

# 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

吴美瑞<sup>1,2,3</sup> 杨西斌<sup>1,2,3</sup> 熊大曦<sup>1</sup> 李辉<sup>1</sup> 武晓东<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 吉林 长春 130033

<sup>3</sup>中国科学院大学, 北京 100049

**摘要** 传统荧光显微镜的分辨率受到光学衍射极限的限制。使用结构光照明技术,可以实现突破衍射极限的超分辨率成像。相对于其他突破衍射极限的超分辨率成像方法,结构光照明显微技术具有装置结构简单、成像速度快等优势,在生命科学研究中发挥了重要作用。首先分析了基于结构光照明的二维超分辨率荧光成像、三维层析荧光成像和非线性结构光照明超分辨荧光显微成像的原理和图像处理算法,并根据不同的结构光产生机理,对基于光栅光调制、基于液晶空间光调制器光调制和基于数字微镜阵列光调制的结构光照明荧光显微镜装置做了阐述和比较,最后概述了结构光照明荧光显微镜在观察生物样品结构特性和动态特性中的应用。

**关键词** 显微; 荧光显微成像; 结构光照明; 衍射极限; 超分辨率成像

中图分类号 O438.2

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP52.010003

## Structured Illumination Fluorescence Microscopy: Diffraction-Limit Breaking Principle and Application in Life Science

Wu Meirui<sup>1,2,3</sup> Yang Xibin<sup>1,2,3</sup> Xiong Daxi<sup>1</sup> Li Hui<sup>1</sup> Wu Xiaodong<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun, Jilin 130033, China

<sup>3</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract** Resolution of traditional fluorescence microscopy is limited by the diffraction of light. Diffraction limit can be broken by structured illumination to get higher resolution. Compared to other super-resolution microscopy techniques, structured illumination fluorescence microscopy can achieve higher imaging speed and need a simple setup, which has an important application life science research. In this paper, we first illustrate the principle and reconstruction algorithm to obtain 2D and 3D super-resolution images as well as non-linear structured illumination. Then the generally used structured illumination method and setup based on grating, spatial light modulator (SLM) as well as digital micro-mirror device (DMD) are introduced and compared. At last we summarize the application of structured illumination fluorescence microscopy for observing biological structures and processes.

**Key words** microscopy; fluorescence microscopy; structured illumination; diffraction limits; super-resolution imaging

**OCIS codes** 180.2520; 100.6640; 100.2000; 230.4110

收稿日期: 2014-05-22; 收到修改稿日期: 2014-07-27; 网络出版日期: 2014-12-19

基金项目: 国家自然科学基金(51376191)、江苏省自然科学基金(BK2012628)、江苏省科技支撑计划社会发展项目(BE2010657)

作者简介: 吴美瑞(1990—),男,硕士研究生,主要从事超分辨率成像方面的研究。E-mail: meirui\_wu@163.com

导师简介: 武晓东(1968—),男,研究员,主要从事医用光学技术、医用激光技术等方面的研究。

E-mail: wuxiaodong2000@hotmail.com(通信联系人)

## 1 引言

荧光显微镜具有可特异性标记、可对活体细胞进行实时动态成像的优势,在生命科学研究中获得了广泛的应用<sup>[1]</sup>,然而,由于“衍射极限”<sup>[2-3]</sup>的存在,使得荧光显微镜的分辨率为横向上为200~300 nm、纵向上为500~700 nm,限制了其在亚细胞水平生命科学领域中的应用。为此,近年来研究人员提出了一系列突破衍射极限分辨率限制的超分辨荧光显微技术<sup>[4-7]</sup>,例如,基于单分子定位的光激活定位荧光显微镜(PALM)<sup>[8]</sup>、随机光学重构荧光显微镜(STORM)<sup>[9]</sup>,基于可逆饱和光转移过程的受激发射损耗(STED)荧光显微镜<sup>[10]</sup>,基于改变照明光空间结构的结构光照明荧光显微镜(SIM)<sup>[11-12]</sup>等。

结构光照明是一种通过改变照明光空间结构的照明方式,通常照明的结构光是一个载频条纹,这种照明方式可应用于角度、长度、振动等的测量,并广泛应用于三维成像<sup>[13-15]</sup>。结构光照明荧光显微镜,是在宽场荧光显微镜的基础上,利用特殊调制的结构光照明样品,运用特定算法从调制图像数据中提取焦平面的信息,突破衍射极限的限制,重建出超分辨切层的三维图像。将结构光照明应用于荧光显微镜,具有成像速度快、光路结构简单、对荧光分子无特殊要求、能够应用于活体细胞实时动态三维成像的优势,因而在生物医学成像领域引起了广泛关注,是应用前景广泛的超分辨荧光显微技术。本文将这类荧光显微镜称为结构光照明荧光显微镜。

本文从以下三个方面介绍结构光照明荧光显微镜:1) 结构光照明突破衍射极限的原理及图像重构算法;2) 结构光照明荧光显微镜的装置;3) 结构光照明荧光显微镜在生命科学研究中的应用。

## 2 结构光照明突破衍射极限成像的原理

显微镜系统作为一个线性平移不变系统,它的成像过程可以借助点扩展函数描述<sup>[16]</sup>为

$$D(\mathbf{r}) = E(\mathbf{r}) \otimes F_{\text{PS}}, \quad (1)$$

式中  $D(\mathbf{r})$  表示像面上的光场强度分布,  $E(\mathbf{r})$  表示样品面发射光的光场强度分布,  $F_{\text{PS}}$  表示显微镜系统的点扩展函数,  $\otimes$  表示卷积运算。将(1)式做傅里叶变换,在频域空间表示为

$$D(\mathbf{k}) = E(\mathbf{k})F_{\text{OT}}, \quad (2)$$

式中  $F_{\text{OT}}$  为显微镜系统的光学传递函数,它由  $F_{\text{PS}}$  做傅里叶变换得到。  $F_{\text{OT}}$  限制了通过显微系统的信息量,只允许低频信息通过系统,滤除代表细节的高频信息,即限制了系统的分辨率。图1以频域空间的笛卡儿坐标系  $(k_x, k_y, k_z)$  来表征样品信息,图1(a1)、图1(c1)和图1(b1)分别表示二维和三维情况下,常规显微镜获得的信

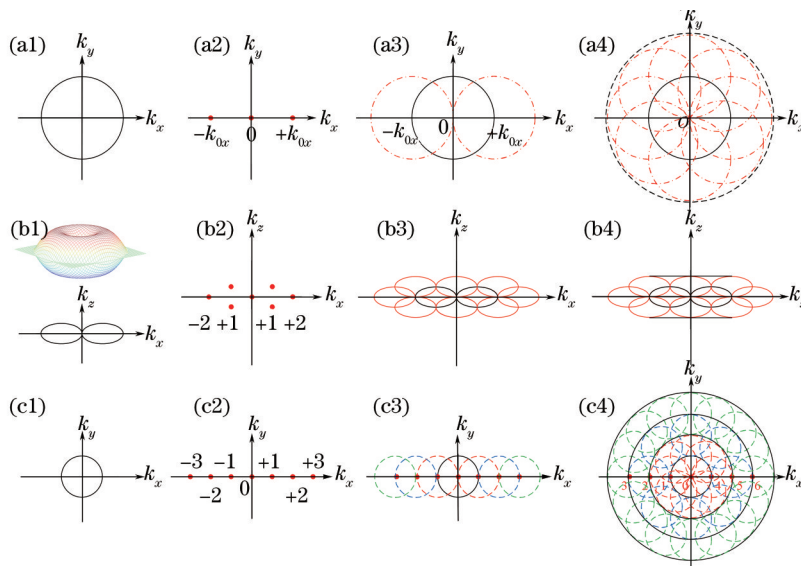


图1 二维、三维及非线性结构光照明显微镜提高分辨率的原理示意图。(a) 二维结构光照明显微镜原理图; (b) 三维结构光照明显微镜原理图; (c) 非线性结构光照明显微镜原理图

Fig.1 Principle diagram of achieving super-resolution image by using 2D, 3D and nonlinear structured illumination microscopy. (a) Principle diagram of 2D structured illumination microscopy; (b) principle diagram of 3D structured illumination microscopy; (c) principle diagram of nonlinear structured illumination microscopy

息量,它受到 $F_{OT}$ 的控制(只有圆内的信息才能通过光学系统)。

### 2.1 二维结构光照明显微镜(2D-SIM)原理

二维的 $F_{PS}$ 可以用贝塞尔函数或者高斯函数来表征<sup>[17]</sup>,所以 $F_{OT}$ 可以用圆近似表示,对于常规显微镜,圆的半径近似表示样品中能够被分辨的任意两点间的最小距离的倒数,表征显微镜的分辨率。一般情况下,(2)式中的 $E(r)$ 与照明光场强度分布 $I(r)$ 成线性关系,即 $E(r) \propto C(r)I(r)$ , $C(r)$ 为荧光分子浓度(表征样品信息)。常规荧光显微镜,采用匀场照明 $E(r) \propto I_0 C(r)$ ,因此 $F_{OT}$ 直接限制了通过显微系统的样品信息量。结构光照明显微镜实现超分辨的原理,就是利用特定结构的照明光 $I(r)$ 在成像过程把位于 $F_{OT}$ 圆外的一部分信息转移到圆内,利用特定算法将 $F_{OT}$ 圆内的高频信息移动到原始位置,从而扩展通过显微系统的样品频域信息,使得重构图像的分辨率超越衍射极限的限制。

结构光照明显微镜一般采用余弦形式照明光,即

$$I(r) = I_0 [1 + \cos(2\pi k_0 r + \varphi)], \quad (3)$$

式中 $I_0$ 和 $\varphi$ 分别为余弦照明条纹的平均强度和初相位, $k_0$ 为余弦照明条纹的空间频率,即条纹周期的倒数。 $I(r)$ 在频域空间是图1(a2)中三个位置处的 $\delta$ 函数( $k_0$ 取 $k_x$ 方向), $E(k) = C(k) \otimes I(k)$ ,所以 $E(k)$ 由 $C(k)$ 、 $C(k - k_0)$ 、 $C(k + k_0)$ 三部分组成,也就是说,结构光将样品的频域信息复制成三份,并使其中两份发生移动[即移动图1(a2)中的坐标系],而 $F_{OT}$ 的中心位置不动,这种移动过程就相当于将原本处于 $F_{OT}$ 外的信息移动到了 $F_{OT}$ 内。采用特定的重构算法可以将移动到 $F_{OT}$ 内的高频信息移回到原始位置,扩展通过显微系统的样品频域信息[图1(a3)]。改变 $k_0$ 的方向,使各个方向的频域信息得到扩展[图1(a4)]。

如前所述,采用结构光照明显微镜获得的单幅图像包含了重叠的高频信息,需要采用一定的算法将它们分离、移位、重构。(3)式所示的结构光照明下,记录的图像在频域空间可以写为

$$D(k) = I_0 \left\{ C(k) + \frac{1}{2} \exp(-i\varphi) C(k + k_0) + \frac{1}{2} \exp(i\varphi) C(k - k_0) \right\} F_{OT}(k) = I_0 D_N(k) + \frac{1}{2} I_0 \exp(-i\varphi) D_P(k + k_0) + \frac{1}{2} I_0 \exp(i\varphi) D_S(k - k_0), \quad (4)$$

式中 $D_N$ 表示获得的样品低频信息,等同于常规荧光显微镜获得的样品信息; $D_P$ 、 $D_S$ 包含了样品的高频信息。 $\varphi$ 可以人为控制,不同 $\varphi$ 值的结构光照明样品时可以在CCD上得到对应的图像,将该图像做傅里叶变换就可以得到对应的 $D(k)$ 。所以只要取三个不同的 $\varphi$ 值就可以通过解一个线性方程组得到 $D_N$ 、 $D_P$ 、 $D_S$ 。对 $D_P$ 、 $D_S$ 做移位处理,使它们对应的样品的零频位置与 $D_N$ 相同,移动过程可以通过 $D_P$ 、 $D_S$ 在实空间分别乘上 $\exp(i2\pi k_0 r)$ 、 $\exp(-i2\pi k_0 r)$ 实现。将移动得到的 $D'_P$ 、 $D'_S$ 与 $D_N$ 以特定方式相加就可以使频域信息得到扩展,最后做傅里叶逆变换就可以得到超分辨图像<sup>[11-12,18]</sup>。

### 2.2 三维结构光照明显微镜(3D-SIM)原理算法

对于光学显微镜系统, $F_{OT}$ 的三维结构<sup>[19-21]</sup>如图1(b1)上图所示,它是圆环结构,在零频位置存在凹陷,在 $k_x$ 、 $k_z$ 平面的截面图如图1(b1)下图所示。凹陷带来的后果就是CCD上记录的信息不仅包含物镜焦平面上的样品信息,同时包含焦平面外的样品信息。由于受到焦平面外的信息的干扰,常规荧光显微镜无法获得层析图像。三维结构光照明显微镜提高分辨率、获得层析图像的原理,就是利用特定结构的照明光来获得样品的高频信息,采用特定算法在横向和纵向上扩展样品频域信息的同时弥补凹陷带来的影响。本文介绍两种图像处理算法:均方根算法和线性重构算法。

#### 2.2.1 均方根算法

这种方法由Neil<sup>[22]</sup>首先提出,利用(3)式所示的结构光,分别获取 $\varphi = \{0, 2\pi/3, 4\pi/3\}$ 时对应的图像 $D_1$ 、 $D_2$ 、 $D_3$ ,利用(5)式即可获得层析图像。

$$D = [(D_1 - D_2)^2 + (D_1 - D_3)^2 + (D_3 - D_2)^2]^{1/2}, \quad (5)$$

从(4)式可以看出,CCD记录的图像 $D_1$ 、 $D_2$ 、 $D_3$ 包含不带层析能力的 $D_N$ 和包含高频信息的 $D_P$ 、 $D_S$ , $(D_1 - D_2)$ 、 $(D_1 - D_3)$ 、 $(D_3 - D_2)$ 就减除了不带层析能力的 $D_N$ 部分。(5)式还可以写为

$$D = \left| D_1 + D_2 \exp\left(i\frac{2\pi}{3}\right) + D_3 \exp\left(i\frac{4\pi}{3}\right) \right| = D_P(r), \quad (6)$$



在频域空间可以表示为  $D(\mathbf{k}) = D_p(\mathbf{k}) \otimes D_p^*(\mathbf{k})$ , 卷积能够弥补凹陷带来的影响, 同时高频信息的使用能够提高重构图像的分辨率<sup>[23]</sup>。

### 2.2.2 线性重构算法

利用 2.1 节中二维结构光照明显微镜重构算法得到的图像虽然能将横向分辨率提高接近两倍, 但是纵向上依然存在凹陷, 为此 Gustafsson 等<sup>[21]</sup>认为可以通过改变照明光的结构, 在扩展各向频域信息的同时“填补”凹陷, 同时提高纵向和横向的分辨率并使图像获得层析能力。为此结构照明光应包含有限个横向和纵向的谐波成分, 光栅衍射产生的 0、+1 和 -1 级衍射光干涉产生的照明光  $I(\mathbf{r})$  具有七个谐波成分, 在频域空间对应七个位置处的  $\delta$  函数, 如图 1(b2) 所示。成像过程相当于将样品信息复制成七份, 并使每份的零频位置在纵向和横向上做了对应的移动, 因此, CCD 上记录的图像包含了七部分样品信息。采用特定的算法, 就可以利用获得的七份信息在扩展各向频域信息的同时“填补”纵向的凹陷。

三光束干涉产生的结构照明光照射样品, CCD 上记录的图像在频域空间可以表示为

$$D(\mathbf{k}) = \sum_m \exp(i\varphi_m) C(\mathbf{k} - m\mathbf{k}_0) F_{OT,m}(\mathbf{k}), \quad (7)$$

式中  $\varphi_m$  可以人为控制,  $C(\mathbf{k} - m\mathbf{k}_0)$  表示零频位于不同横向位置处的样品信息,  $F_{OT,m}(\mathbf{k})$  是  $F_{OT}$  与照明光中的纵向谐波做卷积的结果, 它是可以直接计算出来的。从图 1(b2) 可以看出横向谐波只存在于 0、 $\pm 1$ 、 $\pm 2$  五个点, 因此只要取 5 个不同的  $\varphi$  值 ( $m$  取为 5) 通过解一个线性方程组即可将高频信息分离出来, 再利用傅里叶变换的频移特性将分离出来的高频信息移到对应位置, 做傅里叶逆变换就可以重构出三维分辨率都得到提高的层析图像。这样处理的结果只是在条纹方向上扩展了三维频域信息, 它的边缘存在波浪形状 [图 1(b3)], 为此可以采用多个方向的条纹照明样品, 采用相同的处理方式扩展三维频域信息, 弥补“波浪缺陷”使分辨率可以得到均匀的提高 [图 1(b4)]。

### 2.3 非线性结构光照明显微镜 (NL-SIM) 原理算法

线性结构光照明显微镜分辨率的提高取决于结构照明光空间频率  $k_0$  的大小, 由于结构照明光也是通过光学系统照射到样品表面的, 它同样受到衍射极限的限制, 即  $k_0 \leq \frac{NA}{0.61\lambda_0}$ , 所以分辨率无法突破 2 倍衍射极限 (不考虑照明光和荧光发射波长的不同)。为突破这个限制, 荧光分子的非线性效应被引入结构光照明显微镜<sup>[24-26]</sup>, Gustafsson<sup>[27]</sup>提出了一种基于荧光分子激发态饱和效应的非线性结构光照明显微镜。荧光分子中处于激发态的电子具有荧光寿命, 即单个荧光寿命内一个荧光分子只能发射一个光子。当激发光的能量超过一个阈值 (单个荧光寿命单个吸收界面内激发光子大于 1) 的时候, 发射光将与照明光不再保持线性关系。这种非线性关系就相当于在照明光中引入多项空间频率数倍于原始照明光频率的谐波成分, 在频域空间这些谐波成分就相当于位于不同频率位置的多个  $\delta$  函数 [图 1(c2) 表示包含 3 级谐波成分的照明光在频域空间的分布情况]。 $\delta$  函数使更多频率更高的高频信息被移到  $F_{OT}$  的圆内, 采用与 2.1 节中二维结构光照明显微镜相同的算法, 可以将获得的高频信息分离并移动到对应位置上扩展频域信息 [图 1(c3) 表示利用 3 级谐波非线性结构光照明样品, 样品的频域信息得到 4 倍扩展], 通过改变照明条纹的方向, 可以使频域信息在各个方向上得到均匀扩展 [图 1(c4)]。理论上, 非线性效应引入的谐波成分是有限的, 但是由于受到噪声的影响, 只有有限项的谐波能够被用于提取高频信息。Gustafsson 用实验证明了这种方法可以使分辨率达到  $50 \text{ nm}$ <sup>[27]</sup>。

### 2.4 原理算法小结

结构光照明显微镜是常规荧光显微镜在匀场照明的基础上, 通过改变照明光的空间结构, 使记录的图像包含更多高频信息, 利用特定的算法将这些信息分离出来, 重构出超分辨图像。根据这个原理, 不同结构的照明光或不同的信息分离重构方法可以衍生出不同的算法。

在重构算法方面, 二维图像重构过程除了 2.1 节中介绍的解线性方程组的方法, Heintzmann 等<sup>[28]</sup>提出了一种四相位重构方法, 记录  $\varphi = \{0^\circ, 90^\circ, 180^\circ, 270^\circ\}$  时 (3) 式所示的结构光照明样品时得到的 4 幅图像, 利用 (4) 式系数的特点, 进行加减乘运算, 可以直接分离出  $D_N$ 、 $D_S$ 、 $D_P$ , 用于图像重构。这种方法计算量小, 但是对  $\varphi$  取值精度有较高要求, 而且对于某一方向的照明条纹需要获取 4 幅原始图像, 因此, 在处理二维图像的时候一般采用 2.1 节中 Gustafsson 提出的线性处理算法。在三维图像重构算法中, 2.2 节中的两种处理算法各有优势, 对于均方根算法: 优势在于非常简单, 图像处理速度快; 存在不足: 只利用了 (4) 式中高频信息  $D_P$ , 丢弃

了包含低频信息的  $D_N$ , 当信噪比较低的时候这种方法重构出来的图像并不理想; 作为一种非线性算法, 它并不具有一个特定的光学传递函数, 很难表征它对图像分辨率的贡献能力; 这种算法仅从提高层析能力的角度处理图像, 横向上分辨率的提高并不显著, 类似于激光共聚焦显微镜。对于线性重构算法: 优势在于能同时提高二维、三维分辨率; 存在不足: 处理一个方向的照明条纹需获取 5 幅原始图像, 重构过程比均方根算法复杂, 图像处理速度慢。在这两种算法的基础上, Thomas 等<sup>[29]</sup> 做了一个折中的处理, 通过牺牲部分二维分辨率, 利用三幅原始图像, 采用线性处理算法重构三维超分辨层析图像, 在低信号强度下也具有较高的对比度和图像保真度。

### 3 结构光的发生

通过改变宽场荧光显微镜照明光的结构就可以得到结构光照明荧光显微镜, 因此, 结构光的发生装置是这类显微镜的关键, 其余成像部分跟普通的荧光显微镜类似。早期直接利用两束激光束干涉产生余弦结构光<sup>[30]</sup>, 通过压电陶瓷驱动的反射镜改变光路来改变结构光的相位角, 这种装置速度慢, 精度低, 稳定性差。之后, 光栅<sup>[12,21-22,28,31]</sup>、空间光调制器(SLM)<sup>[18,32-34]</sup>、数字微镜芯片(DMD)<sup>[29,35-37]</sup> 作为结构光调制器被应用于结构光照明荧光显微镜。下面对用这三种方式产生结构光的原理和装置进行说明比较。

#### 3.1 光栅型结构光照明荧光显微镜

这类结构光照明荧光显微镜利用光栅来产生余弦结构照明光。Gustafsson 等<sup>[12]</sup> 于 2000 年提出了这类结构光照明荧光显微镜。光源发的光被耦合进多模光纤, 出射光被透镜准直成平行光, 经过线偏振片照射光栅, 发生衍射, 在光路中加入掩膜, 只允许  $\pm 1$  级的衍射光通过并聚焦在物镜的后焦面上, 经过物镜重新变为平行光, 两束光在样品表面发生干涉, 产生余弦结构光照明样品, 样品发出的荧光经过分光镜在 CCD 上成像(图 2<sup>[12]</sup>)。这种方法适用于二维结构光照明荧光显微镜。如果改变掩膜(mask)的样式, 使 0、 $\pm 1$  级衍射光都进入光路, 在  $z$  方向也产生对应的谐波, 即可以用(7)式所述的线性重构算法进行三维结构光照明荧光显微成像。

为了改变结构光的相位和方向, 光栅被固定在压电陶瓷和电动旋转台上。通过电动旋转台可以获得不同方向的条纹, 通过压电陶瓷可以控制光栅横向移动得到不同相位的条纹<sup>[21]</sup>。为了使结构照明光具有最大的对比度, 可以通过加入线偏振片使照射光栅的光束与条纹方向保持 S 偏振。

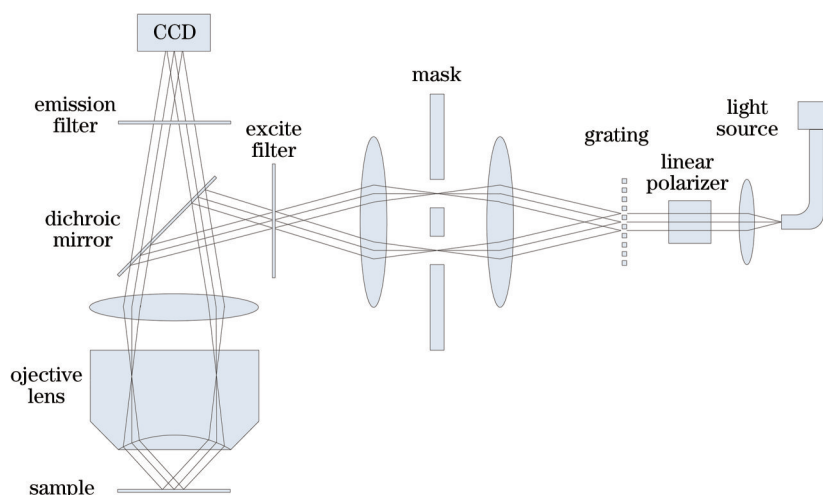


图 2 光栅型结构光照明荧光显微镜

Fig.2 Grating based structured illumination fluorescence microscopy

对于光栅型结构光照明荧光显微镜, 通过设计光栅的光栅常数、占空比、调制深度等结构参数, 增强  $\pm 1$  级衍射光的强度, 从而提高获取的高频信息的强度, 简化装置光路。但是, 采用机械的方式来控制光栅旋转和位移的装置复杂, 转换速度较低; 不同激发波长对应的  $\pm 1$  级衍射角是不一样的, 波长改变时需要微调光路, 这为多色荧光激发带来不便。

#### 3.2 空间光调制器型结构光照明荧光显微镜

为了避免用机械控制来改变结构条纹的相位和方向, Kner 等<sup>[34]</sup> 在 2009 年使用空间光调制器来产生结构光, 如图 3 所示。光纤出来的光准直之后经过偏振分束器(PBS)、半波片(HWP)射入空间光调制器发生衍

射,衍射光经过一个由两片铁电液晶相位延迟器(FLC)和一片四分之一波片(QWP)组成的偏振旋转装置,光路中的掩膜只允许 $\pm 1$ 级衍射光进入后续光路并聚焦于物镜的后焦面,经过物镜重新变为平行光,两束光在样品表面发生干涉,产生余弦结构光照明样品,样品发出的荧光经过分色镜在 CCD 上成像。

液晶空间光调制器可认为是一个周期可编程控制的闪耀光栅<sup>[38-39]</sup>,它由像素点组成,每个像素点可以编程控制开关状态,对入射光进行调制。结构光照明荧光显微镜需要不同方向、同一方向不同相位的结构照明条纹,这些要求可以通过控制空间光调制器一个周期内横向和纵向上包含的像素点来实现<sup>[18, 33-34]</sup>。结构照明条纹的偏振方向与其条纹方向保持 S 偏振的时候可以使结构照明条纹有最大的对比度,为此利用偏振旋转装置中的液晶相位延迟器和四分之一波片来控制不同照明条纹的偏振态。

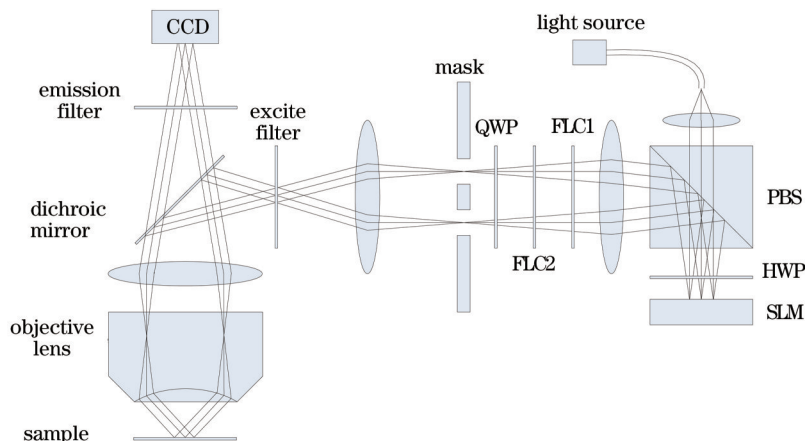


图3 空间光调制器型结构光照明荧光显微镜

Fig.3 Spatial light modulator based structured illumination microscopy

利用空间光调制器可以使结构条纹产生和控制的速度和精度得到提高,可以用于活体细胞成像<sup>[33-34]</sup>。空间光调制器只能对偏振光进行调制的特点,使得光路略显复杂;激发光偏离空间光调制器工作波长越大,衍射效率越低,因此空间光调制器对应特定的单个激发波长。

### 3.3 数字微镜芯片型结构光照明荧光显微镜

这类结构光照明荧光显微镜利用 DMD 产生用于照明的结构条纹。Dan 等<sup>[35]</sup>于 2013 年使用了这类结构光照明荧光显微镜。该结构光照明荧光显微镜整体光路简单(图 4),在 DMD 之后加入一个镜筒透镜(TL1)将 DMD 上的预设条纹成像于样品表面,完成结构光的照明。

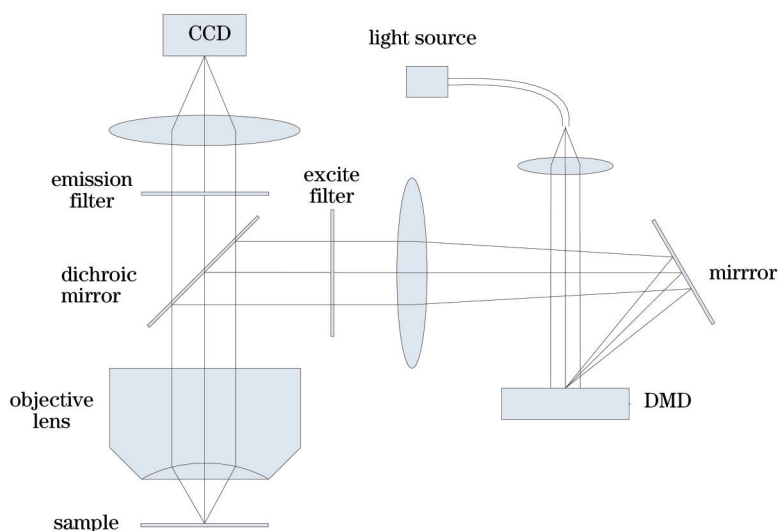


图4 数字微镜芯片型结构光照明荧光显微镜

Fig.4 Digital micromirror device based structured illumination fluorescence microscopy

DMD 由一系列微反射镜组成( $13 \mu\text{m} \times 13 \mu\text{m}$ ),通过改变微镜的偏转角度实现微镜的开关:微镜偏转



12°的时候反射光进入光路,对应开状态;微镜偏转-12°的时候反射光偏离光路,对应关状态。微镜的开关状态可以通过计算机控制实现,精度高,且开关状态可以进行高速切换,Dan等<sup>[35]</sup>验证了基于DMD的结构光照明荧光显微镜的成像速度可以达到 $1.6 \times 10^7$  pixel/s。

利用DMD搭建的结构光照明荧光显微镜光路可以快速产生结构条纹,并进行精确控制,可实现生物样品的实时动态成像。DMD利用反射原理产生结构光,它对宽光谱的入射光都具有较高的反射率,可以实现多波长激发。

#### 4 结构光照明荧光显微镜在生命科学上的应用

荧光显微镜由于其无损、非入侵的观察方式和特异性标记识别的特点,在生命科学研究中应用广泛。但是由于其分辨率受到衍射极限的限制,细胞内许多复杂的精细结构无法观察到。结构光照明荧光显微镜作为一种能够突破衍射极限的荧光显微镜,大大提高了细胞结构成像的分辨率和图像清晰度,有力地促进生命科学研究的发展。如图5所示的细胞微管<sup>[40]</sup>,无论是线性的还是非线性的结构光照明的显微图像[图5(d),采用2级谐波非线性结构光,相对于常规荧光显微镜分辨率能够提高三倍],都比传统的显微图像有更清晰,可以观察到更丰富的细节结构。三维结构光照明显微镜(3D-SIM)可在纵向不同切层上获得层析图像,通过一系列的层析图像重构出3D图像。图6<sup>[35]</sup>展示了3D-SIM对具有一定厚度的花粉颗粒成3D像的过程,沿纵向划分为303个切层[图6(a)],每个切层通过获取3幅图像重构一幅层析图像,通过这303幅层析图像重构出花粉颗粒的3D图像[图6(b)]。

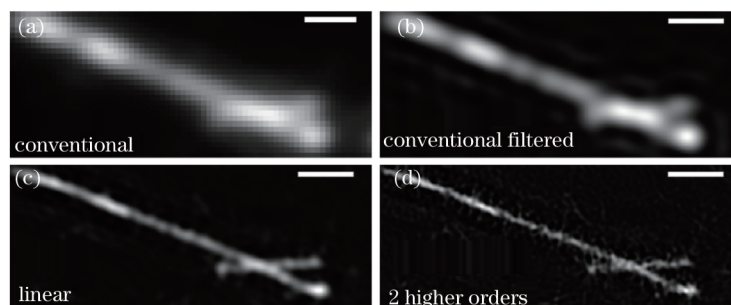


图5 (a) 常规显微镜、(b) 常规滤波显微镜、(c) 线性结构光照明荧光显微镜及(d) 采用2级谐波的非线性结构光照明荧光显微镜对细胞微管所成图像。比例尺: 500 nm

Fig.5 Microtubules imaged by (a) conventional microscopy, (b) conventional filtered microscopy, (c) linear SIM, and (d) NL-SIM with two higher-order harmonics. Scale bar: 500 nm

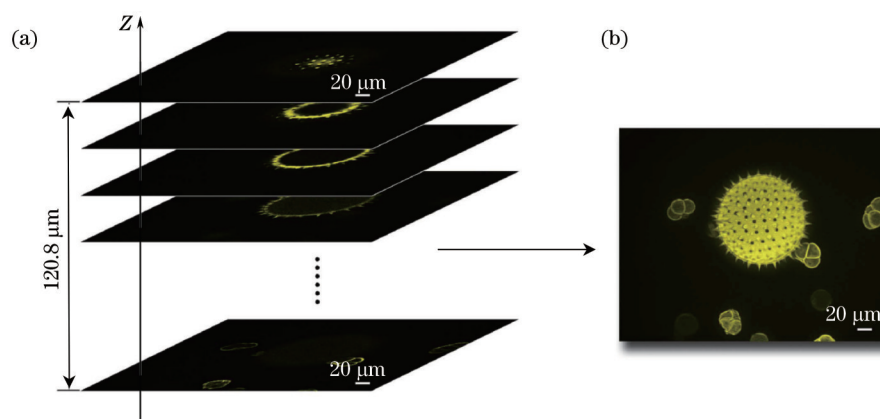


图6 3D-SIM利用一系列层析图像重构出花粉颗粒的3D图像。(a) 303个纵向切层上获得的层析图像;(b) 花粉颗粒的3D图像

Fig.6 3D image of pollen grain reconstructed by 3D-SIM with a stack of optically sectioned images. (a) A stack of optically sectioned images comprised of 303 axial layers; (b) 3D image of pollen grain

##### 4.1 观察生物样品的结构特性

利用结构光照明荧光显微镜,研究人员可以获得生物样品中常规荧光显微镜无法获得的特定部分的结构信息。Fitzgibbon等<sup>[41]</sup>利用三维结构光照明荧光显微镜,借助烟草中绿色荧光蛋白标记的病毒运动蛋白

获得胞间连丝的超分辨图像。结构光照明荧光显微镜不仅可以用于植物细胞的研究,同时也可以应用到动物细胞研究中。Schermelleh等<sup>[42]</sup>利用多色3D-SIM研究哺乳动物的细胞核,对核染色质、核纤层、核孔复合物同时成像,观察到常规荧光显微镜无法观察到的细节信息,为哺乳动物亚细胞结构的观察提供了一种新的方式。在人体组织的研究中也应用到了结构光照明荧光显微镜。Rahman等<sup>[43]</sup>将光学造影剂与结构光照明荧光显微镜结合,从而可以在完整的组织中将肿瘤细胞与正常细胞区分开来,为宫颈癌细胞的检测提供了一种强有力且便宜的检测方法。另外,Best等<sup>[44]</sup>利用多激发波长的结构光照明荧光显微镜研究视网膜色素上皮细胞。为了进一步提高结构光照明荧光显微镜的分辨率,非线性结构光照明荧光显微镜也在生命科学中得到应用。Rego等<sup>[40]</sup>将只需要较低能量就能产生非线性效应的可逆光开关荧光蛋白运用于非线性结构光照明荧光显微镜,并用它观察哺乳动物的核膜孔和肌动蛋白细胞骨架,分辨率达到60 nm。

#### 4.2 观察生物样品的动态特性

要观察生物样品的动态特性就要有较高的成像速度,结构光照明荧光显微镜只需要获得几幅初始图像即可重构超分辨图像的特点使其能满足这种成像速度要求。因此,在许多需要获得样品动态特性的生物学中,结构光照明荧光显微镜有着重要的应用。在细胞学上,Sonnen等<sup>[45]</sup>利用3D结构光照明荧光显微镜分析了不同细胞周期状态下人体细胞中心体的中心粒与中心粒周围基质之间的空间关系,这种研究人体细胞中心体体系结构的新方法揭示了中心粒与其周围基质之间以前所看不到的细节信息。在神经生物学上,Xu等<sup>[36]</sup>利用DMD与sCMOS搭建高速结构光照明荧光显微镜,并对老鼠的大脑切片进行研究,通过较短时间内获得的大量层析图像可以揭示神经元细胞的结构,并绘制出神经元信息传递图。在遗传学上,Carlton<sup>[46]</sup>对利用3D-SIM进行染色体结构的研究做了小结,阐述了在中等距离和减速分裂中染色体的结构,并用秀丽隐杆线虫和玉米的染色体为例做了说明。更好地揭示了染色体在不同分裂时期的结构。York等<sup>[47]</sup>提出了3D-SIM对活体多细胞生物体进行三维成像,采用多焦点照明光提高成像深度的方法。并对绿色荧光蛋白标记的活体转基因斑马鱼胚胎进行成像,获得斑马鱼侧线原基的动态变化。动态成像是结构光照明荧光显微镜区别于其他超分辨荧光显微镜的一个重要特点,了解了生物样品的动态过程才能更好地了解整个生命过程。

## 5 结 论

作为近年来研究热点,超分辨显微技术得到了极大的发展,众多超分辨显微技术被提出。结构光照明荧光显微镜以突破衍射极限的超分辨能力和较快的成像速度,在生命科学领域有着广泛的应用前景。相比传统共聚焦荧光显微镜,结构光照明荧光显微镜具有相同的层析能力,但是分辨率更高、成像速度更快;相比于基于单分子定位的超分辨荧光显微镜,结构光照明荧光显微镜的分辨率不如前者,但是只需要9幅原始图像即可构建一幅超分辨图像,而前者往往需要上千幅原始图像才能构建一幅超分辨图像,因此结构光照明荧光显微镜的成像速度远大于前者;并且结构光照明荧光显微镜对标记样品的荧光染料没有特殊要求,也不要辅助介质,这大大方便了其在生命科学中的应用范围。

结构光照明荧光显微镜也存在不足:对于线性结构光照明荧光显微镜,从实现超分辨的原理上就限制了它的分辨率无法超越两倍衍射极限,相比于其他超分辨显微技术分辨率偏低;非线性结构光照明荧光显微镜虽然可以进一步提高分辨率,但是非线性的实现需要荧光染料具有更长的荧光寿命、照明光具有更强的能量等,这些都会限制它在生命科学中的应用;结构光照明荧光显微镜通过算法将焦平面外的荧光信息减掉,从而获得层析图像,实质上焦平面外的荧光染料也是被激发的,这样会带来一定的光损伤。

作为一种超分辨荧光显微镜,结构光照明荧光显微镜在理论和实验上都取得重大进展,同时一些商用系统已经面世,但是它还存在较大的改进空间。为了进一步发挥高速成像的优势,可以在图像处理过程采用GPU进行加速<sup>[48]</sup>;相比于其他超分辨荧光显微镜,结构光照明荧光显微镜的分辨率偏低,为此可以将结构光照明显微技术与其他超分辨技术结合使用<sup>[49-51]</sup>。目前,结构光照明显微技术的使用主要集中在生命科学研究领域,扩展其应用领域也将是未来研究的方向。通过改进技术以及扩展应用范围,结构光照明显微技术将促进科学研究的发展。



## 参考文献

- 1 Huang B, Babcock H, Zhuang X. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells[J]. *Cell*, 2010, 143(7): 1047-1058.
- 2 Abbe E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung[J]. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 1873, 9(1): 413-418.
- 3 Shi Shunxiang, Wang Xue'en, Liu Jingsong. *Physical Optics and Applied Optics*[M]. Xi'an: Xidian University Press, 2008, 139-142.  
石顺祥, 王学恩, 刘劲松. *物理光学与应用光学*[M]. 西安: 西安电子科技大学出版社, 2008. 139-142.
- 4 Huang B, Bates M, Zhuang X. Super resolution fluorescence microscopy[J]. *Annual review of biochemistry*, 2009, 78: 993.
- 5 Schermelleh L, Heintzmann R, Leonhardt H. A guide to super-resolution fluorescence microscopy[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2010, 190(2): 165-175.
- 6 Lü Zhijian, Lu Jingze, Wu Yaqiong, *et al.*. Introduction to theories of several super-resolution fluorescence microscopy methods and recent advance in the field[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2009, 36(12): 1626-1634.  
吕志坚, 陆敬泽, 吴雅琼, 等. 几种超分辨率荧光显微技术的原理和近期进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36(12): 1626-1634.
- 7 Mao Zhengle, Wang Chen, Chen Ya. Superresolution far-field fluorescence bio-imaging: breaking the diffraction barrier[J]. *Chinese J Lasers*, 2008, 35(9): 1283-1307.  
毛峥乐, 王琛, 程亚. 超分辨远场生物荧光成像——突破光学衍射极限[J]. *中国激光*, 2008, 35(9): 1283-1307.
- 8 Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, *et al.*. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution[J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- 9 Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. *Nature methods*, 2006, 3(10): 793-796.
- 10 Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy[J]. *Opt Lett*, 1994, 19(11): 780-782.
- 11 Gustafsson M G. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy[J]. *Journal of microscopy*, 2000, 198(2): 82-87.
- 12 Gustafsson M G, Agard D A, Sedat J W. Doubling the lateral resolution of wide-field fluorescence microscopy using structured illumination[C]. *BiOS 2000 The International Symposium on Biomedical Optics*, 2000. 141-150.
- 13 Su Xianyu, Zhang Qican, Chen Wenjing. Three-dimensional imaging based on structured illumination[J]. *Chinese J Lasers*, 2014, 41(2): 0209001.  
苏显渝, 张启灿, 陈文静. 结构光三维成像技术[J]. *中国激光*, 2014, 41(2): 0209001.
- 14 Liu Di, Yao Zhenning, Li Haifeng, *et al.*. Structured light acquisition system based on waveband separation[J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, 32(6): 0612003.  
柳迪, 姚振宁, 李海峰, 等. 基于波长分离的结构光采集系统[J]. *光学学报*, 2012, 32(6): 0612003.
- 15 Peng Yifan, Tao Yiyang, Yu Chao, *et al.*. Three-dimensional display interaction device based on infrared structured light[J]. *Acta Optica Sinica*, 2013, 33(4): 0412005.  
彭伟帆, 陶毅阳, 于超, 等. 基于红外结构光的三维显示用交互装置[J]. *光学学报*, 2013, 33(4): 0412005.
- 16 Su Xianyu, Li Jitao. *Information Optics*[M]. Chengdu: Sichuan University Press, 1999. 20-26.  
苏显渝, 李继陶. *信息光学*[M]. 成都: 四川大学出版社, 1999. 20-26.
- 17 Zhang B, Zerubia J, Olivo-Marin J-C. Gaussian approximations of fluorescence microscope point-spread function models[J]. *Applied Optics*, 2007, 46(10): 1819-1829.
- 18 Chang B J, Chou L J, Chang Y C, *et al.*. Isotropic image in structured illumination microscopy patterned with a spatial light modulator[J]. *Optics Express*, 2009, 17(17): 14710-14721.
- 19 Stokseth P A. Properties of a defocused optical system[J]. *J Opt Soc Am*, 1969, 59(10): 1314-1321.
- 20 Sedat J W. *Fluorescence microscopy in three dimensions*[M]// *Methods in Cell Biology, fluorescence microscopy of living cells in culture, part B: quantitative fluorescence microscopy-imaging and spectroscopy: fluorescence microscopy of living cells in culture*, 1989, 30: 353.

- 21 Gustafsson M G, Shao L, Carlton P M, *et al.*. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination[J]. *Biophysical Journal*, 2008, 94(12): 4957-4970.
- 22 Neil M, Juskaitis R, Wilson T. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope[J]. *Opt Lett*, 1997, 22(24): 1905-1907.
- 23 Karadagli c D, Wilson T. Image formation in structured illumination wide-field fluorescence microscopy[J]. *Micron*, 2008, 39(7): 808-818.
- 24 Heintzmann R, Jovin T M, Cremer C. Saturated patterned excitation microscopy—a concept for optical resolution improvement[J]. *J Opt Soc Am A*, 2002, 19(8): 1599-1609.
- 25 Heintzmann R. Saturated patterned excitation microscopy with two-dimensional excitation patterns[J]. *Micron*, 2003, 34(6): 283-291.
- 26 Hao Xiang, Kuang Cuifang, Li Yanghui, *et al.*. Reversible saturable optical transitions based fluorescence nanoscopy[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2012, 49(3): 030005.  
郝翔, 匡翠方, 李阳晖, 等. 可逆饱和光转移过程的荧光超分辨显微术[J]. *激光与光电子学进展*, 2012, 49(3): 030005.
- 27 Gustafsson M G. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(37): 13081-13086.
- 28 Heintzmann R, Cremer C G. Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating[C]. *BiOS Europe'98*, 1999. 185-196.
- 29 Thomas B, Momany M, Kner P. Optical sectioning structured illumination microscopy with enhanced sensitivity[J]. *Journal of Optics*, 2013, 15(9): 094004.
- 30 Neil M, Juškaitis R, Wilson T. Real time 3D fluorescence microscopy by two beam interference illumination[J]. *Opt Commun*, 1998, 153(1): 1-4.
- 31 Beversluis M R, Bryant G W, Stranick S J. Effects of inhomogeneous fields in superresolving structured-illumination microscopy[J]. *J Opt Soc Am A*, 2008, 25(6): 1371-1377.
- 32 Hirvonen L M, Wicker K, Mandula O, *et al.*. Structured illumination microscopy of a living cell[J]. *European Biophysics Journal*, 2009, 38(6): 807-812.
- 33 Shao L, Kner P, Rego E H, *et al.*. Super-resolution 3D microscopy of live whole cells using structured illumination[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(12): 1044-1046.
- 34 Kner P, Chhun B B, Griffis E R, *et al.*. Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 339-342.
- 35 Dan D, Lei M, Yao B, *et al.*. DMD-based LED-illumination Super-resolution and optical sectioning microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3(1116): 1-7.
- 36 Xu D, Jiang T, Li A, *et al.*. Fast optical sectioning obtained by structured illumination microscopy using a digital mirror device[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2013, 18(6): 060503.
- 37 Fukano T, Miyawaki A. Whole-field fluorescence microscope with digital micromirror device: imaging of biological samples[J]. *Appl Opt*, 2003, 42(19): 4119-4124.
- 38 Cai Dongmei, Yang Huizhen, Ling Ning, *et al.*. Diffraction effect of liquid crystal spatial light modulator using for beam deflection[J]. *Chinese J Lasers*, 2008, 35(4): 491-495.  
蔡冬梅, 杨慧珍, 凌宁, 等. 液晶空间光调制器用于光束偏转控制的衍射效应[J]. *中国激光*, 2009, 35(4): 491-495.
- 39 Du Yanli, Ma Fengying, Gong Qiaoxia, *et al.*. Optical microscopic imaging technology based on spatial light modulator [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2014, 51(2): 020002.  
杜艳丽, 马凤英, 弓巧侠, 等. 基于空间光调制器的光学显微成像技术[J]. *激光与光电子学进展*, 2014, 51(2): 020002.
- 40 Rego E H, Shao L, Macklin J J, *et al.*. Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(3): E135-E143.
- 41 Fitzgibbon J, Bell K, King E, *et al.*. Super-resolution imaging of plasmodesmata using three-dimensional structured illumination microscopy[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(4): 1453-1463.
- 42 Schermelleh L, Carlton P M, Haase S, *et al.*. Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D

- structured illumination microscopy[J]. *Science*, 2008, 320(5881): 1332–1336.
- 43 Rahman M, Abd-El-Barr M, Mack V, *et al.*. Optical imaging of cervical pre-cancers with structured illumination: an integrated approach[J]. *Gynecologic Oncology*, 2005, 99(3): S112–S115.
- 44 Best G, Amberger R, Baddeley D, *et al.*. Structured illumination microscopy of autofluorescent aggregations in human tissue[J]. *Micron*, 2011, 42(4): 330–335.
- 45 Sonnen K F, Schermelleh L, Leonhardt H, *et al.*. 3D-structured illumination microscopy provides novel insight into architecture of human centrosomes[J]. *Biology Open*, 2012, 1(10): 965–976.
- 46 Carlton P M. Three-dimensional structured illumination microscopy and its application to chromosome structure[J]. *Chromosome Research*, 2008, 16(3): 351–365.
- 47 York A G, Parekh S H, Dalle Nogare D, *et al.*. Resolution doubling in live, multicellular organisms via multifocal structured illumination microscopy[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 749–754.
- 48 Lefman J, Scott K, Stranick S. Live, video-rate super-resolution microscopy using structured illumination and rapid GPU-based parallel processing[J]. *Microscopy and Microanalysis*, 2011, 17(2): 191–196.
- 49 Isobe K, Takeda T, Mochizuki K, *et al.*. Enhancement of lateral resolution and optical sectioning capability of two-photon fluorescence microscopy by combining temporal-focusing with structured illumination[J]. *Biomedical Optics Express*, 2013, 4(11): 2396–2410.
- 50 Rossberger S, Best G, Baddeley D, *et al.*. Combination of structured illumination and single molecule localization microscopy in one setup[J]. *Journal of Optics*, 2013, 15(9): 094003.
- 51 Fedosseev R, Belyaev Y, Frohn J, *et al.*. Structured light illumination for extended resolution in fluorescence microscopy[J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2005, 43(3): 403–414.

栏目编辑: 殷建芳