

【摘要】 荧光寿命成像（FLIM）是一种强大的生物医学成像技术，能够揭示样本的分子环境信息，提供比强度成像更丰富的对比度。然而，传统的扫描式FLIM系统受限于逐点采集方式，速度慢，难以捕捉动态过程。现在，随着FLIMera TCSPC 相机的出现，这一切发生了改变。

背景介绍

荧光寿命成像（FLIM）技术长期以来与共聚焦显微镜系统耦合工作，使用时间相关单光子计数（TCSPC）技术进行FLIM成像，通过区域扫描方式结合单个TCSPC探测器，实现高灵敏度的寿命测量，可达到皮秒级时间分辨率，但其受限于扫描速度、设备死时间及光子通量，导致成像速度缓慢，难以满足动态生物过程的观测需求。

宽场成像方法通过整体照明和阵列探测器同步成像，从根本上避免了扫描带来的时间损耗。然而，传统宽场FLIM技术在空间分辨率方面存在局限，且始终未能充分发挥其在成像速度方面的理论潜力。

近年来，CMOS技术的突破性发展为FLIM带来了全新解决方案。单光子雪崩二极管（SPAD）阵列集成了像素级的时间数字转换器（TDC），实现了每个像素独立进行TCSPC计时的能力。这种并行处理架构不仅显著提升了探测器分辨率，更使实时荧光寿命成像成为可能。

本文重点介绍基于FLIMera TCSPC 相机的"同步直方图快速寿命采集"（FLASH）技术，该技术充分发挥宽场FLIM 的速度优势，为生命科学和医学研究提供强有力的成像工具。下文将系统阐述FLASH-FLIM的技术特点并展示其典型应用实例。

FLIMera TCSPC 摄像机

FLIMeraTCSPC相机采用 CMOS 传感器，构成 192×126 像素的宽场TCSPC成像阵列。每个像素均集成了单光子雪崩二极管（SPAD）和对应的时间数字转换器（TDC），实现了全并行化的光子事件处理与计时能力（结构见图1）

该系统的传感器芯片详细信息，此前已有报道 [4]

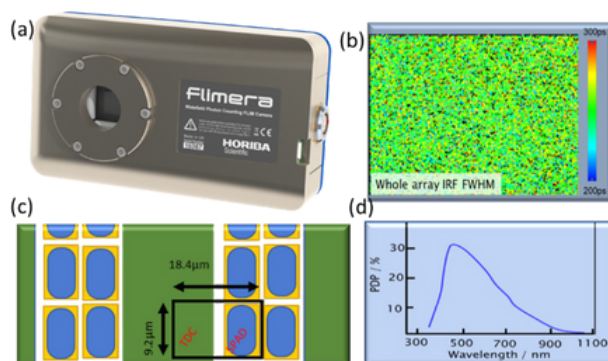


图 1：（a）FLIMera 摄像机，（b）整个阵列的 IRF 图像、（c）传感器结构示意图；（d）波长响应。

相机配备标准C接口（C-Mount），可便捷连接显微镜系统或成像镜头等装置，轻松适配从微观到宏观（MacroFLIM）的多种成像场景。系统采用脉冲激光光源（如HORIBA DeltaDiode [5]）进行宽场照明，适用光源重复频率范围为5-100 MHz。整个成像过程通过FLIMera基本单元（FBU）进行电子同步（TTL信号）控制，并全部由用户友好的EzTimeImage软件实现数据采集与荧光寿命分析。

FLIMera 的连接示意图如图 2 所示。

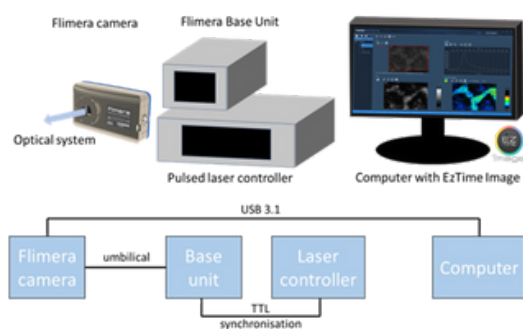


图 2：FLIMera 连接示意图

测量模式

当开启FLIMera并启动配套的EzTime Image软件时，系统会实时显示一幅光子计数强度图像。该图像由传感器以约12,000 fps的高原始帧率经过像素合并生成，用户可自由调整其对比度或像素合并，以优化视觉效果和系统响应速度。这一实时强度成像功能可用于快速预览样品，并辅助用户选定需要进行荧光寿命精确测量的目标区域。

FLIMera的核心优势在于采用了FLASH-FLIM技术，能够同时对全视野所有像素进行荧光寿命采集，彻底摆脱了传统扫描式的速度限制，实现高速宽场寿命成像。结合EzTime Image软件强大的实时处理能力，系统可以依据样品特性和实验条件，以高达约30 fps的视频速率，实时生成并显示平均寿命图像。用户可通过“FLIMFlix”功能将动态寿命变化过程保存为标准avi视频，便于后续回放或处理。

需要说明的是，实时显示的平均寿命图像适于快速观察和对比，但其本质仍是寿命分布的近似表征。若需开展深入定量分析（如解析多指数衰减过程），则需依托系统在正常定时测量模式下采集的完整TCSPC数据进行全面分析及拟合。EzTimeImage支持对全芯片所有像素进行全局拟合分析，最多可使用五个指数模型精确解析复杂的荧光衰减行为。

此外，若用户需要研究样品动态变化过程，还可通过EzTime Image将原始FLIM数据流转换为开放的HDF5文件格式。该文件完整记录了每个像素的光子事件信息（包括宏时间和微时间），既可在软件内部进行深入分析，也支持被第三方专业软件读取和处理，为荧光动力学研究提供了完整、灵活的数据基础。

数据表示

在FLIMera的TCSPC测量过程中，系统会同步显示样品的荧光强度图像与平均寿命图像，为用户提供直观的实时反馈。

EzTime Image 软件提供了丰富的数据可视化与分析功能：

- **“总和” / “单个” 直方图显示：**用户可选择任意单个像素或特定区域，查看其对应的荧光衰减直方图；
- **相位图（Phasor）分析：**支持在强度或寿命图像中基于相位图选择特定寿命区域进行显示与分析；
- **定量参数展示：**软件中的 TCSPC 参数窗口可显示多项拟合结果，包括平均寿命、衰减组分的前指数因子相对贡献、拟合优度（ χ^2 ）等关键参数。

不同数据模式的显示方式示意图见图3，软件数据界面的实际布局见图4。

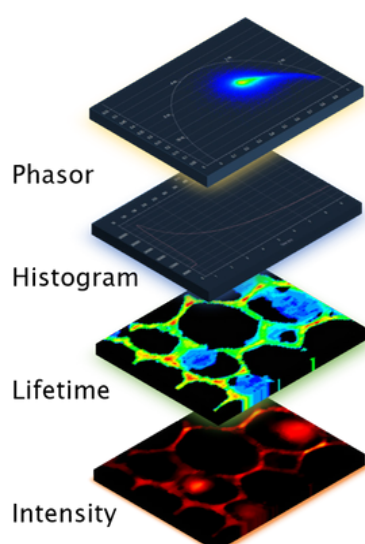


图 3：不同类型数据表示示意图



图 4：EzTime 图像 "Data" 的示意图

由于CMOS传感器特性，图像中偶尔会出现响应过高的“热像素”。这些像素会显示为异常亮点，并占用数据传输带宽。EzTime Image 提供了有效的解决方案：

- **像素掩模（Mask）功能：**可自动或手动屏蔽热像素，提升数据传输效率与图像质量
- **中值滤波（Median Filter）：**可进一步抑制热像素带来的空间噪声，改善整体图像效果

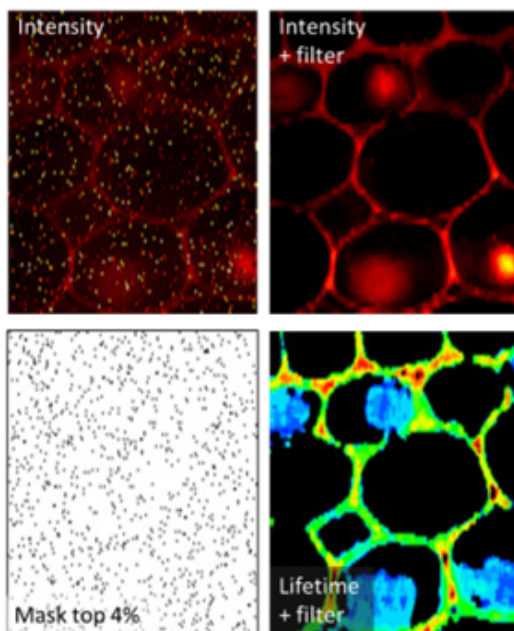


图 5: "热"像素对图像质量的影响, 以及使用像素掩码和降噪滤波器来缓解这种影响。图中还标出了可以屏蔽的最噪点 4% 像素的位置。

测量示例

相比传统扫描式 FLIM 系统, FLASH-FLIM 技术能够实现快速的 TCSPC 测试, 这一进步使得荧光寿命成像在动态样品观测中变得更具可能性, 例如在活细胞成像、细胞内代谢过程以及细胞间信号传递等研究中, 监测过程中的荧光寿命成像。

此外, 该技术也为原本仅具备强度成像能力的显微镜系统 (如宽场、光片、全内反射荧光及单分子显微镜等) 增添了荧光寿命成像功能。只需将 FLIMera 相机接入光路, 即可为这些系统带来寿命分辨能力。不仅如此, 通过改用宏观成像镜头并对样品实施均匀的脉冲激光照明, 还可将 FLIM 应用于宏观尺度样品的寿命成像。

需要说明的是, 尽管 FLASH-FLIM 具备高速成像潜力, 但其数据质量仍依赖于足够的光子数量以进行准确的寿命拟合。因此, 为实现良好的对比度乃至视频级帧率的寿命成像, 仍需充足的信号强度。

下文将介绍几个 FLIMera 相机的典型应用示例。

宽视场 FLIM

FLIMera 相机可便捷地集成至现有显微镜系统, 轻松为实验平台增添荧光寿命成像 (FLIM) 功能。结合宽场照明与 FLASH-FLIM 快速采集技术, 用户只需搭建合适的激发光路, 即可实现高速、全帧荧光寿命检测。

例如, 在对固定 GHFT1 细胞 (表达 Cerulean - 5 - Venus FRET 对探针) 样本的实验中, 采用 HORIBADeltaDiode 脉冲激光器作为激发源, 仅需 1 秒即可完成寿命数据的采集。通过双指数衰减模型进行全局拟合, 得到样品的平均寿命图像 (图 6)。

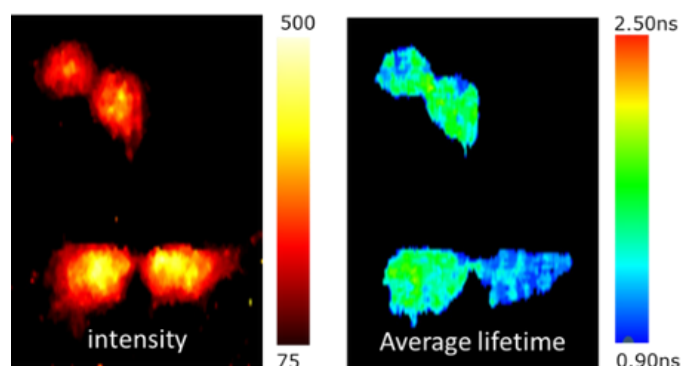


图 6: 1 秒钟内成像的 Cerulean-5-Venus 标记的 GHFT1 细胞的强度和寿命。

进一步分析各寿命组分的相对贡献（前指数因子）发现，右下方细胞中0.6 ns短寿命组分的比例显著升高（图7）。这一结果清晰表明，即使在极短的采集时间内，FLIM仍可提供足够的对比度，有效区分FRET状态的变化，这对于FLIM-FRET研究具有重要意义。

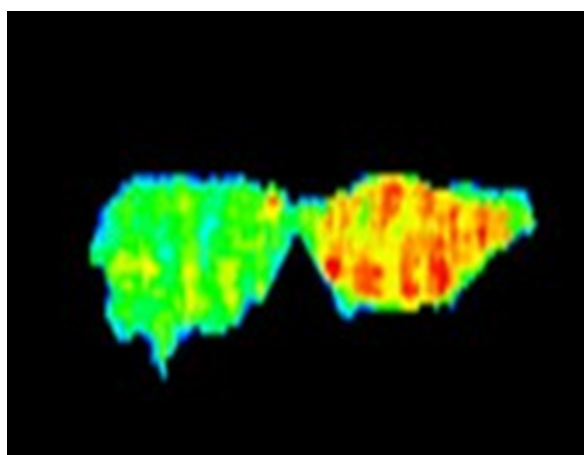


图 7：0.6 ns 分量的前指数贡献。彩虹色阶比例（蓝色 = 较少，红色 = 较多）。

在实际应用中，采集速度还可随光子通量的提升而进一步提高。例如，一项针对肿瘤模型的研究便利用 FLIMera 实现了高速成像[6]。该研究以20帧/秒的速率对经FUN-1活力染料标记的酵母细胞进行了实时观测（图8）。FUN-1染料具备显著的时间分辨荧光特性[7]，此项实验也成功验证了FLIMera在流体样品实时监测方面的强大能力。

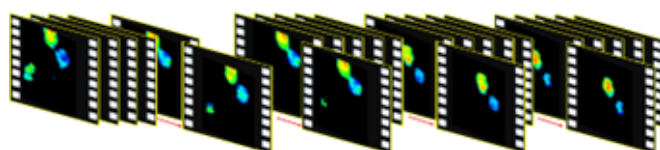


图 8：以 20 帧/秒（每帧 50 ms）拍摄的 FUN-1 标记酵母流动样本示意图。不同颜色代表

FLIMera 相机本身分辨率为 192×126 像素，为进一步提升图像质量，研究人员正积极开发多种图像增强策略。例如，可通过与高分辨率CCD图像融合[8]或采用上采样方法[9]，在后期处理中重建更清晰的荧光寿命图像。此外，为获取大视场样本的整体寿命信息，还可将 FLIMera 搭载于扫描平台上进行拼接成像。

通过EzTime Image软件，用户能够直接控制兼容的位移台，也可借助Python等脚本语言驱动第三方平台，采集多位置图像并拼接成完整的“Mosaic”大图。如图9所示，以Convallaria样品为例，拍摄时通常以视野中心区域为焦距锚点，进行排列。

需注意的是，对于拼接后的整幅Mosaic图像，虽无法直接进行全帧寿命拟合，但仍可依据荧光强度阈值或相位图（Phasor）分析手段提取不同区域的寿命对比信息，从而有效呈现样品的内在特性分布。

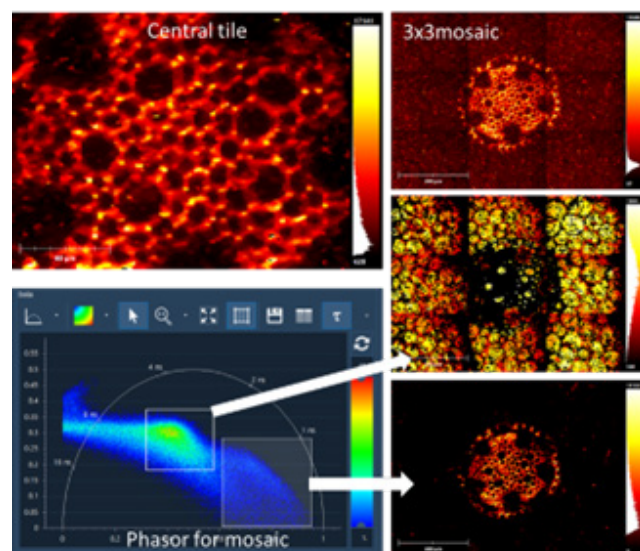


图 9：使用相位图选择样品的不同区域，对寿命差异进行测量的结果。这里显示的是对强度图像的影响。

在实际应用中，采集速度还可随光子通量的提升而进一步提高。例如，一项针对肿瘤模型的研究便利用 FLIMera 实现了高速成像[6]。该研究以20帧/秒的速率对经FUN-1活力染料标记的酵母细胞进行了实时观测（图8）。FUN-1染料具备显著的时间分辨荧光特性[7]，此项实验也成功验证了FLIMera在流体样品实时监测方面的强大能力。

光片显微镜

目前，大多数显微成像系统仍采用基于强度的相机进行拍摄。然而，对于光片显微镜等特定技术而言，将普通相机替换为FLIMera这类荧光寿命相机，可为成像结果增添宝贵的时间维度信息，从而实现对样品功能特性的更深入解析。

例如，将FLIMera与光片显微镜结合，已成功应用于活细胞内源代谢辅酶NAD(P)H的荧光寿命成像，能够快速捕捉代谢状态的动态变化[10]。更进一步，研究人员还将FLIMera与数字扫描光片显微镜、双光子激发技术联用：双光子激发提供了更深的组织穿透能力，而FLIMera则负责同步捕获各扫描位置寿命信息。在此配置中，需保证足够的扫描光子通量以有效激发荧光团，并通过优化扫描机构与光学设计，最终实现了高效、快速的寿命数据采集[11]。

如图10所示，在此类双光子激发光片系统中对荧光标记微珠进行成像，可清晰地区分出不同寿命特征的微珠种群，充分展示了该技术在体积成像中分辨复杂寿命信息的能力。

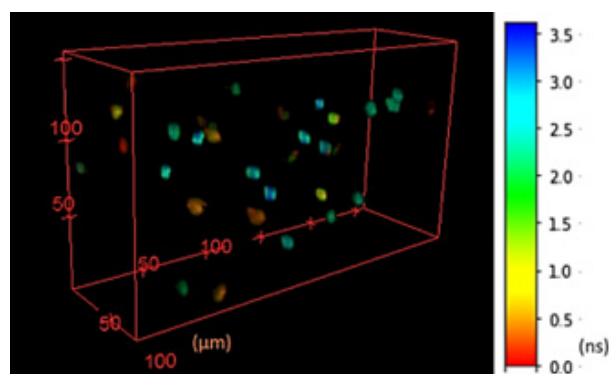


图 10：使用 FLIMera 数字扫描光片显微镜获得的荧光珠体积图像。

宏观 FLIM

荧光寿命成像（FLIM）的应用并不局限于微观世界。借助透镜系统与均匀的脉冲照明，无需使用显微镜，FLIMera 同样可对宏观样品进行荧光寿命成像。

如图11所示，研究人员对一片斑叶橡胶树（*Ficus elastica variegata*）的叶片进行了宏观FLIM成像。图像清晰呈现出叶绿素区域与非叶绿素区域在寿命对比上的显著差异，显示出该技术在宏观尺度下区分生物样本内在特性的能力。

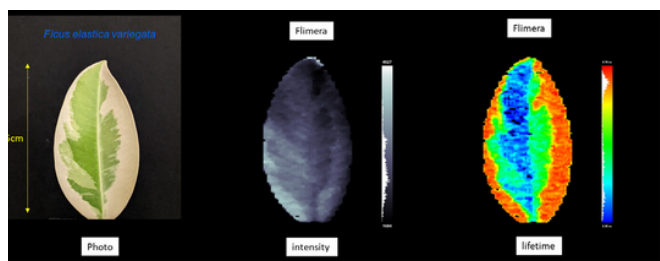


图 11：一片杂色叶片的宏观FLIM，显示了使用漫射 DeltaDiode 激发的 FLIM 相机测量的强度和平均寿命。

由于FLIMera的每个像素均独立记录荧光衰减过程，相当于一个微型“飞行时间”传感器，因此单次测量既可获取寿命信息，也可反映荧光信号到达时间的差异。这一特性使得它甚至能够解析样本的宏观距离信息。

图12展示了这一独特应用：在反射光路中对不同距离的荧光载玻片进行成像。离相机更近的玻片其荧光信号更早到达，表现为衰减曲线在时间轴上的前移（图12c）。通过分析不同感兴趣区域（ROI）衰减曲线的上升沿中点时间差，可计算出玻片间距离约为9.4 cm。该系统目前可实现约40 ps的时间分辨能力，对应的理论距离分辨率为1.2 cm（透射）或0.6 cm（反射）。

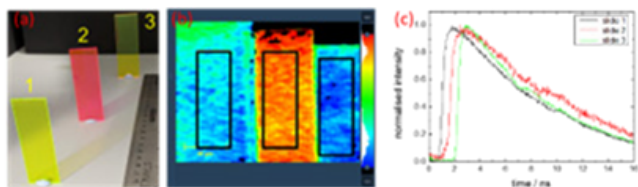


图 12：荧光载玻片与 FLIM 相机不同距离处的 MacroFLIM。(a) 载玻片的位置（相距约 10 厘米）；(b) FLIM 数据，其中选取了 3 个感兴趣的区域（黑色矩形）；(c) 不同感兴趣区域内所有像素的衰减直方图。

总结

FLIMera TCSPC 相机所实现的 FLASH-FLIM 技术，为研究动态生物体系中的荧光寿命与快速动力学过程提供了强大工具。由于其每个像素均具备独立的光子事件探测与计时能力，可在“瞬间”同时完成全帧荧光寿命采集，因此数据获取速度远优于传统的扫描式FLIM系统。

用户不仅能够以视频速率（如30 fps）实时观察平均寿命图像，还可对高速流式数据进行深入的后期处理，全面挖掘动力学信息。FLIMera具备高度的系统兼容性，既可集成于宽场显微镜内，也可在宏观成像等自定义光路中使用，灵活适配多种成像模式。

值得一提的是，其像素级精密计时能力也拓展了FLIM之外的应用场景，例如时域近红外光学成像[12]及深度解析成像[13]等前沿领域。卓越的创新性与广泛的应用价值，使FLIMera荣获了物理学会颁发的商业创新奖。



鸣谢

本研究衷心感谢量子信息中心对本项目的资助支持。同时，我们向 Jonathan Taylor（格拉斯哥大学）和 Christopher Leburn（Chromacity）表示诚挚感谢，感谢他们在数据采集与分析中作出的重要贡献。

参考文献

1. H. Lemmetyinen et al. 2014. Time-resolved fluorescence methods (IUPAC technical report). Pure Appl. Chem., 86, 1969-1998.
2. L.M. Hirvonen and K. Suhling 2017. Wide-field TCSPC: methods and applications. Meas. Sci. Technol., 28, 012003.
3. C. Bruschini et al. 2019. Single-photon avalanche diode imagers in biophotonics: review and outlook. Light: Sci. Appl., 8, 87.
4. R.K. Henderson et al. 2019. A 192 x 128 Time Correlated SPAD Image Sensor in 40nm CMOS Technology. IEEE J. Solid-State Circuits, 54, 1907-1916.
5. D. McLoskey et al. 2011. Fast time-correlated single-photon counting fluorescence lifetime acquisition using a 100 MHz semiconductor excitation source. Meas. Sci. Technol., 22, 067001.
6. K. Sagoo et al. 2021. Rapid (FLASH-FLIM) imaging of protoporphyrin IX in a lipid mixture using a CMOS based widefield fluorescence lifetime imaging camera in real time for margin demarcation applications. Methods Appl. Fluoresc., 9, 015002.

7. A.S. Holmes-Smith et al. 2013. Viability of *Saccharomyces cerevisiae* incorporated within silica and polysaccharide hosts monitored via time-resolved fluorescence. Photochem. Photobiol. Sci., 12, 2186-2194.
8. Y. Zhou et al. 2020. Megapixel Fluorescence Lifetime Imaging by Super-Resolution of a SPAD array. In Imaging and Applied Optics Congress, OSA Technical Digest (Optical Society of America, 2020), paper CW1B.2.
9. C. Callenberg et al. 2021. Super-resolution time-resolved imaging using computational sensor fusion. Sci. Rep., 11, 1689.
10. K. Samimi et al. 2023. Light sheet autofluorescence lifetime imaging with a single photon avalanche diode array. bioRxiv [Preprint]. 2023 Feb 3:2023.02.01.526695. doi: 10.1101/2023.02.01.526695.
11. K.J. Nutt et al. 2023. High-efficiency digitally scanned light-sheet fluorescence lifetime microscopy (DSLM-FLIM). bioRxiv [Preprint] 2023.06.02.543377v1. doi: 10.1101/2023.06.02.543377.
12. G. Hungerford et al. 2023. Potential for remote TD-NIRS imaging using a TCSPC camera. Meas. Sci. Technol., 34, 085702.
13. S. Scholes et al. 2023. Fundamental limits to depth imaging with single-photon detector array sensors. Sci. Rep., 13, 176.



查看样册



咨询产品

<https://www.horiba.com/chn/info-sci.cn@horiba.com>

北京 北京市海淀区海淀东三街2号欧美汇大厦12层 (100080)
上海 上海市长宁区天山西路1068号联强国际广场A栋一层D单元 (200335)
广州 广州市天河区体育东路138号金利来数码网络大厦1612室 (510620)

T: 010 - 8567 9966 F: 010 - 8567 9066
 T: 021 - 2213 9150 / 6289 6060 F: 021 - 6289 5553
 T: 020 - 3878 1883 F: 020 - 3878 1810