

doi: 10.3788/gzxb20154410.1017003

3D-STORM 超分辨率成像中单分子轴向定位精度优化研究

张世超^{1,2,3}, 李思弼¹, 杨光¹, 李辉¹, 熊大曦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 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 长春 130033)

(3 中国科学院大学, 北京 100039)

摘要:为定量描述柱透镜参数对三维成像过程中荧光分子轴向定位精度的影响,本文研究了柱透镜参数与点扩散函数椭圆率的相互关系.基于 Olympus IX-83 倒置荧光显微镜搭建成像系统,利用 3 个不同焦距柱透镜进行实验,通过柱透镜标定曲线的线性变化范围及该范围内曲线的斜率分析柱透镜参数选择上的优劣,优化并提高轴向定位的精度和深度.选择合适的柱透镜参数可实现标定曲线在焦平面上上下 $1\ \mu\text{m}$ 范围线性变化,轴向定位精度为 16 nm,并采用优化的标定曲线对肌动蛋白微丝进行三维超分辨率成像.

关键词:三维;超分辨率成像;荧光显微镜;柱透镜;标定曲线

中图分类号:Q-336

文献标识码:A

文章编号:1004-4213(2015)10-1017003-6

Optimization of Single Molecules Axial Location Precision in 3D Stochastic Optical Reconstruction Microscopy

ZHANG Shi-chao^{1,2,3}, LI Si-min¹, YANG Guang¹, LI Hui¹, XIONG Da-xi¹

(1 Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiang Su 215163, China)

(2 Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130033, China)

(3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The relationship between the ellipticity of point spread function and the focal length of cylindrical lens was investigated. Fluorescent inverted microscopy imaging system is based on Olympus IX-83. With three different focal length, the point spread function with custom built stochastic optical reconstruction microscopy instruments was measured. A method to evaluate the cylindrical lens was developed based on linear region and localization error. The results show that linear region of $1\ \mu\text{m}$ and axial localization error of 16 nm can be achieved with correct focal length. As the demonstration, three dimension super-resolution image of Actin filaments was reconstructed.

Key words: Three-dimensiona; Super resolution; Fluorescence-microscopy ; Cylindrical lenses; Calibration curves

OCIS Codes: 170.0180; 170.6900; 180.2520; 110.0180; 180.6900

0 引言

近年来,荧光超分辨率显微成像引起了研究者极大

的兴趣,发展出的多种超分辨率成像技术,包括受激发射耗损荧光显微镜^[1](Stimulated Emission Depletion, STED)、结构光照明显微镜^[2](Structured Illumination

基金项目:国家重大科研仪器研制项目(No. ZDYZ2013-1)、基金委面上项目(No. 61475185)和中科院百人计划资助

第一作者:张世超(1989-),男,硕士研究生,主要研究方向为超分辨率显微成像技术. Email: 1017114279@qq.com

导师:熊大曦(1970-),男,研究员,博导,主要研究方向为 LED 医用光源及光学显微成像技术. Email: xiongdxi@sibet.ac.cn

通讯作者:李辉(1979-),男,研究员,博导,主要研究方向为单分子生物物理及超分辨率荧光显微技术. Email: hui.li@sibet.ac.cn

收稿日期:2015-06-01;录用日期:2015-07-27

<http://www.photon.ac.cn>

Microscopy, SIM)、随机光学重建显微镜^[3] (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM)和光激活定位显微镜^[4-5] (Photoactivated Localization Microscopy, PALM)等,在生物学和基础医学研究中具有重要的应用.上述超分辨成像技术能够突破传统光学衍射极限的限制,已经实现最高 8 nm 横向成像分辨能力^[6-7],然而相对于横向分辨率的极大提高,目前仍没有合适的办法可以实现纳米级的纵向成像分辨率,研究如何在轴向提高荧光分子定位的精度仍是超分辨成像领域的热点问题.2008 年哈佛大学 Bo Huang 博士提出利用柱状透镜造成的光学散光,改变处于不同焦平面荧光分子在 CCD 上成像的形状,通过拟合其在 x 和 y 方向的宽度来得到其在轴向的位置,从而首次实现了三维的分辨成像,在 x - y 方向上可以达到 20 nm 的分辨率,在 z 方向上达到 70 nm 的分辨率^[8].2009 年 Harald F Hess 教授课题组提出基于 4-Pi 显微镜实现荧光分子轴向定位的方法,并将这种技术命名为干涉光激活定位显微镜^[9-10] (Interferometric PALM, iPALM).2012 年, Grover 等使用空间光调制器调制荧光分子的点扩散函数,使单点的荧光分子在 CCD 平面呈现为两个分离的点,两个点连线的方向随荧光分子在轴向的位置发生选择,从而进行轴向定位,称之为双螺旋点扩展函数法^[11] (Double-Helix Point Spread Function, DH-PSF).但是采用 DH-PSF 和 iPALM 两种方法系统光路复杂,设备昂贵,因此采用柱状透镜的光学散光方法仍然是目前主流的轴向定位方法^[12].

虽然柱状透镜在超分辨成像轴向定位中广泛应用,但是柱透镜参数对于定位精度的影响尚缺确实细致的定量研究,而这对于实验中如何选择柱透镜至关重要.通过理论分析发现:不同参数的柱透镜,对荧光分子点扩散函数的调制度不同,因而对定位结果产生不同的影响.透镜散光性过大,导致点扩散函数椭圆率变化大,单个荧光分子在 x 和 y 方向的宽度之差与荧光分子轴向深度位置呈非线性关系,增加定位难度.并且,椭圆率过大,CCD 上重合荧光分子太多,荧光利用率低,影响成像速度;散光性太小,点扩散函数椭圆率变化小,荧光分子在 x 和 y 方向的宽度变化对轴向深度敏感度低,定位精度差.所以对于特定的实验系统,存在着最优的柱透镜参数选择,以保证轴向分辨精度高的同时尽可能提高荧光分子利用率.为此,本文研究了柱透镜参数与点扩散函数椭圆率的关系,使用焦距不同的三个柱透镜进行实验,对不同轴向深度上荧光小球进行成像并作出标定曲线,通过分析不同柱透镜参数对轴向定位及三维成像的影响,提出一种柱透镜参数优化的方法和评价指标.最后使用具有较理想焦距的柱透镜对肌动蛋白微丝进行三维超分辨成像.

1 原理与方法

二维随机光学重建成像中,通常利用高斯函数拟合荧光点在 CCD 上所成像的强度分布,利用计算所得像点中心位置重建出超分辨图像^[13-14].利用柱状透镜造成的光学散光现象 (Optical astigmatism) 改变处于不同焦平面荧光分子在 CCD 上成像的形状,通过拟合其在 x 和 y 方向的宽度得到其在轴向的位置,从而实现三维超分辨成像的 STORM 成像技术,在 x - y 方向上可以达到 20 nm~50 nm 的分辨率,在 z 方向上达到 70 nm 的分辨率.

在管透镜 (Tube lens) 与 CCD 之间加入低光焦度的柱面镜 (Cylindrical Lens, CL),导致不同 z 平面上的荧光点在 x 和 y 方向的腰宽受到不同程度的调制,模拟腰宽随 z 轴的变化示意图如图 1.这时,CCD 上荧光点像的分布可以用椭圆高斯函数^[8] 描述为

$$I(x, y) = I_0 \exp\left(-\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma_x^2} - \frac{(y-y_0)^2}{2\sigma_y^2}\right) + b \quad (1)$$

$$\omega_{x,y} = 2\sqrt{2\ln 2}\sigma_{x,y} \quad (2)$$

式中, I_0 是荧光点的最大荧光强度, (x_0, y_0) 是荧光点中心位置, ω_x 和 ω_y 分别代表荧光点 x 和 y 方向上的半高宽, b 是背景噪声.两个方向半高宽 ω_x 和 ω_y 与轴向离焦程度的关系^[8] 表示为

$$\omega_{x,y} = \omega_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z-c}{d}\right)^2 + A\left(\frac{z-c}{d}\right)^3 + B\left(\frac{z-c}{d}\right)^4} \quad (3)$$

ω_0 是位于焦平面上荧光点的点扩散函数, c 是引入柱透镜后两腰宽方向上发生焦移的补偿参数, d 是显微镜聚焦深度, A 、 B 是补偿光学系统误差的高次项系数.两腰半高宽 ω_x 和 ω_y 做差,将得到一个更加简单的多项式拟合曲线^[15].通过该模型,根据荧光点所成像在两个方向半高宽之差,即可得到该荧光点对应的轴向深度.

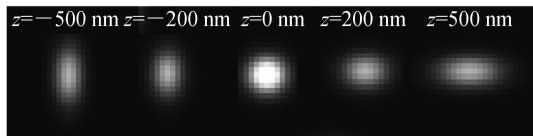


图 1 模拟不同焦平面荧光小球成像

Fig. 1 Simulate images of a fluorophore at various z positions

根据柱透镜成像特点,焦距的不同,对同一荧光点信号的调制度不同.透镜焦距越大,对光束调制度越大;反之,越小.当透镜的焦距过大时,拟合得到的曲线线性范围变小;透镜焦距过小,线性范围增大,但两腰半高宽之差对轴向深度变化敏感度降低,轴向定位误差增大.

2 实验结果

实验系统基于 Olympus IX-83 倒置荧光显微镜搭

建,使用波长为 647 nm,额定功率 132 mW 的半导体激光器作为激发光源,物镜采用 100×/1.49 浸油 TIRF 物镜(UAPON 100XOTIRF, Olympus)和两倍变倍体结合,使用 Olympus 荧光显微镜专用镜油(IMMERSION OIL TYPE-F),折射率为 1.518,图像采集设备为 EM-CCD (Ixon DU-897D-C00-# BV, Andor),像元尺寸 16 μm,采用不同焦距柱透镜(LJ1267RM-A / LJ1144RM-A / LJ1516RM-A, Thorlabs)进行荧光小球成像实验,最后使用 Alexa Fluor 647-phalloidin 染色的肌动蛋白微丝进行三维成

像实验验证.搭建 STORM 成像系统,柱透镜安装在 Tube Lens 与 EM-CCD 之间.

使用焦距为 250 mm,500 mm,1 000 mm 的圆形柱透镜在距 EM-CCD 靶面同一位置进行实验,每次实验采用 20 nm 步长移动物镜轴向位置,采集受到调制的不同平面荧光小球图像共 51 帧,轴向移动总距离 1 000 nm.实验采集到的荧光小球图像如图 2,图片大小为 512pixel×512pixel,其中(a)~(c)分别为采用焦距 250 mm、500 mm 和 1 000 mm 的柱透镜时采集到的荧光小球图像及方框区域对应放大视图.

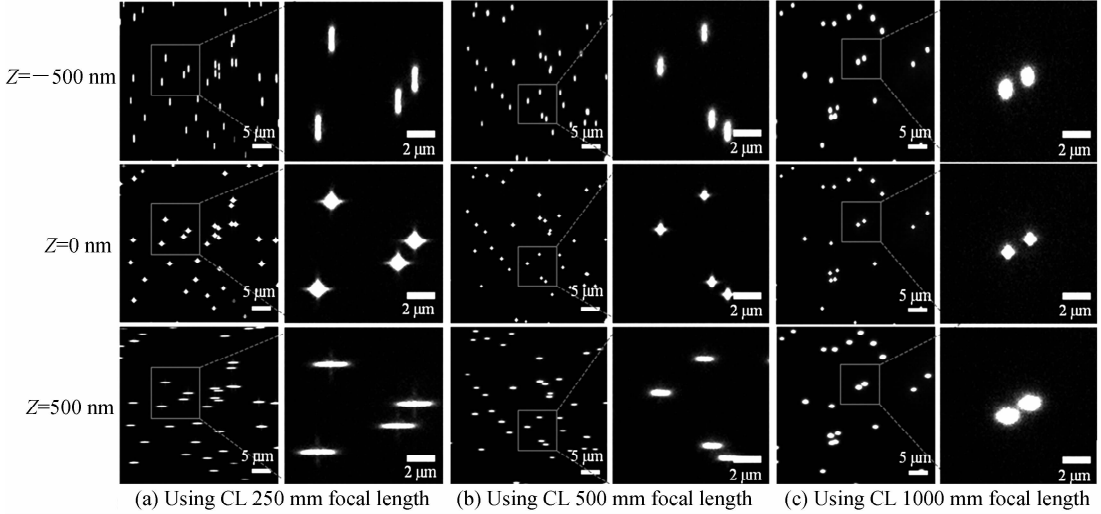
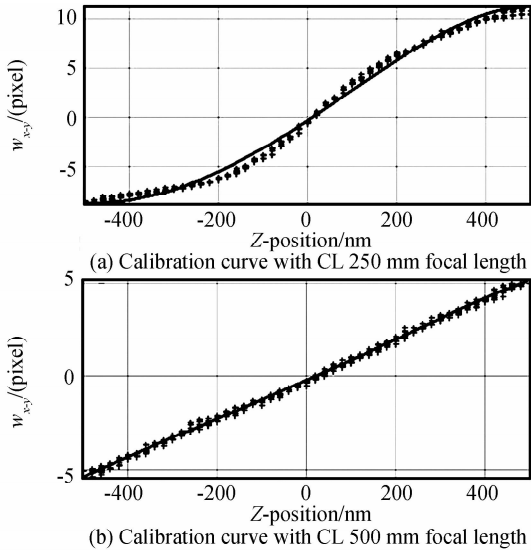


图 2 使用不同焦距柱透镜的荧光小球成像

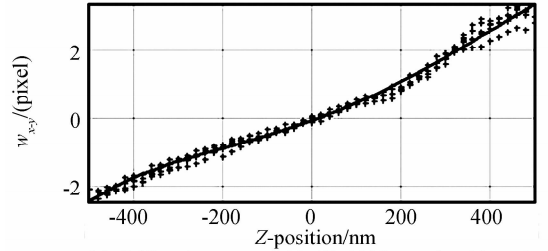
Fig. 2 The images of Fluorescent beads using different CL

根据式(1),针对 3 个不同焦距采集到的图像,分别选取 5 个荧光小球拟合计算各图中荧光小球两方向腰宽的均值 w_x 与 w_y ,并计算 $w_x - w_y$ 的值记作 w_{x-y} .同一轴向深度荧光小球腰宽变化随着透镜焦距的增加而变大.针对每一种焦距采集到的图像,选取对应 w_{x-y} ,使用四次多项式拟合得到标定曲线,如图 3.



(a) Calibration curve with CL 250 mm focal length

(b) Calibration curve with CL 500 mm focal length



(c) Calibration curve with CL 1000 mm focal length

图 3 柱透镜标定曲线

Fig. 3 Calibration curves of different CL

为定量描述标定曲线线性范围,对三种焦距下的标定序列 w_{x-y} 做差分得到序列 g .根据式(4)、(5)、(6),以 0 为中心,20 nm 为步长对称扩大轴向范围 z_n ,计算序列 g 的标准差 s_m .对于给定的标准差阈值 s_0 ,定义满足式(7)的区域 $[-z_l, z_l]$ 为标定曲线的线性区域,本文取 $s_0 = 0.2$.序列 g 标准差与轴向深度范围关系曲线如图 4.

$$z_n = 20n, n \in \{-m, -m+1, \dots, 0, \dots, m-1, m\} \quad (4)$$

$$\bar{g}_m = \frac{\sum_{n=-m}^m g(z_n)}{2m+1} \quad (5)$$

$$s_m = \sqrt{\frac{\sum_{n=-m}^m [g(z_n) - \bar{g}_m]^2}{2m+1}} \quad (6)$$

$$z_l = 20m_l, m_l = \max_m \{s_m \leq s_0\} \quad (7)$$

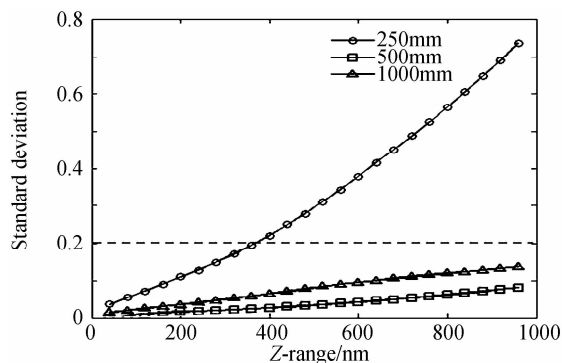


图4 轴向深度范围与标准差变化曲线

Fig. 4 Curve of Standard Deviation as a function of Z range

如式(8),定义 K 为标定曲线线性区域 $[-z_l, z_l]$ 内的斜率,其中 $pSize$ 为 EM-CCD 等效像元尺寸,经标定为 80 nm.在线性区域,斜率(K)越大表示两腰半高宽之差对 z 轴深度越敏感,定位精度越高;相反,则定位精度越差.表 1 为三种焦距柱透镜标定曲线的线性范围及在该范围内的斜率 K .

$$K = \frac{[\omega_{x-y}(z_l) - \omega_{x-y}(-z_l)] \times pSize}{2z_l} \quad (8)$$

表 1 线性区域范围及线性区域斜率

Table 1 Linear range and Slope of images in Fig. 3

Focal length/mm	250	500	1000
K	1.566	0.841	0.446
Linear range / nm	-180~180	-500~500	-500~500

结合线性区域斜率,焦距为 250 mm 的标定曲线线性区域内斜率最大,500 mm 居中,1000 mm 最小.就曲线线性区域,焦距 250 mm 标定曲线(图 3(a))在 $-180 \text{ nm} \sim 180 \text{ nm}$ 之间,曲线呈线性变化,轴向分辨率高,该范围之外,曲线呈非线性变化,易造成重建样品轴向定位畸变.焦距 500 mm 柱透镜的标定曲线(图 3(b))所示在 $-500 \text{ nm} \sim 500 \text{ nm}$ 之间呈线性变化,线性变化范围达到 $1 \mu\text{m}$,同时分辨率较高.图 3(c)中 1000 mm 柱透镜标定曲线线性范围虽大,但线性区域斜率小,轴向分辨率对深度的变化不敏感,分辨率低,误差大.

表 2 为每种标定曲线拟合的残差平方 (Residual Sum of Squares, RSS) 和标准差 (Standard Deviation, SD) 及拟合优度 (Coefficient of Determination, R^2).

表 2 标定曲线拟合残差平方和、标准差及拟合优度

Table 2 RSS, SD and R^2 of images in Fig. 3

Focal length/mm	250	500	1000
RSS / pixel	7.453	0.173	0.217
SD / pixel	0.553	0.061	0.066
R^2	0.997	0.999	0.998

从表 2 中可以看出每条曲线拟合优度大小均接近 1,拟合曲线可以有效反映荧光点两腰宽之差随轴向深

度的变化关系.250 mm 柱透镜标定曲线残差平方和为 7.453,标准差为 0.553,轴向定位误差大;而 500 mm 和 1000 mm 的标定曲线残差平方和与标准差均较小,使用 1000 mm 透镜时,对荧光分子调制度过低,导致信号受 CCD 噪声影响增大,所以,1000 mm 的标定曲线在残差平方和与标准差上略微大于 500 mm 标定曲线.综上,就本实验系统而言,焦距 500 mm 柱透镜优于 250 mm 和 1000 mm 柱透镜.使用 500 mm 焦距柱透镜进行实验,采集同一荧光小球图像 500 帧,通过标定曲线得出小球轴向位置均值为 156 nm,其概率密度函数 (Probability Density Function, PDF) 如图 5.轴向定位精度为 16 nm.

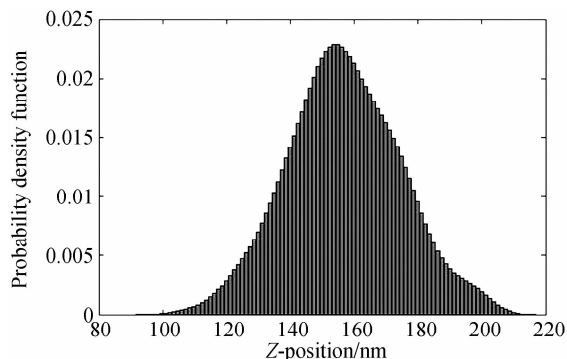
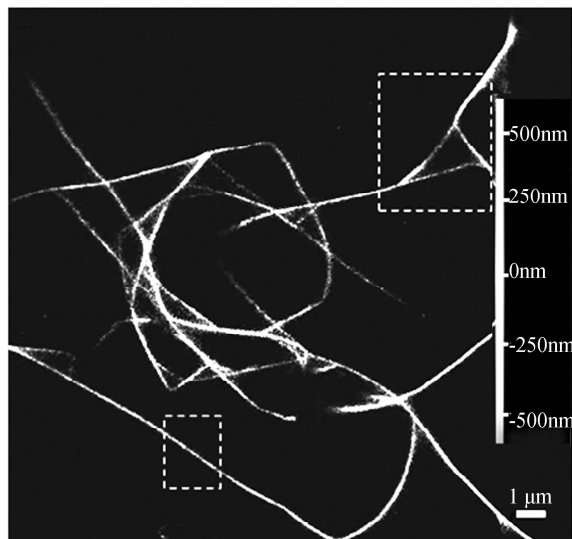


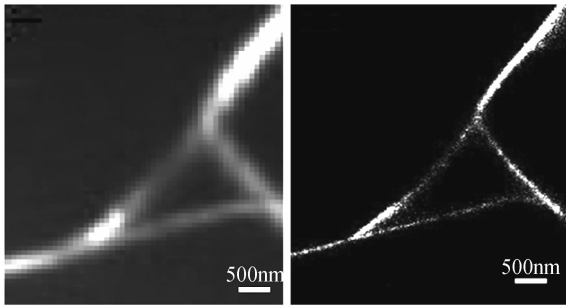
图 5 荧光小球轴向定位概率密度函数

Fig. 5 Probability density function of Z-position

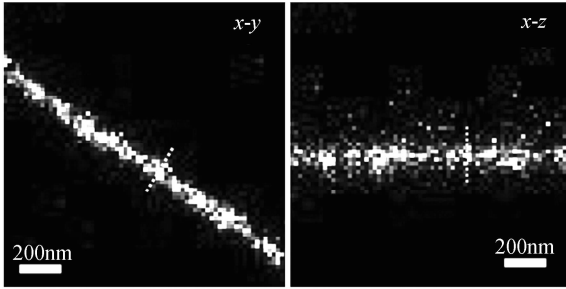
为了验证实验效果,用 Alexa Fluor 647-phalloidin 对 Actin 进行染色^[16],使用焦距为 500 mm 的柱透镜搭建实验系统进行三维成像实验,647 nm 波长激光器作为激发光源,405 nm 波长激光器作为激活光源,采集 10 000 帧图像,最后得到细胞纤维的三维超分辨率重建图像.图 6(a)是细胞纤维三维成像超分辨率图,不同灰度代表不同的轴向深度,对应关系如色标所示.图 6(b)是(a)中上方线框区域的宽场成像及其对应三维超分辨率成像结果;(c)是(a)中下方线框部分的 $x-y$



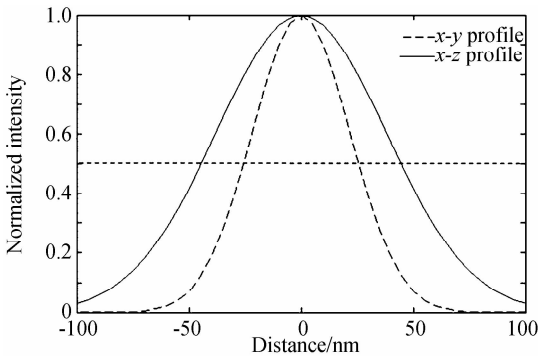
(a) Super-resolution reconstruction of Actin filament



(b) The conventional widefield epifluorescence image(left) and the 3D-STORM image(right) by the blue box in (a)



(c) The x - y and x - z cross section of a Actin filament by the down box in (a)



(d) Intensity profile of the Actin filament cross-section in (c)

图6 肌动蛋白微丝三维成像实验结果

Fig. 6 Three-dimensional STORM imaging of Actin filament 视图(左)及 x - z 视图(右). (d)中虚线和实线分别代表重建图像(c)中虚线位置处强度分布,横向半高宽 60 nm,轴向半高宽 85 nm.

针对荧光分子的轴向定位,Bo Huang 等人最早采用了基于距离最小化搜寻的方法,首先分别得到荧光点 x 方向和 y 方向腰宽的标定曲线,对荧光点两个方向上的腰宽分别搜寻,寻找两者到焦面距离之和的最小值来进行轴向位置确定^[8].而本文使用 x 方向和 y 方向腰宽的差来做标定曲线,通过对标定曲线的线性变化范围及该范围内斜率的定量计算得出.两种方法本质上一致,但是本文采用的方法由于得到的校准曲线是线性的,搜寻的效率和在相同噪声水平下的准确度大大提高.

3 结论

本文通过理论分析和实验证实表明,优化柱透镜散光性参量(柱透镜焦距)可提高 3D-STORM 中荧光

分子的轴向定位精度,使用优化柱透镜参数后,实验所得到轴向分辨率达到 85 nm,定位精度为 16 nm.引入标定曲线线性变化范围及该范围内曲线的斜率来描述柱透镜焦距对荧光分子轴向定位精度的影响,标定曲线线性范围决定三维成像的深度,线性范围内的斜率决定轴向定位精度.对于特定成像系统,焦距过大对应标定曲线斜率小,荧光分子两腰半高宽变化对轴向深度敏感度低,定位精度差;焦距过小对应较大的标定曲线斜率以及更大程度的点扩散函数拉伸,荧光分子两腰半高宽变化对轴向深度敏感度大,但是过小的焦距会使得相邻荧光分子在探测面的像因过度拉伸而严重重叠,同时还导致标定曲线线性变化范围缩小,反而降低了对荧光分子轴向定位精度,缩小轴向定位范围.因此在一定荧光激发密度下寻找最优参数的柱透镜,对于实现高分辨率三维成像尤为重要.此外,在实验中还观察到除柱透镜焦距外,系统本身三维点扩散函数是否对称、浸油物镜与所使用的镜油折射率是否匹配等因素都制约着三维成像的轴向分辨率.三维点扩散函数的不对称导致焦面上下荧光点两方向的腰宽变化不一致,本文实验预先标定三维点扩散函数,最后通过对荧光小球和肌动蛋白显微三维超分辨成像验证了上述分析的正确性.

参考文献

- [1] HELL S W, WICHMANN J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated-emission-stimulated-depletion fluorescence microscopy [J]. *Optics Letters*, 1994, **19**(11): 780-782.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] BETZIG E, PATTERSON G H, SOUGRAT R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, **313**(5793): 1642-1645.
- [5] 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.
- [6] HUANG B, BABCOCK H, ZHUANG X. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells [J]. *Cell*, 2010, **143**(7): 1047-1058.
- [7] DING Y, XI P, REN Q. Hacking the optical diffraction limit: Review on recent developments of fluorescence nanoscopy [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2011, **56**(18): 1857-1876.
- [8] 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.
- [9] SHTENDEL G, GALBRAITH J A, GALBRAITH C G, et al. Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America, 2009, **106**(9): 3125-3130.

- [10] HESS H. iPALM: 3D optical imaging of protein locations at the nanometer level [J]. *Biophysical Journal*, 2010, **98**(3): 619A-619A.
- [11] GROVER G, DELUCA K, QUIRIN S, *et al.* Super-resolution photon-efficient imaging by nanometric double-helix point spread function localization of emitters (SPINDLE) [J]. *Optics Express*, 2012, **20**(24): 26681-26695.
- [12] HUANG B. An in-depth view [J]. *Nature Methods*, 2011, **8**(4): 304-305.
- [13] SMALL A, STAHLHEBER S. Fluorophore localization algorithms for super-resolution microscopy [J]. *Nature Methods*, 2014, **11**(3): 267-279.
- [14] ALLEN J R, ROSS S T, DAVIDSON M W. Single molecule localization microscopy for superresolution [J]. *Journal of Optics*, 2013, **15**(9): 094001.
- [15] HENRIQUES R, LELEK M, FORNASIERO E F, *et al.* QuickPALM: 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ [J]. *Nature Methods*, 2010, **7**(5): 339-340.
- [16] METCALF D J, EDWARDS R, KUMARSWAMI N, *et al.* Test samples for optimizing STORM super-resolution microscopy [J]. *Jove-Journal of Visualized Experiments*, 2013, (79):e50579.