

“西光所建所六十周年暨《光子学报》创刊五十周年”专辑

引用格式: GAO Peng, FANG Xiang, WEN Kai, et al. Large-field Structured Illumination Microscopy (Invited)[J]. Acta Photonica Sinica, 2022, 51(8):0851506

郜鹏,方翔,温凯,等. 大视场结构光照明显微技术(特邀)[J]. 光子学报, 2022, 51(8):0851506

## 大视场结构光照明显微技术(特邀)

郜鹏,方翔,温凯,雷云泽,熊子涵,李娇月,刘星,郑娟娟,安莎

(西安电子科技大学物理学院,西安 710071)

**摘要:**结构光照明显微(SIM)具有成像速度快、对样品损伤小,以及对荧光标记物和标记程序无特殊要求等优点,成为研究活细胞结构和动态过程的重要成像手段之一。介绍了一种大视场、双模式(条纹/点阵)SIM显微技术。该技术结合二维光栅投影产生条纹/点阵结构光,空间光调制器选择条纹方向和实现相移,打破传统SIM中条纹数量受数字投影设备像素个数限制的瓶颈,同时保持了传统SIM成像速度快的优势。实验结果表明:该技术在 $20\times/0.75$ 数值孔径物镜下可获得 $690\mu\text{m}\times 517\mu\text{m}$ 成像视场和1.8倍空间分辨率提升,其空间带宽积是传统SIM的3倍。该技术有望被应用于生物学、化学和工业等领域。

**关键词:**大视场;超分辨;结构光照明显微;荧光样品;点阵照明

中图分类号:O436

文献标识码:A

doi:10.3788/gzxb20225108.0851506

### 0 引言

光学显微镜具有结构简单、对样品损伤小(可对活体样品进行成像)、可对生物样品中特定结构(借助荧光标记)进行选择成像等优点,在了解物质和生命过程中发挥着决定性作用。然而,光学显微镜的空间分辨率受衍射限制为 $\lambda/2$ (一般为200 nm)<sup>[1]</sup>。人们为解决此问题,提出了超分辨率(Super Resolution, SR)显微方法,如单分子定位显微(Single-Molecule Localization Microscopy, SMLM)<sup>[2-4]</sup>、受激发射损耗显微(Stimulated emission depletion, STED)<sup>[5-7]</sup>和结构光照明显微(Structured Illumination Microscopy, SIM)<sup>[8-14]</sup>,将光学显微镜的空间分辨率提高到几十纳米甚至几纳米。2014年,发明超分辨光学显微技术的三位科学家因此被授予诺贝尔化学奖。在SR技术中,SIM技术因其成像速度快、对样品损伤小,在活体样品成像中脱颖而出。SIM利用照明光斑和样品之间的“莫尔效应”,收集传统光学系统无法探测到的样品高频信息,进而重构出超分辨图像。由于产生的结构光同样会受到物镜数值孔径(Numerical Aperture, NA)的影响,线性SIM(激发的荧光与激发强度呈线性关系)的空间分辨率只能在衍射极限基础上提高两倍<sup>[15]</sup>。相比之下,非线性SIM通过利用发射模式中的高次谐波,实现了超过两倍的分辨率增强<sup>[1]</sup>。结构光照明还可以和定量相位显微相结合,实现对透明样品的高分辨、高衬度相位成像<sup>[16]</sup>。

在传统SIM中,通常利用空间光调制器(Spatial Light Modulator, SLM)或数字微镜器件(Digital Micromirror Device, DMD)快速生成和切换不同方向及相移量的条纹结构光完成移相。然而,其成像通量受到SLM/DMD本身像素个数的限制。例如,对于采用 $100\times/1.4\text{NA}$ 物镜和532 nm激发光的SIM显微镜,若要获得两倍的分辨率提升,SLM或DMD需产生周期为190 nm的条纹/点阵结构光。受投影器件像素个数(如 $1\,920\times 1\,080$ 像素)的限制,该结构光场仅能覆盖 $90\mu\text{m}\times 50\mu\text{m}$ 的视场,无法满足组织或病理切片等生物样品超分辨成像的需求。目前也存在几种扩展SIM成像视场的技术:首先,可以通过机械平移样品来

**基金项目:**中央高校基本科研业务费专项资金(No. QTZX22039),国家重点研发计划(Nos. 2022YFE0100700, 2021YFF0700300),国家自然科学基金(No. 62075177),中国轻工业浓香型白酒固态发酵重点实验室开放基金(No. 2019JJ012),陕西省自然科学基金(Nos. 2020JM-193, 2020JQ-324),瞬态光学与光子技术国家重点实验室开放基金(No. SKLTOP202001)

**第一作者:**郜鹏(1983—),男,教授,博士,主要研究方向为超分辨光学显微、相位显微、荧光相关光谱技术。Email: peng.gao@xidian.edu.cn

**收稿日期:**2022-05-16; **录用日期:**2022-07-04

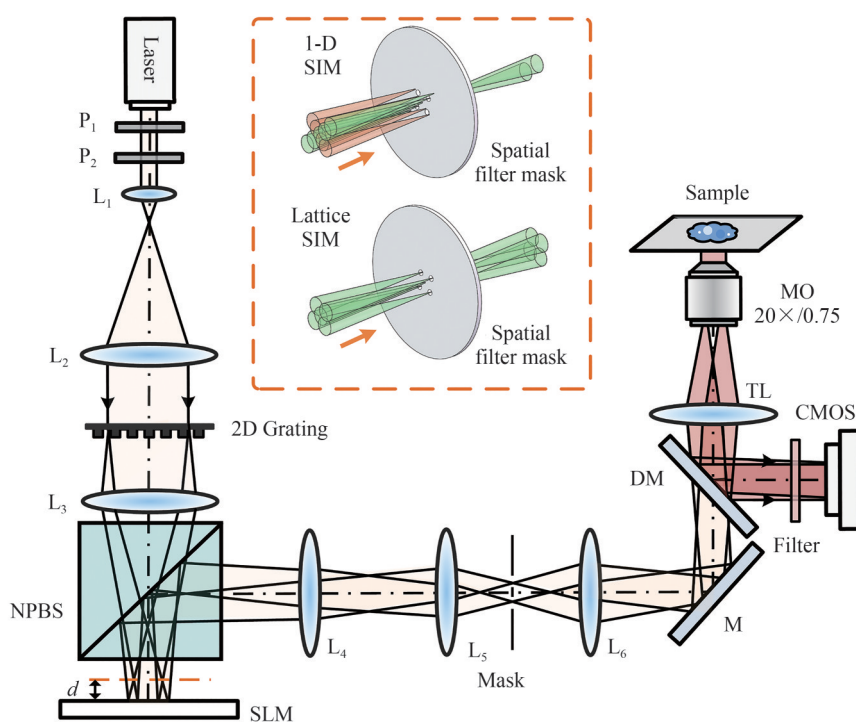
<http://www.photon.ac.cn>

逐一拍摄样品的不同部位,然后对再现的SIM图像进行拼接获得大视场SR图像<sup>[17,18]</sup>。其次,还可以利用平面聚合物波导代替传统物镜获得较大的SR-SIM图像<sup>[19]</sup>。其中,前者较为耗时,后者对样品的制备要求较高。此外,利用物理光栅在样品上的投影也可在大视场中产生条纹图案<sup>[20,21]</sup>。然而,该方法需要对光栅进行物理旋转(改变条纹方向)和平移(实现相移),限制了SIM的成像速度。

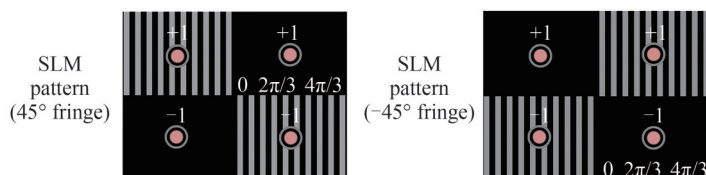
本文将介绍一种大视场条纹/点阵结构光照明显微技术。该技术利用物理光栅投影产生大流量条纹/点阵结构光,同时利用SLM快速实现结构光相移和条纹方向选择。与传统SIM技术相比,该技术可显著提高成像通量;与条纹结构光相比,点阵结构光只需要记录五幅原始荧光图像,便可以获得样品的超分辨图像,提高了成像速度。

## 1 实验装置

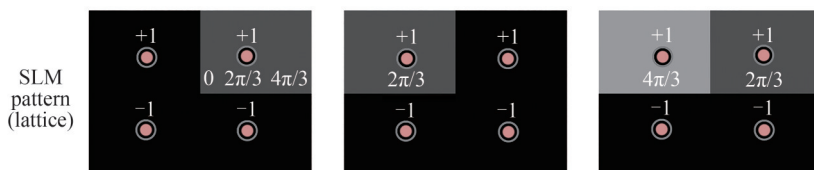
提出的大视场(条纹/点阵)结构光照明SIM<sup>[22]</sup>装置如图1(a)所示:激光器发出的光经过偏振片 $P_1$ 和 $P_2$ 后,被扩束成平行光。该照明光经过二维光栅(80线对/mm)后分别在 $45^\circ$ 和 $-45^\circ$ 方位上产生 $\pm 1$ 级衍射光,这四个光束经过透镜 $L_3$ 后聚焦在空间光调制器(SLM,  $1\,920 \times 1\,200$ 像素,像素大小 $8\,\mu\text{m}$ ,HDSL80R,



(a) Experimental setup of large-field SIM. The insets show spectrum filtering by a mask



(b) The phases loaded on the SLM to generate fringe patterns



(c) The phases loaded on the SLM to generate lattice patterns

图1 大视场SIM的光路示意图

Fig. 1 The schematic setup of large-field SIM

UPO Labs Co., Ltd., China)上的四个象限内。为了避免聚焦光束对SLM的损伤,实验中在SLM和透镜L<sub>3</sub>的焦平面之间保留了一距离 $d$ (例如 $d=5\text{ mm}$ )。通过在四个象限上同时加载不同的灰度值图像和二进制光栅(对两个正交方向上 $\pm 1$ 级衍射光的频谱进行调制)来实现结构光的相移或方向选择。被SLM相位调制后的照明光频谱由望远镜系统L<sub>4</sub>-L<sub>5</sub>进一步成像到一空间掩模板(Mask)上。如图1(a)中插图所示,该掩模板包含直径为 $350\text{ }\mu\text{m}$ 和间距为 $5.5\text{ mm}$ 的四个圆孔,以阻挡除 $45^\circ$ 和 $-45^\circ$ 方位上的 $\pm 1$ 级衍射光之外的结构光频谱。偏振方向分别为s和p偏振的两个偏振片分别放置在 $45^\circ$ 和 $-45^\circ$ 方向的 $\pm 1$ 级频谱位置上,避免两个正交方向上光束之间发生干涉。随后,生成的结构光条纹通过望远镜系统L<sub>5</sub>-L<sub>6</sub>和由镜筒透镜(Tube-lens, TL)和显微物镜(Microscopic Objective, MO)组成的望远镜系统TL-MO中继到样品平面。通常,结构光场的频谱会充满物镜MO的后瞳,以便在样品平面上产生周期最小的正弦条纹图案。

在成像光路中,结构光照明激发所产生的荧光由望远镜系统MO-TL成像到CMOS相机( $4\text{ }096\times 3\text{ }000$ 像素,像素尺寸 $3.45\text{ }\mu\text{m}$ ,Basler ace acA4112-20um,Basler视觉技术(北京)有限公司,中国)上。在该成像光路中,二向色镜DM(FF545/650-Di01-25 $\times$ 36,Semrock,USA)用来分离激发光和荧光。此外,在CMOS相机前面放置了一个滤光片(FF01-562/40-25,Semrock,USA)阻挡来自背景的激发光束和杂散光。

传统SIM使用SLM/DMD生成条纹/点阵图案,其数量受SLM/DMD像素数量限制为500个左右(每个周期用四个像素进行移相操作)。此外,由于SLM/DMD的离散化像素结构产生多级衍射光,降低所产生的条纹质量和光强利用率<sup>[23]</sup>。相比之下,所提出的方法将二维光栅和SLM相结合,能够生成1760个条纹/光点( $22\text{ mm}\times 80$ 线对/mm),达到传统SIM通量的3倍。同时,该方法采用SLM来实现相移操作,具有速度快、操作简便、重复性好的优点。

## 2 大视场SIM的双模式成像

基于图1所示的实验光路,分别开展基于条纹结构光照明的SIM成像和基于点阵结构光照明的SIM成像。

### 2.1 基于条纹结构光的大视场SIM

首先,验证将SLM和针孔滤波相结合产生一维结构光条纹的可行性。将SLM第三象限的灰度值固定为0,第一象限依次设置为 $0$ 、 $2\pi/3$ 和 $4\pi/3$ 相移量时所需灰度值图像。同时,在第二象限和第四象限加载 $0-\pi$ 二进制相位光栅(如图1(b)所示),通过衍射和针孔滤波来抑制该象限上 $\pm 1$ 级衍射光束的光强,如图2(a)所示。图2(b)和(a)显示了在SLM上加载二进制光栅前后结构光的频谱分布。定量分析表明:在第二和第四象限加载 $0-\pi$ 二进制相位光栅后,经过针孔的光强仅为原来的4.5%,可以忽略不计。最终产生 $45^\circ$ 方向条纹结构光,如图2(c)所示。采用类似操作即可获得 $-45^\circ$ 方向的一维条纹结构光。当SLM第一象限分别加载0、79和158灰度值时,可以获得 $0$ 、 $2\pi/3$ 和 $4\pi/3$ 相移的条纹结构光,如图2(e)所示。其沿同一虚线的强度分布如图2(g)所示,对其正弦拟合结果表明,其相移分别为 $[0, 1.84, 4.67]$  rad,接近理论值 $[0, 2\pi/3, 4\pi/3]$  rad,因此该方法可提供准确相移。

其次,通过对直径为 $240\text{ nm}$ 、荧光发射峰值波长为 $580\text{ nm}$ ( $\lambda_{\text{em}}$ )的荧光小球(RF240C,激发波长 $532\text{ nm}$ ,辉质生物,上海,中国)进行成像,来证明条纹结构光照明大视场SIM的超分辨成像能力。在本实验中,使用有效成像视场为 $690\text{ }\mu\text{m}\times 517\text{ }\mu\text{m}$ 的低倍物镜( $20\times/\text{NA}0.75$ )(见图3(a)),其横向分辨率的理论值为 $\delta_{\text{plan}}=0.61\lambda_{\text{em}}/\text{NA}=472\text{ nm}$ 。实验中,条纹结构光在样品平面上的周期 $P_{\text{SIM}}$ 为 $0.69\text{ }\mu\text{m}$ 。此时,SIM空间分辨率增强倍率: $[(2\times\text{NA}/\lambda_{\text{em}})+1/P_{\text{SIM}}]/(2\times\text{NA}/\lambda_{\text{em}})=1.6^{\text{[24]}}$ 倍,故而空间分辨率理论值可达 $247\text{ nm}$ 。

实验中,利用SLM实现相移和选择条纹方向,同时利用CMOS记录样品在结构光照明下的荧光图像。最后,通过SIM重建算法<sup>[25, 26]</sup>即可获得样品的超分辨SIM图像,如图3(a)所示。选取图3(a)中不同位置的5个感兴趣区域对应的宽场图像和SIM图像进行放大比较。通过对虚线处两个相邻小球的强度曲线分析(如图3(b)所示),可以发现SIM成像模式相比宽场成像模式具有更高的空间分辨能力。为了定量评估横向分辨率,从图3(a)中随机选择了20个荧光小球,统计结果如图3(c)所示,宽场图像的小球的半高全宽(Full Width at Half Maximum, FWHM)为 $543\pm 20\text{ nm}$ ,SIM对应的FWHM为 $302\pm 13\text{ nm}$ ,即SIM成像模式将空间分辨率提升了1.8倍。需要指出的是,由于成像系统中存在像差,因此两种成像模式的空间分辨率均低于

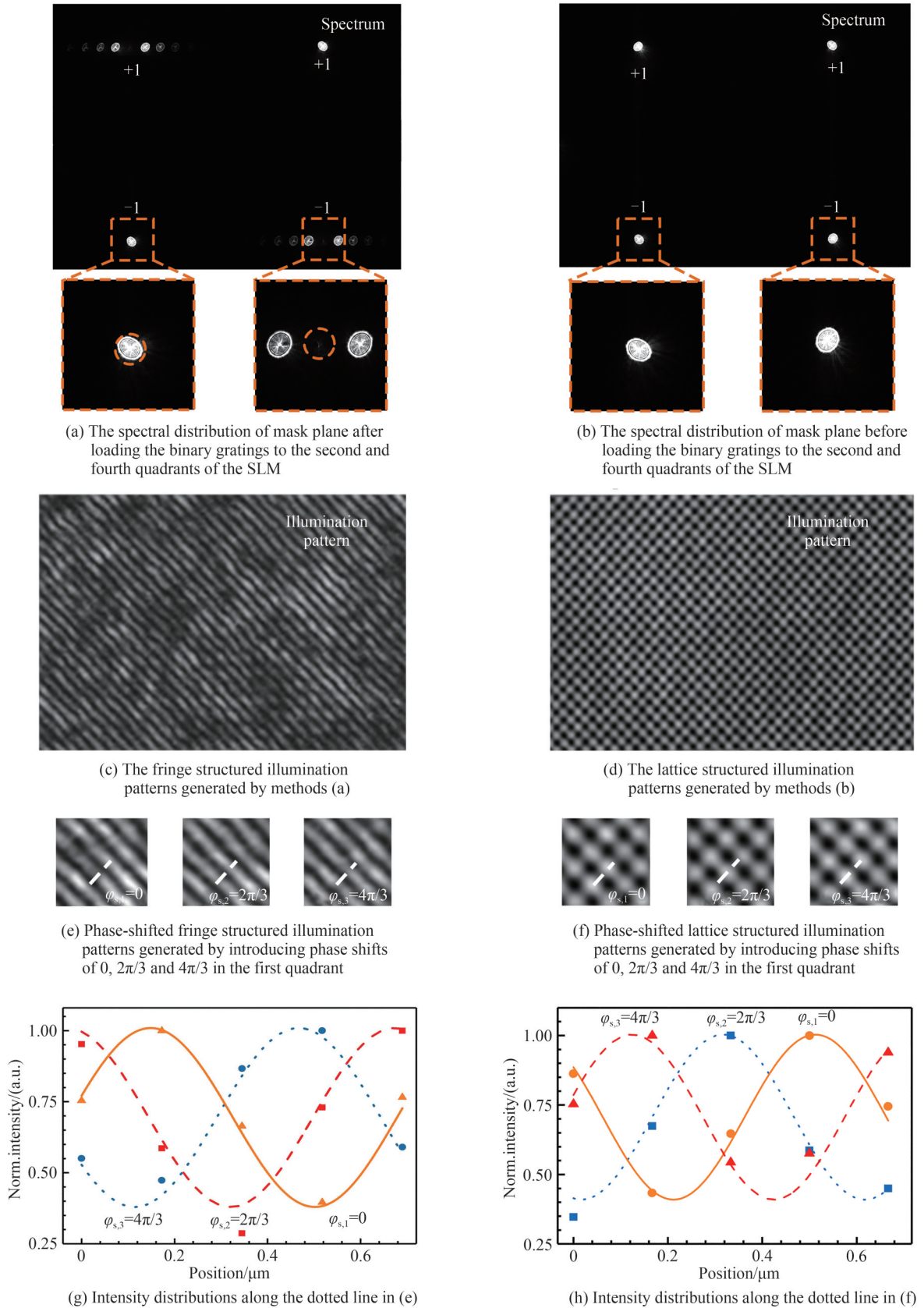


图2 基于光栅投影和SLM相移的大视场条纹和点阵结构光

Fig. 2 Large-field fringe and lattice structured illumination based on grating projection and SLM phase shifting

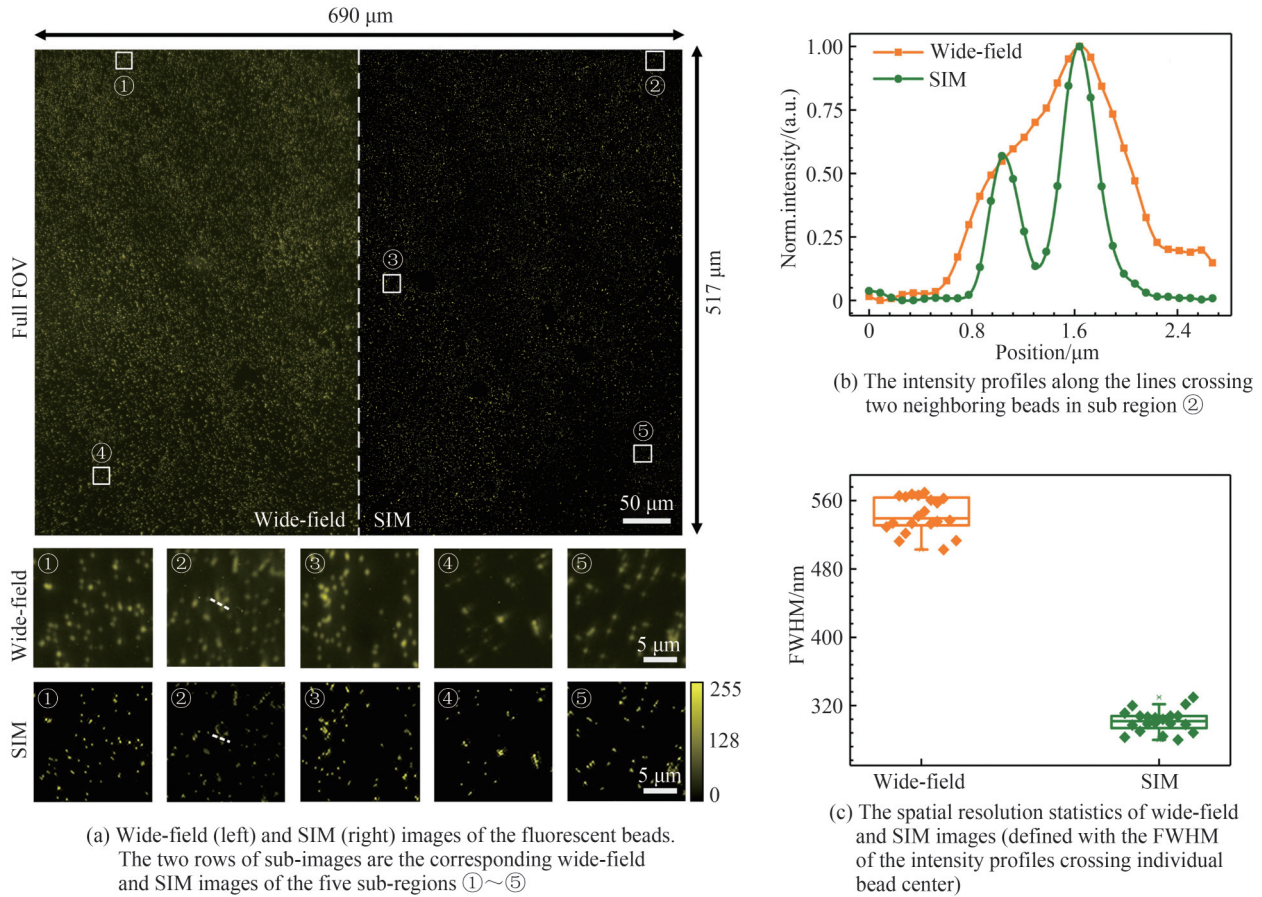


图3 直径240 nm荧光小球的宽场和SIM成像比较

Fig. 3 Wide-field and SIM imaging on 240 nm-diameter fluorescent beads

理论分辨率,并且由于SIM重建中使用的去卷积操作有助于空间分辨率提升,进而实验测得的分辨率增强倍率(1.8倍)高于理论分辨率增强倍率(1.6倍)。

除了分辨率增强外,空间带宽积(Spatial Bandwidth Product, SBP)也是光学成像系统的一个重要参量。SBP越大,通过光学系统所获得的信息越多。SBP可以通过视场除以最小可分辨的有效区域来估计,对于该系统,SBP可计算为: $(4\ 000 \times 3.45\ \mu\text{m}/20) \times (3\ 000 \times 3.45\ \mu\text{m}/20) / (\pi \times 0.302^2\ \mu\text{m}^2) = 125$ 万;对于传统SIM,其有效视场受限于SLM/DMD的像素数,考虑到每个周期用3个像素采样,生成与该系统相同的条纹(周期 $0.69\ \mu\text{m}$ )时,一个 $1\ 920 \times 1\ 080$ 像素的SLM/DMD只能覆盖 $442\ \mu\text{m} \times 248\ \mu\text{m}$ 的视场(每个条纹周期由4个像素所采样),对应有有效SBP为: $442 \times 248\ \mu\text{m}^2 / (\pi \times 0.302^2\ \mu\text{m}^2) = 38$ 万。可得该系统相比传统SIM具有3倍的SBP增强<sup>[9]</sup>。

## 2.2 基于点阵结构光的大视场SIM

基于图1所示实验光路,还可以用于产生二维点阵结构光,以更快的速度实现快速超分辨成像。相比条纹结构光照明,在产生点阵结构光时无需在SLM上加载 $0-\pi$ 二进制相位光栅。为了实现二维点阵的相移操作,仅需在SLM四个象限加载不同灰度值图像。具体地,将SLM第三和第四象限的相位固定为0,将第一和第二象限的相位进行成对变化(如图1(c)所示),可以实现对两组相互垂直的条纹结构光的相移操作。方便起见,用 $\varphi_{r,i}$ 和 $\varphi_{s,j}$ 表示第一和第二象限的相位,下标 $i$ 和 $j$ 分别表示在第一和第二象限上执行的相移次数。具体地,依次在SLM[第一象限,第二象限]上加载 $[0,0]$ 、 $[0,2\pi/3]$ 、 $[0,4\pi/3]$ 、 $[2\pi/3,0]$ 和 $[4\pi/3,2\pi/3]$ 的相位组合,来获得5组点阵结构光。图2(d)为相移量组合 $[0,0]$ 时的结构光图案,图2(f)和(h)分别为对应相移量组合 $[0,0]$ 、 $[0,2\pi/3]$ 、 $[0,4\pi/3]$ 的相移点阵结构光图案和强度分布。通过对强度曲线正弦拟合可以得出,此例中点阵结构光的相移误差为 $0.26\ \text{rad}$ ,说明该方法具有较高的相移精度。通过依次记录样品在以上5组点阵结构光照明下的低分辨荧光图像,结合再现方法,便可得到空间分辨率超越衍射极限的SIM图像。

简要介绍点阵结构光的再现方法。在点阵SIM中,点阵图案是由两组垂直的条纹结构光非相干叠加生成的,因此其强度分布可以表示为

$$I_{i,j}(\mathbf{r})=I_0\left[2+m_s\cos(2\pi\boldsymbol{\kappa}_s\cdot\mathbf{r}+\varphi_{s,i})+m_t\cos(2\pi\boldsymbol{\kappa}_t\cdot\mathbf{r}+\varphi_{t,i})\right] \quad (1)$$

式中, $\mathbf{r}$ 表示二维空间位置矢量; $I_0(\mathbf{r})$ 表示点阵光的直流分量; $m_s$ 、 $m_t$ 是沿 $45^\circ$ 和 $-45^\circ$ 方向条纹结构光的调制深度; $\boldsymbol{\kappa}_s$ 和 $\boldsymbol{\kappa}_t$ 是分别沿 $45^\circ$ 和 $-45^\circ$ 方向两组正交条纹的空间频率。

在点阵结构光 $I_{i,j}(\mathbf{r})$ 的照明下,被荧光标记的样品 $S(\mathbf{r})$ 由显微成像单元MO-TL成像到CMOS相机。此时,样品的荧光图像强度分布为 $S\cdot I_{i,j}(\mathbf{r})$ 与系统的强度点扩散函数 $h_D(\mathbf{r})$ 的卷积,即

$$D_{i,j}(\mathbf{r})=[S\cdot I_{i,j}]\otimes h_D \quad (2)$$

式中, $D_{i,j}(\mathbf{r})$ 表示相机记录的强度分布。对式(2)进行傅里叶变换,可得

$$\tilde{D}_{i,j}(\mathbf{k})=(\hat{S}\otimes\tilde{I}_{i,j})\cdot\tilde{h}_D \quad (3)$$

式中, $\mathbf{k}$ 为频率域的坐标矢量, $\tilde{D}_{i,j}(\mathbf{k})$ 、 $\tilde{h}_D(\mathbf{k})$ 、 $\tilde{S}(\mathbf{k})$ 和 $\tilde{I}_{i,j}(\mathbf{k})$ 分别为 $D_{i,j}(\mathbf{r})$ 、 $h_D(\mathbf{r})$ 、 $S(\mathbf{r})$ 和 $I_{i,j}(\mathbf{r})$ 的频谱。将式(1)代入式(3)可得

$$\tilde{D}_{i,j}(\mathbf{k})=2\tilde{C}_0+\frac{m_s}{2}\tilde{C}_{s,1}\exp(i\varphi_{s,i})+\frac{m_s}{2}\tilde{C}_{s,-1}\exp(-i\varphi_{s,i})+\frac{m_t}{2}\tilde{C}_{t,1}\exp(i\varphi_{t,j})+\frac{m_t}{2}\tilde{C}_{t,-1}\exp(-i\varphi_{t,j}) \quad (4)$$

式中,

$$\begin{cases} \tilde{C}_0(\mathbf{k})=\tilde{S}(\mathbf{k})\cdot\tilde{h}_D(\mathbf{k}) \\ \tilde{C}_{s,1}(\mathbf{k})=\tilde{S}(\mathbf{k}-\boldsymbol{\kappa}_s)\cdot\tilde{h}_D(\mathbf{k}) \\ \tilde{C}_{s,-1}(\mathbf{k})=\tilde{S}(\mathbf{k}+\boldsymbol{\kappa}_s)\cdot\tilde{h}_D(\mathbf{k}) \\ \tilde{C}_{t,1}(\mathbf{k})=\tilde{S}(\mathbf{k}-\boldsymbol{\kappa}_t)\cdot\tilde{h}_D(\mathbf{k}) \\ \tilde{C}_{t,-1}(\mathbf{k})=\tilde{S}(\mathbf{k}+\boldsymbol{\kappa}_t)\cdot\tilde{h}_D(\mathbf{k}) \end{cases} \quad (5)$$

通过记录样品在结构光照明下的5幅荧光图像,可以求解出 $\tilde{C}_0(\mathbf{k})$ 、 $\tilde{C}_{s,1}(\mathbf{k})$ 、 $\tilde{C}_{s,-1}(\mathbf{k})$ 、 $\tilde{C}_{t,1}(\mathbf{k})$ 和 $\tilde{C}_{t,-1}(\mathbf{k})$ 。之后,再利用传统SIM再现算法<sup>[25, 26]</sup>中空间载频补偿、去卷积、频谱拼接、逆傅里叶变换等操作来获得超分辨SIM图像。

点阵SIM比条纹结构光照明SIM具有更快的成像速度。SLM的帧速率(Frames Per Second, FPS)为60帧/s,CMOS相机在全帧曝光模式下的最大帧速率为23帧/s。条纹结构光SIM需要拍摄6幅原始图像重建单幅超分辨图像,因此其超分辨率成像速度最快为23/6帧/s。相比之下,点阵结构光SIM需要记录5幅原始图像来重构一幅超分辨图像,因此点阵结构光SIM超分辨率成像速度为23/5帧/s。

同样利用直径为240 nm的荧光小球验证点阵结构光照明大视场SIM的超分辨成像能力。图4(a)所示

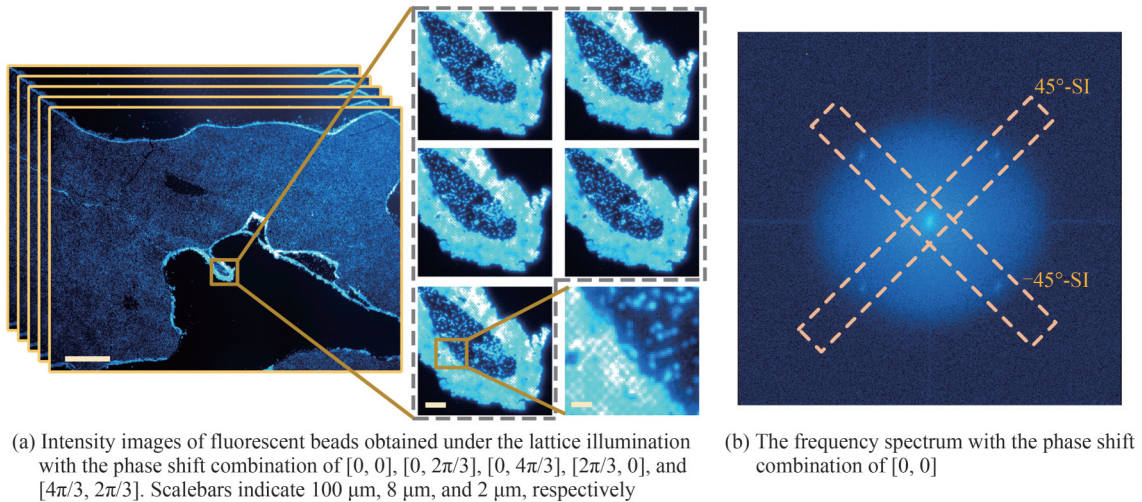


图4 点阵结构光照明下荧光小球的原始荧光图像  
Fig. 4 Raw fluorescence image of fluorescent beads under lattice illumination

分别为在相移组合 $[0,0]$ 、 $[0,2\pi/3]$ 、 $[0,4\pi/3]$ 、 $[2\pi/3,0]$ 和 $[4\pi/3,2\pi/3]$ 结构光照明对应的5幅荧光图像 $I_{rs,0}(x,y)$ 、 $I_{r,1}(x,y)$ 、 $I_{r,-1}(x,y)$ 、 $I_{s,1}(x,y)$ 和 $I_{s,-1}(x,y)$ 。其中,从图4(a)的放大图像中可以明显看到二维点阵结构光对应的“棋盘”图样。同时,从 $I_{rs,0}(x,y)$ 的频谱分布中可以看出(如图4(b)所示),其频谱由沿着 $\pm 45^\circ$ 方向的 $0, \pm 1$ 级衍射光频谱组成,该结果表明点阵结构光照明光是由两组正交方向的条纹结构光非相干叠加而成,且不同结构光之间不存在交叉干涉项。

利用再现方法获得不同方向的频率分量后,结合与传统SIM相同的重构方式,荧光小球的超分辨SIM图像如图5(a)所示,为了便于比较,在图中并列放置了该样品对应的宽场荧光图像。通过对图中感兴趣区域对应的宽场荧光图像和SIM图像进行放大比较,且对两个相邻小球进行强度曲线分析可以发现,SIM图像能够展现出样品更多的细节结构。此外,从图5(a)中随机选择20个荧光小球,并统计其强度分布的半高全宽(FWHM),如图5(c)所示。统计结果为,宽场成像的小球的FWHM为 $560 \pm 30$  nm, SIM对应的FWHM为 $313 \pm 24$  nm,即结构光照明将空间分辨率提升了1.78倍。

为了进一步验证点阵结构光照明大视场SIM的超分辨成像能力,分别利用宽场和点阵SIM对小鼠干细

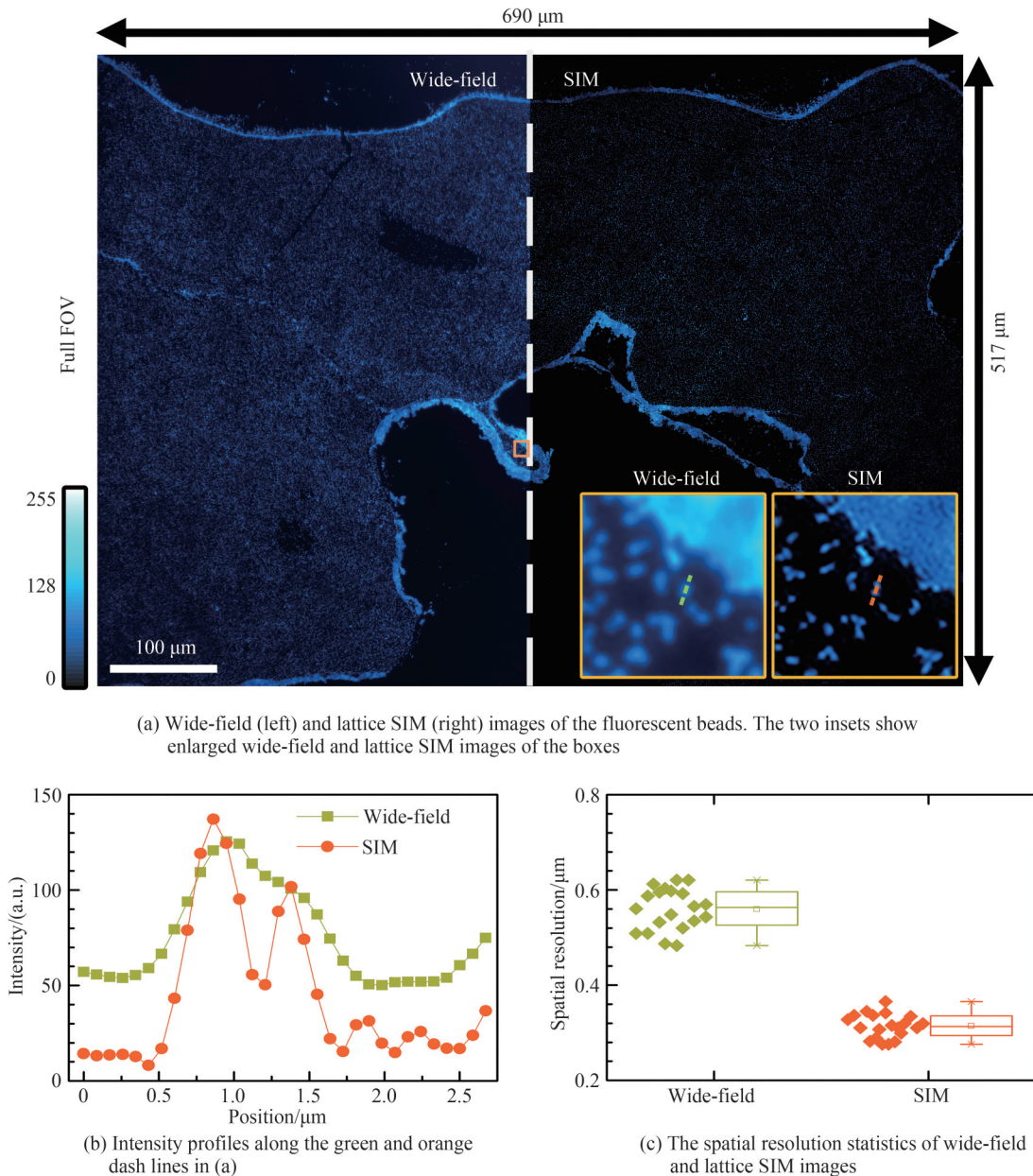


图5 直径为240 nm荧光小球的宽场和点阵SIM成像比较  
Fig. 5 Wide-field and lattice SIM imaging on 240 nm-diameter fluorescent beads

胞中的微管结构进行成像。实验中,用一级抗体( $\beta$ -Tubulin, #2146, 兔抗)和二级抗体(IgG(H+L)-Alexa Fluor 532, 羊抗兔)标记小鼠干细胞中的微管结构。图6(a)的左右两侧分别为该样品的宽场和基于点阵结构光的SIM图像。图6(b)放大展示了图6(a)中橙色方框对应子区域的宽场和SIM图像,对比发现SIM图像具有更多细节结构和更高的信噪比。其中,前者受益于SIM的超分辨能力,后者受益于SIM的层析能力。为了更加直观地比较宽场图像和SIM图像的空间分辨能力,图7(a)展示了图6(b)中宽场和SIM图像中相同虚线位置的强度分布。对比两条曲线可以看出:点阵结构光照明SIM可分辨宽场成像无法分辨的微管结构。同时,利用基于去相关空间分辨率的分析方法<sup>[27]</sup>对图6(b)中宽场和SIM图像进行评定。图7(b)和(c)中的分析结果表明:宽场和SIM图像的空间截止频率分别为 $3.0 \mu\text{m}^{-1}$ 和 $6.4 \mu\text{m}^{-1}$ ,对应空间分辨率分别为 $0.67 \mu\text{m}$ 和 $0.31 \mu\text{m}$ 。需要说明的是,由于点阵结构光照明SIM通过评估信号和噪声之间的相对权重来测定空间分辨率,与宽场成像相比分辨率提升超过两倍;并且该方法中的相移操作可以抑制离焦背景噪声,使空间分辨率的预测值也得到了提升。与SBP分析类似,基于光栅投影和SLM相移的点阵结构光SIM相比传统SIM具有3倍的SBP增强<sup>[9]</sup>。

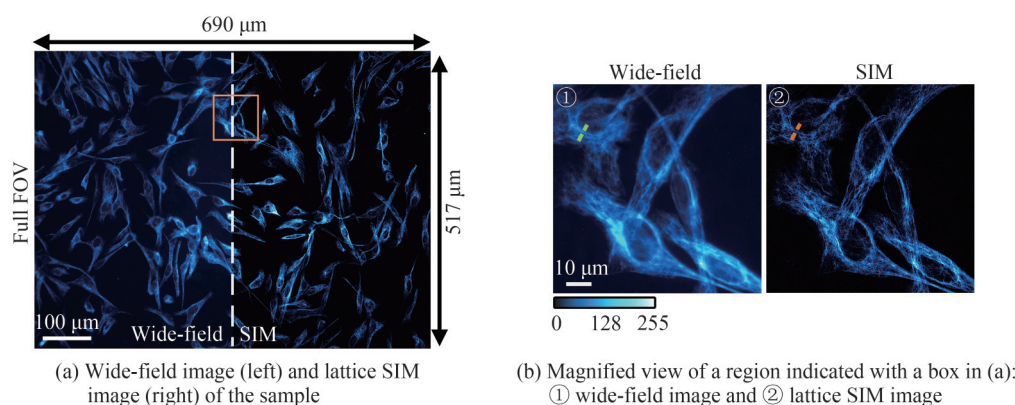


图6 宽场和点阵SIM对Alexa fluor 532标记下固定小鼠干细胞中微管的成像比较

Fig. 6 Wide-field and lattice SIM image of the microtubules in fixed mouse stem cells labeled with Alexa fluor 532

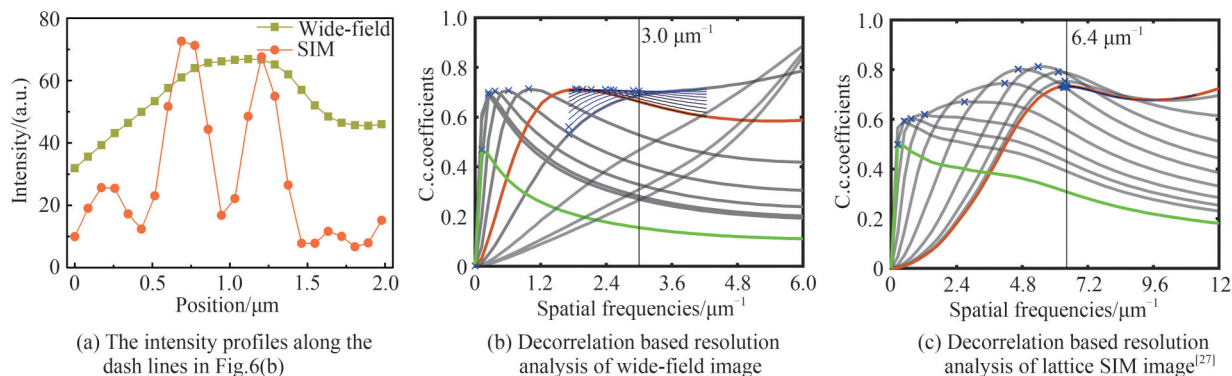


图7 宽场和点阵SIM成像的空间分辨率比较

Fig. 7 Comparison of spatial resolution of wide-field and lattice SIM imaging

### 3 结论

本文介绍了一种基于光栅投影和SLM相移的大视场SIM技术。基于同一实验装置,实现了条纹结构光照明和点阵结构光照明,具有成像速度快、视场大、分辨率高的优点。与传统基于SLM/DMD投影的SIM技术相比,该方法产生结构光的个数不受投影器件限制,其成像通量是传统SIM的3倍(目前主要受限于CMOS相机的通量)。该技术通过采用振幅光栅投影,避免了SLM/DMD投影中的色散效应,可以直接用于多色SIM成像。与现有的基于光栅投影的SIM相比,该方法利用SLM进行相移,具有更快的成像速度(目前受制于CMOS相机的曝光时间,最终超分辨成像速度最快为23/5帧/s)。目前,结构光的照明方向被限制在两个正交方向。通过采用Dammam光栅,可在三个或更多方向上生成结构光照明,从而实现各向同



性的空间分辨率增强。然而,大视场SIM也存在一些不足:首先,当采用单向条纹结构光照明时,会损失50%的光照强度;其次,由于需要同时使用物理光栅和SLM来产生相移结构光,具有相对复杂的装置。点阵结构光照明与条纹结构光照明相比各有优势,点阵结构光照明仅需要记录5幅原始强度图样就可以重建出样品超分辨相位图像,具有更快的成像速度;另外条纹结构光可以充分利用CMOS相机的灰度阶(不需要复用两组正交结构光照明下的强度图像),具有更高的信噪比。

随着人工智能(尤其是深度学习技术)的不断发展,大视场结构光照明SIM的超分辨重建速度,以及相位/荧光双模式成像的融合速度将会得到大幅提升。期望本文介绍的结构光照明显微技术可以被广泛地应用于生物医学、材料化学等研究领域。

#### 参考文献

- [1] GUSTAFSSON M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005, 102(37):13081-13086.
- [2] RUST M J, BATES M, ZHUANG X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. Nature Methods, 2006, 3(10):793-796.
- [3] SIGAL Y M, ZHOU R, ZHUANG X. Visualizing and discovering cellular structures with super-resolution microscopy[J]. Science, 2018, 361(6405):880-887.
- [4] AN Sha, DAN Dan, YU Xianghua, et al. Progress and prospect of research on single-molecule localization super-resolution microscopy (invited review)[J]. Acta Photonica Sinica, 2020, 49(9): 0918001.  
安莎, 但旦, 于湘华, 等. 单分子定位超分辨显微成像技术研究进展及展望(特邀综述)[J]. 光子学报, 2020, 49(9): 0918001.
- [5] 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.
- [6] GAO P, PRUNSCHE B, ZHOU L, et al. Background suppression in fluorescence nanoscopy with stimulated emission double depletion[J]. Nature Photonics, 2017, 11(3):163-169.
- [7] WANG Jialin, YAN Wei, ZHANG Jia, et al. New advances in the research of stimulated emission depletion super-resolution microscopy[J]. Acta Physica Sinica, 2020, 69(10):108702.  
王佳林, 严伟, 张佳, 等. 受激辐射损耗超分辨显微成像系统研究的新进展[J]. 物理学报, 2020, 69(10):108702.
- [8] 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.
- [9] WEN K, GAO Z, FANG X, et al. Structured illumination microscopy with partially coherent illumination for phase and fluorescent imaging[J]. Optics Express, 2021, 29(21):33679-33693.
- [10] DAN D, LEI M, YAO B, et al. DMD-based LED-illumination Super-resolution and optical sectioning microscopy[J]. Scientific Reports, 2013, 3(1):1116.
- [11] CHEN Y, CAO R, LIU W, et al. Widefield and total internal reflection fluorescent structured illumination microscopy with scanning galvo mirrors[J]. Journal of Biomedical Optics, 2018, 23(4):046007.
- [12] QIN J, GUO Y, XUE B, et al. ER-mitochondria contacts promote mtDNA nucleoids active transportation via mitochondrial dynamic tubulation[J]. Nature Communications, 2020, 11(1):4471.
- [13] LIU Zhi, LUO Zewei, WANG Zhengyin, et al. Super-resolution fluorescence microscopy image reconstruction algorithm based on structured illumination[J]. Chinese Journal of Lasers, 2021, 48(3):0307001.  
刘智, 罗泽伟, 王正印, 等. 基于结构照明的超分辨荧光显微成像重建算法[J]. 中国激光, 2021, 48(3):0307001.
- [14] SHAH Z H, MÜLLER M, WANG T C, et al. Deep-learning based denoising and reconstruction of super-resolution structured illumination microscopy images[J]. Photonics Research, 2021, 9(5): B168-B181.
- [15] GUSTAFSSON M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy [J]. Journal of Microscopy, 2000, 198(2):82-87.
- [16] GAO P, YUAN C. Resolution enhancement of digital holographic microscopy via synthetic aperture: a review[J]. Light: Advanced Manufacturing, 2022, 3(1):6.
- [17] YEH L H, CHOWDHURY S, WALLER L. Computational structured illumination for high-content fluorescence and phase microscopy[J]. Biomedical Optics Express, 2019, 10(4):1978-1998.
- [18] ZHONG Q, JIANG C, ZHANG D, et al. High-throughput optical sectioning via line-scanning imaging with digital structured modulation[J]. Optics Letters, 2021, 46(3):504-507.
- [19] ENGDahl A K, BELLE S, WANG T C, et al. Large field-of-view super-resolution optical microscopy based on planar polymer waveguides[J]. ACS Photonics, 2021, 8(7):1944-1950.
- [20] HEINTZMANN R, CREMER C. Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating[C]. SPIE, 1999, 3568(3):185-196.

- [21] ZHENG Q, ZHOU J, CHEN Q, et al. Rapid prototyping of a dammann grating in DMD-based maskless lithography[J]. IEEE Photonics Journal, 2019, 11(6):1-10.
- [22] WEN K, FANG X, MA Y, et al. Large-field structured illumination microscopy based on 2D grating and spatial light modulator[J]. Optics Letters, 2022, 47(11):2666-2669.
- [23] ABDELSALAM D G, YAO B, GAO P, et al. Single-shot parallel four-step phase shifting using on-axis Fizeau interferometry[J]. Applied Optics, 2012, 51(20):4891-4895.
- [24] BROWN P T, KRUTHOFF R, SEEDORF G J, et al. Multicolor structured illumination microscopy and quantitative control of polychromatic light with a digital micromirror device[J]. Biomedical Optics Express, 2021, 12(6):3700-3716.
- [25] LAL A, SHAN C, XI P. Structured illumination microscopy image reconstruction algorithm[J]. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 2016, 22(4):50-63.
- [26] MÜLLER M, MÖNKEMÖLLER V, HENNIG S, et al. Open-source image reconstruction of super-resolution structured illumination microscopy data in ImageJ[J]. Nature Communications, 2016, 7(1):10980.
- [27] DESCLOUX A, GRUBMAYER K S, RADENOVIC A. Parameter-free image resolution estimation based on decorrelation analysis[J]. Nature Methods, 2019, 16(9):918-924.

## Large-field Structured Illumination Microscopy (Invited)

GAO Peng, FANG Xiang, WEN Kai, LEI Yunze, XIONG Zihan, LI Jiaoyue, LIU Xing,  
ZHENG Juanjuan, AN Sha

(School of Physics and Optoelectronic Engineering, Xidian University, Xi'an 710071, China)

**Abstract:** Structured Illumination Microscopy (SIM) has the merits of fast imaging speed, minimal invasion, and no additional requirement on fluorophores and labeling strategies, and hence it is one of the premier imaging tools for studying the structure and dynamic processes of living cells. In this paper, we report a large-field, dual-modality structured illumination microscopy technique, which is constructed by combining a 2D grating for fringe/lattice projection and a spatial light modulator (SLM) for selecting fringe orientation and phase-shifting. Both stripe SIM (using fringe patterns) and lattice SIM (using lattice patterns) can be performed using the same setup, providing super-resolution images and optically sectioned images.

First, a 2D grating is used to project fringe or lattice patterns. The interference of the  $\pm 1$  diffraction orders of the grating in the  $-x$  and  $-y$  directions yields two groups of fringe patterns, forming 2D grid patterns if superimposed. Two polarizers with their polarization azimuth of  $90^\circ$  and  $0^\circ$  (i.e.,  $-s$  and  $-p$  polarizations) are respectively placed on the spectra of the  $\pm 1$ st orders along the  $-x$  and  $-y$  directions and these polarizations can be maintained during the whole imaging process. Hence, the two groups of fringe patterns along the  $-x$  and  $-y$  directions are incoherent. Nowadays, advanced manufacturing techniques can fabricate larger-scale gratings with small periods, of which the number is tens of folds of the patterns generated by SLMs or Digital Micromirror Devices (DMDs). Second, an SLM is used to perform phase shifting and select the orientation of fringe illumination. Specifically, phase shifting of the fringe/lattice patterns is performed by phase modulating the  $+1$ st orders of the generated fringe/lattice field on a plane close to the Fourier plane, where the spectra of the  $\pm 1$  diffraction orders are separate from each other. We mean to set a defocusing distance between the Fourier plane and the SLM plane, so that the broadly-extended defocused spectrum can be well sampled by hundreds of SLM pixels, avoiding the injury of the SLM by the laser light. For stripe SIM, 1D fringe illumination can be selected by loading binary gratings on the spectra of unwanted fringes and further blocking the relayed spectra with a filtering mask. For lattice SIM, two groups of the fringe patterns will be used simultaneously, and the patterns are phase-shifted in two directions. The proposed method preserves the advantage of high-speed phase-shifting in conventional SLM/DMD-based SIM.

Experiments demonstrate that both the stripe SIM and lattice SIM can achieve 1.8-fold spatial resolution enhancement in a large field of  $690\ \mu\text{m} \times 517\ \mu\text{m}$  under a  $20\times/0.75\text{NA}$  objective. In addition, Both modalities can achieve a three-fold SBP enhancement above conventional SIM. Stripe SIM (using fringe illumination) allows for reconstructing a super-resolution image by recording six raw intensity

images (three phase-shifts in each of two orthogonal directions). While, lattice SIM can reconstruct a super-resolution image by recording five phase-shifted intensity images, enhancing imaging speed and reducing photo-bleaching by 17%. Stripe SIM is superior to lattice SIM when imaging samples with low brightness or imaging structures in complex environments.

The proposed method also has disadvantages: first, the period of the fringe/lattice patterns can not be varied digitally like what in SLM/DMD-based SIM. Second, the resolution enhancement achieved with this method is less isotropic than the standard 3-angle 2-beam SIM. Both drawbacks can be solved by using a specially-designed Diffractive Optical Element (DOE) instead of the 2D grating used in the current technique and by recording more raw images under different phase-shift combinations. Once using a 2D amplitude grating that has the same transmittance for different illumination wavelengths, the large-field SIM also allows multi-color SIM imaging. We can envisage that the proposed method can be applied to many fields, including biomedical, industrial, and chemical fields.

**Key words:** Large-field; Super-resolution; Structured illumination microscopy; Fluorescent sample; Lattice illumination

**OCIS Codes:** 180.2520; 170.0110; 170.2520; 330.6130; 350.5730

---

**Foundation item:** Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. QTZX22039), National Key Research and Development Program of China (Nos. 2022YFE0100700, 2021YFF0700300), National Natural Science Foundation of China (No. 62075177), Key Laboratory of Wuliangye-flavor Liquor Solid-state Fermentation, China National Light Industry (No.2019JJ012), China Scholarship Council, Natural Science Foundation of Shaanxi Province (Nos.2020JM-193, 2020JQ-324), Open Research Fund of State Key Laboratory of Transient Optics and Photonics (No.SKLTOP202001)