧光分子发射的多种荧光,并且对使用荧光分子作为其荧光标签的被观察对象几乎不造成损伤,并且允许利用普通玻璃作为用于荧光观察的光学材料。

[0021] 技术方案

[0022] 为了实现以上目的,根据本发明的一种用于检测从至少两种或更多种荧光分子发射的多种荧光的荧光观察方法,其特征在于该荧光观察方法包括以下步骤:通过激发可见区中的具有等于或小于 700nm 的激发波长的光使两种或更多种荧光分子的每种经受多光子激发,以在利用两种或更多种荧光分子的每种的深紫外区中的吸收波长带时产生荧光;以及同时检测在激发光的激发波长的较短波长侧或较短波长侧和较长波长侧二者上产生的多种荧光。

[0023] 另外,在本发明的荧光观察方法中,优选的是,用于荧光检测对象的两种或更多种荧光分子的每种具有在深紫外区和可见区中的吸收波长带。

[0024] 另外,在本发明的荧光观察方法中,优选的是,激发光是超短脉冲激光束。

[0025] 另外,在本发明的荧光观察方法中,优选的是,经由短通滤波器仅检测在激发波长的较短波长侧产生的荧光。

[0026] 另外,在本发明的荧光观察方法中,优选的是,检测在激发波长的短波长侧产生的具有 400nm 或更长的波长的荧光。

[0027] 另外,在本发明的荧光观察方法中,优选的是,以光谱选择方式来检测经由多光子激发产生的多种荧光。

[0028] 另外,在本发明的荧光观察方法中,优选的是,通过共焦检测来检测经由多光子激发而产生的多种荧光。

[0029] 另外,在本发明的荧光观察方法中,优选的是,同时检测经由多光子激发而产生的源于一个光子的荧光和源于两个光子的荧光。

[0030] 另外,一种根据本发明的荧光观察设备,其特征在于该荧光观察设备包括:光源,其以高密度发射具有预定波长的光;二次谐波产生元件,其使用来自该光源的光产生可见区中的具有 700nm 或更短的波长的二次谐波;以及显微镜,其被构造成利用由该二次谐波产生元件产生的光使多种荧光分子经受多光子激发,使得同时可观察在激发光的波长的较短波长侧或较短波长侧和较长波长侧二者上产生的多种荧光。

[0031] 另外,一种根据本发明的荧光观察设备,其特征在于该荧光观察设备包括:激发光产生单元,其一体地设置有光源,其以高密度发射具有预定波长的光,以及二次谐波产生元件,其利用来自光源的光产生可见区中的具有 700nm 或更短的波长的二次谐波,以及显微镜,其被构造成利用由激发光产生单元产生的光使多种荧光分子经受多光子激发,使得同时可观察在激发光的波长的较短波长侧或较短波长侧和较长波长侧二者上产生的多种荧光。

[0032] 另外,在本发明的荧光观察设备中,优选的是,二次谐波产生元件被构造成可插入源自光源的光路上并可从所述光路上移除。

[0033] 本发明的有益效果

[0034] 根据本发明,可获得荧光观察方法和荧光观察设备,其可在省去了多种激发波长的情况下利用简单光学构造同时观察从多种荧光分子发射的多种荧,并且对使用荧光分子作为荧光标签的被观察对象几乎不造成损伤,并且允许利用普通玻璃作为用于荧光观察的光学材料。

## 附图说明

[0035] 图 1 是概念性地示出在现有技术中分别利用可见区中的光通过单光子激发、利用近红外区中的光通过双光子激发和利用深紫外区中的光通过单光子激发而由荧光分子产生的荧光光谱的曲线图。

[0036] 图 2 是示出多种荧光蛋白质的吸收光谱的曲线图。

[0037] 图 3 是示出图 2 所示的荧光蛋白质的激发光谱的曲线图。

[0038] 图 4 是概念性地示出根据本发明的荧光观察方法在利用可见区中的光的多光子激发中由一个荧光分子产生的荧光光谱的曲线图。

[0039] 图 5 是分别示出以下情况中的能态的说明图:在现有技术中,利用可见区中的光的单光子激发和利用深紫外区中的光的单光子激发;以及根据本发明的荧光观察方法的利用可见区中的光的多光子激发。

[0040] 图 6 是示出在其中单独使用不同的荧光分子的情况下在双光子激发中激发光强度与获得的荧光强度之间的关系的关系的示图;图 6A 是在其中荧光蛋白质 Sirius 用作荧光分子的情况下的曲线图,图 6B 是在其中荧光蛋白质 mseCFP 用作荧光分子的情况下的曲线图,图 6C 是在其中荧光蛋白质 mTFP1 用作荧光分子的情况下的曲线图,并且图 6D 是在其中荧光蛋白质 EGFP 用作荧光分子的情况下的曲线图。

[0041] 图 7 是示意性地示出具体化根据本发明的荧光观察设备的一种模式的构造的框图;图 7A 是示出它们的一个示例的图,图 7B 是示出图 7A 所示的示例的变形形式的一个示

例的图,并且图 7C 是示出图 7A 所示的示例的变形形式的另一示例的图。

[0042] 图 8 是示意性地示出用于根据本发明的实施方式 1 的荧光观察方法的荧光观察设备的整体结构的说明图。

[0043] 图 9 是示出利用荧光观察设备按照实施方式 1 的荧光观察方法的激发波长的范围、由荧光蛋白质的每个发射的荧光波长的范围以及各个检测器检测到的荧光波长的范围之间的关系的曲线图。

[0044] 图 10 是示出其中利用实施方式 1 的荧光观察方法表达四种荧光蛋白质的 HeLa 细胞的荧光图像的照片;图 10A 是利用荧光蛋白质 Sirius 的荧光图像的照片,图 10B 是利用荧光蛋白质 mseCFP 的荧光图像的照片,图 10C 是利用荧光蛋白质 mTFP1 的荧光图像的照片,并且图 10D 是利用荧光蛋白质 EGFP 的荧光图像的照片。

[0045] 图 11 是通过以下步骤获得的图像:处理在其中利用实施方式 1 的荧光观察方法表达四种荧光蛋白质的 HeLa 细胞的荧光图像中、利用荧光波长分离 (UNMIXING) 方法等由检测器的每一个检测到的荧光信号;去除除了主要由检测器的每一个检测到的荧光以外的荧光成分的渗透;以及随后将经处理的荧光图像叠加:图 11A 是在 X-Y 平面上的细胞的荧光图像;并且图 11B 是在 X-Z 平面上的细胞的荧光图像。

[0046] 图 12 是示出荧光染料 ATTO488 的荧光强度与激发光强度之间的关系的曲线图。

[0047] 图 13 是示出在利用 ATTO488 染色的 HeLa 细胞中,利用 520nm 的脉冲光激发的细胞色素 c 的荧光图像的照片。

## 具体实施方式

[0048] 在说明本发明的实施方式之前,先解释本发明的操作效果。

[0049] 根据本发明的用于检测从至少两种或更多种荧光分子发射的多种荧光的荧光观察方法包括:通过激发可见区中的具有等于或小于 700nm 的激发波长的光使两种或更多种荧光分子的每种经受多光子激发,以在使用两种或更多种荧光分子的每种在深紫外区中的吸收波长带时产生荧光;以及同时检测在激发光的激发波长的较短波长侧或较短波长侧和较长波长侧二者上产生的多种荧光。

[0050] 现在解释实现本发明的荧光观察方法的经过。

[0051] 图 1 是概念性地示出在现有技术中分别利用可见区中的光通过单光子激发、利用近红外区中的光通过双光子激发和利用深紫外区中的光通过单光子激发而由荧光分子产生的荧光光谱的曲线图。图 2 是示出多种荧光蛋白质的吸收光谱的曲线图。图 3 是示出图 2 所示的荧光蛋白质的激发光谱的曲线图。图 4 是概念性地示出根据本发明的荧光观察方法在利用可见区中的光的多光子激发中由一个荧光分子产生的荧光光谱的曲线图。图 5 是分别示出以下情况中的能态的说明图:在现有技术中,利用可见区中的光的单光子激发和利用深紫外区中的光的单光子激发;以及根据本发明的荧光观察方法的利用可见区中的光的多光子激发。图 6 是示出在其中单独使用不同的荧光分子的情况下在双光子激发中激发光强度与获得的荧光强度之间的关系的示图;图 6A 是在其中荧光蛋白质 Sirius 用作荧光分子的情况下的曲线图,图 6B 是在其中荧光蛋白质 mseCFP 用作荧光分子的情况下的曲线图,图 6C 是在其中荧光蛋白质 mTFP1 用作荧光分子的情况下的曲线图,并且图 6D 是在其中荧光蛋白质 EGFP 用作荧光分子的情况下的曲线图。

[0052] 如图 1 所示,当利用可见区中的光通过单光子激发来对荧光分子进行激发时,产生具有比激发光的波长长的波长的荧光。另外,当利用近红外区中的光通过双光子激发来对荧光分子进行激发时,产生具有比激发光的波长短的波长的荧光。另外,当利用深紫外区中的光通过单光子激发来对荧光分子进行激发时,产生具有比激发光的波长长的波长的荧光。

[0053] 另外,如图 2 所示,荧光蛋白质在可见区和深紫外区中具有吸收波长带。将可见区中的吸收波长带作用于利用可见区中的光的单光子激发中和利用近红外区中的光的双光子激发对荧光蛋白质进行激发的吸收波长带,通常执行这些激发。

[0054] 另外,如图 2 所示,许多荧光分子在深紫外区中具有公共吸收波长带。

[0055] 通过描绘由荧光蛋白质的每种发射的荧光强度的测量结果获得图 3 所示的激发光谱,测量是在激发波长变化的同时执行的。可利用这些激发光谱将在对应的激发波长的激发效率互相比较。可以理解的是,通过图 3 所述的曲线图,也可在深紫外区中获得与在可见区中的激发效率相当的激发效率。

[0056] 现在,已知当作为具有预定波长的激发光的光子吸收到荧光分子内的结果,电子从基态能级跃迁至激发态能级;以及随后电子经由热振动弛豫而跃迁至基态能级时产生荧光。另外,用于产生荧光的方法可根据激发处理中的不同被大致分为“单光子吸收荧光”和“双光子(多光子)吸收荧光”。在单光子吸收荧光中,荧光分子吸收激发光的一个光子,从而荧光分子中的电子跃迁至激发态能级。另一方面,在双光子吸收荧光中,荧光分子同时吸收激发光的两个光子,从而荧光分子中的电子跃迁至激发态能级。另外,在单光子吸收荧光中,必须将具有与荧光分子中的基态能级与激发态能级之间的能量差大致相同的能量(波长)的光用作激发光。另一方面,在双光子吸收荧光中,可以将能量(波长)小于该能量差的光用作激发光。通常,在相同种类的荧光分子被激发的情况下,用于双光子吸收荧光的激发光的波长比用于单光子吸收荧光的激发光的波长长。另外,已知通过双光子吸收的处理产生的荧光强度与激发光的强度的平方成比例(平方特性)。

[0057] 因此,如图 4 所示,本发明的发明人提出利用通过深紫外区中的荧光分子吸收的多光子吸收处理产生荧光的构思和利用可见区中的光作为激发光的构思。荧光蛋白质的吸收特性的特征在于它们在深紫外区中的激发效率良好。在其中通过利用具有比吸收波长长的波长的光作为激发光(例如,通过利用可见区中的具有 525nm 的波长的光子)通过双光子激发来激发荧光蛋白质的情况下,荧光蛋白质基于通过深紫外区中的这些荧光蛋白质的每个的吸收有效地产生双光子吸收荧光(图 5)。另外,如上所述,通过双光子吸收产生的荧光强度与激发光的强度的平方成比例。

[0058] 因此,在利用可见区中的光作为激发光的同时,使用双光子吸收荧光可获得与利用深紫外区中的光的激发产生的荧光(单光子吸收荧光)相当的荧光。

[0059] 为了展示通过利用可见区中的光通过多光子激发来激发荧光分子可产生荧光,本发明的发明人尝试了利用具有可见波长的光对多种荧光蛋白质的双光子激发。

[0060] 图 6 是示出在其中单独使用不同的荧光分子的情况下在双光子激发中激发光强度与获得的荧光强度(用对数画出各个强度)之间的关系的示图;图 6A 是在其中荧光蛋白质 Sirius 用作荧光分子的情况下的曲线图,图 6B 是在其中荧光蛋白质 mseCFP 用作荧光分子的情况下的曲线图,图 6C 是在其中荧光蛋白质 mTFP1 用作荧光分子的情况下的曲线图,

并且图 6D 是在其中荧光蛋白质 EGFP 用作荧光分子的情况下的曲线图。激发光的波长为 525nm。

[0061] 如图 6A、图 6B、图 6C 和图 6D 中的曲线图的每个所示,无论哪种荧光蛋白质用作荧光分子,荧光强度都与激发光的强度的平方成比例(各个对数图的逼近直线的斜度为约 2)。这示出了检测到的荧光是通过双光子激发产生的。

[0062] 本发明的发明人通过这种考虑和这种展示想出了一种用于检测从至少两种或更多种荧光分子发射的多种荧光的荧光观察方法,该荧光观察方法包括:通过激发可见区中的具有等于或小于 700nm 的激发波长的光使两种或更多种荧光分子的每种经受多光子激发,以在利用两种或更多种荧光分子的每种的深紫外区中的吸收波长带时产生荧光;以及同时检测在激发光的激发波长的较短波长侧或较短波长侧和较长波长侧二者上产生的多种荧光。

[0063] 如在本发明的荧光观察方法中,在检测从至少两种或更多种荧光分子发射的荧光的过程中,利用可见区中的具有 700nm 或更短的波长的光作为用于荧光分子的多光子激发的激发光可省去多种激发波长。结果,可省去对于使用波长彼此不同的多种激发光必要的、用于将激发光混合到同一路径的光学系统等,以避免光学系统的复杂构造。另外,如上所述,虽然由于将被收集在试样表面上的多种激发光的焦点位置由于色差而随着波长变化而导致波长彼此不同的多种激发光应用于荧光观察将破坏空间重合性,但是本发明的荧光观察方法可省去使用多种激发光,因此不需要考虑试样表面上的色差。另外,本发明的荧光观察方法不需要针对执行荧光观察,波长不同的多种激发光针对各个荧光分子进行交替,因此有利于同时观察多种生物分子的运动。

[0064] 另外,在本发明的荧光观察方法中用作激发光的可见区中的具有 700nm 或更短的波长的光的光子能量小于深紫外区中的光的光子能量。另外,在本发明的方法中利用了多光子激发,从而深紫外区中的光不被通过除包括焦点的区域以外的荧光分子的区域的荧光分子吸收。结果,根据本发明的荧光观察方法可降低对标记有荧光分子的试样的光损伤。

[0065] 另外,在根据本发明的荧光观察方法中可见区中的光用作激发光,从而通常使用的玻璃等可作用于光学系统的光学材料。

[0066] 多光子吸收的发生可能性与光子密度的平方成比例(平方特性)。因此,多光子激发用于本发明的荧光观察方法中,从而其中荧光分子被激发的部分的体积可减小为显著地小于在激发光的焦点位置的部分的体积。可利用比根据单光子激发中的激发光的波长确定的分辨率高的分辨率来检测荧光。结果,正像近红外区的多光子激发可获得可见区的单光子激发的分辨率,根据本发明的荧光观察方法可通过可见区的多光子激发获得与深紫外区的单光子激发获得的分辨率相当的分辨率。

[0067] 另外,在本发明的荧光观察方法中可见区中的光用作激发光,从而可通过仅利用透射或反射可见区中的光的构件并涂覆来制造光学系统。结果,光的透射率和反射率可增大,从而可提高光学系统的性能。

[0068] 此外,在本发明的荧光观察方法中,用于荧光检测对象的荧光分子的每个是在深紫外区和在可见区中具有吸收波长带的荧光分子。因此,当通过多光子激发激发具有吸收光谱与激发光交叠的特性的荧光分子时,可分别出现源于多光子激发和单光子激发的荧光成分。



[0069] 另外,在本发明的荧光观察方法中,优选的是,超短脉冲激光束用作激发光。这种方式可在焦点处在空间和时间上增大光子密度,从而可有效地执行双光子激发。

[0070] 另外,可通过诸如带通滤波器和边缘滤波器的波长选择装置使超短脉冲激光束的光谱形状成形。这种方式容易将荧光和激发光彼此分离,另外,可较有效地检测荧光发射。例如,可通过利用彼此结合的边缘滤波器切掉宽光谱宽度的超短脉冲激光束的光谱以具有矩形形状。这种方式可加宽可用于检测荧光发射的波长带。通过切掉其谱形并使所述谱形成形为矩形来加宽超短脉冲激光的时域形状,从而可较有效地检测荧光发射,尽管双光子激发的效率在一定程度上降低。

[0071] 另外,在本发明的荧光观察方法中,优选的是,经由短通滤波器仅检测到在激发光的激发波长的较短波长侧产生的荧光。

[0072] 在其中通过可见区中的具有 700nm 或更短的波长的光通过多光子激发激发具有吸收光谱与激发光重叠的特性的荧光分子的情况下,分别出现源于双光子激发和开-光子激发的荧光成分,如上所述。已知由单光子激发产生的荧光的波长通常比激发光的波长长的(斯托克司频移)。因此,在利用本发明的荧光观察方法通过多光子激发来激发荧光分子的情况下,激发光的激发波长的较长波长侧还含有由单光子激发产生的荧光成分。然而,如果按照光谱选择方式利用短通滤波器等去除波长比激发光的波长长的由单光子激发产生的荧光成分并且仅检测到波长比激发光的波长短的荧光成分,则可有效地检测通过双光子激发产生的荧光。

[0073] 另外,在本发明的荧光观察方法中,优选的是,检测到在激发光的激发波长的较短波长侧产生的波长为 400nm 或更长的荧光。

[0074] 这种方式可将源于像 DNA 或构成蛋白质的氨基酸的活自发荧光物质的自发荧光与源于荧光分子的荧光分离,从而可执行高对比度荧光成像。

[0075] 另外,在本发明的荧光观察方法中,优选的是,按照光谱选择方式检测由多光子激发产生的多种荧光。

[0076] 为了按照光谱选择方式检测荧光,例如,可彼此结合地使用多通道检测器、多个光电倍增管和分色镜,或者,可彼此结合地使用多焦点机构和像 CCD、CMOS 等的成像传感器。

[0077] 此外,在本发明的荧光观察方法中,同时产生波长不同的多种荧光。因此,在其中多种荧光的波长带彼此交叠的情况下,在由检测器检测仅通过特定荧光分子产生的荧光信号时必然也可通过检测器检测到通过除特定荧光分子外的荧光分子产生的荧光(荧光串扰)。在这种情况下,优选地:通过荧光-波长分离(UNMIXING)方法等处理由检测器检测到的荧光信号;然后去除源于除特定荧光分子外的荧光分子的荧光成分。

[0078] 另外,在本发明的荧光观察方法中,优选的是,通过共焦检测来检测经由多光子激发产生的多种荧光。

[0079] 更具体地说,可将针孔、狭缝等布置在检测荧光的检测器前方以通过共焦检测来检测荧光。

[0080] 这种构造可去除由单光子激发产生和在其检测平面以外发生的荧光。

[0081] 另外,还提高了光学切片效果(获得诸如仅切除轮廓线上的一部分的图像的效果)。

[0082] 另外,在本发明的荧光观察方法中,可同时检测经由多光子激发产生的源于一个

光子的荧光和源于两个光子的荧光。这种方式可增加可通过激发而同时检测到的荧光的种类数量。

[0083] 另外,根据本发明的荧光观察设备包括:光源,其以高密度发射具有预定波长的光;二次谐波产生元件,其使用来自该光源的光产生可见区中的具有 700nm 或更短的波长的二次谐波;以及显微镜,其被构造成利用由二次谐波产生元件产生的光对多种荧光分子进行激发,使得同时可观察荧光分子在激发光的波长的较短波长侧或较短波长侧和较长波长侧二者上产生的多种荧光。

[0084] 图 7 是示意性地示出根据本发明的荧光观察设备的一个实施方式的构造的框图,图 7A 是示出它们的一个示例的图,图 7B 是示出图 7A 所示的示例的变形形式的一个示例的图,并且图 7C 是示出图 7A 所示的示例的变形形式的另一示例的图。

[0085] 图 7A 所示的示例的荧光观察设备包括光源单元、二次谐波产生单元和用于试样观察的单元。

[0086] 例如,光源单元由以高密度发射具有预定波长的激光脉冲光束的光源构成,光源为锁模激光器、可变波长激光器、OPO(光参量振荡器)器等。

[0087] 二次谐波产生单元包括像 LBO(LiB3O5:三硼酸锂)晶体或 BBO(硼酸钡)晶体的 SGH(二次谐波产生)晶体,并且二次谐波产生单元由利用来自光源单元的光产生可见区中的具有 700nm 或更短的波长的二次谐波的元件构成。

[0088] 用于试样观察的单元由显微镜构成,显微镜被构造成利用由二次谐波产生单元产生的光使多种荧光分子经受多光子激发,以使得同时可观察荧光分子在激发光的波长的较短波长侧或较短波长侧和较长波长侧二者上产生的多种荧光,显微镜为例如激光扫描显微镜、多光子荧光显微镜、共焦荧光显微镜等。

[0089] 这种构造可利用本发明的荧光观察方法执行荧光观察。

[0090] 此外,如图 7B 所示,根据本发明的荧光观察设备可被构造成包括:激发光产生单元,其一体地设置有光源单元和二次谐波产生元件;以及显微镜,其被构造成通过激发光产生单元产生的光使多种荧光分子经受多光子激发,从而可同时观察通过荧光分子在激发光的波长的较短波长侧或较短波长侧和较长波长侧二者上产生的多种荧光。按照这种方式形成的荧光观察设备不需要用于连接光源单元和外部的二次谐波产生单元的光学系统,从而可简化设备的结构。

[0091] 作为另外一种选择,在本发明的荧光观察设备中,如图 7C 所示,二次谐波产生元件可被构造成可插入源自光源的光路中并可从该光路移除。

[0092] 这种方式可利用一个内窥镜实现多种观察方法。例如,与多光子内窥镜结合,可通过从光路中移除谐波产生单元,利用近红外区中的双光子激发执行荧光观察,以及可通过插入谐波产生单元以将谐波产生单元置于光路上,利用二次谐波利用可见区中的双光子激发执行荧光观察。

[0093] [实施方式]

[0094] 以下利用附图解释本发明的实施方式。

[0095] 实施方式 1

[0096] 图 8 是示意性地示出用于根据本发明的实施方式 1 的荧光观察方法的荧光观察设备的整体结构的说明图。图 9 是示出利用所述荧光观察设备在实施方式 1 的荧光观察方法

中,激发波长的范围、由荧光蛋白质的每个发射的荧光波长的范围以及通过各个检测器检测的荧光波长的范围之间的关系的曲线图。

[0097] 如图 8 所示,当前实施方式中的荧光观察设备设有光源单元 11、二次谐波产生单元 12 和用于试样观察的单元 13。

[0098] 光源单元 11 由像锁模激光、可变波长激光 OPO 等的超短脉冲激光构成。

[0099] 二次谐波产生单元 12 包括透镜 12a、像 BBO 晶体的 SHG 晶体 12b 和透镜 12c。SHG 晶体 12b 利用从光源单元 11 发射的脉冲激光产生具有 525nm(作为波长为可见区中的 700nm 或更短)的波长的二次谐波。

[0100] 此外,当前实施方式中的荧光观察设备包括反射镜 14a 和透镜 14b 和 14c,它们是用以连接二次谐波产生单元 12 和用于试样观察的单元 13 的光学构件 14。

[0101] 用于试样观察的单元 13 由显微镜构成,显微镜包括:分色镜 13a1 至 13a4;带通滤波器 13b1 至 13b5;检测器 13c1 至 13c4;用于二维扫描的反射镜 13d;透镜 13e1 至 13e3;物镜 13f;用于三维扫描的工作台 13g;等等。并且,用于试样观察的单元形成为能够利用多个检测器 13c1 至 13c4 和分色镜 13a1 至 13a4 按照光谱选择方式检测多种荧光。此外,在附图中,标号 13h 指示针孔,标号 20 指示像标记有荧光分子的生物分子的试样。

[0102] 试样 20 标记有作为荧光分子的四种荧光蛋白质 (Sirius、msecFP、mTFP1 和 EGFP)。

[0103] 分色镜 13a1 具有透射由二次谐波产生单元 12 产生并且具有 525nm 的波长的光以及反射具有其它波长的光的光学特性。

[0104] 带通滤波器 13b1 具有阻挡通过试样 20 标记有的多种荧光分子产生的多种荧光波长中的波长比 525nm 的激发光波长的光以及透射其它波长带中的光的光学特性。

[0105] 分色镜 13a2 具有反射 410nm 至 440nm 的波长带中的光以及透射其它波长带中的光的光学特性。

[0106] 带通滤波器 13b2 具有透射 410nm 至 440nm 的波长带中的光以及阻挡其它波长带中的光的光学特性。

[0107] 分色镜 13a3 具有反射 455nm 至 475nm 的波长带中的光以及透射其它波长带中的光的光学特性。

[0108] 带通滤波器 13b3 具有透射 455nm 至 475nm 的波长带中的光以及阻挡其它波长带中的光的光学特性。

[0109] 分色镜 13a4 具有反射 475nm 至 490nm 的波长带中的光以及透射其它波长带中的光的光学特性。

[0110] 带通滤波器 13b4 具有透射 475nm 至 490nm 的波长带中的光以及阻挡其它波长带中的光的光学特性。

[0111] 带通滤波器 13b5 具有透射 490nm 至 500nm 的波长带中的光以及阻挡其它波长带中的光的光学特性。

[0112] 检测器 13c1 至 13c4 分别由光电倍增管 (PMT) 构成。

[0113] 此外,实施方式 1 中的荧光观察设备形成为通过多个检测器和分色镜(以及另外,带通滤波器)检测按照光谱选择方式通过各个荧光蛋白质发射的荧光。然而,本发明的设备可按照这些部件由多通道检测器替代的方式形成,以使得光谱作为块中的光学光谱被检测。

[0114] 用于二维扫描的反射镜 13d 由沿着二维方向执行扫描的检流计反射镜构成。

[0115] 用于三维扫描的工作台 13g 形成为能够在试样 20 布置在工作台 13g 上的情况下沿着三维方向移动。

[0116] 现在解释利用具有这种结构的实施方式 1 中的荧光观察设备观察从荧光分子发射的荧光的过程。

[0117] 利用光源单元 11 提供的超短脉冲激光以高密度发射具有预定波长的脉冲激光束。接着,针对二次谐波产生单元 12 设置的 SHG 晶体 12b 利用通过光源单元 11 发射的光进行振荡以发射具有 525nm 的波长的光作为二次谐波。

[0118] 通过光源单元 11 和二次谐波产生单元 12 以高密度发射并且具有 525nm 的波长的光经光学构件 14 进入用于试样观察的单元 13 的分色镜 13a1。

[0119] 分色镜 13a1 透射具有 525nm 的波长并且入射在反射镜 13a1 上的光。通过分色镜 13a1 透射的光被用于二维扫描的反射镜 13 反射,穿过透镜 13e2、透镜 13e3 和物镜 13f,随后被收集在试样 20 中的预定焦点位置上。通过以高密度将具有 525nm 的波长的光辐射至试样在试样 20 中的预定焦点位置以各个预定的可能性通过多光子激发来激发试样 20 标记有的各个荧光分子。多光子吸收荧光的使用可产生这样的荧光,其中波长比深紫外区中的波长长的光用作激发光,并且利用深紫外区中的各个荧光分子的吸收特性。此外,荧光分子的每一个具有带有如下特征的吸收光谱的特性,所述特征即:吸收光谱位于深紫外区中以及可见区中;并且可见区中的吸收光谱的一部分与激发光的波长重叠。结果,波长比激发光的波长长的荧光还通过单光子激发经各个荧光分子发射。因此,从荧光分子发射的荧光不仅包括源于双光子激发的荧光而且包括源于单光子激发的荧光,并且源于单光子激发的荧光与源于双光子激发的荧光混合。

[0120] 通过多光子激发从试样 20 标记有的各个荧光分子发射的荧光经过物镜 13f、透镜 13e3 和 13e2 以及用于二维扫描的反射镜 13d,然后通过分色镜 13a1 而被反射。

[0121] 被分色镜 13a1 反射的光进入带通滤波器 13b1。带通滤波器 13b1 阻挡波长比 525nm 的激发光波长长的光,以及透射其它波长带中的光。结果,去除了由单光子激发产生的荧光。

[0122] 通过带通滤波器 13b1 透射的光经过透镜 13e1 和针孔 13h,随后进入分色镜 13a2。分色镜 13a2 反射 410nm 至 440nm 的波长带中的光,以及透射其它波长带中的光。被分色镜 13a2 反射的光进入带通滤波器 13b2。带通滤波器 13b2 透射入射在带通滤波器 13b2 上的光的 410nm 至 440nm 的波长带中的光,以及阻挡其它波长带中的光。检测器 13c1 检测到通过带通滤波器 13b2 透射的 410nm 至 440nm 的波长带中的光。结果,主要检测到在深紫外区中通过荧光蛋白质 Sirius 吸收由多光子激发产生的荧光。

[0123] 通过分色镜 13a2 透射的光进入分色镜 13a3。分色镜 13a3 反射入射在分色镜 13a3 上的光中的 455nm 至 475nm 的波长带中的光,以及透射其它波长带中的光。被分色镜 13a3 反射的光进入带通滤波器 13b3。带通滤波器 13b3 透射入射在带通滤波器 13b3 上的光中的 455nm 至 475nm 的波长带中的光,并且阻挡其它波长带中的光。检测器 13c2 检测到通过带通滤波器 13b3 透射的 455nm 至 475nm 的波长带中的光。结果,主要检测到在深紫外区中通过荧光蛋白质 CFP 吸收由多光子激发产生的荧光。

[0124] 通过分色镜 13a3 透射的光进入分色镜 13a4。分色镜 13a4 反射入射在分色镜 13a4

上的光中的 475nm 至 490nm 的波长带中的光,以及透射其它波长带中的光。被分色镜 13a4 反射的光进入带通滤波器 13b4。带通滤波器 13b4 透射入射在带通滤波器 13b4 上的光中的 475nm 至 490nm 的波长带中的光,以及阻挡其它波长带中的光。检测器 13c3 检测到通过带通滤波器 13b4 透射的 475nm 至 490nm 的波长带中的光。结果,主要检测到在深紫外区中通过荧光蛋白质 mTFP1 吸收由多光子激发产生的荧光。

[0125] 通过分色镜 13b4 透射的光进入带通滤波器 13b5。带通滤波器 13b5 透射入射在带通滤波器 13b5 上的光中的 490nm 至 500nm 的波长带中的光,以及阻挡其它波长带中的光。检测器 13c4 检测到通过带通滤波器 13b5 透射的 490nm 至 500nm 的波长带中的光。结果,主要检测到在深紫外区中通过荧光蛋白质 GFP 吸收由多光子激发产生的荧光。

[0126] 此外,通过附图中未示出的已知的信号处理装置或已知的成像装置,通过检测器的每个检测到的荧光输出并在附图中未示出的显示装置上显示为荧光图像。

[0127] 图 10 是示出其中利用实施方式 1 的荧光观察方法表达四种荧光蛋白质的 HeLa 细胞的荧光图像的照片,并且通过使分别通过检测器 13c1 至 13c4 检测到的荧光信号成像获得分别在图 10A 至图 10D 中示出的荧光图像。分别在以下细胞器中表达四种荧光蛋白质。用于成像的激发光的波长为 525nm。此外,图中的刻度条的长度为 5  $\mu$ m。

[0128] Sirius :线粒体

[0129] mseCFP :组蛋白 H2B

[0130] mTFP1 :高尔基氏体

[0131] EGFP :纤维蛋白

[0132] 图 11 是示出按照以下方式获得的图像的示意图,所述方式即,针对 HeLa 细胞的荧光图像(其中利用实施方式 1 的荧光观察方法表达四种荧光蛋白质)利用荧光波长分离(UNMIXING)方法处理通过检测器 13c1 至 13c4 检测到的荧光信号,以及随后荧光图像重叠:图 11A 是在 X-Y 平面上的细胞的荧光图像;图 11B 是在 X-Z 平面上的细胞的荧光图像。

[0133] 此外,图中的刻度条的长度为 5  $\mu$ m。

[0134] 此外,虽然在实施方式 1 中荧光蛋白质用作荧光分子,但是本发明的荧光观察方法也可应用于除荧光蛋白质以外的荧光分子(例如,由化学合成物质构成的荧光染料)。

[0135] 图 12 是示出荧光染料 ATTO488 的荧光强度与激发光强度之间的关系的曲线图。利用具有 560nm 的波长和 200 毫微微秒的脉冲宽度的脉冲激光束的激发产生荧光。图 13 是示出 520nm 的脉冲光激发的利用 ATTO488 染色的 HeLa 细胞中的细胞色素 c 的荧光图像的照片。图 13 中的刻度条的长度为 5  $\mu$ m。

[0136] 如图 12 所示,当将具有 560nm 的波长和 200 毫微微秒的脉冲宽度的脉冲激光束辐射至 ATTO488 时,荧光强度与激发光强度的平方成比例。因此,也通过双光子激发产生检测到的从 ATTO488 发射的荧光,并且清楚的是根据本发明的荧光观察方法的可见波长区中的双光子激发也可应用于除荧光蛋白质以外的化学合成物质。

[0137] 另外,已经证实了本发明也可应用于荧光染料 Mitotracker Green。

[0138] 此外,二次谐波产生单元 12 可设有通过在超短脉冲束的群速中产生负色散来调整超短脉冲束的脉冲宽度的预啁啾器(chirper)(图中省略了预啁啾器)。这样可控制试样表面上的脉冲宽度,并可在试样表面上大致形成傅里叶极限脉冲。结果,双光子激发的效率增大,并且产生的荧光的荧光强度变大。

[0139] 另外,针孔 13h 布置在实施方式 1 中的光路上。然而,毋庸置疑,根据本发明的荧光观察设备可具有其中荧光观察设备未设置针孔的结构。

[0140] 另外,虽然在实施方式 1 中透镜 13e1 和针孔 13h 设置在分色镜 13a2、13a3 和 13a4 以及带通滤波器 13b5 之前,但是所述透镜 13e1 和针孔 13h 对可布置在分色镜 13a2、13a3 和 13a4 的每个以及带通滤波器 13b5 之后。这种方式可根据入射在检测器 13c1 至 13c4 的每个上的荧光的波长来优化针孔 13h 的位置和直径,并且可有效地检测荧光。

[0141] 另外,在同时存在由单光子激发产生的荧光和由双光子激发产生的荧光的情况下,可利用声光系统等(图中省略)通过单频率调制激发光的强度,并且随后可利用锁相放大器等(图中省略)以调制的频率两倍大的频率解调通过检测器 13c1 至 13c4 检测到的荧光的强度,从而通过单光子激发产生的荧光成分和通过双光子激发产生的荧光成分彼此分离,并且仅提取通过双光子激发的荧光成分。这种方式在其中利用滤波器难以分裂荧光的情况下可提高分辨能力。

[0142] 另外,例如,可利用边缘滤波器等(图中省略)使激发光波长的波长宽度成形,以使得激发光波长的波长宽度变为 7nm 至 10nm。这种方式可容易地将荧光和激发光彼此分离,另外,可更有效地检测荧光发射。然而,该波长宽度不限于这些值,并且激发光的波长宽度可根据用于本发明的荧光观察方法的荧光蛋白质、激发光波长等改变为最佳。

[0143] 工业应用

[0144] 根据本发明的荧光观察方法和荧光观察方法可用于需要同时观察分别从多种荧光分子发射的荧光的每个领域。

[0145] 附图标记列表

[0146] 10 : 荧光观察设备

[0147] 11 : 光源单元

[0148] 12 : 二次谐波产生单元

[0149] 12a、12c、13e1、13e2、13e3 : 透镜

[0150] 12b : SHG 晶体

[0151] 13 : 用于试样观察的单元(显微镜)

[0152] 13a1、13a2、13a3、13a4 : 分色镜

[0153] 13b1、13b2、13b3、13b4、13b5 : 带通滤波器

[0154] 13c1、13c2、13c3、13c4 : 检测器(PMT)

[0155] 13d : 用于二维扫描的反射镜(检流计反射镜)

[0156] 13f : 物镜

[0157] 13g : 用于三维扫描的工作台

[0158] 20 : 试样

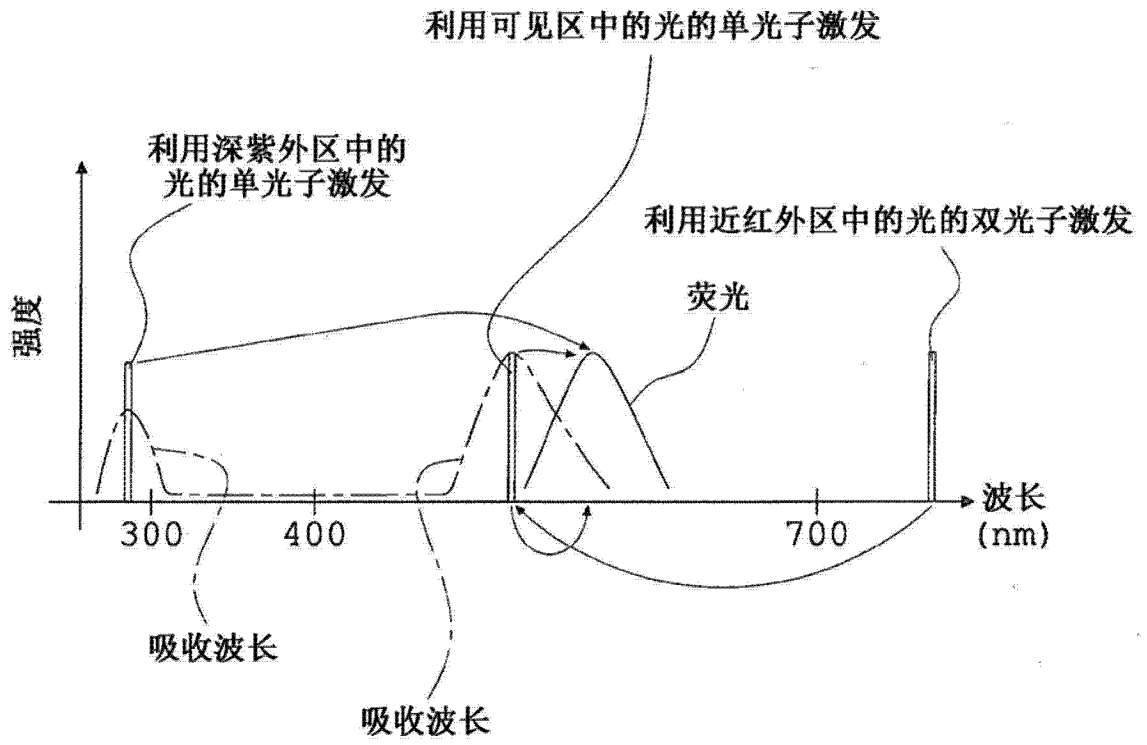


图 1

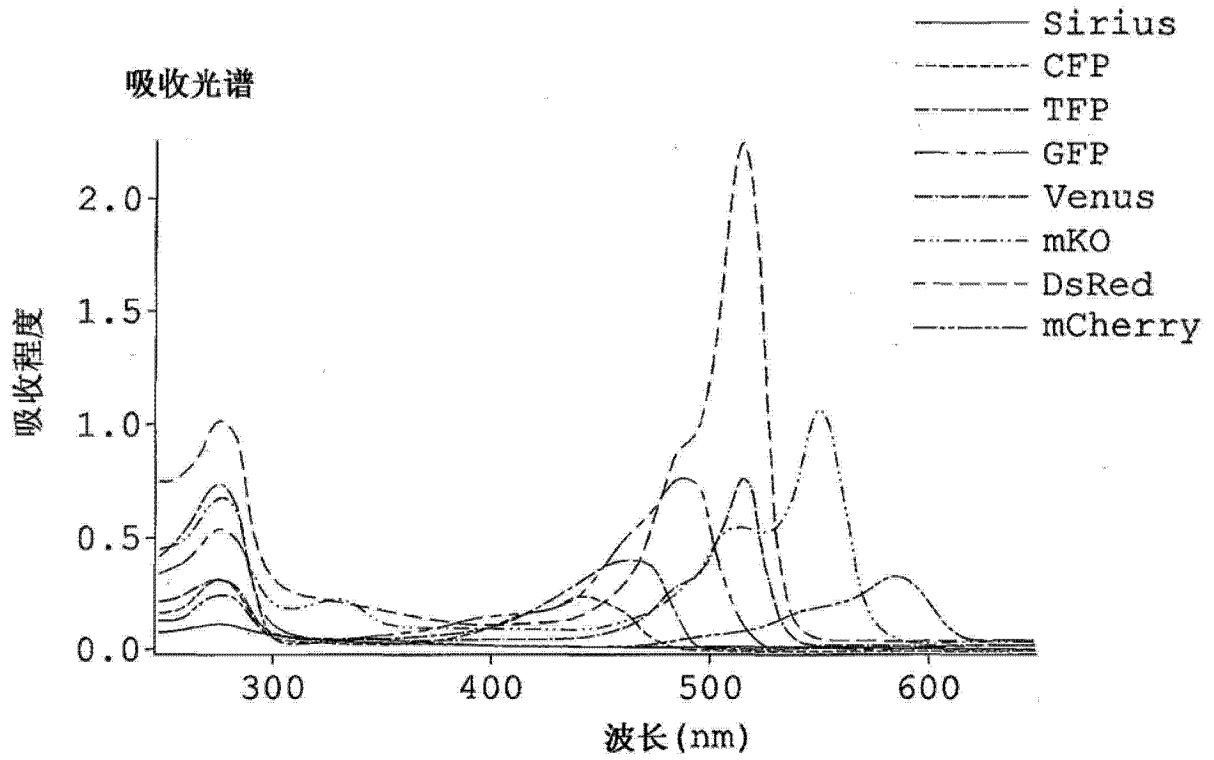


图 2



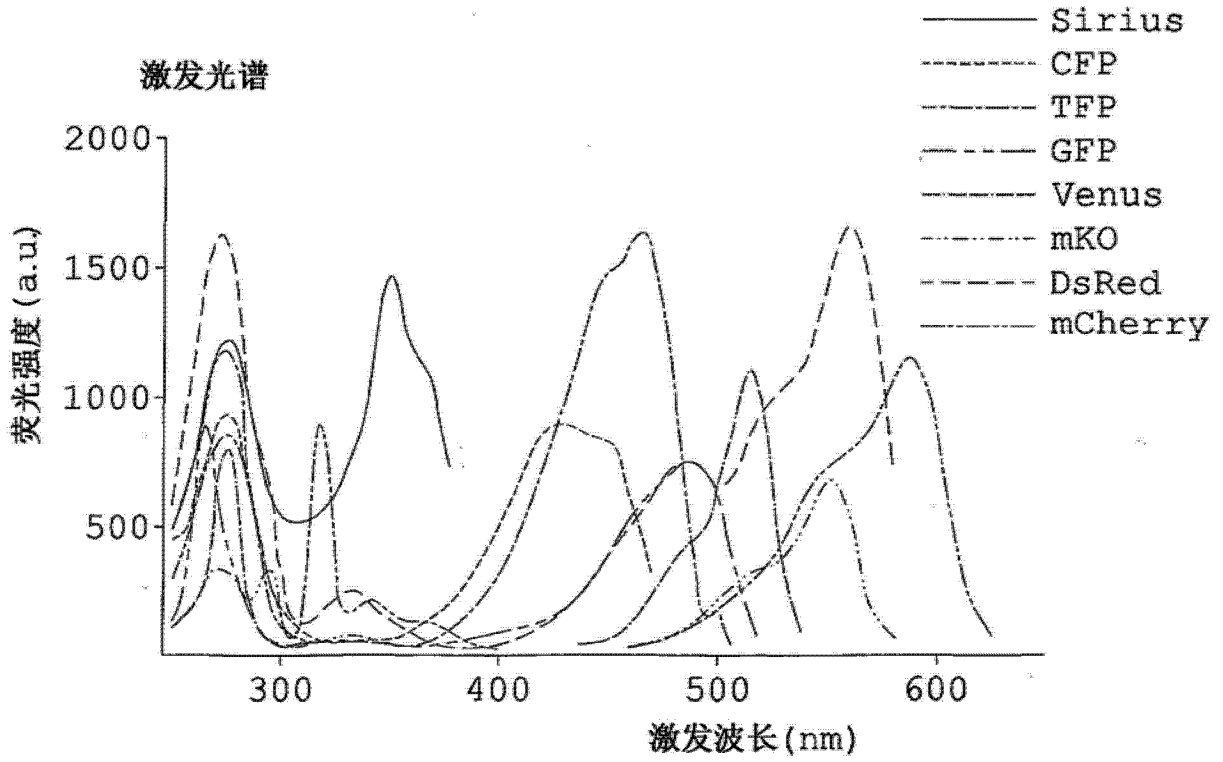


图 3

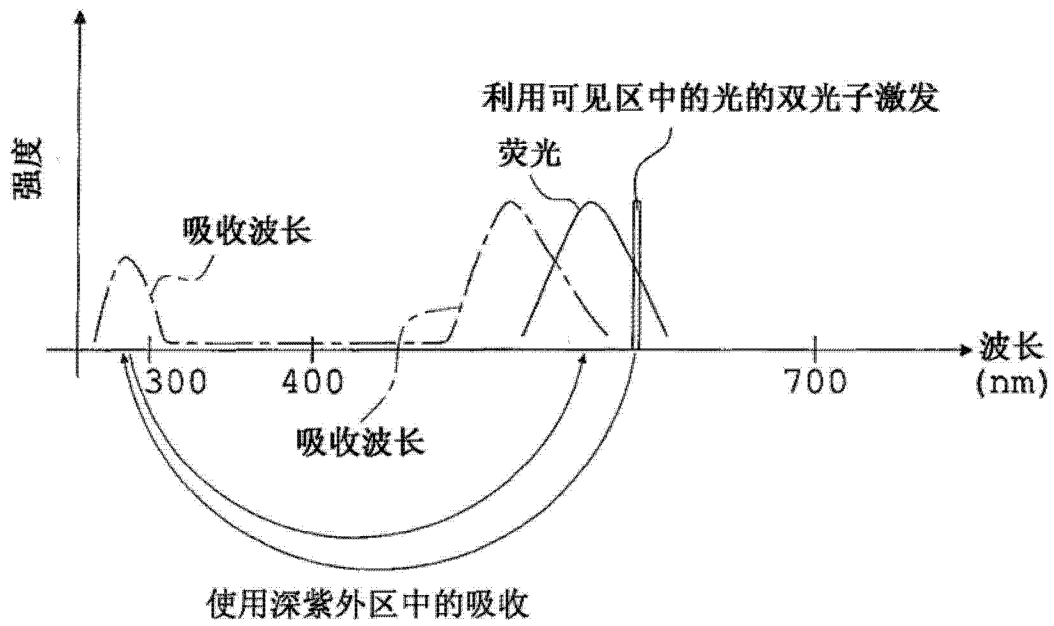


图 4

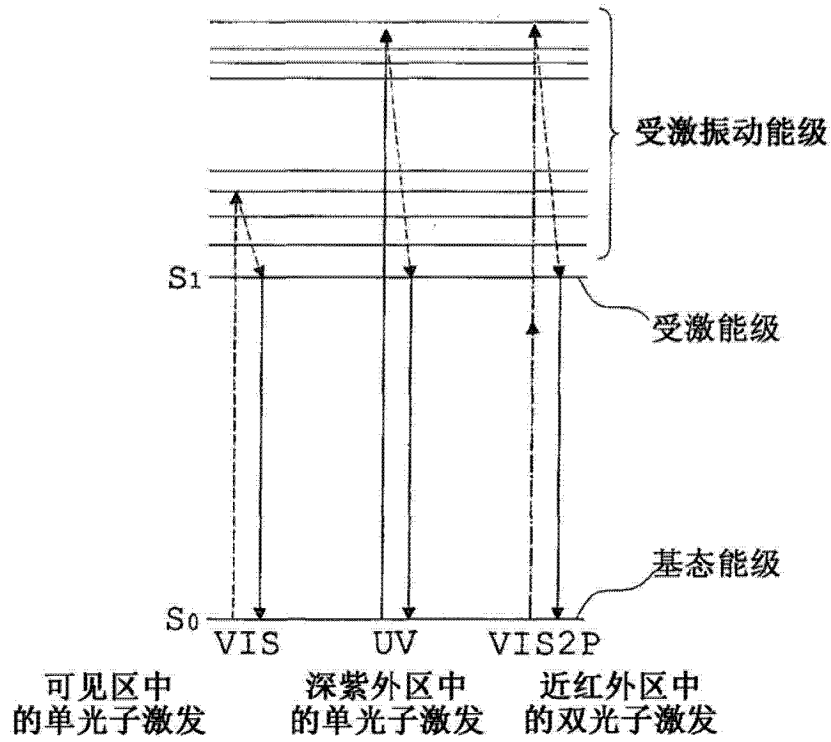


图 5

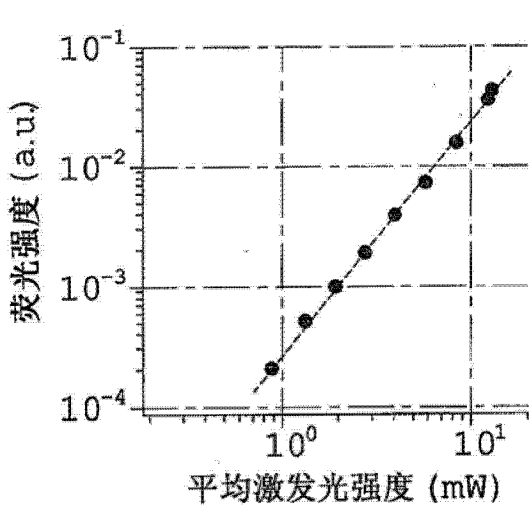


图 6A

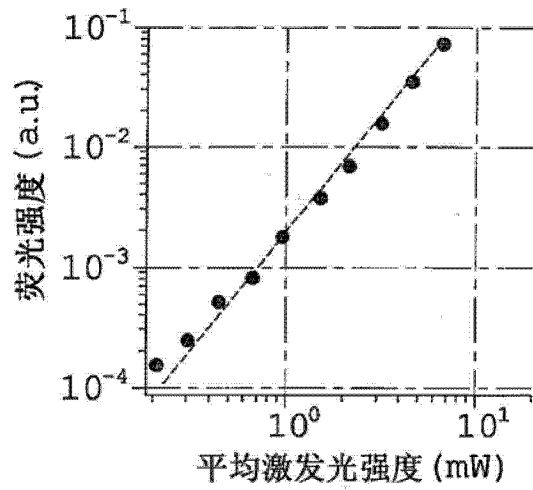


图 6B

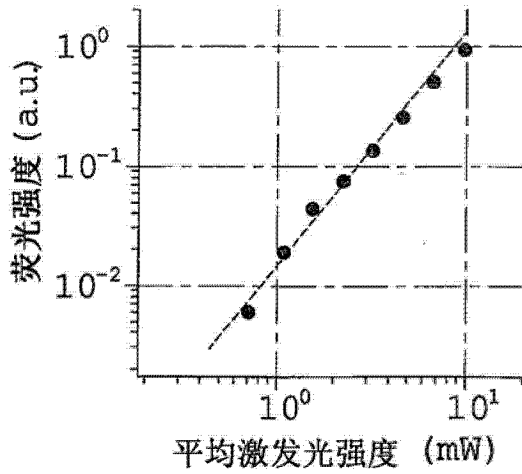


图 6C

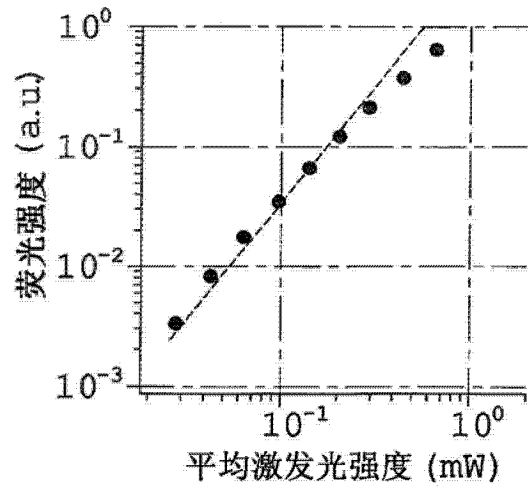


图 6D

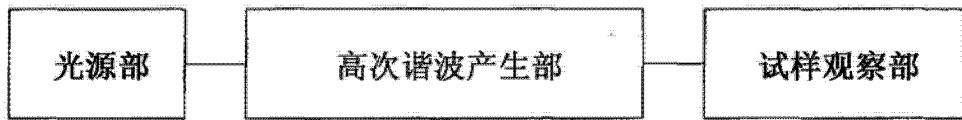


图 7A

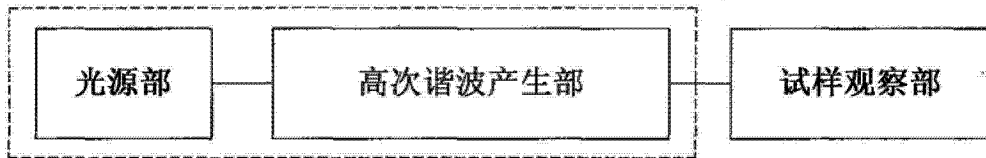


图 7B

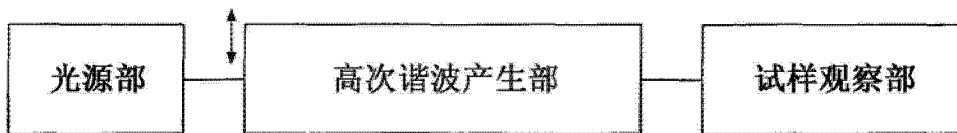


图 7C

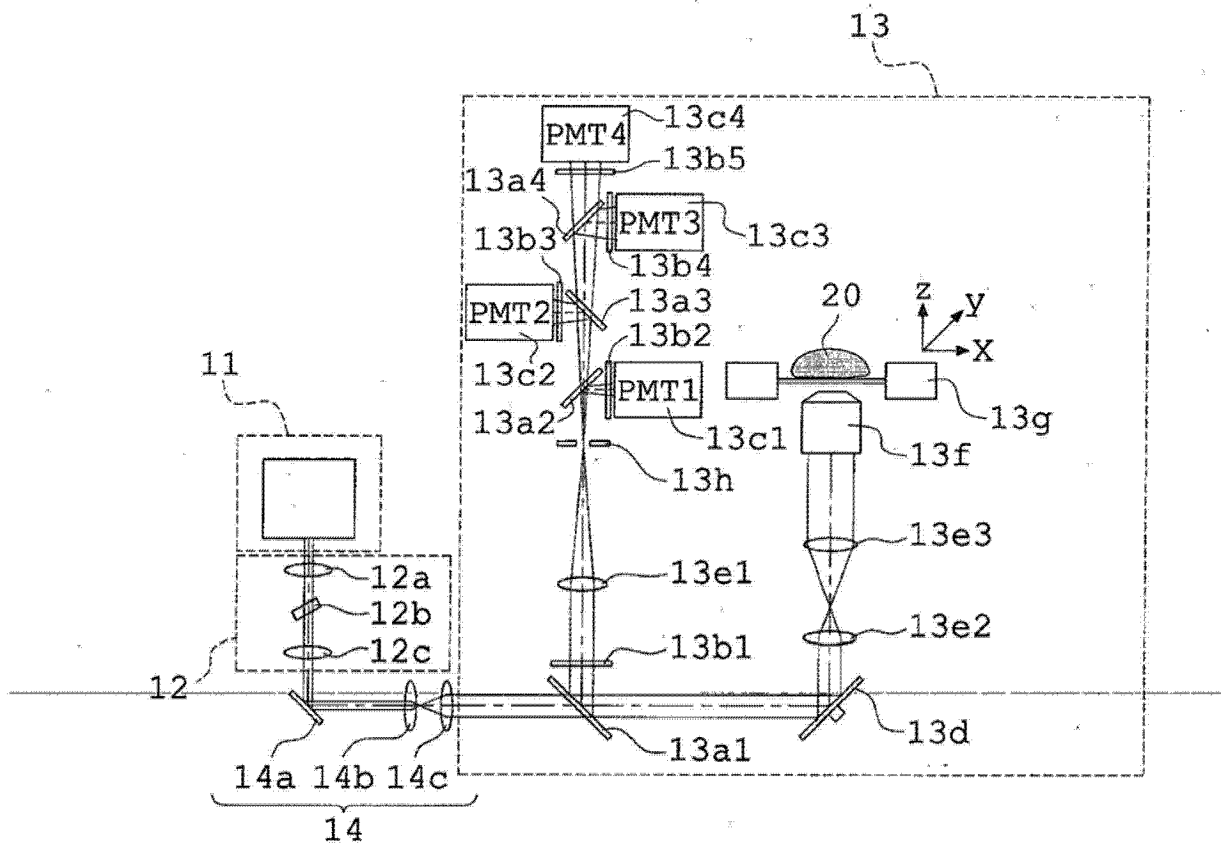


图 8

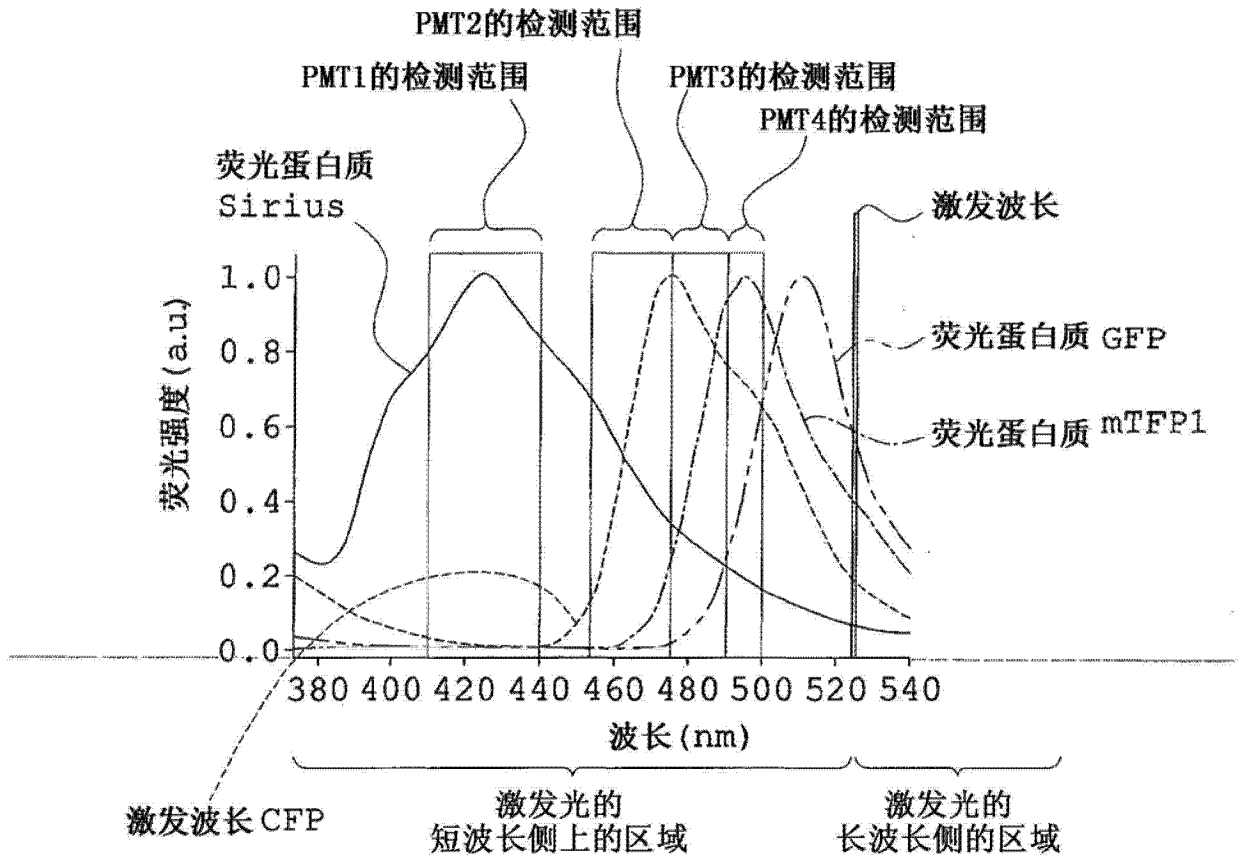


图 9

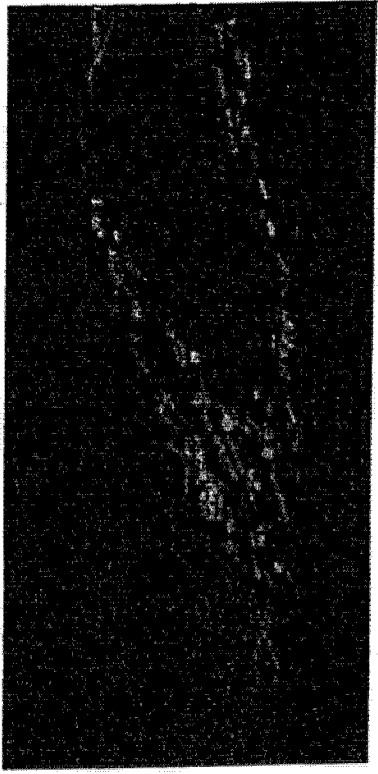


图 10A

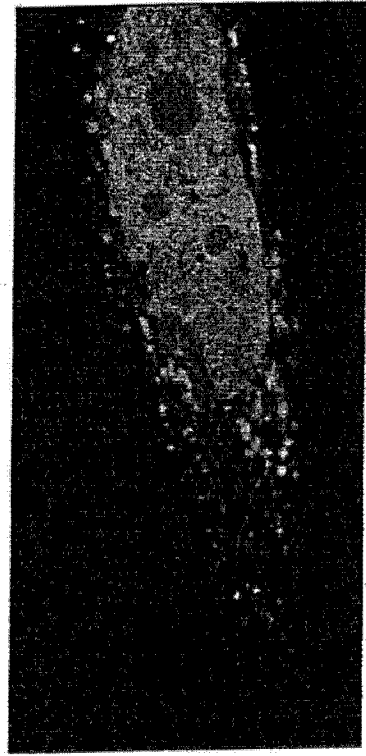


图 10B

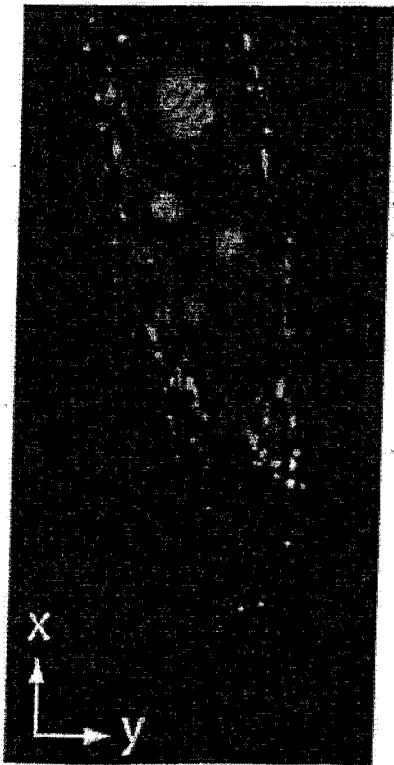


图 10C

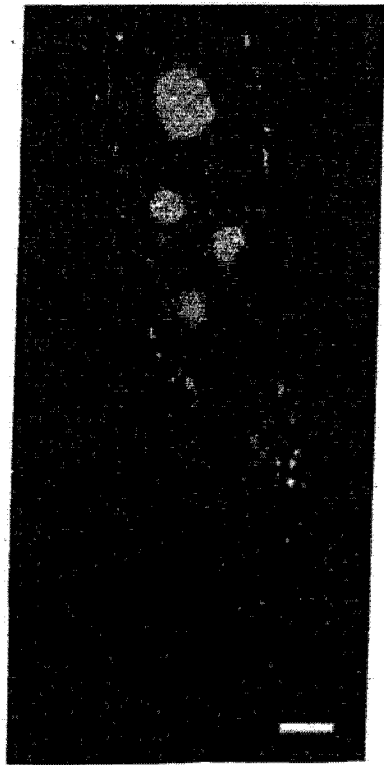


图 10D

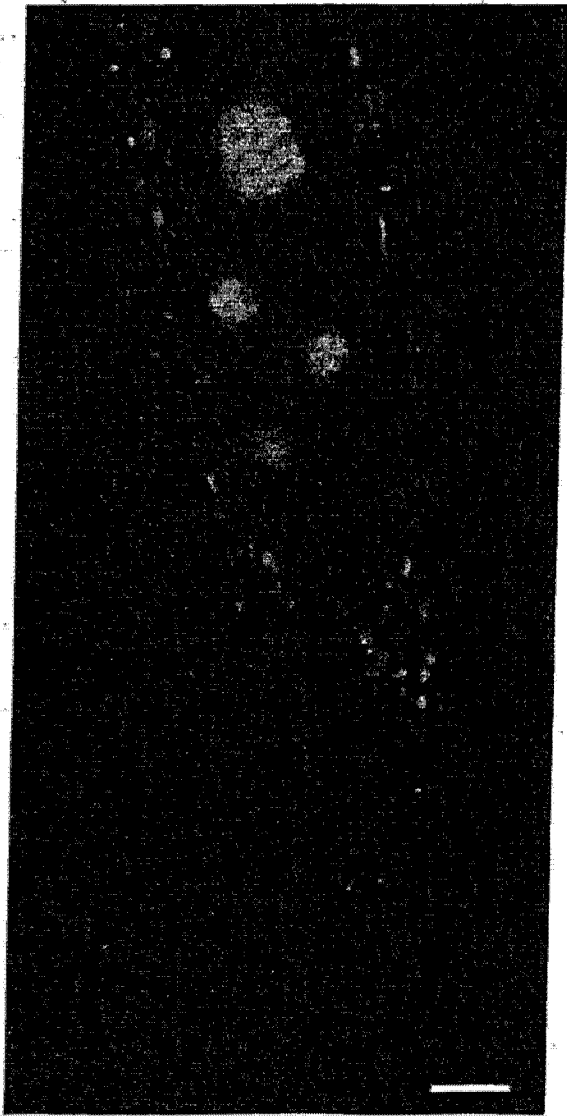


图 11A

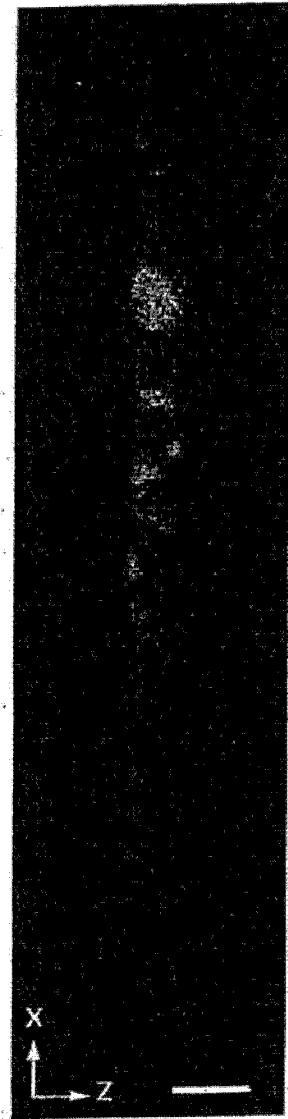


图 11B

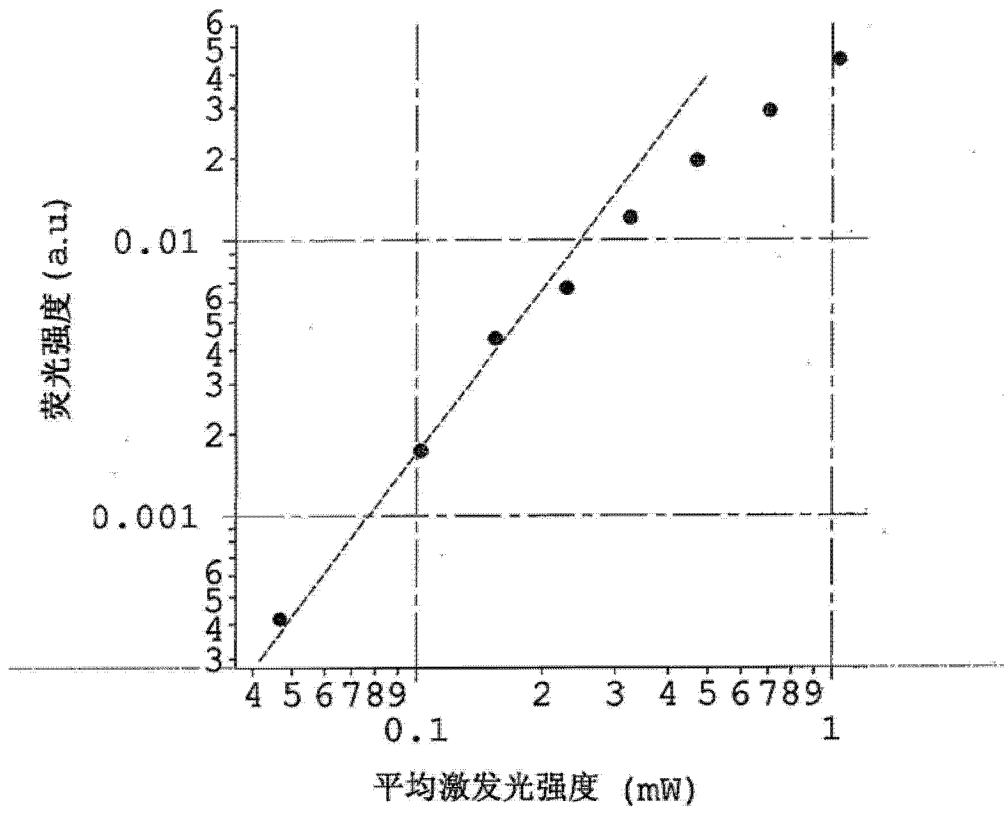


图 12

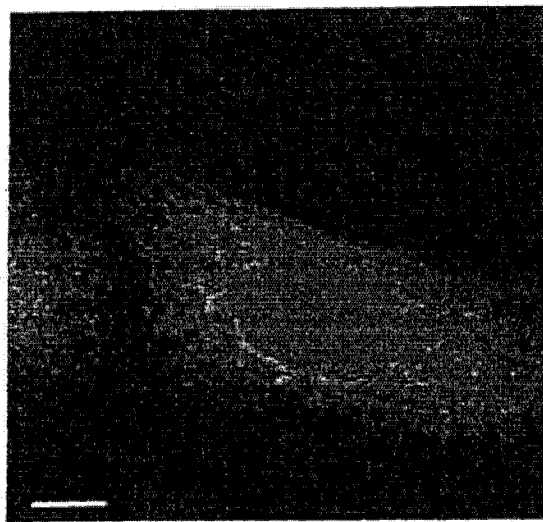


图 13