

OmniFluo-FLIM 系列 显微荧光寿命成像系统

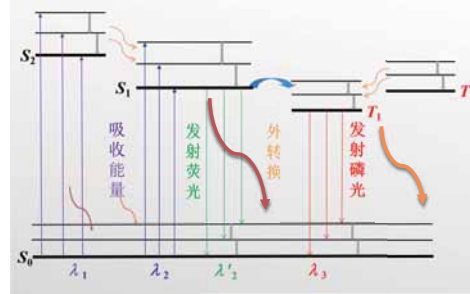
北京卓立汉光仪器有限公司



荧光和 荧光寿命

分子包含多个单能态 S_0 、 S_1 、 S_2 ... 和三重态 T_1 ...，每个能态都包含多个精细的能级。正常情况下，大部分电子处在最低能态即基态 S_0 的最低能级上，当分子被光束照射，会吸收光子能量，电子被激发到更高的能态 S_1 或 S_2 上，在 S_2 能态上的电子只能存在很短的时间，便会通过内转换过程跃迁到 S_1 上，而 S_1 能态上的电子亦会在极短时间内跃迁到 S_1 的最低能级上，而这些电子会存在一段时间后通过震荡弛豫辐射跃迁到基态，这个过程会释放一个光子，即荧光。

此外，亦会有电子跃迁至三重态 T_1 上，再由 T_1 跃迁至基态，我们称之为磷光。



荧光及磷光产生机理
 ↓ 振动弛豫 ↘ 内转换 ↗ 系间窜越

荧光特性

研究荧光特性时，主要在以下几方面进行分析：激发光谱、发射光谱、荧光强度、偏振荧光、荧光发光量子产率、荧光寿命等。其中荧光寿命 (Fluorescence Lifetime) 是指荧光分子在激发态上存在的平均时间 (纳秒量级)。

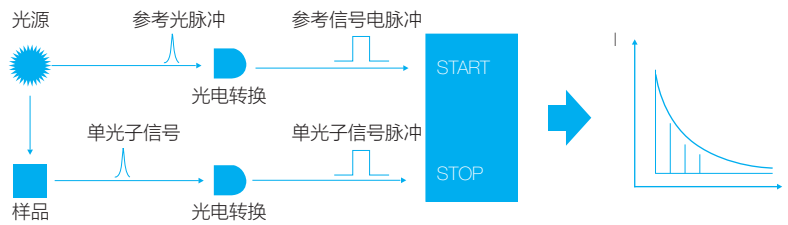
荧光寿命测试

荧光寿命一般在几纳秒至几百纳秒之间，如今主要有两类测试方法：时域测量和频域测量时间稳定性实验测试曲线：

1 时域测量

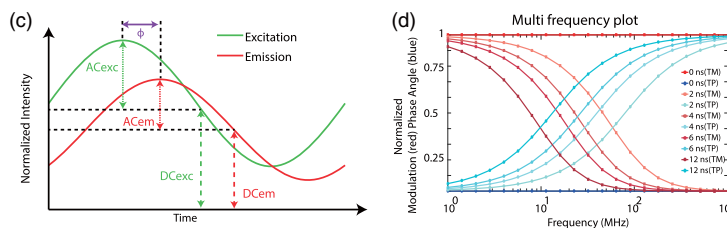
由一束窄脉冲将荧光分子激发至较高能态 S_1 ，接着测量荧光的发射几率随时间的变化。其中目前广泛应用的是时间相关单光子计数，即 TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting)。

时间相关单光子计数 (TCSPC) 实现了从百 ps-ns-us 的瞬态测试，此方法对数据的获取完全依赖快速探测器和高速电路。用统计的方法计算样品受激后发出的第一个 (也是唯一的一个) 光子与激发光之间的时间差，也就是下图的 START (激发时刻) 与 STOP (发光时刻) 的时间差。由于对于 Stop 信号的要求，所以 TCSPC 一般需要高重复频率的光源作为激发源，其重复至少要在 100kHz 以上，多数的光源都会达到 MHz 量级；同时，在一般情况下还要对 Stop 信号做数量上的控制，做到尽量满足在一个激发周期内，样品产生且只产生一个光子的有效荧光信号，避免光子对的出现。



2 频域测量

对连续激发光进行振幅调制后，分子发出的荧光强度也会受到振幅调制，两个调制信号之间存在与荧光寿命相关的相位差，因此可以测量该相位差计算荧光寿命。



左图为正弦调制激发光 (绿色) 频域显示，发射光信号 (红色) 相应的相位变化频域显示。

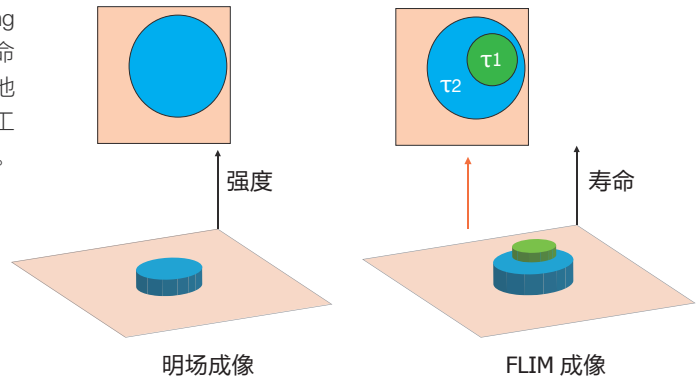
右图为对应不同寿命的调制和相位的频域显示。TM- 调制寿命，TP- 相位寿命。^[1]

[1] Rupsa Datta, Tiffany M. Heaster, Joe T. Sharick, Amani A. Gillette, Melissa C. Skala, Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications. J. Biomed. Opt. 25(7), 071203 (2020)

显微荧光寿命成像技术 (FLIM)

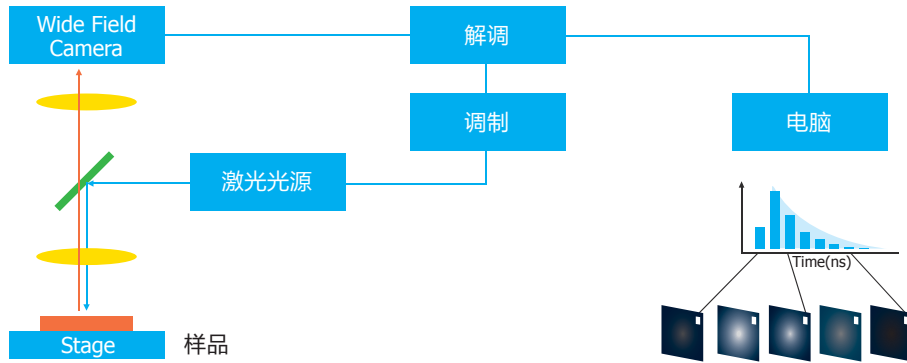
显微荧光寿命成像技术 (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM) 是一种在显微尺度下展现荧光寿命空间分布的技术, 由于其不受样品浓度影响, 具有其他荧光成像技术无法代替的优异性能, 目前在生物医学工程、光电半导体材料等领域是一种重要的表征测量手段。

FLIM 一般分为宽场 FLIM 和激光扫描 FLIM。



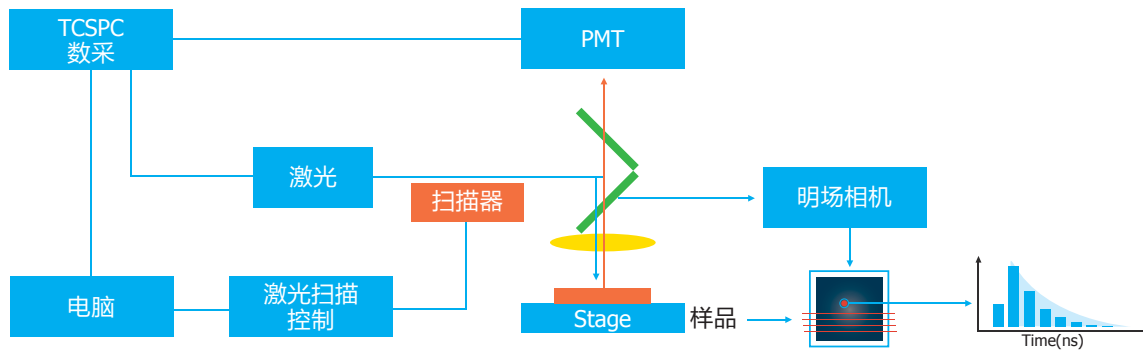
1 宽场 FLIM (Wide Field FLIM, WFM)

该技术是用平行光照明并由物镜聚焦样品获得荧光信号, 再由一宽场相机采集荧光成像。宽场 FLIM 常用于快速获取大面积样品成像。时域或是频域寿命采集都可以应用在宽场成像 FLIM 上。宽场 FLIM 有更高帧率和低损伤的优势。



2 激光扫描 FLIM (Laser Scanning FLIM, LSM)

激光扫描 FLIM 是针对选定区域内的样品逐点获取其荧光衰减曲线, 再经过拟合最终合成荧光寿命图像。相比宽场 FLIM, 其在空间分辨率、信噪比方面有更大的优势。扫描方式有两种: 一种是固定样品, 移动激光进行扫描, 一种是固定激光, 电动位移台带动样品移动进行扫描。



FLIM 应用



应用案例

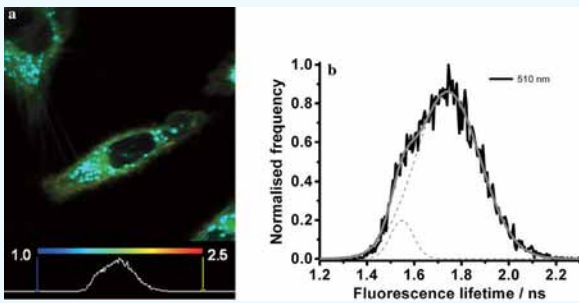
1 用荧光分子对海拉细胞进行染色

用荧光分子转子 Bodipy-C₁₂ 对海拉细胞(宫颈癌细胞的一种)进行染色。

(a) 显微荧光寿命成像图, 寿命范围 1ns (蓝色) 到 2.5ns (红色);

(b) 荧光寿命直方图, 脂肪滴的短寿命约在 1.6ns 附近, 细胞中其他位置寿命较长, 在 1.8ns 附近。

用荧光分子转子的时间分辨测量最大的好处在于荧光寿命具备足够清晰的标签特性, 且与荧光团的浓度无关。^[2]



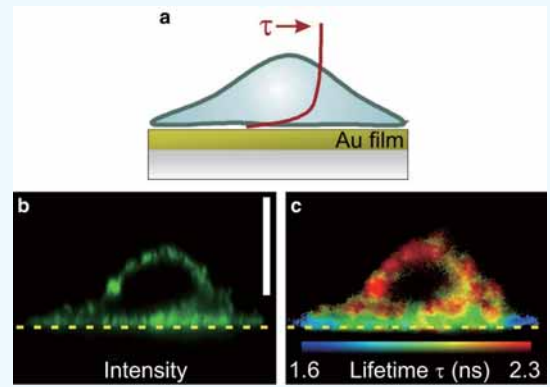
2 金属修饰荧光

金属修饰荧光:

(a) 荧光寿命是荧光团到金表面距离的函数;

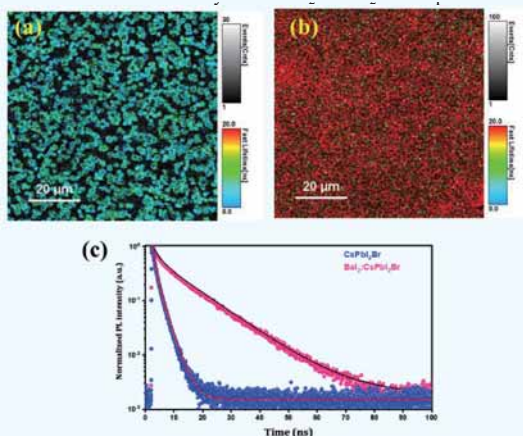
(b) 用绿色荧光蛋白 (GFP) 标记乳腺癌细胞的细胞膜的共聚焦 xz 横截面, 垂直比例尺: 5 μ m;

(c) b 图的 FLIM 图, 金表面附近的 GFP 荧光寿命缩短。^[2]



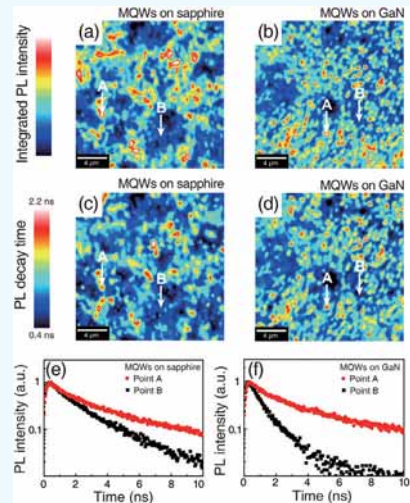
3 钙钛矿太阳能电池

下图研究中, 展示了一种动态热风 (DHA) 制备工艺来控制全无机 PSC 的薄膜形态和稳定性, 该工艺不含有常规的有害反溶剂, 可以在大气环境中制备。同时, 钙钛矿掺有钡 (Ba²⁺) 碱金属离子 (Ba₂:CsPbI₂Br)。这种 DHA 方法有助于形成均匀的晶粒并控制结晶, 从而形成稳定的全无机 PSC, 从而在环境条件下形成完整的黑色 α 相。经过 DHA 处理的钙钛矿光伏器件, 在 0.09 cm² 小面积下, 效率为 14.85%, 在 1 \times 1 cm² 的大面积下, 具有 13.78% 的最高效率。DHA 方法制备的器件在 300 h 后仍然保持初始效率的 92%。^[3]



4 MQWs 多量子阱研究

在 (a) 蓝宝石和 (b) GaN 上生长的 MQWs 的共焦 PL mapping 图像。具有较小尺寸的发光团的最高密度是观察到在 GaN 上生长的 MQWs。在 (c) 蓝宝石和 (d) GaN 上生长的 MQWs 的共焦 TRPL mapping 图。仅对于在 GaN 上生长的 MQWs, 强的 PL 强度区域与较长 PL 衰减时间的区域很好地匹配。在 (e) 蓝宝石和 (f) GaN 上生长的 MQWs 在 A 点和 B 点测量的局部 PL 衰减曲线, 均标记在图中。对于在 GaN 上生长的 MQWs, 点 A 和 B 之间的 PL 衰减时间差更高。^[4]



[2] Klaus Suhling, Liisa M. Hirvonen, James A. Levitt, Pei-Hua Chung, Carolyn Tregidgo, Alix Le Marois, Dmitri A. Rusakov, Kaiyu Zheng, Simon Ameer-Beg, Simon Poland, Simao Coelho, Robert Henderson, Nikola Krstajic. Fluorescence lifetime imaging (FLIM): Basic concepts and some recent developments, Medical Photonics, 27, 3-40 (2015)

[3] Hot-Air-Assisted Fully Air-Processed Barium Incorporated CsPbI₂Br Perovskite Thin Films for Highly Efficient and Stable All-Inorganic Perovskite Solar Cells. Nano Lett. 19(9), 6213-6220 (2019)

[4] Jeong, H., Jeong, H., Oh, H. et al. Carrier localization in In-rich InGaIn/GaN multiple quantum wells for green light-emitting diodes. Sci Rep 5, 9373 (2015)

OmniFluo-FLIM 系列 显微荧光寿命成像系统参数配置

北京卓立汉光仪器有限公司提供的显微荧光寿命成像系统是基于显微和时间相关单光子计数技术，配合高精度位移台得到微观样品表面各空间分布点的荧光衰减曲线，再经过用数据拟合，得到样品表面发光寿命表征的影像。是光电半导体材料、荧光标记常用荧光分子等类似荧光寿命大多分布在纳秒、几十、几百纳秒尺度的物质的不二选择。



参数指标:

系统性能指标	
光谱扫描范围	200-900nm
最小时间分辨率	16ps
荧光寿命测量范围	500ps-1μs@ 皮秒脉冲激光器
空间分辨率	≤1μm@100X 物镜 @405nm 皮秒脉冲激光器
荧光寿命检测 IRF	≤2ns
配置参数	
激发源及匹配光谱范围 (光源参数基于 50MHz 重复频率)	375nm 皮秒脉冲激光器, 脉宽: 30ps, 平均功率 1.5mW, 荧光波段: 400-850nm
	405nm 皮秒脉冲激光器, 脉宽: 25ps, 平均功率 2.5mW, 荧光波段: 430-920nm
	450nm 皮秒脉冲激光器, 脉宽: 50ps, 平均功率 1.9mW, 荧光波段: 485-950nm
	488nm 皮秒脉冲激光器, 脉宽: 70ps, 平均功率 1.3mW, 荧光波段: 500-950nm
	510nm 皮秒脉冲激光器, 脉宽: 75ps, 平均功率 1.1mW, 荧光波段: 535-950nm
	635nm 皮秒脉冲激光器, 脉宽: 65ps, 平均功率 4.3mW, 荧光波段: 670-950nm
	670nm 皮秒脉冲激光器, 脉宽: 40ps, 平均功率 0.8mW, 荧光波段: 700-950nm
科研级正置显微镜	落射明暗场卤素灯照明, 12V, 100W 5 孔物镜转盘, 标配明场用物镜: 10×, 50×, 100× 监视 CCD: 高清彩色 CMOS 摄像头, 像元尺寸: 3.6μm*3.6μm, 有效像素: 1280H*1024V, 扫描方式: 逐行, 快门方式: 电子快门
电动位移台	高精度电动 XY 样品台, 行程: 75*50mm (120*80mm 可选), 最小步进: 50nm, 重复定位精度: < 1μm
光谱仪	320mm 焦距影像校正单色仪, 双入口、狭缝出口、CCD 出口, 配置三块 68*68mm 大面积光栅, 波长准确度: ±0.1nm, 波长重复性: ±0.01nm, 扫描步距: 0.0025nm, 焦面尺寸: 30mm(w)*14mm(h), 狭缝缝宽: 0.01-3mm 连续电动可调 探测器: 制冷型紫外可见光电倍增管, 光谱范围: 185-900nm (标配, 可扩展)
光谱 CCD (可扩展 PLmapping)	低噪声科学级光谱 CCD (LDC-DD), 芯片格式: 2000*256, 像元尺寸: 15μm*15μm, 探测面: 30mm*3.8mm, 背照式深耗尽芯片, 低暗电流, 最低制冷温度 -60℃ @25℃ 环境温度, 风冷, 最高量子效率值 >95%
时间相关单光子计数器 (TCSPC)	时间分辨率: 16/32/64/128/256/512/1024ps……33.55μs, 死时间 < 10ns, 最高 65535 个直方图时间窗口, 瞬时饱和计数率: 100Mcps, 支持稳态光谱测试;
OmniFluo-FM 荧光寿命成像专用软件	控制功能: 控制样品平移台移动, 通过显微镜的明场光学像定位到合适区域, 框选扫描区域进行扫描, 逐点获得荧光衰减曲线, 实时生成荧光图像等 数据处理功能: 自动对扫描获得的 FLIM 数据, 逐点进行多组分荧光寿命拟合 (组分数小于等于 4), 对逐点拟合获得的荧光强度、荧光寿命等信息生成伪彩色图像显示 图像处理功能: 直方图、色表、等高线、截线分析、3D 显示等
操作电脑	品牌操作电脑, Windows 10 操作系统

备注: 更多详尽配置及参数请咨询销售

丰富的激发波长选择

支持多路激光器耦合

拓展 CCD 光谱仪可同时实现 PL mapping 及 FLIM/TRPL

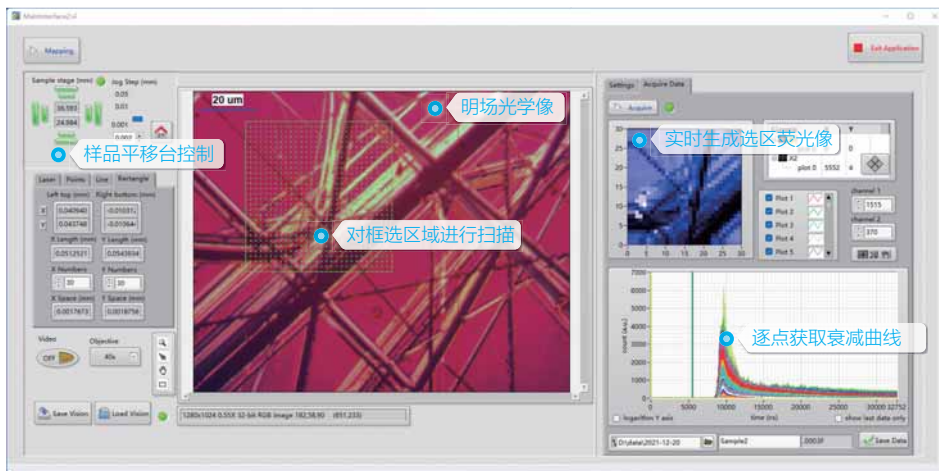
可配置高、低温样品台



FLIM 软件界面

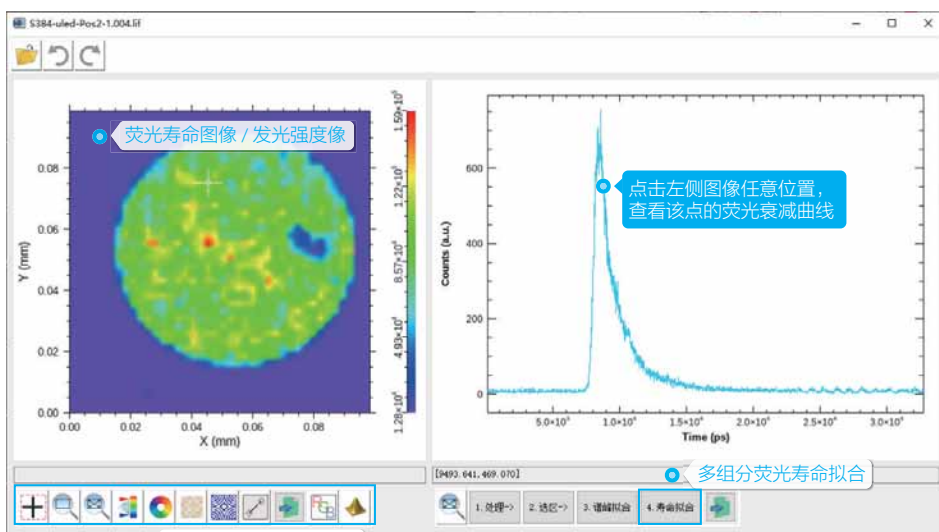
控制测试界面

测试软件的界面遵循“All In One”的简洁设计思路，用户可在下图所示的控制界面中完成采集数据的所有步骤：包括控制样品平移台移动，通过显微镜的明场光学像定位到合适区域，框选扫描区域进行扫描，逐点获得荧光衰减曲线，实时生成荧光图像等。软件可控制光谱仪，扫描得到光谱测试曲线，或者是进行快速 PL Mapping（配置 CCD 检测器）。



数据处理界面

功能丰富的荧光寿命数据处理软件，充分挖掘用户数据中的宝贵信息。可自动对扫描获得的 FLIM 数据，逐点进行多组分荧光寿命拟合（组分数小于等于 4），对逐点拟合获得的荧光强度、荧光寿命等信息生成伪彩色图像显示。



丰富的图像处理功能：
直方图、色表、等高线、
截线分析、3D 显示

自主开发的一套时间相关单光子计数（TCSPC）荧光寿命的拟合算法，可对荧光衰减曲线中最多包含 4 个时间组分的荧光过程进行拟合，获得每个组分的荧光寿命，光子数比例，计算评价函数和残差。TCSPC 荧光寿命通常并非简单的指数衰减过程，而是与光源及探测器相关的仪器响应函数（IRF）与荧光衰减过程相互卷积的结果，因此适当的拟合方法和参数选择对获得正确可靠的荧光寿命非常重要。该软件可导入实际测量的 IRF 对衰减曲线进行卷积计算和拟合。但是大多数情况下，IRF 很难正确的从实验获得，针对这种情况，软件提供了两种无需实验获取 IRF 的拟合方法：

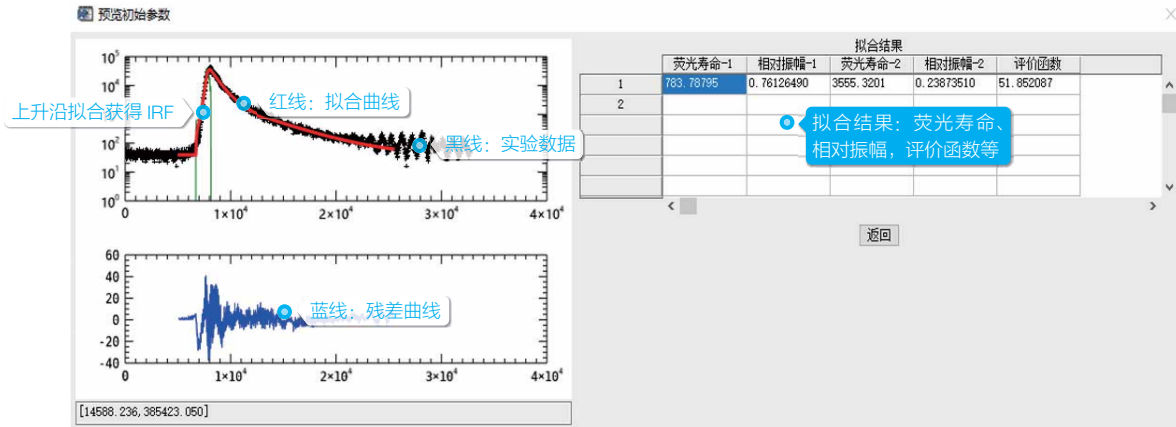
NO.1

通过算法对数据上升沿进行拟合，获得时间响应函数 IRF，然后对整条衰减曲线进行卷积计算和拟合得到荧光寿命。

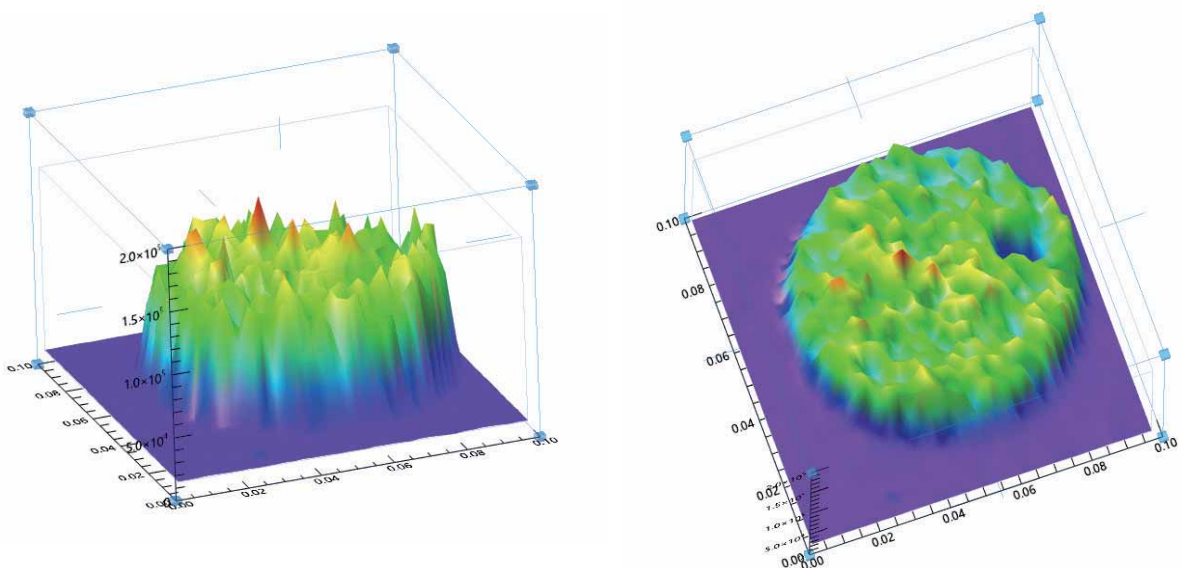
NO.2

对于衰减时间远长于仪器响应时间的，可对衰减曲线下降沿进行直接的指数拟合。

该软件经过大量测试，可以很好的满足各种场合的用户需求。

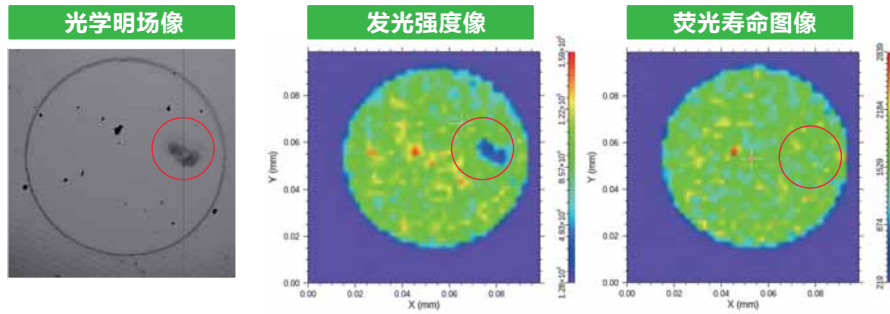


MicroLED 微盘的荧光强度像(3D 显示):

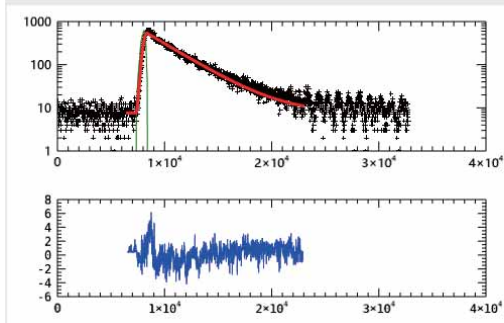


测试案例

MicroLED: LED 微盘，直径约 80 微米



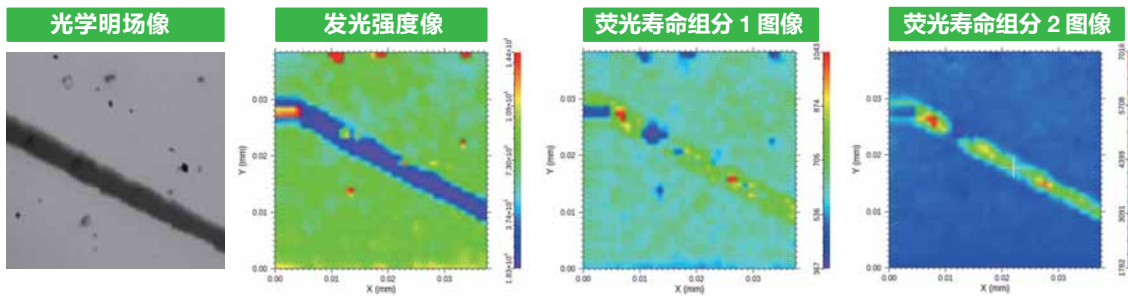
预览初始参数



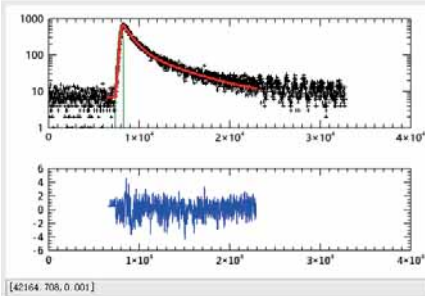
拟合结果			
荧光寿命-1	相对振幅-1	评价函数	
1	2397.4098	1.0000000	1.9377665

单组分拟合，可以看到红圈中的污损位置，虽然影响发光强度，但对发光寿命没有影响

钙钛矿样品 - 位置 1



预览初始参数

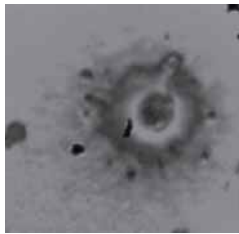


拟合结果					
	荧光寿命-1	相对振幅-1	荧光寿命-2	相对振幅-2	评价函数
1	946.023325	0.55149735	4460.8276	0.43652064	1.4751051
2					

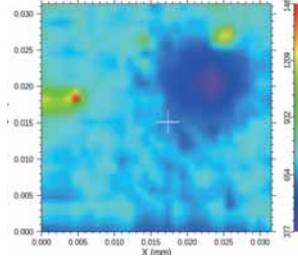
钙钛矿样品做双组分的寿命成像

钙钛矿样品 - 位置 2

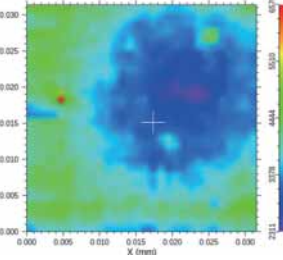
光学明场像



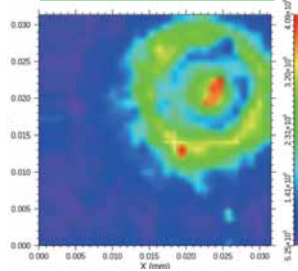
荧光寿命组分 1 图像



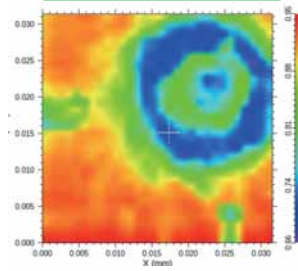
荧光寿命组分 2 图像



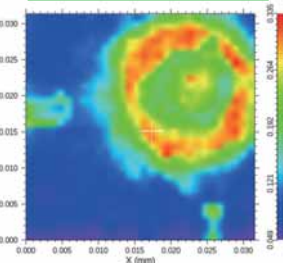
发光强度像



相对振幅组分 1 图像



相对振幅组分 2 图像

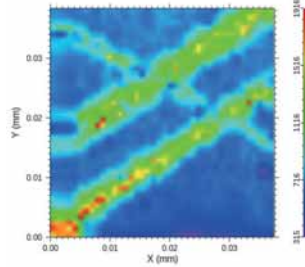


钙钛矿样品 - 位置 3

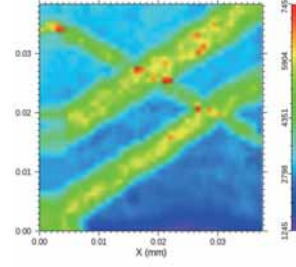
光学明场像



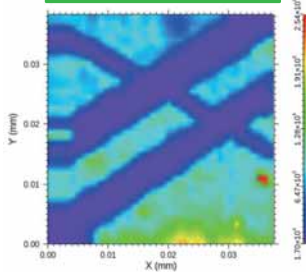
荧光寿命组分 1 图像



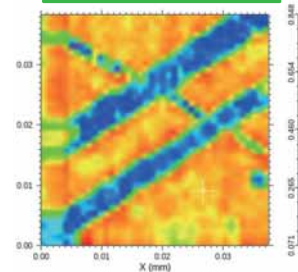
荧光寿命组分 2 图像



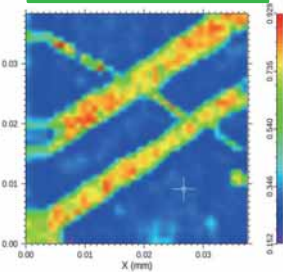
发光强度像



相对振幅组分 1 图像



相对振幅组分 2 图像





卓立现在 着眼未来

北京卓立汉光仪器有限公司

北京:

北京市通州区金桥产业基地 联东U谷
中试区68号B座
电话: 010 56370168
传真: 010 56370118
邮箱: info@zolix.com.cn
邮编: 101102

上海:

上海市普陀区武宁路501号鸿运
大厦17楼1701-1710室
电话: 021 62227575
传真: 021 62227911
邮箱: info-sh@zolix.com.cn
邮编: 200063

深圳:

深圳市龙华区民治梅龙路
七星商业广场B1106室
电话: 0755 83293053
传真: 0755 83230070
邮箱: info-sz@zolix.com.cn
邮编: 518131

成都:

四川省成都市青羊区顺城街206号
四川国际大厦七楼G座
电话: 028 84896020
传真: 028 84896038-816
邮箱: info-cd@zolix.com.cn
邮编: 610106

西安:

陕西省西安市高新区高新六路38号腾
飞创新中心B座206室
电话: 029 89562755
传真: 029 89562755
邮编: 710065

长春:

长春市高新技术产业开发区
硅谷大街1198号硅谷大厦931室
电话: 0431 89231139
邮箱: sales-cc@teo.com.cn
邮编: 130012

郑州:

河南省郑州市中原区建设西路
荣成大厦1215室
电话: 13910017428
邮箱: alex-xu@teo.com.cn
邮编: 450007

更多产品, 请访问我们的网站: www.zolix.com.cn