

双光子亚衍射多焦点结构光照明显微研究

权小娟, 张晨爽, 林丹樱, 于斌*, 屈军乐

深圳大学物理与光电工程学院, 深圳市光子学与生物光子学重点实验室, 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 为进一步提高双光子多焦点结构光照明显微技术(2P-MSIM)的空间分辨率,笔者提出并发展了一种双光子亚衍射多焦点结构光照明显微成像方法(2P-sMSIM)。首先,通过改进的 Gerchberg-Saxton(GS)相位恢复算法设计亚衍射聚焦点阵,生成相位图,利用高速相位型空间光调制器产生亚衍射聚焦点阵。通过计算机模拟的仿真实验,探究算法的可行性,并通过对荧光染料溶液的激发成像,证明了每个亚衍射聚焦点阵的平均尺寸为正常衍射受限点阵聚焦点阵尺寸的 80%。其次,将该点阵引入 2P-MSIM 系统,对固定在 BS-C-1 细胞内的微管和商用线粒体切片分别进行了超分辨成像实验,证明了在亚衍射聚焦点阵激发下,2P-MSIM 的分辨率和成像质量得到了进一步提高,这对于 2P-MSIM 的发展具有重要意义。

关键词 生物光学; 多焦点结构光照明显微; 亚衍射聚焦点阵; 空间光调制器; 相位恢复

中图分类号 TH742

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL230480

1 引言

近年来,受激辐射损耗(STED)^[1]、单分子定位显微(SMLM)^[2-3]、结构光照明显微(SIM)^[4]等超分辨荧光显微(SRFM)技术蓬勃发展,达到了纳米量级空间分辨率,有力地促进了生命科学等诸多领域的发展。虽然 STED 可以对较厚的生物样品完成高空间分辨成像,但其无法摆脱特定荧光标记探针的限制,而且其所需的高能量损耗光也对样品产生了光漂白和光损伤。因此,STED 技术的进一步应用受到限制。SMLM 的空间分辨率虽然很高,但其成像深度不大且成像速度不快,因为 SMLM 不仅需要特殊的荧光标记,还受宽场激发方式和荧光探针稀疏激发的影响。虽然宽场 SIM 的空间分辨相比衍射极限分辨率来说只能提高 2 倍左右,但其具有成像速度快、光毒性小、无须特殊荧光标记等优势,在活细胞超分辨成像中获得了广泛应用。然而,受宽场激发的影响,宽场 SIM 的成像深度一般在十几微米左右。为了进一步提升宽场 SIM 的成像深度,最近几年发展起来了一种新型点扫描结构光照明超分辨显微镜——图像扫描显微镜(ISM)^[5]。与共聚焦显微镜相比,ISM 不仅用阵列探测器代替了传统共聚焦显微镜中的点探测器,还结合像素重定位和解卷积图像重构等算法,将空间分辨率提高了近一倍,达到横向 120 nm、轴向 350 nm 左右的空间分辨率,

同时将成像对比度提高了 4 倍以上。ISM 主要基于点扫描成像,很好地兼容了单光子激发与双光子激发,在深层超分辨成像方面更具发展前景。在单点扫描 ISM 成像的基础上,多焦点结构光照明显微技术(MSIM)^[6]采用多点并行激发的方式,大大提高了成像速度。双光子多焦点结构光照明显微技术(2P-MSIM)在 MSIM 的基础上采用长的激发波长^[7]和双光子激发,成像深度最高可达 50 μm 以上。同时,将 2P-MSIM 与自适应光学、深度学习相结合^[8-10],可以进一步提高成像性能。基于 ISM 的成像原理,2P-MSIM 成像分辨率主要受系统激发点扩散函数和发射点扩散函数的影响。因此,如果利用光场调控技术将系统激发点扩散函数的尺度进一步缩小,即采用亚衍射聚焦点阵(SSA)结构光照明,那么 2P-MSIM 的成像分辨率可进一步提高。

目前,研究人员主要利用衍射光学元件(DOE)来产生亚衍射聚焦点阵。DOE 的设计方法主要包括基于线性规划的设计方法^[11-12]、多光束干涉法^[13-14]、基于 Gerchberg-Saxton(GS)相位恢复的迭代优化算法^[15-17]以及各种利用光学超振荡^[18-23]的方法。其中,光学超振荡是指将空间频率较低的光场相干叠加,在空间形成远大于光场最高空间频率的局域快速振荡的光场,并在局域空间形成最小特征尺寸小于光学衍射极限的光场分布,在非标记超分辨成像领域具有巨大的优势和应用潜力。光瞳滤波技术是光学超振荡器件设计的

收稿日期: 2023-02-01; 修回日期: 2023-03-12; 录用日期: 2023-03-22; 网络首发日期: 2023-04-05

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFF0712500, 2022YFF0706001)、国家自然科学基金(61975131, 62175166, 62235007, 62275165)、深圳市科技计划(JCYJ20200109105411133, ZDSYS20210623092006020)

通信作者: *yubin@szu.edu.cn

主要方法之一,通过调控光学系统光瞳透过率函数中不同透光环带的位置、相位及振幅,可以产生亚衍射极限的聚焦光斑,缩小系统点扩散函数的尺寸,从而实现超分辨成像^[24-26]。

为了进一步提高 2P-MSIM 的分辨率,笔者提出了基于光瞳滤波技术的改进 GS 相位恢复亚衍射聚焦点阵设计方法,通过在点阵面上限定每个聚焦光斑的位置、大小和相位分布,同时通过迭代优化,得到了亚衍射聚焦点阵的相位图。计算机仿真和点阵成像实验证明了设计方法的可行性和有效性。在此基础上,将设计的亚衍射聚焦点阵相位图应用到实验室现有的 2P-MSIM 系统中,使用 BS-C-1 细胞微管和商用线粒体切片 (MitoTracker Red™) 进行了双光子超分辨成像实验,实现了系统分辨率的有效提升,证实了通过双光子亚衍射聚焦点阵激发可以进一步提高 2P-MSIM 的空间分辨率,对于大深度超分辨显微成像技术的发展具有重要意义。

2 亚衍射聚焦点阵产生原理

利用相位型 DOE 可以使单色相干光束在透镜的频谱面上获得任意的结构光场分布,这涉及光学逆问题的求解。通常利用迭代法来设计这类 DOE,其中基于 GS 相位恢复的迭代算法应用得最为广泛。笔者利用改进的 GS 算法设计产生亚衍射聚焦点阵的 DOE。

图 1 为使用 DOE 的光学系统示意图。DOE 位于

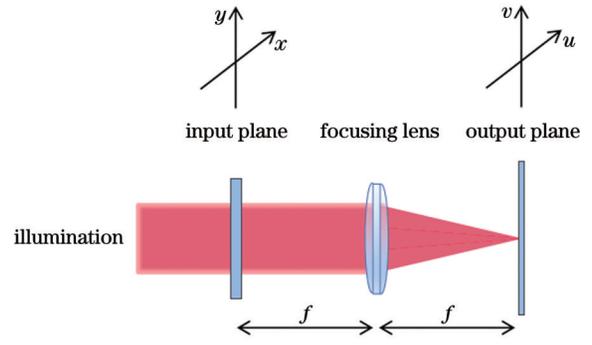


图 1 使用 DOE 的光学系统的示意图

Fig. 1 Schematic of an optical system using a DOE

聚焦透镜的前焦平面(输入平面),亚衍射聚焦点阵面(输出平面)位于聚焦透镜的后焦平面,即在单色平面波垂直照明下,输出平面的复振幅与输入平面的复振幅之间服从傅里叶变换关系。因此,输出平面上的光强分布为

$$I(u, v) \propto \left| \iint t(x, y) \exp \left[-\frac{i2\pi}{\lambda f} (ux + vy) \right] dx dy \right|^2, \quad (1)$$

式中: i 为虚数单位; $t(x, y)$ 为 DOE 的透过率函数分布; f 为焦距; λ 为波长。

在采用均匀单色平面波垂直照明以及亚衍射聚焦点阵的强度分布已知的条件下,通过改进的 GS 算法可以恢复输入平面的相位分布,即 DOE 的相位分布。GS 算法及改进的 GS 算法的流程图如图 2 所示。

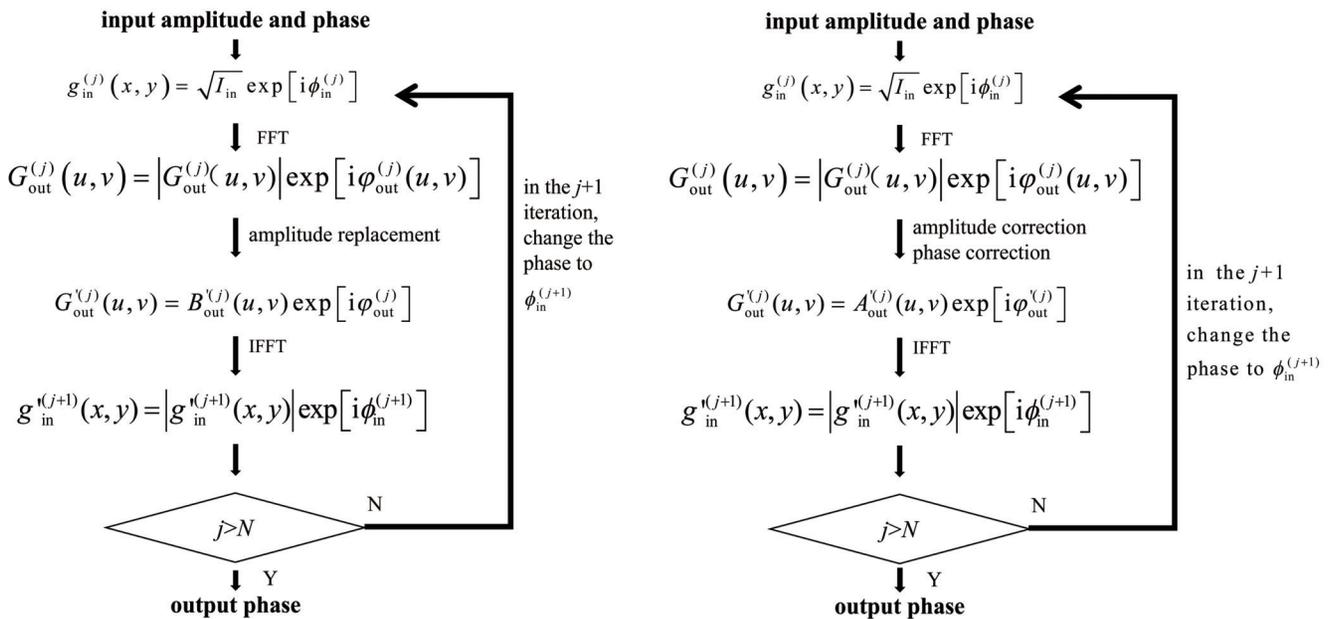


图 2 GS 算法(左)和改进的 GS 算法的流程图(右)

Fig. 2 Flow charts of GS algorithm (left) and improved GS algorithm (right)

以第 j 次迭代为例,算法的具体步骤如下:

1) 假定输入光场的初始相位分布是随机的,经 j 次迭代后的输入光场的复振幅分布 $g_{in}^{(j)}(x, y)$ 可以表示为

$$g_{in}^{(j)}(x, y) = \sqrt{I_{in}} \exp[i\phi_{in}^{(j)}], \quad (2)$$

式中: $I_{in}(x, y)$ 为输入平面上光场的强度分布,其值通常是在以光场强度分布的中心为圆心、以激光光斑半径为半径的圆形区域内赋 1,其余区域赋 0; $\phi_{in}^{(j)}(x, y)$ 为相位分布。

2) $g_{in}^{(j)}(x, y)$ 经过傅里叶变换后获得其频谱分布 $G_{out}^{(j)}(u, v)$, 即输出平面的复振幅分布为

$$G_{out}^{(j)}(u, v) = |G_{out}^{(j)}(u, v)| \exp[i\varphi_{out}^{(j)}(u, v)] = \mathcal{F} [g_{in}^{(j)}(x, y)]. \quad (3)$$

3) GS 算法是用目标振幅 $B_{out}^{(j)}(u, v)$ 替换原来的振幅, 而改进的 GS 算法则是在输出平面即频谱面上引入目标振幅限制和相位限制, 获得修正后的频谱 $G_{out}^{(j)}(u, v)$ 为

$$G_{out}^{(j)}(u, v) = A_{out}^{(j)}(u, v) \exp[i\varphi_{out}^{(j)}(u, v)]. \quad (4)$$

4) 第 $j+1$ 次迭代的输入光场相位由修正后的频谱 $G_{out}^{(j)}(u, v)$ 经过傅里叶逆变换后得到, 即

$$\phi_{in}^{(j+1)}(x, y) = \arg[\mathcal{F}^{-1}(G_{out}^{(j)})]. \quad (5)$$

5) 引入输入平面上的振幅约束, 则第 $j+1$ 次迭代的输入光场复振幅分布 $g_{in}^{(j+1)}(x, y)$ 为

$$g_{in}^{(j+1)}(x, y) = \sqrt{I_{in}} \exp[i\phi_{in}^{(j+1)}(x, y)]. \quad (6)$$

迭代到一定次数后, 判断迭代次数是否大于设置的数值 N (GS 算法一般迭代 30 次左右就可以收敛, 而改进的 GS 算法为了输出相位稳定取 $N=50$), 如果大于, 则输出相位, 否则再进入迭代程序, 直到大于该数值为止。

算法中采用修正的 $G_{out}^{(j)}(u, v)$ 是本算法 (改进的 GS 算法) 得到亚衍射聚焦点阵的关键, 不仅要输出面光场的振幅进行限制, 还要对输出面光场的相位进行限制。以 3×3 亚衍射聚焦点阵生成为例, 如图 3 所

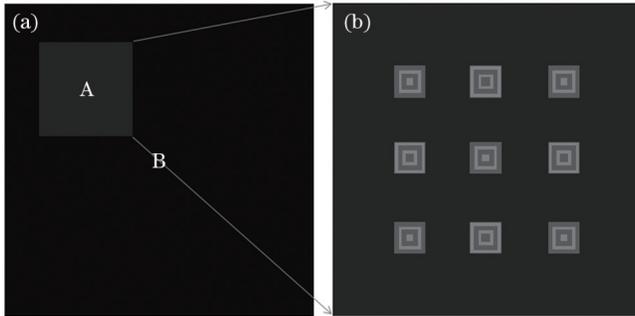


图 3 输出平面的振幅约束示意图, 其中输出平面的 A 区域分成 9 个大正方形区域和其他区域 [振幅执行操作 (I)], 而正方形区域又由小正方形区域 [振幅执行操作 (II)] 以及由小到大的正方形框 1、正方形框 2、正方形框 3 [振幅执行操作 (III)] 组成。(a) 输出平面的振幅分布; (b) 区域 A 的放大图;

Fig. 3 Schematic of amplitude constraint of the output plane, where the region A of the output plane is divided into 9 large square regions and other regions [amplitude operation (I)] and the large square region consists of small square region [amplitude operation (II)] and square box 1, square box 2 and square box 3 [amplitude operation (III)] from small to large. (a) Amplitude of the output plane; (b) magnified image of the region A in Fig. 3(a)

示, 具体修正原理如下: 将输出平面分成亚衍射聚焦点阵所在的区域 A 和非亚衍射聚焦点阵所在区域 B, 如图 3(a) 所示。为了避免零级光的影响以及对相位进行限制, 将区域 A 的位置选择在第一象限靠近中心的地方, 而区域 B 则不做特殊处理, 以便区域 A 的所有处理可以顺利进行。图 3(b) 是图 3(a) 中区域 A 放大后的图, 区域 A 由 9 个大的正方形区域和剩下的非正方形区域组成, 每个大正方形区域又由 4 个同心正方形组成, 将这些区域的振幅和相位分开进行约束, 才可以得到需要的亚衍射聚焦点阵。

为了保证每个聚焦点相邻区域的复振幅干涉相消, 将相邻区域光场的相位设置为相差 π , 如图 3(b) 所示。具体如下: 每个大正方形区域中颜色相同的 (不相邻区域) 相位相同, 颜色不同的 (相邻区域) 相位相差 π 。根据光场的衍射理论, 这样的设计方法可以达到缩小聚焦点尺度的目的。

区域 A 的振幅约束如下:

非正方形区域的振幅执行操作 (I), 即

$$A_{out}^{(j)} = 0; \quad (7)$$

小正方形区域的振幅执行操作 (II), 即

$$A_{out}^{(j)} = \sqrt{I_s}, \quad (8)$$

其中 $\sqrt{I_s}$ 是归一化强度; 由小到大的正方形框 1、正方形框 2、正方形框 3 的振幅分别执行操作 (III), 即

$$A_{out}^{(j)} = e_1 \sqrt{I_s}, \quad (9)$$

$$A_{out}^{(j)} = e_1 e_2 \sqrt{I_s}, \quad (10)$$

$$A_{out}^{(j)} = e_1 e_2 e_3 \sqrt{I_s}. \quad (11)$$

引入的参数 e_1 、 e_2 和 e_3 都是小于 1 的常数, 如此可使小正方形和外面正方形框的振幅的大小是递减的, 从而在得到亚衍射聚焦点阵的同时提高背景光和中心光束的对比度。

3 仿真结果与分析

为了验证所提算法的有效性, 首先进行了计算机仿真实验。根据实验室现有的 2P-MSIM 系统, DOE 及系统参数设置如下: 照明光波长 λ 为 1036 nm, 聚焦透镜焦距 f 为 10/3 mm, DOE 的尺寸 D 为 8.46 mm \times 8.46 mm, 像素数为 920 \times 920, 像素尺寸为 9.20 μm \times 9.20 μm 。为了得到有关亚衍射聚焦点更多的强度分布细节, 在设计时对输入面和输出面进行扩充, DOE 的像素数扩充到原来的 10 倍, 即 9200 \times 9200, 除了中心 DOE 部分, 其他区域的振幅用零填充。由输出面与输入面之间的傅里叶变换关系可知输出平面的采样间隔为 $\lambda f / (10D)$, 即 40.80 nm \times 40.80 nm。经过优化, 最后将小正方形的边长和外面正方形的边长依次设置为 10、20、30、40 pixel, 迭代 50 次, e_1 、 e_2 、 e_3 的值分别为 0.50、0.20、0.20。在这种情况下, 旁瓣强度在中心强度的 1/10 左右, 可以通过后续的图像处理算法消除旁瓣

的影响。

对 3×3 的亚衍射聚焦点阵与正常衍射受限点阵进行仿真, 仿真结果如图 4 所示。图 4(a)、(b) 分别是正常衍射受限点阵和亚衍射聚焦点阵的强度分布图; 图 4(c) 是图 4(a)、(b) 上过中心点的虚线所在位置处强度分布的拟合归一化轮廓曲线, 实线代表正常衍射

受限点, 虚线代表亚衍射聚焦点; 图 4(d) 是图 4(a)、(b) 上过三点的虚线所在位置处强度分布的拟合归一化轮廓曲线, 实线代表正常衍射受限点, 虚线代表亚衍射聚焦点。对比可知, 亚衍射聚焦点比正常衍射受限点的尺寸更小, 强度也更均匀, 旁瓣强度为中心强度的 $1/10$ 左右。

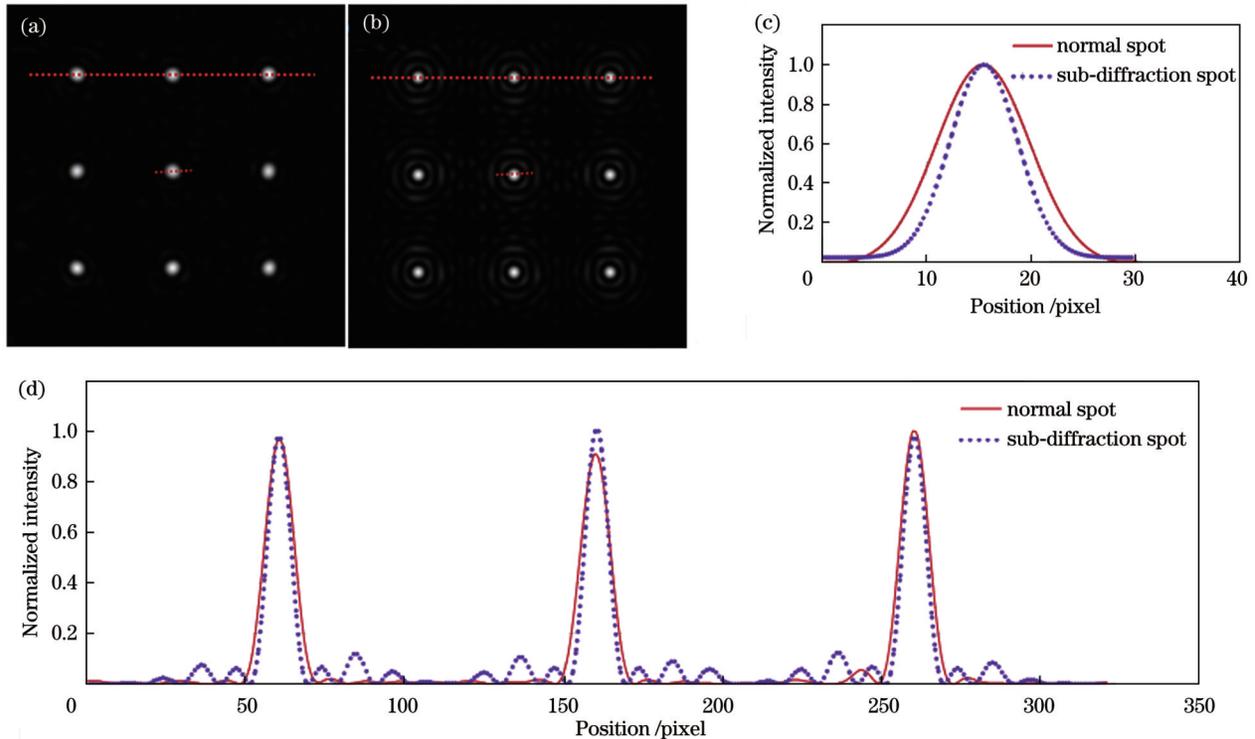


图 4 正常衍射受限点阵和亚衍射聚焦点阵的仿真结果。(a)(b)正常衍射受限点阵和亚衍射聚焦点阵的强度分布图;(c)过正常衍射受限点阵和亚衍射聚焦点阵中心单点的虚线所在位置处强度分布的拟合归一化轮廓曲线;(d)过三点的虚线所在位置处强度分布的拟合归一化轮廓曲线

Fig. 4 Results of simulation analysis of normal diffraction limited spot array and sub-diffraction spot array (SSA). (a)(b) Intensity distributions of normal diffraction limited spot arrays and SSA; (c) fitted normalized intensity profiles along the dashed line across a single spot in the central of the normal diffraction limited spot arrays and the SSA; (d) fitted normalized intensity profiles along the dashed line across the three points

对图 4 中单点的尺寸进行进一步统计分析。正常衍射受限点阵中单个聚焦点的半峰全宽(FWHM)平均值约为 10.60 pixel, 亚衍射聚焦点阵中单个聚焦点的 FWHM 平均值约为 7.64 pixel。因此, 亚衍射聚焦点阵的大小为正常衍射受限点大小的 72%, 达到了设计目的, 验证了所提算法的可行性和效果。

4 实验结果与分析

为了验证所设计的亚衍射聚焦点阵的性能, 基于实验室现有的 2P-MSIM 系统^[27] (系统光路如图 5 所示), 开展了双光子亚衍射多焦点结构光照明显微成像 (2P-sMSIM) 实验。2P-sMSIM 系统使用的光源是一台波长为 1036 nm、功率为 1 W、脉宽为 145 fs 的光纤激光器 (FemotoYL-6)。激光从光纤激光器输出后, 先通过一个用来调节激光出射功率的半波片 (Thorlabs, AHWP05M-980), 接着通过一个偏振分光棱镜对获

得 P 偏振光, 再依次通过可以调节偏振方向的半波片 (Thorlabs, AHWP05M-980), 之后进入一对焦距分别为 25 mm (Thorlabs, AC127-025-B-ML) 和 80 mm (Thorlabs, AC254-080-B-ML) 的透镜进行扩束, 扩束后照射在一个高速相位型空间光调制器 (SLM, 像元数为 1920×1152 , 像素尺寸为 $9.20 \mu\text{m} \times 9.20 \mu\text{m}$) 上, 在 SLM 上加载亚衍射点阵和相位光栅的合成相位图, 从而在其傅里叶面上实现扫描成像, 并且扫描的视场大小可以自由调控。激光被 SLM 调制后, 通过一个焦距为 300 mm 的透镜 (Thorlabs, AC508-300-B), 接着通过一个可以滤除零级光和其他高级衍射光而只保留一级衍射光的可调光阑, 打在尼康显微镜 (Nikon ECLIPSE Ti-U) 的管镜上。为了使 SLM 的光学面与物镜后孔径面的大小尽可能匹配, 将原来的管镜替换成焦距为 300 mm、孔径尺寸为 2 inch (1 inch = 2.54 cm) 的透镜 (Thorlabs, A508-300-AB-ML), 此透镜与前面

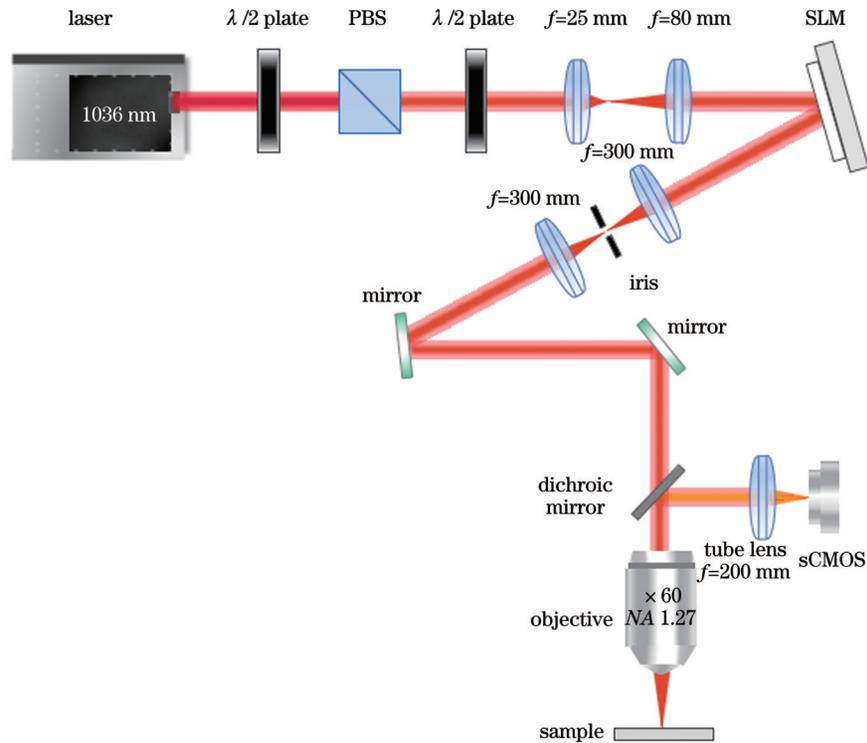


图 5 2P-sMSIM 成像光路示意图
Fig. 5 Schematic of 2P-sMSIM system

的透镜一起构成无扩束的 $4f$ 系统。激光离开管镜后进入水浸物镜 (Nikon, $60\times$, $NA=1.27$), 然后在样品面上形成亚衍射聚焦点阵激发样品, 产生的荧光信号依次通过物镜、二向色镜和成像管镜后, 在 sCMOS 相机 (滨松, ORCA-Flash4.0v3) 上成像。

基于 MSIM 的图像重构原理^[7], 实验获得的原始双光子亚衍射聚焦点阵激发的序列荧光点阵图像通过像素重定位处理 (数字高斯针孔滤波、图像缩放、求和) 和 Richardson-Lucy (RL) 反卷积重构后, 可得到 2P-sMSIM 超分辨图像。

4.1 点阵成像

将上述设计的相位图加载到 SLM 上, 并用正常衍射受限点阵 2P-sMSIM 系统产生的亚衍射聚焦点阵激发均匀的伊红溶液, 得到 3×3 正常衍射受限点阵和亚衍射聚焦点阵, 如图 6 所示。图 6(a) 是正常衍射受限点阵的图像; 图 6(b) 是亚衍射聚焦点阵的图像; 图 6(c) 是图 6(a)、(b) 上过中心点的红虚线所在位置的强度分布的拟合归一化轮廓曲线, 实线代表正常衍射受限点阵中的点, 虚线代表亚衍射聚焦点阵中的点。

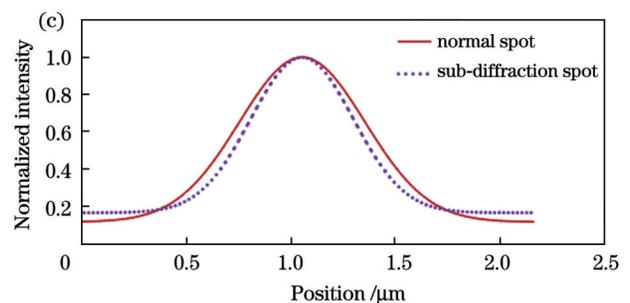
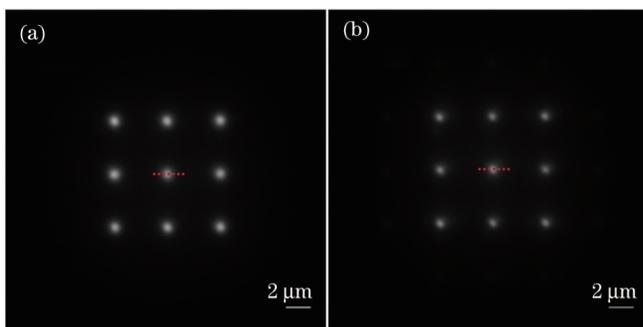


图 6 正常衍射受限点阵和亚衍射聚焦点阵成像实验结果。(a)(b) 正常衍射受限点阵和亚衍射聚焦点阵的像; (c) 虚线位置处的强度轮廓图

Fig. 6 Imaging results of normal diffraction limited spot array and SSA. (a)(b) Images of normal diffraction limited spot array and SSA; (c) intensity profiles along the dotted lines in Fig. 6(a) and Fig. 6(b)

为了定量比较亚衍射聚焦点阵和正常衍射受限点阵, 统计分析了 9 个亚衍射聚焦点阵和对应的正常衍射受限点阵中单个点的尺寸。如图 6(c) 所示, 正常衍射

受限点阵中单个点的平均 FWHM 为 $(0.71\pm 0.07)\ \mu\text{m}$, 而亚衍射聚焦点阵中单个点的平均 FWHM 为 $(0.57\pm 0.07)\ \mu\text{m}$, 后者约为前者的 80%。虽然亚衍射聚焦点

阵存在一定的旁瓣,但旁瓣的影响与中心强度相比可以忽略不计。

综上所述,亚衍射聚焦点阵照明可以有效减小系统点扩散函数的大小,从而进一步提高 2P-MSIM 系统的分辨率。

4.2 BS-C-1 细胞微管成像

为测试 2P-sMSIM 的空间分辨率,使用 InP/

ZnSe/ZnS 量子点(发射波长为 620 nm)标记的 BS-C-1 细胞微管作为样品进行成像实验。由于所选微管的尺寸远小于该成像系统的理论分辨率,所以对实验结果进行分析时未考虑微管直径对测量结果的影响。样品的宽场图像通过叠加原始点阵图像序列获得。通过高斯数字针孔去噪、像素重定位、RL 去卷积等后续图像处理获得的 2P-sMSIM 图像结果如图 7 所示。

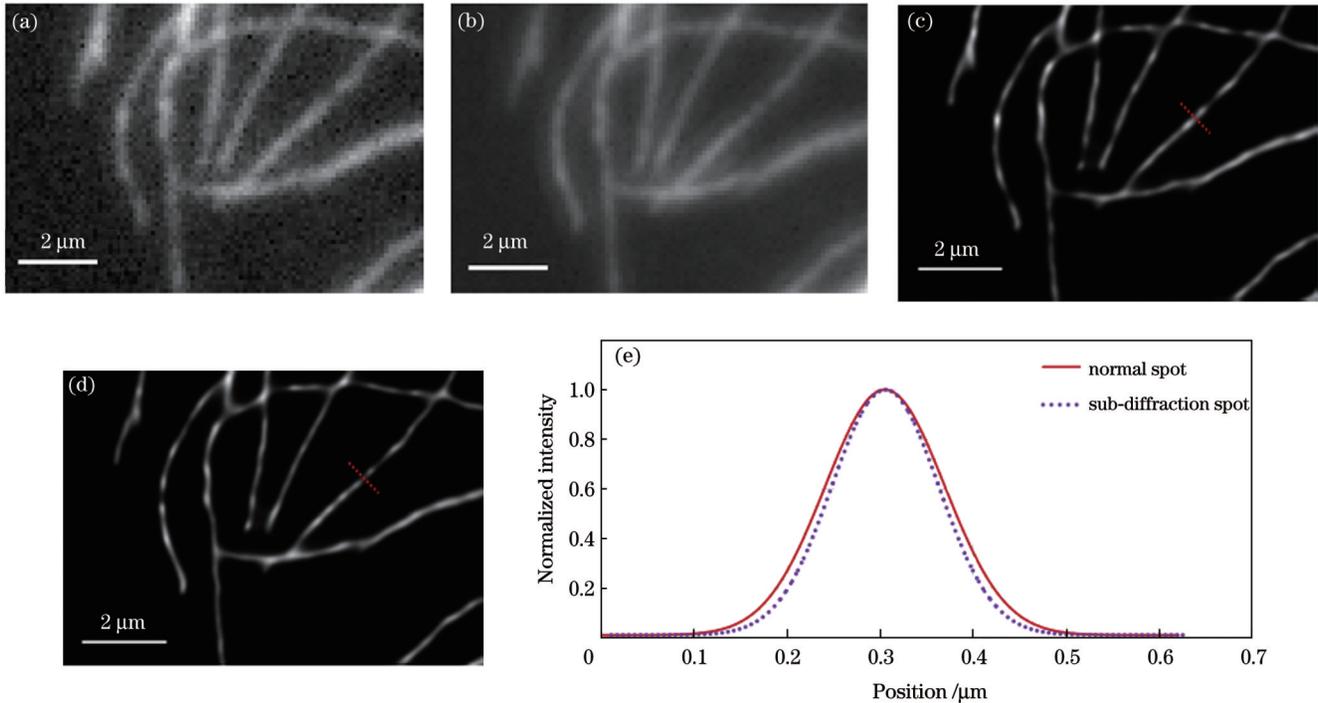


图 7 BS-C-1 细胞中微管的 2P-sMSIM 成像。(a)正常衍射受限点阵激发下的宽场图像(通过叠加所有的点阵图获得);(b)亚衍射聚焦点阵激发下的宽场图像(通过叠加所有的点阵图获得);(c)2P-MSIM 成像结果;(d)2P-sMSIM 成像结果;(e)虚线处的强度轮廓图

Fig. 7 2P-sMSIM imaging of microtubules in a BS-C-1 cell. (a) Wide-field image obtained with normal diffraction limited spot array excitation (obtain with overlapping all spot arrays); (b) wide-field image obtained with SSA excitation (obtain with overlapping all spot arrays); (c) 2P-MSIM imaging; (d) 2P-sMSIM imaging; (e) intensity profiles along the dotted lines in Fig. 7(c) and Fig. 7(d)

图 7(a)、(b)分别是正常衍射受限点阵扫描得到的宽场图像和亚衍射聚焦点阵扫描得到的宽场图像;图 7(c)、(d)分别是 2P-MSIM 和 2P-sMSIM 的成像结果;图 7(e)是图 7(c)、(d)中虚线处的强度轮廓图(为了更加科学地表示分辨率,选择图 7(c)、(d)所示粗细居中的微管处进行分辨率计算),其中实线代表正常衍射受限点阵的计算结果,虚线代表亚衍射聚焦点阵的计算结果。由相机和物镜参数可知相机的一个像素对应物镜上的距离为 $0.108 \mu\text{m}$,将相机采集的图片的分辨率换算成 μm 就可以得图 7,再将图 7(e)中的标准差乘以 2.355 即可得到分辨率。经此换算后得到正常衍射受限点阵扫描处理后的图像分辨率为 $(151 \pm 5) \text{ nm}$,亚衍射聚焦点阵扫描处理后的图像分辨率为 $(135 \pm 5) \text{ nm}$ 。亚衍射聚焦点阵扫描处理后的图像分辨率更高,相比正常衍射受限点阵扫描处理后的分辨率提高了约 16 nm。该实验结果证明了所设计的亚衍射聚焦点阵在 2P-MSIM 成像中可以有效提高图像的分辨率。

4.3 线粒体成像

为了进一步证明 2P-sMSIM 的成像效果,选用 Invitrogen 公司的商用线粒体切片(MitoTracker Red™)进行荧光成像,结果如图 8 所示。图 8(a)、(b)是正常衍射受限点阵扫描得到的宽场图像和亚衍射聚焦点阵扫描得到的宽场图像,图 8(c)、(d)分别是 2P-MSIM 和 2P-sMSIM 的成像结果,图 8(e)是图 8(c)中矩形框位置处的放大图像,图 8(f)是图 8(d)中矩形框位置处的放大图像。从图 8(e)、(f)中可以清楚地看到亚衍射聚焦点阵扫描处理后的图像更加清晰,成像质量更好,在图 8(e)中分辨不了的环形结构在图 8(f)中可以清晰地看到。该实验进一步证明了亚衍射聚焦点阵激发可以有效提高 2P-MSIM 系统的分辨率和成像质量。

5 结 论

笔者提出了一种亚衍射聚焦点阵,并将其应用到 2P-MSIM 中进行生物成像实验验证。以 3×3 的点阵

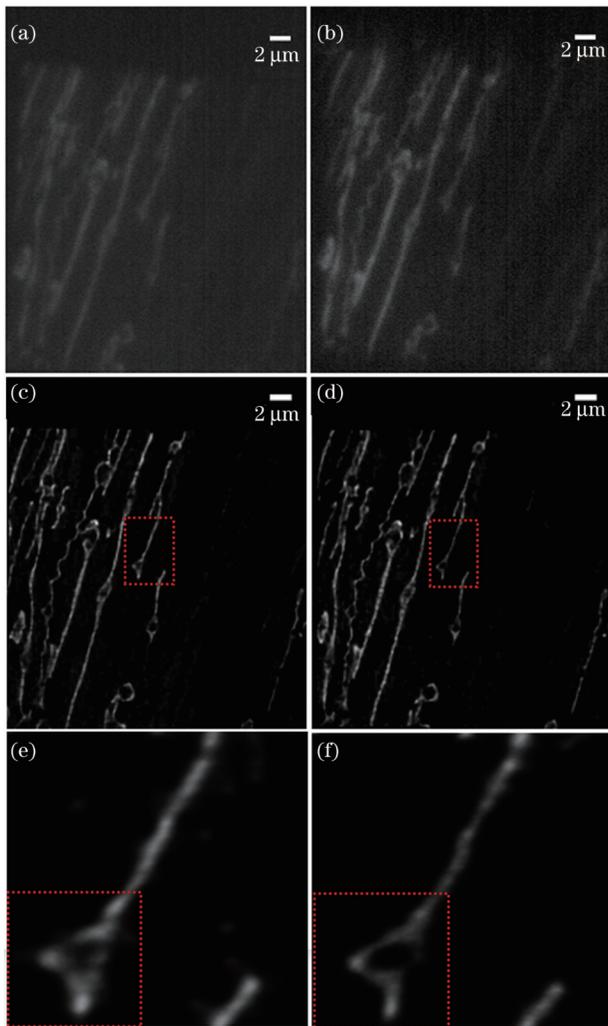


图8 线粒体的2P-sMSIM成像。(a)正常衍射受限点阵激发下的宽场图像(通过叠加所有的点阵图获得);(b)亚衍射聚焦点阵激发下的宽场图像(通过叠加所有的点阵图获得);(c)2P-MSIM成像结果;(d)2P-sMSIM成像结果;(e)(f)矩形框区域的放大图像

Fig. 8 2P-sMSIM imaging of mitochondria. (a) Wide-field image obtained by using normal diffraction limited spot excitation; (b) wide-field image obtained by using SSA excitation; (c) 2P-MSIM imaging; (d) 2P-sMSIM imaging; (e) (f) magnified view of the rectangle region boxed in Fig. 8(c) and Fig. 8(d)

为例,在仿真实验中,用正常衍射受限点阵和亚衍射聚焦点阵进行对比,并且计算它们的标准差,结果显示:亚衍射聚焦点阵可以将光斑尺寸缩小到正常光斑的72%。随后将设计的亚衍射聚焦点阵应用到2P-MSIM系统中,利用设计的相位图进行实验,结果显示:亚衍射聚焦点阵中单个点的平均FWHM缩小到正常衍射受限点阵中单个点的80%,证明了亚衍射聚焦点阵可以提升空间分辨率。微管成像实验进一步验证了亚衍射聚焦点阵的有效性,其扫描处理后的图像分辨率相比正常衍射受限点阵扫描处理后的图像分辨率提高了约16 nm,达到(135±5) nm。线粒体成像实验同样证明了亚衍射聚焦点阵的有效性和实用性,为

进一步开展其在活细胞及组织超分辨成像中的应用打下了基础。

参 考 文 献

- [1] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy[J]. *Optics Letters*, 1994, 19(11): 780-782.
- [2] Hess S T, Gould T J, Gunewardene M, et al. Ultrahigh resolution imaging of biomolecules by fluorescence photoactivation localization microscopy[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2009, 544: 483-522.
- [3] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-796.
- [4] Allen J R, Ross S T, Davidson M W. Structured illumination microscopy for superresolution[J]. *ChemPhysChem*, 2014, 15(4): 566-576.
- [5] Gregor I, Enderlein J. Image scanning microscopy[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2019, 51: 74-83.
- [6] York A G, Parekh S H, Nogare D D, et al. Resolution doubling in live, multicellular organisms via multifocal structured illumination microscopy[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 749-754.
- [7] Ingaramo M, York A G, Wawrzusin P, et al. Two-photon excitation improves multifocal structured illumination microscopy in thick scattering tissue[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(14): 5254-5259.
- [8] 章辰, 高玉峰, 叶世蔚, 等. 自适应光学在双光子显微成像技术中的应用[J]. *中国激光*, 2023, 50(3): 0307103.
Zhang C, Gao Y F, Ye S W, et al. Application of adaptive optics in two-photon microscopic imaging[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2023, 50(3): 0307103.
- [9] 付娆, 方宇, 杨勇, 等. 基于循环生成对抗网络的大视场显微成像方法[J]. *光学学报*, 2023, 43(5): 0518002.
Fu R, Fang Y, Yang Y, et al. Large-field microscopic imaging method based on cycle generative adversarial networks[J]. *Acta Optica Sinica*, 2023, 43(5): 0518002.
- [10] 李浩宇, 曲丽颖, 华子杰, 等. 基于深度学习的荧光显微成像技术及应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(18): 1811007.
Li H Y, Qu L Y, Hua Z J, et al. Deep learning based fluorescence microscopy imaging technologies and applications[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(18): 1811007.
- [11] Liu H T, Yan Y B, Tan Q F, et al. Theories for the design of diffractive superresolution elements and limits of optical superresolution[J]. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision*, 2002, 19(11): 2185-2193.
- [12] Liu H T, Yan Y B, Jin G F. Design and experimental test of diffractive superresolution elements[J]. *Applied Optics*, 2006, 45(1): 95-99.
- [13] Huang F M, Chen Y F, Garcia de Abajo F J, et al. Optical super-resolution through super-oscillations[J]. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 2007, 9(9): S285-S288.
- [14] Huang F M, Kao T S, Zheludev N I. Superresolution without evanescent fields[C] // CLEO/Europe-EQEC 2009-European Conference on Lasers and Electro-Optics and the European Quantum Electronics Conference, June 14-19, 2009, Munich, Germany. New York: IEEE Press, 2009.
- [15] Gerchberg R. A practical algorithm for the determination of phase from image and diffraction plane pictures[J]. *Optik*, 1972, 35: 237-246.
- [16] Ogura Y, Aino M, Tanida J. Design and demonstration of fan-out elements generating an array of subdiffraction spots[J]. *Optics Express*, 2014, 22(21): 25196-25207.
- [17] Ogura Y, Aino M, Tanida J. Diffractive fan-out elements for

- wavelength-multiplexing subdiffraction-limit spot generation in three dimensions[J]. *Applied Optics*, 2016, 55(23): 6371-6380.
- [18] Zheludev N I, Yuan G H. Optical superoscillation technologies beyond the diffraction limit[J]. *Nature Reviews Physics*, 2022, 4(1): 16-32.
- [19] Aharonov Y, Colombo F, Sabadini I, et al. Some mathematical properties of superoscillations[J]. *Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical*, 2011, 44(36): 365304.
- [20] Wong A M H, Eleftheriades G V. Superoscillations without sidebands: power-efficient sub-diffraction imaging with propagating waves[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 1-6.
- [21] Hyvärinen H J, Rehman S, Tervo J, et al. Limitations of superoscillation filters in microscopy applications[J]. *Optics Letters*, 2012, 37(5): 903-905.
- [22] Berry M V. A note on superoscillations associated with Bessel beams[J]. *Journal of Optics*, 2013, 15(4): 044006.
- [23] Berry M V. Exact nonparaxial transmission of subwavelength detail using superoscillations[J]. *Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical*, 2013, 46(20): 205203.
- [24] de Juana D M, Oti J E, Canales V F, et al. Design of superresolving continuous phase filters[J]. *Optics Letters*, 2003, 28(8): 607-609.
- [25] Liu J, Tan J B, Zhao C G. Convex objective function-based design method developed for minimizing side lobe[J]. *Applied Optics*, 2008, 47(22): 4061-4067.
- [26] Sheppard C J R, Ledesma S, Campos J, et al. Improved expressions for performance parameters for complex filters[J]. *Optics Letters*, 2007, 32(12): 1713-1715.
- [27] 喻欢欢, 张晨爽, 林丹樱, 等. 基于高速相位型空间光调制器的双光子多焦点结构光显微技术[J]. *物理学报*, 2021, 70(9): 098701.
- Yu H H, Zhang C S, Lin D Y, et al. Two-photon multifocal structured light microscopy based on high-speed phase-type spatial light modulator[J]. *Acta Physica Sinica*, 2021, 70(9): 098701.

Two-Photon Sub-Diffraction Multifocal Structured Illumination Microscopy

Quan Xiaojuan, Zhang Chenshuang, Lin Danying, YuBin*, QuJunle

Shenzhen Key Laboratory of Photonics and Biophotonics, Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, College of Physics and Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China

Abstract

Objective The multifocal structure light microscope (MSIM) can achieve an imaging depth of 50 μm and a diffraction limited resolution that is two times that of the traditional wide-field structure light technique. However, factors such as fluorescence noise, scattering, and aberration limit its chromatographic capability and imaging depth when conducting super-resolution imaging of thick samples. To overcome these limitations, the MSIM technique combined with two-photon excitation, is implemented to obtain a two-photon multifocus structured light illumination microscope (2P-MSIM), and the imaging depth and resolution of MSIM are thus improved. The MSIM has great application potential in the field of fast super-resolution microscopic imaging of deep tissues *in vivo*. However, owing to the diffraction limit, the enhancement of the existing 2P-MSIM spatial resolution is limited. To further improve the spatial resolution of 2P-MSIM, a two-photon sub-diffraction multifocal structure illumination microscopy (2P-sMSIM) is proposed in this paper.

Methods Using the improved Gerchberg-Saxton (GS) phase recovery algorithm, the conditions restricting the amplitude and the phase were enhanced in specific locations on the spectrum plane (the input plane reached the output plane after Fourier transform); subsequently, the amplitude and phase were constrained. After several iterations, the phase diagram of the sub-diffraction spot arrays (SSAs) was calculated, and the initial SSAs were obtained. The sidelobe intensity was controlled at approximately one-tenth of the center intensity (the sidelobe effect can be eliminated by the subsequent image-processing algorithm), and the algorithm parameter optimization was completed to obtain an SSA suitable for system imaging. Raw data for SSA and normal diffraction limited spot arrays were obtained. Next, Gaussian pinhole filtering, pixel relocation, and deconvolution algorithms were used to obtain the SSA and normal diffraction limited spot array images. The resolution of 2P-MSIM imaging was improved under the excitation of the SSA.

Results and Discussions The simulation results for the SSA and normal diffraction limited spot arrays are shown in Fig. 4. The average value of the full width at half maximum (FWHM) of the normal diffraction limited spot arrays is approximately 10.60 pixel; the average FWHM for a single focal point in the SSA is approximately 7.64 pixel. As a result, the SSA is 72% of the size of the normal diffraction limited spot arrays, achieving its design purpose. The phase diagram designed above is loaded onto a liquid-crystal spatial light modulator, and the SSA generated by the 2P-sMSIM system is used to excite the uniform eosin solution. Normal diffraction limited spot arrays and SSAs are obtained, and the experimental results are shown in Fig. 6. The normal diffraction limited spot arrays have an average FWHM of $0.71 \mu\text{m} \pm 0.07 \mu\text{m}$ for a single point, while the SSA has an average FWHM of $0.57 \mu\text{m} \pm 0.07 \mu\text{m}$. The SSAs are 80% the size of the normal diffraction limited spot arrays. SSAs can effectively reduce the size of the point diffusion function of the system to further improve the resolution of the 2P-MSIM system. To test the 2P-sMSIM spatial resolution, cell microtubules were used as samples for the experiments, and the results are shown in Fig. 7. The normal diffraction limited spot arrays have a resolution of $151 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ after scanning and $135 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ after SSA scanning. The image resolution improved by approximately 16 nm after the sub-diffraction-focusing lattice scanning. The experiments prove that the SSA designed using this algorithm can effectively improve the resolution of 2P-MSIM imaging. To further demonstrate the imaging effects of the 2P-

sMSIM, commercial mitochondrial sections obtained from Invitrogen were used for fluorescence imaging. The results are presented in Fig. 8. The images after the SSA scan processing are clearer, and the image quality is better. A ring structure that cannot be distinguished in the normal diffraction limited spot array scanned images is clearly observed in Fig. 8(f). The experiments further prove that SSA can effectively improve the resolution and imaging quality of the 2P-MSIM system.

Conclusions A design method for SSAs is developed in this study and applied to a 2P-MSIM for experimental verification in bioimaging. In the simulation experiment, normal diffraction limited spot arrays are compared with the SSA. By calculating their standard deviations, the SSA can shrink the spots to 72% of the normal diffraction limited spot arrays. The SSA is reduced to 80% of that of the normal diffraction limited spot arrays, proving that the SSA can improve the spatial resolution. Compared with the normal diffraction limited spot arrays, microtubule imaging experiments further verify the effectiveness of the algorithm, and its resolution is improved by approximately 16–135 nm. Mitochondrial imaging experiments also demonstrate the effectiveness and practicability of this algorithm, which lays the foundation for further applications of this algorithm in super-resolution imaging of living cells and tissues.

Key words bio-optics; multifocal structured-illumination microscopy; sub-diffraction spot array; spatial light modulator; phase retrieval