

利用 SOFI 方法提高光片荧光显微镜横向分辨率

安 坤^{1,2}, 王 晶¹, 梁 东^{1,2}, 刘 军¹

¹中国科学院上海光学精密机械研究所, 上海 201800;

²中国科学院大学, 北京 100049

摘要 为了提高超分辨率光涨落成像(SOFI)的速度,结合改进的超分辨率光涨落成像算法和光片荧光显微镜,加入两个小波滤波器分别在时间和空间上消除低频背景噪声和原始图像读出噪声,结果成功将 SOFI 所需的图像数量降低。对 50 张量子点和斑马鱼的成像图片进行处理,研究表明引入改进的 SOFI 算法可以在不改变光路结构情况下将光片荧光显微镜的横向分辨率提高两倍,该方法可以扩展到活体的生物研究,突破物镜数值孔径对光片显微镜的限制。

关键词 生物光学; 光片荧光显微镜; 超分辨率光涨落成像算法; 横向分辨率; 斑马鱼

中图分类号 Q631

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201744.0607002

Improving Lateral Resolution of Light Sheet Fluorescence Microscopy with SOFI Method

An Kun^{1,2}, Wang Jing¹, Liang Dong^{1,2}, Liu Jun¹

¹Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China;

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract In order to improve the speed of super-resolution optical fluctuation imaging(SOFI) method, a modified SOFI algorithm is combined with light sheet fluorescence microscopy (LSFM). Two wavelet-based filters are utilized separately in the temporal and spatial domains to eliminate the low-frequency background noise and readout noise of the raw image, which successfully reduces the image amount that SOFI needs. And it is used to process 50 frames of raw images of quantum dot and zebrafish, respectively. The result shows that introducing improved SOFI algorithm can improve the lateral resolution of a LSFM two times without changing the optical structure, which can be expanded to the biological research of living samples and overcome the limitations of numerical aperture of objective lens for LSFM.

Key words biotechnology; light sheet fluorescence microscopy; super-resolution optical fluctuation imaging algorithm; lateral resolution; zebrafish

OCIS codes 170.2520; 100.3008; 100.6640

1 引 言

光片荧光显微镜(LSFM)是生物学研究中用于快速三维活体荧光成像的一个重要工具。不同于共聚焦显微镜^[1]等传统的荧光成像方法,光片荧光显微镜的激发光光路与荧光探测光路所用到的两个物镜是正交结构,从而可获得其他显微镜所不具有的优点。在这种特殊结构下,激发光被限制在焦平面附近较窄的一个薄片内而不是整个样品内,能够获得极小的光漂白和光毒性^[2-3],以及宽视场高速三维活体成像,但这样的特

收稿日期: 2017-01-09; **收到修改稿日期:** 2017-01-19

基金项目: 国家自然科学基金(11274327, 61521093, 61527821)、中国科学院仪器开发项目(YZ201538, QYZDB-SSW-JSC002)、中国科学院战略优先研究计划(XDB16)

作者简介: 安 坤(1992—),男,硕士研究生,主要从事光片显微镜方面的研究。E-mail: ankunnight@163.com

导师简介: 刘 军(1979—),男,博士生导师,研究员,主要从事飞秒激光技术与非线性光学显微成像技术中的应用方面的研究。E-mail: jliu@siom.ac.cn(通信联系人)

殊结构由于空间的限制,导致光片荧光显微镜不能使用高数值孔径的物镜,从而限制了其横向分辨率。

在光片荧光显微镜中,样品每次只有一小薄片区域被激光激发,在薄片的垂直方向上采集荧光图像。目前有两种方式可以获得激发光片:一种是在一个方向上使用柱面透镜聚焦激光束来形成光片,另外一种是在激光束在普通的球面透镜后聚焦,然后在一个方向上扫描形成光片。光片荧光显微镜的轴向分辨率取决于激发光片的厚度。一直以来,人们做了许多努力来获得更均匀、更宽并且更薄的光片^[4-6]。然而,在提高光片荧光显微镜的横向分辨率方面相关研究较少。

近几年,超分辨率显微成像技术如随机光学重建显微技术(STORM)^[7]、受激辐射损耗显微技术(STED)^[8]等被应用到提高显微镜的横向分辨率中。超分辨率光涨落成像(SOFI)是一种不需要复杂设备就可以提高分辨率的成像方法^[9]。通过成百上千基于荧光信号涨落的统计和相关性分析,SOFI方法可以提供高信噪比的超分辨率图像。然而,传统的SOFI算法需要数百甚至数千张原始图像,限制了成像速度,原始图像的信噪比决定了算法处理所需的原始图像数量^[10-11]。

本文对SOFI算法进行改进,通过减少采集的图像数量,提高成像速度。在算法中,加入的两个小波滤波器分别在时间和空间上消除低频背景噪声和原始图像读出噪声。利用商用的铽化镱量子点扩散到琼脂糖溶液和斑马鱼中作为样品,在搭建的光片荧光显微镜中使用改进的SOFI算法,在不改变光片荧光显微镜的任何结构情况下,可获得两倍横向分辨率的提高,突破成像物镜对于分辨率的限制^[12]。

2 实 验

图1是自主搭建的光片荧光显微镜。 L_{488} 和 L_{405} 分别是波长为488 nm和405 nm的半导体激光器,作为激发光源; BS_1 为双色镜, BS_2 为分束片; $L_1 \sim L_8$ 为透镜,焦距分别为25,50,50,30,150,150,50,30 mm; EO_1 和 EO_2 为两个相同的激发物镜(Nikon,10×0.3);DO为探测物镜(Olympus,20×0.5);CA是焦距为50 mm的柱面透镜;AOM为声光调制器。双色镜 BS_1 用来整合488 nm的激光和405 nm的激光,它对于488 nm的激光有高的透射性而对于405 nm的激光有高的反射性。声光调制器用于波长选择和激光强度的调节。激光束通过两个透镜 L_1 和 L_2 进行扩束。使用柱面透镜CA可以在样品上产生一个约4 μm 厚的光片。分束片 BS_2 将经过柱面透镜CA后的光束分为两部分。一束光反射并且通过两个透镜 L_3 和 L_4 共轭到激发物镜的后瞳上;另一束光通过一个由 L_5 和 L_6 组成的4f双透镜系统,再经由两个透镜 L_7 和 L_8 共轭到另外一个激发物镜的后瞳上。探测物镜DO垂直于两个激发物镜,收集荧光并且通过滤光片后成像在科学互补金属氧化物半导体(sCMOS)相机上。滤波片用来过滤掉发射荧光以外的杂散光,以保证实验数据不被其他光干扰。样品被放置在四维电动平移台上,可进行三维的移动和任意角度的转动。电动平移台的最小步长是1.5 μm 。采用0.02 mg/mL的铽化镱量子点溶液,将样品扩散在1%浓度(体积比)的琼脂糖凝胶氟化乙烯丙烯(FEP)管里,FEP管浸入样品室的水中。

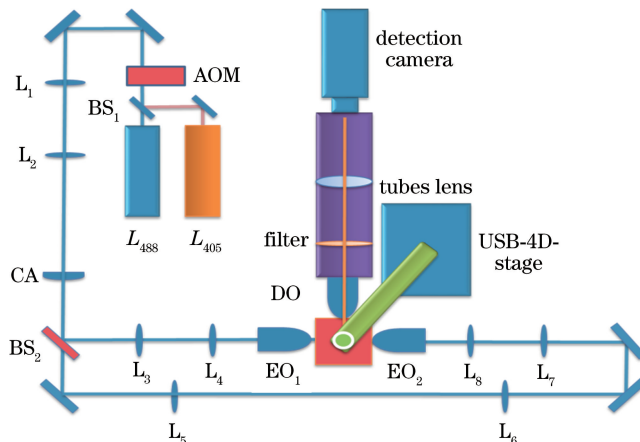


图1 自主搭建的双端激发的光片荧光显微镜装置

Fig. 1 Experimental setup of the home-made LSFM with double side inspired

3 实验结果和讨论

量子点具有荧光随机涨落特性。首先在光片荧光显微镜上采用镉化铜量子点来进行超分辨光涨落成像的实验,量子点的辐射波长是 530 nm。为了量化 SOFI 算法提高光片荧光显微镜的横向分辨率,选择两个相邻的量子点颗粒,如图 2(a)所示。受限于显微镜的分辨率,这两个量子点颗粒不能被直接分辨。采集 500 张数据,每一帧图片的采集时间是 0.3 s,经过传统的 4 阶 SOFI 算法对原始数据的处理,这两个相邻的量子点颗粒可以被分辨,如图 2(b)所示。图 2(a)和图 2(b)中被标记部分的荧光强度经高斯曲线拟合之后的结果如图 3(a)所示,相较于光片荧光显微镜观察到的原始数据,经过传统 4 阶 SOFI 算法得到的数据借由高斯拟合可以看到两个明显的波峰,这两个波峰之间的距离是 1100 nm,证明 SOFI 算法可以提高光片荧光显微镜的横向分辨率。接下来从这 500 张原始数据中选取了 50 张数据,在经过传统 4 阶 SOFI 算法处理之后,如图 2(c)所示,这两个量子点颗粒并不能被分辨开。图 2(c)中被标记部分的荧光强度经高斯曲线拟合之后,曲线半峰全宽为 1300 nm,只观察到一个波峰,如图 3(b)所示,实验结果证明要想提高光片荧光显微镜的横向分辨率,使用传统的 SOFI 算法需要相当数量的原始图片数据。

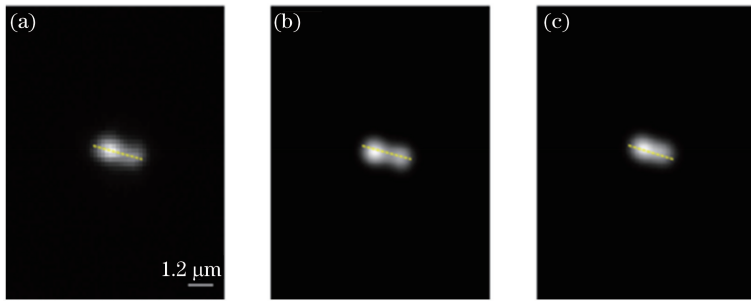


图 2 在自主搭建的光片荧光显微镜上获取的镉化铜量子点的原始图像和用 4 阶 SOFI 算法处理后的图像。

(a)原始图片;(b)处理 500 张原始图片得到的图像;(c)处理 50 张原始图片得到的图像

Fig. 2 Quantum dot-CdTe raw image and images processed by 4-order SOFI algorithm with home-made LSMF. (a) Raw image; (b) image after processing 500 raw images; (c) image after processing 50 raw images

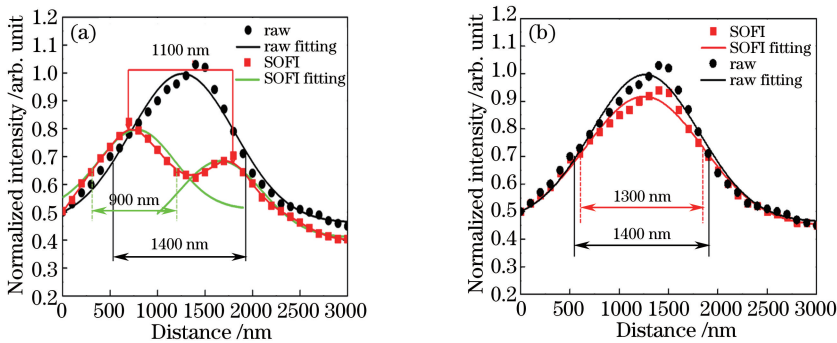


图 3 经 SOFI 算法处理后的图片的荧光强度分布及高斯拟合结果。(a)图 2(a)和(b)中被标记部分的结果;(b)图 2(a)和(c)中被标记部分的结果

Fig. 3 Fluorescence intensity distribution and Gaussian fitting results of images processed by SOFI algorithm.

(a) Results of marked part from Figs. 2(a) and (b); (b) results of marked part from Figs. 2(a) and (c)

SOFI 算法处理图像的质量受量子点荧光的稳定性和 sCMOS 的读出噪声两方面的影响。一方面低频背景噪声会减慢 SOFI 成像算法的收敛速度;另一方面,为了减少读出噪声,SOFI 算法需要更多的原始图像,但是这将影响算法的时间分辨率^[13]。首先,由于量子点荧光涨落信号和低频背景波动信号之间有频率差^[14],考虑到量子点的荧光强度,采用基于一维小波变换的高通滤波器在时间域来消除低频背景波动信号。其次,在空间频率域,光学传递函数的频率明显低于读出噪声,因此,利用基于二维小波变换的低通滤波器来消除高频读出噪声^[15-17]。

对于一个二维图像,小波变换相当于在水平方向和垂直方向上交替进行滤波和采样。小波变换每次分解产生一个低频子图和三个高频子图(水平子图、垂直子图和对角子图)。低频子图反映原始图像的主体轮

廓信息,水平子图、垂直子图和对角子图分别反映图像的水平、垂直和对角方向的边缘细节信息。以平滑函数的一阶导数为母小波进行小波变换,其小波变换在各尺度下系数的模极大值对应信号突变点,即图像的边缘位置,边缘点进行边缘匹配和连接,构成原始图像的边缘定位。小波变换把图像信号变换到小波域,在小波域中,图像的主要能量集中在低分辨率的尺度系数和一些较大的小波系数上,而噪声仍然分布在低分辨率的尺度系数和所有小波系数上。在变换域,图像的相关性降低,能量更加集中而噪声的能量分布情况不变。基于以上原理,首先对原始图像进行小波分解,然后找到一个合适的阈值,对小波分解系数进行阈值处理,达到抑制噪声的目的,再对处理后的系数重构,即得到去除噪声之后的图像,最后在光片荧光显微镜下测试改进之后的 SOFI 算法。

选用最初的 500 张原始数据,如图 4(a)所示。首先用改进的 4 阶 SOFI 算法对 500 张原始数据进行处理,得到了相应的图像,如图 4(b)所示,两个相邻的量子点颗粒被明显分辨开,对图 4(b)标记部分的荧光强度分布进行高斯拟合得到的半峰全宽为 550 nm,如图 5(a)所示,两个波峰之间的距离是 1200 nm。接下来从 500 张原始数据中选取了 50 张,经过 4 阶改进的 SOFI 算法处理之后,这两个相邻的量子点颗粒也可以被分辨,如图 4(c)所示,对图 4(c)标记部分的荧光强度分布进行高斯拟合得到的半峰全宽为 890 nm,两个波峰之间的距离是 1100 nm,如图 5(b)所示。结果表明,SOFI 算法经过改进,可以显著降低所需要的图像数量,同时提高两倍光片荧光显微镜的横向分辨率。

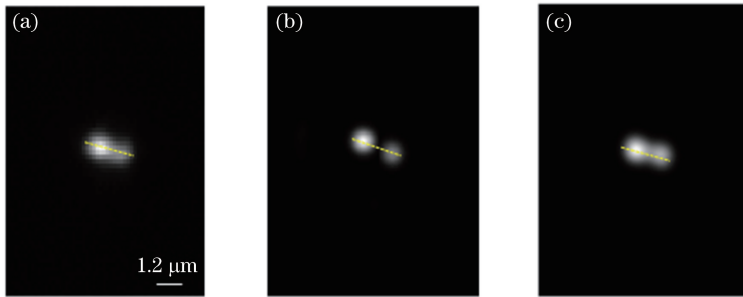


图 4 在自主搭建的光片荧光显微镜上获取的碲化镉量子点的原始图像和用改进后的 4 阶 SOFI 算法处理后的图像。

(a)原始图片;(b)处理 500 张原始图片得到的图像;(c)处理 50 张原始图片得到的图像

Fig. 4 Quantum dot-CdTe raw image and images processed by modified 4-order SOFI algorithm with

home-made LRFM. (a) Raw image; (b) image after processing 500 raw images; (c) image after processing 50 raw images

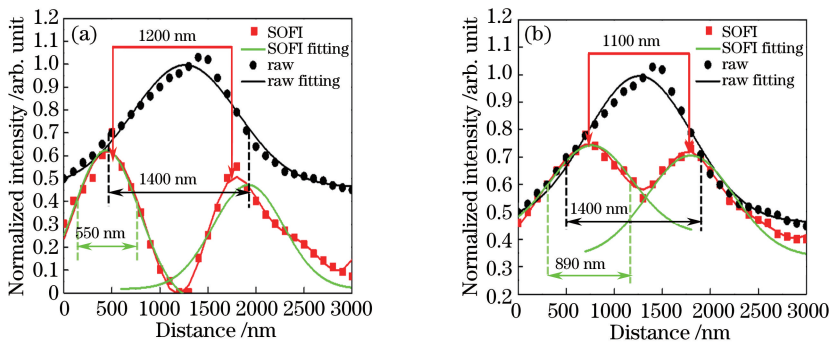


图 5 经改进后的 SOFI 算法处理后的图片的荧光强度分布及高斯拟合结果。(a)图 2(a)和(b)中被标记部分的结果;(b)图 2(a)和(c)中被标记部分的结果

Fig. 5 Fluorescence intensity distribution and Gaussian fitting results of images processed by modified SOFI algorithm.

(a) Results of marked part from Figs. 2(a) and (b); (b) results of marked part from Figs. 2(a) and (c)

为了进一步测试结合 SOFI 成像算法的光片荧光显微镜对活体生物样品成像的适用性,利用自主搭建的光片荧光显微镜对已经用量子点标记过的 3 天大小的斑马鱼进行了显微成像。图 6 是用光片荧光显微镜获取到的斑马鱼眼睛的图片。在光片荧光显微镜下,斑马鱼的眼睛表现出有限的结构,细节模糊,没有明显的形态结构,如图 6(a)和图 6(c)所示。然后选取 50 张采集到的图像数据,在经过 4 阶改进的 SOFI 成像算法处理之后,斑马鱼的眼睛图像如图 6(b)和图 6(d)所示,相比于直接观察获得的图像,处理后的图像更加清

楚,已经显现出了明显的边界和形态细节。除了分辨率,图像信噪比的提升也很明显,这得益于改进后 SOFI 成像算法对背景噪声的消除[图 6(e)].实验结果表明,引入改进后的 SOFI 算法可以显著提高光片荧光显微镜的横向分辨率,同时实验中算法所需的原始图像的数目已被减少到 50,可以显著缩短采集成像时间。

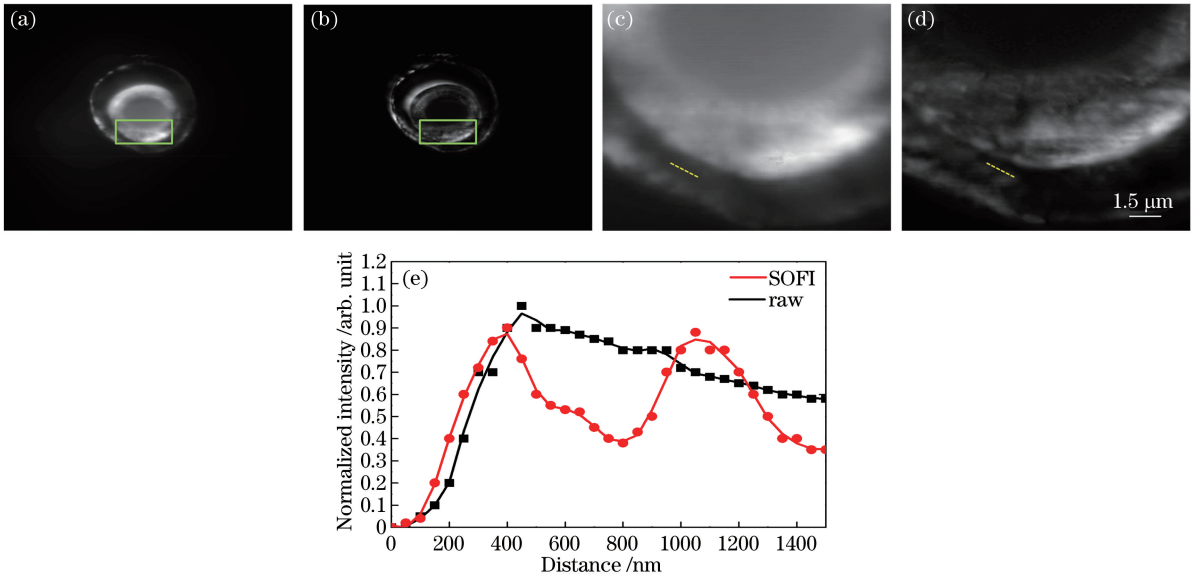


图 6 通过光片荧光显微镜直接观察到的和经改进后 4 阶 SOFI 算法处理得到的斑马鱼眼睛的对比。

(a)直接观察到的图像(50 张);(b)经算法处理得到图像(50 张);(c)图(a)中被标记位置的细节;
(d)图(b)中被标记位置的细节;(e)图像的荧光强度分布

Fig. 6 Comparison between the image observed by LSFM and the image processed by modified 4-order SOFI algorithm of a zebrafish eye. (a) Observed image of 50 raw frames; (b) image processed by algorithm with 50 raw images; (c) detailed view of area marked in Fig. (a); (d) detailed view of area marked in Fig. (b); (e) fluorescence intensity distribution of images

4 结 论

本文将光片荧光显微镜和改进的 SOFI 成像算法相结合来提高横向分辨率,该方法的优势为:1) 相对于传统的光片荧光显微镜,在不改变光片荧光显微镜任何结构的情况下将其横向分辨率提高了两倍。2) 相比较于传统的 SOFI 成像算法,将需要的图像数量从几百张降到了几十张。该研究对于提高光片荧光显微镜的横向分辨率具有积极的意义,可应用于高时空分辨率的活体成像研究中。

参 考 文 献

- [1] Chen X, Zeng Z, Wang H, *et al.* Three-dimensional multimodal sub-diffraction imaging with spinning-disk confocal microscopy using blinking/fluctuating probes[J]. *Nano Research*, 2015, 8(7): 2251-2260.
- [2] Huisken J, Swoger J, Bene F D, *et al.* Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy[J]. *Science*, 2004, 305(5686): 1007-1009.
- [3] Gao L. Optimization of the excitation light sheet in selective plane illumination microscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(3): 881-890.
- [4] Golub I, Chebbi B, Golub J. Toward the optical "magic carpet": reducing the divergence of a light sheet below the diffraction limit[J]. *Optics Letters*, 2015, 40(21): 5121-5124.
- [5] Gao L. Extend the field of view of selective plan illumination microscopy by tiling the excitation light sheet[J]. *Optics Express*, 2015, 23(5): 6102-6111.
- [6] Truong T V, Supatto W, Koos D S, *et al.* Deep and fast live imaging with two-photon scanned light-sheet microscopy [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(9): 757-760.
- [7] Bates M, Huang B, Rust M J, *et al.* Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-796.

- [8] Hein B, Willig K I, Hell S W. Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell[C]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(38): 14271-14276.
- [9] Dertinger T, Colyer R, Iyer G, *et al.* Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI) [C]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(52): 22287-22292.
- [10] Dertinger T, Colyer R, Vogel R, *et al.* Superresolution optical fluctuation imaging (SOFI) [J]. Advances in Experimental Medicine & Biology, 2012, 733(49): 17-21.
- [11] Chen X, Zong W, Li R, *et al.* Two-photon light-sheet nanoscopy by fluorescence fluctuation correlation analysis. [J]. Nanoscale, 2016, 8(19): 9982-9987.
- [12] Wu Meirui, Yang Xibin, Xiong Daxi, *et al.* Structured illumination fluorescence microscopy: Diffraction-limit breaking principle and application in life science[J]. Lasers & Optoelectronics Progress, 2015, 52(1): 010003.
吴美瑞, 杨西斌, 熊大曦, 等. 结构光照明荧光显微镜突破衍射极限的原理和在生命科学中的应用[J]. 激光与光电子学进展, 2015, 52(1): 010003.
- [13] Watanabe T M, Fukui S, Jin T, *et al.* Real-time nanoscopy by using blinking enhanced quantum dots[J]. Biophysical Journal, 2010, 99(7): L50-L52.
- [14] Schwab H. Introduction to wavelets and wavelet transforms. a primer[M]. Prentice Hall, 1998.
- [15] Antoine J P, Murenzi R, Vanderghenst P, *et al.* Two-dimensional wavelets and their relatives [M]. Cambridge University Press, 2004.
- [16] Jiang S, Zhang Y, Yang H, *et al.* Enhanced SOFI algorithm achieved with modified optical fluctuating signal extraction [J]. Optics Express, 2016, 24(3): 3037-3045.
- [17] Li Rui, Qu Huiming, Zhang Yunhai, *et al.* Super-resolution optical fluctuation imaging algorithm based on spatial Gaussian filter[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2016, 53(8): 081001.
李蕊, 屈惠明, 张运海, 等. 基于空间高斯滤波的超分辨光学波动成像算法[J]. 激光与光电子学进展, 2016, 53(8): 081001