

基于液体变焦透镜和振镜的三维光片显微成像系统

李红帝¹, 张红霞^{1*}, 宋晓敏¹, 赵若昕¹, 吴国新², 贾大功¹, 刘铁根¹

¹天津大学光电信息技术教育部重点实验室, 天津 300000;

²北京信息科技大学现代测控技术教育部重点实验室, 北京 100192

摘要 搭建了一种基于液体变焦透镜和振镜的三维光片显微成像系统, 设计了振镜、液体变焦透镜、相机的同步控制采集成像系统, 通过调谐振镜和液体变焦透镜, 使得光片激发样品和成像同步, 获得样品不同切面的图像堆栈并实现样品的三维重建。当采用数值孔径为 0.3、放大倍率为 10 的成像物镜时, 该系统的轴向扫描范围为 507 μm , 横向视场达到 1970 $\mu\text{m} \times 1300 \mu\text{m}$, 横向分辨率为 1.32 μm , 轴向分辨率可达 12.75 μm 。在轴向扫描过程中, 系统的放大倍率保持恒定, 可以用于对一定尺寸生物样品的成像实验和相关研究, 并通过对斑马鱼胚胎进行成像验证所提系统对厚生物样品成像的可行性。

关键词 成像系统; 光片显微成像; 液体变焦透镜; 振镜; 三维成像

中图分类号 TH742

文献标志码 A

DOI: 10.3788/AOS221275

1 引言

光片荧光显微镜以其快速成像、低光毒性、低漂白性、高时空分辨率, 已成为生物医学研究的基本工具。随着科学的进步, 生命科学的研究对象从单层细胞转变为器官甚至整个动物^[1]。对生物样品的研究在很大程度上依赖三维体积成像来提供完整样本的结构和功能信息^[2-3]。大多数传统成像工具, 如宽视场和共聚焦显微镜, 使用相同的物镜来激发和收集样品的荧光^[4]。采用小针孔在主平面上获得荧光, 以提高图像的对比度^[5-6]。已建立的荧光显微技术无法一次直接对样品三维体积进行成像, 因此, 为了获得样品中荧光分子的三维图像, 必须进行多次照射, 这导致光漂白和光毒性增加, 并限制了连续成像时间。

与传统显微镜相比, 光片荧光显微镜(LSFM)的特点是通过两个或多个显微物镜进行成像, 其中激发和检测路径分离, 使成像物平面只有在成像时才被照明激发, 有效减少了非物平面荧光信号的干扰, 从而提高对比度^[7]。用片状光照明方式只需对成像层面照明一次, 从而显著提高了三维成像速度并降低了光毒性和光漂白性^[8], 进而提高了信噪比^[9-13]。

目前, 为实现厚生物样品三维成像, 获取生物组织不同层面结构的方法主要包括以下两种: 1) 移动样

品^[14], 这种方法主要受限于样品的安装方式, 低含量的琼脂糖凝胶才能维持生物样品的正常发育, 但会引起不稳定问题; 2) 同时移动光片和探测物镜, 这种方法的成像速度受惯性限制^[15], 且在轴向扫描过程中系统的放大倍率会发生变化, 导致在三维重建之前需要做图像配准等预处理, 配准不当将导致图像失真^[16]。

为了捕捉样品的动态状态并避免记录数据的失真, 体积成像必须以非常高的速度并行或以多个平面顺序的成像来执行, 理想情况下没有任何样品移动^[17]。因此, 搭建了一种基于液体变焦透镜和振镜配合的三维光片显微成像系统, 并设计了振镜、液体变焦透镜、相机的同步控制采集成像系统, 在成像系统中加入液体变焦透镜进行远程聚焦, 在照明系统中加入振镜进行扫描以使光片沿轴向移动, 并得到振镜、液体变焦透镜和相机的同步控制信号时序关系, 从而在避免样品移动的情况下实现对整个样品的三维成像。使用荧光微球和斑马鱼胚胎进行成像, 以验证系统的三维成像性能。本研究为实现厚生物样品的三维形貌观测提供了一种可行的办法。

2 基本原理

基于液体变焦透镜(ETL, EL-10-30-C, Optotune)和振镜(GVS001, Thorlabs)的三维光片显

收稿日期: 2022-06-07; 修回日期: 2022-07-13; 录用日期: 2022-08-01; 网络首发日期: 2022-08-11

基金项目: 国家自然科学基金(61675153)

通信作者: hxzhang@tju.edu.cn

微成像系统原理图如图 1 所示,系统由互相垂直的照明光路和成像光路组成。在照明光路中,半导体激光器发出的光束($\lambda=532\text{ nm}$)经过针孔滤波、准直扩束之后,经过柱面镜被压缩成高斯光片,高斯光片通过振镜和照明物镜后在样品室可沿样品轴向进行扫描激发。成像部分主要是由检测物镜、液体变焦透镜、4f系统和 sCMOS(Dhyana400D, LK-20)相机组成。检测物镜收集光片激发的荧光图像,然后通过滤光片滤除激发光,荧光再经过液体变焦透镜后聚焦到 sCMOS 相机上。本装置通过振镜对光片进行轴向扫描,激发样品的一系列切面,从而实现对样品的体积照明,并由成像光路进行成像,从而完成样品的三维成像。

本装置照明光路中采用的振镜是检流计式振镜,其

特点是扫描角度和输入电压为线性关系,在工作时通过输入周期性电压实现光片的周期性扫描。在检测光路上,该装置的成像光路的实质为双远心光路。当无变焦透镜时,探测物镜和透镜 1 组成一个无焦系统,孔径光阑放置在探测物镜的后焦面处,用液体变焦透镜替代孔径光阑,可实现系统的自动轴向扫描。在透镜的安装过程中,需要精确对准显微物镜和液体变焦透镜主平面位置,该过程对光学系统的调节精度要求高。为降低调节精度,插入一个由透镜 2 和透镜 3 组成的无焦光学系统,而液体变焦透镜位于透镜 2 的后焦面上。为确保在透镜变焦过程中系统的放大倍率不变,需要显微物镜后焦面和透镜 1 前焦面重合,透镜 1 后焦面和透镜 2 前焦面重合,透镜 2 后焦面和透镜 3 前焦面重合。

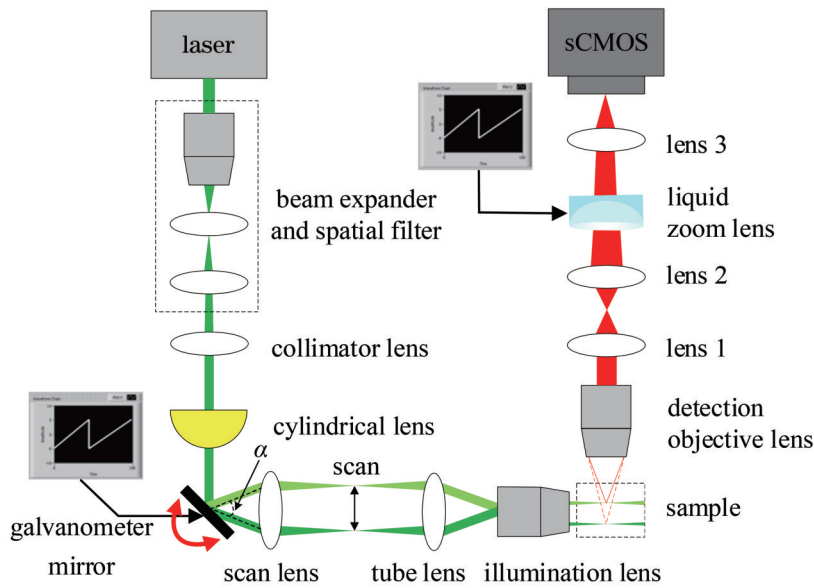


图 1 基于液体变焦透镜和振镜的三维光片显微成像系统原理图

Fig. 1 Schematic diagram of 3D light-sheet microscopy imaging system based on liquid zoom lens and galvanometer mirror

双远心光路的物像关系如图 2 所示。图 2 中: F_4 和 F'_4 分别为透镜 4 的物方焦点和像方焦点; f_4 和 f'_4 分别为透镜 4 的物方焦距和像方焦距; F_5 和 F'_5 分别为透镜

5 的物方焦点和像方焦点; f_5 和 f'_5 分别为透镜 5 的物方焦距和像方焦距; AB 、 A_1B_1 和 A_2B_2 分别为位于透镜 4 和透镜 5 组成的双远心光路物方 A 、 A_1 和 A_2 点处的物

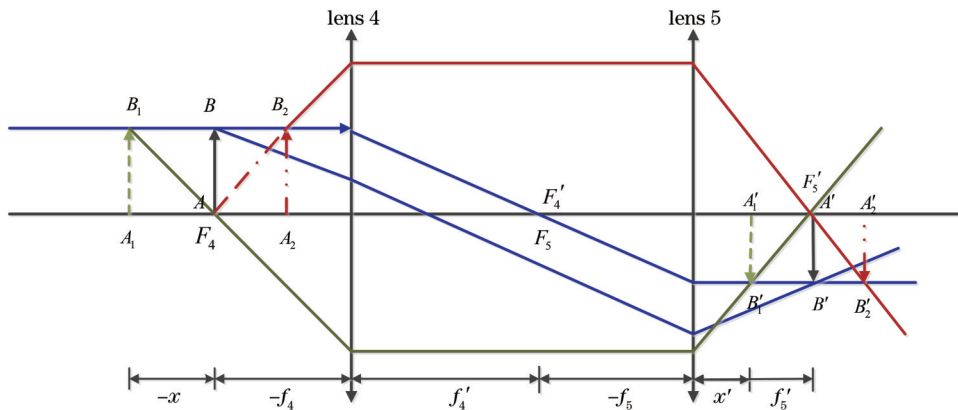


图 2 双远心光路的物像关系

Fig. 2 Object-image relationship of double telecentric optical path

体, $A'B'$ 、 A_1B_1' 和 A_2B_2' 分别为 AB 、 A_1B_1 和 A_2B_2 通过双远心光路所成的像; x 和 x' 分别为双远心光路的物平面和像平面的位移量。

对图 2 中可知,随着物平面的移动,像平面朝着同一方向移动,物平面和像平面移动距离的关系为

$$x' = \frac{\beta f_5'}{f_4} x, \quad (1)$$

式中: β 为双远心光路的放大倍率。

对图 1 中部分成像光路进行分析,在透镜 1 和相机之间插入由透镜 2 和透镜 3 组成的 $4f$ 系统,液体变焦透镜位于 $4f$ 系统中间,且液体变焦透镜的主平面和探测显微物镜的像方焦平面重合。在液体变焦透镜的变焦过程中,系统物方主平面的位移距离 $\delta_{z_{\text{obj}}}$ 为

$$\delta_{z_{\text{obj}}} = -\frac{1}{\beta_M^2} \frac{n f_3^2}{f_v}, \quad (2)$$

式中: f_v 为液体变焦透镜的物方焦距; n 为浸润介质的折射率; β_M 为系统的放大倍率。

本装置将 $4f$ 系统插入现有的双远心光路,基于液体变焦透镜和振镜的三维光片显微成像系统的简化光路如图 1 所示。用 f_0' 和 f_2' 分别表示光片显微系统成像光路中探测物镜(放大倍率为 10,数值孔径为 0.3)和透镜 2($f_2=40$ mm)的像方焦距, f_1 和 f_3 分别代表系统中透镜 1($f_1=100$ mm)和透镜 3($f_3=50$ mm)的物方焦距。根据图 1,系统的放大倍数 β_M 为

$$\beta_M = \frac{f_1 f_3}{f_0' f_2'}. \quad (3)$$

从式(2)中可以看出,系统实现轴向扫描是通过调谐液体变焦透镜的光焦度来移动物方主平面,且物方主平面位移量与液体变焦透镜的光焦度呈线性关系。由于装置的远心性,检测光路的放大倍率不依赖于液体变焦透镜的焦距,因此不依赖于像平面的位移,在轴向扫描过程中,保持成像系统放大倍率不变,序列图像间距相等便于后续的三维图像重建。

除此之外,液体变焦透镜与光轴的对齐至关重要,液体变焦透镜沿光轴的正确位置确保成像光路的放大倍率与液体变焦透镜的焦距变化无关,避免成像过程中图像的放大倍率或者横向位置发生变化,通过反复调节液体变焦透镜的位置,记录液体变焦透镜不同焦距时的图像变化,进而消除图像偏移和保持恒定的放大倍率。

样品三维体积照明是通过在照明路径上使用振镜扫描进行整个样品的光片轴向扫描,同时,通过调谐液体变焦透镜来实现物方主平面同步移动,保证物方主平面和照明光片始终重合,精确地实现样品三维体积成像。为了保证得到的三维图像是准确的,振镜与液体变焦透镜严格同步扫描是必不可少的步骤。为了实现系统对样品的三维图像采集,需要对振镜、液体变焦透镜和探测相机进行同步控制,即控制振镜扫描光片进行轴向移动以激发样品,液体变焦透镜控制物方主平面移动和光片激发位置重合,然后利用相机对激发图像进行采集,利用计算机对采集到的图像进行后续处理,具体的控制部分的流程图如图 3 所示。

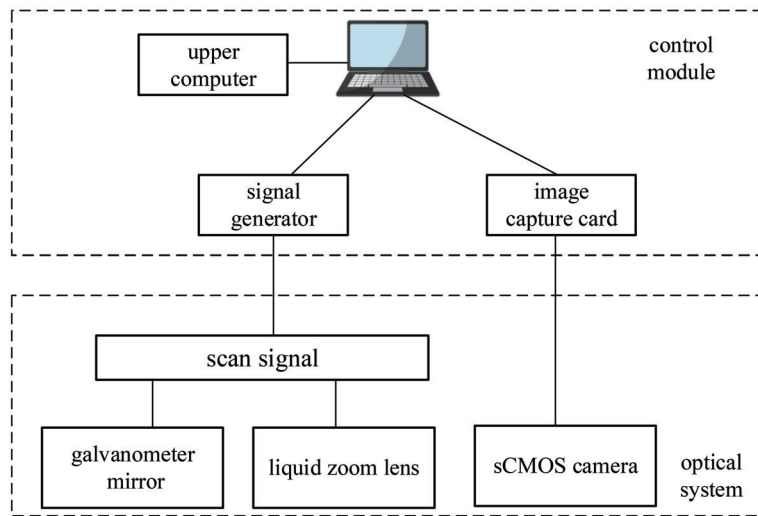


图 3 光片显微系统控制原理图

Fig. 3 Control principal diagram of optical slice microscopic system

3 分析与讨论

3.1 系统放大倍率

通过测量条纹间距为 $50 \mu\text{m}$ 的掩模版图案[图 4 (a)~(f)]来确定整个检测路径的放大倍率,对于放大

倍率为 10、数值孔径为 0.3 的检测物镜来说,系统的实际放大倍率 $\beta_M=9.09$ [图 4(g)],本系统的放大倍率理论上约为 8.9,且随着液体变焦透镜驱动电流的增加,系统的放大倍率基本保持不变。由于该系统是将样品轴向扫描成多幅平面图像,因此需保证在不同主平面

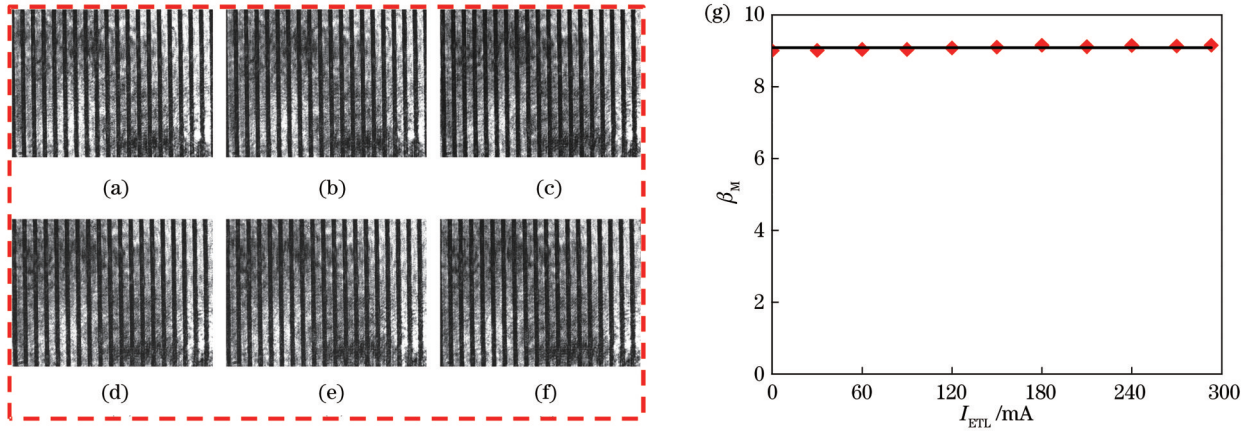


图 4 透镜变焦过程中周期性条纹掩模版所成的像,以及显微成像系统的放大倍率。(a) $I_{ETL}=0$ mA; (b) $I_{ETL}=60$ mA; (c) $I_{ETL}=120$ mA; (d) $I_{ETL}=180$ mA; (e) $I_{ETL}=240$ mA; (f) $I_{ETL}=293$ mA; (g)放大倍率为 9.09

Fig. 4 Images formed by periodic fringe mask and magnification of microscopic imaging system during zooming process of liquid lens. (a) $I_{ETL}=0$ mA; (b) $I_{ETL}=60$ mA; (c) $I_{ETL}=120$ mA; (d) $I_{ETL}=180$ mA; (e) $I_{ETL}=240$ mA; (f) $I_{ETL}=293$ mA; (g) magnification is 9.09

位置处成像系统的放大倍率不变,在后续的图像处理重建时,可以避免对图像进行放缩和配准处理,进而提高系统三维成像的准确性。

3.2 液体变焦透镜和振镜的同步控制

本装置通过调节液体变焦透镜的光焦度来移动成像光路物方主平面,进而实现轴向扫描。物方主平面的位移量与液体变焦透镜的光焦度变化量呈线性关系,如式(2)所示。为分析商用液体变焦透镜光焦度的调谐范围和系统轴向扫描范围之间的关系,对不同电流下物平面的位置进行了探测。当驱动电流 $I_{ETL}=0$ mA时,系统的物平面位置记为 $\delta_{z_{det}}=0$ μm ;当驱动电流改变时,液体变焦透镜的焦距发生变化,系统物方主平面位置发生变化。当远离显微物镜时,系统物方主平面位置记为负;当靠近显微物镜时,系统物方主平面位置记为正。

当电流从 0 mA 升高到 293 mA,物平面移动范围为 507 μm 。根据式(2),减小成像系统的放大倍率可以增大系统的轴向扫描范围,且轴向扫描范围与成像系统的放大倍率的平方成反比。当系统的放大倍率减小为原来的一半时,轴向扫描范围变为 2028 μm ,从而可以对更大尺寸的生物样品进行三维成像。由于光学显微镜的本质是对生物样品进行放大成像,提高系统的放大倍率势必会减小系统的轴向扫描范围,故应用于光片荧光显微成像系统的液体变焦透镜需要有大光焦度调谐范围。由于该商用透镜的光焦度与所施加的电流呈线性关系,理论上物方主平面位移量与液体变焦透镜上施加的电流值呈线性关系,对电流值和物方主平面位移量进行线性拟合,得到图 5。

由图 5 可知,物平面位置与液体变焦透镜施加电流 I_{ETL} 呈线性关系,液体变焦透镜施加电流每增加 1 mA,物平面位置改变 1.73 μm ,轴向扫描范围即物方主平面移动范围可达到 507 μm 。由图 1 中系统的原理

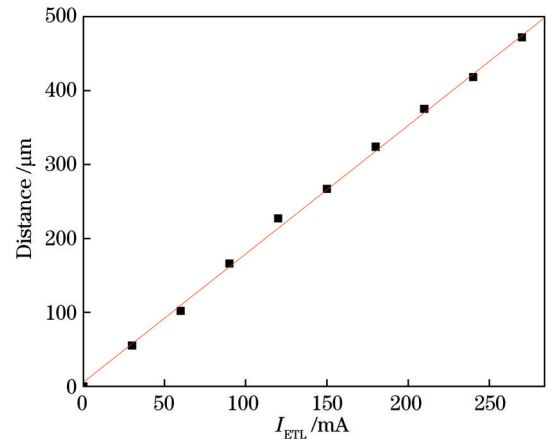


图 5 物方主平面位移量和液体变焦透镜上驱动电流 I_{ETL} 的关系图

Fig. 5 Relationship between distance of main plane of object and applied current I_{ETL} of liquid zoom lens

图可知,照明光路通过柱透镜产生的高斯光片激发样品发射荧光,成像探测光路探测的信号被探测器或者相机采集。高斯光束经过柱面镜产生高斯光片的方式的主要优点是简单易操作,而且光片的压缩质量较高,厚度相对较薄。本文中的光片显微系统通过柱透镜压缩成高斯光片,高斯光束和压缩后的光片如图 6(a)、(b)所示,光片厚度可达到 10 μm 。

为通过实验分析振镜施加电压和光片轴向扫描范围之间的关系,对振镜在不同驱动电压下的高斯光片位置进行了探测,所使用的探测器是光束分析仪(BC207 VIS, Thorlabs)。扫描振镜扫描光片的位置与扫描振镜的施加电压的关系如图 6 所示。

由图 6 可知,振镜扫描光片的轴向位置与振镜施加电压呈线性关系,施加电压每变化 1 mV,光片位置移动 3.00 μm ,即轴向扫描光片的步进精度为 3.00 μm 。

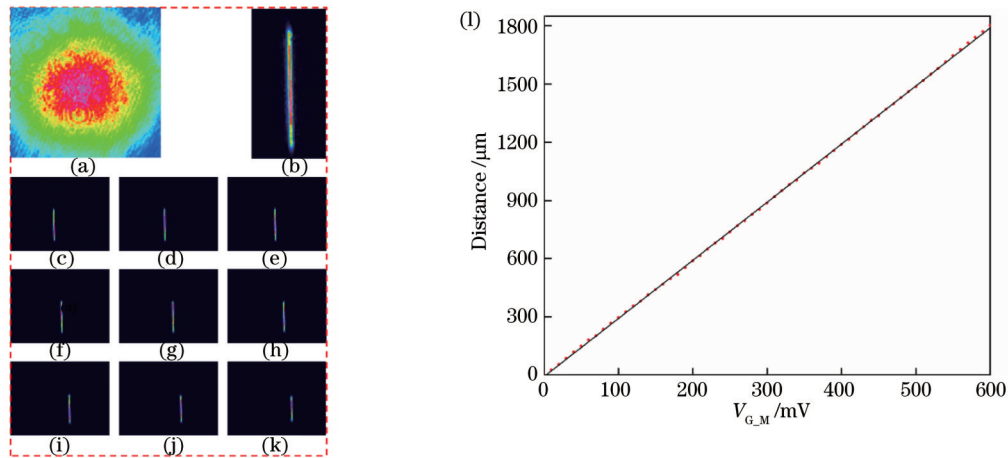


图 6 高斯光束、高斯光片和扫描振镜扫描光片位置与振镜施加电压 $V_{G,M}$ 的关系。(a) 高斯光束; (b) 高斯光片; (c) $V_{G,M}=0$ mV、(d) $V_{G,M}=50$ mV、(e) $V_{G,M}=100$ mV、(f) $V_{G,M}=150$ mV、(g) $V_{G,M}=200$ mV、(h) $V_{G,M}=250$ mV、(i) $V_{G,M}=300$ mV、(j) $V_{G,M}=350$ mV 和 (k) $V_{G,M}=400$ mV 时光束分析仪检测到的高斯光片; (l) 振镜扫描光片位置与外加电压的关系

Fig. 6 Gaussian beam, Gaussian light sheets, and relationship between position of scanning light sheet of scanning galvanometer and applied voltage $V_{G,M}$. (a) Gaussian beam; (b) Gaussian light sheet; Gaussian light sheets detected by optical beam profilers (c) $V_{G,M}=0$ mV, (d) $V_{G,M}=50$ mV, (e) $V_{G,M}=100$ mV, (f) $V_{G,M}=150$ mV, (g) $V_{G,M}=200$ mV, (h) $V_{G,M}=250$ mV, (i) $V_{G,M}=300$ mV, (j) $V_{G,M}=350$ mV, and (k) $V_{G,M}=400$ mV; (l) relationship between position of scanning light sheet of scanning galvanometer and applied voltage

前文已经得到物方主平面随液体变焦透镜施加电流线性变化,轴向扫描光片位置与振镜施加电压呈线性关系。为了保证三维成像的准确性、保证对样品进行切片成像时每一张图像都是聚焦的,驱动振镜电压和液体变焦透镜电流变化时,需保证成像系统的主平面和振镜扫描光片位置重合,这时可以得到液体变焦透镜驱动电流和振镜驱动电压的对应关系。具体过程如图 7(a) 所示:1) 成像光路中先不放置液体变焦透镜,振镜的电压设置为 0 V,光片照射激发其中一个微球,调整样品位置,使其聚焦;2) 加入液体变焦透镜,调整液体变焦透镜的电压,使微球重新聚焦;3) 将振镜电压增加 0.01 V,振镜偏转,光片扫描到样品的其他切面,此时微球会出现离焦现象;4) 慢慢移动样品,使微球达到最大离焦状态;5) 调节液体变焦透镜电压,使微球再次聚焦,记下此时液体变焦透镜的电压值;6) 重复步骤 3)、4)、5), 这样能得到振镜施加电压与液体变焦透镜施加电流的对应关系,将其拟合成曲线,在后期成像实验时,按照对应关系曲线去驱动振镜和液体变焦透镜,实现两者的同步控制,拟合曲线如图 7(b) 所示。

完成上述步骤后会得到一系列数据,经拟合后得到振镜和液体变焦透镜的对应时序关系如图 7 所示,可知振镜扫描时光片位置随振镜施加电压呈线性关系。由图 7(b) 可知,振镜施加电压每增加 1 mV,需要液体变焦透镜施加电流增加 1.73 mA,光片位置移动 3.00 μm ,系统轴向扫描范围即物平面移动范围可达到 507 μm 。

在对样品进行三维图像采集或者动态三维成像的

过程中,振镜和液体变焦透镜需要不断地进行三维周期性扫描,利用振镜轴向扫描光片实现样品的体积照明,同时,也需要对液体变焦透镜进行同步控制,对激发的图像进行采集成像,完成整个周期的扫描成像后,重新开始下一个周期的扫描成像,这样也可以实现样品的实时动态三维成像。由图 7(b) 可知,振镜驱动电压和液体变焦透镜驱动电流之间呈线性关系。本装置选择三角波作为液体变焦透镜和振镜的控制信号。为了实现较高的扫描成像效率,即有效扫描的时间尽可能占比大一些,控制有效扫描成像的时间和控制信号的复位时间的比例为 9:1,即占空比达到 90%。前文已经得到了振镜控制电压和液体变焦透镜控制电流的线性对应关系,振镜、液体变焦透镜和相机控制信号的时序图如图 8 所示。

在实际的实验过程中,振镜和液体变焦透镜的控制时序和相机的采集帧率是随着不同的实验对象灵活变化的。如果对静态的生物样品(如斑马鱼的血管或者尾骨)进行成像,相机就可以降低成像帧率;如果对斑马鱼的心脏跳动进行成像,就需要设置较高的相机成像帧率。

3.3 荧光微球成像实验

为了对光片显微成像系统的视场进行衡量,使用直径为 10 μm 的荧光微球标准样品进行成像。琼脂糖包埋荧光微球样品的制备流程如下:琼脂糖粉末和无菌水的比例为 1:100,将二者均匀混合、加热,制成浓度为 1% 的琼脂糖溶液,按照 1:1000 的比例取出荧光微球和琼脂糖溶液,放在试管里混合均匀,荧光微球溶液取 5 μL ,琼脂糖溶液取 5 mL,再取适量混合后的微

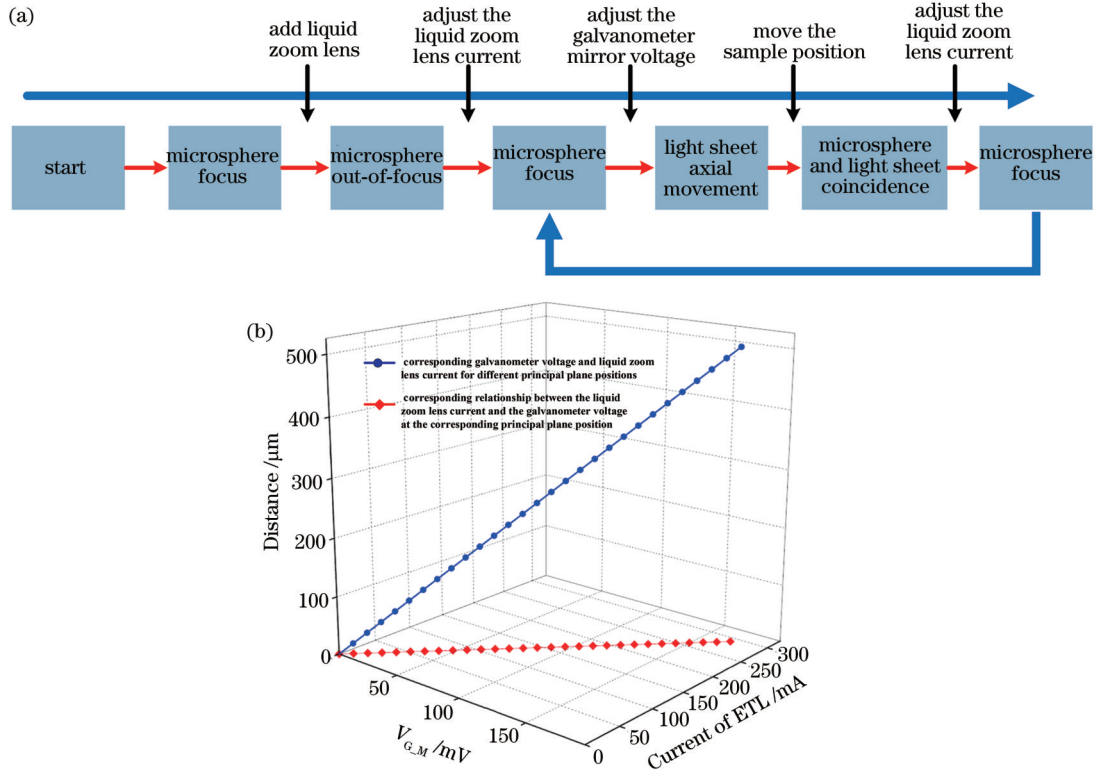


图 7 振镜和液体变焦透镜的同步扫描关系。(a)测定振镜和液体变焦透镜同步扫描关系的流程图;(b)振镜施加电压 $V_{G,M}$ 与液体变焦透镜施加电流的对应关系与对应物方主平面位置

Fig. 7 Synchronous scanning relationship between galvanometer mirror and liquid zoom lens. (a) Flow chart for measuring synchronous scanning relationship between galvanometer mirror and liquid zoom lens; (b) corresponding relationship between applied voltage of galvanometer mirror $V_{G,M}$ and current of liquid zoom lens, and corresponding position of main plane of object

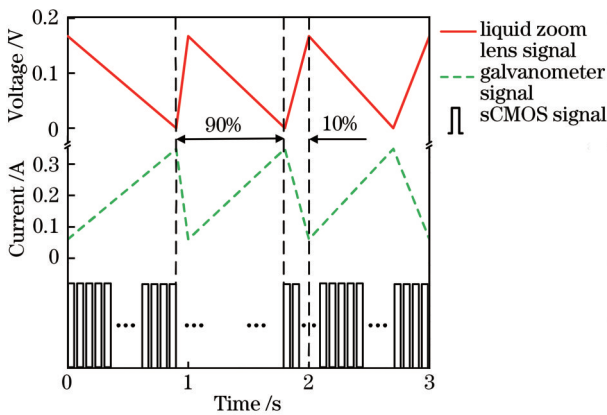


图 8 同步控制系统控制信号时序图

Fig. 8 Sequence chart of control signal of synchronous control system

球溶液放在样品槽内,等待其冷却凝固。使用三维光片显微成像系统对荧光微球样品进行成像,得到如图 9 所示的成像结果。

对图 9 中得到的荧光微球图像的强度分布曲线进行高斯拟合并进行归一化处理,得到的强度分布曲线如图 9(b)所示,测得归一化强度的半峰全宽(FWHM)为 9.24 pixel,微球直径为 10 μm ,因此单个像素代表实际视场尺寸为 1.08 μm ,相机在全像素下进行成像,

像素值为 1824×1216 ,可以计算得到相机对应的视场为 $1970 \mu\text{m} \times 1300 \mu\text{m}$,系统轴向扫描范围为 $507 \mu\text{m}$,所以系统的实际探测视场为 $1970 \mu\text{m} \times 1300 \mu\text{m} \times 507 \mu\text{m}$ 。

系统点扩展函数是对成像系统成像性能最直接有效的表征。对光片显微系统来说,横向分辨率主要由物镜的数值孔径决定,轴向分辨率由光片的厚度和光片最小位移量^[18]决定。通过对系统的点扩展函数的测量分析,可以得到系统的空间分辨率,光片显微系统的理论横向分辨率 σ_{lateral} 和轴向分辨率 σ_{axial} 可分别表示为

$$\begin{cases} \sigma_{\text{lateral}} = \frac{0.61\lambda}{NA} \\ \sigma_{\text{axial}} = \frac{1.78n\lambda}{NA^2} \end{cases}, \quad (4)$$

式中: λ 为发射光波长; n 为介质的折射率; NA 为探测物镜的数值孔径。

本文中光片成像系统的探测物镜数值孔径 NA 为 0.3,荧光微球的激发光波长为 580 nm,故理论上成像系统的横向分辨率为 1.18 μm ,系统的轴向分辨率为 11.5 μm 。因此采用直径为 0.5 μm 的荧光微球样品对系统的点扩展函数进行测量,三维光片显微成像系统的成像结果如图 10(a)所示。通过对荧光微球横向和轴向的点扩展函数的强度分布曲线进行测量并进行归

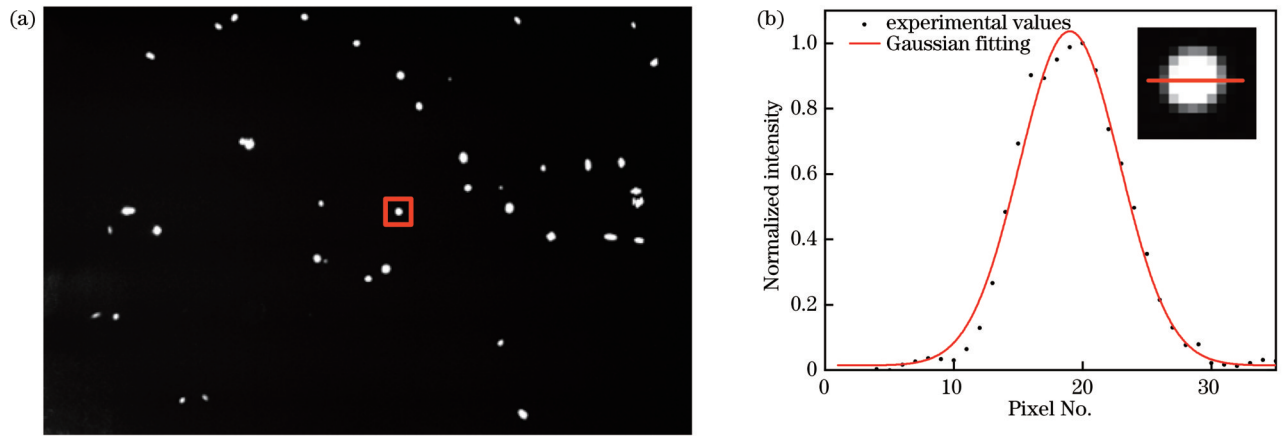


图 9 直径为 $10\ \mu\text{m}$ 的荧光微球成像结果。(a)样品二维图像分布;(b)图 9(a)框中荧光微球的局部放大图像和其强度归一化分布曲线和高斯拟合结果

Fig. 9 Imaging results of fluorescent microsphere with diameter of $10\ \mu\text{m}$. (a) Two-dimensional image distribution of sample; (b) local magnified image of fluorescent microsphere in box in Fig. 9(a) and normalized intensity distribution curve and Gaussian fitting result

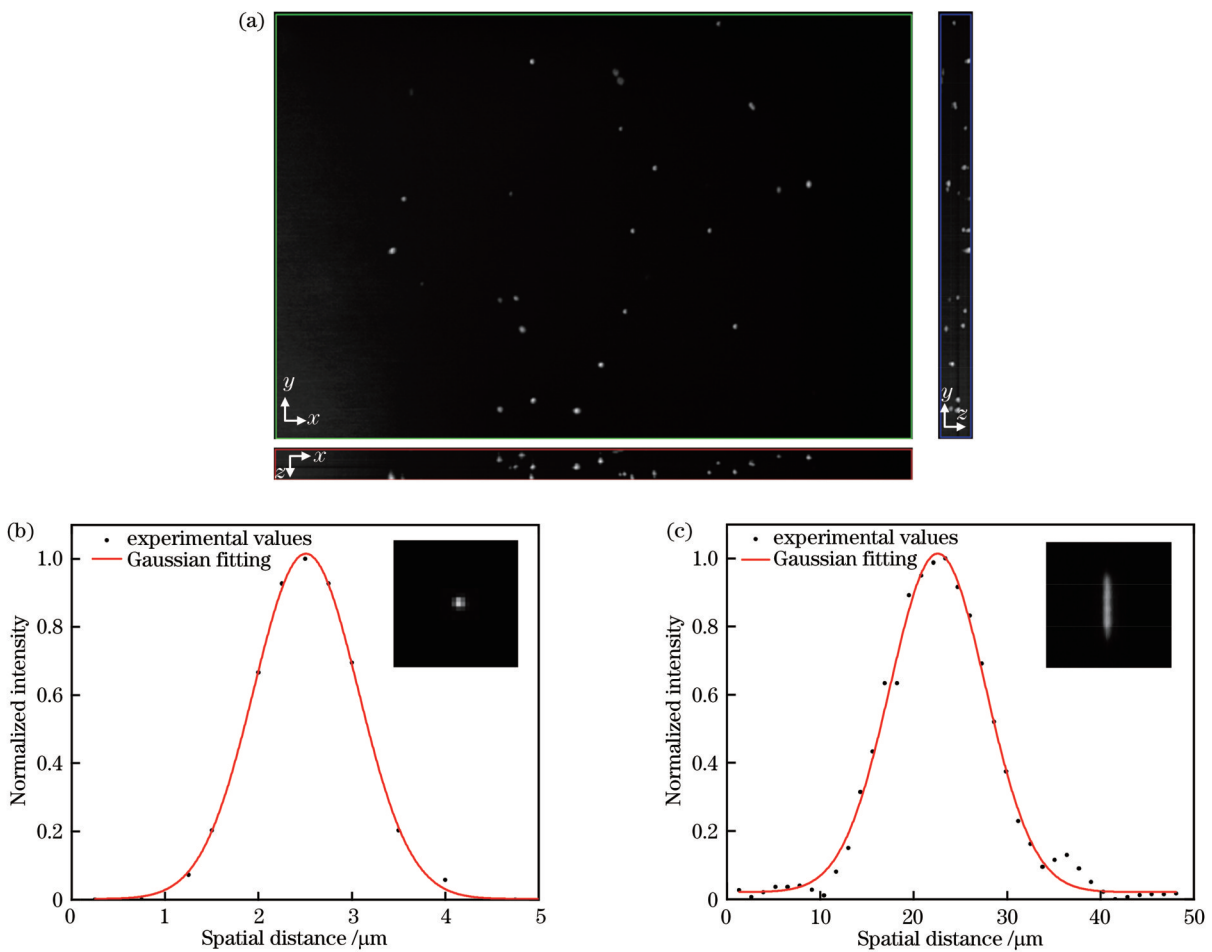


图 10 系统点扩展函数的测量结果。(a)直径为 $0.5\ \mu\text{m}$ 的荧光微球样品的三维重构图像沿 xy 、 yz 、 xz 平面的投影;点扩散函数沿 (b)横向和 (c)轴向的归一化强度分布曲线及高斯拟合结果

Fig. 10 Measurement results of system point spread function. (a) Three-dimensional reconstructed images of fluorescent microsphere sample with diameter of $0.5\ \mu\text{m}$ projected along xy , yz , and xz planes; normalized intensity distributions of point spread function along (b) lateral and (c) axial directions and Gaussian fitting results

一化高斯拟合,得到的结果如图 10(b)、(c)所示,系统的横向分辨率为 $1.32\ \mu\text{m}$,轴向分辨率为 $12.75\ \mu\text{m}$,

二者与理论分辨率的偏差主要由光路偏差和折射率不匹配问题引起,但是并不影响对实际样品的成像结果。

为验证系统三维成像的可行性,对琼脂糖包埋的 $10\ \mu\text{m}$ 荧光微球进行三维成像,对液体变焦透镜施加周期性的驱动电流,对振镜施加对应的驱动电压,通过探测该厚琼脂凝胶中的荧光微球不同层面的粒子分布情况,从而实现对整体荧光微球分布情况的体积成像。根据前文中相机、振镜和液体变焦透镜的同步控制时序关系对荧光微球样品进行成像,得到一系列二维切

片图像,图 11(a)~(d)所示分别为不同深度处样品切片图像。

根据前面采集到的完整周期的二维切片图像,利用 Amira 三维可视化软件对成像系统采集到的荧光微球图像进行三维重建,得到微球粒子的三维分布图像如图 11(e)所示,得到的荧光微球粒子的三维空间分布验证了本装置可以实现样品的三维成像。

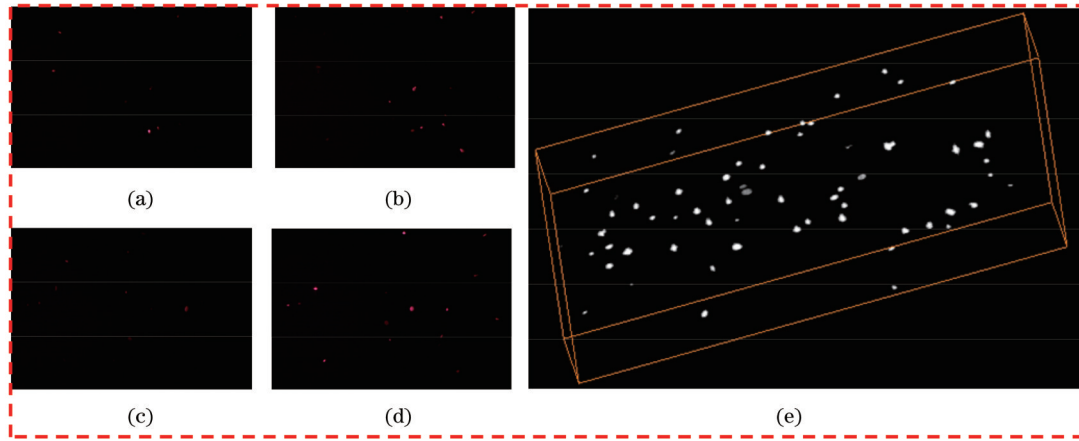


图 11 不同深度 z 处荧光微球图像和三维重建图像。(a) $z=60\ \mu\text{m}$; (b) $z=150\ \mu\text{m}$; (c) $z=240\ \mu\text{m}$; (d) $z=330\ \mu\text{m}$; (e) 体绘制算法对荧光微球样品的三维重建

Fig. 11 Fluorescent microsphere images at different depth and 3D reconstruction image of fluorescent microsphere sample. (a) $z=60\ \mu\text{m}$; (b) $z=150\ \mu\text{m}$; (c) $z=240\ \mu\text{m}$; (d) $z=330\ \mu\text{m}$; (e) 3D reconstruction of fluorescent microsphere samples by volume rendering algorithm

3.4 斑马鱼成像实验

为验证光片成像系统具有对生物样品的成像能力,使用该系统对实际的生物样品进行成像。采用斑马鱼胚胎对实际的生物样品进行成像,在利用光片显

微系统对斑马鱼进行成像时,并不需要很大的成像速度,因此可以通过适当降低成像速度来提高成像质量,通过同步调谐液体变焦透镜和振镜可以得到斑马鱼图像,斑马鱼胚胎成像如图 12 所示。

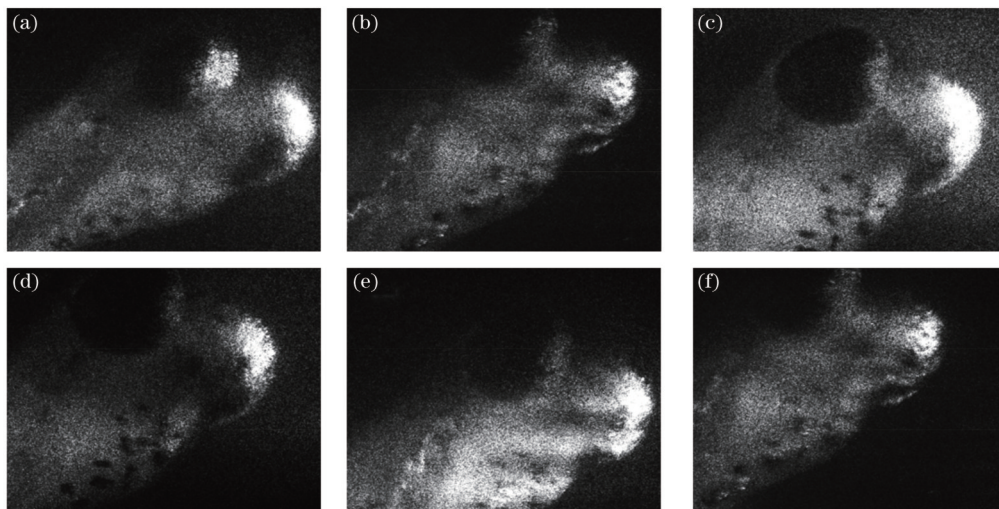


图 12 不同深度下斑马鱼胚胎头部成像结果

Fig. 12 Imaging results of zebrafish embryo head at different depth

此实验证明了该系统可以对斑马鱼样品进行成像,但是该系统对生物的三维层析能力较差,成像质量不理想。

为了验证系统高速成像的性能,对斑马鱼的心脏

跳动进行动态成像测试。心脏跳动的速度很快,所以对成像速度要求很高。为了获得更高的成像速度,需要牺牲相机成像的像素,同时还得保证视场的大小能观察到完整的心脏的三维成像结果。调节相机帧率为

100 frame/s, 振镜和液体变焦透镜以 1 Hz 的频率进行扫描, 相机在一个扫描周期内采集 100 幅图像, 对获取

的图像进行排序以生成不同平面的图像, 心脏跳动的变化过程如图 13 所示。

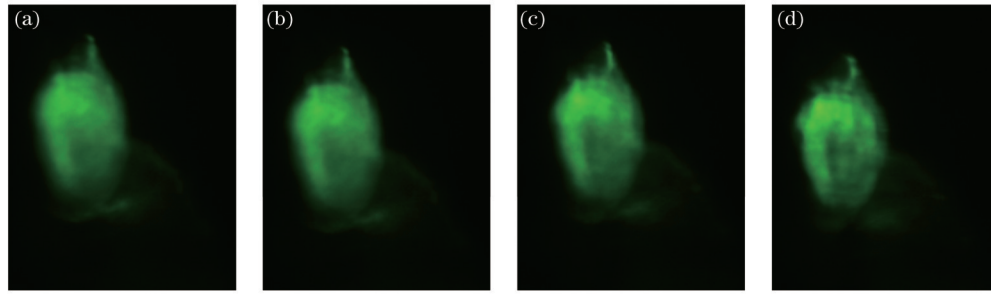


图 13 斑马鱼心脏跳动过程的成像结果

Fig. 13 Imaging results of zebrafish heart beating process

目前对荧光微球样品进行成像测试得到的层析成像效果较好, 这可以验证本系统三维成像的可行性。本系统在对斑马鱼样品进行成像测试时效果较差, 主要是因为高斯光片照明不均匀, 光强会沿着传播方向逐渐减弱。在对厚生物样品进行成像时, 色散和散射特性的影响使得系统对深部的样品成像效果很差; 系统的横向和轴向分辨率较低, 由于高分辨率需要大数值孔径的激发和收集物镜, 而大数值孔径物镜的工作距离普遍较短, 因此在空间上会受到约束, 且高斯光片的视场和光片厚度相互制约, 在对大体积样品进行成像时, 为保证视场, 需牺牲分辨率, 这也会使成像效果变差。

为了解决上述生物样品成像中存在的问题, 后续可对系统进行优化, 采用动态扫描光片可以使光片照明更加均匀, 光片厚度更小, 轴向分辨率更高, 且激发功率的提升会增强光在生物样品中的穿透性, 光片厚度小也可以抑制或者消除离焦信号的干扰, 改善厚生物样品的成像效果。

4 结 论

提出了一种基于液体变焦透镜和振镜的三维光片显微成像系统, 设计了振镜、液体变焦透镜、相机的同步控制采集成像系统, 并得到其控制信号时序关系。通过调谐振镜和液体变焦透镜控制信号, 使得光片激发样品和成像同步, 从而获得样品不同切面的图像堆栈并实现三维重建, 实现超过 $507\ \mu\text{m}$ 的轴向扫描切片成像, 且横向视场可超过 $1970\ \mu\text{m} \times 1300\ \mu\text{m}$, 横向分辨率为 $1.32\ \mu\text{m}$, 轴向分辨率可达 $12.75\ \mu\text{m}$ 。使用聚苯乙烯荧光微球粒子进行成像, 验证了此系统三维成像的可行性; 通过对斑马鱼胚胎进行成像, 验证了此系统对厚生物样品成像的可行性。预计不久的将来会出现具有更大光圈和更好聚焦性能的液体变焦透镜, 采用高速相机, 使之对更大生物样品进行高速体积成像, 或者采用线扫描实现对样品散射的抑制^[19], 进而提升对大尺寸生物样品的成像性能。

参 考 文 献

- [1] Yang Z, Mei L, Xia F, et al. Dual-slit confocal light sheet microscopy for *in vivo* whole-brain imaging of zebrafish[J]. Biomedical Optics Express, 2015, 6(5): 1797-1811.
- [2] Rahman A, Rahman A K, Rao B. Early detection of skin cancer via terahertz spectral profiling and 3D imaging[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2016, 82: 64-70.
- [3] Dickensheets D L, Kreitinger S, Peterson G, et al. Wide-field imaging combined with confocal microscopy using a miniature $f/5$ camera integrated within a high NA objective lens[J]. Optics Letters, 2017, 42(7): 1241-1244.
- [4] 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): 1257998.
- [5] Liu T L, Upadhyayula S, Milkie D E, et al. Observing the cell in its native state: imaging subcellular dynamics in multicellular organisms[J]. Science, 2018, 360(6386): eaaq1392.
- [6] Betzig E. Imaging cellular structure and dynamics from molecules to organisms[J]. Microscopy and Microanalysis, 2017, 23(S1): 2-3.
- [7] 于湘华, 刘超, 柏晨, 等. 光片荧光显微成像技术及应用进展[J]. 激光与光电子学进展, 2020, 57(10): 100001.
Yu X H, Liu C, Bai C, et al. Progress in light-sheet fluorescence microscopy and applications[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2020, 57(10): 100001.
- [8] 张球, 梁东, 白丽华, 等. 光片荧光显微镜长时间的稳定成像[J]. 中国激光, 2019, 46(4): 0407001.
Zhang Q, Liang D, Bai L H, et al. Long-time stabilization imaging by light sheet fluorescent microscope[J]. Chinese Journal of Lasers, 2019, 46(4): 0407001.
- [9] Fadero T C, Gerbich T M, Rana K, et al. LITE microscopy: tilted light-sheet excitation of model organisms offers high resolution and low photobleaching[J]. The Journal of Cell Biology, 2018, 217(5): 1869-1882.
- [10] Dong S Y, Nanda P, Guo K K, et al. Incoherent Fourier ptychographic photography using structured light[J]. Photonics Research, 2015, 3(1): 19-23.
- [11] Lim J, Lee H K, Yu W M, et al. Light sheet fluorescence microscopy (LSFM): past, present and future[J]. The Analyst, 2014, 139(19): 4758-4768.
- [12] Stelzer E H K. Light-sheet fluorescence microscopy for quantitative biology[J]. Nature Methods, 2015, 12(1): 23-26.
- [13] Pampaloni F, Chang B J, Stelzer E H K. Light sheet-based fluorescence microscopy (LSFM) for the quantitative imaging of cells and tissues[J]. Cell and Tissue Research, 2015, 360(1): 129-141.

- [14] Ahrens M B, Orger M B, Robson D N, et al. Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(5): 413-420.
- [15] Holekamp T F, Turaga D, Holy T E. Fast three-dimensional fluorescence imaging of activity in neural populations by objective-coupled planar illumination microscopy[J]. *Neuron*, 2008, 57(5): 661-672.
- [16] Swoger J, Verveer P, Greger K, et al. Multi-view image fusion improves resolution in three-dimensional microscopy[J]. *Optics Express*, 2007, 15(13): 8029-8042.
- [17] Fahrbach F O, Voigt F F, Schmid B, et al. Rapid 3D light-sheet microscopy with a tunable lens[J]. *Optics Express*, 2013, 21(18): 21010-21026.
- [18] 胡渝曜, 梁东, 王晶, 等. 基于电动可调焦透镜的大范围快速光片显微成像[J]. *物理学报*, 2020, 69(8): 088701.
Hu Y Y, Liang D, Wang J, et al. High-speed and large-scaled light-sheet microscopy with electrically tunable lens[J]. *Acta Physica Sinica*, 2020, 69(8): 088701.
- [19] 吴越前, 徐欣, 王吉祥, 等. 基于线扫描成像的光片荧光显微镜[J]. *光学学报*, 2021, 41(20): 2018001.
Wu Y Q, Xu X, Wang J X, et al. Light sheet fluorescence microscope based on line-scanning imaging[J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(20): 2018001.

Three-Dimensional Light-Sheet Microscopy Imaging System with Liquid Zoom Lens and Galvanometer Mirror

Li Hongdi¹, Zhang Hongxia^{1*}, Song Xiaomin¹, Zhao Ruoxin¹, Wu Guoxin², Jia Dagong¹, Liu Tiegeng¹

¹Key Laboratory of Optoelectronic Information Technology, Ministry of Education, Tianjin University, Tianjin 300000, China;

²Key Laboratory of Modern Measurement and Control Technology, Ministry of Education, Beijing Information Science & Technology University, Beijing 100192, China

Abstract

Objective With the advancement of science, the research objects of life science have changed from monolayers of cells to organs and even *in-situ* measurement of animals. The study of biological samples relies heavily on three-dimensional (3D) volumetric imaging to provide structural and functional information about the samples. At present, there are mainly two methods to obtain the structure of biological tissue at different levels for 3D imaging of thick biological samples, i. e. , the movement of samples and the simultaneous movement of the light sheet and the detection objective lens. The former can cause instability problems, while for the latter, the imaging speed is limited by inertia, and the magnification of the system changes during axial scanning. To capture the dynamic state of samples and avoid distortion of recorded data, we should ensure the volumetric imaging is performed in parallel at tremendously high speeds or by multiple planes sequentially, ideally without any sample movement. Therefore, we set up a 3D light-sheet microscopy imaging system based on the cooperation of the liquid zoom lens and the galvanometer mirror and design a synchronous control acquisition imaging system for the galvanometer mirror, the liquid zoom lens, and the camera to enable 3D imaging of the entire samples without sample movement. We use microspheres and zebrafish embryos to demonstrate the feasibility of the system to image thick biological samples. This study provides a feasible method for the 3D topographical observation of thick biological samples.

Methods In this paper, we set up a 3D light-sheet microscopy imaging system based on the cooperation of the liquid zoom lens and the galvanometer mirror and design a synchronous control acquisition imaging system for the galvanometer mirror, the liquid zoom lens, and the camera. First, we use a double telecentric optical path as the imaging optical path, and thus the displacement of the principal plane of the system changes linearly with the focal length of the liquid zoom lens, while the magnification of the system remains constant. Then, we analyze the relationship between the power control range of the liquid zoom lens and the axial scanning range of the system and the relationship between the applied voltage of the galvanometer mirror and the scanning range of the light sheet. Next, the control timing relationship among the galvanometer mirror, the liquid zoom lens, and the camera is obtained by the imaging of the fluorescent microspheres. Afterward, the field of view and the resolution of the system are analyzed by the imaging of the standard fluorescent microsphere samples. Finally, the 3D imaging performance of the system is evaluated by the imaging results of microsphere samples and zebrafish embryos.

Results and Discussions The constructed 3D light-sheet microscopy imaging system based on the cooperation of the liquid zoom lens and the galvanometer mirror has good 3D imaging performance. As the drive current of the liquid zoom

lens increases, the magnification of the system remains unchanged (Fig. 4). The displacement distance of the object-side principal plane has a linear relationship with the current applied to the liquid zoom lens (Fig. 5), and the axial position of the scanning light sheet has a linear relationship with the applied voltage of the galvanometer mirror (Fig. 6). For every 1 mV increase in the applied voltage of the galvanometer mirror, the liquid zoom is required. Specifically, when the applied voltage of the galvanometer mirror increases by 1 mV, the applied current of the liquid zoom lens needs to be increased by 1.73 mA. The position of the light sheet is moved by 3.00 μm , and the axial scanning range of the system, namely, the moving range of the object-side principal plane, can reach 507 μm (Fig. 7). The imaging experiments of fluorescent microspheres demonstrate that the lateral field of view of the system can reach 1970 $\mu\text{m} \times 1300 \mu\text{m}$ (Fig. 9), and the actual detection field of view is 1970 $\mu\text{m} \times 1300 \mu\text{m} \times 507 \mu\text{m}$; the lateral resolution of the system is 1.32 μm , and the axial resolution is 12.75 μm (Fig. 10). The fluorescent microsphere samples are imaged by the 3D light-sheet microscopy imaging system to verify the correctness of the synchronous control timing of the liquid zoom lens, the galvanometer mirror, and the camera. The 3D reconstruction of the obtained light-sheet image is used to verify the feasibility of the system for 3D imaging of actual samples (Fig. 11). This paper employs the imaging of zebrafish embryos to verify the feasibility of the device for 3D imaging of thick biological samples (Figs. 12 and 13).

Conclusions We set up a 3D light-sheet microscopy imaging system based on the cooperation of the liquid zoom lens and the galvanometer mirror and design a synchronous control acquisition imaging system of the galvanometer, the liquid zoom lens, and the camera. By the adjustment of the galvanometer mirror and the liquid zoom lens, the sample excitation by the light sheet is synchronized with the imaging to obtain the sample image stacks of different sections for 3D reconstruction and 3D imaging of the samples. When the imaging objective lens with a magnification of 10 and an NA of 0.3 is used, the axial scanning range of the system is 507 μm , and the lateral field of view reaches 1970 $\mu\text{m} \times 1300 \mu\text{m}$; the lateral resolution is 1.32 μm , and the axial resolution can reach 12.75 μm . The magnification of the imaging system remains constant during the axial scanning process, which can meet the requirements of the imaging experiments and related studies of a certain size of biological samples, and the imaging of zebrafish embryos demonstrates the imaging feasibility of thick biological samples. It is expected that liquid zoom lenses with larger apertures and better focusing performance will emerge soon, and with high-speed cameras, high-speed volumetric imaging of large biological samples can be achieved, or with line scanning for the suppression of sample scattering, the imaging performance of large biological samples can be improved.

Key words imaging systems; light-sheet microscopy imaging; liquid zoom lens; galvanometer mirror; three-dimensional imaging