

## 稀疏结构光照明三维层析显微技术

雷云泽<sup>1†</sup>, 郜鹏<sup>1\*\*†</sup>, 刘星<sup>1</sup>, 李娇月<sup>1</sup>, 陈肖霏<sup>1</sup>, 郑娟娟<sup>1</sup>, 安莎<sup>1\*</sup>, 但旦<sup>2</sup>, 姚保利<sup>2</sup><sup>1</sup>西安电子科技大学物理学院, 陕西 西安 710071;<sup>2</sup>中国科学院西安光学精密机械研究所瞬态光学与光子技术国家重点实验室, 陕西 西安 710119

**摘要** 光学显微具有对样品损伤低、可特异性成像等优点,是生物医学、生命科学、材料化学等多个领域中必不可少的成像手段。然而,传统光学显微镜多采用平行光照明整个样品,无法有效区分在焦信号和离焦背景,不具备三维层析成像能力。基于此,提出一种基于共振扫描的稀疏结构光照明三维层析显微(SSI-3DSM)技术,通过共振扫描聚焦光斑快速生成稀疏条纹结构光,利用多步相移减除背景噪声实现对待测样品的三维层析成像。相较于扫描宽场成像,该方法将轴向分辨率提升1.3倍,信背比提升12倍。此外,该技术性能稳定、成本较低、便于商业化开发,可与结构光照明、单分子定位等超分辨显微成像技术相结合以进一步提高横向分辨率。

**关键词** 成像系统; 结构光照明显微; 共振扫描; 数字共聚焦显微; 大深度成像; 三维层析成像

中图分类号 O436

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP230456

## 3D Optical Sectioning Microscopy with Sparse Structured Illumination

Lei Yunze<sup>1†</sup>, Gao Peng<sup>1\*\*†</sup>, Liu Xing<sup>1</sup>, Li Jiaoyue<sup>1</sup>, Chen Xiaofei<sup>1</sup>, Zheng Juanjuan<sup>1</sup>,  
An Sha<sup>1\*</sup>, Dan Dan<sup>2</sup>, Yao Baoli<sup>2</sup><sup>1</sup>School of Physics, Xidian University, Xi'an 710071, Shaanxi, China;<sup>2</sup>State Key Laboratory of Transient Optics and Photonics, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics,  
Chinese Academy of Sciences, Xi'an 710119, Shaanxi, China

**Abstract** Optical microscopy has the advantages of low sample damage as well as high specificity imaging and is an indispensable imaging technique in many fields, such as biomedicine, life science, and material chemistry. However, the conventional optical microscope uses parallel light to illuminate the entire sample, which cannot effectively distinguish the in-focus signal from the defocused background, and does not have the ability of realizing a three-dimensional optical section imaging. Hence, a sparse structured illumination three-dimensional sectioning microscopy (SSI-3DSM) technology based on resonant scanning is proposed herein. The sparse structured illumination is rapidly generated via the resonant scanning focusing spot, and the three-dimensional optical section imaging of the sample to be measured is realized using a multistep phase shift to determine and eliminate the background noise. Compared with scanning wide-field imaging, the proposed method improves the axial resolution by 1.3 times and the signal-to-background ratio by 12 times. Moreover, the proposed method demonstrates stable performance, is cost effective, and can be easily commercialized. It can be combined with super-resolution microscopy imaging techniques such as structured illumination microscopy and single-molecule localization to further improve lateral resolution.

**Key words** imaging systems; structured illumination microscopy; resonant scanning; digital confocal microscopy; high penetration-depth imaging; three-dimensional optical section imaging

## 1 引言

光学显微技术<sup>[1-11]</sup>具有结构简单、对样品损伤小、

可对特定结构选择性成像(借助荧光标记)等优点,一直是生物成像的主流研究手段,在生物医学、材料化学等多个领域有着广泛的应用。随着生物医学研究的不断

收稿日期: 2023-01-05; 修回日期: 2023-02-11; 录用日期: 2023-02-22; 网络首发日期: 2023-03-02

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFF0700303, 2022YFE0100700)、陕西省自然科学基金(2023JCQN0731, 2023JCYB518)、国家自然科学基金(62075177)、中国轻工业五粮液浓香型白酒固态发酵重点实验室开放基金(2019JJ012)

通信作者: \*ansha@xidian.edu.cn; \*\*peng.gao@xidian.edu.cn

† 共同第一作者

断深入,科学家们越来越希望对生物组织、胚胎、个体进行原位超分辨成像,以揭示生命活动、疾病产生和治疗的机理。例如,在脑科学中,科学家们发现神经元的形态与其功能和活跃性直接相关<sup>[12-13]</sup>。神经元一般分布在脑表皮 100  $\mu\text{m}$  以下,神经元树突末梢的直径一般在 30~150 nm,经常被 30~50 nm 的触泡所包围。这对光学显微镜的三维层析成像能力、成像深度和分辨率提出了更高的要求。然而,传统宽场光学显微镜采用平行光照明整个样品,使得清晰成像的在焦信号与大量模糊的离焦背景相互重叠,不仅难以提取三维信息,还会影响在焦目标的分辨<sup>[14-15]</sup>。针对传统宽场光学显微技术的这一缺点,具有光学层析能力的三维显微成像技术应运而生,目前发展的主流技术包括激光扫描共聚焦显微技术(LSCM)、光片荧光显微技术(LSFM)、光切片结构光照明显微技术(OS-SIM)等。

LSCM 是一种重要的三维层析显微成像技术,目前已被广泛应用于工业、材料、生物等领域。LSCM 采用聚焦的光斑对样品进行扫描成像,采用一针孔滤除焦点外区域的离焦噪声而只收集来自焦点的荧光信号。然而,受线性振镜扫描速率的限制,LSCM 无法实现对动态样品的快速成像。同时,由于成像系统中物理针孔的存在,LSCM 不便与其他宽场光学技术进行有机结合。

LSFM 是另一种可对样品进行快速三维层析的显微成像技术。LSFM 采用与成像方向垂直的薄片状光束(称之为光片)照明样品,只有焦平面对应薄层的样品被激发而发射荧光<sup>[16]</sup>,可有效避免离焦噪声的产生。与传统宽场荧光显微技术相比,LSFM 有如下优点:1)提高图像信噪比和轴向分辨率,具备和 LSCM 类似的光学切片功能;2)减少光漂白和光毒性;3)提高成像速度。

OS-SIM 也是人们常用的三维层析显微成像技术之一,是由英国牛津大学的 Neil 等<sup>[17]</sup>在 1997 年提出的。OS-SIM 采用正/余弦条纹光场照明样品,当条纹频率足够高时,只有焦平面上的样品部分才能加载条纹而离焦区域则不然。通过条纹相移的方式,可以消除相移期间保持不变的离焦分量,只留下焦平面信息,以此实现对样品的“光切片”操作。OS-SIM 技术<sup>[18-20]</sup>具有和 LSCM 相媲美的光切片能力,并且克服了后者成像速度慢、结构复杂、造价昂贵等缺点,适合对活细胞进行快速动态成像。然而,传统 OS-SIM 采用的宽场条纹结构光容易受到样品散射的影响而退化,导致 OS-SIM 的成像深度受限,很难实现对厚样品的大深度成像。近年来,国内许多科研单位也对 SIM 开展了大量研究<sup>[21-30]</sup>。

传统 SIM 是一种宽场显微技术,具有成像速度快、对样品损伤小等优点。然而,宽场照明光容易受到样品不均匀性和散射作用的影响,其成像深度一般在 20  $\mu\text{m}$  以内,无法对厚样品进行超分辨成像<sup>[31]</sup>。同时,在成像过程中,宽场照明光会照明整个样品,致使荧光

标记物漂白而不利于三维成像。针对该缺点,近十年来国内外众多学者提出并研究了扫描结构光照明显微(扫描 SIM)技术:通过扫描聚焦光斑来形成条纹结构光,有效提高 SIM 的成像深度<sup>[32-36]</sup>。例如,2009 年,哈佛大学学者首次提出通过扫描焦点形成结构光对深层样品进行超分辨成像的思路<sup>[31]</sup>。2018 年,Yeh 等<sup>[36]</sup>将扫描 SIM 与二次谐波显微相结合,利用激发光与样品本身特定结构产生非线性(倍频)作用,在无需荧光标记的前提下,分别将横向和轴向分辨率提高 1.4 倍和 1.56 倍。以上方法大都采用线性扫描方式产生扫描结构光,限制了其成像速度。

本文提出一种基于共振扫描的稀疏结构光照明三维层析显微(SSI-3DSM)技术,以实现对于厚样品的大深度、快速光切片成像。该技术通过扫描聚焦光斑并进行光强调制产生强度均匀的稀疏条纹结构光,利用多步相移减除背景噪声,实现对厚样品的三维层析成像。与传统宽场光学显微技术相比,该技术利用共振扫描聚焦光斑形成结构光,具有较大的成像深度,采用共振扫描代替传统的线性扫描方式,实现约 23 frame/s 的快速成像。首先利用反射镜测定稀疏条纹结构光的相关参数,然后以荧光小球为样品标定系统的横向和轴向分辨率,最后对一金属台阶样品进行三维层析成像,验证系统的光切片能力。

## 2 实验原理

### 2.1 光路原理

所提 SSI-3DSM 成像装置的光路原理如图 1 所示。照明光源为 488 nm 波长的脉冲激光(型号 OBIS-LX,美国),其激光频率和出光占空比可调,数字模式下频率可调范围为 1~150 MHz。激光器发出的激光由光纤导入扫描光路系统,经过透镜  $L_1$ ( $f_{L1}=100$  mm)扩束准直为平行光。该平行光经共振振镜 RM 和线性振镜 GM 组成的二维共振扫描振镜系统(型号 LSK-GR12/M, Thorlabs, 美国)扫描,并由扫描透镜 Scan Lens( $f_{\text{Scan Lens}}=100$  mm)会聚,在其焦平面上形成条纹结构光。该结构光经由套筒透镜  $TL_1$ ( $f_{TL1}=200$  mm)和显微物镜 MO(型号 Water 63x/NA-1.2, Leica, 德国)所组成的望远镜系统最终投影在样品上,此处两者之间的二向色镜 DM(型号 Di01-R405/488/561/635-25x36, Semrock, 美国)用于反射照明激光。

在显微成像光路中,样品发出的信号光经由物镜 MO 和套筒透镜  $TL_2$ ( $f_{TL2}=400$  mm)组成的望远镜系统清晰成像到 sCMOS 相机(型号 Zyla 4.2 P-CL10, sCMOS, Andor, 英国)上。sCMOS 相机的像素阵列个数为  $2048 \times 2048$ ,像素大小为  $6.5 \mu\text{m} \times 6.5 \mu\text{m}$ 。其间的二向色镜 DM 用于分离入射激光与发射荧光,sCMOS 相机前的带通滤光片 BP(型号 FF01-520/60-25, Semrock, 美国)会再次滤除噪声以进一步提高图像信噪比。

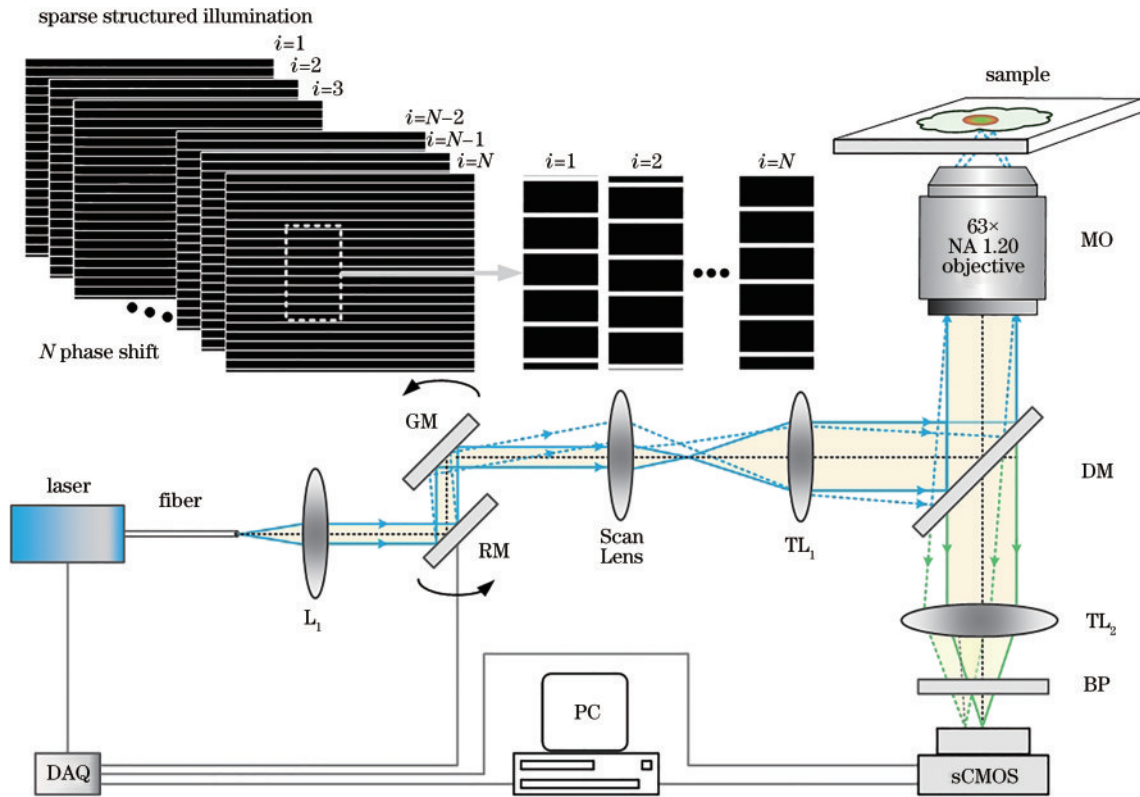


图 1 SSI-3DSM 光路原理图  
Fig. 1 Schematic optical path of SSI-3DSM

该成像装置的控制模块包括计算机和数据采集/控制板卡 DAQ(型号 DAQ-USB-6363(BNC), NI, 美国)。计算机通过 LabVIEW 编程控制 DAQ 产生光路中仪器所需的控制信号,实现对激光器的光强调制、RM 和 GM 的扫描控制、物镜轴向位移台的轴向移动,以及 sCMOS 相机的外触发曝光图像采集控制,从而完成该系统的实时图像采集。在 63 倍水镜下,实验测得的 SSI-3DSM 系统的放大率为 129 倍,那么该 sCMOS 相机决定了样品平面的成像视场为  $103.2 \mu\text{m} \times 103.2 \mu\text{m}$ 。SSI-3DSM 的  $x$  方向采用共振振镜扫描,扫描速率高达 12 kHz,在  $103.2 \mu\text{m} \times 103.2 \mu\text{m}$  全幅视场下的成像速度为 23 frame/s。

### 2.2 SSI-3DSM 的成像过程

扫描结构光通过二维振镜系统控制一聚焦光斑移动,并利用相机的累加曝光效应,最终形成一幅明暗相间分布的二维结构光图像。基于共振扫描的 SSI-3DSM 的成像具体过程如下:共振振镜控制器受控于 DAQ 产生一周期性正弦信号,用于驱动共振振镜 RM 在  $x$  方向对激光光束进行共振扫描,焦点在样品平面的位移函数可描述为

$$x(t) = A \cos(2\pi ft), \quad (1)$$

式中:  $A$  为扫描振幅;  $f$  为 RM 的共振扫描频率;  $t$  为时间。

当 RM 被控制信号驱动时,共振周期为 83.33  $\mu\text{s}$  [ $1/(12 \text{ kHz})$ ]。在一个共振周期中,焦点在  $x$  方向上

完成一次往返扫描运动。在每一余弦信号的顶峰位置都会产生一个严格同步的 transistor transistor logic (TTL) 信号作为控制系统的外触发信号,如图 2(b) 所示。实验中,仅选用该 TTL 信号的前半个周期 ( $0.5 \times 1/12 \text{ kHz} = 41.67 \mu\text{s}$ ) 作为有效信号(在另外半个扫描周期内激发光强设为 0),该信号仅仅选取了焦点往返扫描中的单向扫描(舍弃了另一半扫描)。

根据式(1)所示的 RM 扫描位移的函数表达式可知,焦点在样品的不同位置停留的时间不同,导致共振扫描过程中出现如图 2(a) 所示的光强非均匀问题,即行扫描中间区域光强比两端光弱。要强调的是,对于荧光成像而言,共振扫描两端长时间的激光停留是成像噪声的一个主要来源。为了解决这一问题,仅选取扫描区域的中心部分作为成像区域(虚线表示的区域),在非均匀光强扫描区内关闭激光,有助于提高荧光信号信噪比,从而进一步提高成像质量。具体而言,激光的调制频率约为 12 kHz,高电平时间为 13.89  $\mu\text{s}$  (光强均匀区域),低电平时间为 69.41  $\mu\text{s}$  (两端光强非均匀区域),线性(光强均匀)区时间占比为 20%,空间占比为 50%。

当 RM 完成 1 次或整数次  $x$  方向上共振扫描时,DAQ 产生第二模拟阶梯电压信号,用于控制所述线性扫描振镜 GM 沿着  $y$  方向对激光焦点进行扫描,最终形成稀疏条纹结构光,如图 1 中插图所示。具体而言,GM 的扫描位移函数可以表示为

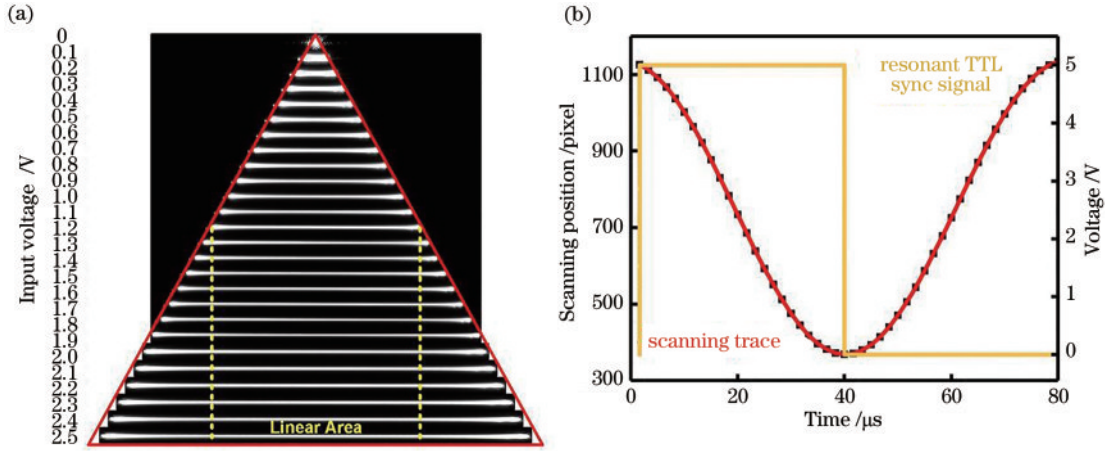


图 2 共振振镜的扫描特性。(a) 焦点的扫描范围与不同输入电压之间的关系;(b) 焦点位置与扫描时间的对应关系  
 Fig. 2 Properties of the resonant scanning mirror. (a) The relationship between the scanning range of focus and different input voltages; (b) correspondence between focus position and scanning time

$$y(t) = kt, \quad (2)$$

式中: $k$ 决定GM的扫描最小步长; $t$ 为时间。通过控制 $y$ 方向扫描电压信号的时序,可以扫描出不同相移量的稀疏条纹结构光。

对于每一帧扫描结构光,DAQ产生相机触发TTL信号,控制sCMOS相机在上升沿时开始曝光,在下降沿时结束曝光。其高电平时间等于一帧稀疏条纹结构光场的扫描帧时间,低电平时间为读图时间。该成像装置的控制信号时序图和流程图分别如图3(a)、(b)所示。通过保证相机触发信号、RM同步输出信

号、光强调制信号以及GM控制信号的精准时序同步,利用相机曝光时间内的光强累加效应,最终可在视场内产生一幅均匀光强的稀疏条纹结构光。

在本实验中,选取条纹周期 $P$ 为 $2.4 \mu\text{m}$ 的稀疏条纹结构光。在放大倍数为63、数值孔径( $A_{NA}$ )为1.2水浸物镜下,SSI-3DSM的成像视场为 $103.2 \mu\text{m} \times 103.2 \mu\text{m}$ ,整个视场共有43个条纹。此外,为了实现对稀疏条纹结构光的相移操作(如总相移步数 $N=12$ ),每次在原有GM控制信号的每个电平信号幅值上增加一个相移电压,使得该组条纹依次向下移动 $0.2 \mu\text{m}$ 。

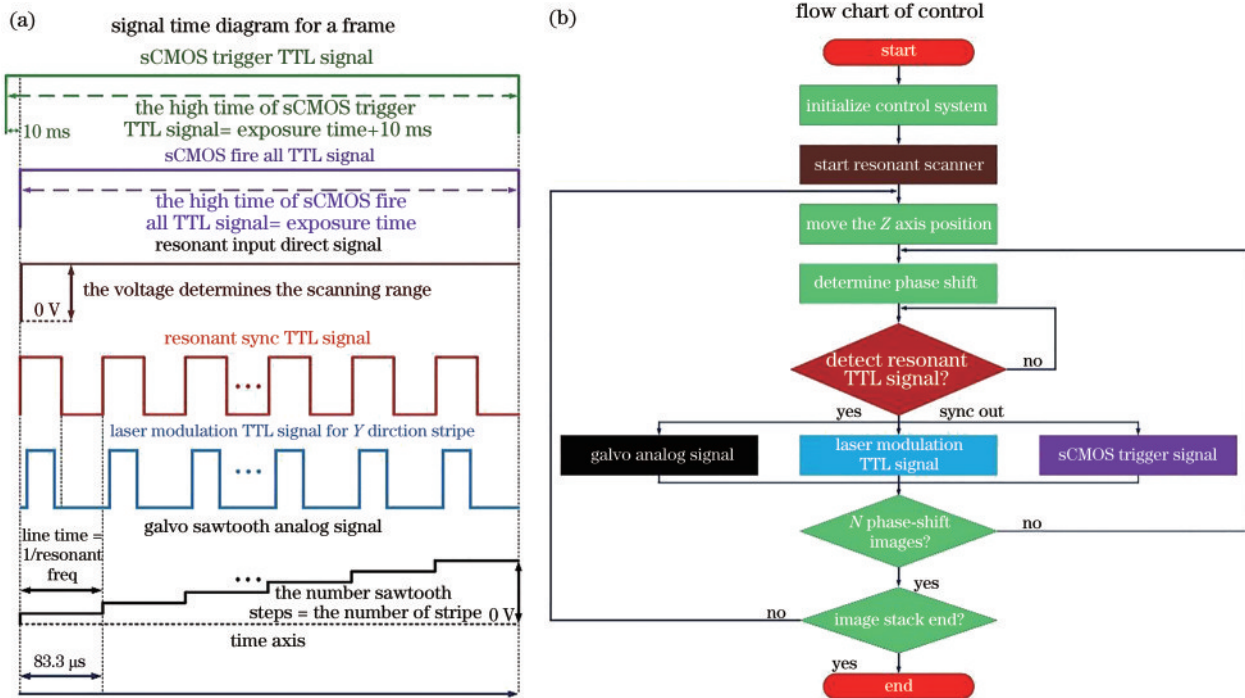


图 3 仪器信号控制原理。(a)控制信号时序图;(b)控制流程图  
 Fig. 3 Control principle of instrument signal. (a) Diagram of control signal timing; (b) the diagram of the control flow chart

### 2.3 SSI-3DSM 的图像重构

图像重构方法主要分为两步:首先利用图像堆栈中条纹灰度值错峰相减,消除离焦噪声;然后利用图像堆栈对层析显微图像进行像素重构。具体而言,如图 4 所示,在稀疏条纹结构光(周期  $P=2.4\ \mu\text{m}$ 、相移步数  $N=12$ )的光强分布模式下,条纹所在区域亮度较高(记为 ON),两个亮条纹之间亮度较低(记为 OFF),亮区域在一个周期内的占比为  $1/12$ 。样品在稀疏条纹结构光照明下,OFF 位置的强度主要来自样品的离焦噪声,因此将条纹结构光 ON 和 OFF 照明时样品的强度相减可以有效抑制离焦噪声,其减除结果如图 4 第 1 列所示。因此,可利用同一轴向切片处相距为  $N/2$  的两幅图像相减移除离焦噪声<sup>[31-32]</sup>:

$$\begin{cases} F_i = I_i - I_{(i+N/2)}, i = 1, \dots, N/2 \\ F_i = I_i - I_{(i-N/2)}, i = 1 + N/2, \dots, N \end{cases} \quad (3)$$

式中:  $I_i$  为一个图像堆栈中第  $i$  次扫描得到的强度图像;  $I_{(i-N/2)}$  为一个图像堆栈中第  $i-N/2$  次扫描得到的强度图像;  $I_{(i+N/2)}$  为一个图像堆栈中第  $i+N/2$  次扫描得到的强度图像;  $F_i$  为  $I_i$  经过减除离焦噪声后的强度图像;  $N$  为总相移步数,即一个图像堆栈中的图像数目。同时,采集  $y$  方向等间距 12 步相移稀疏条纹结构光照明下的强度图像,记为  $I_i(x, y), i = 1, 2, \dots, 12$ 。将该图像堆栈中的 12 幅图像叠加求平均 [ $I_{\text{wi}} = (\sum_{i=1}^{12} I_i)/12$ ] 后即可获得该系统对应的扫描宽场图像。

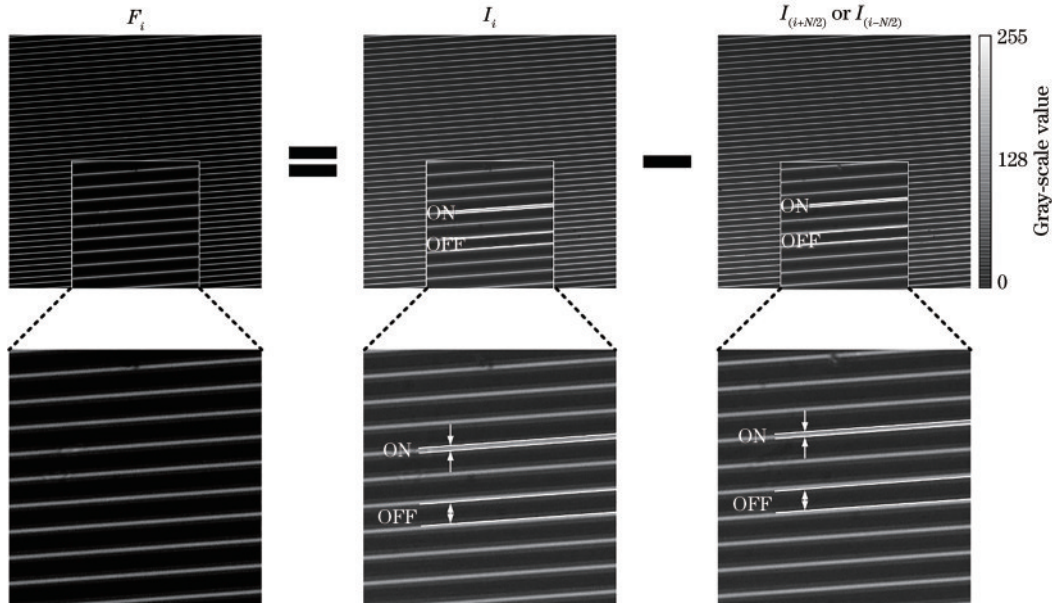


图 4 SSI-3DSM 的背景噪声减除方法

Fig. 4 Background noise subtraction of SSI-3DSM

选择采集图像中每一像素在一个图像堆栈  $F_i(i=1, 2, \dots, N)$  中的光强最大值,重构样品在当前轴向位置处的层析显微图像:

$$F_{\text{sec}}(m, n) = \max\{F_i(m, n)\}_i, \quad (4)$$

式中:  $F_{\text{sec}}(m, n)$  表示层析显微图像  $F_{\text{sec}}$  在像素点  $(m, n)$  处的光强值。利用样品同一轴向切片的图像堆栈重构当前平面的层析显微图像,并利用不同轴向切片的层析显微图像重构样品的三维结构。

## 3 实验结果

为了验证 SSI-3DSM 系统的三维层析成像性能,首先利用平面反射镜作为样品获得稀疏条纹结构光的相关特性,然后以荧光小球为样品分别标定系统成像的横向和轴向分辨率,最后利用 SSI-3DSM 系统对金属台阶样品进行三维层析成像,验证系统的光切片能力。

### 3.1 SSI-3DSM 的稀疏条纹结构光

将平面反射镜置于物镜 MO 的焦平面上,如图 5 所示,通过 12 步相移即可获得不同相位的稀疏条纹结构光,相机记录的图像堆栈如图 5(a) 所示。从图 5(a) 中的放大插图可以看出,图像由稀疏的条纹结构光组成。沿垂直于稀疏条纹结构光的方向画一虚线,对应的强度分布如图 5(b) 所示,从中可以测定该图像堆栈的周期与相位。对图 5(b) 中的强度曲线进行高斯拟合,得到的稀疏条纹结构光的周期为  $2.4\ \mu\text{m}$ ,12 步相移对应的亮条纹移动量均为  $0.2\ \mu\text{m}$ 。在  $\lambda = 488\ \text{nm}$  的激光照明下,水浸物镜的数值孔径  $A_{\text{NA}}$  为 1.2,则该装置的理论横向分辨率  $\delta$  为  $207\ \text{nm}[0.51\lambda/A_{\text{NA}}]$ ,聚焦光斑的半峰全宽(FWHM)。图 5(b) 中亮条纹强度分布的半峰全宽为  $308\ \text{nm}$ ,略大于理论值,这主要是由于照明光未能完全充满物镜的入瞳所致。对于每一扫描周期  $2.4\ \mu\text{m}$ ,实验中采用 12 步相移,以保证单步相移距离( $2.4\ \mu\text{m}/12 = 200\ \text{nm}$ )小于等于  $308\ \text{nm}$ 。

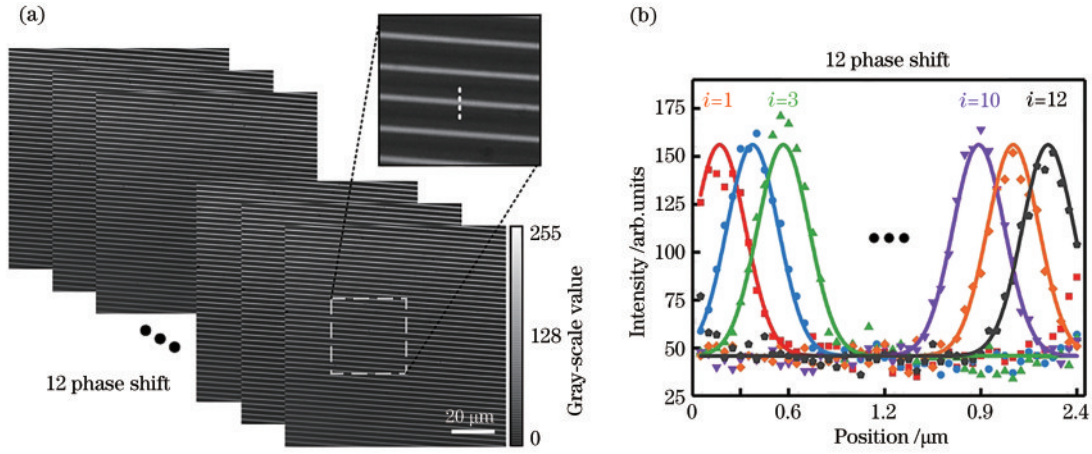


图5 稀疏条纹结构光周期与相移测定。(a)不同相移下稀疏条纹结构光照明下获得的图像堆栈,样品为一宽带反射镜(400~700 nm);(b)一个图像堆栈中的稀疏条纹结构光周期与相位的测定

Fig. 5 Characterization of the period and phase shift of sparse stripe structured illumination. (a) Acquired image stack of sparse stripe structured illumination in different phase shift, the sample is a broad-band mirror (400–700 nm); (b) estimation of the period and phase for sparse stripe structured illumination in a image stack

### 3.2 SSI-3DSM 的轴向分辨率

需要说明的是,SSI-3DSM 系统与传统共聚焦系统光路基本一致,前者采用像元滤波方式代替后者中物理针孔的功能。因此,SSI-3DSM 与传统共聚焦的轴向分辨率理论计算公式一致:

$$\delta_z = \frac{0.88\lambda_{exc}}{(n - \sqrt{n^2 - A_{NA}^2})}, \quad (5)$$

式中: $\delta_z$ 为 SSI-3DSM 系统的理论轴向分辨率; $\lambda_{exc}$ 为激光器激发波长; $n$ 为浸没介质的折射率; $A_{NA}$ 为物镜的数值孔径。在  $A_{NA}$  为 1.2 的 63 倍水浸物镜下,SSI-

3DSM 系统的理论轴向分辨率为  $0.568 \mu\text{m}$ ,实测轴向分辨率为  $0.919 \mu\text{m}$ 。

为了测定 SSI-3DSM 系统的轴向分辨能力,实验中使用  $A_{NA}$  为 1.2 的 63 倍水浸物镜,对直径为  $240 \text{ nm}$ 、发射波长  $580 \text{ nm}$  的单层荧光小球(RF240C,发射峰波长  $580 \text{ nm}$ ,上海辉质生物科技有限公司,中国)样品按照第 2.2 节中的成像过程进行 SSI-3DSM 成像。

三维扫描宽场的图像可以通过对图像堆栈内 12 步相移图像进行平均后三维合成获得。根据第 2.3 节中介绍的方法获得的 SSI-3DSM 结果如图 6(a)、(b)所

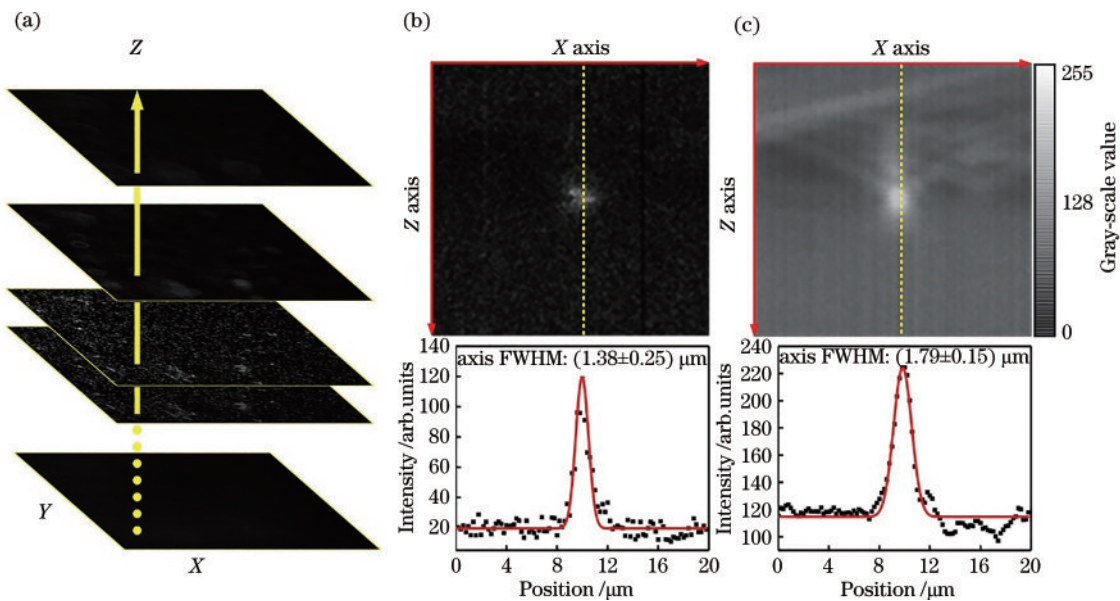


图6 SSI-3DSM 的轴向分辨率测定。(a)不同轴向位置下的荧光小球图像;(b)三维层析的轴向分辨率(半峰全宽)测定;(c)三维扫描宽场的轴向分辨率(半峰全宽)测定

Fig. 6 Axial resolution estimation of SSI-3DSM. (a) SSI-3DSM image stack of the fluorescent beads obtained from different axial planes; (b) axial resolution determination (FWHM) of SSI-3DSM; (c) axial resolution determination (FWHM) of 3D-scanning wide-field mode

示。其中:图 6(a)为单层荧光小球样品在  $103.2 \mu\text{m} \times 103.2 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$  体积内 SSI-3DSM 扫描成像的结果,轴向扫描步长为  $0.2 \mu\text{m}$ ,扫描层数为 100;图 6(b)为该样品三维层析显微图像的  $x$ - $z$  剖面图像(上)与其沿小球中心的轴向强度分布(下);图 6(c)为该荧光小球三维扫描宽场显微图像的  $x$ - $z$  剖面图像(上)与其沿小球中心的轴向强度分布(下)。对比图 6(b)和图 6(c)可以发现,利用该方法所获得的层析显微图像具有较低的背景噪声。同时,通过对剖面上小球的轴向强度分布进行高斯拟合,发现 SSI-3DSM 方法的轴向分辨率为  $(1.38 \pm 0.25) \mu\text{m}$ ,而三维扫描宽场显微成像的轴向分辨率为  $(1.79 \pm 0.15) \mu\text{m}$ 。测定结果表明,该方法的轴向分辨率相对于三维扫描宽场显微成像提高 1.3 倍。

同时,为了测定该 SSI-3DSM 系统的层析成像(抑制离焦背景)能力,实验中使用数值孔径为 1.44 的 100 倍油浸物镜,对琼脂中固定的直径为 240 nm、发射波长为 580 nm 的三维荧光小球(RF240C,发射峰波长 580 nm,上海辉质生物科技有限公司,中国)样品进行成像。鉴于油浸物镜形成的聚焦光斑更接近衍射极限,因此类比 2.2 节中的步骤,在稀疏条纹周期  $P=1 \mu\text{m}$ ,总相移步数  $N=10$  的实验环境下进行了 SSI-3DSM 成像。图 7(a)为三维琼脂荧光小球样品在焦面

位置下的三维扫描宽场和 SSI-3DSM 显微图像。通过对图像堆栈内 10 步相移图像进行平均获得扫描宽场图像。为了便于比较,在图 7(a)中选取了 5 个不同区域进行放大,比较了它们对应的扫描宽场图像和 SSI-3DSM 图像。对比结果表明:相对于宽场图像,SSI-3DSM 图像中的背景噪声得到了显著抑制。图 7(b)展示了扫描宽场和 SSI-3DSM 模式下沿着子图②中虚线(穿过了小球中心)的强度分布。通过对两条曲线进行高斯拟合,结果表明 SSI-3DSM 模式下荧光小球直径(半峰全宽)为  $(294.4 \pm 17.4) \text{nm}$ ,扫描宽场模式下荧光小球直径为  $(303.4 \pm 19.9) \text{nm}$ 。也就是说,相比于扫描宽场模式,SSI-3DSM 模式的横向分辨率提升了 1.03 倍。采用信背比(SBR)对两种模式下噪声水平进行估计。信背比的物理定义为在焦信号与离焦背景之间的强度比值,是光学系统层析性能的一个侧面量化反映。在实验中,利用荧光小球的平均亮度作为在焦信号(S),荧光小球之外背景的平均光强作为离焦背景(B)来计算 SBR。图 7(c)展示了不同位置处扫描宽场和 SSI-3DSM 模式的信背比。统计结果表明:扫描宽场下荧光小球的信背比为  $1.6 \pm 0.1$ ,SSI-3DSM 模式的信背比为  $19.5 \pm 2.4$ ,较扫描宽场提升了 12 倍。

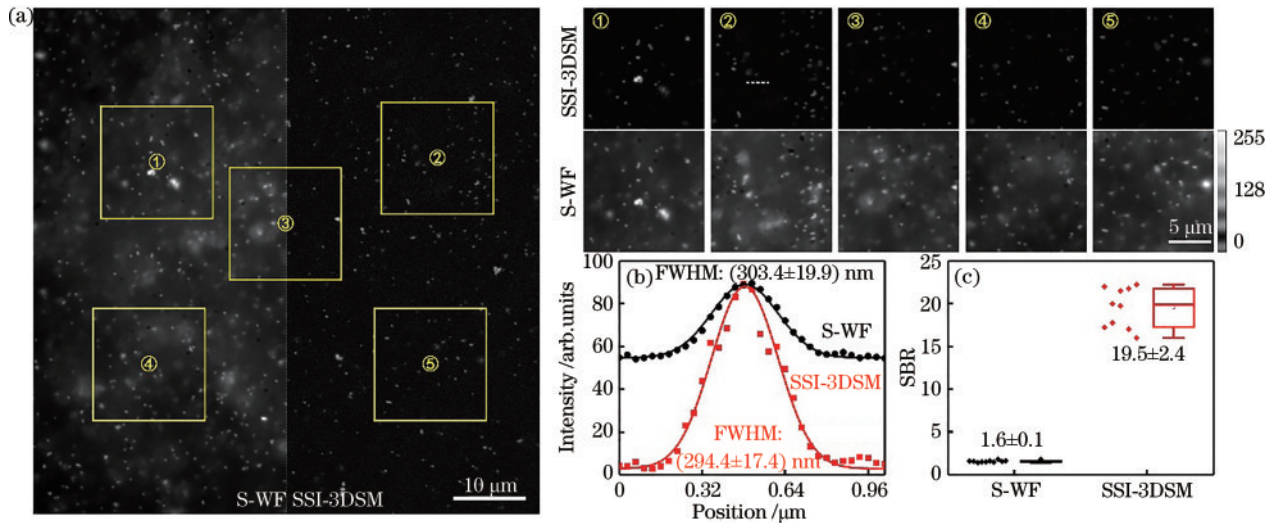


图 7 扫描宽场和 SSI-3DSM 模式的信背比测定。(a)扫描宽场(左)和 SSI-3DSM(右)模式下的荧光小球图像;(b)扫描宽场和 SSI-3DSM 模式下单个荧光小球的强度分布,对应于子图②中白色虚线位置;(c)扫描宽场和 SSI-3DSM 模式下的信背比测定  
Fig. 7 SBR estimation of scanning wide-field microscopy and SSI-3DSM. (a) Fluorescent images of fluorescent beads obtained with scanning wide-field (left) and SSI-3DSM (right) modes; (b) intensity profile along the dash-line in the inset ② crossing an individual bead from both the scanning wide-field and SSI-3DSM images; (c) SBR estimation of scanning wide-field and SSI-3DSM

同时,为了测定该 SSI-3DSM 系统相较于 OS-SIM 系统<sup>[37]</sup>的层析成像(抑制离焦背景)能力。对于 OS-SIM 实验中使用  $A_{NA}$  为 0.75 的 20 倍物镜,对琼脂中固定的直径为 240 nm、发射波长为 580 nm 的三维荧光小球(RF240C,发射峰波长 580 nm,上海辉质生物科技有限公司,中国)样品进行 OS-SIM 成像。

图 8(a)为三维琼脂荧光小球样品的 SSI-3DSM(上)和扫描宽场图像(下)。图 8(b)为相同样品的 OS-SIM 图像和宽场图像(下)。相对于宽场图像和扫描宽场图像,OS-SIM 和 SSI-3DSM 均实现了背景噪声抑制,表现出良好的层析成像能力。图 8(c)为宽场、扫描宽场、OS-SIM 和 SSI-3DSM 信背比统计。统计

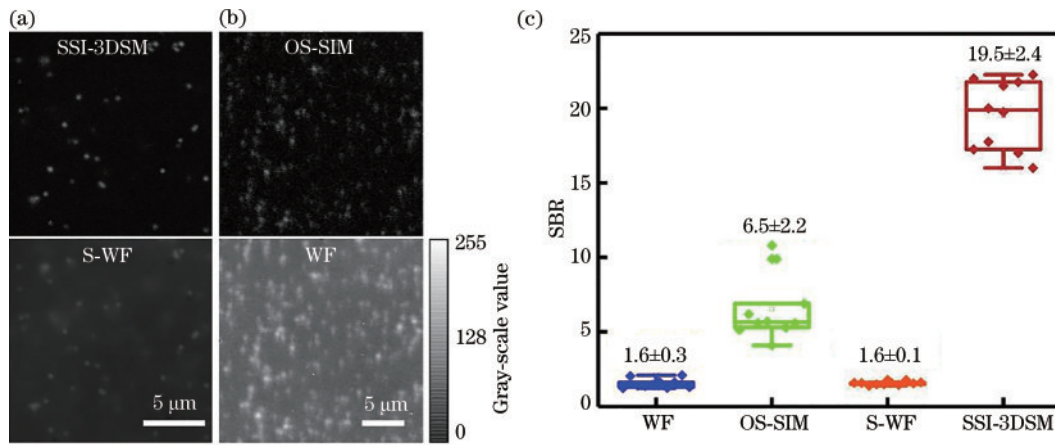


图 8 OS-SIM 和 SSI-3DSM 的层析能力比较。(a) SSI-3DSM(上)和其扫描宽场(下)模式下的荧光小球图像;(b) OS-SIM(上)和其宽场(下)模式下的荧光小球图像;(c)宽场、OS-SIM、扫描宽场、SSI-3DSM 模式的信背比统计

Fig. 8 Comparison of OS-SIM and SSI-3DSM modes on optical sectioning capability. (a) Images of fluorescent beads in SSI-3DSM (top) and the scanning wide-field (bottom) images; (b) images of fluorescent beads in OS-SIM (top) and wide-field (bottom) modes; (c) signal-to-background ratio statistics for wide-field, OS-SIM, scanning wide-field, and SSI-3DSM modes

结果表明:宽场模式下荧光小球的信背比为  $1.6 \pm 0.3$ , OS-SIM 模式的信背比为  $6.5 \pm 2.2$ , 扫描宽场模式的信背比为  $1.6 \pm 0.1$ , SSI-3DSM 模式的信背比为  $19.5 \pm 2.4$ 。

### 3.3 SSI-3DSM 对金属台阶样品的三维层析成像

利用 SSI-3DSM 装置对一金属台阶样品进行三维成像,实验结果如图 9 所示。图 9(a)为该样品在不同轴平面上的扫描宽场图像(上)和 SSI-3DSM 图像

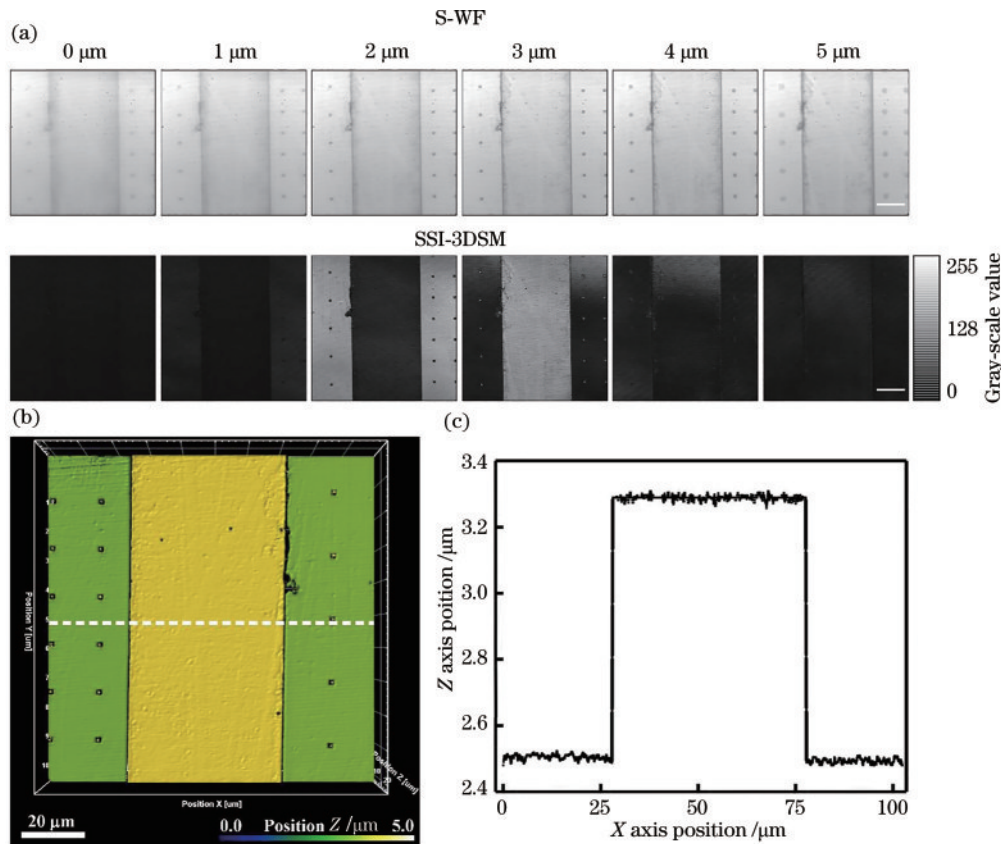


图 9 SSI-3DSM 对一金属台阶样品的三维显微成像结果。(a)金属台阶样品的扫描宽场和 SSI-3DSM 成像效果对比图;(b) SSI-3DSM 成像模式下的金属台阶样品三维层析立体图,不同颜色代表不同轴向高度;(c)沿图 9(b)虚线的高度分布

Fig. 9 SSI-3DSM imaging results of a metal step sample. (a) Comparison of the image qualities of the scanning wide-field and SSI-3DSM mode for a metal step sample; (b) three-dimensional optical sectioning image of a metal step sample, the different color represents the different height of the sample; (c) the height distribution along the dash-line in Fig. 9 (b)



(下)。实验结果表明,相比于扫描宽场显微成像,基于共振扫描的 SSI-3DSM 有效抑制了成像中的离焦噪声,具备良好的层析能力。图 9(b)为该样品重构的三维高度分布,从图 9(c)的定量分析可以看出,SSI-3DSM 可以对厚度差为  $0.8\ \mu\text{m}$  的台阶样品进行三维成像,展现了良好的三维层析成像能力。

## 4 结 论

提出一种基于共振扫描的稀疏结构光照明三维层析显微(SSI-3DSM)技术。该技术通过光强调制产生强度均匀的稀疏条纹结构光,利用多步相移实现背景噪声减除和层析图像重构,具有媲美共聚焦显微镜的穿透深度和三维层析成像能力。SSI-3DSM 以共振镜代替传统线性振镜实现  $x$  方向快速扫描,扫描速率高达  $12\ \text{kHz}$ ,在数值孔径为 1.2 的 63 倍水浸物镜下,完成  $103.2\ \mu\text{m} \times 103.2\ \mu\text{m}$  视场的成像帧时间为  $43\ \text{ms}$ ,而同等视场下传统共聚焦显微镜单帧图像耗时约为  $17.79\ \text{s}$ ,可见该技术的成像速度较传统方法提高了 400 多倍。相较于扫描宽场成像,该方法将轴向分辨率提升了 1.3 倍,信背比提升了 12 倍。该技术使用面阵探测器成像,无需使用价格昂贵的 PMT 和 APD 等点探测器,采用数字共聚焦思路提升图像质量,系统结构简单,性能稳定,有利于产业化开发。此外,该技术可与结构光照明、单分子定位等超分辨显微成像技术相结合,进一步实现横向分辨率的提高。

## 参 考 文 献

- [1] Chen B C, Legant W R, Wang K, et al. Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution[J]. *Science*, 2014, 346(6208): 1257-1262.
- [2] Mortensen K I, Churchman L S, Spudich J A, et al. Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 377-381.
- [3] Holden S J, Uphoff S, Kapanidis A N. DAOSTORM: an algorithm for high-density super-resolution microscopy[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(4): 279-280.
- [4] Chi K R. Super-resolution microscopy: breaking the limits[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(1): 15-18.
- [5] Zanicchi F C, Lavagnino Z, Donnorso M P, et al. Live-cell 3D super-resolution imaging in thick biological samples[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(12): 1047-1049.
- [6] Rowlands C J, Yew E Y S, So P T C. Parallel super-resolution imaging[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(8): 709-710.
- [7] Pastrana E. Fast 3D super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(1): 46.
- [8] Jungmann R, Avendaño M S, Woehrstein J B, et al. Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(3): 313-318.
- [9] Liu C, Chen J B, Zhang Y C, et al. Five-wavelength optical-resolution photoacoustic microscopy of blood and lymphatic vessels[J]. *Advanced Photonics*, 2021, 3(1): 016002.
- [10] Lu L P, Li J, Shu Y F, et al. Hybrid brightfield and darkfield transport of intensity approach for high-throughput quantitative phase microscopy[J]. *Advanced Photonics*, 2022, 4(5): 056002.
- [11] Wang W S, Li C K, Zhan Z Y, et al. Dual-modulation difference stimulated emission depletion microscopy to suppress the background signal[J]. *Advanced Photonics*, 2022, 4(4): 046001.
- [12] Deng W, Simone J B, Gage F H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2010, 11(5): 339-350.
- [13] Lian H, Yang L, Cole A, et al. NF $\kappa$ B-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease[J]. *Neuron*, 2015, 85(1): 101-115.
- [14] Qiao W, Jin R, Luo T P, et al. Single-scan HiLo with line-illumination strategy for optical section imaging of thick tissues[J]. *Biomedical Optics Express*, 2021, 12(4): 2373-2383.
- [15] Zhong Q Y, Jiang C Y, Zhang D J, et al. High-throughput optical sectioning via line-scanning imaging with digital structured modulation[J]. *Optics Letters*, 2021, 46(3): 504-507.
- [16] Mertz J, Kim J. Scanning light-sheet microscopy in the whole mouse brain with HiLo background rejection[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, 15(1): 016027.
- [17] Neil M A, Juskaitis R, Wilson T. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope[J]. *Optics Letters*, 1997, 22(24): 1905-1907.
- [18] Wu Y C, FesterShroff H., sharper, and deeper: structured illumination microscopy for biological imaging [J]. *Nature Methods*, 2018, 15(12): 1011-1019.
- [19] Keller P J, Schmidt A D, Santella A, et al. Fast, high-contrast imaging of animal development with scanned light sheet-based structured-illumination microscopy[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(8): 637-642.
- [20] Nixon-Abell J, Obara C J, Weigel A V, et al. Increased spatiotemporal resolution reveals highly dynamic dense tubular matrices in the peripheral ER[J]. *Science*, 2016, 354(6311): aaf3928.
- [21] Dan D, Lei M, Yao B L, et al. DMD-based LED-illumination super-resolution and optical sectioning microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3(1): 1-7.
- [22] Qian J, Lei M, Dan D, et al. Full-color structured illumination optical sectioning microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 1-10.
- [23] Tu S J, Liu Q L, Liu X, et al. A fast reconstruction algorithm for structured illumination microscopy[J]. *Optics Letters*, 2020, 45(6): 1567-1570.
- [24] Huang X S, Fan J C, Li L J, et al. Fast, long-term, super-resolution imaging with Hessian structured

- illumination microscopy[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(5): 451-459.
- [25] Gu L S, Li Y, Zhang S W, et al. Molecular resolution imaging by repetitive optical selective exposure[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(11): 1114-1118.
- [26] Chen J L, Xu Y, Lü X H, et al. Super-resolution differential interference contrast microscopy by structured illumination[J]. *Optics Express*, 2013, 21(1): 112-121.
- [27] Gao P, Pedrini G, and Osten W. Structured illumination for resolution enhancement and autofocusing in digital holographic microscopy[J]. *Optics Letters*, 2013, 38(8): 1328-1330.
- [28] Gao P, Yuan C J. Resolution enhancement of digital holographic microscopy via synthetic aperture: a review [J]. *Light: Advanced Manufacturing*, 2022, 3(1): 105.
- [29] Wang Z J, Zhao T Y, Hao H W, et al. High-speed image reconstruction for optically sectioned, super-resolution structured illumination microscopy[J]. *Advanced Photonics*, 2022, 4(2): 026003.
- [30] Liu G X, Xu N, Yang H D, et al. Miniaturized structured illumination microscope with diffractive optics [J]. *Photonics Research*, 2022, 10(5): 1317-1324.
- [31] Mandula O, Kielhorn M, Wicker K, et al. Line scan: structured illumination microscopy super-resolution imaging in thick fluorescent samples[J]. *Optics Express*, 2012, 20(22): 24167-24174.
- [32] Heintzmann R, Benedetti P A. High-resolution image reconstruction in fluorescence microscopy with patterned excitation[J]. *Applied Optics*, 2006, 45(20): 5037-5045.
- [33] Wang L, Zheng X M, Zhou J, et al. Improvement in the resolution of multiphoton scanning structured illumination microscopy via harmonics[J]. *Engineering*, 2022, 16: 65-72.
- [34] Lu J, Min W, Conchello J A, et al. Super-resolution laser scanning microscopy through spatiotemporal modulation[J]. *Nano Letters*, 2009, 9(11): 3883-3889.
- [35] Urban B E, Xiao L, Chen S Y, et al. *In vivo* superresolution imaging of the neuronal structure in the mouse brain[J]. *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering*, 2018, 65(1): 232-238.
- [36] Yeh C H, Tan C Z, Cheng C H A, et al. Improving the resolution of second -harmonic generation microscopy via scanning structured illumination[J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(12): 6081-6090.
- [37] When K, Fang X, Ma Y, et al. Large-field structured illumination microscopy based on 2D grating and a spatial light modulator[J]. *Optics Letters*, 2022, 47(11): 2666-2669.