



# СПЕКТРАЛЬНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШИРОКО ПЕРЕСТРАИВАЕМЫХ ТОНКОПЛЕНОЧНЫХ ФИЛЬТРОВ VERSACHROME

П.Прабхат, Ph.D., [pprabhat@idexcorp.com](mailto:pprabhat@idexcorp.com),  
Н.Андерсен, Ph.D.,  
Т.Эрдоган, Ph.D., Semrock

В научно-исследовательских и клинических приложениях широко используется диагностика объектов по многоцветным изображениям флуоресцирующих образцов. Когда излучение используемых флуорофоров имеет небольшое спектральное перекрытие, для получения отдельных спектральных изображений достаточно применить стандартные фильтры (с фиксированными значениями спектральных характеристик). Однако, когда перекрытие спектров оказывается значительным, появляется необходимость в спектральной визуализации.

## ВВЕДЕНИЕ

Системы для спектральной визуализации обеспечивают гибкость в выборе длины волны. Очень удобно, если в экспериментах используются разные комбинации флуорофоров, так как пропадает необходимость смены фильтров. Однако, несмотря на имеющуюся возможность спектральной перестройки, стандартные системы визуализации редко проявляют те преимущества, которые дает использование тонкопленочных интерференционных фильтров, а именно: высокий коэффициент передачи в сочетании с крутыми краями на границе полосы пропускания и высокий коэффициент блокировки излучения вне полосы. В данной статье описан инновационный подход к спектральной визуализации с использованием перестраиваемых тонкопленочных фильтров, выпускаемых компанией Semrock.

## ТЕХНОЛОГИЯ

В основе новой технологии спектральной визуализации [1-4] лежит метод использования

# SPECTRAL IMAGING WITH VERSACHROME THE FIRST WIDELY TUNABLE THIN-FILM OPTICAL FILTERS

P.Prabhat, Ph.D., is Applications Scientist,  
[pprabhat@idexcorp.com](mailto:pprabhat@idexcorp.com);  
N.Anderson, Ph.D., is Technology Development  
Analyst,  
T.Erdogan, Ph.D., is co-founder and CTO  
of Semrock, Inc., a Unit of IDEX Corporation

Multicolor fluorescence imaging is ubiquitous in research and clinical applications. When the fluorophores used in such applications have low spectral overlap, standard filter cubes (with fixed spectral edges) are adequate. However, when the crosstalk is high, spectral imaging becomes necessary.

## INTRODUCTION

Spectral imaging systems provide flexibility in wavelength selection. This flexibility is also useful when experiments need to be designed with new fluorophore combinations because optical filters need not be changed in these systems. However, despite their flexibility, conventional spectral imaging systems are rarely able to offer the key advantages of thin-film interference filters, i.e., high transmission combined with steep spectral edges and high out-of-band blocking. This article outlines a novel approach to spectral imaging based on recently introduced tunable thin-film optical filters.

## TECHNOLOGY

At the heart of this spectral imaging technology is Semrock's VersaChrome® filters technology. These are the first widely tunable thin-film optical filters [5]. Unlike standard thin-film interference filters, the spectra of VersaChrome® filters can be angle-tuned – the filter spectrum changes as a function of angle of incidence – without exhibiting any appreciable change in the shape of the spectrum.

Figure 1 shows snapshots of spectral profiles of one of Semrock's VersaChrome® filters, TBP01-620/15, at different angles of incidence (AOI). This filter has a guaranteed minimum bandwidth of 15 nm and a full-width-at-half-maximum bandwidth of 20 nm. As seen in this figure, the filter not only retains its bandwidth

перестраиваемых в широком диапазоне спектра тонкопленочных оптических фильтров серии VersaChrome [5], выпускаемых компанией Semrock. В отличие от стандартных тонкопленочных интерференционных фильтров с установленными спектральными характеристиками, спектральные характеристики фильтров VersaChrome меняются в зависимости от угла падения излучения, при этом форма спектра не претерпевает никаких заметных изменений.

На рис.1 представлены спектры фильтра серии VersaChrome от Semrock, ТВР01-620/15, полученные при различных углах падения излучения на поверхность фильтра. Данный фильтр обладает гарантированной минимальной шириной полосы пропускания порядка 15 нм и шириной на полувысоте (FWHM) – 20 нм. Как видно (см. рис.1), фильтр не только сохраняет ширину полосы при больших значениях угла падения, но и обладает высоким коэффициентом пропускания, при этом крутые края спектра надежно отрезают излучение из области, расположенной вне полосы пропускания.

Центральная длина волны данного перестраиваемого фильтра (верно для всех фильтров VersaChrome) определяется следующим уравнением:

$$\lambda(\theta) = \lambda(0) \sqrt{1 - \frac{\sin^2(\theta)}{n_{\text{eff}}^2}},$$

**Semrock**

at higher AOIs, but also the high transmission, steep spectral edges, and high out-of-band blocking (not seen in this plot) remain virtually unchanged.

The center wavelength of this tunable filter (in fact for all VersaChrome® filters) is dictated by the following equation:

$$\lambda(\theta) = \lambda(0) \sqrt{1 - \frac{\sin^2(\theta)}{n_{\text{eff}}^2}},$$

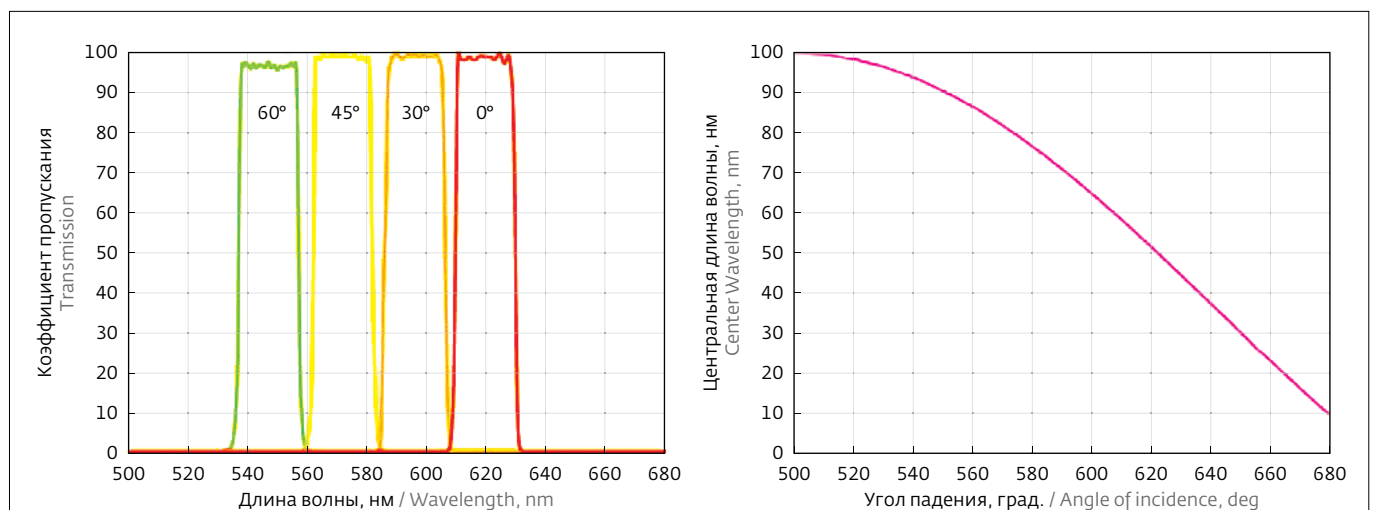
where  $n_{\text{eff}}$  is the effective refractive index of the thin-film coatings:

Here  $n_{\text{eff}}$  is approximately 1.85. Note that the spectrum of this tunable filter is continuously tunable. With a tuning range of greater than 12% of the normal-incidence wavelength (by varying the angle of incidence from 0 to 60°) only five filters are needed to cover the full visible range.

## MATERIALS AND METHODS

### Microscopy

BPAE cells (sample courtesy of Mike Davidson, Molecular Expressions™) labeled with MitoTracker® red (Mitochondria), Alexa Fluor® 568 (F-actin), and SYTOX® Orange (Nucleus) were imaged with an Olympus BX41 microscope equipped with a Hamamatsu ORCA C8484 camera. The emission



**Рис.1.** Спектр пропускания фильтра ТВР01-620/15: спектр пропускания при нескольких больших углах падения (слева); сдвиг положения центральной длины волны при увеличении угла падения (справа) – полуширина полосы пропускания остается фиксированной 20 нм, что соответствует гарантированному минимальному значению ширины – 15 нм. Следует отметить, что спектр фильтра непрерывно перестраивается в диапазоне от 0 до 60° (угол падения)

**Fig. 1.** (Left) Transmission spectra at several very high angles for the TBV01-620/15 filter. (Right) Shift of center wavelength with increasing angle of incidence for this filter. The FWHM bandwidth remains fixed at 20 nm (corresponding to 15 nm guaranteed minimum bandwidth). Note that the filter spectrum is continuously tunable over 0 to 60° AOI.

где  $n_{\text{eff}}$  – эффективный показатель преломления тонкопленочного покрытия.

Для данного фильтра  $n_{\text{eff}}$  составляет примерно 1,85. Подчеркнем, что спектр пропускания данного фильтра меняется непрерывно. Если диапазон перестройки составляет 12% от длины волны при нормальном угле падения (угол падения изменяется в диапазоне от 0 до 60°), то для покрытия всего видимого диапазона понадобится всего 4 фильтра.

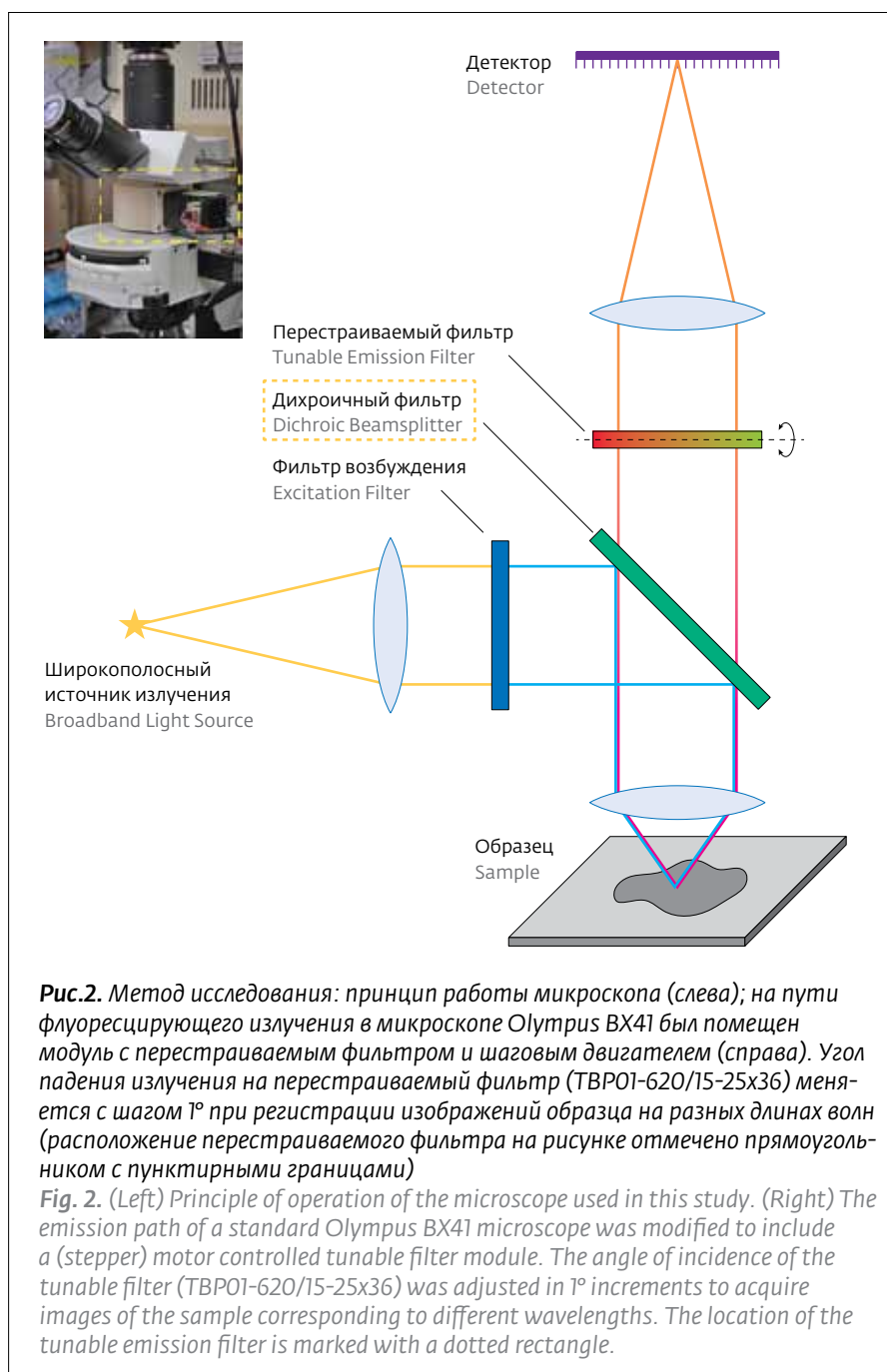
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Микроскопия

Изображения клеток эндотелия легочной артерии быка (BPAE cells) с флуоресцентными метками MitoTracker® red (митохондрия), Alexa Fluor® 568 (F-актин) и SYTOX® Orange (ядро) были получены с помощью микроскопа Olympus BX41, оснащенного камерой ORCA C8484 компании Hamamatsu (образец предоставлен Mike Davidson, Molecular Expressions™). В конструкцию микроскопа встроен модуль с перестраиваемым фильтром, сквозь который проходит флуоресцирующее излучение. Управление модулем осуществлялось с помощью компьютера. Принцип работы микроскопа представлен на рис.2.

Для одновременного возбуждения всех флуорофоров в образце в микроскопе в куб с набором фильтров устанавливается фильтр, пропускающий волну возбуждения (FF01-543/22-25) и дихроичный фильтр (FF562-Di02-25x36). В модуль с перестраиваемым фильтром был помещен перестраиваемый запирающий фильтр TBP01-620/15-25x36. Последовательность наблюдаемых изображений (lambda stack) регистрировали, меняя при этом с шагом 1° угол наклона фильтра (таким образом менялся угол падения излучения флуоресценции).

pathway of this microscope was modified to include a computer-controlled tunable filter module. The principle of operation of this microscope is shown in Figure 2. In order to simultaneously excite all the fluorophores in the sample, a single excitation filter (FF01-543/22-25) and a single-edge dichroic mirror (FF562-Di02-25x36) were installed in a filter cube in the standard filter turret of the microscope. The tunable emission filter, TBP01-620/15-25x36, was placed in the tunable filter module, and a sequence of images were acquired (called a lambda stack of images) by varying



**Рис.2.** Метод исследования: принцип работы микроскопа (слева); на пути флуоресцирующего излучения в микроскопе Olympus BX41 был помещен модуль с перестраиваемым фильтром и шаговым двигателем (справа). Угол падения излучения на перестраиваемый фильтр (TBP01-620/15-25x36) меняется с шагом 1° при регистрации изображений образца на разных длинах волн (расположение перестраиваемого фильтра на рисунке отмечено прямоугольником с пунктирными границами)

**Fig. 2.** (Left) Principle of operation of the microscope used in this study. (Right) The emission path of a standard Olympus BX41 microscope was modified to include a (stepper) motor controlled tunable filter module. The angle of incidence of the tunable filter (TBP01-620/15-25x36) was adjusted in 1° increments to acquire images of the sample corresponding to different wavelengths. The location of the tunable emission filter is marked with a dotted rectangle.

## Линейное спектральное разделение (Linear unmixing)

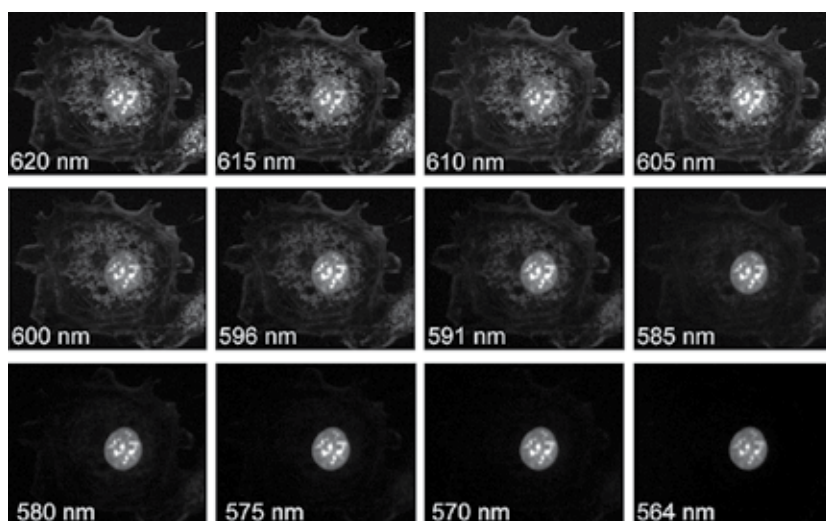
Для спектрального разделения данных (linear unmixing [1-4]) значения интенсивностей регистрировались с помощью пикселей, составляющих матрицу приемника, и последовательность изображений представлялась в виде матриц. Далее использовался пакет MATLAB для решения системы линейных уравнений методом наименьших квадратов  $\min \|Ax - b\|_2$  при условии, что  $x \geq 0$ , где  $x$  – разница спектральных вкладов каждого флуорофора в заданном пикселе. Матрица  $A$  содержит опорные спектры флуорофоров, соответствующие каждому из используемых (рис.4), матрица  $b$  состоит из значений интенсивности в заданном пикселе в серии изображений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В приведенных исследованиях спектральная визуализация с использованием перестраиваемых фильтров была продемонстрирована на примере конкретного образца. Была зарегистрирована серия изображений образца, помеченного флуорофорами MitoTracker® red, Alexa Fluor® 568 и SYTOX® Orange, с использованием перестраиваемого фильтра Semrock серии VersaChrome® (см. "Материалы и методы"). На рис.3 представлены изображения, зарегистрированные со спектральным шагом 5 нм.

Из анализа полученных изображений видно, что ядро, окрашенное SYTOX® Orange, можно легко выделить среди других компонентов клетки, используя только один перестраиваемый запирающий фильтр, который предназначен для визуализации всех флуорофоров. Однако F-актин и митохондрии помечены флуорофорами с сильно перекрывающимися спектрами (Alexa Fluor® 568 и MitoTracker®), поэтому для визуализации соответствующих компонентов было необходимо использовать разделение каналов эмиссии.

Выбранные из последовательности изображений участки, отображающие чистый спектральный



**Рис.3.** Серия изображений, полученных при использовании перестраиваемого запирающего фильтра: изображения получены со спектральным шагом 5 нм (см. рис.1 с соответствующими спектрами фильтра). Компоненты – клетки, помеченные флуорофорами с отличающимися спектрами излучения, их можно легко различить даже при необработанных данных, тогда как, флуорофоры с похожими спектрами разделяют с помощью алгоритма разделения каналов эмиссии (каждый кадр – изображение объекта размером 47×38 мкм)

**Fig. 3.** Lambda-stack images of the sample acquired using a tunable emission filter. Images are presented at about 5 nm intervals (refer to Fig.1 for corresponding filter spectra). Cellular components labeled with fluorophores of distinct emission spectra can easily be resolved even in the raw data, however, fluorophores with similar spectra benefit from linear unmixing algorithms. Individual frames represent an object size of about 47×38 mm.

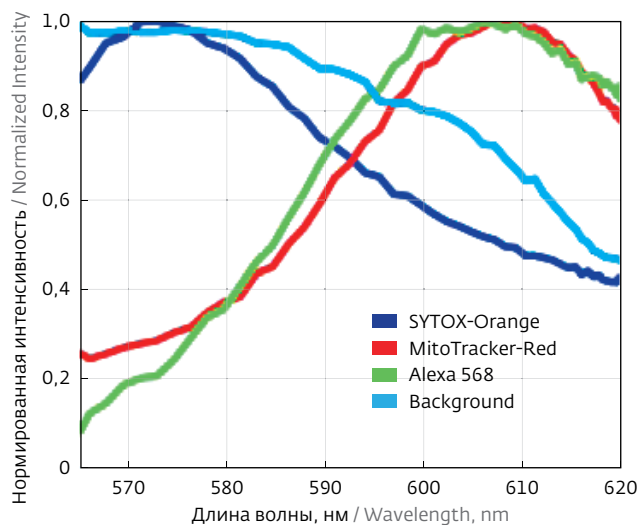
the angle of incidence of the filter with respect to the emission beam in 1° increments.

## Linear unmixing

In order to spectrally deconvolve the data (called linear unmixing, [1-4]), the pixel intensity values were extracted from the lambda stack images and arranged in matrices. MATLAB was used to solve a linear least squares problem of  $\min \min \|Ax - b\|_2$  with a nonnegativity constraint on  $x$ , where  $A$  is the matrix of deconvolved spectral contributions from each fluorophore at a given pixel. The matrix  $A$  contains the reference fluorophore spectra corresponding to each of the fluorophores (Figure 4), and the matrix  $b$  comprises the intensity values for a given pixel from the lambda stack images.

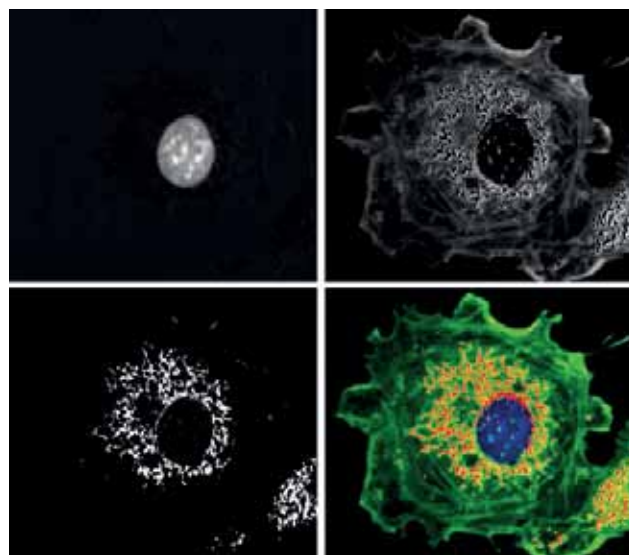
## RESULTS

In this study, spectral imaging using tunable filters is illustrated with an example. Lambda stack images of a sample labeled with MitoTracker® red, Alexa Fluor® 568, and SYTOX® Orange were acquired using a Semrock VersaChrome® tunable filter (see Materials



**Рис.4.** Нормированные опорные спектры для каждого используемого в образце флуорофора в заданной области. Измеренный спектр флуорофора может отличаться от идеального. Одной из причин могут стать изменения условий окружающей среды или ограничения эксперимента. Фоновый сигнал изображен как функция длины волны

*Fig. 4. Reference spectra for each fluorophore are plotted as normalized intensity values of the selected regions corresponding to each of the fluorophores in the sample. Note that the measured spectrum of a fluorophore can be different from its ideal spectrum. This can happen due to a change in the environmental conditions or due to limitations in experimental protocols. The background signal is also plotted as a function of the wavelength.*



**Рис.5.** Спектрально разделенные данные: однотонные изображения соответствуют компонентам клетки, помеченным одним из флуорофоров – ядро (верхнее слева), F-актин (верхнее справа) и митохондрии (нижнее слева). Нижнее правое изображение составное (каждый кадр – изображение объекта размером 47×38 мкм)

*Fig. 5. Spectrally unmixed data. The grayscale images correspond to cellular components labeled with specific fluorophores: nucleus (top left), F-actin (top right) and Mitochondria (bottom left). Bottom right is a composite image. Individual frames represent an object size of about 47×38 mm.*

вклад каждого флуорофора, представлены на рис.3. Нормированные значения интенсивности (после вычитания фонового сигнала), соответствующие каждому флуорофору, изображены на рис.4. Данные графики представляют собой эталонные спектры флуорофоров, используемые в алгоритме спектрального разделения. Затем изображения из зарегистрированной последовательности использовались вместе в алгоритме разделения спектральных данных (см. "Материалы и методы") для спектрального разделения изображений всех флуорофоров (рис.5).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фильтры серии VersaChrome® могут быть размещены на пути излучения, возбуждающего образец, и флуоресцентного излучения. По мере того как меняется угол падения на фильтр пучка излучения, можно регистрировать различные спектральные линии. Кроме того, следует отметить, что спектральные характеристики данных перестраиваемых фильтров практически одинаковы для s- и p-поляризованного света. Данную особенность довольно сложно получить при использова-

and Methods for details). Figure 3 presents images acquired at about 5 nm intervals.

It is evident from these images that the nucleus stained with SYTOX® Orange can be easily discriminated from the other cellular structures – by merely utilizing a single tunable emission filter used to visualize all the fluorophores. However since F-actin and mitochondria are labeled with fluorophores that have a high degree of spectral overlap (Alexa Fluor® 568 and MitoTracker® red, respectively), linear unmixing was necessary to discern the corresponding cellular constituents.

Regions of interest representing the pure spectral contribution of each fluorophore were selected from the lambda-stack images shown in Figure 3. The normalized intensity values (following background adjustment) corresponding to each of these fluorophores are plotted in Figure 4. These represent the reference spectra of the fluorophores used in the unmixing algorithm. The lambda-stack images were then used together with a linear unmixing algorithm (see Materials and Methods) to arrive at spectrally deconvolved images for all the fluorophores (Figure 5).



нии жидкокристаллических и акустооптических перестраиваемых фильтров [2-5]. Нечувствительность к поляризации крайне желательна для спектральных систем визуализации, и кроме того, ограничения на поляризацию излучения для фильтров с токовым управлением могут привести к потере половины сигнала во многих сканирующих спектральных приборах. Использование фильтров VersaChrome® не приводит к таким потерям. Поэтому эти фильтры могут не только увеличить пропускную способность приборов спектральной визуализации, но и упростить конструкцию экспериментального прибора [5].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Visualization of Microscopy-Based Spectral Imaging Data from Multi-Label Tissue Sections, Mansfield JR, Hoyt C, Richard, RM, *Current Protocols in Molecular Biology*, 84:14.19.1-14.19.152008.
2. Spectral Imaging: Principles and Applications. Garini Y, Young IT, McNamara G., *Cytometry A*, 69(8):735-47, 2006.
3. Multispectral Imaging Fluorescence Microscopy for Living Cells, Hiraoka Y, Shimi T., and Haraguchi T. *Cell Structure and Function*, 27: 367-374, 2002.
4. Электронный ресурс: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/>
5. Semrock VersaChrome™ – the First Widely Tunable Thin-film Optical Filters, Erdogan T and Wang L. Электронный ресурс: <http://semrock.com/>, 2010.

### CONCLUSIONS

VersaChrome® filters can be placed in the excitation or emission path of a fluorescence instrument and by merely changing the angle of incidence of the filter with respect to the beam, different spectral features can be obtained. Also, it is worth pointing out that the spectral properties of these tunable filters are almost identical for both s and p polarizations of light - a feature that cannot be easily obtained using liquid-crystal and acousto-optic tunable filters [2-5]. Polarization independence is highly desirable for spectral imaging systems, and yet polarization limitations of current tunable filters can account for a loss of half of the signal in many spectral scanning instruments. VersaChrome® filters, on the other hand, do not exhibit such a loss of signal. Therefore these filters can not only enhance the throughput in spectral imaging but they can also greatly simplify the complexity of instrumentation [5].

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge the support of Professor Mike Davidson, at Florida State University, for this study.