

结合去卷积的艾里光束片状光显微成像研究

徐 豪^{1,2}, 张运海¹, 张 欣¹, 肖 昀¹, 黄 维¹

¹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;

²中国科学院大学, 北京 100049

摘要 为了解决传统高斯光束片状光照明显微成像技术高轴向分辨率时视场范围(FOV)小的问题, 结合艾里光束片状光照明样本成像与去卷积算法, 实现了光片显微镜对样本的高轴向分辨率大视场成像。数值模拟了高斯光束与艾里光束经过物镜聚焦后的光强分布。搭建实验光路系统, 在液晶空间光调制器上加载三次相位图生成艾里光束, 并扫描光束生成片状光照明荧光微球、染色的斑马鱼肌肉组织进行成像实验。在艾里光束光片显微镜成像结果基础上, 建立去卷积算法进行图像恢复, 克服了艾里光束光片显微镜成像范围大但轴向分辨率不高的问题, 对荧光微球成像, 探测放大倍率为 42 倍, FOV 从高斯光束光片显微镜的 25 μm 扩大到 208 μm ; 对染色的斑马鱼肌肉组织进行成像, 探测放大倍率为 53 倍, FOV 由 20 μm 扩大到 167 μm 。仿真和实验表明, 通过艾里光束光片显微镜与去卷积算法的结合可以在扩展光片显微镜成像视场的同时提高轴向分辨率。

关键词 显微; 荧光显微镜; 视场扩展; 艾里光束; 轴向分辨率

中图分类号 TH742 **文献标识码** A

doi: 10.3788/AOS201737.0318013

Airy Beam Light Sheet Microscopy with Deconvolution

Xu Hao^{1,2}, Zhang Yunhai¹, Zhang Xin¹, Xiao Yun¹, Huang Wei¹

¹Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China;

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract In order to form an extended light sheet to provide high resolution across a large field of view (FOV), the combination of Airy beam light sheet illumination and deconvolution arithmetic is proposed. The light intensity distributions of Gaussian beam and Airy beam in the focal plane of the objective are numerically simulated. The light sheet microscope setup is constructed. Airy beam is created by modulating the wavefront with a cubic polynomial function, and fluorescent microspheres and stained zebrafish musculature are imaged. Finally, based on the pictures imaged by Airy light sheet microscopy, deconvolution arithmetic is built to improve the axial resolution. For fluorescent microspheres (the amplification is 42), the FOV is extended from 25 μm to 208 μm . For labeled zebrafish musculature (the amplification is 53), the FOV is extended from 20 μm to 167 μm . The experimental result and numerical simulation all suggest that the FOV of the system can be extended with high resolution.

Key words microscopy; fluorescence microscope; extending field of view; Airy beam; axial resolution

OCIS codes 180.2520; 100.5010; 180.6900

1 引 言

光片显微镜是一种新型的光学显微镜。与传统的落射式光学显微镜相比, 光片显微镜的片状光照明方式与荧光探测方式都有明显的差异(光片显微镜的探测光路与照明光路相垂直)。照明光束通过柱面透镜生成片状光束或通过振镜扫描光束生成了一个厚度很薄的片状光束, 该激发光束被限制在探测物镜焦面附近

收稿日期: 2016-09-12; **收到修改稿日期:** 2016-11-17

基金项目: 国家重大科研装备研制项目(ZDY22013-1)、江苏省六大人才高峰资助项目(2012-swyy-020)

作者简介: 徐 豪(1990—), 男, 硕士研究生, 主要从事光学显微镜方面的研究。E-mail: 18552441906@163.com

导师简介: 张运海(1975—), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事激光扫描共聚焦显微镜成像, 超分辨显微光学方面的研究。E-mail: zhangyh@sibet.ac.cn(通信联系人)

的一个窄带内,光片照明样本,探测光路在与照明光路相垂直的方向进行荧光探测^[1]。光片显微镜成像速度快,轴向分辨率高,光毒性效应与光漂白性弱,对于生命科学研究有着非常重要的意义^[2]。

尽管光片显微镜在生物样本成像中优势突出,但其成像轴向分辨率与视场范围却相互制约。由于光片形状与照明物镜直接相关,光片厚度会随着视场的增大而相应变厚,导致在扩大视场的时候,系统的轴向分辨率有所损失^[3]。科研人员一直在探索有效扩展视场的方法,从而提高光片显微镜性能。Dean 等^[4]提出了一种利用变焦镜头进行快速变焦,从而实现对样本的宽视场光片显微成像,但变焦镜头在沿着照明光轴快速扫描时,会将片状光束较厚的部分叠加在较薄的光片部位。Fahrbach 等^[5-6]提出了利用贝塞尔光束的非衍射性质进行光片显微镜视场的扩展。这种方法与高斯光束的光片显微镜成像相比,视场扩展效果明显。但是贝塞尔光束本身具有旁瓣,旁瓣激发探测物镜非焦面处的样本发出荧光,使得焦面处样本发出的荧光受到干扰,背景噪声增大且系统信噪比降低。徐豪等^[7]提出了一种利用后期图像拼接的方法实现对样本的大视场成像。即首先对样本不同位置分别成像,再将这些图像进行剪裁拼接得到一个宽视场成像结果。这种方法在保证轴向分辨率与层切能力的前提下对视场进行了扩大。但是由于每一张宽视场成像结果都是由多张小视场图片剪裁和拼接形成的,因此,对于一个完整的样本成像结果而言,很多时间花费在图像的多次采集与图像拼接过程中,损失了获取一张完整样本成像图片的时间。

本文针对传统高斯光束片状光照明显微成像技术轴向分辨率和成像视场范围小的问题,通过三次相位调制高斯光束生成艾里光束,并扫描形成片状光对样本进行成像,最后对成像结果进行去卷积处理,恢复图像,提高了轴向分辨能力。将艾里光束片状光照明样本成像与去卷积算法相结合,实现了在扩展视场的同时恢复图像轴向分辨率,从而改善光片显微镜性能。

2 原理与方法

激光光束一般是高斯光束,而高斯光束光片显微镜是由高斯光束生成片状光照明样本成像。样本在很窄的范围内被激发出荧光,同时探测光路在与照明光路相垂直的方向进行荧光探测。

高斯光束光片显微镜的视场大小为^[7]

$$F_{\text{Gaussian}} = 4 \frac{\lambda_{\text{exc}} \times n}{NA_{\text{exc}}^2}, \quad (1)$$

式中 λ_{exc} 为照明光束波长, n 为折射率, NA_{exc} 为照明物镜数值孔径。

高斯光束形成光片的厚度为

$$d = \frac{\lambda_{\text{exc}}}{2NA_{\text{exc}}}. \quad (2)$$

片层光照明显微镜探测光路的横向分辨率为

$$a = \frac{\lambda_{\text{em}}}{2NA_{\text{det}}}. \quad (3)$$

光片显微镜探测光路的轴向分辨率 r 为^[8]

$$r = \frac{1}{1/d + n(1 - \cos \theta_{\text{det}}) / \lambda_{\text{em}}}, \quad (4)$$

$$\sin \theta_{\text{det}} = \frac{NA_{\text{det}}}{n}, \quad (5)$$

式中 NA_{det} 为探测物镜数值孔径, λ_{em} 为激发样本发出的荧光波长, θ_{det} 为探测物镜孔径角。

由(2)~(5)式可知,横向分辨率与激发样本发出的荧光波长和探测物镜数值孔径 NA_{det} 有关。轴向分辨率由片状光厚度 d 与探测物镜数值孔径 NA_{det} 共同决定,而片状光厚度 d 取决于照明物镜数值孔径 NA_{exc} 。 d 随着 NA_{exc} 减小而变大(即 d 随着视场变大而变大),从而导致探测光路的轴向分辨能力的损失。

由(1)~(5)式可得,当 488 nm 激光通过数值孔径为 0.3 的照明物镜(浸水物镜, $n = 1.33$)照明样本,由数值孔径为 0.5 的探测物镜接收荧光 $\lambda_{\text{em}} = 515$ nm 时,高斯光束光片显微镜的轴向分辨率与视场大小的关系如图 1 所示。从图中可以看到,若扩大高斯光束光片显微镜的视场范围,则势必导致系统轴向分辨率的损

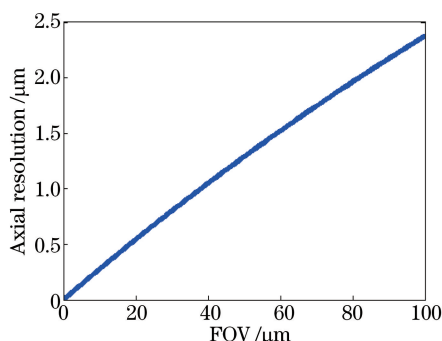


图1 光片显微镜的视场与轴向分辨率关系图

Fig. 1 Relationship between the FOV and axial resolution of light sheet microscope

失,反之,若追求系统轴向分辨率,则可成清晰像的视场范围就会被压缩。因此高斯光束光片显微镜需要平衡轴向分辨率与视场区域。

结合(1)~(5)式,当 488 nm 激光通过数值孔径为 0.3 的照明物镜(浸水物镜, $n = 1.33$)照明样本,由数值孔径为 0.5 的探测物镜接收荧光 $\lambda_{em} = 515$ nm,则视场大小为 28.85 μm ,视场范围内的轴向分辨率为 0.75 μm 。在视场范围内,光片显微镜可以达到很高的轴向分辨率,然而一旦超过这个范围,光片显微镜成像的轴向分辨率就会急剧下降。

艾里光束是一种无衍射光束,在一定传播范围内,这种光束横截面的光强分布基本保持不变^[9]。艾里光束除了无衍射特性之外还有自弯曲特性和自愈的奇异特性^[10-11]。由于其无衍射特性,利用艾里光束形成片状光照明样本成像可以在很长一段范围内保持成像的最佳轴向分辨率,从而扩大视场范围。

加载三次相位图的空间光调制器(SLM)调制高斯光束生成艾里光束,艾里光束又由振镜扫描形成片状光,如图 2 所示。

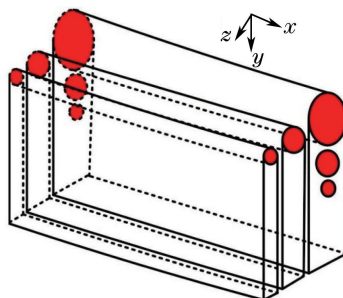


图2 艾里光束片状光示意图

Fig. 2 Schematic of Airy beam light sheet

三次相位调制函数为^[12]

$$P(u, v) = \exp [2\pi i \alpha (u^3 + v^3)], \quad (6)$$

式中 u, v 是光瞳面二维坐标, α 是无衍射传播系数。

艾里光束光片显微镜的视场为^[13]

$$F_{\text{Airy}} = \frac{6\alpha\lambda_{\text{exc}}/n}{1 - \sqrt{1 - (NA_{\text{exc}}/n)^2}}. \quad (7)$$

结合(6)、(7)式, $NA_{\text{exc}} = 0.3$, 激发波长 $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm, 折射率 $n = 1.33$, α 取 5, 则艾里光束光片显微镜视场范围达到了 427.15 μm 。

贝塞尔光束是一种无衍射光束。贝塞尔光束片状光照明显微术可以实现视场的扩展,然而贝塞尔光束的环形旁瓣使得成像结果受到探测物镜非焦面位置处的荧光干扰,背景噪声增大,系统信噪比降低。为了克服贝塞尔光束环形旁瓣带来的影响,常常需分别结合双光子激发,结构光照明或者结合共聚焦探测技术。

贝塞尔光束光片显微镜的视场 F_{Bessel} 为^[14]

$$F_{\text{Bessel}} = \frac{\lambda_{\text{exc}}/n}{2[1 - \sqrt{1 - (NA_{\text{exc}}/n)^2}]\beta}, \quad (8)$$

$$\beta = \frac{\omega}{R}, \quad (9)$$

式中 ω 是照明物镜光瞳半径, R 是生成贝塞尔光束的环形光阑宽度。当 β 选取 0.05 时, 生成的贝塞尔光束最接近理论上的贝塞尔光束。 α 取值大于 1.7 时, 结合(7)式可知, 艾里光束片状光照明显微镜得到的视场就要比贝塞尔光束片状光照明样本得到的视场要大。本文中 α 取 5。

艾里光束与贝塞尔光束片状光照明显微镜的视场范围不同。艾里光束可以在更长的一段距离内保持截面的光强分布, 进而可以在更大的范围内进行去卷积处理, 在更大的范围内恢复轴向分辨率, 实现高轴向分辨率的大视场成像。

照明物镜的数值孔径 0.3, 激发波长 488 nm, 折射率 1.33, 通过光束矢量衍射积分仿真出物镜焦面处的光强分布^[15], 结果如图 3 所示。光强用 $|E|^2$ 表示。图 3(a)~(c) 显示沿照明光轴高斯光束聚焦在 0, 30, 60 μm 时探测光路光轴位置处的光束横截面强度分布, 相对于焦面位置 0, 30, 60 μm 处的光斑分别发散了 15 倍和 30 倍。可以看出, 高斯光束光片显微镜对样本成像可以在一定范围内(视场)达到很高的轴向分辨率, 但是一旦超过这个范围, 随着点扩展函数(PSF)的发散, 成像的轴向分辨率会急剧下降。如图 3(d)~(f)

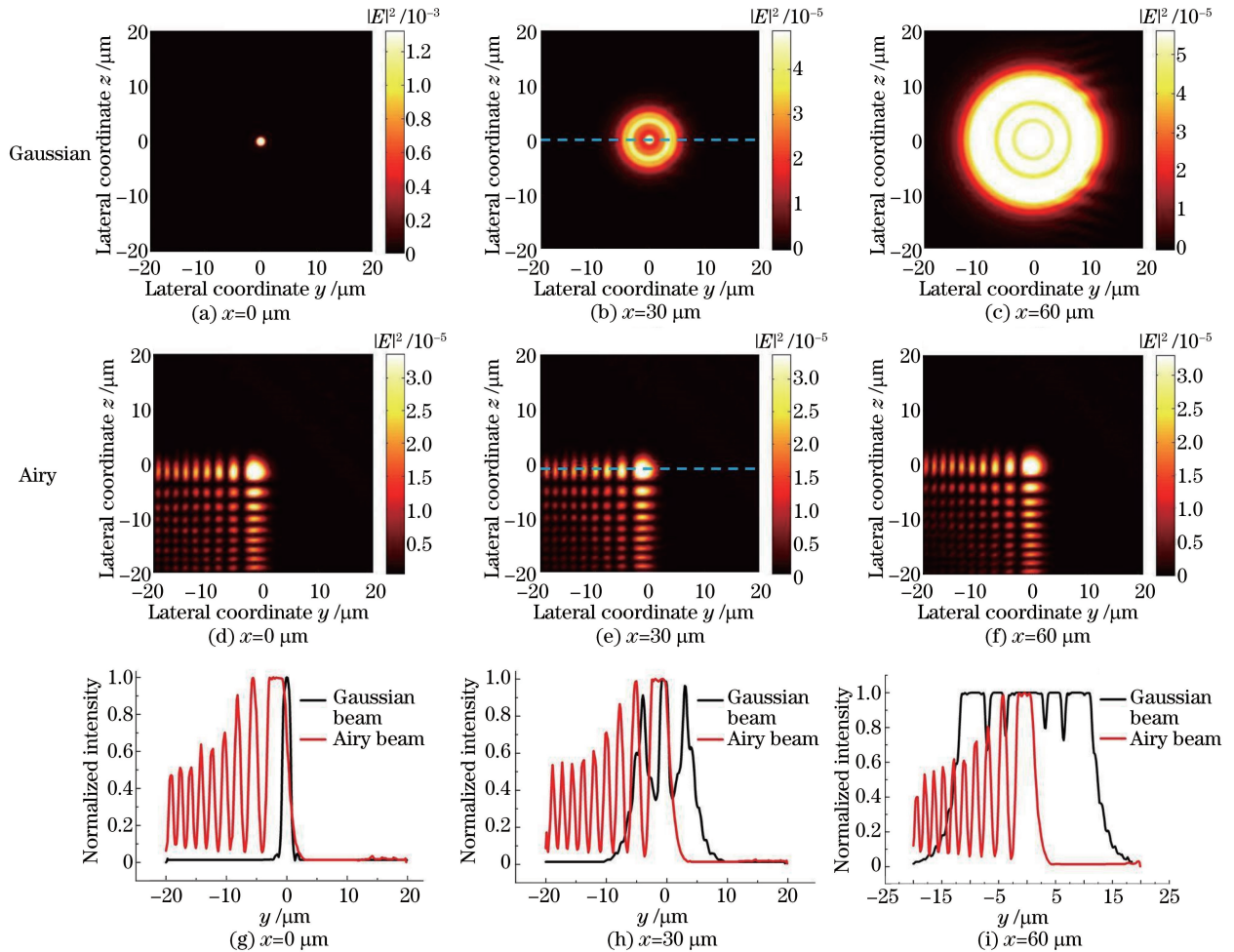


图 3 物镜聚焦面 $x=0, 30, 60 \mu\text{m}$ 处光强分布的数值仿真。(a)~(c) 高斯光束经物镜聚焦后 yz 面光强分布; (d)~(f) 艾里光束经物镜聚焦后 yz 面光强分布; (g)~(i) 高斯光束与艾里光束的光强分布比较

Fig. 3 Simulated results of the excitation beam focused by the lens when $x=0, 30, 60 \mu\text{m}$.

(a)-(c) Gaussian beam intensity distributions; (d)-(f) Airy beam intensity distributions; (g)-(i) comparison of Gaussian beam and Airy beam intensity distributions

所示,艾里光束沿照明光轴聚焦在 $0\sim 60\ \mu\text{m}$ 时光斑形状几乎没有发生改变,只是由于艾里光束的自弯曲特性,位置有了微小的偏差。当利用具有无衍射性质的艾里光束进行片状光照明样本成像时,可以在相对较宽的一段范围内保持成像的轴向分辨率,从而扩大视场范围。然而,由艾里光束在通过物镜聚焦后的光强分布可知,它形成的光片厚度比高斯光束形成的光片厚,如图 3(d)~(f)所示。通过(4)式可以看到,尽管艾里光束光片显微镜的视场范围扩大,但相比于高斯光束光片显微镜在视场范围内的成像来说,其轴向分辨能力较差。

卷积是一种积分变换的数学方法,光学系统成像结果是物与系统 PSF 卷积的结果。PSF 与物卷积后导致成像模糊,降低了成像的分辨率。通过适当的去卷积技术可以对图像进行还原。

由于其无衍射性质,艾里光束经过物镜聚焦后的 PSF 会在很长一段距离内保持不变。根据光学系统成像原理,在计算出艾里光束 PSF 后,可以通过去卷积技术对艾里光束光片显微镜成像结果进行复原,从而在大视场范围内提高轴向分辨率。对于数值孔径较大的照明物镜而言,对于高斯光束无法采用去卷积的方法提高图像质量,原因是高斯光束在经过物镜聚焦后,光强分布会随着照明光轴位置移动而变化,发散严重[图 3(a)~(c)],PSF 形状和大小不固定,并且视场范围以外的成像质量下降严重,故无法在大范围内利用去卷积技术进行图像复原。

结合(1)式,当 $NA_{\text{exc}}=0.1, \lambda_{\text{exc}}=488\ \text{nm}, n=1.33$ 时, F_{Gaussian} 为 $260\ \mu\text{m}$ 。

结合(7)式,当 $NA_{\text{exc}}=0.3, \lambda_{\text{exc}}=488\ \text{nm}, n=1.33$ 时, α 取为 3, F_{Airy} 为 $260\ \mu\text{m}$ 。

此时高斯光束片层光系统与艾里光束片层光系统具有相同的有效视场 $260\ \mu\text{m}$ 。根据上述条件,通过光束矢量衍射积分分别仿真物镜焦面处的光强分布,结果如图 4 所示。

图 4(a)~(c)为沿照明光轴高斯光束聚焦在 $-130, 0, 130\ \mu\text{m}$ 时光束横截面强度分布。图 4(d)~(f)为沿照明光轴艾里光束聚焦在 $-130, 0, 130\ \mu\text{m}$ 时光束横截面强度分布,艾里光束沿照明光轴聚焦光斑形状没有发生太大改变,只是由于艾里光束的自弯曲特性,位置有了偏差。当利用具有无衍射性质的艾里光束进行片状光照明样本成像时,可以在相对较宽的一段范围内保持成像的轴向分辨率,从而扩大视场范围。结合图 4(g)~(i)可知,在照明光路光轴 $-130, 130\ \mu\text{m}$ 位置处(有效视场边缘),由艾里光束通过物镜聚焦后形成的光片厚度比高斯光束形成的光片薄,相比于高斯光束光片显微镜在视场范围内的成像来说,其轴向分辨能力更好。

根据光学系统成像特点,选择维纳滤波器对艾里光束光片显微镜成像结果进行去卷积。维纳滤波器是一种基于最小均方误差准则的估计器。维纳滤波器的输出与期望输出之间的均方误差最小,因此可用于艾里光束光片显微镜成像结果的去卷积复原^[16]。

维纳滤波器为

$$H_w(x, \nu) = \frac{H(x, \nu)^*}{|H(x, \nu)|^2 + R(\nu)^{-2}}, \quad (10)$$

$$R(\nu) = 2NA/(\lambda\nu), \quad (11)$$

式中 $H(x, \nu)$ 是系统光学传递函数, * 代表取共轭复数, $R(\nu)$ 是信噪比, ν 是频域坐标, x 是空域坐标。光学传递函数可以通过 PSF 的傅里叶变换得到。又因为卷积在频域中相当于简单的乘积运算,因此整个去卷积过程在频域中进行计算。计算步骤如下:

- 1) 计算 x_y 面 PSF(图 3),并将其进行傅里叶变换得到光学传递函数 $H(x, \nu)$;
- 2) 结合(11)式计算光学系统成像结果的信噪比 $R(\nu)$;
- 3) 结合(10)式,由 $H(x, \nu)$ 和 $R(\nu)$ 计算得到维纳滤波器 $H_w(x, \nu)$;
- 4) 将待处理的成像结果进行傅里叶变换,并与维纳滤波器 $H_w(x, \nu)$ 进行乘积运算;
- 5) 将步骤 4)中得到的结果进行傅里叶逆变换,得到图像去卷积复原结果。

当调制传递函数 $F_A(\nu_z)$ 单调递减至 5% 时达到频率阈值 ν_z 。艾里光束的轴向分辨率 r 可表示为

$$r = \frac{\lambda}{2NA \cdot \nu_z}, \quad (12)$$

$$F_A(\nu_z) = \frac{1}{\sqrt{48|\alpha\nu_z|}}. \quad (13)$$

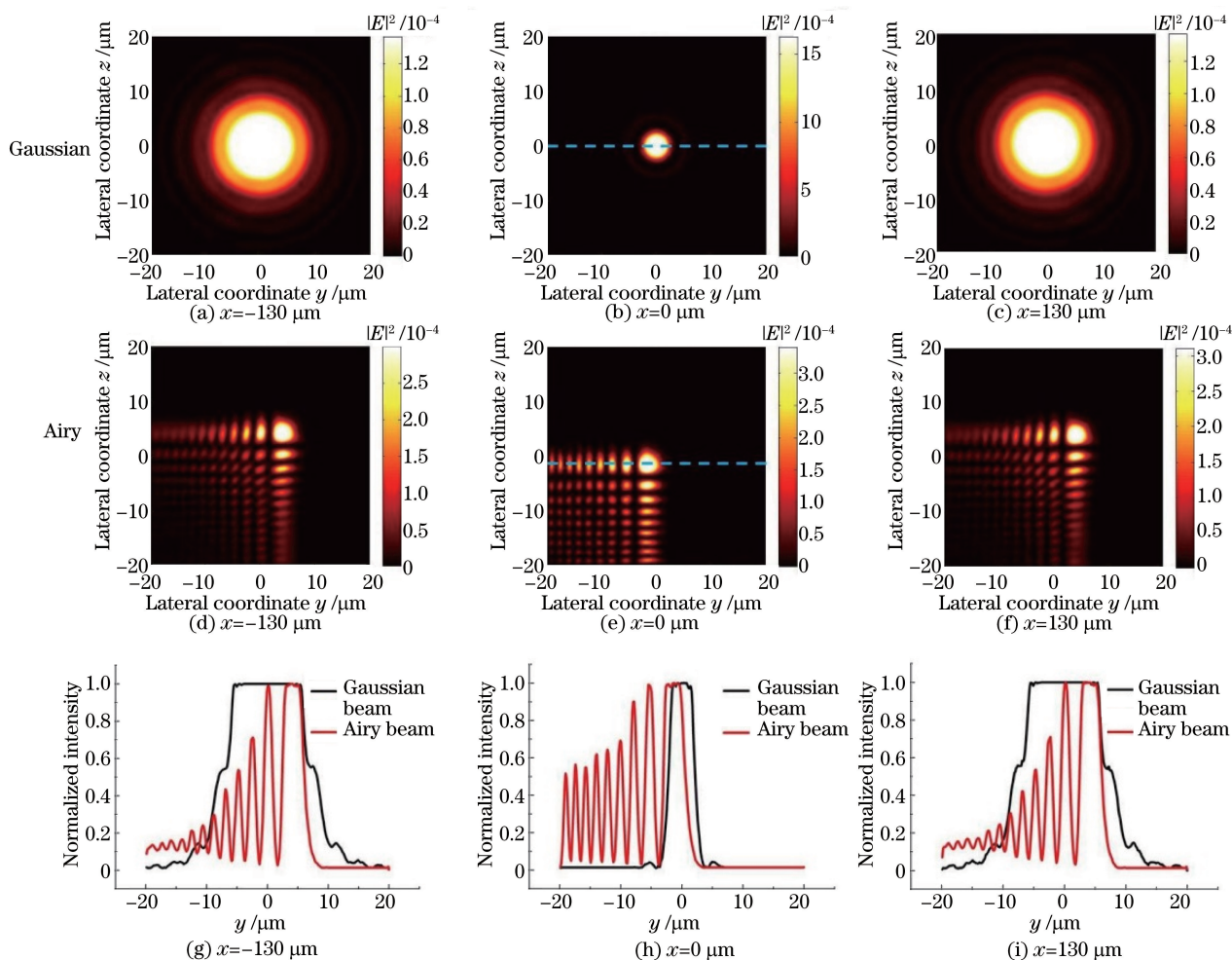


图4 物镜聚焦面 $x = -130, 0, 130 \mu\text{m}$ 处光强分布的数值仿真。(a)~(c) 高斯光束经物镜聚焦后 yz 面光强分布；(d)~(f) 艾里光束经物镜聚焦后 yz 面光强分布；(g)~(i) 高斯光束与艾里光束的光强分布比较

Fig. 4 Simulated results of the excitation beam focused by the lens when $x = -130, 0, 130 \mu\text{m}$.

(a)-(c) Gaussian beam intensity distributions; (d)-(f) Airy beam intensity distributions;

(g)-(i) comparison of Gaussian beam and Airy beam intensity distributions

由(12)、(13)式可知,当 $\alpha = 8.33$ 时,艾里光束刚好达到轴向衍射极限。随着 α 的增大,轴向分辨能力变差。本文中 $\alpha = 5$,系统仍然具有较高的分辨能力,可以利用去卷积算法进行图像复原^[17]。

3 成像实验与结果

3.1 荧光微球成像

如图5所示搭建了实验光路系统,并对荧光微球进行了成像实验。将500 nm 荧光微球(Life Technologies公司)融入质量分数为1%的琼脂糖溶液中,以体积比1:1000均匀混合,降温凝固成凝胶作为实验成像样本。如图5所示,由488 nm 激光器发出的激光经过偏振片得到符合液晶空间光调制器(Reference Model P512-0635-DVI-60Hz, Boulder Nonlinear Systems公司)偏振要求的线偏振光。将三次相位图($\alpha = 5$)加载在空间光调制器后,经过调制的光束通过振镜扫描光束的方式生成片状光。光片通过照明物镜(UMPLFLN, 10 \times , NA = 0.3, Olympus公司)激发样本发出荧光。在探测方向上,样本发出的荧光依次通过探测物镜(UMPLFLN, 20 \times , NA = 0.5, Olympus公司)、筒镜、二级放大透镜、荧光滤色块(ET525/30M, Chroma ATE公司),最后由制冷CCD(DR-328G-C01-SIL, Andor公司)接收荧光成像。

为了说明艾里光束光片显微镜对视场的扩展效果,对荧光微球成像进行了三组对比实验:1)高斯光束片状光照明样本成像(SLM不加载相位图);2)艾里光束片状光照明样本成像(在SLM上加载三次相位图);

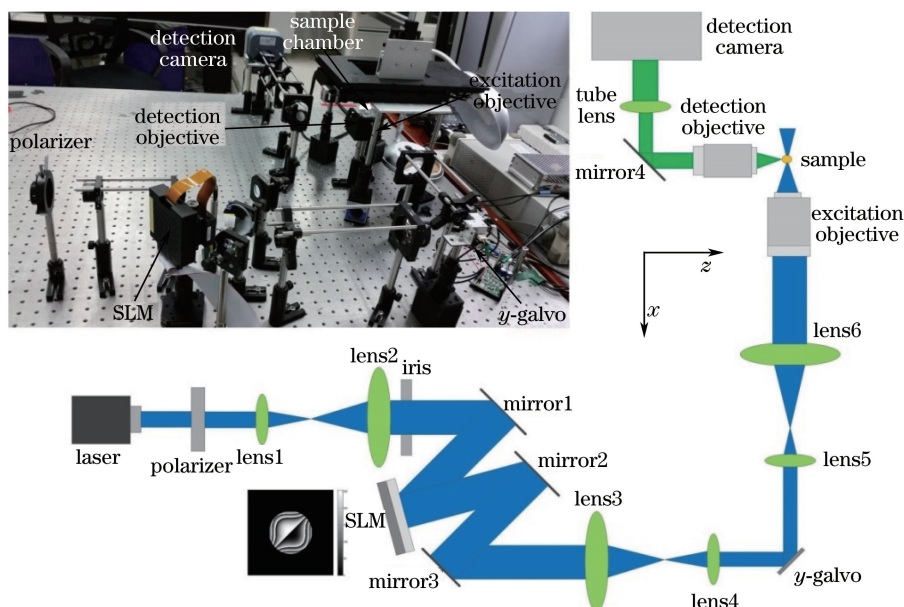


图5 实验光路原理图与实验光路实物图

Fig. 5 Schematic and photo of the experimental system

3) 艾里光束片状光照明样本成像, 并对成像结果进行去卷积处理。

为了比较实验系统的轴向分辨率, 对样本成像进行三维重建, 并选择在 xz 面中的成像结果进行分析 (z 轴方向为探测光路光轴方向)。通过 C# 编程设计了一个控制程序, 可以对 CCD 和精密电动位移台自动控制。探测 CCD 的曝光时间设置为 0.01 s, 成像系统放大倍率为 42。在进行成像数据采集时, 通过控制精密电动位移台移动, 以 $0.2 \mu\text{m}$ 为步距沿 z 轴移动样本, 并拍摄 200 张图片, 再通过 Imaris 软件对这些样本成像图片进行三维重建。

光学系统成像结果是物与系统 PSF 卷积的结果, PSF 与物卷积后导致成像模糊, 降低了成像的分辨率。针对导致图像失真的原因对图像进行反处理(去卷积处理)可以对图像进行复原, 而系统 PSF 是去卷积恢复图像的关键因素。具有无衍射性质的艾里光束经过物镜聚焦后, PSF 会沿视场方向有微小变化。因此在对图像进行去卷积处理时, 首先将整个视场分为 3 个部分, 然后分别计算出每一个部分的 PSF, 并分别针对各自区域进行去卷积处理, 从而可以实现对整幅图片的精确恢复, 抑制去卷积带来的虚假信号。

实验结果分析如图 6 所示。图 6(a)、(c) 分别是高斯光束片状光照明样本成像结果、艾里光束片状光照明样本成像结果、在艾里光束片状光照明样本成像结果的基础上再进行去卷积处理后的图像。图 6(d) 是图 6(a) 中黄色方框内荧光微球沿虚线的相对光强分布。图 6(e) 是图 6(b)、(c) 中黄色方框内荧光微球沿虚线的相对光强分布。

高斯光束片状光照明荧光微球在 xz 面成像如图 6(a)~(d) 所示。成像结果表明, 非视场内的荧光微球成像半峰全宽(FWHM)是视场内成像 FWHM 的 2 倍以上, 视场范围内的荧光微球成像沿 z 向光强分布差别很大, 由此可以界定视场范围的边界, 同时经测量得到成像的视场范围是 $25 \mu\text{m}$ 。在图 6(b) 中, 艾里光束片状光照明样本成像结果表明, 在全视场范围内 ($208 \mu\text{m}$) xz 面荧光微球成像的光强分布变化不大, 全视场基本保持同样的轴向分辨率。但是图 6(b) 中荧光微球的 FWHM 比图 6(a) 中视场范围内的荧光微球 FWHM 大, 即前者较后者的轴向分辨率低, 如图 6(d)、(e) 所示。为了提升图 6(b) 中全视场 ($208 \mu\text{m}$) 内的轴向分辨率, 通过去卷积技术处理图 6(b) 得到图 6(c), 结果表明, 对图 6(b) 去卷积处理后的 FWHM 与图 6(a) 中视场范围内的荧光微球成像 FWHM 相当, 如图 6(d) 中黑色曲线与图 6(e) 中红色曲线所示。

综上所述, 高斯光束光片显微镜对荧光微球成像在视场范围内可以达到很高的轴向分辨率。但是这个视场范围有限, 在实验中仅 $25 \mu\text{m}$ 。由于艾里光束的无衍射特性, 艾里光束光片显微镜对荧光微球成像可以在很长的一段范围内 ($208 \mu\text{m}$) 保持轴向分辨率不变。但是其成像的轴向分辨率不高, 低于高斯光束光片显微镜在视场范围内对荧光微球成像的轴向分辨率。为了在艾里光束光片显微镜成像结果基础上提高轴向分

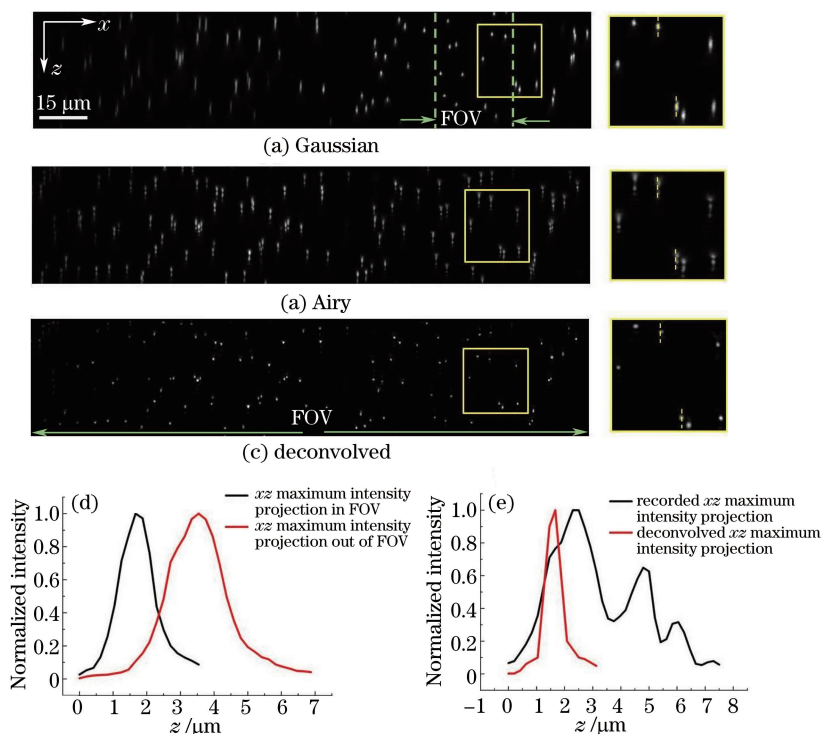


图 6 光子显微镜对荧光微球三维成像中的 xz 截面。(a)~(c)高斯光束片状光照明样本成像结果、艾里光束片状光照明样本成像结果、在艾里光束片状光照明样本成像结果的基础上再进行去卷积处理后的图像；(d) 图 6(a)中黄色方框内荧光微球沿虚线的相对光强分布；(e) 图 6(b)、(c) 中黄色方框内荧光微球的相对光强分布

Fig. 6 Imaging fluorescent particles in 3D, xz maximum intensity projection by light sheet microscopy using the proposed method. (a)-(c) xz maximum intensity projection of fluorescent particles by the Gaussian light sheet microscope, by the Airy light sheet microscope and deconvolved xz maximum intensity projection of Airy light sheet microscope; (d) normalized light density distributions along the dotted line in the yellow square of Fig. 6(a); (e) normalized light density distributions in the yellow squares of Figs. 6(b) and 6(c)

分辨率,利用去卷积技术复原图像,使处理后的图像在 208 μm 内的轴向分辨率与高斯光束光片显微成像结果相当。

3.2 斑马鱼肌肉组织成像

在图 5 所示实验系统中进行染色的成年斑马鱼肌肉组织成像实验。利用荧光染料鬼笔环肽(Alexa Fluor 488 Phalloidin,Life Technologies 公司)染色成年斑马鱼肌肉组织中的肌动蛋白(F-actin),制成实验样本。将样本固定在样品台,并浸入样品槽中的水中,488 nm 激光生成的片状光照明样本,CCD 探测接收斑马鱼肌肉组织样本被激发出的荧光成像。

对一样本成像部位进行了三组对比实验:1)高斯光束片状光照明样本成像(SLM 不加载相位图);2)艾里光束片状光照明样本成像(在 SLM 上加载 α 取 5 的三次相位图);3)去卷积处理艾里光束片状光照明样本成像结果。

为了分析染色斑马鱼肌肉组织样本在探测物镜光轴方向(xz 面中的 z 轴方向)的成像效果,对样本成像进行三维重建。探测 CCD 的曝光时间设置为 0.1 s,成像系统放大倍率为 53。在对样本进行三维重建时,精密电动位移台以 0.5 μm 为步距沿 z 轴移动样本,并拍摄 400 张图像,再通过 Imaris 软件对这些样本成像图片进行三维重建。

实验结果与分析如图 7 所示。图 7(a)~(c)分别是高斯光束片状光照明样本成像结果,艾里光束片状光照明样本成像结果,在艾里光束片状光照明样本成像结果的基础上再进行去卷积处理后的图像。图 7 (d)~(f)分别是图 7(a)~(c)中 $x=17,127,147 \mu\text{m}$ 处沿着 z 轴方向的相对光强分布。在光强分布中,波峰-波谷差值越大,波峰处越尖锐,说明成像分辨的细节越多,轴向分辨率越高。

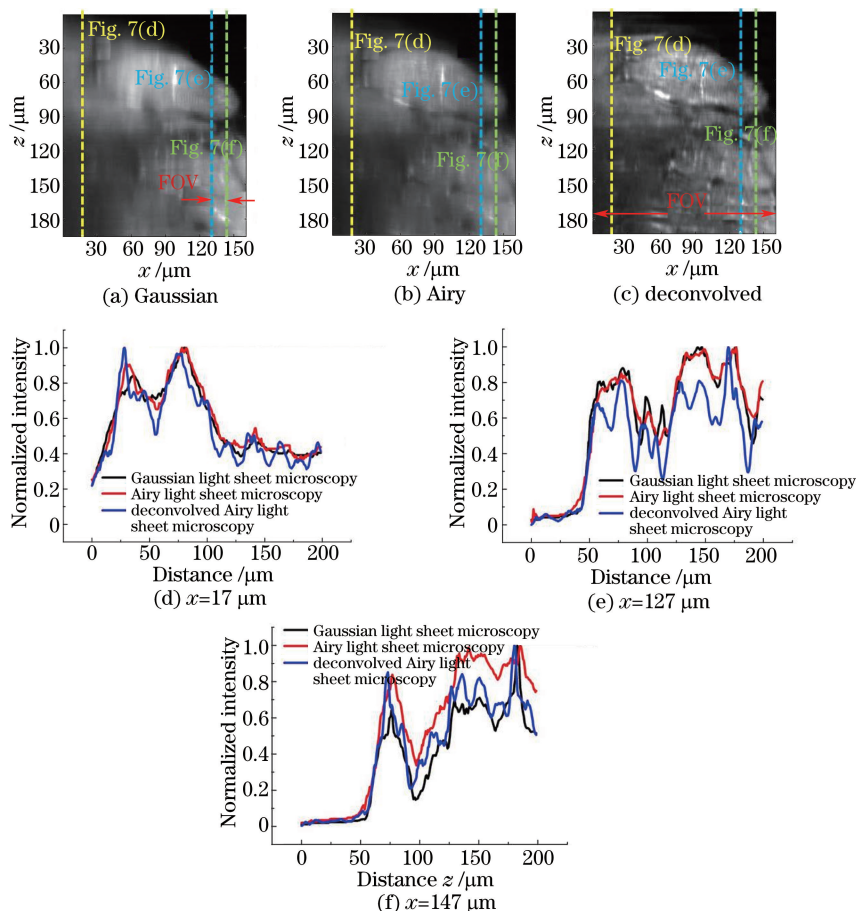


图 7 光片显微镜对染色的斑马鱼肌肉组织三维成像中的 xz 截面。(a)~(c)高斯光束片状照明样本成像结果、艾里光束片状照明样本成像结果、在艾里光束片状照明样本成像结果的基础上再进行去卷积处理后的图像；(d)~(f) $x = 17, 127, 147 \mu\text{m}$ 处沿 z 方向的相对光强分布

Fig. 7 Imaging stained zebrafish musculature in 3D, xz maximum intensity projection by light sheet microscopy using the proposed method. (a)-(c) xz maximum intensity projection of stained zebrafish musculature by the Gaussian light sheet microscope, by the Airy light sheet microscope and deconvolved xz maximum intensity projection of Airy light sheet microscope; (d)~(f) axial intensity distributions when $x = 17, 127, 147 \mu\text{m}$

在图 7(d)中,3 条曲线分别为:1)高斯光束片状照明样本成像强度分布;2)艾里光束片状照明样本成像强度分布;3)在艾里光束片状照明样本成像结果的基础上再进行去卷积处理后的图像强度分布。如图所示,三条曲线背景强度近似相同,但是沿着 z 方向,各位置处的 FWHM 变化相差很大。曲线 1)各位置处波峰值与波谷值相差不大,且峰值处不够尖锐。相比之下,曲线 2)的波峰-波谷差值更大,波峰也更为尖锐。对于曲线 3)而言,可以观察到它的波峰-波谷差值最大(全程),且波峰最为尖锐。综上, $x = 17 \mu\text{m}$ 位置处轴向分辨率从高到低依次为去卷积处理的艾里光束片状照明样本成像、艾里光束片状照明样本成像结果、高斯光束片状照明样本成像结果。

图 7(e)中,3 条曲线背景强度近似相同,其中红色曲线波峰值与波谷值差值最小,且峰值处最为平滑。黑色曲线与蓝色曲线波峰值与波谷值差值都比较大,且峰值处也都比较尖锐。相比之下,蓝色曲线各波峰处 FWHM 更小。综上, $x = 127 \mu\text{m}$ 位置处轴向分辨率从高到低依次为去卷积处理的艾里光束片状照明样本成像结果(蓝色曲线)、高斯光束片状照明样本成像结果(黑色曲线)、艾里光束片状照明样本成像结果(红色曲线)。

图 7(f)与图 7(e)中各曲线强度分布规律相似, $x = 147 \mu\text{m}$ (绿色虚线)位置处轴向分辨率从高到低依次为去卷积处理的艾里光束片状照明样本成像结果(蓝色曲线)、高斯光束片状照明样本成像结果(黑色曲线)、艾里光束片状照明样本成像结果(红色曲线)。

综上,在高斯光束片状光照明视场范围内(127~147 μm),高斯光束光片显微镜对样本成像的轴向分辨率很高,但是一旦超过这个视场范围,轴向分辨率就会急剧下降($x=17 \mu\text{m}$ 处)。由于艾里光束的无衍射特性,艾里光束光片显微镜可以在很长的一段范围内保持轴向分辨率不变,但是它的轴向分辨率低于高斯光束光片显微镜在其视场内成像的轴向分辨率。为了提升轴向分辨率,在艾里光束光片显微镜成像结果基础上,由(10)、(11)式建立去卷积算法并对其进行图像恢复,结果如图7(c)所示。通过将艾里光束片状光照明样本成像与去卷积算法相结合,可以在前者成像范围大但轴向分辨率不高的情况下提高轴向分辨率[图7(d)、(f)蓝色曲线],从而使得视场范围由20 μm 扩展至167 μm 。

4 结 论

在光片显微镜成像基础上,提出了一种利用无衍射光束扩展视场的同时恢复成像轴向分辨率的方法。利用三次相位调制入射光束生成艾里光束,并扫描艾里光束形成片状光。艾里光束光片显微镜对样本进行成像,采集成像图片。最后,利用去卷积技术恢复成像图片,提高轴向分辨率。

通过本文提出的方法,在探测放大倍率为42倍时,从传统高斯光束片状光显微镜视场范围25 μm 扩展到208 μm (对荧光微球成像)。在探测放大倍率为53倍时,视场从原来的20 μm 提高到167 μm (对染色的斑马鱼肌肉组织成像)。解决了传统高斯光束片状光照明显微成像技术视场范围小的问题,进而改善光片显微镜性能,扩大了光片显微镜在生物学上的应用范围。

参 考 文 献

- [1] Engelbrecht C J, Stelzer E H. Resolution enhancement in a light-sheet-based microscope (SPIM)[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(10): 1477-1479.
- [2] 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.
- [3] Sheppard C J. Pupil filters for generation of light sheets[J]. *Optics Express*, 2013, 21(5): 6339-6345.
- [4] Dean K M, Fiolka R. Uniform and scalable light-sheets generated by extended focusing[J]. *Optics Express*, 2014, 22(21): 26141-26152.
- [5] Fahrbach F O, Gurchenkov V, Alessandri K, *et al.* Self-reconstructing sectioned Bessel beams offer submicron optical sectioning for large fields of view in light sheet microscopy[J]. *Optics Express*, 2013, 21(9): 11425-11440.
- [6] Gao L. Extend the field of view of selective plan illumination microscopy by tiling the excitation light sheet[J]. *Optics Express*, 2015, 23(5): 6102-6111.
- [7] Xu Hao, Zhang Yunhai, Zhang Xin, *et al.* Extend the field of view of light sheet microscopy by wavefront phase modulation[J]. *Acta Optica Sinica*, 2016, 36(8): 0818001.
徐 豪, 张云海, 张 欣, 等. 基于波前相位调制的宽视场光片显微镜的研究[J]. *光学学报*, 2016, 36(8): 0818001.
- [8] Gao L. Optimization of the excitation light sheet in selective plane illumination microscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(3): 881-890.
- [9] Siviloglou G A, Broky J, Dogariu A, *et al.* Observation of accelerating Airy beams[J]. *Physical Review Letters*, 2007, 99(21): 213901.
- [10] Broky J, Siviloglou G A, Dogariu A, *et al.* Self-healing properties of optical Airy beams[J]. *Optics Express*, 2008, 16(17): 12880-12891.
- [11] Baumgartl J, Mazilu M, Dholakia K. Optically mediated particle clearing using Airy wave packets [J]. *Nature Photonics*, 2008, 2(11): 675-678.
- [12] Yang Z, Prokopas M, Nylk J, *et al.* A compact Airy beam light sheet microscope with a tilted cylindrical lens[J]. *Biomedical Optics Express*, 2014, 5(10): 3434-3442.
- [13] Porat G, Dolev I, Barlev O, *et al.* Airy beam laser[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(20): 4119-4121.
- [14] Durnin J, Miceli J Jr, Eberly J H. Diffraction-free beams[J]. *Physical Review Letters*, 1987, 85(15): 1499-1501.
- [15] Xiao Yun, Zhang Yunhai, Wang Zhen, *et al.* Effect of incident laser on resolution of LSCM[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2014, 22(1): 31-38.
肖 昀, 张云海, 王 真, 等. 入射激光对激光扫描共聚焦显微镜分辨率的影响[J]. *光学 精密工程*, 2014, 22(1): 31-38.
- [16] Demenikov M, Harvey A R. Image artifacts in hybrid imaging systems with a cubic phase mask[J]. *Optics Express*, 2010, 18(8): 8207-8212.
- [17] Dowski E R, Cathey W T. Extended depth of field through wave-front coding [J]. *Applied Optics*, 1995, 34(11): 1859-1866.