



## 基于数字微镜器件的数字线扫描荧光显微成像技术

王美昌 于斌 张炜 林丹樱 屈军乐

### Digital line scanning fluorescence microscopy based on digital micromirror device

Wang Mei-Chang Yu Bin Zhang Wei Lin Dan-Ying Qu Jun-Le

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 69, 238701 (2020) DOI: 10.7498/aps.69.20200908

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200908>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

基于数字微镜器件的自适应高动态范围成像方法及应用

Adaptive high-dynamic-range imaging method and its application based on digital micromirror device

物理学报. 2017, 66(23): 234201 <https://doi.org/10.7498/aps.66.234201>

基于数字全息的血红细胞显微成像技术

Digital holographic microscopy for red blood cell imaging

物理学报. 2020, 69(16): 164201 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200357>

二维拓扑绝缘体的扫描隧道显微镜研究

Scanning tunneling microscopy study on two-dimensional topological insulators

物理学报. 2019, 68(22): 226801 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20191631>

扫描电子显微镜法测定金属衬底上石墨烯薄膜的覆盖度

Coverage measurement of graphene film on metallic substrate using scanning electron microscopy

物理学报. 2018, 67(7): 076802 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20172654>

Bi (110)薄膜在NbSe<sub>2</sub>衬底上的扫描隧道显微镜研究

Scanning tunneling microscopy research of Bi(110) thin films grown on NbSe<sub>2</sub>

物理学报. 2018, 67(17): 170701 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180977>

荧光寿命显微成像技术及其应用的最新研究进展

Recent progress of fluorescence lifetime imaging microscopy technology and its application

物理学报. 2018, 67(17): 178701 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180320>

# 基于数字微镜器件的数字线扫描 荧光显微成像技术\*

王美昌 于斌<sup>†</sup> 张炜 林丹樱 屈军乐<sup>‡</sup>

(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, 深圳 518060)

(2020年6月14日收到; 2020年7月11日收到修改稿)

在激光扫描共聚焦显微镜的基础上, 线扫描荧光显微术利用线扫描代替点扫描, 提升图像获取速度, 具有系统结构简单、成像速度快、光毒性弱、更适用于活体厚样品的高分辨快速成像, 对于生命科学和生物学等领域的研究具有重要的意义. 然而, 目前的线扫描显微技术在系统灵活性、成像速度、分辨率和光学层析能力等方面仍面临着许多亟需解决的问题. 因此, 本文提出一种基于数字微镜器件 (digital micromirror device, DMD) 的数字线扫描荧光显微 (digital line-scanning fluorescence microscopy, DLSFM) 成像方法和系统, 在照明光路中引入高速空间光调制器 DMD 实现多线并行扫描激发, 简化光学系统, 提升系统灵活性和扫描速度; 提出基于荧光信号标准差的 DLSFM 图像重构算法, 结合三维 Landweber 解卷积算法实现了三维高分辨光切片图像重构. 在此基础上, 利用搭建 DLSFM 开展了荧光珠和老鼠肾切片标准样品的成像实验, 实验结果表明, DLSFM 具有快速三维高分辨层析成像能力.

**关键词:** 线扫描显微, 数字微镜器件, 荧光显微

**PACS:** 87.64.M-, 87.64.kv, 42.30.-d, 87.85.Pq

**DOI:** 10.7498/aps.69.20200908

## 1 引言

激光扫描共聚焦显微镜 (laser scanning confocal microscope, LSCM)<sup>[1,2]</sup> 具有光学层析能力强、信噪比和分辨率高等优势, 是生物成像必不可少的重要工具之一<sup>[3-7]</sup>. 但是, 传统的 LSCM 通常采用检流式扫描振镜进行逐点扫描, 其慢的成像速度和大的光毒性大大阻碍了其在活细胞成像中的进一步的应用. 为了进一步提高 LSCM 的成像速度, 目前已发展了基于转盘 (Nipkow disk)<sup>[8]</sup>、共振振镜<sup>[9]</sup>、多面转镜<sup>[10,11]</sup> 等多种扫描方式的 LSCM.

转盘式 LSCM 成像速度可达 25 帧/秒 (frames per second, fps), 但其光通量低, 成像条件苛刻; 基于多面转镜和共振振镜扫描的 LSCM, 成像速度达到 30 fps, 但光学系统复杂、扫描系统的同步控制电路复杂、价格高. 为了突破这些限制, 进一步提升 LSCM 的图像获取速度, 线扫描显微技术 (line-scanning microscopy, LSM) 应运而生. 1988 年, Sheppard 等<sup>[12]</sup> 首先提出了应用狭缝代替针孔的扫描显微技术, 利用线扫描代替点扫描, 大大提升了成像速度和降低了激发光强度, 更适用于活细胞和组织成像<sup>[13,14]</sup>; 随后, Reto 等<sup>[15]</sup> 在此基础之上提出了一种虚拟狭缝扫描显微术, 提升了各向异性

\* 国家自然科学基金 (批准号: 61975131, 61775144, 61525503, 61620106016, 61835009)、广东省自然科学基金项目 (批准号: 2018A030313362)、广东省高等学校科技创新 (重点) 项目 (批准号: 2016KCXTD007) 和深圳市基础研究项目 (批准号: JCYJ20170818141701667, JCYJ20170818144012025, JCYJ20170412105003520) 资助的课题.

<sup>†</sup> 通信作者. E-mail: [yubin@szu.edu.cn](mailto:yubin@szu.edu.cn)

<sup>‡</sup> 通信作者. E-mail: [jlqu@szu.edu.cn](mailto:jlqu@szu.edu.cn)

的成像空间分辨率, 但是其成像速度却受到了制约; 针对这一问题, Kang 等<sup>[16]</sup>提出了一种基于声光偏转器的高速线扫描共焦显微术, 其成像速率为 191 fps, 但该系统不适用于生物样品荧光信号的测量; 为了进一步提高 LSM 的空间分辨率, Ondrej 等<sup>[17]</sup>提出了线扫描结构光照明显微技术 (line scan-structured illumination microscopy, LS-SIM), 实现了厚样品的超分辨成像, 但系统和图像重构算法相对复杂, 成像速度较慢. 为了进一步简化系统, 研究人员提出了基于虚拟结构光探测 (virtually structured detection, VSD) 的超分辨线扫描显微成像技术 (VSD-LSM)<sup>[18–20]</sup>, 实现了超分辨线扫描显微成像. 为了降低系统成本, 简化 LSM 系统, Vakili 等<sup>[21]</sup>发展了基于高亮度线阵发光二极管 (LED) 的线扫描共聚焦显微镜. 近年来, LSM 已广泛应用于生物医学研究的各个领域<sup>[22–26]</sup>.

另外, 在 LSM 的图像重构算法方面, 目前主要有基于虚拟狭缝的图像重构方法, 但是该方法对狭缝尺寸有特定要求, 尺寸过大导致离焦信号不能完全滤除, 过小会导致在焦信号被滤除, 引起图像信息缺失. 因此, Rainer 等<sup>[27]</sup>提出了基于结构光场激发的高分辨荧光显微图像重构方法, 避免了狭缝式滤除离焦信号的过程, 有效提升了图像分辨率. 但是, 其重构图像中存在伪影, 导致图像模糊. 随后, 也有研究人员利用解卷积 (deconvolution, DE) 算法处理 LSM 图像, 但分辨率的提升并不明显.

因此, 线扫描显微技术在成像速度、分辨率和光学层析能力等方面仍面临着许多亟需解决的问题, 研究和开发新型线扫描显微成像技术系统及相关图像重构算法, 进一步提升其性能, 使其更适用于活体厚样品例如活体完整细胞和组织等的高分辨快速三维成像, 对于生命科学和生物医学等领域的研究具有重要的意义. 数字微镜器件 (digital micromirror device, DMD) 作为高速数字光处理器件, 已广泛应用于投影、显示、无掩模光刻、光学测量、成像、全息等领域<sup>[28,29]</sup>. Vienola 等<sup>[30]</sup>以 DMD 作为扫描器件建立了数字线扫描检眼镜成像系统, 但该系统并不适用于生物样品荧光信号测量. 本文在实验室现有多焦点结构光照明显微镜的基础上<sup>[31]</sup>, 提出了一种基于 DMD 的数字线扫描荧光显微成像方法 (digital line-scanning fluorescence microscopy, DLSFM), 并搭建了相关显微系统, 开展了老鼠肾切片标准样品的三维光切片显微成像实验;

提出基于荧光信号标准差的 DLSFM 图像重构算法并编制了其图像重构程序, 结合三维 Landweber DE 算法<sup>[32]</sup>实现了三维高分辨光切片层析图像重构, 实验结果证明了系统的可靠性, 为 LSM 进一步发展及其在对完整活细胞等厚样品快速高分辨成像方面提供理论和技术基础.

## 2 DLSFM 的基本原理

### 2.1 系统光路设计

DLSFM 光路如图 1 所示, 首先, 波长为 488 nm 固体激光器发出的光束, 经过一个 4f 扩束系统, 将入射光束的光斑直径扩大 6 倍; 随后, 扩束后的激光光束被反射镜以特定角度反射到 DMD 面板上, 并被开 (on) 状态的微镜反射进入后续的 4f 系统, 其中 4f 系统的前焦面与 DMD 面板重合, 并将光阑 (Iris) 放置在 4f 系统的傅里叶面, 用来滤除多余衍射级的反射光; 随后, 光线汇聚在 4f 系统的后焦面上形成稀疏的线条阵列, 其轴向位置与管镜前焦面重合; 最后, 被聚焦的线条阵列经管镜和物镜后缩小 1/90, 成像到样品面上, 从而形成最终的多线阵激发模式. 实验中, DMD 面板的像素数为  $1024 \times 768$ , 像素尺寸为  $10.8 \mu\text{m} \times 10.8 \mu\text{m}$ , 经过后续光学系统的缩放, 在样品面上对应的尺寸为  $120 \text{ nm} \times 120 \text{ nm}$ . 最后, 由样品被激发后产生的荧光信号通过物镜 (尼康,  $60 \times$ ,  $NA = 1.27$  水镜)、二向色镜和管镜, 聚焦到高灵敏度相机 (scientific CMOS, sCMOS)(滨松, ORCA Flash 4.0 V2, 像素数  $2048 \times 2048$ , 像素尺寸  $6.5 \mu\text{m} \times 6.5 \mu\text{m}$ ) 上形成样品的像. 样品放在三维高精度电动纳米位移台上 (PI, P-545.3R7Z PINano XYZ), 主要通过其进行轴向扫描, 结合 DMD 的横向扫描, 最终实现样品的三维成像. 另外, 由于 PI 纳米位移台在三个方向的重复精度优于 5 nm, 远小于样品面的像素尺寸 120 nm, 确保了系统的稳定性, 因此, 轴向扫描过程对系统分辨率的影响可以忽略不计.

### 2.2 系统信噪比特性分析

在 DLSFM 成像过程中, 通过控制 DMD 每列像素的“开”和“关”即偏转角度来生成多条平行线光束, 同时对样品扫描成像. 因此, 成像视场内扫描线的多少和间距决定了成像的速度和信噪比 (single-to-noise ratio, SNR), 所以, 在设计系统时,

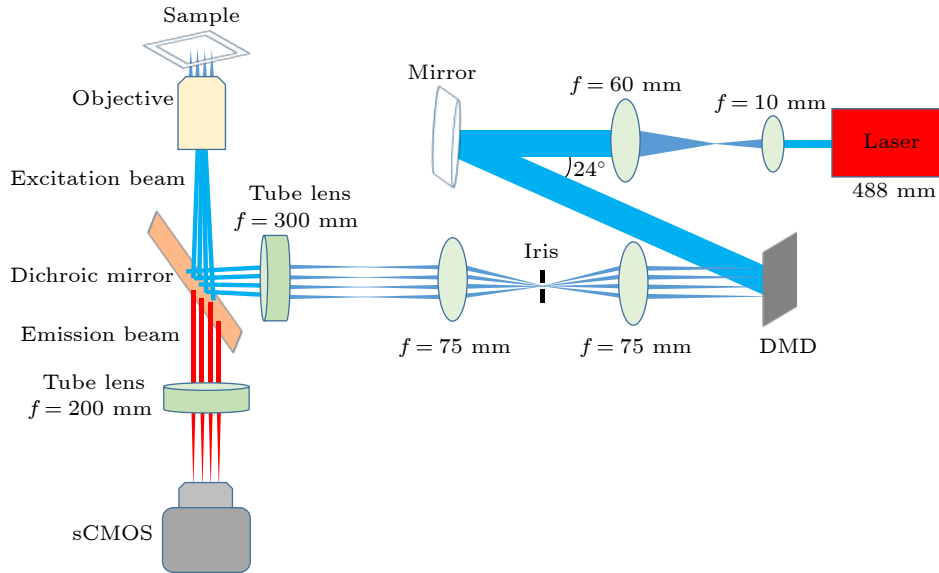


图 1 DLSFM 系统光路示意图  
Fig. 1. Schematic diagram of DLSFM system.

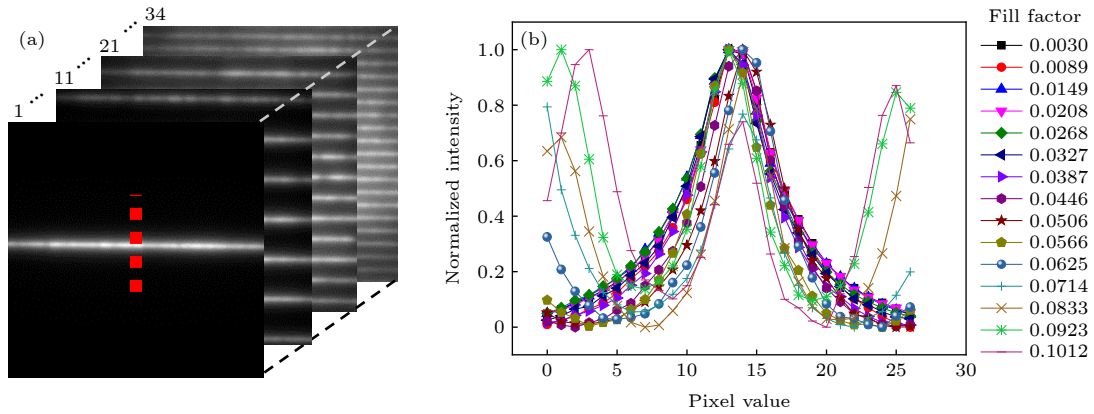


图 2 DMD 不同填充因子的数字线扫描成像分析 (a) 不同密度线条纹激发下的罗丹明荧光溶液图像; (b) 不同帧的同扫描线位置的强度轮廓线

Fig. 2. Digital line scan imaging analysis of DMD with different fill factor: (a) The rhodamine fluorescence solution images excited by different density scanning lines; (b) the intensity profiles through the dotted line in (a).

需要综合考虑这两个因素. 为了分析 SNR 特性, 定义 DMD 的填充因子  $F$  (fill factor),

$$F = n/N, \quad (1)$$

其中,  $N$  为 DMD 的微反射镜总数量,  $n$  为开状态下的 DMD 微反射镜数量.

首先, 通过对均匀的罗丹明荧光溶液进行线扫描成像来分析  $F$  与扫描线数的关系, 如图 2 所示. 通过采集单帧不同密度线条纹激发下的罗丹明荧光溶液图像, 如图 2(a) 所示, 并对采集的荧光溶液图像不同帧的同一平行线位置的横截面宽度进行计算, 如图 2(b) 所示.

从图 2(b) 中看出, 随着  $F$  的增大, 不同线密度

条件下激发样片产生荧光线条的横截面宽度几乎接近于一恒定值, 但当  $F$  增大到 0.0566 时, 可以看出线条的横截面强度除了中心的主峰强度外, 有一些旁瓣信号, 这主要是由于高线密度下平行线间的散射光和离焦信号导致的. 因此, 为了获取理想  $F$  情况下平行线阵列的激发数目, 需对图像 SNR 作进一步分析, 如图 3 所示. SNR 定义如下:

$$\text{SNR} = \frac{E_s - E_b}{\sqrt{E_s}}, \quad (2)$$

其中,  $E_s$  表示焦面信号强度,  $E_b$  表示背景信号平均强度.

由图 3(b) 看出, 随着  $F$  的增大, 焦面信号和背景信号强度趋于线性变化, 而图像 SNR 逐渐减小

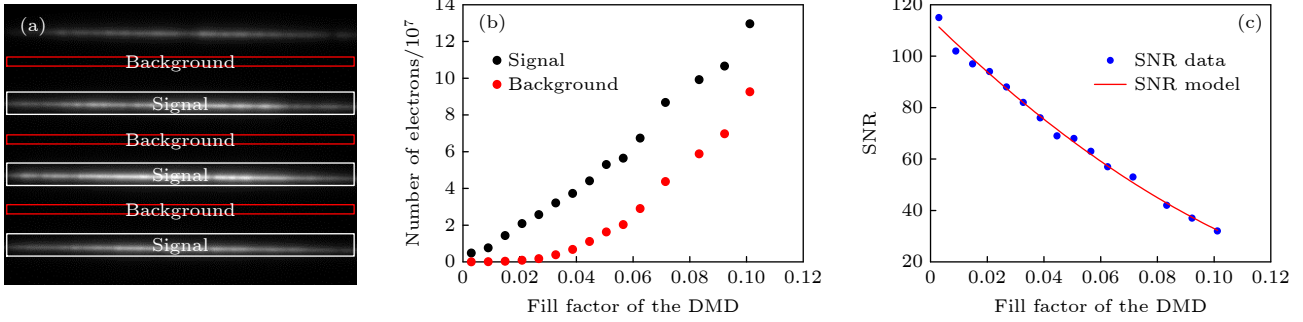


图 3 DMD 不同填充因子的信噪比分析 (a) 焦面信号和背景信号强度分布图; (b) 焦面信号和背景信号强度与 DMD 填充因子的关系曲线; (c) DMD 不同填充因子的信噪比曲线

Fig. 3. SNR analysis of DMD with different fill factor: (a) The intensity distributions of focal plane signal and background signal intensity; (b) the intensity curves of focal plane signal (black) and background signal (red); (c) the curve of the SNR versus fill factor of DMD.

(图 3(c)), 这主要是由于线密度增大使平行线阵列间的散射光信号导致了这一结果. 由图 2(b)、图 3(b), (c) 看出, 当  $F$  为 0.0208 时, SNR 比为 94, 此时从物镜口发出的光功率为 177  $\mu\text{W}$ , 采样速率为 250 Hz, 重构一幅光切片图像需要 48 帧扫描图像, 从成像时间和空间分辨效果进行综合分析, 此时, 成像条件最佳. 因此, 由 (1) 式, 可以计算该条件下所需的线条阵列数为 7, 从而为后续的实验奠定了基础.

### 3 DLSFM 图像重构方法

在厚样品的荧光显微成像中, 由于荧光信号可在样品成像的焦面和非焦面位置产生, 对于非焦面信号会对成像产生干扰, 降低图像对比度进而影响成像分辨率, 对此, 研究人员提出了基于虚拟狭缝 (virtual slit, VS) 的图像重构方法去处理, 但是该方法的处理过程受狭缝尺寸以及成像深度的限制. 在前期的研究工作中提出了一种基于离焦信号和聚焦信号统计特性的多焦点结构光显微层析成像重构方法<sup>[33]</sup>, 可以有效保留聚焦信号和滤除离焦等低频背景信号, 实现了厚样品的高对比度层析成像. 本文在此基础上, 将该方法用于 DLSFM 的图像重构, 用于抑制离焦背景信号, 进而提高其光切片能力和分辨率.

为了得到每个像元对应的标准差 (standard deviation, STD) 数值  $\sigma$ , 对每一层扫描图像的像元强度分布情况进行统计计算, 其计算式中重构图像每个像元的强度均值  $\mu$  为不同扫描图像中每个像元的强度值求平均而得到. 然后, 可以计算出重构图像中每个像元的  $\sigma$  数值, 其表达式为

$$\mu(i, j) = \frac{1}{M} \sum_{p=1}^M I(i, j, p),$$

$$\sigma(i, j) = \left[ \frac{1}{M-1} \sum_{p=1}^M (I(i, j, p) - \mu(i, j))^2 \right]^{\frac{1}{2}}, \quad (3)$$

其中,  $(i, j)$  表示图像像元索引位置,  $\mu(i, j)$  表示重构图像中每个像元的强度均值,  $p$  为采集的不同图像,  $M$  为图像数,  $I(i, j, p)$  表示索引位置像元的强度值,  $\sigma(i, j)$  为重构图像中每个像元的标准差.

通过上述公式对线扫描图像序列进行处理, 抑制离焦背景噪声, 获得了 DLSFM 图像, 在此基础上可结合三维 Landweber DE 算法来进一步提高 DLSFM 图像的对比度和分辨率.

## 4 实验结果分析与讨论

### 4.1 系统分辨率标定

为了验证 DLSFM 的成像能力, 可通过测量直径为 100 nm 的荧光珠对该系统的分辨率进行标定, 对视场范围内 25 颗荧光珠的图像进行统计平均, 得到了系统在  $x, y, z$  方向的平均分辨率, 用荧光珠的半高全宽 (full width at half maximum, FWHM) 值来表征, 如图 4 所示.

首先, 利用线扫描原始图像进行直接叠加, 获得了荧光珠宽场 (wide field, WF) 图像. 但 WF 图像离焦背景噪声信号较强 (图 4(a)), 荧光珠在  $x, y, z$  方向对应的平均 FWHM 分别为 286, 274 和 854 nm. 然后, 经 VS 图像重构、STD 图像重构及 VS 图像重构与 Landweber DE 算法结合 (STD + DE) 处理后, 分辨率得到了一定的提升, 但是效果不是太

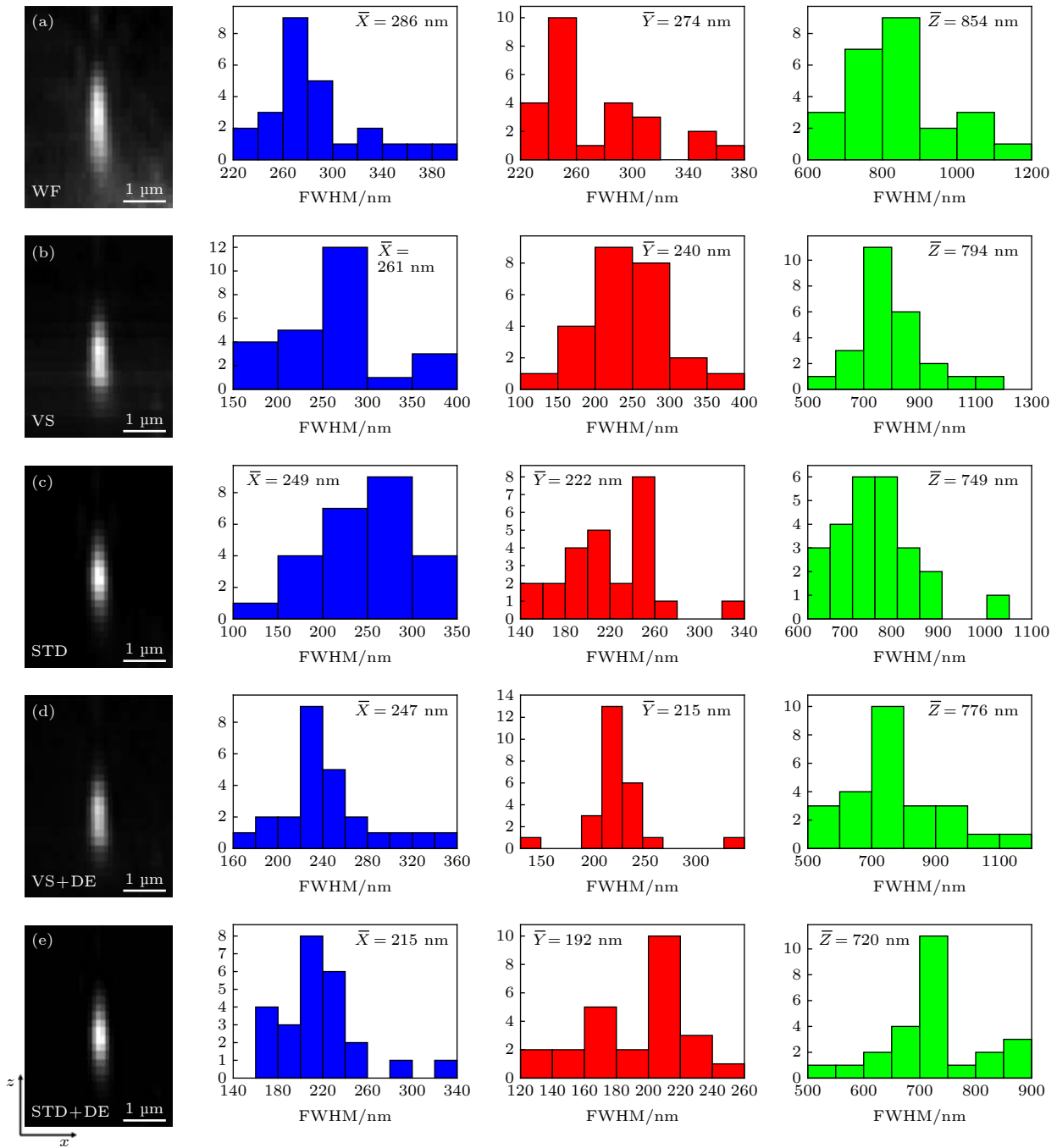


图 4 100 nm 荧光珠标定的系统三维空间分辨率 (a) 宽场图像; (b) 虚拟狭缝重构图像; (c) 标准差重构图像; (d) 虚拟狭缝与 LW 解卷积组合重构图像; (e) 标准差与 LW 解卷积组合重构图像. 其右边对应的直方图为 25 颗荧光珠在沿  $x, y, z$  方向的 FWHM 分布,  $\bar{X}, \bar{Y}, \bar{Z}$  分别为其平均值

Fig. 4. 3D spatial resolution of the system calibrated by the 100 nm fluorescent bead: (a) WF image; (b) VS image; (c) STD image; (d) VS + DE image; (e) STD + DE image. The corresponding histograms on the right show the measured distribution of  $x, y, z$  FWHM values from 25 beads.

明显. 然而, 将 STD 图像重构与 LandweberDE 算法结合 (STD + DE) 处理后其分辨率得到了进一步的改善, 荧光珠在  $x, y, z$  方向的平均 FWHM 分别为 215, 192 和 720 nm, 为宽场条件下的 1.33 倍、1.42 倍和 1.19 倍. 考虑到荧光珠的尺寸, DLSFLM 的实际空间分辨率略小荧光珠的 FWHM.

## 4.2 老鼠肾切片三维成像实验

接下来, 利用搭建的 DLSFM 系统, 选用荧光标记的老鼠肾切片 (FluoCell™ prepared slide#3 mouse kidney section, \*AF 488 WGA, AF 568 phalloidin, Product of US) 作为实验样片, 选取其

中厚度为  $11.2\ \mu\text{m}$  的肾小球作为实验对象, 进行扫描成像, 样品荧光发射光波长为  $568\ \text{nm}$ , 样品像素尺寸大小为  $108\ \text{nm}$ . 在成像采集过程中, DMD 上 7 条激发线横向并行扫描的步数为 48 步, 扫描速率为  $250\ \text{Hz}$ , 三维电动纳米位移台轴向扫描间隔为  $200\ \text{nm}$ . 因此, 共获得 2688 幅线扫描源图像. 这些采集的样品图像经 VS、STD, 以及 LandweberDE 算法处理后获得样品的不同深度的光切片层析图像, 如图 5 所示.

从图 5 中可以看出, WF 模糊不清, 大致能分辨外轮廓, 对于边缘细节几乎难以分辨开来, 经 VS 图像重构方法处理后, 离焦信号得到了一定的去除, 边缘细节得到了一定的凸显; 然而, VS 图像重构方法与 STD 图像重构方法成像相比, 其对比

度与分辨率相对较低. 利用 Landweber 解卷积算法在二者基础之上进行处理, 其对比度及分辨率得到了进一步改善, 尤其是对于标准差图像重构, 其经解卷积算法处理后, 样品细节结构得到了显著的凸显, 图像分辨率得到了进一步的提升.

为了细致观察其重构效果, 选取轴向深度处于  $8\ \mu\text{m}$  处的肾小球切片的一区域进行放大, 如图 6 所示, 其中, 图 6(a)—(f) 分别为 WF 图像、VS 图像和 STD 图像; 图 6(a)—(c) 分别经 Landweber DE 算法处理成像 (图 6(d)—(f)); 图 6(i)—(n) 分别为图 6(a)—(f) 黄色线框区域的放大.

从图 6 可以看出, 经由图 6(a)—(f) 黄色线框分别放大后的图 6(i)—(n), 其中, 图 6(l)—(n) 在图 6(i)—(k) 的基础之上分辨率得到了进一步提升,

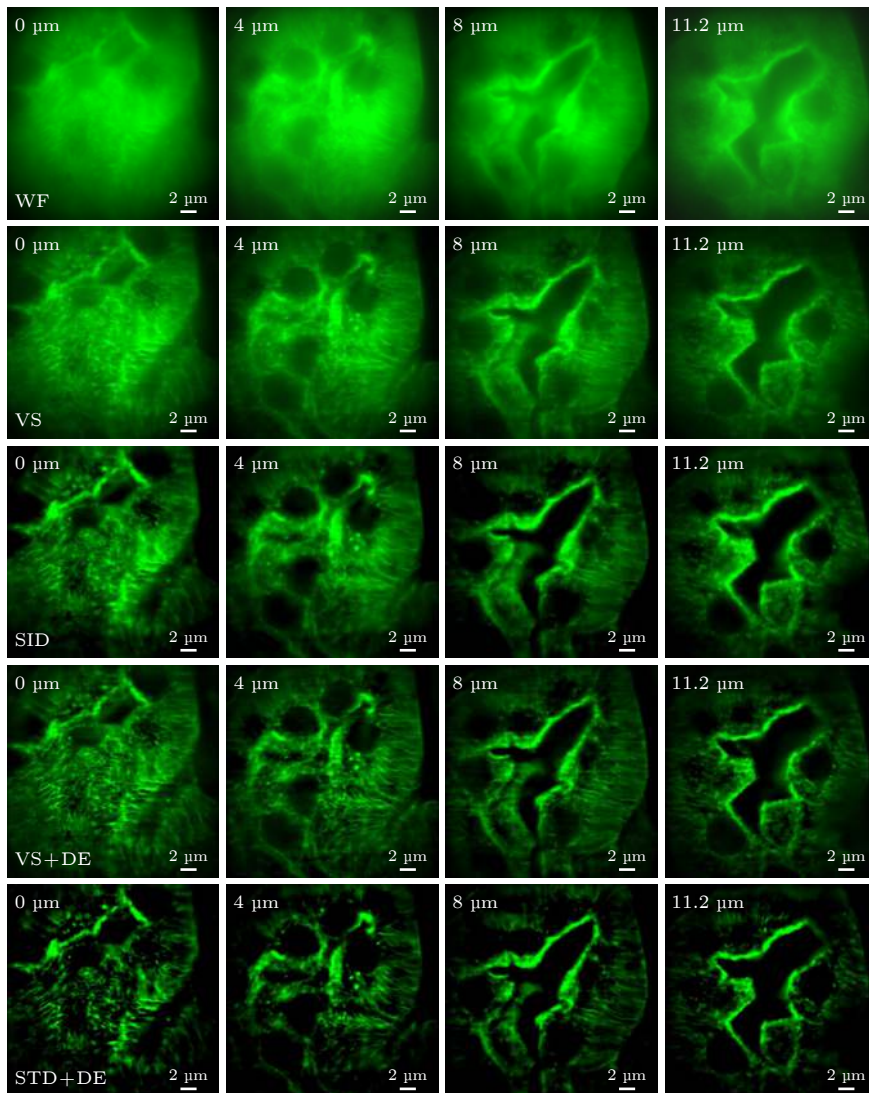


图 5 肾小球轴向光切片的重构图像

Fig. 5. Reconstructed slice images of the same glomerulus.

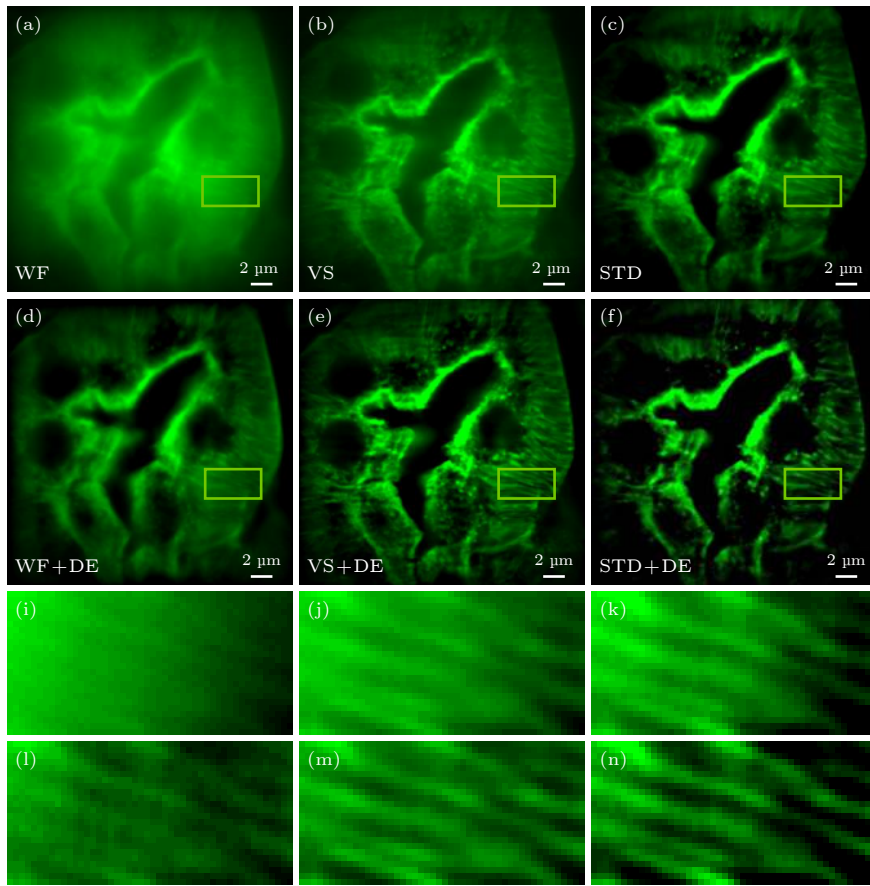


图 6 不同算法的图像重构细节比较 (a)—(c) 分别为 WF 图像、VS 图像和 STD 图像; (d)—(f) 分别由 (a)—(c) 经 Landweber DE 算法处理成像; (i)—(n) 分别为图 (a)—(f) 黄色线框区域的放大图

Fig. 6. Comparison of image reconstruction details of different algorithms: (a)–(f) WF image, VS image, and STD image; (d)–(f) the Landweber DE images for (a)–(c); (i)–(n) magnified view of the yellow rectangular areas in (a)–(f).

尤其是对于图 6(n), 与图 6(m) 相比, 其样品结构凸显得尤为明显. 因此, 说明了数字线扫描 WF、VS 图像重构、STD 图像重构经 Landweber 算法解卷积后图像分辨率得到进一步的提升, 其中 STD 图像对比度以及分辨率明显比 VS 图像重构的要高, 如图 7 所示, 其中, 图 7(a)—(c) 分别为 WF 图像、VS 图像和 STD 图像; 图 7(d)—(f) 分别为图 7(a)—(c) 经 Landweber 解卷积算法处理成像; 图 7(g) 和 7(h) 分别为图 7(a)—(f) 白色虚线位置的归一化强度拟合.

从图 7(g),(h) 可以看出, 通过 Landweber DE 算法处理前后, STD 图像重构的强度明显比 VS 图像重构的要高, 与此同时, 处理后整体比处理前的要大 (如图 7(g), (h) 所示). 处理前, STD 图像、VS 图像、WF 图像的归一化强度变化量分别为:  $d_3 = 0.69$ ,  $d_2 = 0.32$ ,  $d_1 = 0.04$ ; 处理后, 其分别为:  $d_3 = 1.00$ ,  $d_2 = 0.66$ ,  $d_1 = 0.24$ . 因此, 进一步验证了我们所述的结论.

根据对系统的分辨率测试和对固定生物样品成像结果可以看出, 系统的成像分辨率基本上接近系统理论的成像分辨率, 在生物样品成像过程中具有良好的信噪比.

## 5 总 结

本文实现了一种基于数字微镜器件的线扫描荧光显微成像系统, 通过超高速 DMD 空间光调制器实现了多线并行数字线扫描荧光显微成像, 简化及智能化了系统扫描装置, 提高了其时空分辨率; 建立了基于标准差的线扫描显微图像重构方法, 并将其与 Landweber 解卷积算法相结合, 实现了三维高分辨率光切片图像重构, 实验表明系统  $x, y, z$  方向的分辨率分别为宽场条件下的 1.33 倍、1.42 倍和 1.19 倍, 并实现了对生物样本的三维高分辨率层析成像, 为进一步开展活体完整细胞及组织等厚样品快速高分辨成像奠定了技术基础.

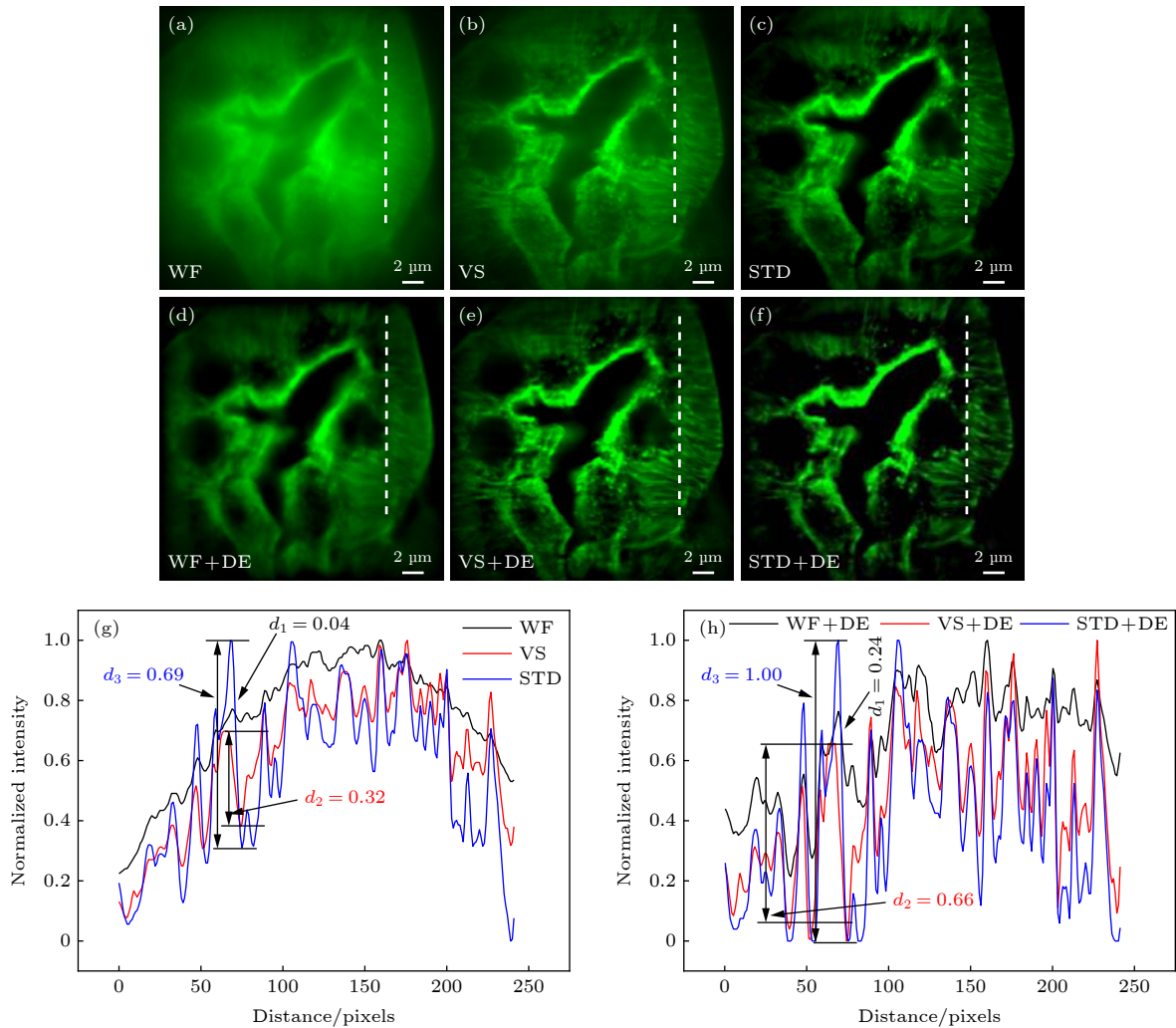


图 7 不同算法重构图像的对比度比较 (a)–(c) 分别为 WF 图像、VS 图像和 STD 图像; (d)–(f) 分别为图 (a)–(c) 经 Landwebe 解卷积算法处理成像; (g)–(h) 分别为图 (a)–(f) 白色虚线位置的归一化强度轮廓图

Fig. 7. Contrast comparison of reconstructed images with different algorithms: (a)–(c) WF image, VS image, and STD image; (d)–(f) images obtained from (a)–(c) processed by Landwebe deconvolution algorithm; (g)–(h) the normalized intensity profiles through the white dotted line position in (a)–(f).

### 参考文献

- [1] Minsky M 1988 *Scanning* **10** 128
- [2] Mitsuhiro I, Hiromi S 1998 *SPIE* **34** 68
- [3] Gustafsson M G 2010 *J. Microsc.* **198** 82
- [4] Zhao Q T, Miao J Y 2003 *Beijing Biomed. Eng.* **22** 52 (in Chinese) [赵启韬, 苗俊英 2003 *北京生物医学工程* **22** 52]
- [5] Rainer H, Christoph G C 1999 *SPIE* **35** 185
- [6] Sauermann K, Gambichler T, Wilmert M 2002 *Skin Res. Technol.* **8** 141
- [7] Taejoong K, DaeGab G, Jun-Hee L 2009 *Meas. Sci. Technol.* **20** 055501
- [8] Schulz O, Pieper C, Clever M, et al. 2013 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110** 21000
- [9] Fan G Y, Fujisaki H, Miyawaki A, Tsay R K, Tsien R Y, Ellisman M H 1999 *Biophys. J.* **76** 2412
- [10] Rahadhyaksha M, Anderson R R, Webb R H 1999 *Appl. Opt.* **38** 2105
- [11] Li Y X, Gautam V, Brüstle A, Cockburn I A, Daria VR, Gillespie C, Gaus K, Alt C, Lee W M 2017 *J. Biophotonics* **10** 1526
- [12] Sheppard C JR, Mao X Q 1988 *J. Mod. Optic.* **35** 1169
- [13] Puash W C, Wasser M 2016 *Methods* **96** 103
- [14] Yazawa M, Hsueh B, Jia X, Pasca A M, Bernstein J A, Hallmayer J, Dolmetsch R E 2011 *Nature* **471** 230
- [15] Reto F, Andreas S, Yury B 2007 *Histochem. Cell Biol.* **128** 499
- [16] Kang B I, Sumin H, Hwajoon P, Dongsun K, Beop M K 2005 *Opt. Express* **13** 5151
- [17] Ondrej M, Martin K, Kai Wicker, Gerhard K, Ingo K, Rainer H 2012 *Opt. Express* **20** 24167
- [18] Lu R W, Wang B Q, Zhang QX, Yao XC 2013 *Biomed. Opt. Express* **4** 1673
- [19] Wang B, Lu R, Zhang Q, Yao X 2013 *Quant. Imag. Med. Surg.* **3** 243
- [20] Yanan Z, Lu R W, Wang B Q, Zhang Q X, Yao X C 2015 *Opt. Lett.* **40** 1683
- [21] Poher V, Zhang HX, Kennedy GT 2007 *Opt. Express* **15** 11196
- [22] Chamma I, Levet F, Sibarita J B, Sainlos M, Thoumine O

- 2016 *Neurophotonics* **3** 041810
- [23] Endesfelder U, Heilemann M 2014 *Nat. Methods* **11** 235
- [24] Flors C 2011 *Biopolymers* **95** 290
- [25] Patterson G, Davidson M, Manley S 2010 *Annu. Rev. Phys. Chem.* **61** 345
- [26] Hossain S, Hashimoto M, Katakura M, Mamun A A, Shido O 2015 *Bmc. Complem. Altern. M* **15** 1
- [27] Rainer H, Pier A, Benedetti 2006 *Appl. Opt.* **45** 5037
- [28] Ren Y X, Lu R D, Gong L 2015 *Ann. Phys.(Berlin)* **527** 447
- [29] Feng W, Zhang F M, Wang W J, Qu X H 2017 *Acta Phys. Sin.* **66** 234201 (in Chinese) [冯维, 张福民, 王惟婧, 曲兴华 2017 物理学报 **66** 234201]
- [30] Vienola K V, Damodaran M, Braaf B, Vermeer K A, Johannes F 2015 *Opt. Lett.* **40** 5335
- [31] Wu J J, Li S W, Cao H Q, Lin D Y, Yu B, Qu J L 2018 *Opt. Express* **26** 31430
- [32] Vonesch C, Unser M 2008 *IEEE Trans. Image Process.* **17** 539
- [33] Zhang W, Yu B, Lin D Y, Yu H H, Li S W, Qu J L 2020 *Opt. Express* **28** 10919

## Digital line scanning fluorescence microscopy based on digital micromirror device\*

Wang Mei-Chang Yu Bin<sup>†</sup> Zhang Wei Lin Dan-Ying Qu Jun-Le<sup>‡</sup>

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

( Received 14 June 2020; revised manuscript received 11 July 2020 )

### Abstract

Laser scanning confocal microscope (LSCM) is one of the most important tools for biological imaging due to its strong optical sectioning capability, high signal-to-noise ratio, and high resolution. On the basis of LSCM, line-scanning fluorescence microscopy (LSFM) uses linear scanning instead of point scanning to improve the speed of image acquisition. It has the advantages of simple system structure, fast imaging speed, and weak phototoxicity, and in addition, it is more suitable for high-resolution and fast imaging of living thick samples. It is of great significance for studying the life science, biomedicine, and others. However, the current LSFM technology still faces many urgent problems in terms of system flexibility, imaging speed, resolution and optical sectioning capabilities. Therefore, based on the existing multifocal structured illumination microscopy (MSIM) in our laboratory, a digital line-scanning fluorescence microscopy (DLSFM) based on digital micromirror device(DMD) is presented in this paper. In the illumination path, a high-speed spatial light modulator DMD is adopted to realize multi-line parallel scanning excitation, which simplifies the optical system and improves the flexibility and scanning speed of the system. A DLSFM image reconstruction algorithm based on the standard deviation of fluorescence signal is proposed, which is combined with three-dimensional (3D) Landweber deconvolution algorithm to achieve 3D high-resolution optical slice image reconstruction. On this basis, the imaging experiments on fluorescent beads and standard samples of mouse kidney section are carried out by using DLSFM. The experimental results show that the resolution of DLSFM in the  $x$ ,  $y$  and  $z$  directions is 1.33 times, 1.42 times and 1.19 times that of wide field microscope, respectively, and the fast 3D high-resolution optical sectioning imaging of biological samples is realized, which lays a technical foundation for further developing the rapid high-resolution imaging of the whole cells and tissues in vivo.

**Keywords:** line-scanning microscopy, digital micromirror device, fluorescence microscopy

**PACS:** 87.64.M-, 87.64.kv, 42.30.-d, 87.85.Pq

**DOI:** 10.7498/aps.69.20200908

\* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 61975131, 61775144, 61525503, 61620106016, 61835009), the Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (Grant No. 2018A030313362), the Key Project of Department of Education of Guangdong Province, China (Grant No. 2016KCXTD007), and the Shenzhen Basic Research Project, China (Grant Nos. JCYJ20170818141701667, JCYJ20170818144012025, JCYJ20170412105003520).

<sup>†</sup> Corresponding author. E-mail: [yubin@szu.edu.cn](mailto:yubin@szu.edu.cn)

<sup>‡</sup> Corresponding author. E-mail: [jlqu@szu.edu.cn](mailto:jlqu@szu.edu.cn)