

# 用于荧光显微镜的正交偏振滤波图像增强技术

文 侨 王凯歌 邵永红 屈军乐\* 牛憨笨

(深圳大学光电工程学院, 光电子器件与系统(教育部, 广东省)重点实验室, 广东 深圳 518060)

**摘要** 在荧光显微镜中, 微弱的荧光信号一般淹没于较强的激发光中, 显微镜的成像质量在很大程度上取决于提取微弱荧光信号的能力。目前, 荧光显微镜均根据荧光与激发光波长的差异, 采用频率滤波法滤除激发光, 实现图像增强。但该方法不仅对滤光片要求高, 而且对荧光和激发光的波长有严重的依赖性。基于激发光与荧光在偏振态上的差异, 提出了一种用于荧光显微镜的正交偏振滤波图像增强技术。研究表明, 正交偏振滤波图像增强技术能够显著地提高成像质量, 对光学元件性能参数的要求大幅度降低。丰富了从强激发光中提取弱荧光信号的技术手段, 为今后解决波长可调谐的多光谱荧光显微镜、白光照明多光谱荧光显微镜等技术上的瓶颈提供了参考。

**关键词** 生物光学; 荧光显微镜; 图像增强; 正交偏振; 滤波

中图分类号 Q631 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL201239.1004002

## Orthogonal Polarization Filtering Image Enhancement Technology for Fluorescence Microscope

Wen Qiao Wang Kaige Shao Yonghong Qu Junle Niu Hanben

(Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems, Ministry of Education and Guangdong Province, College of Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China)

**Abstract** In fluorescence microscope, the weak fluorescence signals are usually submerged in the strong excitation light. The fluorescence microscope image quality seriously depends on the ability to extract the faint fluorescence signal from the strong excitation light. At present, the image enhancement using frequency filtering to filter out the excitation light, is often used in the fluorescence microscope, based on the differences between fluorescence and excitation wavelength. However, while this method is used, the parameters of the filter will be required highly, and seriously depend on the wavelength of the fluorescence and the excitation light. A polarization filtering image enhancement technology to filter out the excitation light and enhance image quality, is proposed, based on the differences of the polarization characteristic between the fluorescence and the excitation light. The experimental results indicate that when the filtering method is utilized, the image quality is improved significantly, and the requirements of the optical components performance parameters, is significantly reduced. The study is not only to enrich the technological method to extract the weak fluorescence signal from the strong excitation light, but also a reference for developing a light wavelength tunable multi-spectral fluorescence microscope.

**Key words** biotechnology optics; fluorescence microscope; image enhancement; orthogonal polarization; filtering

**OCIS codes** 170.2520; 100.3008; 170.3880; 260.5430

## 1 引言

荧光显微镜是利用特定波长的光照射被检物, 使之发出荧光, 然后在显微镜下观察物体的形状及其所在位置的一种显微光学检测技术<sup>[1]</sup>。近年来,

由于免疫荧光在医学研究、诊断领域里的广泛应用, 荧光原位杂交(FISH)、绿色荧光蛋白(GFP)技术分别在基因组学、蛋白质组学研究方面的推广, 赋予这一传统技术新的应用价值和生命力<sup>[2~4]</sup>。

收稿日期: 2012-05-21; 收到修改稿日期: 2012-06-28

基金项目: 深圳大学科研基金面上项目(201033)资助课题。

作者简介: 文 侨(1980—), 男, 博士, 讲师, 主要从事激光尾波场加速电子、超短脉冲激光器和激光技术与应用等方面的研究。E-mail: wenqiao@szu.edu.cn

\* 通信联系人。E-mail: jlqu@szu.edu.cn

在荧光显微成像中,激发光照射到样品后,一部分激发光被样品的荧光团吸收,用于激发荧光团分子内的电子跃迁到较高能级轨道,使分子进入激发态,处于激发态的分子通过释放出相应较低能量的荧光回到基态。另一部分激发光对产生荧光信号没有贡献,只在样品上发生反射或透射,结果导致荧光信号淹没在较强的激发光当中。因此,荧光显微镜的成像质量在一定程度上取决于对激发光的滤波效果。典型的荧光显微镜依靠激发滤光片、双色分光镜和发射滤光片等多种频率滤波器件,根据荧光与激发光波长的差异,将微弱的荧光与强激发光分离。但这种方法不仅对滤光元件参数要求极高,而且滤光元件的选择必须与样品激发光谱、发射光谱相匹配<sup>[5]</sup>。在这种情况下,荧光显微镜在同一时间内,只能对一种颜色的荧光团成像;要想获得多色或彩色荧光团的图像,得由不同时刻的单色成像合成。当激发光或荧光波长调谐时,需要频繁切换相适应的滤光片;当激发光为白光或宽带光源时,如果激发光与荧光在波长上有部分重叠时,该方法则具有一定的局限性。

本文提出了一种新型的基于正交偏振滤波图像增强技术的荧光显微镜。偏振滤波图像增强方法根据激发光与荧光偏振态的差异,利用偏振器件滤除激发光,提取荧光信号。

## 2 实验装置

在传统荧光显微镜中,人们根据激发光与荧光波长的差异用滤光片滤除激发光。偏振滤波图像增强技术与传统荧光显微镜不同,它根据激发光与荧

光偏振态的差异,利用偏振元件滤除激发光,提取荧光。自然偏振态的激发光源经过起偏器后变成线偏振光,线偏振光激发样品中的荧光团,荧光团受到其中一部分激发光的激励,辐射出荧光。荧光为自然光,其偏振态为自然偏振或接近于自然偏振,即不再保持原来激发光的偏振态。另一部分未被吸收的激发光在样品表面发生反射,对产生荧光信号没有贡献,此部分的激发光经过样品的反射后,其偏振态几乎保持不变,仍然为线偏振。根据荧光团辐射出荧光偏振态与被样品表面反射激发光偏振态的差异,利用偏振器件可以轻松滤除激发光,实现激发光与荧光的分离<sup>[5]</sup>。

图1为正交偏振滤波原理示意图(彩图见网络电子版)。参考面1为激发光入射偏振片 $P_2$ 前的任意位置,参考面2表示荧光通过检偏器 $P_1$ 后的任意位置。在参考面1内,带箭头的虚线表示为激发光,此时,激发光为自然偏振光,激发光经过偏振片 $P_2$ 后变为线偏振光。偏振片上带箭头的实线表示偏振片的偏振方向,通过偏振片后,激发光偏振方向与偏振片 $P_2$ 的偏振方向一致。当然,如果采用的光源是线偏振光,图中偏振片 $P_2$ 可以省略。线偏振的激发光入射到样品S上,样品S被激发后,辐射出荧光信号,荧光为自然光或接近自然光。图1样品S中,虚线是激发光,实线为荧光,箭头表示偏振方向。偏振片 $P_1$ 与偏振片 $P_2$ 正交,激发光经过偏振片 $P_1$ 时,由于其偏振方向与偏振片 $P_1$ 偏振方向垂直而被过滤掉。然而,样品S被激发辐射出的荧光为自然光,偏振态平行于偏振片 $P_1$ 的那部分荧光,能顺利地通过偏振片 $P_1$ ,最终能够将激发光与荧光分离。

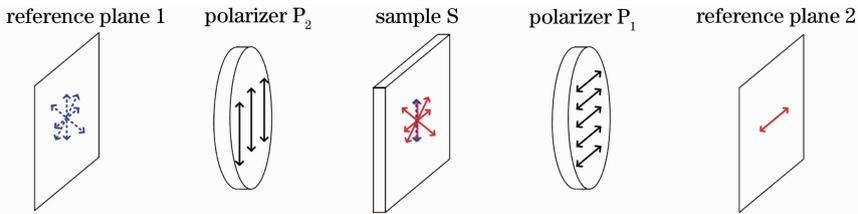


图1 正交偏振滤波原理示意图

Fig.1 Schematic diagram of the orthogonal polarization filtering principle

基于正交偏振滤波图像增强技术的散斑照明荧光显微镜结构示意图如图2所示,主要由激光器、散射体、散斑成像光学系统、荧光显微镜、偏振元件及控制系统等部分组成。半导体抽运固体激光器(长春新产业光电技术有限公司,MBL50,中心波长为473 nm)发出的激光耦合到散射体,得到特定大小的散斑光源,光源经过偏振片 $P_2$ (大恒新纪元科技

股份有限公司,GCL-050003)后获得具有线偏振特性的散斑。散斑再经散斑成像光学系统成像于显微物镜(莱卡公司,LDMLB2)后焦面上,而且散斑像的大小刚好覆盖显微物镜后通光孔径,以实现样品的宽场激发。样品被激发后产生的荧光由物镜收集,分别经过双色分光镜(Chroma Technology公司,505dcxr)、透镜 $f_s$ 和检偏器 $P_1$ ,最终成像于电荷

耦合器件(CCD)相机(英敏基信息技术有限公司, QHY-IMG2S-M-COOL)。P<sub>1</sub>(大恒新纪元科技股份有限公司, GCL-050003)偏振态正交于激发光偏振态,因此能够过滤除激发光,提取荧光信号。对比实验采用的是 Chroma Technology 公司 HQ510lp 的滤光片。利用动态散斑照明可实现类似共焦显微镜的宽场层析功能,且具有结构简单、低成本、响应

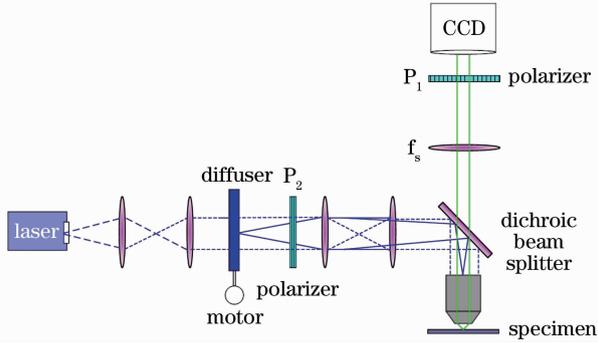


图 2 基于偏振滤波图像增强技术的散斑照明荧光显微镜结构图

Fig. 2 Diagram of the speckle illumination fluorescence microscope based on the polarization filtering image enhancement

速度快、容易操作等共焦显微镜不具备的优点。

### 3 实验结果

为了验证正交偏振滤波图像增强技术的有效性,对荧光珠样品进行了实验,实验采用散斑照明。图 3 给出了荧光珠(Molecular probes 公司, C-14837)的荧光图像。图 3(a)为采用偏振滤波图像增强前的原图像,由于激发光比较强,荧光完全被激发光淹没了,因此得到的图像是一幅激光散斑图像。图 3(b)为采用偏振片 P<sub>1</sub> 滤除激发光,实现图像增强后的图像是一幅清晰的荧光珠图像。实验表明偏振滤波图像增强方案能够很好地滤除激发光,提取荧光信号,显著提高成像质量。为了进一步说明实验方法的有效性,图 3(c)中给出了采用高消光比的频率滤光片代替偏振片 P<sub>1</sub>,滤除激发光后得到的荧光珠图像。比较图 3 的各幅图像得知,偏振滤波法获得图像的质量明显地优于原图像,成像质量不差于传统滤波法。由于荧光珠浸泡在液体中,在成像过程中荧光珠在横向和轴向都有微细的移动,因此图 3(b)和图 3(c)形状有一些差异,但这完全不影响实验结论以及证明系统方案的有效性。

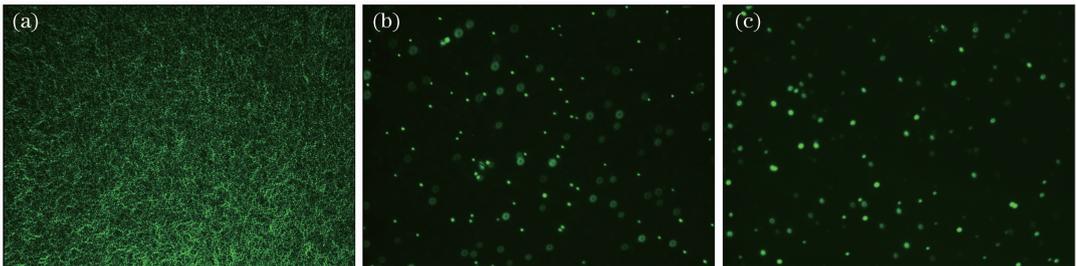


图 3 荧光珠的荧光图像。(a)原图像;(b)采用偏振滤波实现图像增强后的图像;(c)采用高消光比滤光片的对比图像  
Fig. 3 Fluorescence images of the fluorescent bead. (a) Original picture; (b) picture enhanced by polarization filter; (c) contrast image using wavelength filtering image enhancement with a high extinction ratio filter

图 4 给出了莱卡公司染色的铃兰根茎样品的荧光图像。图 4(a)为采用偏振滤波图像增强前的原图像,图 4(b)为采用偏振片 P<sub>1</sub> 滤除激发光,实现图像增强后的图像。图 4(a)表明图像包含很强的散斑激发光。在图 4(b)中,激发光几乎完全被过滤掉,清晰地显示出了荧光图像。对比图 4(a)、(b)可知,提出的偏振滤波图像增强方案能够很好地滤除激发光,提取荧光信号,显著提高图像质量。同样地,为了进一步说明实验方法的有效性,图 4(c)给出了采用高消光比的频率滤光片代替偏振片 P<sub>1</sub>,滤除激发光后的图像,以便对两种滤波方法进行对比。比较图 4(b)、(c)两图可知,偏振滤波法获得的图像

质量并不差于传统滤波法。由于采用散斑照明激发,图 4 的各幅图像的铃兰根茎环中,能看到散斑的颗粒。

在偏振滤波图像增强技术的实验中,所采用的起偏器和检偏器为国产吸收型偏振片,其消光比为 500:1;进行对比实验的传统频率滤波法采用美国进口滤光片,其光密度(OD)大于 6,即消光比大于 10<sup>6</sup>。由此可知,采用偏振滤波图像增强技术,显著降低了荧光显微镜中滤除激发光对光学元件性能参数的要求。当然,如果采用高消光比的检偏器件,偏振滤波荧光显微镜所获得的图像质量将会进一步提高。

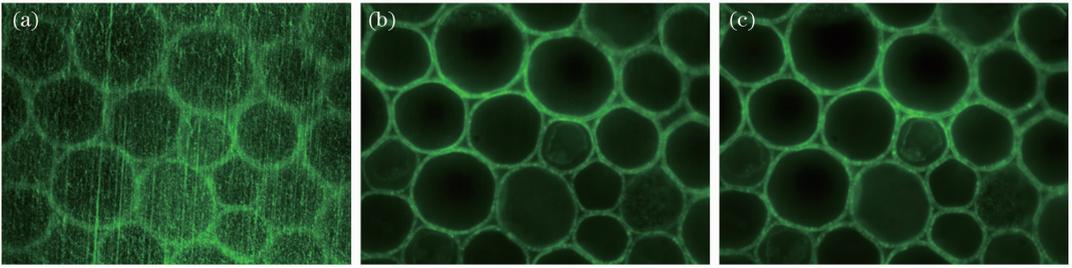


图 4 铃兰根茎样品的荧光图像。(a)原图像;(b)采用偏振滤波实现图像增强后的图像;(c)采用高消光比滤光片的对比图像

Fig. 4 Fluorescence images of the stained lily sample slices. (a) Original picture; (b) picture enhanced by polarization filter; (c) contrast image using wavelength filtering image enhancement with a high extinction ratio filter

## 4 结 论

提出了一种基于偏振滤波图像增强技术的新型荧光显微镜。显微镜基于激发光与荧光偏振态的差异,利用偏振器件滤除激发光,提取荧光信号。实验研究表明,偏振滤波图像增强技术在显著提高图像质量的同时,大幅度地降低了对光学元件性能参数的要求。该方法丰富了在荧光显微镜中,从较强的激发光中提取微弱荧光信号的技术手段,且不受激发光与荧光波长的限制。

## 参 考 文 献

- 1 S. W. Hell. Far-field optical nanoscopy [J]. *Science*, 2007, **316**(5828): 1153~1158
- 2 J. Lippincott-Schwartz, E. Snapp, A. Kenworthy. Studying protein dynamics in living cells[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001, **2**(6): 444~456
- 3 D. J. Stephens, V. J. Allan. Light microscopy techniques for live cell Imaging[J]. *Science*, 2003, **300**(5616): 82~86
- 4 Yonghong Shao, Heng Li, Qiao Wen *et al.*. A miniature laser speckle fluorescence sectioning microscope for cell imaging[J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2010, **8**(10): 944~946
- 5 Wen Qiao, Qu Junle, Shao Yonghong *et al.*. A fluorescent microscope imaging method for imaging system; China, 201010616211[P]. 2011-09-07  
文 侨, 屈军乐, 邵永红 等. 一种荧光显微成像方法即成像系统; 中国, 201010616211[P]. 2011-09-07

栏目编辑:韩 峰