

# 基于可控光剂量的低荧光漂白共聚焦成像技术

徐依雯<sup>1,2</sup>, 张运海<sup>1</sup>, 杨皓旻<sup>1</sup>, 季林<sup>1</sup>, 昌剑<sup>1</sup>, 刘创<sup>1,2</sup>, 唐玉国<sup>1</sup>

<sup>1</sup>江苏省医用光学重点实验室, 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏 苏州 215163;

<sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100049

**摘要** 激发光引起的荧光漂白限制了共聚焦成像技术在长时间观测生物样本方面的应用。提出了一种基于可控光剂量的共聚焦成像技术(CLE-CM), 该技术通过预实验设置高低阈值, 定时读取采样像素值并与预设阈值进行比较, 根据比较结果控制每个物方像素的光照时间, 以更高效地利用荧光信息, 在不牺牲图像质量的情况下降低了荧光漂白。用 CLE-CM 和标准共聚焦对牛肺动脉内皮细胞样本连续成 11 幅图像, 与第 11 幅标准共聚焦图像相比, 第 11 幅 CLE-CM 图像的荧光漂白减少了 52.62%, 具体降漂白效果与样本中的荧光分布有关。CLE-CM 通过减少光剂量大幅降低了共聚焦显微成像的荧光漂白, 使共聚焦显微镜能连续成更多张高质量图像。

**关键词** 医用光学; 荧光显微成像; 可控光剂量共聚焦显微术; 共聚焦显微术; 降低荧光漂白

中图分类号 O439

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0407001

## Imaging Technology of Reduced Photobleaching Based on Controllable Light Exposure-Confocal Microscopy

Xu Yiwen<sup>1,2</sup>, Zhang Yunhai<sup>1</sup>, Yang Haomin<sup>1</sup>, Ji Lin<sup>1</sup>, Chang Jian<sup>1</sup>,  
Liu Chuang<sup>1,2</sup>, Tang Yuguo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology (SIBET),  
Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China;

<sup>2</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract** Photobleaching induced by excitation light limits the application of confocal microscopy for long-time observation of biological samples. A new imaging approach, controllable light exposure-confocal microscopy (CLE-CM), is proposed. CLE-CM has two thresholds decided through pre-experiments and detects the feedback of sample pixel value at set intervals. The feedback is compared with upper and lower thresholds. By spatially controlling the light-exposure time of objective pixel according to the results of comparison, CLE-CM exploits fluorescent information in a more efficient way and reduces photobleaching without decreasing image quality. Two scan series of 11 successive CLE-CM images and standard confocal images show that, CLE-CM reduces 52.62% of photobleaching in bovine pulmonary artery endothelial (BPAE) cells compared with standard confocal at the 11th image. The effect of bleaching attenuation depends on the fluorophore distribution. CLE-CM decreases photobleaching markedly through the reduction of excitation-light dose, and increases the number of good-quality images that can be captured continuously by confocal microscope.

**Key words** medical optics; fluorescence microscopy imaging; controllable light exposure-confocal microscopy; confocal microscopy; photobleaching reduction

**OCIS codes** 180.2520; 180.1790; 170.1790

收稿日期: 2017-06-22; 收到修改稿日期: 2017-08-29

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC0110303)、国家重大科研装备研制项目(DYZ2013-1)、江苏省基础研究计划青年基金(BK20160363)、苏州应用基础研究计划(SYG201510)

作者简介: 徐依雯(1993—), 女, 硕士研究生, 主要从事共聚焦显微成像方面的研究。E-mail: xuyiwen15@mails.ucas.edu.cn

导师简介: 张运海(1975—), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事共聚焦显微成像技术、超分辨受激辐射损耗(STED)成像技术等方面的研究。Email: zhangyh@sibet.ac.cn(通信联系人)

# 1 引 言

荧光显微成像因具有非侵入和特异性标记识别的特点而广泛应用于生命科学领域,但常遇到荧光漂白的难题。随着对同一样本成像次数的增加,荧光染料会逐渐失去发荧光的能力<sup>[1]</sup>,从而导致图像变暗,变模糊,逐渐丢失重要的细节信息。生命科学领域内的研究需要对研究目标连续取多幅图像,以观察目标的变化过程,逐渐变暗的图像会严重影响生命科学领域研究的开展,因此降低荧光漂白对生物医学研究,尤其是发育生物学研究十分重要。

共聚焦显微镜是一种得到了广泛应用的荧光显微成像工具,与普通宽场荧光显微镜和光片显微镜相比,成像深度可控,可层析成像,分辨率高,信噪比高<sup>[2-4]</sup>。在其基础上还发展出了受激辐射损耗(STED)超分辨成像技术,这两种技术均属于激光点扫描成像技术。与激光分布在照明区域的宽场荧光成像技术<sup>[5]</sup>相比,点扫描成像技术的激光束通过高数值孔径物镜聚焦在一个非常小的光斑内,聚焦功率密度很高,典型的共聚焦光功率密度<sup>[6]</sup>可达  $5 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^5 \text{ W/cm}^2$ ,而 STED 的光功率密度<sup>[7]</sup>更是高达  $200 \text{ MW/cm}^2$ ,过高的光功率密度使得荧光漂白现象十分严重,限制了点扫描成像的应用范围。低荧光漂白共聚焦成像技术可以扩大共聚焦成像的应用范围,而且其采用的技术经调整后又可以方便地应用到 STED 成像中。

荧光漂白的三大因素为荧光分子、化学环境、光剂量,降漂白技术正是基于这三点,使用特殊荧光染料<sup>[8-9]</sup>(如量子点)或改变荧光分子的化学环境<sup>[10-12]</sup>(如添加抗漂白剂)来达到提高荧光标记物光学稳定性的目的,但这两类方法都不适用于普通生物样本。通过改进成像技术来减少光剂量的方法,如提高线性扫描速度的快速扫描技术<sup>[13]</sup>更适用于普通生物样

本。Manders 等提出的闭环控制技术(CLEM)<sup>[14]</sup>通过减少弱荧光和强荧光区的光照大大降低了烟草 BY2 型细胞 3D 活细胞成像的荧光漂白,但牺牲了图像的信噪比,其重要参数的高低阈值依靠多次成像经验得出,不能灵活地运用于其他生物样本。

本文提出了一种降低共聚焦成像荧光漂白的新技术:基于可控光剂量的共聚焦成像技术(CLE-CM)。实验结果证明,该技术能够有效降低共聚焦成像时的荧光漂白,可灵活地用于多种生物样本,并且这种荧光降漂白技术经过适当调整后可以方便地应用到 STED 超分辨成像技术中。

## 2 CLE-CM 的实现机理和方法

### 2.1 机 理

高数值孔径物镜带来的高光功率密度是样本荧光漂白的直接原因,简单地降低光功率密度或减少光照时间能缓解荧光漂白,但也会降低有效荧光信号,导致图像丢失,细节模糊不清<sup>[15]</sup>。为此本研究提出了一种既能控制光剂量又不影响图像质量的方法。

图 1(a)展示了共聚焦成像的原理。共轭针孔滤除了焦点光斑以外的背景荧光,极大地提高了信噪比,但一次只能观察光斑大小的一个点,通过振镜或纳米位移台使光斑与样本发生相对位移来获得各点的荧光信息,点扫描过程如图 1(b)所示。扫描样本的“点”是一个三维分布的光场,称为点扩散函数(PSF)<sup>[15]</sup>,其在  $xy$  平面和  $xz$  平面都遵循高斯分布<sup>[17]</sup>,影响范围非常广。扫描光斑就是激发光透过物镜形成的焦斑,其直径  $d$  的计算公式为  $d = 1.22\lambda / NA$  ( $\lambda$  为激发光波长,  $\lambda = 488 \text{ nm}$ ;  $NA$  为数值孔径,  $NA = 1.4$ )。计算可得光斑直径  $d = 425 \text{ nm}$ ,该成像系统的光学分辨率为光斑直径的  $1/2$ <sup>[18]</sup>,约为  $212 \text{ nm}$ 。根据奈奎斯特采样定理,采样频率为信号频率的 2 倍,而实际应用中至少要达

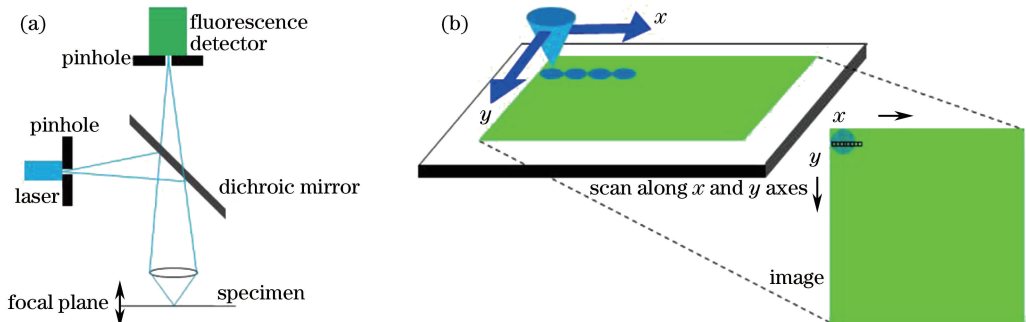


图 1 (a)激光点扫描共聚焦成像原理以及(b)共聚焦成像点扫描过程示意图

Fig. 1 Schematics of (a) principle of laser spot scanning confocal microscopy and (b) spot scanning process of confocal microscopy

到 3 倍, 采样间隔(物方像素尺寸)应小于分辨率的  $1/3$ , 物方像素尺寸设为 60 nm。

标准共聚焦成像以光强固定的光斑匀速扫描, 成像过程中光剂量不可调节。对图 2(a) 所示的像素(稀疏区)施加固定剂量的光照, 不但不能获得有效的荧光信号, 还会漂白周边的荧光分子; 对图 2(b) 所示的像素(密集区)施加相同剂量的光照, 则会得到过强的荧光信号, 远超图像信噪比的需求。CLE-CM 可针对以上两种情况的像素控制光照剂量, 能保证各区域接收“最小的光剂量”, 从而降低

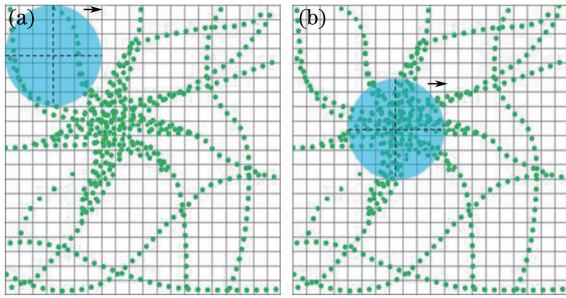


图 2 物方像素扫描图。(a) 荧光分子稀疏区; (b) 荧光分子密集区  
Fig. 2 Spot scanning diagrams of objective pixel.  
(a) Fluorophore sparse area; (b) fluorophore dense area

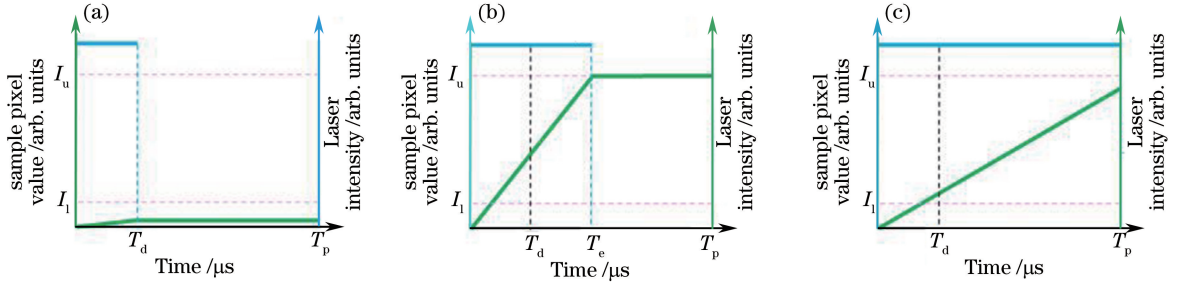


图 3 CLE-CM 反馈判断过程示意图。(a) 荧光分子极稀疏; (b) 荧光分子高密度; (c) 荧光分子密度适中  
Fig. 3 Process of feedback judgment in CLE-CM.

(a) Fluorophore with extremely sparse density; (b) fluorophore with high density; (c) fluorophore with medium density

每个像素扫描前一小段时间保持光照, 从决策时间开始读取反馈进行判断, 若反馈未达到低阈值, 说明像素内的荧光分子极稀疏, 无法提供荧光信息, 立刻关闭激光, 如图 3(a) 所示; 若反馈达到高阈值, 说明像素内的荧光分子很密集, 已获得足够的荧光信息, 立刻关闭激光, 如图 3(b) 所示; 若像素驻留时间结束, 而采样像素值仍未达到高阈值, 说明该像素内荧光分子的密度适中, 光剂量未过剩, 如图 3(c) 所示。

反馈判断的理想情况是实时监测反馈, 在其恰好达到高阈值时关闭激光, 如图 4 中绿色虚线所示, 但实际上这种实时监测很难实现, 所以采用近似方法, 将像素驻留时间分成如图 4 所示的  $N$  段, 在每

漂白。

## 2.2 CLE-CM 的实现方法

可控光剂量共聚焦实现的方法是先设置阈值, 再读取反馈, 以判断像素内荧光分子的密集程度, 最后根据判断结果控制像素的光照时间。

设置阈值: 在 CLE-CM 成像前取一张标准共聚焦图像, 用于分析高低阈值以及与 CLE-CM 图像对照。高阈值需要参考对照图的最大像素值, 计算对照图像中 5% 最大像素值的均值, 该均值的  $1/4$  设为 CLE-CM 的高阈值。低阈值需要参考对照图的最小像素值, 计算对照图像中 5% 最小像素值的均值  $p$ , 考虑到决策时间与像素驻留时间比值  $t$  以及噪声的影响, CLE-CM 低阈值设为  $pt+2$ 。

根据反馈判断荧光分子的密集程度。反馈就是某像素扫描过程中某时刻读取的像素值  $I$ , 为采样像素值; 第一次读取反馈的时间  $T_d$  为决策时间, 光斑中心停留在单个物方像素的时间  $T_p$  为像素驻留时间, CLE-CM 激光实际开启的时间  $T_e$  为像素的实际光照时间,  $T_e$  时刻读取的像素值  $I$  为实际像素值。图 3 展示了单个像素扫描过程的可能情况,  $I_u$  为高阈值;  $I_l$  为低阈值。

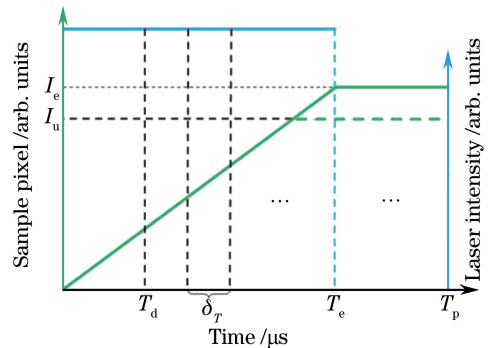


图 4 高阈值判断过程分段示意图

Fig. 4 Schematic of time subsection in upper threshold judgment  
段时间末尾读取反馈, 像素实际光照时间  $T_e =$

$T_d + k\delta_T$  其中:  $k=0, 1, \dots, N-1$ ;  $\delta_T = (T_p - T_d) / (N-1)$ ,  $\delta_T$  为相邻判断的时间间隔。理论上,  $N$  越大,  $k$  的取值范围越大, 像素光照时间的变化越细微。

CLE-CM 中一幅图像扫描结束得到两组数据, 一组是各像素的实际光照时间, 如图 5(a) 所示, 另一组是各像素的实际像素值, 如图 5(b) 所示。由于激光的强度恒定, 荧光强度不变, 像素值等于荧光强度与像素光照时间的乘积, 所以像素值与像素光照时间成正比, 根据这一关系可以恢复出 CLE-CM 图像, 如图 5(c) 所示。

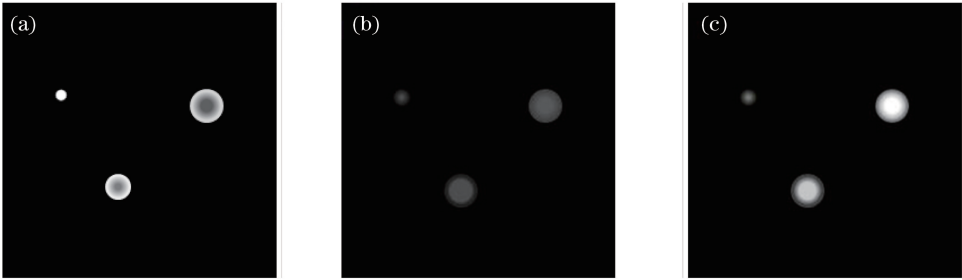


图 5 (a) 像素光照时间分布图; (b) 采样像素值分布图; (c) CLE-CM 恢复图像

Fig. 5 (a) Pixel light-exposure time distribution; (b) real pixel value; (c) reconstructed image of CLE-CM

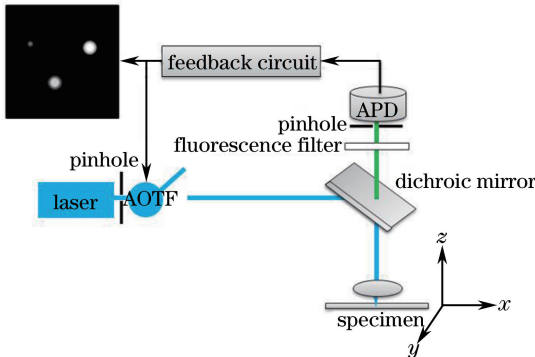


图 6 CLE-CM 成像系统示意图

Fig. 6 Diagram of CLE-CM imaging system

实验样本为牛肺动脉内皮细胞 (F36924-BPAE cells)。超连续谱皮秒脉冲白激光光源 (SC450-PPHE) 经滤光片选通 488 nm 波长的光, 脉冲重复频率为 1 MHz, 可覆盖 GFP/YFP、ATTO488、FITC 等常用荧光染料。探测器采用光子计数型雪崩光电二极管 (APD, 型号为 SPCM-AQRH-14-FC)。AOTF (160T1-1SNR-12-0.4J) 对激发光的转移效率约为 88.98%, 对模拟调制信号的响应时间约为 2  $\mu$ s (远小于整个像素驻留时间 200  $\mu$ s), 可用于成像。

### 3.2 可控光剂量共聚焦图像分析

标准共聚焦以光强固定的光斑匀速扫描, 光剂量不可控, 每个像素接受相同的光剂量。在 CLE-CM 成像前, 先取一幅标准共聚焦对照图像 (如图 7

## 3 CLE-CM 成像实验

### 3.1 实验系统

与标准共聚焦成像系统相比, 图 6 所示的 CLE-CM 成像系统增加了两部分: 反馈电路和声光可协调滤波器 (AOTF)。AOTF 在光路中起高速开关的作用; 反馈电路的主体是 1 块现场可编程逻辑门阵列 (FPGA) 开发板, 用作光子计数器和光照时间计时器, 同时执行比较判断程序, 并根据判断结果输出波形控制 AOTF, 实现激光的开关。

(a) 所示), 再取像素光照时间分布图 (如图 7(b) 所示) 和实际像素值分布图 (如图 7(c) 所示), 并根据图 7(b) 和图 7(c) 获得图 7(d) 所示的 CLE-CM 重建图像。由图 7 可见: CLE-CM 重建图像与标准共聚焦对照图像基本一致, 但从白箭头标注处能看出重建图像的信噪比较低。根据理论预测可知提高时间分段数  $N$  能改善重建图像的信噪比, 分别取  $N$  为 4、9、16 进行三组对比实验, 高阈值为对照图像中最大 5% 像素值均值的 1/4, 低阈值为  $p \cdot 50/200 + 2$ , 决策时间为 50  $\mu$ s, 像素驻留时间为 200  $\mu$ s。

增大  $N$  能使像素光照时间分布图更平滑 (如图 7(b) 所示), CLE-CM 重建图像质量显著提升 (如图 7(d) 所示),  $N=4$  时弱荧光区有大量黑点,  $N=9$  时黑点数量大大减少且边缘更平滑,  $N=16$  时图像质量非常高, 信噪比满足需求。

为验证阈值分析法设置阈值配合 CLE-CM 的降漂白效果, 先取对照图像以阈值分析法计算, 高阈值为 26, 低阈值为 5, 激发光波长 488 nm, 显微镜侧入口光强 2.8  $\mu$ W, 像素驻留时间 200  $\mu$ s, 决策时间 50  $\mu$ s,  $N$  为 16, 物方像素尺寸 60 nm, 成像区域 15  $\mu$ m  $\times$  15  $\mu$ m, 对 BPAE 样本连续成 11 幅图像。对于第 11 幅图, 标准共聚焦图像已损失了约 85% 的荧光信息, 而 CLE-CM 图像只损失了约 30% 的荧光信息, 如图 8 所示。

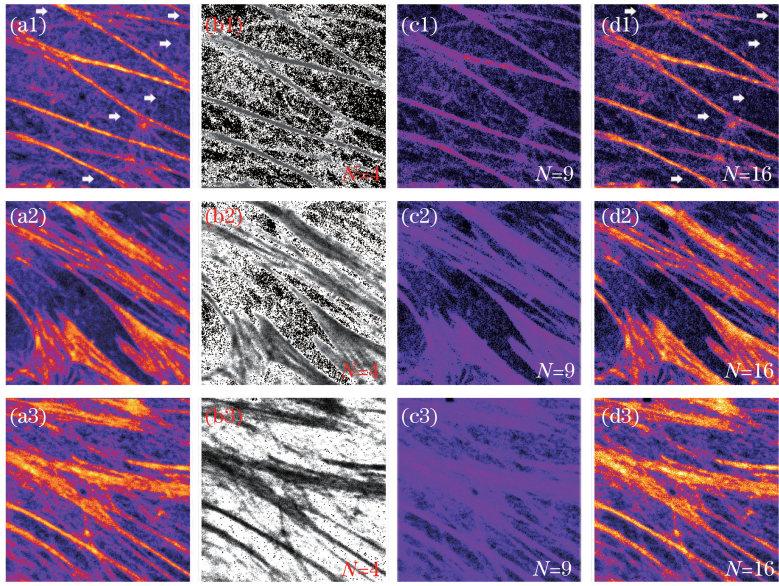


图 7 (a)标准共聚焦对照图像;(b)像素光照时间分布图;(c)实际像素值分布图;(d) CLE-CM 重建图像  
 Fig. 7 (a) Standard confocal contrast images; (b) distribution of pixel light-exposure time;  
 (c) distribution of real pixel value; (d) reconstructed images of CLE-CM

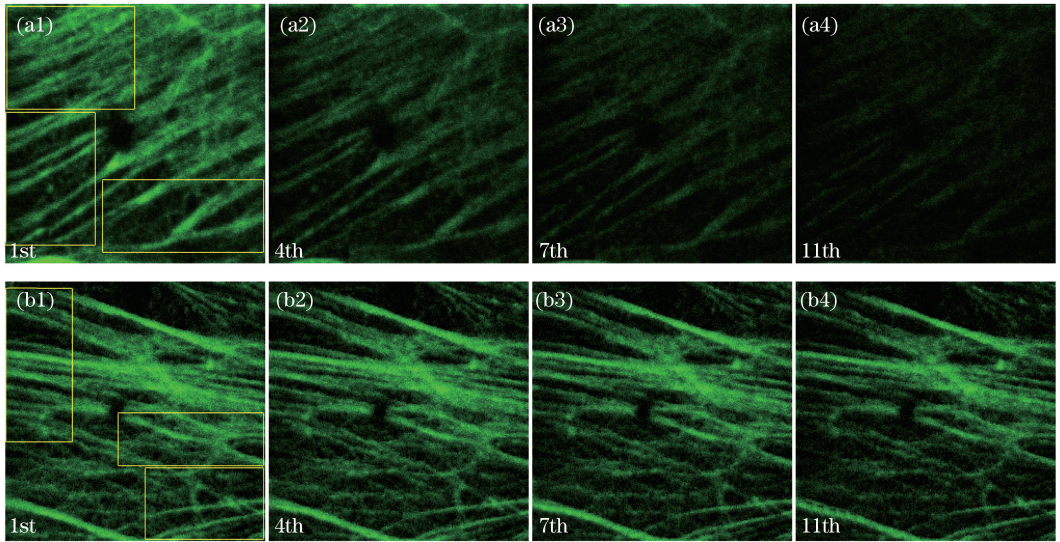


图 8 (a)标准共聚焦图像;(b) CLE-CM 重建图像

Fig. 8 (a) Standard confocal images; (b) reconstructed images of CLE-CM

为定量分析降漂白的效果,从两组图内亮度中等的细丝上(如图 8 黄框圈出的区域)选取所有像素值在 50~90 范围内的点,追踪荧光强度的变化,绘成荧光强度的变化曲线(图 9),标准共聚焦图像荧光强度迅速下降到 50% 以下,而 CLE-CM 图像的荧光强度均匀、缓慢、近似线性地下降。到第 11 幅图,标准共聚焦图像和 CLE-CM 图像剩余荧光强度各为起始强度的 15.67% 和 68.29%,CLE-CM 将荧光漂白降低了 52.62%。若从强荧光区选择样本点,第 11 幅 CLE-CM 图像将保留超过 80% 的荧光强度,

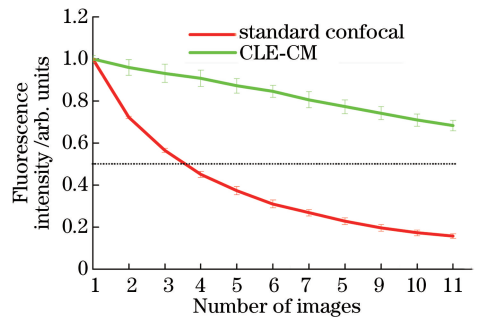


图 9 荧光强度曲线

Fig. 9 Curves of fluorescence intensity

可见具体效果还与荧光分布情况有关。

## 4 结 论

提出了一种低荧光漂白共聚焦成像技术——基于可控光剂量的共聚焦(CLE-CM)成像技术,它通过预扫描的标准共聚焦图像的阈值,结合反馈最大程度控制像素光剂量,极大地降低共聚焦成像技术的荧光漂白,简化了更换样本后反复确定阈值的过程;可通过细化时间分段来改善图像质量,为进一步提高图像质量并降低漂白的研究提供了思路。

实验以 CLE-CM 对牛肺动脉内皮细胞样片连续成 11 幅图像,在光分子分布均匀的细丝区域的荧光漂白降低了 52.62%,证明了 CLE-CM 技术具有很好的降漂白效果,使共聚焦显微镜能针对生物样本的同一区域连续获取更多的高质量图像,极大地提高了共聚焦显微镜长时间观测生物样本的能力。

## 参 考 文 献

- [1] Bernas T, Zarebski M, Dobruki J W, *et al.* Minimizing photobleaching during confocal microscopy of fluorescent probes bound to chromatin: Role of anoxia and photon flux [J]. *Journal of Microscopy*, 2004, 215(3): 281-296.
- [2] Xu H, Zhang Y H, Zhang X, *et al.* Airy beam light sheet microscopy with deconvolution[J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(3): 0318013.  
徐豪, 张运海, 张欣, 等. 结合去卷积的艾里光束片状光显微成像研究[J]. *光学学报*, 2017, 37(3): 0318013.
- [3] Xu H, Zhang Y H, Zhang X, *et al.* Field of view-extended light sheet microscope based on wavefront phase modulation[J]. *Acta Optica Sinica*, 2016, 36(8): 0818001.  
徐豪, 张运海, 张欣, 等. 基于波前相位调制的宽视场光片显微镜研究[J]. *光学学报*, 2016, 36(8): 0818001.
- [4] Zhang Y, Hu B, Dai Y, *et al.* A new multichannel spectral imaging laser scanning confocal microscope [J]. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2013, 2013: 890203.
- [5] Schermelleh L, Heintzmann R, Leonhardt H. A guide to super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Journal of Cell Biology*, 2010, 190(2): 165-175.
- [6] Robert H W. Confocal optical microscopy [J]. *Reports on Progress in Physics*, 1996, 59(3): 427-471.
- [7] Liu Y, Ding Y, Alonas E, *et al.* Achieving  $\lambda/10$  resolution CW STED nanoscopy with a Ti : sapphire oscillator[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e40003.
- [8] Irvine S E, Staudt T, Rittweger E, *et al.* Direct light-driven modulation of luminescence from Mn-doped ZnSe quantum dots[J]. *Angewandte Chemie*, 2008, 120(14): 2725-2728.
- [9] Rittweger E, Han K Y, Irvine S E, *et al.* STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution[J]. *Nature Photonics*, 2009, 3(3): 144-147.
- [10] Dittrich P S, Schwille P. Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis with one- and two-photon excitation [J]. *Applied Physics B*, 2001, 73(8): 829-837.
- [11] Song L, Varma C A, Verhoeven J W, *et al.* Influence of the triplet excited state on the photobleaching kinetics of fluorescein in microscopy [J]. *Biophysical Journal*, 1996, 70(6): 2959-2968.
- [12] Vogelsang J, Kasper R, Steinhauer C, *et al.* A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, 47(29): 5465-5469.
- [13] Borlinghaus R T. MRT letter: High speed scanning has the potential to increase fluorescence yield and to reduce photobleaching[J]. *Microscopy Research & Technique*, 2006, 69(9): 689.
- [14] Hoebe R A, van Oven C H, Gadella T W J, *et al.* Controlled light-exposure microscopy reduces photobleaching and phototoxicity in fluorescence live-cell imaging [J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(2): 249-253.
- [15] Masters B R. Handbook of biological confocal microscopy [M]. 3rd ed. New York: Springer, 2006.
- [16] Eggeling C, Willig K I, Sahl S J, *et al.* Lens-based fluorescence nanoscopy [J]. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2015, 48(2): 178-243.
- [17] Peng X. Optical nanoscopy and novel microscopy techniques[M]. [S.l.]: CRC Press, 2014: 1-22.
- [18] Huang B, Bates M, Zhuang X W. Super-resolution fluorescence microscopy [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, 78: 993-1016.