

基于激光干涉的结构光照明超分辨荧光显微镜系统

文 刚, 李思崑, 杨西斌, 王林波, 梁 永, 金 鑫, 朱 茜, 李 辉*

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

摘要 结构光照明荧光显微术(SIM)是一种可突破阿贝衍射极限的宽场显微成像技术,因其非侵入、成像速度快及光损伤小等优点在生物医学研究中具有广泛的应用前景。从结构光照明显微成像系统基本原理出发,分析了超分辨图像重构算法原理、重构图像中伪影来源及优化方法;结合研制的线性/非线性结构光照明显微镜,详细讨论了基于激光干涉的 SIM 成像系统光机结构。重点讨论了系统的同步时序设计和光路中的几个关键技术问题。设计对比实验验证了自主开发的 SIM 重构算法的可靠性,并基于研制的线性 SIM 系统开展细胞骨架的成像实验。最后,对 SIM 技术在生物上的发展和应用提出展望。

关键词 显微; 超分辨; 荧光显微镜; 结构光照明; 激光干涉

中图分类号 O436 **文献标识码** A

doi: 10.3788/AOS201737.0318003

Super-Resolution Fluorescence Microscopy System by Structured Light Illumination Based on Laser Interference

Wen Gang, Li Simin, Yang Xibin, Wang Linbo, Liang Yong, Jin Xin, Zhu Qian, Li Hui

Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China

Abstract Structured illumination fluorescence microscopy (SIM) is a wide field microscopy imaging technique which can circumvent the Abbe diffraction limit. It has various potential applications in the biomedical research due to its advantages of non-invasivity, fast imaging speed and low photon damage and so on. Based on the basic principle of structured illumination microscopy imaging system, the super-resolution image reconstruction algorithm, the sources of artifacts in reconstructed image and optimization methods are analyzed. The SIM imaging system based on laser interference is discussed combining custom built linear/non-linear structured illumination microscope. Design of the control system for hardware synchronization, and few key questions during optical alignment are discussed in detail. Imaging of cell skeleton is done with the linear SIM microscopy system and the comparative tests verify the reliability of the independent-developed image reconstruction algorithm. At last, the future improvement and application in biology of the SIM technique are discussed.

Key words microscopy; super-resolution; fluorescence microscopy; structured-illumination; laser interference

OCIS codes 180.2520; 100.6640; 110.4155

1 引 言

荧光显微镜分辨率由光波长和物镜数值孔径(NA)决定。根据阿贝衍射定律,普通荧光显微镜极限横向分辨率约为 200 nm,导致显微镜对小于波长特征尺度的生物结构难以观测^[1-2]。近年来,受生物学研究在纳米尺度成像需求的推动,伴随着光源、探测器、新型荧光探针及新成像理论的发展,多种可突破衍射极限的

收稿日期: 2016-11-03; **收到修改稿日期:** 2016-12-29

基金项目: 国家自然科学基金(11504409,61405238,61475185)、江苏省自然科学基金(BK20150357,BK20141206)、中国科学院科研装备研制项目(YZ201443)

作者简介: 文 刚(1990—),男,硕士,助理研究员,主要从事超分辨显微成像和图像重构算法方面的研究。

E-mail: weng@sibet.ac.cn

* **通信联系人.** E-mail: hui.li@sibet.ac.cn

超分辨荧光成像技术被提出,并将荧光显微镜分辨率提高至 100 nm 甚至小于 10 nm^[3]。根据不同的成像方法,超分辨荧光显微技术可分为三类:1)单分子定位显微术(SMLM),包括随机光学重建显微术(STORM)^[4-5]和光激活定位显微术(PALM)^[6-7];2)受激辐射损耗显微术(STED)^[8-9];3)结构光照明显微术(SIM)^[10-11]。SMLM 可实现 20 nm 甚至更高分辨率成像,但时间分辨率低,同时全内反射荧光(TIRF)照明方式导致成像深度很浅(约波长量级),而高达几千瓦每平方厘米的激发光功率密度也使得样品极易发生光漂白^[4-7]。STED 可获得 40~70 nm 的超分辨图像,但高达 GW/cm² 量级的 STED 光功率密度也同样存在样品漂白的问题,不适合活细胞成像^[8-9]。SIM 则有效克服了上述两类超分辨显微镜的不足,其非特定荧光标记和宽场采图特性,使其在时间分辨率和抑制光漂白方面有较大优势,被视为观测活细胞最有效的手段。

基于 SIM 原理的显微成像技术分为层切和超分辨成像两类,本文着重讨论 SIM 超分辨成像研究。1999 年,Heintzmann 等^[10]提出了横向调制激发显微镜(LMEM)成像方法,并在实验中获得高分辨率,提高成像结果;2000 年,Gustafsson^[11]在 LMEM 的基础上提出了二维结构光照明显微技术,实验获得了横向分辨率约 115 nm 的超分辨率图像,较普通宽场显微镜分辨率提高约两倍;随着非线性荧光激发显微术的发展,2002 年,Heintzmann 等^[12]提出了基于非线性荧光激发的饱和结构光激发显微镜(SPEM),从理论上进一步扩展 SIM 的频谱空间以提高成像分辨率;2005 年,Gustafsson^[13]从实验上验证了 SPEM 技术的可行性,获得约 50 nm 的横向分辨率,并称之为饱和结构光照明显微术(SSIM)。SPEM/SSIM 技术激发光强对样品有很强的光漂白效应,2008 年,Hirvonen 等^[14]提出了基于可逆光转换荧光蛋白实现非线性结构光照明的理论,直至 2012 年此方案才被 Rego 等^[15]从实验中获得验证,在激发光强度降低 6 个数量级的条件下仍获得了约 50 nm 的横向分辨率。为了获得轴向样品三维信息,2008 年,Gustafsson 等^[16]实现了三维结构光照明荧光显微成像,将横向和轴向分辨率都提高到普通荧光显微镜的两倍。早期的 SIM 使用光栅获得两束光,随着空间光调制器件(SLM)在光学波前调控领域的广泛使用,Hirvonen 等^[17-18]采用 SLM 替代光栅产生结构光条纹,成功实现活细胞二维超分辨成像。2011 年,Shao 等^[19]基于 SIM 获得了活细胞三维超分辨图像,并于 2012 年实现双色三维活细胞超分辨成像^[20]。国内,2013 年,Dan 等^[21]使用 LED 作为光源,数字微镜阵列(DMD)作为 SLM 开展 SIM 研究,实现了 SIM 层切和超分辨成像。2015 年,Li 等^[22]使用 NA1.7 油镜和 SLM 在 TIRF 照明模式下开展线性 SIM 成像,获得 82 nm 的超高分辨率;此外,该小组提出了结构光激活与结构光激发相结合的新型非线性 SIM 技术,采用新型反复光激活荧光蛋白 Skylan-NS 进行活细胞成像,获得了高达 62 nm 的空间分辨率。

本文从 SIM 技术基本原理出发,结合本课题组开发的激光干涉线性/非线性 SIM 系统,从图像重构算法开发、光机结构设计、控制系统和同步时序设计等方面展开讨论,重点分析了 SIM 系统研制时涉及的关键技术问题。

2 SIM 原理与重构算法

2.1 基本原理

SIM 技术利用强度正弦调制的结构光激发荧光样品产生叠栅效应,将原本不在远场空间传播的高频信息编码到低频显微图像中,通过图像重构算法解码出高频成分实现分辨率的提高。首先从显微镜成像过程中点扩展函数与荧光发射强度的卷积出发,系统探测器采集到的荧光图样 $D(r)$ 可表述为^[11-13]

$$D(r) = F[I(r)] \otimes P(r) + N(r), \quad (1)$$

式中 $F[I(r)]$ 为发射光强, $I(r)$ 为激发光强, $P(r)$ 为点扩展函数, $N(r)$ 为噪声项, \otimes 代表卷积运算。荧光分子激发光强较弱时,发射强度正比于激发光强,而激发光强度进一步增大时荧光分子进入饱和激发态,发射强度呈非线性效应,此时(1)式中的发射光强 F 展开为^[13,15,23]

$$F[I(r)] = [a_0 + a_1 I(r) + a_2 I^2(r) + a_3 I^3(r) + \dots + a_N I^N(r)] \cdot S(r), \quad (2)$$

式中 $S(r)$ 为被测样品, N 代表谐波阶次, $N=1$ 为线性激发。当激发光为正弦分布的非均匀结构光时,荧光发射强度可表示为^[16]

$$F [I (r)] = [b_0 + b_1 \cos (2 \pi k_0 r + \phi) + b_2 \cos (4 \pi k_0 r + 2 \phi) + b_3 \cos (6 \pi k_0 r + 3 \phi) + \cdots + b_N \cos (2 N \pi k_0 r + N \phi)] \cdot S (r) , \quad (3)$$

式中 k_0 和 ϕ 分别为结构光空间频率和初始相位。将(3)式代入(1)式并进行傅里叶变换可得

$$\hat{D}(k) = F_{\text{out}}(k) \sum_{m=-N}^N b_m \hat{S}(k - mk_0) \exp(-im\phi) + N(k), \quad (4)$$

式中 $\hat{D}(k)$ 为荧光频谱图像, $\hat{S}(k)$ 为样品频谱, $F_{\text{out}}(k)$ 为系统光学传递函数, $N(k)$ 为噪声谱。

特殊情况, 当 $N=1$ 时系统为线性激发产生线性结构光照明, (3)式可简化为^[11]

$$\hat{D}(k) = \frac{I_0}{2} \left[\hat{S}(k) + \frac{1}{2} \hat{S}(k - k_0) \exp(-i\phi) + \frac{1}{2} \hat{S}(k + k_0) \exp(i\phi) \right] \cdot F_{\text{out}}(k) + N(k), \quad (5)$$

式中右边第一项代表普通宽场显微频谱, 另两项相对于第一项分别平移了 k_0 , 相当于系统将大于截止频率 k_c 的高频成分编码到光学传递函数的低频区域。当在同一方向角下采集三张或更多不同相位值 ϕ 的荧光图像后, 对(5)式三个不同相位下的方程组进行联立求解, 将三个谐波项 $s(k)$ 、 $s(k+k_0)$ 和 $s(k-k_0)$ 分离开; 对两频谱项 $s(k+k_0)$ 和 $s(k-k_0)$ 平移并拼接到 $s(k)$ 的高频区域获得目标荧光图像频谱。进一步, 为确保重构图像在频谱空间的各方向均提高, 系统在三个方向(即不同的余弦调制 k_0 值)进行不同相位值 ϕ 荧光宽场成像。图 1 所示为 SIM 技术基本原理, 图 1(a)所示为叠栅效应调制产生高频信息, 图 1(b)所示为普通宽场荧光显微镜可探测频谱范围, 图 1(c)为正弦结构光照明时荧光图像频谱, 图 1(d)为多方向角线性 SIM 频谱拓展, 图 1(e)单方向的非线性 SIM 频谱拓展, 图 1(f)多方向角非线性 SIM 频谱拓展^[11,14]。

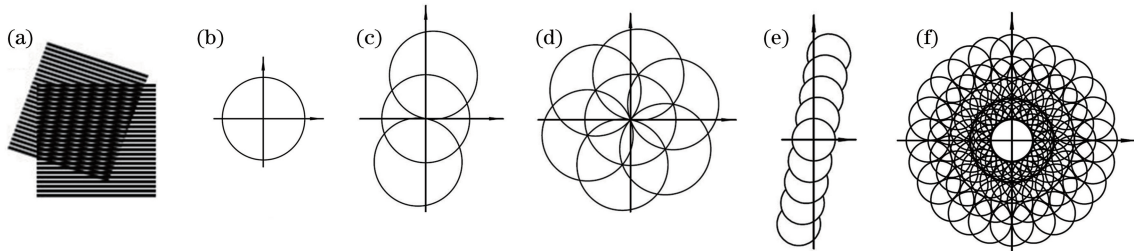


图 1 SIM 技术原理示意图

Fig. 1 Diagram of the principle of SIM

进一步, 当 $N>1$ 时, 系统可实现非线性结构光照明。依然可以从(4)式出发, 各非线性谐波项分别是照明结构光空间频率的二倍频、三倍频乃至更高阶, 这些高阶非线性项将更高空间频率编码到光学系统的低频区域, 相对于线性 SIM 又进一步拓展了整个系统的光学传递函数。若不考虑其他因素(光漂白、系统复杂度等)限制, 一直增大激发光强可无限扩展系统的光学传递函数, 理论上非线性 SIM 不存在分辨率极限^[13]。

2.2 重构算法与伪影优化

SIM 显微成像中需要采集不同方向和不同相位的多幅结构光照明的原始图像进行重构才能得到最终的超分辨图像, 因此图像重构算法非常重要。基于广义维纳滤波的图像重构是目前最常用的 SIM 超分辨图像重构算法, 主要包括图像预处理、频谱分离、频谱配准、频谱融合与图像重构 4 个步骤^[11,24-26]。在 SIM 超分辨重构算法中, 如何抑制重构图像中的伪影、保证图像的真实性是需要重点解决的问题。重构图像中产生伪影的原因主要有^[27-28]: 1) 探测器背景噪声和响应不均匀; 2) 照明结构光强度波动; 3) 各图像间样品漂移; 4) 结构光周期扰动; 5) 各方向角间样品漂移; 6) 结构光参数标定不准确。为确保重构图像的真实性, 需设计补偿算法对上述因素的影响进行校正, 实时标定结构光参数。

1) 预处理。图像预处理包括去背景、强度归一化及图像边缘模糊化等^[27,29]。

为确保结构光参数标定算法的精度, 传统 SIM 算法一般要求原始荧光图像具有较高的信噪比, 通常采用直接减暗背景对原始图像进行预处理。然而, 当原始荧光图像信噪比较低时, 上述预处理步骤重构出的图像中存在很严重的伪影。Chu 等^[29]对低信噪比荧光图像分析发现, 噪声频谱主要集中在坐标原点与沿轴方向, 该区域噪声相对信号更强, 并提出如下优化方案: 设置沿轴向分布陷波器对原始荧光图像频谱滤波后再进行下一步的结构光参数标定, 有效减少重构图像中的伪影。

2) 频谱分离。首先标定结构光调制度和初始相位:①将理想的调制度和相位差代入满足(4)式或(5)式的 $2N+1$ 的线性方程组求解,对各频谱项初步分离;②对 0 级与 ± 1 级频谱重叠区通过交叉关联的方式估算出准确的余弦结构光调制度和初始相位,完成 0 级、 ± 1 级等频谱项的分离。在同一方向角 k_0 中对不同相位 ϕ 结构光的相位估计不准确时,分离出的各阶频谱中就会残留其他频谱成分,造成重构图像中存在网格状伪影。Shroff^[28] 最早提出采用峰值法来标定结构光初始相位,当结构光空间频率超过系统光学传递函数截止频率 85% 时,该方法误差较大,故无法对 TIRF 条件下的结构光初始相位进行标定。针对峰值法的上述缺陷,Kai 等^[24-27] 提出如下优化方案:对频谱分离步骤反复迭代计算,使得 0 级与 ± 1 级频谱重叠区域相关性最强,得到最优初始相位,确保各阶频谱准确分离,避免产生网格状伪影。

3) 频谱配准。将包括 ± 1 级在内的高阶频谱项平移到样品频谱的特定位置以解码出高频成分,平移方向和大小由结构光空间频率 k_0 决定。Heintzmann 等^[12] 最早提出采用质心法标定 k_0 , 可达到亚像素精度。然而,当频谱中相邻两像素同为峰值点时该标定算法无效。在此基础上,Kai 等^[24-25] 提出基于交叉关联法迭代的标定算法,但计算时间较长。为解决上述算法耗时的问题,本文提出如下标定方案:①对 0 级与 ± 1 级频谱交叉关联计算,得到相关性最强的位置即为 k_0 初始位置;②对以初始位置 k_0 为中心的 $M \times M$ 像素区域进行细化,获得 $M^2 \times M^2$ 大小区域,重复步骤①获得亚像素精度定位;③重复细化步骤三次以上即可获得满足精度的 k_0 。此外,为确保频谱平移后解码出的高频成分能够完整保留,在平移前对各阶频谱进行补零,一般扩充一倍。

4) 频谱融合与图像重构。基于广义维纳滤波算法将平移后的高阶频谱与 0 级频谱叠加融合获得拓展频谱,使用合适的窗函数对拓展频谱切趾以消除高频干扰,再进行傅里叶逆变换得到超分辨图像^[11,14,24]。

图 2 所示为线性 SIM 和非线性 SIM 超分辨图像重构算法仿真。图 2(a)~(c)分别为宽场频谱、实域图和选定区域局部放大;图 2(d)~(f)分别为线性 SIM 频谱、实域图和局部放大;图 2(g)~(i)分别为非线性 SIM 频谱、实域图和对应区域局部放大。线性 SIM 重构图像成像分辨率相比宽场成像分辨率有了明显提高,非线性 SIM 重构图像分辨率又相比于线性 SIM 提高一倍。

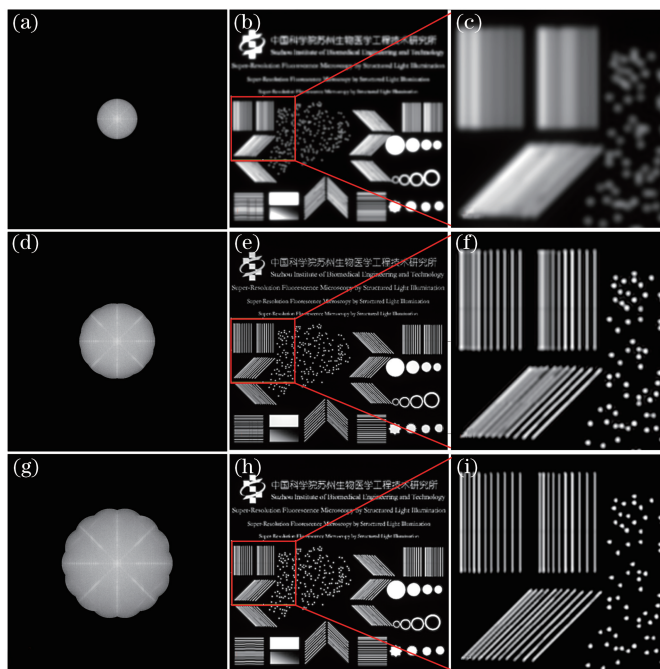


图 2 线性 SIM 和非线性 SIM 成像仿真。(a)~(c)分别为宽场频谱、时域图和局部放大;
 (d)~(f)分别为线性 SIM 频谱、时域图和局部放大;(g)~(i)分别为非线性 SIM 频谱、时域图和局部放大
 Fig. 2 Simulation of linear and non-linear SIM . (a)-(c) Wide field Fourier transform, time domain image
 and its detail view; (d)-(f) linear SIM Fourier transform , time domain image an
 its detail view; (g)-(i) non-linear Fourier transform, time domain image and its detail view

3 Laser-SIM 系统

根据照明光源类型和结构光条纹产生机理的不同, SIM 系统分为非相干成像和相干成像两类^[11,21]。非相干成像 SIM 采用 LED 等非完全相干光源, 将 DMD 阵列上的图像结构直接投影成像在物镜焦平面, 具有结构简单、成本较低、成像速度快等优点, 但是结构光的投影过程受光学调制传递函数(MTF)的限制, 无法产生高对比度精细条纹。而相干成像 SIM 采用激光作为光源, 两束或三束相干光在物镜焦平面干涉形成周期性余弦条纹, 通过在光瞳面加入滤波小孔改变系统的光学传递函数的方式滤除系统对非标称条纹周期的响应产生高对比度余弦条纹。建立了以 LED 为光源的 DMD 结构光照明器, 通过外接普通荧光显微镜搭建非相干投影 SIM 系统^[30], 同时在普通荧光显微镜上搭建了基于激光干涉的相干 SIM 成像系统, 实现全内反射的二维 TIRF-SIM 和非线性 SIM 成像。本文重点讨论激光作为光源、液晶附硅(LCOS)作为光栅的相干 SIM 系统。

Laser-SIM 系统(线性/非线性 SIM 光路共用)光路原理如图 3 所示, 采用 4 路激光(405、488、561、647 nm)对铁电液晶空间光调制器(LCOS)(SXGA-3DM Forth Dimension Displays, 英国)进行照明, 激光经过光纤耦合-准直扩束系统后经偏振分光棱镜(PBS)后垂直投射到 LCOS 上获得相位调制; 衍射光经过傅里叶透镜后在其后焦面上得到频谱; 采用 MASK 滤波系统进行空间滤波, 仅使-1 级和 1 级衍射光通过; 两束光波干涉产生余弦分布的高对比度结构光条纹激发荧光样品。进行三维成像时, 切换 MASK 滤波器让 0 级光和±1 级光同时通过并干涉产生结构光条纹。系统所用物镜为奥林巴斯 NA 1.49、100×浸油 TIRF 物镜。线性 SIM 模式时, 采集三个方向角上三个相位的荧光图像(共 9 张)进行图像重构; 非线性 SIM 模式则采集 6 个方向角上 5 个相位共 30 帧荧光图像。图 4 为线性/非线性 Laser-SIM 系统原理样机, 图 4(a)为系统整体光机结构, 图 4(b)为结构光生成模块。

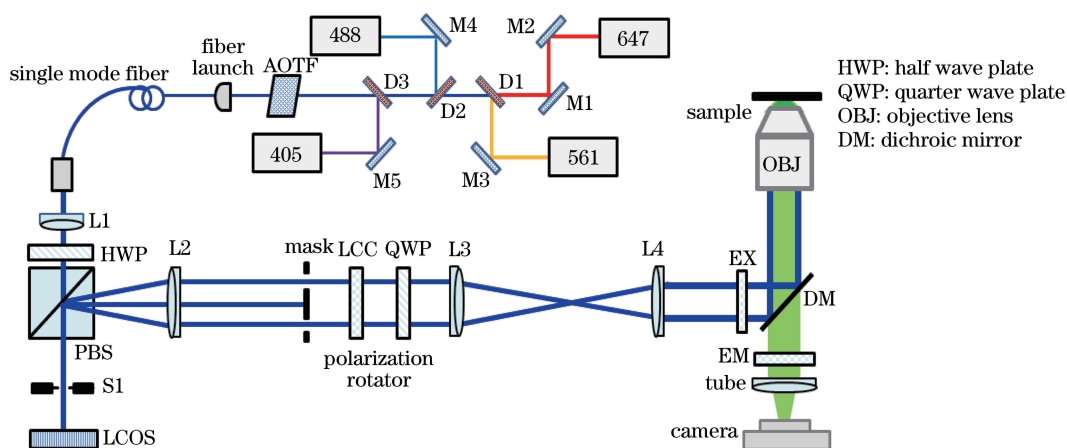


图 3 基于激光和 LCOS 的线性和非线性 SIM 系统

Fig. 3 Linear and non-linear SIM system based on laser and LCOS

4 几个关键问题

4.1 控制系统与同步时序

Laser-SIM 从功能上可分为光源合束模块、结构光生成模块、成像与处理系统、电子学控制系统 4 个子系统。其中, 电子学控制系统主要包括同步控制器、LCOS、声光调制器(AOTF)、成像探测器(sCMOS)、液晶位相延迟器(LCC)、Z 轴位移台以及 405、488、561、647 nm 激光器控制模组。为确保采集到的原始图像的可靠性, 需对 LCOS、AOTF、sCMOS 和 LCC 进行精确同步与切换, 这是线性 SIM 和非线性 SIM 系统控制的核心。开发了基于现场可编程门阵列(FPGA)的电子学控制系统来实现微秒级精度的同步与切换, 图 5 为控制系统总体结构框图。

Laser-SIM 系统工作于线性 SIM 模式时, 重构单帧超分辨率图像需采集三个不同方向角、三个不同相位结构光照明的共 9 帧荧光图像。当在 LCOS 上下载特定方向角及相位的二值化条纹图像时, 要严格控制

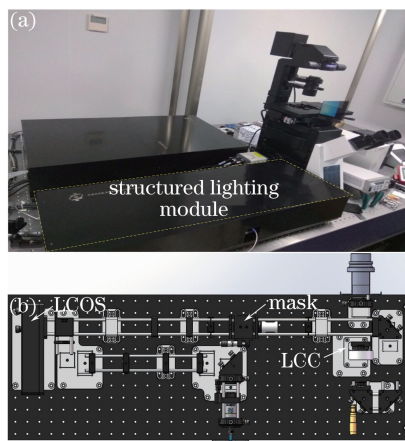


图 4 线性/非线性 Laser-SIM 光机结构。(a) 整体结构；(b) 结构光照明模块

Fig. 4 Opto-mechanical structure of linear and non-linear Laser-SIM. (a) Integral structure; (b) structured light module

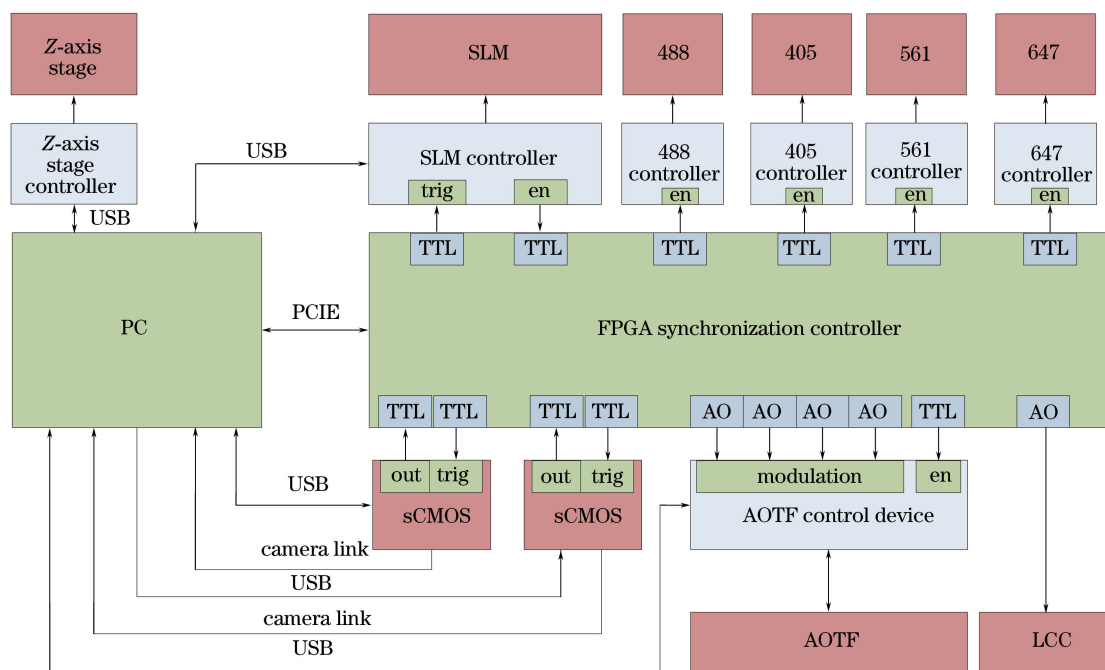


图 5 控制系统总体结构框图

Fig. 5 Overall structure diagram of control system

AOTF 选通某一路激光光源、LCC 需同步调控激发光偏振态为指定方向，sCMOS 相机实时完成荧光图像采集。因此，系统以 LCOS 作为整个同步时序的基准，即 AOTF、LCC 和 sCMOS 触发都以 LCOS 为参考。此外，偏振态调控时因 LCC 的最下时间相应为 10 ms，需给 LCC 预留 10 ms 响应时间。图 6 为线性 SIM 模式下 LCOS 加载 20 ms 序列成像的同步时序。

工作于非线性 SIM 模式时，获得单帧超分辨图像需采集 6 个不同方向角、5 个不同相位结构光照明时的 30 帧原始图像。因非线性 SIM 成像时需先选通 405 nm 激光对荧光样品进行激活，再选通 488 nm 激光对被激活的样品进行激发。因此，完成一张荧光图像的采集需先后控制 405 nm 和 488 nm 激光器各通断一次，本系统利用 AOTF 来控制两路激光的选通。非线性 SIM 模式下 LCOS 加载 20 ms 序列成像的同步时序如图 7 所示。

4.2 偏振调控

目前，绝大多数激光 SIM 系统都采用大 NA 物镜成像，例如奥林巴斯放大倍率 100×、NA 1.49 的 TIRF 油镜 (UAPON 100× OTIRF, Olympus, 日本)。大 NA 物镜干涉成像时激发光偏振态不可忽略^[31-32]。

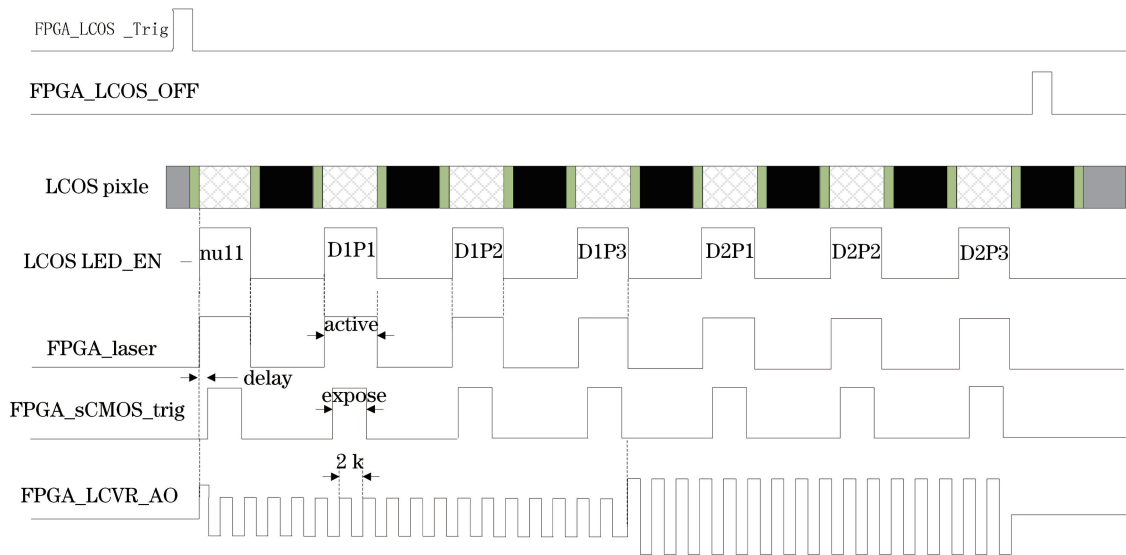


图 6 线性 SIM 模式:LCOS 加载 20ms 序列成像同步时序

Fig. 6 Linear SIM mode: synchronous sequential of LCOS loading 20ms sequence

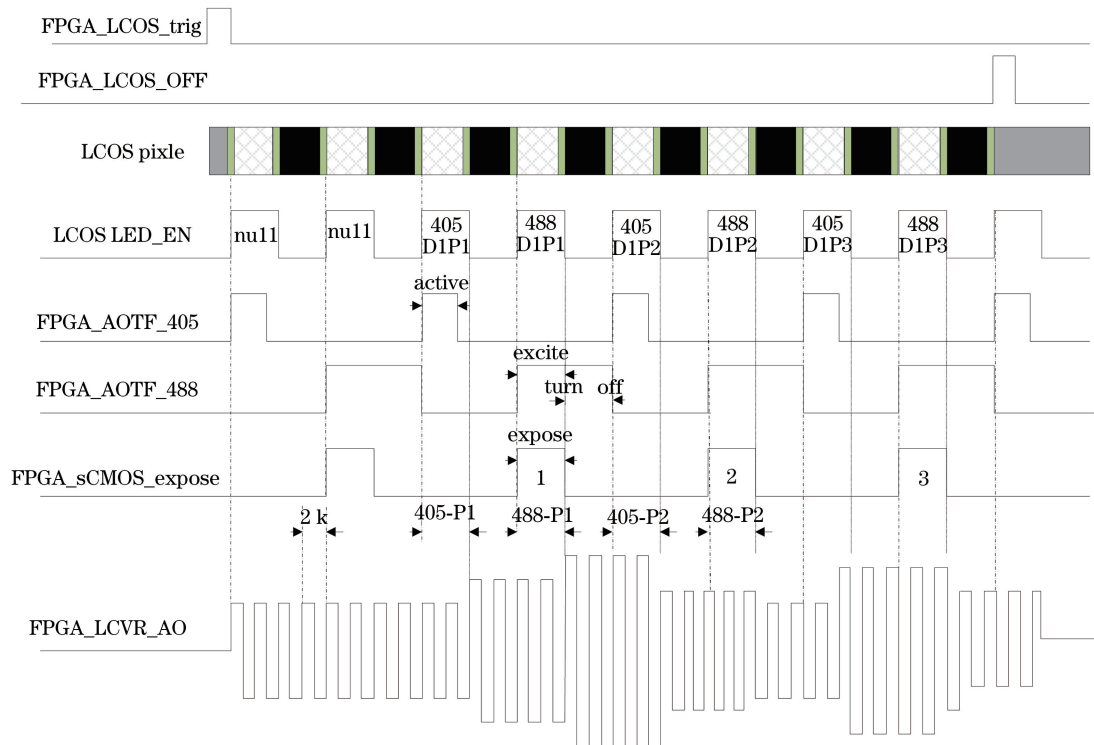


图 7 非线性 SIM 模式:LCOS 加载 20 ms 序列成像同步时序

Fig. 7 Non-linear SIM mode: synchronous sequential of LCOS loading 20ms sequence

如图 8 所示,两束 p 偏振光经大 NA 物镜出射后以接近垂直角度聚焦于焦面时几乎不干涉,没有结构光条纹产生。为确保激发光在焦面上产生高对比度的结构光条纹,需实时调控激发光偏振态保证其与物镜光瞳面垂直(s 偏振光)。通常使用 $\lambda/4$ 波片(QWP)、 $\lambda/2$ 波片(HWP)配合 LCC 实现,使用 Meadowlark Optics 公司生产的 LCC(LVR-200-VIS-TSC-1L, Meadowlark Optics, 美国)。此外,值得注意的是,LCC 调控效果会因温度漂移变化,导致条纹对比度下降。当长时间曝光时,需对 LCC 采取严格的温控措施,如开发闭环温控电路或购买具有温度自动调节功能的 LCC 器件。

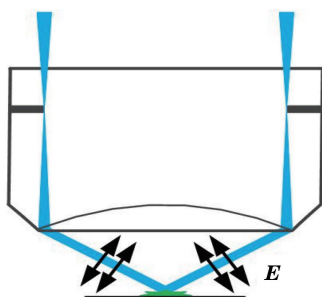


图 8 大 NA 物镜偏振态影响

Fig. 8 Polarization effect of high NA objective

4.3 干涉光斑对称与重合

对 SIM 成像而言,两束干涉光斑在物镜焦平面完全重合时,条纹对比度最高、成像视场最大。光路调节时最常见的两个问题:1)1 级衍射光斑分布不对称。以三个方向角、三个相位的 TIRF-SIM 为例,6 个 1 级衍射光相对于光轴不对称,造成三个方向角结构光条纹对比度不同,甚至某些方向角存在挡光情况;实验上可通过调整物镜转盘转到无物镜位置,切换 SLM 到快速工作模式,让 0 级光通过光路;在物镜接口处安装 0.5~1 m 长且带有口径可调小孔光阑的套筒,迭代调节双反射镜使 0 级光斑无遮挡的通过套筒投射到天花板上并标记位置;再切换物镜转盘至 100× TIRF 物镜,让 0 级和 6 个 1 级光斑同时通过,迭代调节反射镜确保 6 个 1 级光斑对称,完成共轴调节。2)相机成像清晰,对称分布的两干涉光斑不完全重合,结构光条纹仅出现在中间重叠区域,移动物镜使干涉光斑完全重合时则相机成像变得模糊^[32]。在 SLM 上加载半径很小的圆形 Mask 条纹,使探测器上可以看到两个边缘清晰圆斑;沿轴向反复调节物镜和探测面位置,从而确保两干涉光斑完全重合且成像清晰。图 9 为调节干涉光斑对称与重合示意图,图 9(a)、(c)为物镜焦面处于干涉光斑部分重合情况,图 9(b)、(d)为调整后干涉光斑在物镜焦面处完全重合图样,图 9(e)、(f)分别为上述两个状态时对 100 nm 荧光小球成像结果。

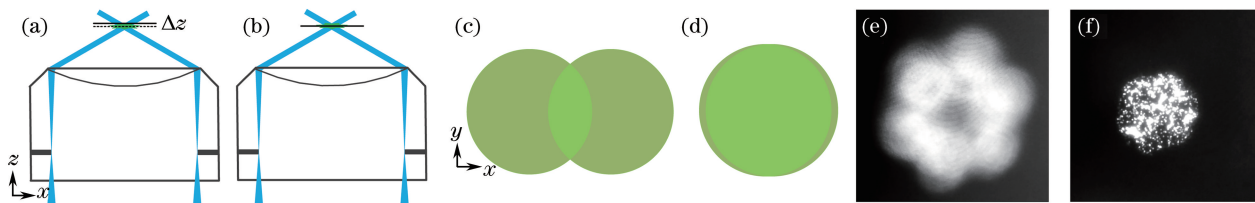


图 9 干涉光斑对称与重合示意图。(a)(c)物镜焦面处于干涉光斑部分重合;(b)(d)物镜焦面处于干涉光斑完全重合;
(e)3 个方向角 1 级光斑对称调节(未重合);(f)3 个方向角 1 级光斑对称调节(重合)

Fig. 9 Diagram of interference speckle symmetry and coincidence. (a)(c) Partly overlapped state in focal plane;
(b)(d) completely overlapped state in focal plane; (e) symmetric adjustment of 1st order speckle
of three orientations(no overlap); (f) symmetric adjustment of 1st order speckle of three orientations(overlap)

5 实验结果

为检验本文 SIM 重构算法的可靠性,使用 3D-SIM(DeltaVision OMX ©, GE Healthcare, 美国)对 alexa fluor488 标记的鬼笔环肽(激发和发射波长分别为 505 和 512 nm)荧光染料标记的小牛肺动脉上皮细胞成像。图 10 所示为开发的线性 SIM 算法与 GE 商用 SIM 系统重构结果比较,图 10(a)为 3D-SIM 宽场成像结果,去卷积结果如图 10(b)所示,图 10(c)所示为 3D-SIM 商用算法重构结果,图 10(d)所示为本文自编算法重构结果,相对于宽场去卷积图样,本文线性 SIM 重构算法与 3D-SIM 算法在重构准确性上相当。

线性 Laser-SIM 系统成像结果如图 11 所示。其中,图 11(a)为激发波长 488 nm 下奥林巴斯放大倍率 100×、NA 1.49 TIRF 物镜(UAPON 100× OTIRF, Olympus, 日本)宽场成像结果,对应的线性 SIM 重构图像如图 11(d)所示,样品为小牛肺动脉上皮细胞、荧光染料为 alexa fluor488 标记的鬼笔环肽(激发和发射

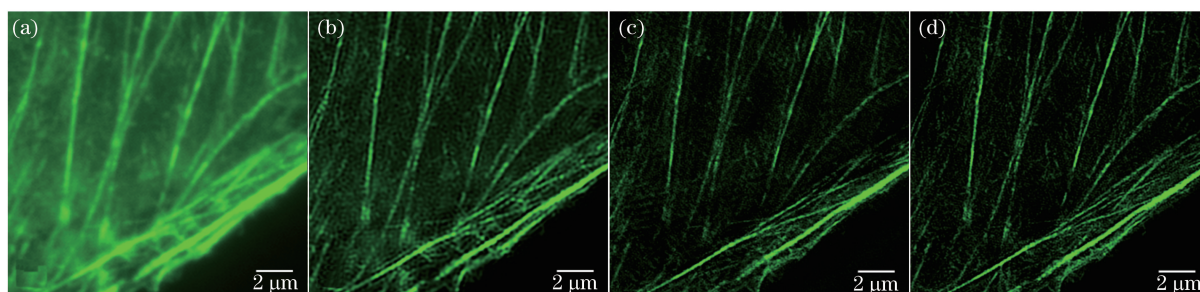


图 10 线性 SIM 算法重构结果分析。(a) 宽场图像;(b) 宽场去卷积;(c) 3D-SIM 算法重构结果;(d) 本文算法重构结果
Fig. 10 Analysis of linear SIM reconstruction results. (a) Wide field image; (b) deconvolution of wide field;
(c) reconstructed image of 3D-SIM algorithm;(d)reconstructed image of proposed algorithm

波长分别为 505 和 525 nm);图 11(b)为激发波长 561 nm 下奥林巴斯放大倍率 100 \times 、NA 1.49 TIRF 物镜(UAPON 100XOTIRF, Olympus, 日本)宽场成像结果,对应的线性 SIM 重构图像如图 11(e)所示,样品为小牛肺动脉上皮细胞、荧光染料为 MitoTracker[®] Red CMXRos(激发和发射波长分别为 579 和 599 nm);图 11(c)为使用奥林巴斯放大倍率 40 \times 、NA 0.75 物镜(UPLFLN 40 \times , Olympus, 日本),在 647 nm 激发光照明时的宽场成像结果,对应的线性 SIM 图像如图 11(f)所示,样品为细胞肌动蛋白微丝、荧光染料为 alexa fluor647 标记的鬼笔环肽(激发和发射波长分别为 650 和 668 nm);可以看出,SIM 重构图像分辨率比宽场图像明显提高。经实验标定,线性 SIM 模式下分辨率最高可达 120 nm 左右(TIRF 物镜:100 \times 、NA 1.49;激发和发射波长分别为 505 和 525 nm)。

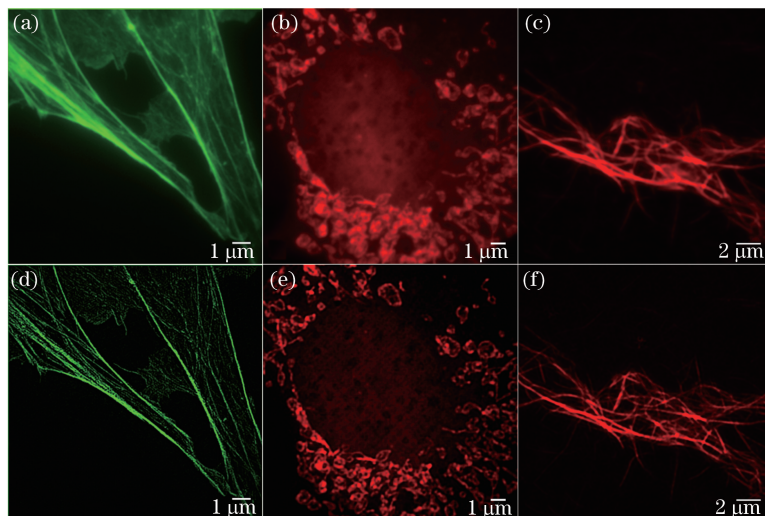


图 11 线性 SIM 成像结果。宽场成像,激发光分别为(a)488 nm、(b)561 nm 和
(c)647 nm;SIM 重构,激发光分别为(d)488 nm、(e)561 nm 和(f)647 nm
Fig. 11 Imaging results of linear SIM. Wide filed images of (a) 488 nm、(b) 561 nm and
(c) 647 nm; reconstructed SIM images of (d) 488 nm、(e) 561 nm and (f) 647 nm

6 结 论

结构光照明荧光显微镜被视为超分辨显微成像在生物医学研究中最有前途的手段。线性 SIM 容易实现且分辨率较传统显微镜提高一倍,不需要特别的荧光标记方法,可以做普通荧光显微成像的样品都可以用来进行 SIM 超分辨成像,因此引起了生物医学研究者的广泛兴趣。非线性 SIM 有效弥补了线性 SIM 无法解析 100 nm 以下尺度生物结构的不足。SIM 技术未来的发展方向将取决于应用需求,成像装置将朝着多种成像方式(如 SIM-STORM、光片 SIM 等)融合的方向发展,图像重构算法则在传统算法基础上朝着正则化图像复原方向演变。可以预见,随着 SIM 技术和新型荧光探针的发展,当前活细胞成像观测中光漂白、光

毒性以及时间分辨率低等问题将逐步解决, SIM 技术也将在生物医学研究, 尤其是活细胞动态成像中发挥更重要的作用。

参 考 文 献

- [1] Pawley J. Handbook of biological confocal microscopy[M]. Heidelberg: Springer, 2010.
- [2] González S, Halpern A. Laser-scanning confocal microscopy[M]. Heidelberg: Springer, 2007: 39-46.
- [3] Rayleigh L. Investigations in optics, with special reference to the spectroscope[J]. Philosophical Magazine, 1879, 8(49): 261-274.
- [4] Huang B, Wang W, Bates M, *et al.* Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy[J]. Science, 2008, 319(5864): 810-813.
- [5] Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. Nature Methods, 2006, 3(10): 793-795.
- [6] Betzig E, Patterson G H, Sougrat H, *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution[J]. Science, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [7] Hess S T, Girirajan T P K, Mason M D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy[J]. Biophysical Journal, 2006, 91(11): 4258-4272.
- [8] 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.
- [9] Klar T A, Jakobs S, Dyba M, *et al.* Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(15): 8206-8210.
- [10] Heintzmann R, Cremer C G. Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating[C]. Proceedings of the SPIE, 1999, 3568: 185-196.
- [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] Heintzmann R, Jovin T M, Cremer C. Saturated patterned excitation microscopy—a concept for optical resolution improvement[J]. Journal of the Optical Society of America A: Optics Image Science & Vision, 2002, 19(8): 1599-1609.
- [13] Gustafsson M G L. 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.
- [14] Hirvonen L, Mandula O, Wicker K, *et al.* Structured illumination microscopy using photoswitchable fluorescent proteins[C]. Proceedings of the SPIE, 2008, 6861: 68610L.
- [15] Rego E H, Lin S, 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 of the United States of America, 2011, 109(3): E135-E143.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] Fiolka R, Shao L, Rego E H, *et al.* Time-lapse two-color 3D imaging of live cells with doubled resolution using structured illumination[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(14): 5311-5315.
- [21] Dan D, Lei M, Yao B, *et al.* DMD-based LED-illumination super-resolution and optical sectioning microscopy[J]. Scientific Reports, 2013, 3: 1116.
- [22] Li D, Shao L, Chen B C, *et al.* Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal

- dynamics[J]. *Science*, 2015, 349(6251): 527.
- [23] Heintzmann R, Benedetti P A. High-resolution image reconstruction in fluorescence microscopy with patterned excitation[J]. *Applied Optics*, 2006, 45(20): 5037-5045.
- [24] Kai Wicker. Non-iterative determination of pattern phase in structured illumination microscopy using auto-correlations in Fourier space[J]. *Optics Express*, 2013, 21(21): 24692-24701.
- [25] Müller M, Mönkemöller V, Hennig S, *et al.* Open-source image reconstruction of super-resolution structured illumination microscopy data in image[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10980.
- [26] Kai W. Increasing resolution and light efficiency in fluorescence microscopy[D]. London: King's College, 2010.
- [27] Shroff S A, Fienup J R, Williams D R. Phase-shift estimation in sinusoidally illuminated images for lateral superresolution[J]. *Journal of the Optical Society of America A: Optics Image Science & Vision*, 2009, 26(2): 413-424.
- [28] Shroff S A, Fienup J R, Williams D R. Lateral superresolution using a posteriori phase shift estimation for a moving object: experimental results[J]. *Journal of the Optical Society of America A: Optics Image Science & Vision*, 2010, 27(8): 1770-1782.
- [29] Chu K, Mcmillan P J, Smith Z J, *et al.* Image reconstruction for structured-illumination microscopy with low signal level[J]. *Optics Express*, 2014, 22(7): 8687-8702.
- [30] Lu Weimin. Optimization of structured illumination light field and characterization of system point spread function in structured illumination microscopy (SIM) [D]. Changchun: Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, 2015.
鹿伟民. SIM 显微镜照明结构光场优化与系统点扩散函数表征[D]. 长春: 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 2015.
- [31] Heintzmann R. Structured illumination methods[M]. New York: Springer, 2010: 265-279.
- [32] Young L J, Ströhl F, Kaminski C F. A guide to structured illumination TIRF microscopy at high speed with multiple colors[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(111): 53988.