

如何选择激光器

如何为显微镜应用选择合适的激光器

在选定光学显微照明系统时，除了激光的波长和输出功率这些明显的关键参数外，还需要考虑很多其他因素。

文/Daniel Callen, Matthias Schulze; Coherent

凭借对各种目标生化样品与物理结构（形态）成像的独特能力，荧光显微镜成为生命科学领域普遍应用的一种“万能”工具。在许多荧光显微镜应用（尤其是共聚焦激光扫描显微镜，简称为CLSM）中，激光由于兼具空间亮度和单色性（光谱亮度）的独特优势，而被用作光源。

激光器种类繁多，而每一种激光器又通过多个技术性能参数进行定义，对于非激光器专家而言，为荧光显微镜应用选择合适的激光光源，并非易事。但往往，激光源选择的正确与否会直接决定实验的成败。在本文中，我们将详细分析这些关键的参数，对显微镜性能的影响。

波长

波长是最显著的激光参数，但选择最佳的波长却不是总能轻松实现。最简单的方法是将激光波长与荧光团激发光谱的峰值相匹配，并使用截止或带通滤光片来阻止散射的激光进入 CCD 相机或光电探测器，随后检测具有斯托克斯位移的荧光发射即可。

发射激光的光谱比

从滤光片返回的激光的光谱锐利得多（就光谱宽度和斜率而言），因此选择使用从滤光片返回的激光通常效果会更好。例如，许多用户经常选择使用波长与激发峰短波长斜率对应的激光来激发荧光染料。这样做的原因是，通过移到较短波长，任何散射激光与较长波长的荧光之间的分离度会增加，从而减少滤光带来的困难并提高信噪比（影像对比度）。

随着显微镜制造商和用户转向越来越广的激发波长组合，以实现通过单个显微镜系统对多个荧光团进行成像（无论是在同一实验中，还是将该系统作为一项共享资源来使用），滤光的难度变得越来越高。如今，显微镜通常配备多达七种不同波长的样品通道。

业界对将显微镜操作的波长带宽扩展到近红外光谱区域越来越感兴

趣，而需要避免多个激光器与检测通道之间的串扰，正是造成这种现象的驱动因素之一。借助具备反斯托克斯发射特性的巧妙技术，能够实现使用一种基于单硅的相机来检测图像（在这类相机中，在 800nm 之外的波长范围，硅 CCD/CMOS 的量子效率会迅速下降）。激光器制造商推出了各种波长（包括 808nm 甚至 980nm）的激光器来满足这种需求。

功率

功率是另一个显著的激光器输出参数，其中图像强度与激光功率大致成正比。在大多数荧光团中，激光受激荧光是一种高效的过程，量子效率往往接近于一。与之相反，共聚焦显微镜是一种光学效率低下的系统，物镜收集的荧光有多达 99% 被共聚焦针孔阻挡，为三维分辨率而牺牲了图像强度。

然而，选择最大激光功率并非总是最佳方案，因为光损伤和散射光都会随着激光功率的提高而增加，激光器的成本也会随之增加。通常情况下，对于许多共聚焦应用而言，照射在样品处的功率水平达到大约 1~10mW 会较为

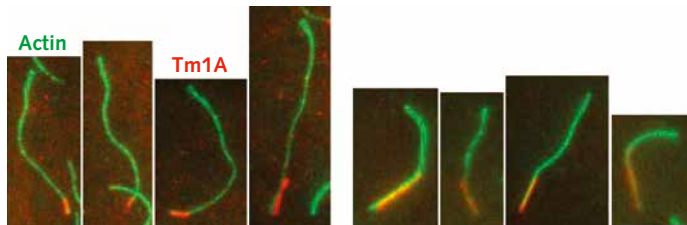


图 1：这些全内反射荧光显微镜图像是借助在 Coherent Galaxy 激光合束器中整合两个激光器去激发而获得的；在肌动蛋白丝结合研究中，红色信号来自在 640nm 波长下激发的带有 Cy5 标记的 Tm1A（蛋白质）荧光，绿色信号则是由在 488nm 波长下激发的带有 Alexa488 标记的肌动蛋白产生的。

理想，这意味着，根据典型显微镜照明和扫描光学系统的效率，激光输出功率应为几十毫瓦。

一些应用需要更高的功率。例如，新式转盘显微镜能够同时对样品中的多个焦点进行成像，从而支持更高帧速。在这种应用中，通常需要更高的功率来在每个焦点处提供所需的强度（进而提供所需的速度）。

诸如光敏定位显微镜（PALM）和受激发射损耗（STED）等超分辨率技术也需要更高的功率，因为这些技术需要依靠漂白或饱和来接通和关闭荧光团（见图1）。直至目前，这仍然意味着需要使用瓦级功率的激光器，但会因此耗费过高的能源和成本。

实际上，最理想的功率应当为数百毫瓦。为了支持这些应用，激光器制造商目前在 250~500mW 功率范围内推出了越来越多的波长选择。

光束质量

光束模式质量会直接影响聚焦光斑的大小，进而影响系统的光学效率。这是因为共聚焦显微镜的工作原理是将激光聚焦到样品平面上的一个或多个小点，并通过共聚焦孔径使这些点上的样品荧光成像。任何聚焦在目标点之外的光不仅会浪费能量，还会增加背景噪声，从而降低整体图像对比度。

多模激光器可以与共聚焦显微镜

一起使用，但通常需要与光学器件相结合以实现光均匀化和空间滤光，这会增加系统的复杂度并降低效率。因此，虽然光束质量较低的多模激光器更容易制造，售价也较低，但它们的“经济实惠”只是假象。

简单地说，CLSM 最适合使用 TEM₀₀ 激光器。就规格而言，在由激光器产生的额定输出中，要有 80% 以上的激光是 TEM₀₀，或者光束质量 $M^2 < 1.2$ 。

激光噪声是影响共聚焦图像质量的另一个重要因素。如果跨越的带宽较大（例如，20Hz~20kHz），则必须将强度噪声保持在较低水平，以最大限度地降低图像噪声。这同时包括降低平均值或均方根（RMS）噪声以及峰峰值噪声。光束指向的偏移（与温度有关）也可能带来噪声干扰和分辨率的损失，我们建议将此位移控制在 5 μ rad/°C 以下。

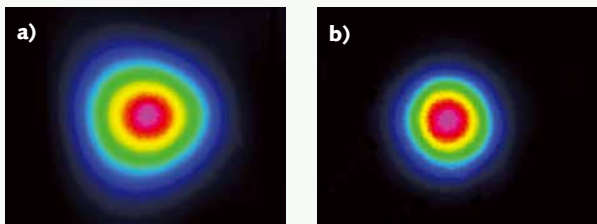
调制

扫描的图像需要一定的调制功能：至少需要能够实现在回扫期间将激光器关闭。调制可以同时包括数字和模拟两种规格。数字调制是简单的开/关切换，而模拟调制则会根据输入的模拟信号来改变激光的输出功率。

在速度方面，激光二极管能够提供最快的调制速度，数模切换速度可达兆赫级，但模拟调制的动态范围仅限于略超过 100:1 的水平。光泵半导体激光器（OPSL）提供的调制速度较慢（最大值：数字模式 50 kHz，模拟模式 100kHz），具有与激光二极管类似的（50:1）动态范围；而 DPSS 激光器则根本不支持调制。因此，根据激光器类型，往往有可能进

关于激光技术的说明

从历史上看，激光器的规格由其技术、波长和额定功率决定。但如今，显微镜制造商和用户等群体都只关心输出光束的特性，而不是关心产生这些激光背后的技术。这种模式转变是从激光制造商开发出与技术无关的通用平台时开始的。例如，相干公司以相同的即插即用形式来封装两种互补的半导体技术，即激光二极管和光泵半导体激光器（OPSL）。其中的原因在于，二极管在短波长（ $\leq 488\text{nm}$ ）以及红/近红外波长（ $\geq 640\text{nm}$ ）下的效率极为出色，而且调制速度更快。相反，OPSL 技术能提供的波长分布在可见光谱的中间部分以及紫外部分，而二极管技术在这些波长范围内尚不实用。OPSL 技术还可以在功率方面进行扩展，能够在数百毫瓦的功率下实现超分辨率的应用。



对不同的激光技术进行智能封装是一项关键进步，让激光器具有相同的外形规格、接口和功能，确保为显微镜提供广泛的波长范围和必需的光束质量；由于封装内部的光学器件极为精密，二极管激光器可以提供具有较低像散的圆形光束（a），而 OPSL 技术则提供了更高的光束质量和圆度（b）。

行直接调制。然而，直接调制通常并不是一项关键因素，因为大多数显微镜还配备有声光调制器（AOM）或声光可调谐滤光器（AOTF），以实现调制。

光纤传送

共聚焦显微镜能够通过单模光纤连接器接收激光。FC/APC（套管式连接器/斜角物理端面）是最为常用的标准，在市场上的份额达到了80%左右。一些较新款式的产品（例如转盘显微镜）已经转而使用FC/PC8连接器。激光器具有自由空间输出光束，其方向是从尾纤到裸纤，或从尾纤到光纤（终止于连接器）。

将激光耦合到单模光纤内输出的难度极高，需要在六个自由度上进行调整，以控制高数值孔径（NA）光学器件的高敏度对准。此类对准可能需要数小时才能完成优化，对于几乎所有显微镜用户而言，这样做根本不值得。更为合理的做法是，购买已针对显微镜或光束整合器而配备了合适光纤连接器终端的激光器。

关于光纤耦合激光器的注意事项：在第一代产品中，特别是在较短的波长和高功率下，发射功率在仅仅经过几百小时后就会降低几个百分点，导致使用寿命只有1,000小时。主要原因是光纤面损伤（光沉积），它是由于单模光纤耦合所需要的高强度聚焦导致的。其中一个不太常见的原因是光纤本身受到了光损伤。出于这个原因，激光器制造商实施了一些专有方案（例如相干公司的“长寿命接口”）来降低光纤面的功率强度，同时也不会失去光纤的单模特性。这些方案将激光器/光纤单元的通常寿命延长至10,000小时或更久。

多种激光器间的兼容性

由于显微镜的每一路输入最多可以连接七台激光器，因此另一个难题是激光器的通用性。对于显微镜制造商和最终用户而言，如果激光器具有相同的外形规格、接口和功能，那么无论是实现多种激光器的集成还是使用新激光器进行升级，都会变得更加简单。这意味着会拥有相同的电源、相同的热处理要求、相同的电子接口，以及相同的光束位置、直径、发散度、方位角等。

通过将所有用于生命科学领域的激光器封装在相同的能量分隔设计中，激光器制造商可以支持用户对于多激光器的通用性的需求，不需要考虑激光器内部采用了何种技术（参见“关于激光技术的说明”）。此外，这些激光器现在一般会采用智能的即插即用技术，可以通过直接更换激光器来提升功率、增加新波长，或在激光器达到使用寿命后予以更换。相干公司的OBIS系列激光器就是这种通用智能平台概念的一个范例。

最近，这种通用平台概念已延伸到物理集成领域，其中会将多台激光器安装在单个外壳中，无需使用多个相同的电源，从而减少了整个系统所占用的空间。相干公司的这一平台称为Laserbox，可通过单个触摸屏控制器来操作所有激光器。

光束整合

最后一步是将所有激光器连接到显微镜的单个输入光纤连接器（FC/APC或FC/PC8）上。根据传统做法，这需要对每个激光器的光束进行准直，并使用多个二向色分光器将它们依次整合在一起。随后，必须使用光学特性会随波长变化的透镜，将整

合起来的光束有效地耦合到单模光纤中。值得庆幸的是，现在有现成的集成模块，可以无缝地整合不同的激光，无需用户进行对准或调整。这样，智能模块的即插即用功能便发挥出它的预定作用，使得光纤连接的激光器可以在几秒而不是几小时内完成添加或交换。

最先推出的这种光束整合模块，是相干公司的Galaxy（见图2），它具有采用专利技术的FC输入连接器，可为用户提供多达八种选择的波长。它内部使用最少的光学折射器件，将光束耦合到预先对准的单模输出光纤中。这种单模偏振光纤可通过用户指定的FC/APC或FC/PC8终端，直接连接到所有常用的共聚焦显微镜上。



图2：多个激光器可以集成在一个Laserbox机箱中，从而消除了冗余的电源和使用面板；然后，使用即插即用光束整合模块（如Coherent Galaxy）将多个激光整合到一根单模光纤内耦合输出。

激光技术的进步有力地支持了新一代荧光显微镜工具，这些工具有更多的功能、简化的操作和更低的成本。然而，恰恰是这种成功使市场上充斥着各种产品，有时很难为特定应用选择最佳解决方案。如果能了解一些关键的激光参数对显微镜性能产生的影响，就可以使这种选择简单化，并能实现更好的结果。□

参考文献

- 1 J. Y. Hsiao, L. M. Goins, N. A. Petek 和 R. D. Mullins, *Curr.Biol.*, 1-10 (2015年)