

散斑照明宽场荧光层析显微成像技术研究^{*}

林浩铭^{1,2)} 邵永红¹⁾ 屈军乐^{1)†} 尹 君¹⁾ 陈思平²⁾ 牛憨笨¹⁾

1) 深圳大学光电子学研究所, 光电子器件与系统教育部重点实验室, 深圳 518060)

2) 深圳大学生物医学工程重点实验室, 深圳 518060)

(2008 年 3 月 23 日收到, 2008 年 8 月 29 日收到修改稿)

介绍了一种新的宽场荧光层析显微方法. 在传统宽场显微镜中引入散斑图案照明样品, 控制散斑图案的动态变化, 利用 CCD 相机记录对应的一系列荧光图像. 由于焦平面内强度变化远比焦平面外强度变化剧烈, 通过合适的算法能够获得焦平面的层析分辨的荧光显微图像. 标定了系统参数, 并研究了不同的图像重建算法对系统性能的影响, 获得了不同生物组织样品的层析图像. 实验表明, 该显微方法能用于组织光学切片成像, 在临床医学中具有实际应用价值.

关键词: 荧光, 散斑照明, 荧光显微, 层析

PACC: 4225H, 4230

1. 引 言

激光扫描共焦显微镜^[1,2]是一种性能良好的光学显微成像工具, 在生命科学研究中获得了广泛的应用. 与普通的宽场荧光显微方法相比, 共焦荧光显微的优点在于能获得一定厚度样品的三维层析图像, 可提供较高的时间和空间分辨率^[3]. 但是这种显微方法需要对一个或多个照明点进行扫描, 需要三维扫描系统, 从而使系统更加复杂且成像速度较慢. 为了提高成像速度, 人们还提出了非扫描的显微成像技术, 比如结构光照明显微成像技术^[4]. 因为样品对结构光的散射会降低图像的对比度, 所以结构光显微成像技术不太适合于厚组织成像. 近年来, 一种利用散斑照明来提供深层层析分辨能力的荧光显微成像新方法引起了广泛的兴趣^[5-8]. 本文分析了散斑颗粒大小、原始图像幅数以及散斑图案变化模式对系统性能的影响, 在普通宽场荧光显微镜的基础上, 实现了散斑照明宽场荧光层析显微功能, 还研究分析了不同的信号提取算法(尤其是微分算法)以及这些算法对图像重建的影响.

2. 理论基础

当激光束照射到物体上时, 会在自由空间产生散射光. 物体表面的每一个物点都可视为一个子波源, 由于激光束存在高相干性, 因而由每一个物点散射的光将和其他物点散射的光发生干涉. 因为物体表面上各个面元是随机分布的(这种随机性由表面粗糙度引起), 由它们散射的各个子波的振幅和相位都不相同, 并且是无规则分布, 所以由各面元散射的子波相干叠加形成的反射光场具有随机的空间光强分布. 当把探测器置于光场中, 在探测器接收面上能够记录到一种随机的干涉图案, 此即“散斑图案”^[9].

在使用动态变化的散斑图案照明的宽场荧光显微系统中, 当激光束通过一个移动(平动或转动)的散射体时, 会在显微镜物镜的后焦面上形成一系列随机变化的散斑图案用于照明样品. 样品受激发后产生的荧光信号主要有两个来源, 一是产生自显微镜物镜视场焦平面上的荧光信号, 另一个是产生自显微镜物镜照明区域视场焦平面外的背景荧光信号. 随着照明散斑的变化, 散斑照明产生的散粒状分布的荧光强度在物镜焦平面内发生剧烈变化, 而在视场焦平面外的其他地方却变化缓慢, 这种信号特

^{*} 国家自然科学基金(批准号: 60627003)、广东省高等学校科技创新团队计划(批准号: 06CXTD009)和深圳大学青年科学基金(批准号: 200854)资助的课题.

[†] E-mail: jlqu@szu.edu.cn

征是实现层析成像的基础.通过探测器(如 CCD 相机)记录样品特定层上一系列物镜视场焦平面内动态变化的散斑图案,根据焦平面内荧光强度的剧烈变化,利用特殊的算法能够提取该层面的荧光信号,从而具有层析成像功能.

理论上可以将探测器探测面上接收到的荧光强度信号表示为^[10]

$$I_d(\boldsymbol{\rho}_d) = \iint F_{\text{det}}(\boldsymbol{\rho}_d - \boldsymbol{\rho}, -z) \times C(\boldsymbol{\rho}, z) I_s(\boldsymbol{\rho}, z) d^2 \boldsymbol{\rho} dz, \quad (1)$$

式中 $I_s(\boldsymbol{\rho}, z)$ 为样品上产生的荧光散斑信号强度, $C(\boldsymbol{\rho}, z)$ 为样品中荧光团的浓度, F_{det} 为探测得到的点扩展函数, ρ 为散斑场半径, ρ_d 为探测面半径.为了估计散斑照明宽场荧光显微系统的层析分辨能力,并且计算在纵向位置 z_c 每一个 CCD 探测器像素上的强度变化,荧光信号强度的变化可以定义为

$$D(\boldsymbol{\rho}_d) = I_d(\boldsymbol{\rho}_d)^2 - \langle I_d(\boldsymbol{\rho}_d) \rangle^2,$$

式中的角括号表示对相互独立的散斑照明图案信号强度取平均.引入自相关函数

$$R_{\text{det}}(\Delta \boldsymbol{\rho}, z_c) = \int F_{\text{det}}(\boldsymbol{\rho}_d - \boldsymbol{\rho}, -z_c) \times F_{\text{det}}(\boldsymbol{\rho}_d - \boldsymbol{\rho} + \Delta \boldsymbol{\rho}, -z_c) d^2 \boldsymbol{\rho}, \quad (2)$$

式中 $\Delta \rho = |\boldsymbol{\rho} - \boldsymbol{\rho}'|$. CCD 探测器上接收到的荧光信号的变化可以表示为

$$D(\boldsymbol{\rho}_d) = I_s^2 C^2 \int R_{\text{det}}(\Delta \boldsymbol{\rho}, z_c) F_{\text{ill}}(\Delta \rho, \theta) d^2 \Delta \boldsymbol{\rho}, \quad (3)$$

式中 F_{ill} 为照明的点扩展函数.均方根(RMS)图像强度可以由 $\sqrt{D(\boldsymbol{\rho}_d)}$ 得到,其与样品中的荧光团浓度具有线性关系.

为了获得更加定量的描述,利用高斯-洛伦兹近似定义探测和照明的点扩展函数

$$F_{\text{det}}(\boldsymbol{\rho}, z) = F_{\text{ill}}(\boldsymbol{\rho}, z)$$

$$= \frac{1}{1 + \zeta^2} \exp\left[-\frac{2\rho^2}{\omega_0^2(1 + \zeta^2)}\right]. \quad (4)$$

式中

$$\zeta = \frac{\lambda z}{\pi \omega_0^2}.$$

探测器的自相关函数可以表示为

$$R_{\text{det}}(\Delta \boldsymbol{\rho}, z_c) = \frac{\pi \omega_0^2}{4(1 + \zeta_c^2)} \exp\left[\frac{-\Delta \rho^2}{\omega_0^2(1 + \zeta_c^2)}\right]. \quad (5)$$

最终,在 CCD 探测器探测面上每一个像素的均方根强度 I_{RMS} 可以表示为

$$I_{\text{RMS}} = \frac{I_s CA}{\sqrt{3 + 2\zeta_c^2}}. \quad (6)$$

这里

$$A = \frac{\pi \omega_0^2}{2},$$

$$\zeta_c = \frac{\lambda z_c}{\pi \omega_0^2},$$

$$\omega_0 = \frac{0.61 \lambda}{\sigma_{\text{NA}}},$$

其中 σ_{NA} 为物镜数值孔径.

3. 实验装置

在实验室一台由德国莱卡公司生产的 DM LB2 型普通显微镜的光路中引入了散斑图案照明机构,建成动态散斑照明的宽场荧光显微实验系统,如图 1 所示.光源采用由美国光谱物理公司生产的 Stabilit2017 型氩离子激光器,输出波长为 488 nm.扩束镜对激光束进行适当的扩束,在显微镜物镜视场中实现全场照明.散射体安装在一维微位移平台上,当激光束通过垂直于光路平移的散射体时,产生一系列动态变化的激光散斑图案.通过中继镜系统,动态变化的散斑图案经双色镜反射后成像在宽场荧

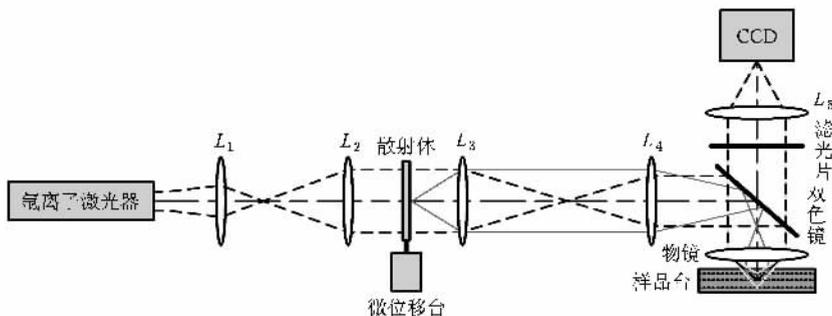


图 1 散斑照明宽场荧光显微系统示意图 L_1-L_5 为透镜

光显微镜物镜(其中物镜放大倍率为 40 倍,数值孔径为 0.65)的后焦面上,在样品上实现宽场科勒照明,在样品照明区域内激发样品产生荧光信号,面阵 CCD 探测器记录样品所发射的荧光信号.安装在 CCD 相机前面的滤光片消除样品反射或散射的激发光.

4. 实验结果及讨论

4.1. 实验系统性能分析

为了分析散射颗粒大小对层析图像的影响,使用不同颗粒度的散射体产生散斑图案,获得样品的层析图像强度变化曲线,从而可以分析层析图像荧光强度的变化.散射体颗粒度 G 分别为 120, 1500. 在动态散斑照明的宽场荧光显微镜中,使用上述不同颗粒度的散射体获得了一系列铃兰根茎样品切片相同位置处的荧光层析图像强度变化曲线(图 2).从图 2 可以看出,小颗粒度情况下荧光强度的锐度更大.

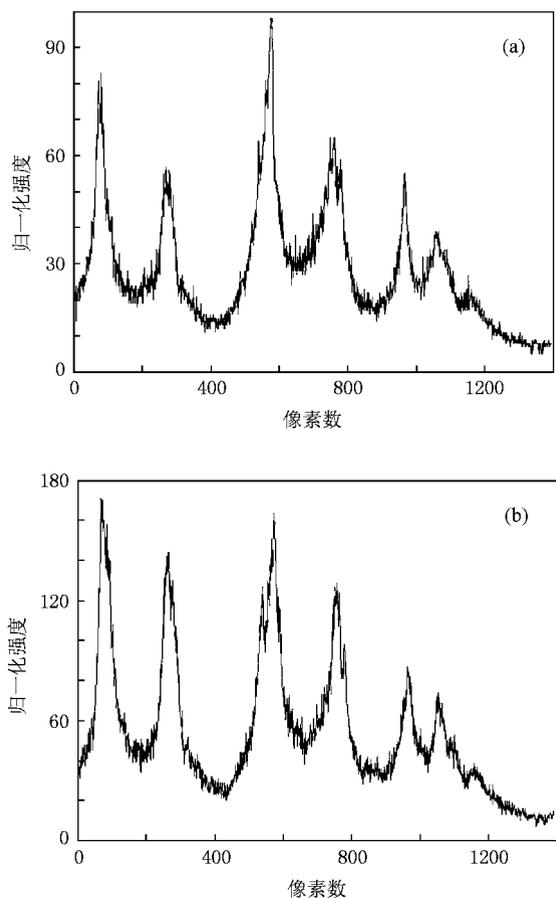


图 2 激光光束通过不同颗粒度($G = 120, 1500$)的散射体获得的铃兰根茎样品切片的荧光层析图像指定位置处的强度曲线

(a) $G = 120$ (b) $G = 1500$

为了分析散射体移动对层析图像效果的影响,我们在连续模式(散射体连续运动)和步进模式(散射体每移动一步由 CCD 采集记录一幅原始图像)两种不同工作模式下,分析了层析图像的锐度影响.分别在连续模式和步进模式下获得一系列原始图像,利用微分算法处理这组图像从而得到了对应模式下的层析图像.取相同位置的强度曲线,得到的结果如图 3 所示.图 3 表明,在连续模式下图像锐度变差,主要原因是在 CCD 曝光时间内散射体的移动产生了多个散斑颗粒的混叠,使部分细节信息丢失.

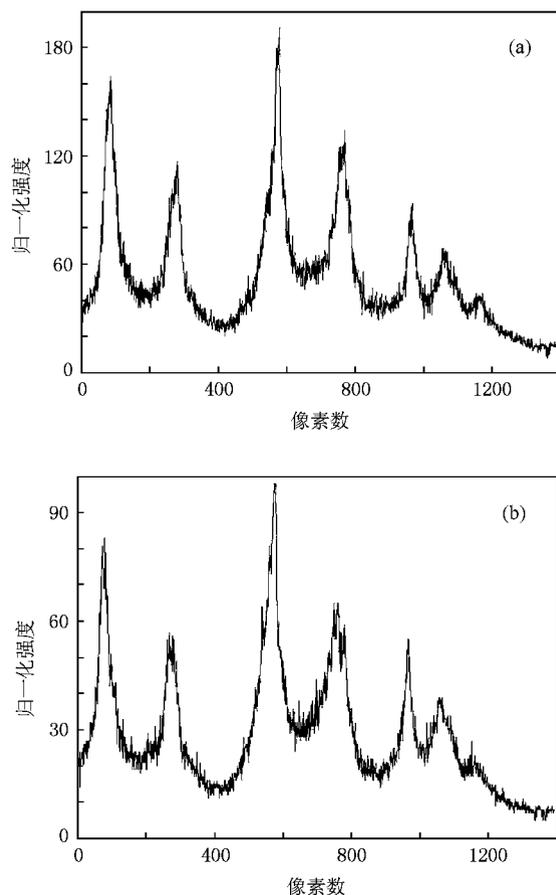


图 3 散射体在连续模式和步进模式下铃兰根茎样品切片的荧光层析图像指定位置处的强度曲线 (a)步进模式 (b)连续模式

对于散斑照明宽场荧光显微系统,由 CCD 相机记录的信号主要包括物镜焦平面内的荧光信号和焦平面以外的荧光信号两部分.当散斑照明图案发生变化时,物镜焦平面内的荧光信号产生剧烈变化,而焦平面以外的荧光信号变化缓慢.因此,通过选择合适的算法来提取这种剧烈变化所反映的信息,就能够实现层析成像.我们选择铃兰根茎样品切片作为

实验样品,将显微镜聚焦到距样品表面的一定深度处,在步进模式下获得一系列的原始荧光图案.采用以下三种算法进行均方根强度信号的提取:

$$I_{\text{RMS1}} = \left[\frac{\sum_{i=1}^N I_i^2}{N} - \frac{\left(\sum_{i=1}^N I_i\right)^2}{N^2} \right]^{1/2}, \quad (7)$$

$$I_{\text{RMS2}} = \left[\frac{\sum_{i=1}^N \left(I_i - \left(\sum_{i=1}^N I_i \right) / N \right)^2}{2N} \right]^{1/2}, \quad (8)$$

$$I_{\text{RMS3}} = \left[\frac{\sum_{i=1}^N (I_i - I_{i-1})^2}{2N} \right]^{1/2}. \quad (9)$$

这里, N 为图像序列中的图像数, I_i 为第 i 幅图像的强度.图 4 是分别利用以上三种算法得到的荧光层析图像.

从图 4(a) 可以看到,原始图像由于焦平面外产生的荧光和焦平面内的荧光信号叠加的结果导致图

像结构丰富,但细节结构模糊,没有纵向分辨能力.图 4(b)–(d) 是通过不同的算法进行图像重建后提取出焦平面上变化剧烈的散斑图案,从而获得该层上较清晰的荧光图像.图 4(d) 是用(9)式微分算法重构得到的图像,它明显比另外两个算法重构出的图像具有更高的对比度和更好的细节分辨能力.因为该算法中每一幅原始图像只与临近的前一幅图像做比较,所以可以比较好地提取两个原始图像的荧光强度变化,从而减少系统噪声的影响.

原始图像的数目对重建效果也有很大的影响.如果选择原始图像数目过少,那么重建出来的荧光层析图案质量会很差;如果选择用于重建的原始图像数目过多,就会增加计算量,降低成像速度.在实验中,同样选择铃兰根茎切片作为样品,通过选择不同的原始图像数 N 来重建层析图像,实验结果如图 5 所示.

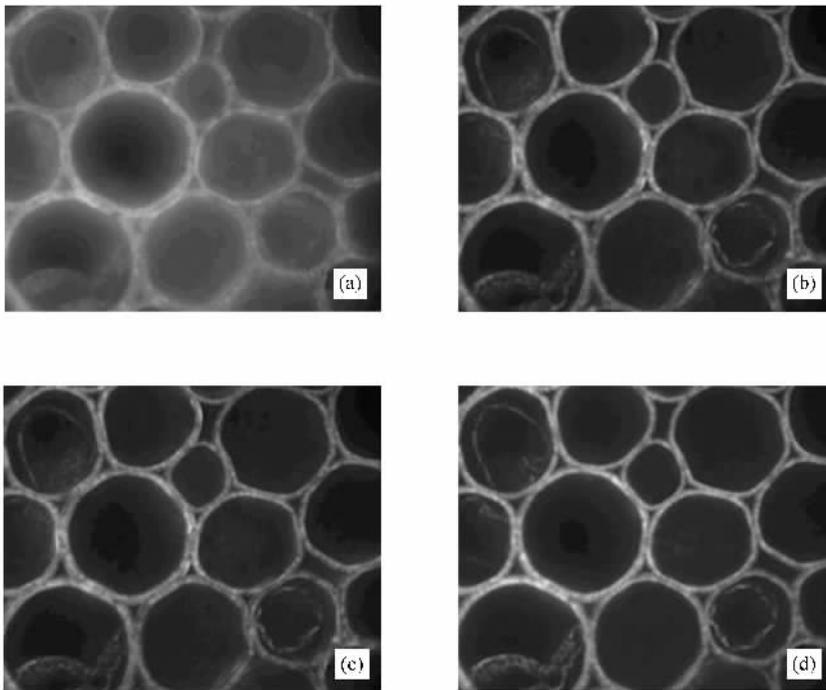


图 4 对铃兰根茎切片样品运用不同的图像重建算法得到的荧光层析图像 (a)原始图像 (b)用(7)式的算法重构得到的图像 (c)用(8)式的算法重构得到的图像 (d)用(9)式的算法重构得到的图像

从图 5 可以看到,当 N 取值较小时,图像信息部分丢失,当 N 取 70, 80, 90, 100 和 120 时,重建得到的荧光层析图像没有明显差别.所以,一般取 $N = 80$ — 90 时,就可以得到比较清晰的荧光层析图像.这样既保证重建的图像质量,又可以提高成像

速度.

4.2. 生物样品实验

我们以新鲜的牵牛花花瓣为样品,CCD 探测器的曝光时间设定为 120 ms,激光功率约为 30 mW,散

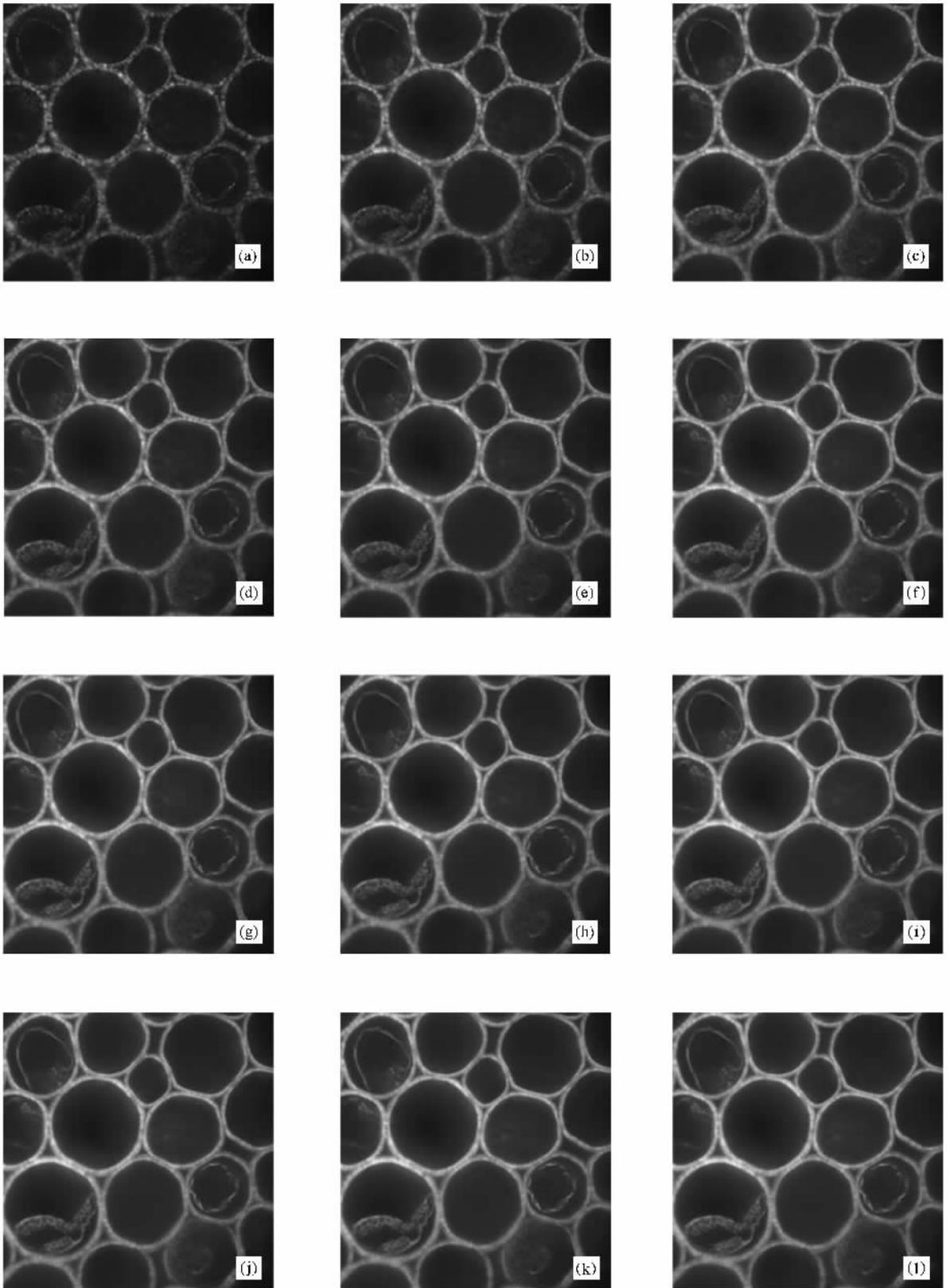


图 5 选择不同散斑图案数 N 时重构得到的荧光层析图像 (a) $N=10$,(b) $N=20$,(c) $N=30$,(d) $N=40$,(e) $N=50$,(f) $N=60$,(g) $N=70$,(h) $N=80$,(i) $N=90$,(j) $N=100$,(k) $N=110$,(l) $N=120$

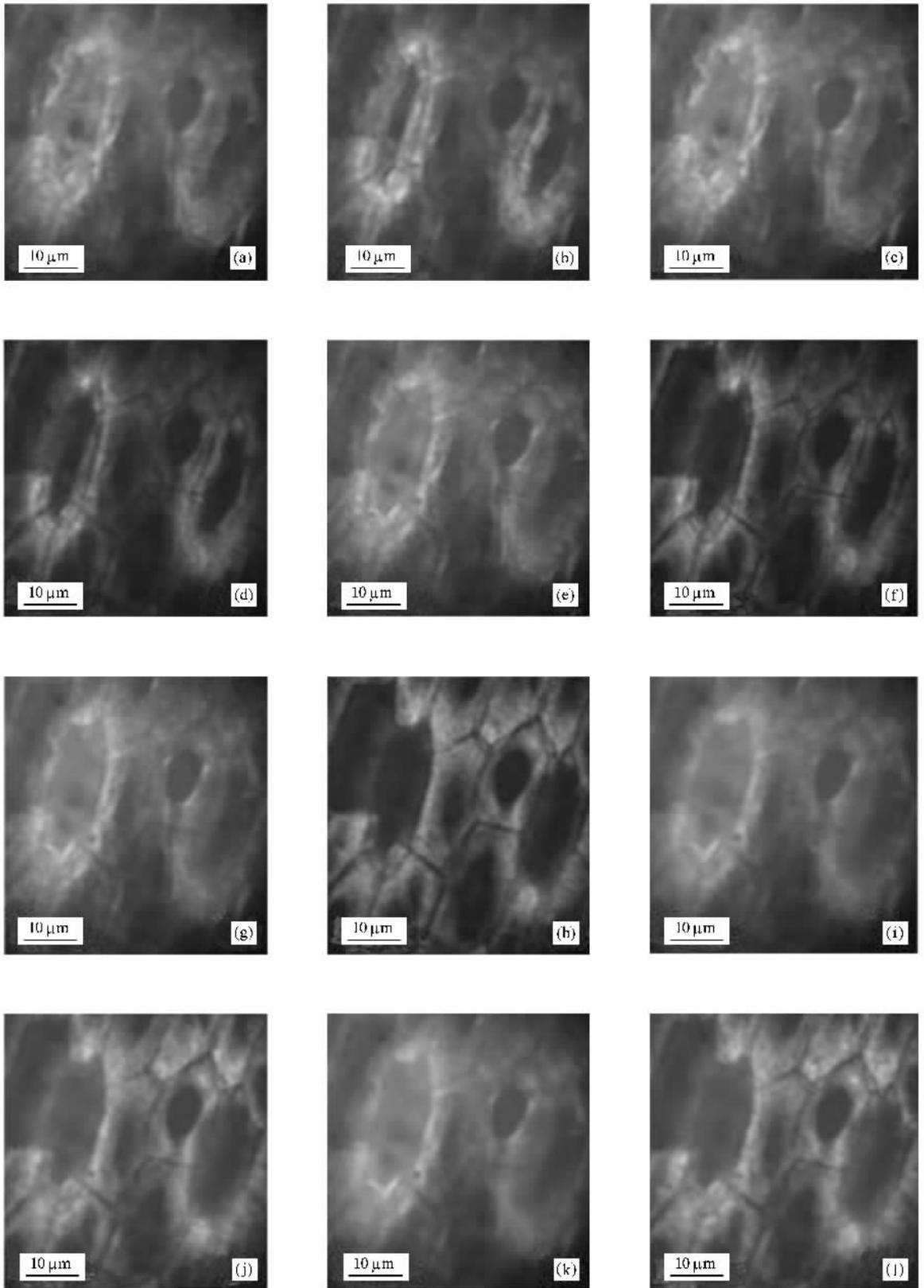


图 6 利用散斑照明宽场荧光显微系统所获得的新鲜牵牛花花瓣样品从 30 至 80 μm 不同深度处的原始图像和层析图像 (a), (c)(e)(g)(i)和(k)分别对应从 30 至 80 μm 不同深度处的原始图像;(b)(d)(f)(h)(j)和(l)分别为运用微分算法后得到对应位置处的层析图像

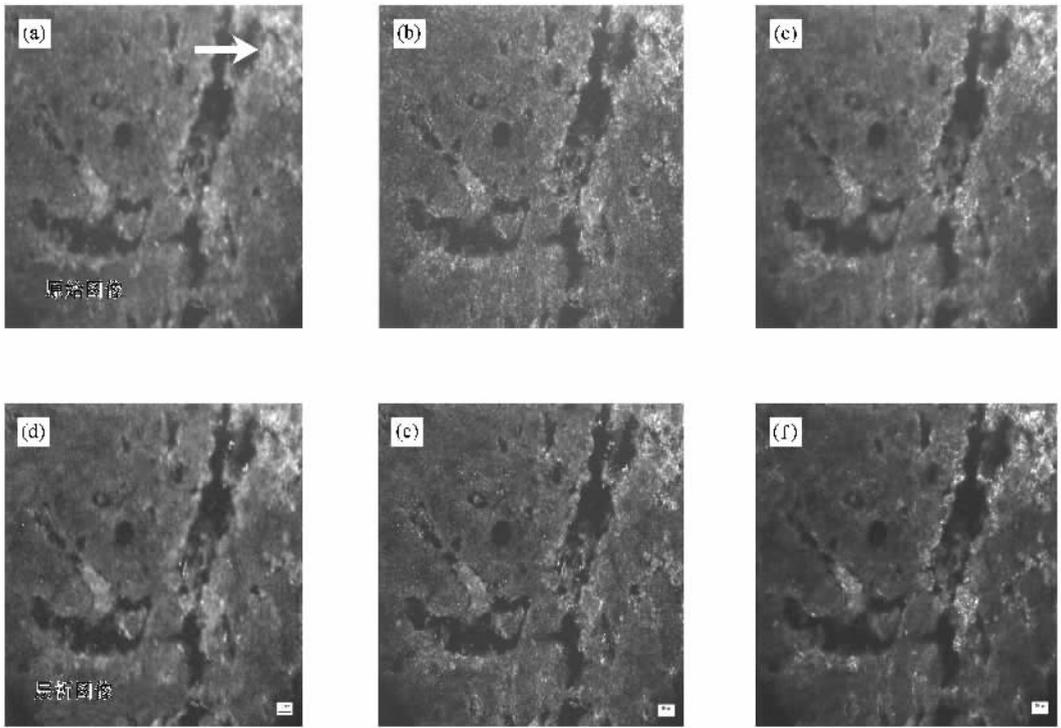


图 7 在不同深度($z_c = 0, 5, 10 \mu\text{m}$)处大鼠食管横断面的原始图像与层析图像 (a) $z_c = 0 \mu\text{m}$ 处原始图像 (b) $z_c = 5 \mu\text{m}$ 处原始图像 (c) $z_c = 10 \mu\text{m}$ 处原始图像 (d) $z_c = 0 \mu\text{m}$ 处层析图像 (e) $z_c = 5 \mu\text{m}$ 处层析图像 (f) $z_c = 10 \mu\text{m}$ 处层析图像

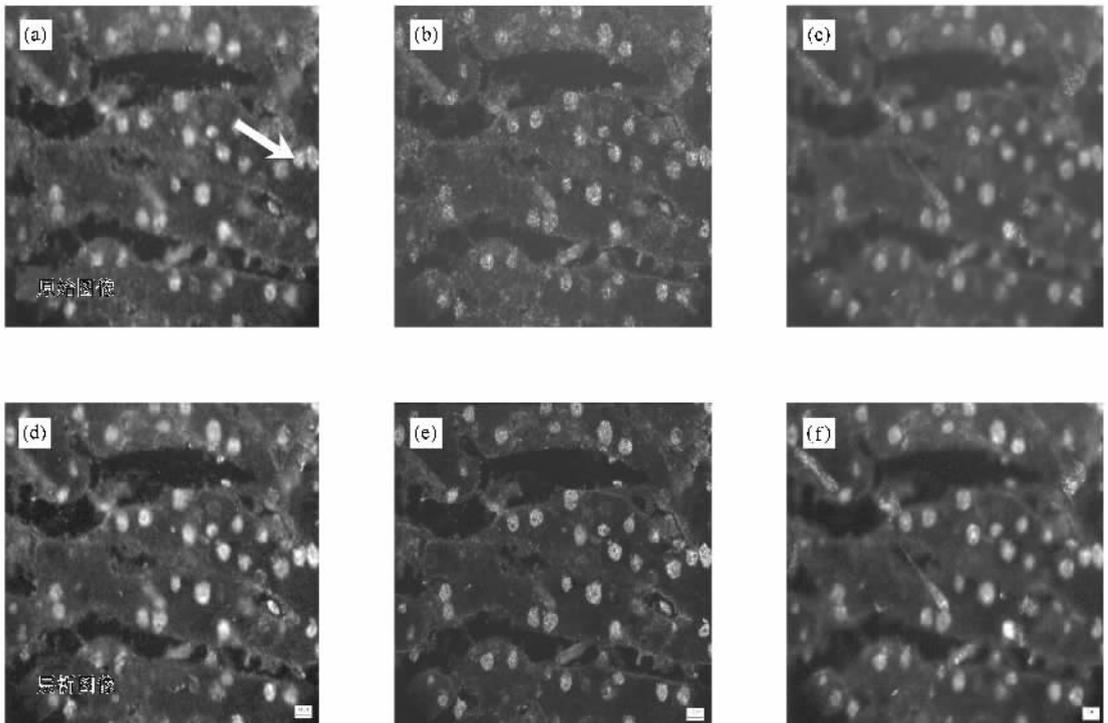


图 8 在不同深度($z_c = 0, 5, 10 \mu\text{m}$)处带有染色细胞的大鼠食管横断面的原始图像与层析图像 (a) $z_c = 0 \mu\text{m}$ 处原始图像, (b) $z_c = 5 \mu\text{m}$ 处原始图像 (c) $z_c = 10 \mu\text{m}$ 处原始图像 (d) $z_c = 0 \mu\text{m}$ 处层析图像 (e) $z_c = 5 \mu\text{m}$ 处层析图像 (f) $z_c = 10 \mu\text{m}$ 处层析图像

射体移动步长约为 $50 \mu\text{m}$, 原始图像数为 100, 采用微分算法提取层析信号. 调整显微物镜使其焦平面分别处于样品的不同深度, 如 $30, 40, \dots, 80 \mu\text{m}$, 利用动态散斑照明的宽场荧光显微系统获得了在 488 nm 激光散斑照明下不同深度处的荧光层析图像, 其原始荧光图像和层析图像如图 6 所示. 图 (a)(c), (e)(g)(i) 和 (k) 分别对应深度 z_c 从 30 至 $80 \mu\text{m}$ 的原始图像, 可以看出, 由于物镜焦平面外样品产生的荧光背景信号的干扰, 植物细胞的细节结构模糊. 图 (b)(d)(f)(h)(j) 和 (l) 分别为运用微分算法后得到对应位置的层析图像, 显示出样品中植物细胞在各层上清晰的细胞结构和细胞内特定荧光团的分布情况, 能获得原始图像中不能观察到的细节结构. 当调节物镜聚焦在样品深度为 $80 \mu\text{m}$ 处时, 仍然能够获得该层植物细胞结构清晰的荧光图像. 这表明使用动态散斑照明的宽场荧光显微镜能够获得清晰的荧光层析图像.

我们还利用该系统进行了组织切片实验. 组织样品采用大鼠食管横断面组织切片, CCD 曝光时间为 200 ms , 激光输出功率约为 30 mW , 切片间距为 $5 \mu\text{m}$, 由 70 幅原始图像重建一幅层析图像, 结果如图

7、图 8 所示. 从图 7、图 8 可以看出: 在原始图像中, 由于焦平面外信号的存在, 导致图中标识结构不清楚, 而在通过微分算法处理后的切片图像中, 这些原本模糊的结构已非常清晰. 实验结果表明, 该方法具有组织切片层析成像能力, 可用于临床医学上的组织切片分析.

5. 结 论

利用散斑图案在宽场荧光显微镜中对样品进行照明, 通过改变照明散斑图案, 从而可获得一系列样品的荧光图像. 通过微分算法来提取物镜焦平面内荧光图案的变化, 从而实现对特定深度的层析功能. 该技术能较好地抑制系统噪声, 提高层析荧光图像的对比度, 使系统具有较高的空间分辨率. 选择适当的重构图像数目和信号提取算法, 既可以缩短图像采集时间, 提高成像速度, 又可以保证荧光层析图像的质量, 提高整个系统的效率. 这种散斑照明宽场荧光显微技术能够以高的纵向分辨率对生物组织进行层析成像, 而且结构简单, 有望在生物医学领域获得实际的应用.

- [1] Tang Z L, Liang R S, Chang H S 2000 *Acta Phys. Sin.* **49** 1080 (in Chinese) [唐志列、梁瑞生、常鸿森 2000 物理学报 **49** 1080]
- [2] Wilson T, Sheppard C J 1984 *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy* (New York: Academic Press)
- [3] Neil M A A, Squire A, Juskaitis R, Dastiaens P I H, Wilson T 2000 *J. Microsc.* **197** 1
- [4] Neil M A A, Juskaitis R, Wilson T 1997 *Opt. Lett.* **22** 1905

- [5] Walker J G 2001 *Opt. Commun.* **189** 221
- [6] Somekh M G, See C W, Goh J 2000 *Opt. Commun.* **174** 75
- [7] Jiang S H, Walker J G 2004 *Opt. Commun.* **238** 1
- [8] Jiang S H, Walker J G 2005 *Opt. Commun.* **256** 35
- [9] Shi Y B, Chen C L 2007 *J. Hebei Polytechnic Univ.* **29** 136 [石友彬、陈春雷 2007 河北理工大学学报 **29** 136]
- [10] Ventalon C, Mertz J 2005 *Opt. Lett.* **30** 3350

Study on wide-field fluorescence sectioning microscopy based on dynamic speckle illumination^{*}

Lin Hao-Ming¹⁾²⁾ Shao Yong-Hong¹⁾ Qu Jun-Le^{1)†} Yin Jun¹⁾ Chen Si-Ping²⁾ Niu Han-Ben¹⁾

1) *Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education, Institute of Optoelectronics, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China*

2) *Key Laboratory of Biomedical Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China*

(Received 23 March 2008 ; revised manuscript received 29 August 2008)

Abstract

In this paper, we present a novel wide-field fluorescence sectioning microscopy in which speckle patterns are produced on the sample for illumination. The speckle pattern is dynamically changed and a sequence of fluorescence images of the sample is recorded with a CCD camera. Due to a large variation of fluorescence intensity of the in-focus light compared to that of the out-of-focus light, special processing algorithms can be used to reconstruct the sectioned fluorescence image. We calibrated the system and studied the effect of the reconstruction algorithms on the system performance. Fluorescence sectioned images of a few biological samples were obtained. Our experiments showed that this wide-field fluorescence sectioning microscopy can be used to optically section tissue and has potential applications in the clinics.

Keywords : fluorescence, speckle illumination, fluorescence microscopy, sectioning

PACC : 4225H, 4230

^{*} Project supported by the National Natural Science Foundation of China, China (Grant No. 60627003), the Science and Technology Innovation Research Team Program of Institution of Higher Education of Guangdong Province, China (Grant No. 06CXTD009) and the Young Science Foundation of Shenzhen University, China (Grant No. 200854).

[†] E-mail : jlqu@szu.edu.cn