

光学学报

基于点扫描结构光的 SHG 超分辨显微技术研究

王美婷, 吴文帅, 汪磊, 郑晓敏, 贾伯良, 陈嘉杰, 邵永红*

深圳大学物理与光电工程学院, 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 二次谐波产生(SHG)成像技术是一种针对非中心对称生物组织的免标记成像技术,已经成为生命科学研究的重要手段。衍射极限使得 SHG 技术无法分辨衍射极限以下的精细结构。虽然超分辨显微技术取得了突破性进展,但是 SHG 的相干非线性过程限制了 SHG 超分辨显微技术的发展。提出了一种点扫描结构光照明 SHG 超分辨显微(SHG-psSIM)技术,实现了氧化锌颗粒和小鼠尾腱的超分辨 SHG 显微成像。在传统的 SHG 显微系统的激发光路中引入电光调制器,通过对激发光正弦调制产生点扫描结构照明图案。基于点扫描结构照明图案与样本结构相互作用产生的莫尔条纹效应,将原本不可探测的样本高频信息搬移到显微镜通频带内,并利用光电倍增管探测。最后,利用软件重构出超分辨率图像。对比传统 SHG 系统,SHG-psSIM 分辨率提高了 1.86 倍。

关键词 显微; 二次谐波产生; 二次谐波产生显微; 结构光照明显微; 超分辨显微

中图分类号 O436.1

文献标志码 A

DOI: 10.3788/AOS202242.1018001

SHG Super-Resolution Microscopy Based on Point-Scanning Structured Light

Wang Meiting, Wu Wenshuai, Wang Lei, Zheng Xiaomin, Jia Boliang,
Chen Jiajie, Shao Yonghong*

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

Abstract Second harmonic generation (SHG) imaging technology is a powerful tool capable of imaging non-centrosymmetric biological tissues without labeling, which has become an important means of life science research. Due to the diffraction limit, SHG technology cannot resolve the fine structures below the diffraction limit. Although super-resolution microscopy has made breakthrough progress, the coherent nonlinear process of SHG limits the development of the SHG super-resolution microscopy. A point-scanning structured illumination SHG super-resolution microscopy (SHG-psSIM) technology is proposed to realize the super-resolution SHG microscopic imaging of zinc oxide particles and mouse tail tendons. The electro-optic modulator is introduced into the excitation light path of the traditional SHG microscopy system. A point-scanning structured illumination pattern is generated by sinusoidally modulating of the excitation beam. Based on the moiré fringe effect generated by interaction of the point-scanning structured illumination pattern with the sample structures, the undetectable high frequency information of samples is moved to the observable passband of the microscopy and detected by the photomultiplier. Finally, the algorithm software is used to reconstruct the super-resolution image. Compared with the traditional SHG system, the resolution of SHG-psSIM is improved by 1.86 times.

Key words microscopy; second harmonic generation; second harmonic generation microscopy; structured illumination microscopy; super-resolution microscopy

收稿日期: 2021-11-03; 修回日期: 2021-12-10; 录用日期: 2021-12-13

基金项目: 国家自然科学基金(61775148)、深圳市科技计划(JCYJ20200109105608771)

通信作者: *shaoyh@szu.edu.cn

1 引言

二次谐波产生(SHG)是二阶非线性过程,SHG 显微成像技术具有良好的光学切片能力和揭示材料非线性特性的能力,已被广泛应用于生物医学研究中^[1-2]。SHG 显微成像技术的成像过程与双光子激发荧光(TPEF)具有相似的非线性特性^[3],即 SHG 与 TPEF 强度都与激发光强度的平方成正比,具有激发阈值,激发出的光子能量几乎全部位于焦点附近,进而可探测的信号均为有效信号。SHG 与 TPEF 的区别在于,SHG 是一种相干辐射的光学现象,点扩展函数(PSF)为相干点扩展函数,且在激发光强度一定的条件下,其信号强度正比于介质的二阶线性极化率 $[\chi^{(2)}]$,故 SHG 强度图能够表征介质的 $\chi^{(2)}$ 分布^[4]。然而,TPEF 是非相干辐射过程^[5-6],故点扩展函数为非相干点扩展函数。由于具有非中心对称结构的生物组织,如胶原纤维和神经纤维等,具有较大的 $\chi^{(2)}$,因此无需荧光标记,就能够利用 SHG 显微系统成像观测。虽然目前已有许多围绕 SHG 显微技术的工作,并取得了较好的进展,但是其横向分辨率仍然受到衍射极限的限制^[4, 7-9]。

为了突破衍射极限,科学家们提出了一系列的超分辨显微成像方法(SRM)^[10-12],具有代表性的超分辨显微成像技术包括受激辐射损耗超分辨显微成像技术(STED)^[13-14],可逆饱和荧光跃迁显微成像技术(RSOLFT)^[15-18],随机光学重建显微成像技术(STORM)^[19-20],光激活定位超分辨显微成像技术(PALM)^[21]和宽场结构光照明显微成像技术(SIM)^[22-24]等。其中:STED 和 RSOLFT 通过受激辐射或基态耗尽等非自发辐射跃迁方式来消耗激发光斑边缘区域的激发态荧光分子以缩小荧光发射范围,从而提高系统的分辨率^[14];STORM 和 PALM 通过控制荧光分子随机发光并结合“质心定位”算法实现超分辨成像,其要求每幅原始图像只记录视场中荧光分子的随机子集,且衍射极限区域内只有一个分子发光,不同的分子子集不断地被成像记录和定位,最终可构建出超分辨率图像^[25];宽场 SIM 利用光栅衍射或者网格投影使两束激发光束干涉形成正弦条纹图案,正弦条纹图案与样本叠加,产生莫尔条纹效应^[26-27]。莫尔条纹效应能够将样本的高频信息移到显微镜的光学传递函数(OTF)通带以内,进而对样本的高频信息进行探测,再通过算法重建出超分辨图像^[28]。与其他 SRM 技术相比,SIM 具有

无需特殊的荧光染料、成像速度快等优点,进而具有广泛的应用前景。目前人们已经发展了基于 STED^[29]和 STORM^[30-31]与 SHG 相结合的超分辨成像技术,而 SIM 与 SHG 相结合的方式鲜有报道。原因主要是宽场 SIM 产生的正弦图案通常是由光栅衍射或网格的投影产生的,而 SHG 要求非线性激发,需要激光脉冲的紧密聚焦,宽场 SIM 无法实现激光脉冲的紧密聚焦。最近,针对点扫描显微技术,人们提出了点扫描 SIM 技术,实现了 TPEF-SIM,与点扫描显微技术相比,其分辨率提高了 2 倍^[3, 32]。在已经报道的 TPEF-SIM 中,本文利用光电调制器(EOM)对激发光进行了强度正弦调制,再通过振镜扫描在样本上形成扫描累积的结构化照明图案,激发出的双光子荧光信号由面探测器记录。该技术将基频结构光的频率调整为接近宽场显微镜的截止频率,忽略了由非线性效应引起的倍频条纹结构光作用^[33]。

本文提出了基于点扫描的 SHG-SIM 显微成像技术,并建立了结构化 SHG 超分辨图像采集和重建过程的数学模型。通过在激发光路中加入 EOM 来实现激发光的正弦调制,通过振镜扫描具有正弦强度变化的激发光在样本上形成扫描累积的结构化照明图案,并与样本结构叠加,产生混频现象。最后,利用光电倍增管(PMT)逐点记录。对氧化锌颗粒和小鼠尾腱样本进行了实验成像验证,结果表明,与传统 SHG 显微(C-SHG)技术相比,SHG 超分辨显微(SHG-psSIM)系统的分辨率提高了 1.86 倍。

2 基本原理

SIM 提高分辨率原理如图 1(a)所示。结构照明图案和样本结构信息叠加可产生莫尔条纹,其作用是将样本高频信息通过混频移到显微镜的 OTF 通带以内,拓展了可探测的频率范围,进而提高显微镜的横向分辨率^[34]。若结构照明图案空间频率等于显微系统的衍射极限,则 SIM 能够将分辨率提高至原来的 2 倍^[35-36]。图 1(b)曲线为 C-SHG 系统的 OTF, $(-k_0, k_0)$ 区域表示 OTF 通带,通带外的信息将被系统滤除掉。其中,横轴 k 表示频率空间。图 1(c)为莫尔条纹混频示意图,照明条纹频率包括 k_a 和 $2k_a$ 。由于 SHG 是倍频过程,故激发 SHG 信号会产生非线性响应,正弦结构光条纹(k_a)激发产生 2 套 SHG 正弦条纹(k_a 和 $2k_a$),对应的频谱为 $\pm k_a$ 和 $\pm 2k_a$ 。这些照明条纹通过莫尔条纹效应将原本在 OTF 通带以外的物体的高频信息移到 OTF

通带内,进而这些高频信息可以被探测到,提高了系统的空间分辨率。图 1(d)为拓展后的系统 OTF,通频带为 $(-k_0 - 2k_a, k_0 + 2k_a)$ 。为了充分利用一

倍频条纹和二倍频条纹来提高图像信噪比,令 $k_a = 0.5k_0$,使得 $2k_a = k_0$,理论上可让系统分辨率提高 2 倍。

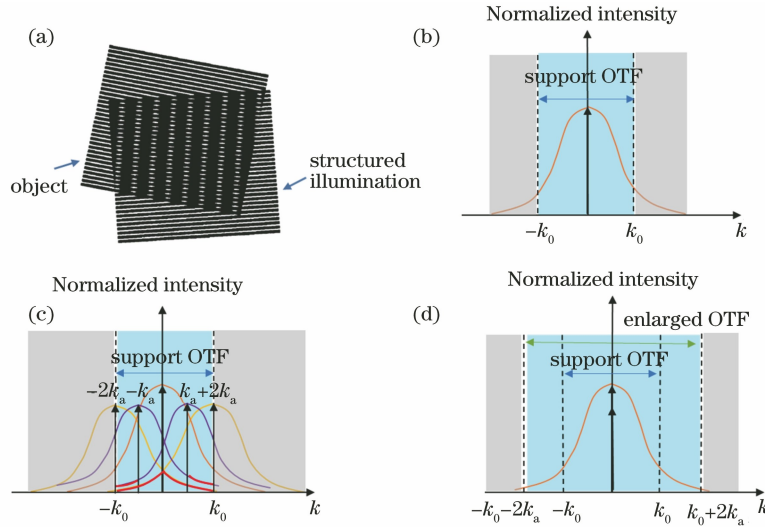


图 1 SHG-psSIM 技术的频移原理。(a)莫尔条纹现象;(b) C-SHG 的 OTF;(c) SHG-psSIM 频移过程;(d) SHG-psSIM 扩展后的 OTF

Fig. 1 Frequency shift principle of SHG-psSIM. (a) Moiré phenomenon; (b) OTF of C-SHG; (c) frequency shift process of SHG-psSIM; (d) expanded OTF of SHG-psSIM

为更好地理解点扫描 SHG-psSIM 原理,理论推导了其成像过程。在点扫描 SHG-psSIM 技术中,激发光聚焦在 SHG 样本上,定义在物平面位置 (r) 处 SHG 的发射强度 I_{SHG} 为

$$I_{\text{SHG}}(r, t) = [I_{\text{ex}}(t)h_{\text{ex}}(r - t)]^2 s(r), \quad (1)$$

式中: I_{ex} 是激发光斑的归一化强度; t 是光束扫描过程中时间或扫描光束的中心位置^[37](当 $r = t$ 时,扫描速度等于 1); h_{ex} 是截止频率为 k_0 的激发波长处激发的点扩展函数; h_{ex}^2 是 SHG 激发的点扩展函数; $s(r)$ 是 SHG 样本的 $\chi^{(2)}$ 的空间分布。

随着扫描的进行, PMT 会累积记录每个图像像素的 SHG 强度,直到生成一帧图像 $p(t)$,其表达式为

$$p(t) = \int [I_{\text{ex}}(t)h_{\text{ex}}(t - r)]^2 s(r)h_{\text{em}}(r - t)dr = [I_{\text{ex}}^2(t)s(t)] \otimes [h_{\text{em}}^2(t)h_{\text{em}}(t)], \quad (2)$$

式中: h_{em} 是发射点扩展函数,由于 SHG 具有相干性,故 h_{em} 为相干点扩展函数; \otimes 为卷积。 $p(t)$ 的傅里叶变换 $\tilde{p}(k)$ 可表示为

$$\tilde{p}(k) = [I_{\text{ex}}^2(t) \otimes \tilde{S}(k)][\tilde{h}_{\text{em}}^2(k) \otimes \tilde{h}_{\text{em}}(k)], \quad (3)$$

式中: $\tilde{I}_{\text{ex}}(k)$, $\tilde{S}(k)$, $\tilde{h}_{\text{em}}^2(k)$, $\tilde{h}_{\text{em}}(k)$ 分别表示 $I_{\text{ex}}(t)$, $s(t)$, $h_{\text{em}}^2(t)$, $h_{\text{em}}(t)$ 的傅里叶变换。

通过 EOM 调制激发光,可以产生强度为 $I_{\text{SIM,ex}}$ 的激发结构光,调制函数可以用正弦函数表示,其表达式为

$$I_{\text{SIM,ex}}(t) = \frac{1}{2}[1 + m \cos(k_a t + \varphi)], \quad (4)$$

式中: m 为调制深度; φ 为结构照明图案相移。 $I_{\text{SIM,ex}}(t)$ 的傅里叶变换 $[\tilde{I}_{\text{SIM,ex}}(k)]$ 由脉冲增量 δ 组成^[38], $\tilde{I}_{\text{SIM,ex}}(k)$ 的表达式为

$$\tilde{I}_{\text{SIM,ex}}(k) = \frac{\pi}{2} \left[\delta(k) + \frac{1}{2} \delta(k + k_a) \exp(-i\varphi) + \frac{1}{2} \delta(k - k_a) \exp(i\varphi) \right], \quad (5)$$

基于该调制函数,可以得到结构化的 SHG 图像,其表达式为

$$\begin{aligned} \tilde{p}(k) &= [\tilde{I}_{\text{SIM,ex}}^2(k) \otimes \tilde{S}(k)][\tilde{h}_{\text{em}}^2(k) \otimes \tilde{h}_{\text{em}}(k)] = \\ &= \frac{\pi}{4} [U_0 \tilde{s}(k) + U_1 \tilde{s}(k - k_a) e^{i\varphi} + U_1 \tilde{s}(k + k_a) e^{-i\varphi} + U_2 \tilde{s}(k - 2k_a) e^{2i\varphi} + U_2 \tilde{s}(k + 2k_a) e^{-2i\varphi}] \times \\ &= [\tilde{h}_{\text{ex}}^2(k) \otimes \tilde{h}_{\text{em}}(k)], \end{aligned} \quad (6)$$

式中: U_0, U_1, U_2 为常数。由式(6)可知,为获取样本频谱信息,需要求解式中 5 个未知量,即 $\tilde{s}(k)$, $\tilde{s}(k - k_a)$, $\tilde{s}(k + k_a)$, $\tilde{s}(k - 2k_a)$, $\tilde{s}(k + 2k_a)$ 。因此,至少需要构建 5 个独立方程式来解出这 5 个分量。幸运的是,通过预先对相位 φ 赋予特殊值,可以

建立关于这 5 个分量的线性方程,进而可以求解。通常选择 5 个具有不同相位 φ 的结构化图案依次照射在样本上,并分别记录对应的样本 SHG 信息 p ,结合线性方程的思想,构建分离矩阵,将这 5 个分量分离,进而获得对应的频域矩阵方程,其表达式为

$$\begin{bmatrix} p(k) \\ p_1(k) \\ p_2(k) \\ p_3(k) \\ p_4(k) \end{bmatrix} = \frac{\pi}{4} \begin{bmatrix} U_0 & U_1 e^{-i\varphi_1} & U_1 e^{i\varphi_1} & U_2 e^{-2i\varphi_1} & U_2 e^{2i\varphi_1} \\ U_0 & U_1 e^{-i\varphi_2} & U_1 e^{i\varphi_2} & U_2 e^{-2i\varphi_2} & U_2 e^{2i\varphi_2} \\ U_0 & U_1 e^{-i\varphi_3} & U_1 e^{i\varphi_3} & U_2 e^{-2i\varphi_3} & U_2 e^{2i\varphi_3} \\ U_0 & U_1 e^{-i\varphi_4} & U_1 e^{i\varphi_4} & U_2 e^{-2i\varphi_4} & U_2 e^{2i\varphi_4} \\ U_0 & U_1 e^{-i\varphi_5} & U_1 e^{i\varphi_5} & U_2 e^{-2i\varphi_5} & U_2 e^{2i\varphi_5} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \tilde{s}(k) \\ \tilde{s}(k + k_a) \\ \tilde{s}(k - k_a) \\ \tilde{s}(k + 2k_a) \\ \tilde{s}(k - 2k_a) \end{bmatrix} \times [\tilde{h}_{\text{ex}}^2(k) \otimes \tilde{h}_{\text{em}}(k)], \quad (7)$$

再将分离出的样本信息 p 与移位因子相乘,将其搬移回原来的位置。最后,与原样本通频带中的样本信息叠加,即可完成一幅单个方向的超分辨 SHG 图像。

3 SHG-psSIM 实验装置

SHG-psSIM 采用前向探测模式设计,实验装置如图 2 所示。采用高重复频率(80 MHz)的钛蓝宝石激光器作为 SHG 激发光源,激发波长设置为 810 nm,脉宽为 100 fs。激发光束通过半波片(HWP)和电光调制器(EOM350, Conoptics)被调制成强度正弦变化的时变光束,时变光束由数据采集(DAQ)卡(PCI6110, NI)驱动二维扫描振镜(2D GS, Model 6210H, Cambridge Tech)进行空间扫描。然后,时变光束通过扫描透镜(AC508-100-B, Thorlabs)、管镜(TTL200MP, Thorlabs)和高数值孔径物镜收集(60×, NA 为 1.4, Nikon)后照射到

样本上,由于调制和扫描的共同作用,故会在样本上产生点扫描结构照明图案。同时,样本每个扫描位置处被激发出的 SHG 信号会被前向聚透镜(NA 为 1.4, Achr-Apl, Nikon)收集,利用双色片(DMLP490, Thorlabs)和窄带滤光片(ET405/10, Chroma)滤除激发光和其他杂散光,最后逐点被 PMT(H7422-50, Hamamatsu)探测,重构成 SHG 结构图案。由于 SHG 具有二阶非线性效应,故正弦变化的激发光(频率为 ω)将激发出非正弦变化的 SHG 信号,即包括两套正弦变化的 SHG 信号(ω 和 2ω)。因此,会出现以下 3 种情况:1)利用 ω 和 2ω 两套结构光图案与样本同时混频,若 $\omega \approx \omega_c$, ω_c 为系统截止频率,则能够将系统 OTF 通频带拓展到 $(-3\omega_c, 3\omega_c)$,即系统分辨率提高至原来的 3 倍;2)利用 ω 和 2ω 两套结构光图案与样本同时混频,若 $\omega \approx 0.5\omega_c$,则能够将系统 OTF 通频带拓展到 $(-2\omega_c, 2\omega_c)$,即系统分辨率提高至原来的 2 倍;3)

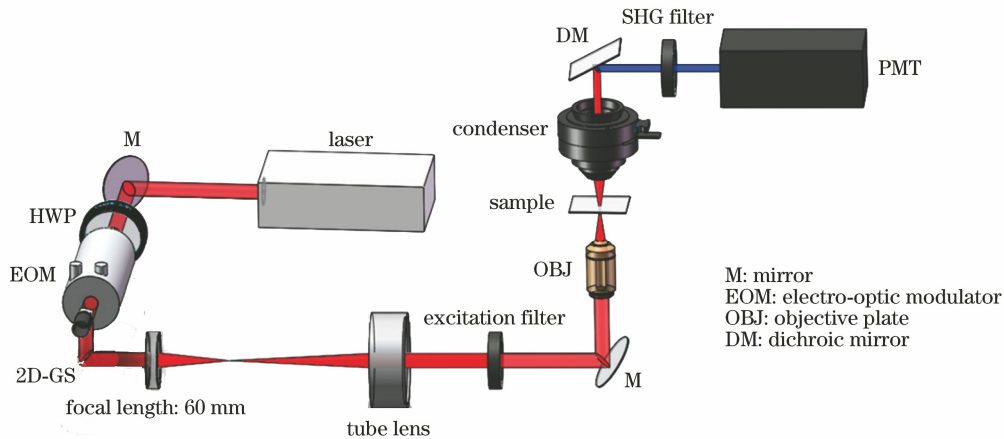


图 2 SHG-psSIM 实验装置

Fig. 2 SHG-psSIM setup

若仅利用一套 ω 结构光图案与样本同时混频,且 $\omega \approx \omega_c$,则能够将系统 OTF 通频带拓展到 $(-2\omega_c, 2\omega_c)$,即系统分辨率提高至原来的 2 倍。对分辨率提高 2 倍条件下的情况进行了分析,可以发现:包含 2 套结构光图案混频的方案每个方向至少需要 5 幅图像,但具有更高的信噪比;1 套结构光图案的方案每个方向至少需要 3 幅图像,成像速度更快。

4 实验与结果

为验证 SHG-psSIM 技术提高分辨率的能力,使用 C-SHG 和 SHG-psSIM 对比成像了 90 nm 大小的氧化锌颗粒(颗粒尺寸低于 SHG-psSIM 能够达到的理论分辨率值)。在实验中,当选取 2 套结构光图案混频的方案时,目标分辨率可提高至原来的 2 倍。为此,设定条纹空间周期为 666 nm,接近系统衍射极限,像素尺寸为 40 nm。具体条纹图案产生原理如下。频率为 400 Hz 和 0.5 Hz 的锯齿波用于同步驱动 2D GS 的快轴和慢轴。分别用频率为 16 kHz 的正弦波、频率为 60 kHz 的正弦波和频率为 44 kHz 的正弦波驱动 EOM 对激发光进行调制,最终可在样本上生成 15° 方向、 75° 方向和 135° 方向的结构照明图案。每幅原始的结构化 SHG 图像的采集时间为 2 s,扫描点数为 800×800 ,视场大小为 $32 \mu\text{m} \times 32 \mu\text{m}$ 。由于 EOM 的调制效率问题,故调

制函数的 k_a 与 EOM 的调制深度成反比。EOM 的调制深度对重建效果起着至关重要的作用,调制深度越大,重建效果越好。为保证良好的 EOM 调制深度,保留 5 个频谱分量。为尽可能提高分辨率,需设置 $2k_a$ 的值接近截止频率,即调制函数 k_a 的值接近截止频率的一半。因此,将调制函数设计为 $I_{\text{SIM,ex}}^{\text{max}}(t) = [1 + 0.1 \cos(0.06t + \varphi)]/2$ 。最终可得到 5 个分别是以 $k_0, \pm k_a, \pm 2k_a$ 为中心的频谱分量。为解出这 5 个分量,在每个方向上分别形成相位差为 $2\pi/5$ 的 5 幅点扫描结构照明图案,并记录对应的 SHG 混频图像。为获得各向同性分辨率,选取了角度相差 $2\pi/3$ 的 3 个方向。这样,通过采集 15 幅原图像重构 1 幅超分辨图像。图 3 为 C-SHG 与 SHG-psSIM 成像的重建结果比较。图 3(a) 右上是 SHG-psSIM 成像的重建结果,左下为 C-SHG 的结果。可以看出,SHG-psSIM 能够分辨更多的细节。图 3(b) 和图 3(c) 是利用 2 种成像方法对图 3(a) 中矩形框内氧化锌颗粒进行成像的结果的放大图,分别沿着穿过衍射像点中心的实线进行归一化强度曲线拟合,如图 3(d) 所示。为进一步量化分辨率,计算其半峰全宽(FWHM),SHG-psSIM 成像的氧化锌的平均 FWHM 为 152 nm, C-SHG 成像的氧化锌的平均 FWHM 为 284 nm,表明与 C-SHG 相比,SHG-psSIM 的分辨率提高了约 1.86 倍。

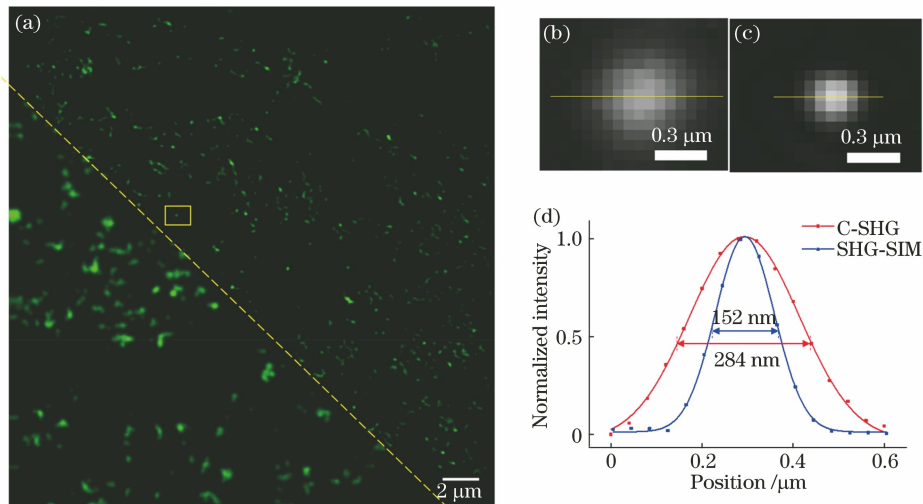


图 3 C-SHG 和 SHG-psSIM 成像氧化锌纳米颗粒的比较。(a)氧化锌纳米颗粒图像(左下:C-SHG,右上:SHG-psSIM);(b)利用 C-SHG 对图 3(a)中的矩形框区域成像后结果的放大图;(c)利用 SHG-psSIM 对图 3(a)中的矩形框区域成像后结果的放大图;(d)归一化强度曲线

Fig. 3 Comparison of ZnO nanoparticles imaged by C-SHG and SHG-psSIM. (a) Images of ZnO nanoparticles (lower left: C-SHG, upper right: SHG-psSIM); (b) magnified image of rectangle area in Fig. 3 (a) imaged by C-SHG; (c) magnified image of rectangle area in Fig. 3 (a) imaged by SHG-psSIM; (d) normalized intensity curve

为验证 SHG-psSIM 技术对生物组织样本的成像分辨能力,利用该技术对未染色、未切片的小鼠尾腱样本进行成像。实验参数同图 3 中的设置,重构的超分辨图像如图 4 所示。图 4(a)为利用 C-SHG (左下)和 SHG-psSIM(右上)获取的 15 幅小鼠尾腱 SHG 原图像重建的超分辨率图像。可以清楚地看到,与 C-SIM 系统相比,SHG-psSIM 图像的分辨率

和对比度均有明显的改善。为定量表征空间分辨率,沿图 4(b)、4(c)中实线进行归一化强度曲线拟合,如图 4(d)所示。结果表明,SHG-psSIM 可以清楚地区分 2 个非常相近(距离 200 nm)的组织结构,而 C-SHG 不能。因此,SHG-psSIM 能够提高组织成像的空间分辨率,并通过结构光抑制背景有效地增强了图像的对比度。

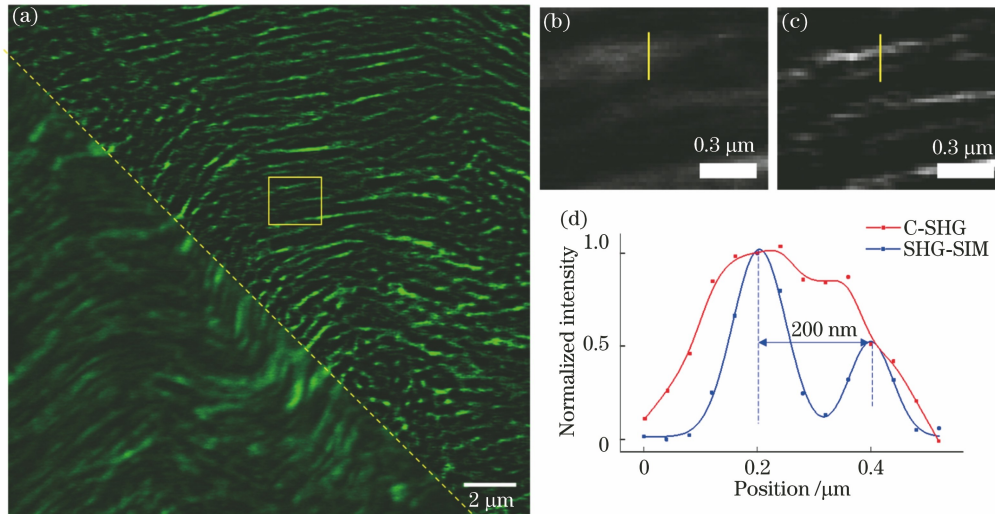


图 4 成像小鼠尾腱的分辨率提升。(a)小鼠尾腱超分辨图像(左下:C-SHG,右上:SHG-psSIM);(b)利用 C-SHG 对图 4(a)中的矩形框区域成像后结果的放大图;(c)利用 SHG-psSIM 对图 4(a)中的矩形框区域成像后结果的放大图;(d)归一化强度曲线
Fig. 4 Resolution improvement for imaging mouse tail tendon. (a) Super-resolution image of mouse tail tendon (lower left: C-SHG, upper right: SHG-psSIM); (b) magnified image of rectangle area in Fig. 4 (a) imaged by C-SHG; (c) magnified image of rectangle area in Fig. 4 (a) imaged by SHG-psSIM; (d) normalized intensity curve

5 结 论

发展了一种新的基于点扫描的 SHG-psSIM 技术,并进行了理论分析和实验验证,实现了氧化锌纳米颗粒和生物组织免标记的超分辨 SHG 成像。相比 C-SHG 显微成像技术,SHG-psSIM 技术的成像分辨率提高了 1.86 倍,该方法为免标记的非荧光信号超分辨成像提供了一种新思路。该技术具有以下优点:1)不需要荧光标记,对生物样本的损伤小;2)很容易在商品化双光子显微镜系统上集成;3)由于使用 PMT 逐点探测 SHG 信号,故收集到的结构化 SHG 图像拥有更好的信噪比。与基于点扫描的 TPEF-SIM 相比,实验中在保持共聚焦光路特点的同时,使用了基频条纹(ω)和倍频条纹(2ω),并令 $\omega \approx 0.5\omega_c$,进而让激发条纹具有了更高的对比度。此外,在图像重构算法中,在 ω 和 2ω 对应的样本 SHG 信息分量与原样本通频带内的样本 SHG 信息分量相加的同时,重新分配了各个分量的权重,将原样本通频带内的样本 SHG 信息分量的权重削弱至

2ω 信息分量的一半,有利于降低重构伪影。然而,为提取倍频条纹信息,在每个方向上获取的原图像数量也会相应增加到 5 幅,这会导致成像速度变慢,而多焦点扫描技术能够进一步提高成像速度。在实验中,由于存在系统参数(扫描速度、调制频率等)误差、光学系统畸变、光路准直偏差和重构过程中条纹参数误差等因素,故实验结果没有达到理论预期的 2 倍分辨率提高。后续将进一步优化系统参数和重构算法。SHG-psSIM 未来具有多种发展方向,例如:由于其成像方式与双光子成像相似,故可以对系统进行改进,向多模态、多色成像方面发展;多次谐波成像的探究;多维度成像等。

参 考 文 献

- [1] Zoumi A, Yeh A, Tromberg B J. Imaging cells and extracellular matrix *in vivo* by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(17): 11014-11019.

- [2] Zipfel W R, Williams R M, Christie R, et al. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(12): 7075-7080.
- [3] Yeh C H, Chen S Y. Resolution enhancement of two-photon microscopy via intensity-modulated laser scanning structured illumination[J]. *Applied Optics*, 2015, 54(9): 2309-2317.
- [4] Deng Y Y, Qin Y F, Zhang Z B, et al. Simultaneous label-free two-photon fluorescence and second-harmonic generation microscopy for visualization of mouse pulmonary alveoli [J]. *Proceedings of SPIE*, 2020, 11549: 1154916.
- [5] Odin C, Guilbert T, Alkilani A, et al. Collagen and myosin characterization by orientation field second harmonic microscopy[J]. *Optics Express*, 2008, 16(20): 16151-16165.
- [6] Chen C P, Qin Z Y, He S C, et al. High-resolution two-photon transcranial imaging of brain using direct wavefront sensing[J]. *Photonics Research*, 2021, 9(6): 1144-1156.
- [7] Hirayama H, Watai M W. Two-photon resonance in optical second harmonic generation from quantum well states in ultra-thin Ag films grown on Si(111) surfaces[J]. *Surface Science*, 2006, 600(18): 3825-3829.
- [8] Adur J, Pelegati V B, de Thomaz A A, et al. Combined nonlinear laser imaging (two-photon excitation fluorescence, second and third-harmonic generation, and fluorescence lifetime imaging microscopies) in ovarian tumors[J]. *Proceedings of SPIE*, 2012, 8226: 82261A.
- [9] Zhou Z H, Liu W, He J J, et al. Far-field super-resolution imaging by nonlinearly excited evanescent waves [J]. *Advanced Photonics*, 2021, 3(2): 025001.
- [10] Abrahamsson S. Super-resolution microscopy on a photonic chip[J]. *Nature Photonics*, 2020, 14(7): 403-404.
- [11] Sigal Y M, Zhou R B, Zhuang X W. Visualizing and discovering cellular structures with super-resolution microscopy[J]. *Science*, 2018, 361(6405): 880-887.
- [12] Sheng J, Xie J L, Liu J J. Multiple super-resolution imaging in the second band of gradient lattice spacing photonic crystal flat lens[J]. *Chinese Optics Letters*, 2020, 18(12): 120501.
- [13] Silani Y, Hubert F, Acosta V M. Stimulated emission depletion microscopy with diamond silicon vacancy centers[J]. *ACS Photonics*, 2019, 6(10): 2577-2582.
- [14] Wu Z Y, Xu X Z, Xi P. Stimulated emission depletion microscopy for biological imaging in four dimensions[J]. *Microscopy Research and Technique*, 2021, 25(6): 741-752.
- [15] Sharma R, Singh M, Sharma R. Recent advances in STED and RESOLFT super-resolution imaging techniques [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 231: 117715.
- [16] Grotjohann T, Testa I, Reuss M, et al. rsEGFP₂ enables fast RESOLFT nanoscopy of living cells[J]. *eLife*, 2012, 1: e00248.
- [17] Hamel V, Guichard P, Fournier M, et al. Correlative multicolor 3D SIM and STORM microscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2014, 5(10): 3326-3336.
- [18] Zhang H, Zhao M, Peng L L. Nonlinear structured illumination microscopy by surface plasmon enhanced stimulated emission depletion [J]. *Optics Express*, 2011, 19(24): 24783-24794.
- [19] Hainsworth A H, Lee S, Foot P, et al. Super-resolution imaging of subcortical white matter using stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) and super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI) [J]. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2018, 44(4): 417-426.
- [20] Pfender M, Aslam N, Waldherr G, et al. Single-spin stochastic optical reconstruction microscopy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(41): 14669-14674.
- [21] Tang J Y, Vaziri A, Akerboom J P, et al. Three dimensional super resolution fluorescence imaging of single bacterial cells by stereo photoactivated localization microscopy [J]. *Microscopy and Microanalysis*, 2009, 15(S2): 564-565.
- [22] Shroff H, Galbraith C G, Galbraith J A, et al. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics [J]. *Nature Methods*, 2008, 5(5): 417-423.
- [23] Zhanghao K, Chen X Y, Liu W H, et al. Super-resolution imaging of fluorescent dipoles via polarized structured illumination microscopy [J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4694.
- [24] 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.
- [25] Huang B, Wang W Q, Bates M, et al. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic

- optical reconstruction microscopy[J]. *Science*, 2008, 319(5864): 810-813.
- [26] Wei F F, Lu D L, Shen H, et al. Wide field super-resolution surface imaging through plasmonic structured illumination microscopy [J]. *Nano Letters*, 2014, 14(8): 4634-4639.
- [27] Zheng Z, Shi R H, Kong L J. High-speed wide-field optical-sectioning fluorescence microscopy based on one-shot structured illumination[J]. *Proceedings of SPIE*, 2020, 11553: 1155320.
- [28] 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.
- [29] Tian N, Fu L, Gu M. Resolution and contrast enhancement of subtractive second harmonic generation microscopy with a circularly polarized vortex beam[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13580.
- [30] Tam J, Merino D. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) in comparison with stimulated emission depletion (STED) and other imaging methods[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2015, 135(4): 643-658.
- [31] Liu J, Cho I H, Cui Y, et al. Second harmonic super-resolution microscopy for quantification of mRNA at single copy sensitivity [J]. *ACS Nano*, 2014, 8(12): 12418-12427.
- [32] Urban B E, Yi J, Chen S, et al. Super-resolution two-photon microscopy via scanning patterned illumination[J]. *Physical Review E*, 2015, 91(4): 042703.
- [33] 张子一, 王明雪, 刘志贺, 等. 二次谐波在生物医学成像中的应用 [J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207008.
- Zhang Z Y, Wang M X, Liu Z H, et al. Application of second harmonic generation in biomedical imaging [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207008.
- [34] 郝翔, 杨青, 匡翠方, 等. 光学移频超分辨成像技术进展[J]. *光学学报*, 2021, 41(1): 0111001.
- Hao X, Yang Q, Kuang C F, et al. Optical super-resolution imaging based on frequency shift[J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(1): 0111001.
- [35] Bellec M, Royon A, Bousquet B, et al. Beat the diffraction limit in 3D direct laser writing in photosensitive glass [J]. *Optics Express*, 2009, 17(12): 10304-10318.
- [36] Wang X, Zhou W X, Xu D D, et al. Analysis and verification of fluorescence super-resolution microscopy via polarization modulation in reciprocal space [J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2021, 38(3): 337-343.
- [37] 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.
- [38] Neil M A 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.