

1064 纳米波长下的组织拉曼测量

使用色散型 1064 纳米拉曼光谱仪获得高信号并大幅减少荧光

Copyright BaySpec, Inc., August 2012, Chad Lieber, Huawen Wu, and Eric Bergles

背景

由于过去十年电信业的蓬勃发展推动了技术的进步，拉曼光谱技术已变得更容易为各个领域的用户所使用。技术的改进与该技术的分子灵敏度相结合，使得拉曼技术在制药、生物学、工业和法医等众多应用领域的使用激增。然而，在所有这些应用领域中，从荧光和发光样品中提取有用的拉曼光谱仍是一个难题。

荧光在短波长下更容易发生，也更强烈，因为短波长下的能量更容易引起电子转变。因此，尽管拉曼散射截面较低（与 λ^4 成反比），但大多数使用潜在荧光样品的用户早已改用近红外波长，如785或830nm。这些激光波长会将检测到的信号推向传统多通道CCD检测器所用硅的光谱边缘，而硅在~1050nm以上基本上是透明的。然而即使在这些近红外波长下，许多物质仍然会发出荧光，有时会阻碍拉曼光谱的采集。

对于那些需要更长波长（如1064nm）的用户来说，唯一可用的选择是傅立叶变换拉曼，它通常比色散拉曼系统噪音更大、速度更慢。但现在，BaySpec的新型色散1064nm拉曼光谱仪系列仪器为用户提供了一种交钥匙解决方案，它将传统色散拉曼仪器的速度、灵敏度和坚固设计与传统傅立叶变换拉曼仪器的荧光避免功能结合在一起。此外这种色散几何结构还允许衍射限制光学性能，最终实现了1064nm共焦显微拉曼。

方法

使用两套BaySpec台式系统（RamSpec™ 785和 RamSpec™ 1064）对从当地市场获得的各种动物组织进行了检测。两套系统都使用了为各自波长设计的滤波光纤探头（InPhotonics RPB），焦距均为7.5mm。除非另有说明，两种系统的采集时间均为30秒。除非另有说明，否则785nm波长和1064nm波长测量的功率分别设置为50mW和150mW。

结果

如前所述生物组织难以提取干净的拉曼信号。尤其是肾脏等富含色素和卟啉的组织，即使在785nm波长下也往往因荧光太强而无法测量（见图1）。但使用1064nm波长在相同的积分时间内就能产生相对没有荧光背景的清晰拉曼光谱。此外由于InGaAs探测器的量子效率较高，使用同一激光还能同时捕捉到高文数特征（C-H、O-H和N-H伸展模式）。这与785nm光谱仪上的高文数拉曼形成鲜明对比，后者的这些波段位于硅可探测性的边缘，因此需要第二个较短波长的激光源（通常为671nm或720nm）¹以及合适的滤光片和光学器件来同时容纳两条激光线。

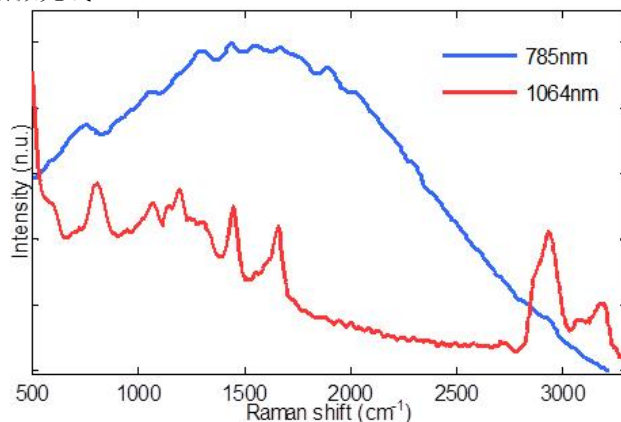


图1：在785nm波长下猪肾具有很强的荧光，因此无法提取可用的拉曼信号，但在1064nm波长下，荧光干扰基本消除，拉曼条带清晰可见

除了生物组织的荧光之外，清晰拉曼采样的其他主要障碍是其固有的浑浊光学环境和低拉曼散射截面。即使没有荧光干扰，这种噪音和信号的缺乏通常也需要较长的积分时间，一般为数十秒或更长。为了评估1064nm拉曼系统对组织进行测量所需的时间，我们在猪脂肪样本上以不同的功率和积分时间获得了大量光谱。如图2所示在10秒钟内即可获得 SNR光谱，在 2 秒钟的积分时间内SNR仅略有下降。

除了使用户能够测量高荧光样品的拉曼光谱之外，色散型1064nm拉曼系统还降低了较短波长所需的严格取样条件。例如通过样品瓶、比色皿或盖玻片进行785nm拉曼测量时，通常要求这些材料由熔融石英、石英或氟化钙制成以降低其荧光，而所有这些材料的成本都远远高于块状玻璃材料。但是如图 3 所示，即使是廉价的玻璃样品瓶也可以用于1064nm波长的弱拉曼散射体测量如鸡胸组织。

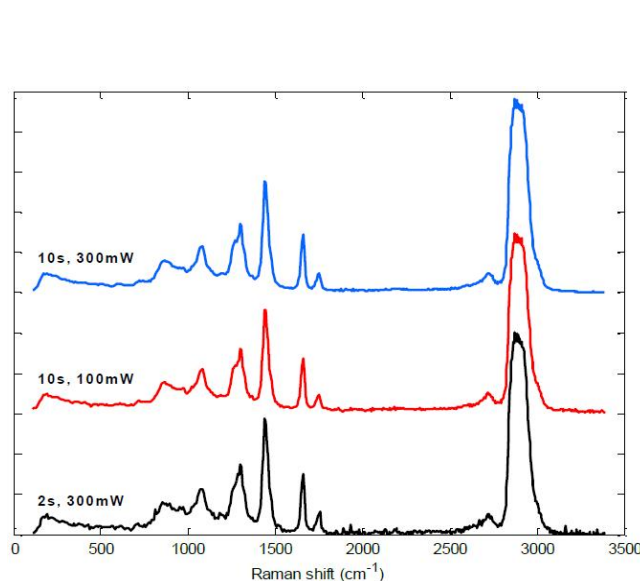


图2：使用不同的积分时间和样品功率测量的脂肪（猪）拉曼光谱显示，在相对较短的积分时间内可以获得较高的信噪比，这在较短波长的组织拉曼研究中非常典型

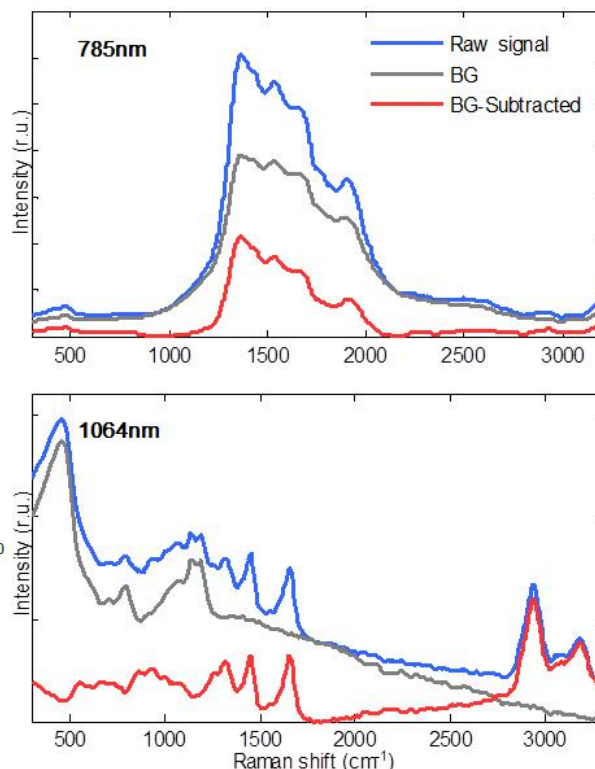


图3：玻璃容器对785和1064nm波长鸡胸肉拉曼测量的影响。在785nm波长下，玻璃的高背景信号弥漫在组织的测量体积中，无法减去，因此没有可分辨的拉曼条带。在1064nm波长下本底信号大大降低，只需简单地减去即可显示清晰的拉曼条带。

讨论

正如本文所展示的光谱所示与785nm等较短波长相比，1064nm波长的色散拉曼测量具有许多优势。使用1064nm波长的拉曼光谱时，人们一直担心的一个问题是拉曼散射截面的减小。与波长785nm的拉曼相比，这一截面确实减少了约3.4倍。然而根据人体组织（皮肤）照射的允许标准，1064nm波长下可承受的最大功率水平比785nm波长下的允许功率高出约3.4倍。

基于这些实验，1064nm色散拉曼将为那些研究高荧光组织、希望在简单的玻璃容器中测量多个样品的用户，或者那些对同时采集指纹和高波长光谱感兴趣的用户提供一种可行的新选择。与短波长（785或830纳米）拉曼方法或傅立叶变换拉曼系统相比，未来的研究必将证明这种方法的更多优势。

References

- 1) Nijssen et al., J Biomed Opt, 12(3), p. 034004, 2007.
- 2) National Institute of Standards and Technology, Z136.1, p.76-77, 2007.