

光片荧光显微镜长时间的稳定成像

张球^{1,2}, 梁东², 白丽华¹, 刘军^{2*}

¹上海大学理学院物理系, 上海 200444;

²中国科学院上海光学精密机械研究所强场激光物理国家重点实验室, 上海 201800

摘要 利用 $4f$ (f 为焦距) 系统和电子耦合器件相机跟踪样品的位置, 通过纳米平移台对机械漂移进行了补偿, 使样品始终处于光片的束腰位置, 从而获得了最优图像。所提方法可以对几纳米的机械偏移进行补偿。使用自主搭建的光片荧光显微镜对直径为几微米的荧光微球进行了长时间成像, 验证了所提方法的可行性。

关键词 成像系统; 光片荧光显微镜; 机械偏移; $4f$ 系统; 补偿; 最优图像

中图分类号 Q631

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201946.0407001

Long-Time Stabilization Imaging by Light Sheet Fluorescent Microscope

Zhang Qiu^{1,2}, Liang Dong², Bai Lihua¹, Liu Jun^{2*}

¹Department of Physics, College of Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China;

²State Key Laboratory for High Laser Field Physics, Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

Abstract By using a $4f$ (f is the focal length) optical setup and a charge coupled device camera, the sample position is tracked. The mechanical drift is compensated by the nano-translation table which ensures the sample always at the beam waist of the light sheet and thus an optimal image is obtained. With the proposed method, the mechanical drift of several nanometers can be compensated. By using the home-made light sheet fluorescence microscopy, the long-time imaging of fluorescent microspheres with diameters of several micrometers is acquired, which confirms the feasibility of the proposed method.

Key words imaging systems; light sheet fluorescence microscopy; mechanical drift; $4f$ optical setup; compensation; optimal image

OCIS codes 170.2520; 170.0180; 170.5810; 110.0180

1 引言

光片荧光显微镜(LSFM)以其较强的切片能力、快速采集和三维(3D)无损成像等优势,在细胞生物学^[1-2]、生物物理学^[3-4]和神经科学^[5-6]等方面得到越来越广泛的应用。LSFM的两个物镜垂直放置,仅探测物镜焦平面附近的样品被照明进而辐射荧光信号,从而实现切片效果,极大地减少离焦信号并减轻光毒性和光漂白性^[7-9]。此外,由于整个探测物镜焦平面的荧光信号被一次性采集,因此LSFM是一种宽场成像的手段,能够极大地提高图像采集的速度^[10-12]。为了满足亚细胞成像的需求,需要采

用高数值孔径(NA)的物镜以激发出超薄的光片,进而实现数百纳米的空间分辨率^[13-14]。然而,对于这种装置而言,机械偏移是一个很严峻的问题,尤其是在长时间成像进程中,机械偏移会持续恶化图像质量,甚至使图像脱离视野。

当前对于LSFM稳定性的研究不多,机械偏移的补偿精度也有限,普适性不高。因此本文提出了一种利用 $4f$ (f 为焦距)系统和电子耦合器件(CCD)相机来监测机械偏移、使用纳米平移台进行反馈调节的方法提高系统的长时间成像稳定性。首先CCD对从盖玻片表面反射的光片进行成像,并对采集的图像进行分析,进而监测样品的位置,随后将

收稿日期: 2018-12-27; 修回日期: 2019-01-10; 录用日期: 2019-01-18

基金项目: 国家自然科学基金(61521093, 61527821)、上海市自然科学基金(18ZR1413600)

* E-mail: jliu@siom.ac.cn

样品的位置传递给纳米平移台,通过纳米平移台的反馈调节使样品始终位于光片的束腰位置,以达到最好的成像质量。此外,可以通过调节 $4f$ 系统的放大倍率来改变 CCD 相机对于机械偏移的响应精度。

2 基本原理

2.1 计算样品的位置

在 LSFM 中,滤光片通常被放置在探测光路中以过滤除荧光之外的其他光信号^[15-16]。然而,在本实验中,利用激发光作为样品位置的参考。如图 1 所示,激发光片经盖玻片反射后入射到探测物镜中,随后反射光片经 $4f$ 系统放大后在 CCD 中成像。

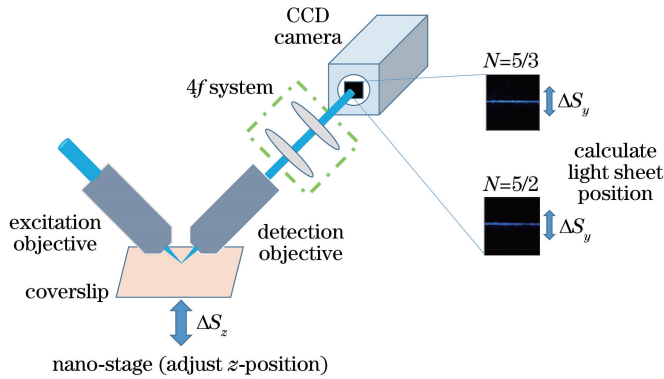


图 1 基于 $4f$ 系统和 CCD 相机的长时间成像稳定装置图

Fig. 1 Schematic of long time stabilization system with $4f$ optical setup and CCD camera

2.2 实验装置

图 2 是自主搭建的光片荧光显微镜装置图。M1~M5 是反射镜;L1~L10 是消色差透镜,其对应的焦距分别为 25, 50, 100, 150, 50, 75, 50, 100, 30, 50 mm。从 488 nm 固体激光器中出射的光束先经 L1 和 L2 扩束,再经 L3 和 L4 放大至直径约为

对反射光片进行强度分析得出反射光片在垂直方向的偏移量 ΔS_y ,则样品在 z 轴方向的偏移量为

$$\Delta S_z = \Delta S_y \frac{a}{\sqrt{2}MN}, \quad (1)$$

式中: a 为 CCD 相机的单个像素尺寸; M 为探测光路的放大倍数; N 为 $4f$ 系统的放大率。通过对反射光片进行强度分析得出,最小能被识别的偏移量为 1。当 $\Delta S_z = 1$ 时,所对应的即为最小能辨别的机械偏移量。根据(1)式,提升反馈系统对机械偏移监测精度的方式有三种:增大 M 、增大 N 以及减小 a 。考虑到经济效益和实现难易程度,选择增大 N 来实现目标最具可行性。图 1 右侧是 N 取不同数值时,CCD 相机中采集到的反射光片图像。

2.1 mm,随后射入柱透镜 CL(焦距 $f = 50$ mm)中生成光片。振镜 GM(GVS001, Thorlabs, 美国)被放置在柱透镜的焦平面上,并与激发物镜 OBJ1 (N40X-NIR, Nikon, 日本)的后焦面共轭,光片经 GM 反射后再经 L5 和 L6 射入激发物镜中,并在样品处生成 600 nm 厚的光片。探测物镜 OBJ2 (N40X-NIR, Nikon, 日本)安装在压电陶瓷 PZE (P-726.1CD, PI, 德国)上,被用来接收样品处的光信号,这些光信号经过套筒透镜 TL(焦距 $f = 200$ mm)后被长波通二向色镜 DM (DMLP505R, Thorlab, 美国)分成荧光信号和反射光片两部分,荧光信号经过 L7 和 L8 后在 sCMOS (scientific Complementary Metal-Oxide-Semiconductor) 相机 (C13440, Hamamatsu, 日本)中成像,反射光片则经由 L9 和 L10 后在 CCD 相机 (DCC1645C, Thorlabs, 美国)中成像。F0 是由 F9 和 F10 组成的 $4f$ 系统,实验中保持 L9 的位置不变,通过改变 L10 的焦距来调节 N 值。样品放置在纳米平移台 NS (MAX341M, Thorlabs, 美国)上,其坐标轴方位在

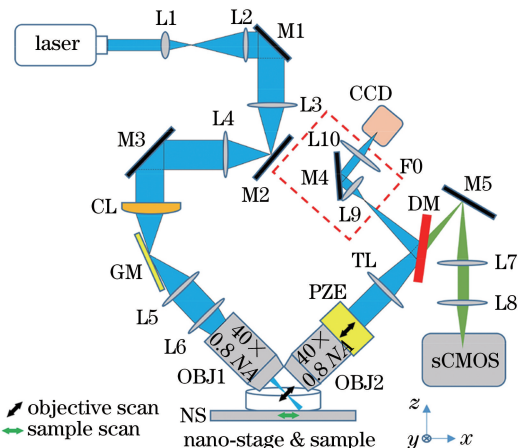


图 2 LSFM 的实验装置图

Fig. 2 Schematic of LSFM experimental setup

图的右下角。样品的 3D 图像可通过图中左下角所显示的物镜扫描模式或者样品扫描模式来实现。对于物镜扫描模式,通过控制 GM 和 PZE 进行同步扫描,从而实现 3D 图像采集,其中 GM 带动激发光片沿着轴向扫描,PZE 带动探测物镜沿着轴向同步扫描,各自的扫描方向在图中用黑色箭头标出;对于样品扫描模式,通过控制 NS 使样品沿着图中的箭头方向即可实现 3D 图像采集。

2.3 样品位置的修正

系统的控制信号如图 3 所示,最上方是触发信号,采取上升沿触发的方式;中间是相机的曝光控制信号;最下方是 GM 和 PZE/NS 的控制信号。假定

GM 从初始位置出发再回到初始位置的整个过程为一个完整的扫描周期,其中 GM 每次运动后所停留的时间称为一个子阶梯。一个共同的触发信号使相机、GM 和 PZE 同时开始运动,其中 GM 和 PZE 每个子阶梯长度与相机的一次曝光和数据读出的总长度保持一致。在相机每次读出数据的同时确认样品当前位置并调节纳米平移台,使样品处于光片束腰处,然后重复上述过程。实验中相机可设置的曝光时间为 1 ms 到 10 s,因此扫描周期中每个子阶梯的长度可根据曝光时间和读取时间以及反馈调节时间来确定。此外,也可以用纳米平移台 NS 代替 GM 和 PZE 来实现 3D 成像,其控制信号与 GM 和 PZE 保持一致。

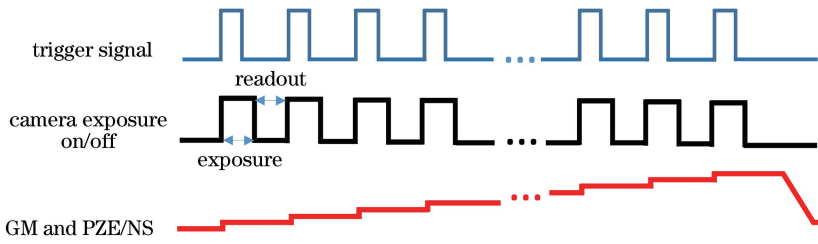


图 3 sCMOS 相机以及 GM 和 PZE/NS 的控制信号

Fig. 3 Control signal sequences for sCMOS camera as well as GM and PZE/NS

实验装置的反馈控制流程如图 4 所示。打开激光器并调节纳米平移台,使样品处于光片的束腰位置,此时样品成像最优。对于快速 3D 成像,子阶梯的长度很短,因此可忽略相机曝光过程中的机械漂移,将当前样品位置(光片束腰处)设置为整个子阶梯的参考。此外,为了保证每次采集的图像均最优,在相机读取数据前需将样品的位置调整好,这涉及到阈值的设定,一般情况下阈值可设置为 1 pixel,即 CCD 中反射光片的中心移动 1 pixel,大概对应 z 轴方向光片尺度的 $1/30 \sim 1/10$ 。同时还需根据实际

标定情况进行一定的修正,以便达到最佳的实验效果。同时,本实验中为了保证每次成像的最优化,每次 sCOMS 相机数据读出过程都会进行一次样品位置的调整,这样在一定程度上会降低图像采集效率。不过这一稳定系统主要用于长时间的机械偏移校正,短时间内认为偏移可接受,因此可以设定一个时间间隔后再进行反馈。比如,当设定每间隔 1 min 进行一次反馈时,40~100 ms 的反馈时间对于整个系统的采集速度的影响就已经小到可以忽略了。

3 实验结果

3.1 机械漂移及其补偿

本节将从反射光片的成像质量以及实验装置的标定情况两个角度对实验原理进行验证。首先,对 CCD 中的反射光片进行强度分析,绘制出强度分布的半峰全宽图 $\omega_{1/2}$ ^[17]。如图 5 所示,当 $N=1, 5/3, 5/2$ 时,半峰全宽分别为 10, 17, 26 pixel。这证实了调节 N 值,确实可以使反射光片按照特定的比例放大。不过随着 N 值越来越大,成像质量也随之变差。因此 N 值并非越大越好,而应该根据反射光片成像质量和纳米平移台的位移精度来选择。横坐标的差异是相机安装导致的,对成像质量和半峰全宽没有影响。

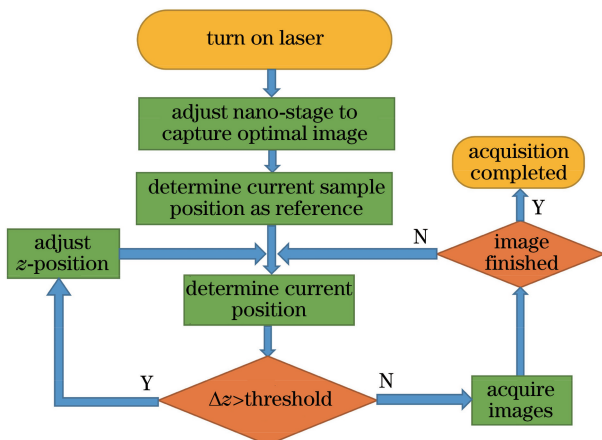


图 4 反馈控制下的成像流程图

Fig. 4 Flow chart for imaging under feedback control

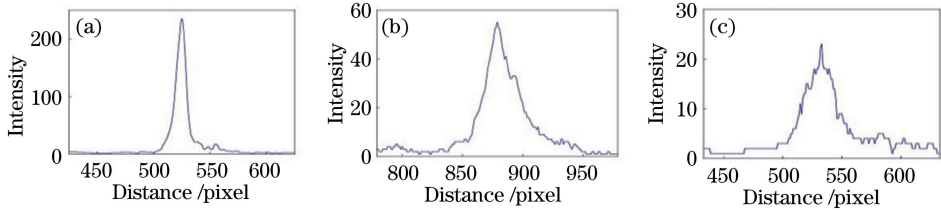


图 5 CCD 相机中光片的半峰全宽。(a) $N=1$; (b) $N=5/2$; (c) $N=5/3$

Fig. 5 Full width at half maximum of light sheet in CCD camera. (a) $N=1$; (b) $N=5/2$; (c) $N=5/3$

控制纳米平移台 z 轴以 25 nm 的步长进行移动,并同步对 CCD 中的反射光片进行强度分布分析。如图 6 所示,“up”表示纳米平移台向上移动,“down”表示纳米平移台向下移动,6 组实验在尽量短的时间里完成,以减小无关因素的影响。由图 6 可知,当 $N=1, 5/3, 5/2$ 时,CCD 中反射光片的偏移总体上分别以 $3/5, 1, 3/2$ 的斜率远离初始位置,即当 $N=1, 5/3, 5/2$ 时,CCD 中反射光片 1 pixel 的偏移分别对应 z 轴 42, 25, 17 nm 的偏移。对 CCD 中的反射光片进行偏移量分析时,由于偏移量只能是整数个像素,同时纳米平移台移动时也有误差,实验结果和理论值有些差异,但是这些差异不会对实验造成不可忽视的影响。综上,选择 N 值时,需综合考虑反射光片的成像质量、纳米平移台的精度以及光片的尺寸三个方面的因素。在本实验中,取 $N=5/3$ 。

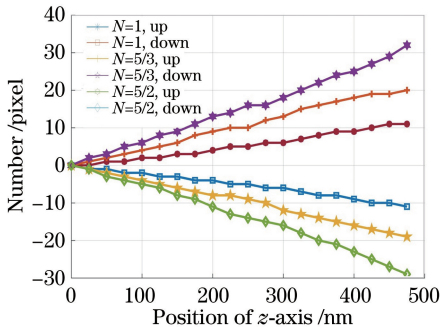


图 6 以 25 nm 步长移动时 CCD 中反射光片的移动情况

Fig. 6 Movement of light sheet in CCD camera under step size of 25 nm

前文中已经证实了实验原理的可靠性,这里将利用该原理对实验装置的机械偏移情况进行测试。在室温 26 °C 的条件下,每间隔 3 min 采集一次 CCD 相机中反射光片图像,总共采集 783 min。根据实验装置图,可知 x 轴和 y 轴方向的机械偏移原理上不会改变光片的反射表面,所以 CCD 相机中采集的偏移信息只是整个系统机械偏移在 z 轴方向上的分量,不过后续实验会证实 z 轴方向分量占比

很大,只对其进行反馈就已经可以满足成像的质量要求。如图 7 所示, x 轴表示时间, y 轴表示偏移量。为了增强对比性,实验分无反馈下的机械偏移情况(I: 0~100 min, II: 220~340 min, III: 460~580 min, IV: 700~783 min)和有反馈下的机械漂移情况(①: 100~220 min, ②: 340~460 min, ③: 580~700 min)。对于无反馈的情况,在最初的 100 min 出现约 3.3 μm 的偏移量,已经远远大于光片在 z 轴方向的尺度(800 nm),虽然机械偏移在 III、V 和 VII 三个阶段有所减小,但依然很可观;而对于有反馈的情况, z 轴方向的偏移被很好地补偿。因此,实验中的反馈是一种必需且有效的补偿机械偏移的方法。

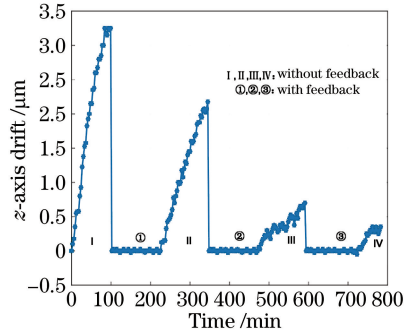


图 7 不同情况下样品在 z 轴方向的机械漂移量

Fig. 7 Mechanical drifts in z axis of sample under different conditions

3.2 荧光微球成像的补偿效果

这里将通过 1.06 μm 荧光微球的长时间成像来验证实验方法在成像进程中的效果。测量时间过长时,图像会脱离视野,因此选择对微球成像 2.5 h。实验在 26 °C 下进行,荧光波长为 595 nm,先在无反馈情况下测量 2.5 h,复原实验条件,再在有反馈的情况下测量 2.5 h,通过对比成像质量来验证实验方法的可靠性。为了使实验现象便于理解,先分析机械偏移对荧光微球的影响效果。如图 8 所示,FM 是荧光微球, x, y 和 z 是纳米平移台坐标轴方向,假设所有的机械偏移均被投影在这三个方向上。可

以发现 z 轴和 x 轴垂直于成像平面的分量 z_v 和 x_v 会迫使荧光微球沿垂直于成像平面方向移动,同时沿成像平面的分量 z_p 会迫使荧光微球沿成像平面的竖直方向移动,而 y 轴方向的偏移会使荧光微球沿着成像平面的水平方向移动。

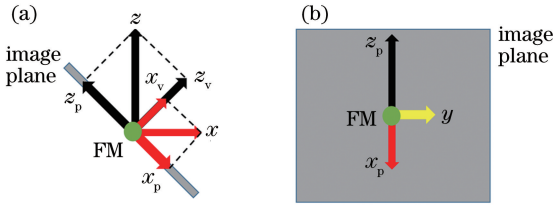


图 8 机械漂移对成像的影响。(a)机械漂移在垂直于成像平面方向的作用效果;(b)机械漂移在平面内的作用效果

Fig. 8 Effect of mechanical drift on imaging. (a) Effect of mechanical drift in direction perpendicular to imaging plane; (b) effect of mechanical drift in plane

图 9(a)~(d)是没有反馈下的荧光微球成像图,图 9(e)~(h)是有反馈下的成像图,图中方框是边长为 200 pixel 的正方形区域。从成像质量上来看,在没有反馈的情况下,荧光微球图像会随着时间的推移逐渐模糊,并且背景噪声也有所增大。0 h 时,在成像平面上可以清晰地观察到 3 个荧光微球;1 h 后,最下方的荧光微球变得模糊不清;2 h 后,下方的 2 个荧光微球均变得模糊不清;2.5 h 后,3 个荧光微球均变得模糊不清。在有反馈的情况下,虽然背景噪声会随着时间的推移出现一定的增加,但是在成像平面上始终能观察到 3 个清晰的荧光微球图像。从图像偏移上来看,当没有反馈时,随着时间的推移荧光微球在竖直方向移动了约 60 pixel,由 sCMOS 相机的像素尺寸以及探测光路的放大率可知偏移约为 $3.5 \mu\text{m}$,几乎与图 7 中的偏移保持一

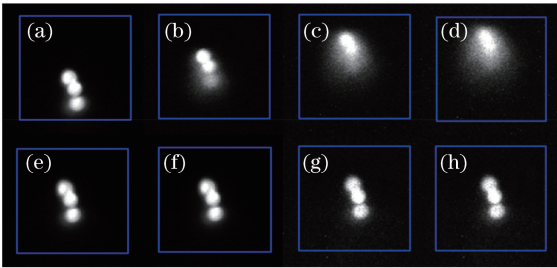


图 9 不同条件下的荧光微球成像效果图。

(a)~(d)没有反馈;(e)~(h)有反馈

Fig. 9 Imaging effects of fluorescent microspheres under different conditions. (a)-(d) Without feedback; (e)-(h) with feedback

致,同时在水平方向也只有几个像素的波动,这证实了只补偿 z 轴方向的偏移确实可行。当有反馈时,3 个微球图像始终清晰地处于视野的中心,最多也只有几个像素的漂移。因此,该实验方法是成像系统一个很好的补充,并为长时间采集下的成像质量提供可靠的保障。

4 结 论

由于实验中的机械偏移难以避免,长时间成像下的系统稳定性至关重要,尤其是对于超高分辨率的成像系统。如果没有反馈,成像质量会被持续恶化。本实验中,提出了一种利用 $4f$ 系统和 CCD 相机来监测样品位置并利用纳米平移台来补偿机械偏移的方法,同时分别从原理验证和成像效果两个角度证实了所提方法的可靠性。通过一个简单的 $4f$ 系统,可以对几个纳米的机械偏移进行监测并补偿,进而使成像质量始终最优。但是,由于该方法只能补偿 z 轴方向的机械漂移,虽然成像质量得到了很好的保证,但是成像的背景噪声会有轻微的增强。今后将同时从 x 、 y 和 z 三个方向来进行补偿,以消除背景噪声的影响。

参 考 文 献

- [1] Tokunaga M, Imamoto N, Sakata-Sogawa K. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells[J]. Nature Methods, 2008, 5(2): 159-161.
- [2] Tomer R, Khairy K, Keller P J. Light sheet microscopy in cell biology[M]//Tomer R, Khairy K, Keller P J. eds. Methods in molecular biology. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2012: 123-137.
- [3] Zickus V, Taylor J M. 3D+time blood flow mapping using SPIM-microPIV in the developing zebrafish heart[J]. Biomedical Optics Express, 2018, 9(5): 2418-2435.
- [4] Schmid B, Shah G, Scherf N, et al. High-speed panoramic light-sheet microscopy reveals global endodermal cell dynamics[J]. Nature Communications, 2013, 4: 2207.
- [5] Haslehurst P, Yang Z Y, Dholakia K, et al. Fast volume-scanning light sheet microscopy reveals transient neuronal events[J]. Biomedical Optics Express, 2018, 9(5): 2154-2167.
- [6] Keller P J, Ahrens M B, Freeman J. Light-sheet imaging for systems neuroscience[J]. Nature Methods, 2015, 12(1): 27-29.

- [7] Wu Y C, Kumar A, Smith C, *et al.* Reflective imaging improves spatiotemporal resolution and collection efficiency in light sheet microscopy[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 1452.
- [8] Hedde P N, Gratton E. Active focus stabilization for upright selective plane illumination microscopy [J]. *Optics Express*, 2015, 23(11): 14707-14714.
- [9] An K, Wang J, Liang D, *et al.* Improving lateral resolution of light sheet fluorescence microscopy with SOFI method[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2017, 44(6): 0607002.
安坤, 王晶, 梁东, 等. 利用 SOFI 方法提高光片荧光显微镜横向分辨率[J]. *中国激光*, 2017, 44(6): 0607002.
- [10] Gao L, Shao L, Chen B C, *et al.* 3D live fluorescence imaging of cellular dynamics using Bessel beam plane illumination microscopy[J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(5): 1083-1101.
- [11] Olarte O E, Andilla J, Gualda E J, *et al.* Light-sheet microscopy: a tutorial[J]. *Advances in Optics and Photonics*, 2018, 10(1): 111-179.
- [12] Yang Y L, Zong W J, Wu R L, *et al.* Light-sheet fluorescence microscopy[J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(3): 0318007.
杨豫龙, 宗伟建, 吴润龙, 等. 光片荧光显微成像[J]. *光学学报*, 2017, 37(3): 0318007.
- [13] Planchon T A, Gao L, Milkie D E, *et al.* Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(5): 417-423.
- [14] Power R M, Huisken J. A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging [J]. *Nature Methods*, 2017, 14(4): 360-373.
- [15] Reynaud E G, Peychl J, Huisken J, *et al.* Guide to light-sheet microscopy for adventurous biologists[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(1): 30-34.
- [16] Fahrbach F O, Voigt F F, Schmid B, *et al.* Rapid 3D light-sheet microscopy with a tunable lens [J]. *Optics Express*, 2013, 21(18): 21010-21026.
- [17] Yoshida A, Kaburagi Y, Hishiyama Y. Full width at half maximum intensity of G band in first order Raman spectrum of carbon material as a parameter for graphitization-a study with pyrolytic carbons[J]. *Tanso*, 2006, 2006(221): 2-7.