



基于高速相位型空间光调制器的双光子多焦点结构光显微技术

喻欢欢 张晨爽 林丹樱 于斌 屈军乐

Two-photon multifocal structured light microscopy based on high-speed phase-type spatial light modulator

Yu Huan-Huan Zhang Chen-Shuang Lin Dan-Ying Yu Bin Qu Jun-Le

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 70, 098701 (2021) DOI: 10.7498/aps.70.20201797

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.70.20201797>

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

基于空间光调制器的非相干数字全息单次曝光研究

Single-shot incoherent digital holography based on spatial light modulator

物理学报. 2018, 67(6): 064202 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20172127>

结构光照明显微中的偏振控制

Polarization control methods in structured illumination microscopy

物理学报. 2017, 66(14): 148704 <https://doi.org/10.7498/aps.66.148704>

基于混合光模式阵列的自由空间编码通信

Free-space optical communication based on hybrid optical mode array encoding

物理学报. 2017, 66(14): 144102 <https://doi.org/10.7498/aps.66.144102>

表面等离激元结构光照明显微成像技术研究进展

Research progress of plasmonic structure illumination microscopy

物理学报. 2017, 66(14): 148701 <https://doi.org/10.7498/aps.66.148701>

菲涅耳非相干数字全息大视场研究

Fresnel incoherent digital holography with large field-of-view

物理学报. 2019, 68(10): 104204 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20182216>

基于石墨烯的宽带全光空间调制器

Graphene-based broadband all-optical spatial modulator

物理学报. 2018, 67(21): 214201 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180307>

基于高速相位型空间光调制器的双光子 多焦点结构光显微技术*

喻欢欢 张晨爽 林丹樱 于斌[†] 屈军乐

(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10月29日收到; 2020年11月24日收到修改稿)

多焦点结构光照明显微镜 (multifocal structured illumination microscopy, MSIM) 能在 50 μm 的成像深度内实现 2 倍于衍射极限分辨率的提升, 但在对厚样品成像时, 散射光和离焦光限制了其层析能力和图像衬度. 双光子多焦点结构光照明显微镜 (two-photon MSIM, 2P-MSIM) 克服了样品组织散射的影响, 进一步提高了 MSIM 的成像深度和成像特性. 然而, 现有的 2P-MSIM 通常采用振镜扫描成像, 系统复杂, 灵活性差. 为了解决上述问题, 本文提出了一种基于高速相位型空间光调制器 (spatial light modulator, SLM) 的双光子多焦点结构光照明超分辨显微成像系统, 通过在 SLM 上同时加载生成多焦点阵列的相位图和线性相位光栅的相位图, 实现了多焦点阵列的产生和在样品面上的高精度的并行数字随机寻址扫描和激发成像, 结合像素重定位和反卷积技术实现了三维双光子多焦点结构光超分辨成像, 解决了扫描振镜在 2P-MSIM 成像中的机械惯性问题, 同时降低了系统的复杂性, 提升了灵活性. 在此基础上, 利用搭建的 2P-MSIM 开展了小鼠肾组织切片和铃兰根茎双光子超分辨成像实验, 验证了该方法的三维超分辨成像能力, 对于 2P-MSIM 的发展具有重要的意义.

关键词: 多焦点结构光照明显微技术, 双光子, 荧光显微镜, 空间光调制器

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

DOI: 10.7498/aps.70.20201797

1 引言

近年来, 多种突破光学衍射极限限制的超分辨显微技术蓬勃发展, 如: 受激发射损耗 (stimulated emission depletion, STED) 显微技术^[1]、光激活定位显微技术^[2]、随机光学重构显微成像技术 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)^[3] 及结构光照明显微成像技术 (structured illumination microscopy, SIM)^[4] 等, 已达到了纳米量级的空间分辨率, 实现了对细胞内精细结构的观察, 极大地推动了生命科学等诸多领域的发展. 尽管 STED 显微技术能对较厚的生物组织进行高分辨

率成像, 但需要特定荧光标记的样品及高能量的损耗光, 后者一定程度地造成了光漂白和光损伤, 限制了该技术的进一步应用. STORM 虽能提供更高分辨率成像, 但其不仅仅受到荧光染料种类的限制, 宽场的激发方式和稀疏化的发光模式进一步限制了其成像深度和成像速度. 与此同时, SIM 虽然仅仅能提供 2 倍的分辨率提升, 但由于其具有成像时不受荧光染料限制, 不需要高的激发光功率, 以及快的成像速度等优势, 在活细胞成像方面获得广泛的应用. 令人遗憾的是, 传统的宽场结构光照明显微成像技术仅仅能实现对比较薄的样品 ($< 10 \mu\text{m}$) 超分辨成像, 限制了其发展. 图像扫描显微镜 (image scanning microscopy, ISM)^[5] 被认

* 国家自然科学基金 (批准号: 61975131, 61775144, 61835009)、广东省自然科学基金 (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, JCYJ20180305125649693) 资助的课题.

[†] 通信作者. E-mail: yubin@szu.edu.cn

为是一种点扫描照明显微成像技术, 这种超分辨技术的出现大大提高了结构光照明显微成像技术的成像深度. 然而, 单个聚焦点的扫描方式限制了 ISM 的成像速度, 于是多焦点结构光照明显微镜 (multifocal structured illumination microscopy, MSIM)^[6] 被提出, 采用多点并行扫描的方式, 大大提高了单点扫描结构光照明显微镜的成像速度.

MSIM 不仅能够实现 2 倍于宽场显微镜的成像分辨率, 还具有传统共聚焦显微技术的层析能力, 成像深度可以达到 50 μm . 但是, 在对厚样品成像时, 样品中的散射和离焦背景光降低了 MSIM 的成像特性. 双光子显微镜由于成像深度大并具有较强的层析能力在生物成像领域获得了广泛应用. 发展基于双光子技术的 MSIM, 即双光子多焦点结构光照明显微镜 (two-photon MSIM, 2P-MSIM), 进一步提升 MSIM 的成像性能, 将进一步推进其在活体厚样品超分辨成像中广泛应用. MSIM 采用数字微镜器件 (digital micromirror device, DMD) 实现点阵的产生和扫描, 但是 DMD 因其较低的能量利用率而难以实现 2P-MSIM. 为了能够获得高效的多焦点双光子激发, 各种不同类型的光学器件被应用在多光子多焦点显微成像技术中, 包括光分束器^[7]、微透镜阵列^[8-10]、衍射光学元件^[11,12]及空间光调制器 (spatial light modulator, SLM)^[13-15]等. 目前, 在 2P-MSIM^[10] 中, 主要采用微透镜阵列与扫描振镜相结合的方式实现双光子点阵的激发和扫描, 但其双光子激发点阵是固定的, 灵活性差. 而基于 SLM 的多焦点产生技术在点阵的均匀性、效率及随机性方面都具有较大的优势. 利用 SLM 生成点阵的算法主要有基于相位恢复 (Gerchberg-Saxton, GS) 算法^[16]、广义自适应加法算法^[17]、直接搜寻算法^[18]、以及加权相位恢复 (weighted GS, WGS) 算法^[19,20]等. 在这些算法中, WGS 算法生成的点阵具有更好的均匀性和效率. 直到目前, 几乎所有的多焦点多光子结构光照明显微成像系统都需要振镜来实现扫描成像, 系统具有较大的复杂性且受机械惯性的影响, 灵活性差. 为了解决上述问题, 本文提出并搭建了一种基于高速相位型 SLM 的 2P-MSIM, 仅通过在 SLM 上加载生成点阵和线性相位光栅的合成相位图, 就同时实现了点阵产生和在样品面上高精度并行数字随机寻址扫描激发, 结合像素重定位和反卷积技术实现了三维双光子多焦点结构光超分辨成像. 利用搭建的系统

完成了对小鼠肾切片、铃兰根茎及荧光珠的双光子超分辨成像, 具有较好的成像效果, 验证了该方法的三维超分辨成像能力.

2 2P-MSIM 原理与方法

2.1 2P-MSIM 成像理论

2P-MSIM 被认为是一种并行的 2P-ISM, 其实现超分辨的原理与 2P-ISM 一致. 在 ISM^[5] 中, 一个面阵探测器替换了激光共聚焦扫描显微镜中的点探测器. 探测器探测到的图像不仅仅与激发点的位置有关, 同时也与探测器上的像素点的位置有关, 因此, 在不考虑系统放大倍率的情况下, 在样品面扫描位置 \mathbf{r} 处, 探测器 \mathbf{s} 位置处的双光子荧光光强分布可以表示为^[5,21]

$$I(\mathbf{r}, \mathbf{s}) = \int U(\mathbf{r} - \mathbf{r}' + \mathbf{s}) E^2(\mathbf{r} - \mathbf{r}') c(\mathbf{r}') d\mathbf{r}', \quad (1)$$

其中, $c(\mathbf{r}')$ 表示荧光分子分布, $E(\mathbf{r}')$ 表示在扫描位置为 \mathbf{r} 的系统激发点扩散函数, $U(\mathbf{r} + \mathbf{s})$ 表示探测位置为 $\mathbf{r} + \mathbf{s}$ 的系统探测点扩散函数. 那么, 在双光子激发下, 系统有效的点扩散函数可表示为 $E_0(\mathbf{r})U(\mathbf{r} + \mathbf{s})$, 其中 $E_0(\mathbf{r}) = E^2(\mathbf{r})$, 表示在扫描位置为 \mathbf{r} 的双光子激发点扩散函数. 假设双光子激发点扩散函数和系统探测点扩散函数采用高斯分布模型, 且标准差分别为 σ_{in} 和 σ_{det} , 那么双光子激发下, 系统有效的点扩散函数可重新表示为^[22]

$$U_{\text{eff}} \propto G\left(r - \frac{\sigma_{\text{in}}^2}{\sigma_{\text{in}}^2 + \sigma_{\text{det}}^2} r', \frac{\sigma_{\text{in}}\sigma_{\text{det}}}{\sqrt{\sigma_{\text{in}}^2 + \sigma_{\text{det}}^2}}\right), \quad (2)$$

其中, G 表示高斯函数, U_{eff} 表示有效的点扩散函数.

在 2P-ISM 中, 双光子激发点扩散函数为系统激发点扩散函数的平方, 则双光子激发点扩散函数的标准差为 $\sigma_{2\text{P-in}} = \sigma_{\text{ex}}/\sqrt{2}$, 其中 σ_{ex} 为单光子激发下, 系统激发点扩散函数的标准差. 在双光子激发过程中, 分子吸收两个光子经过斯托克斯位移后自发辐射出单个光子, 则双光子激发波长 λ_{ex} 与探测波长 λ_{det} 的比值 $1 < k < 2$, 其中 $k = \lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{det}}$. 所以系统激发点扩散函数和系统探测点扩散的标准差之间的关系变为 $\sigma_{\text{ex}} = k\sigma_{\text{det}}$, 因此, 双光子激发点扩散函数的标准差与系统探测点扩散函数标准差之间关系为 $\sigma_{2\text{P-in}} = k\sigma_{\text{det}}/\sqrt{2}$.

假设不考虑双光子激发时荧光染料的吸收截面, 再结合 (2) 式, 则 2P-ISM 的有效点扩散函数

$U_{2P\text{-eff}}$ 可以描述为

$$U_{2P\text{-eff}} \propto G\left(\mathbf{r} - \frac{k^2}{k^2+2}\mathbf{s}, \frac{k\sigma_{\text{det}}}{\sqrt{k^2+2}}\right). \quad (3)$$

因此, 有效的双光子图像可以通过 $I\left(\mathbf{r} - \frac{k^2}{k^2+2}\mathbf{s}, \mathbf{s}\right)$ 对 \mathbf{s} 的积分来重构:

$$\begin{aligned} I_{2P\text{-eff}}(\mathbf{r}) &= \int I\left(\mathbf{r} - \frac{k^2}{k^2+2}\mathbf{s}\right) d\mathbf{s} \\ &= \int U_{2P\text{-eff}}(\mathbf{r} - \mathbf{r}') c(\mathbf{r}') d\mathbf{r}'. \end{aligned} \quad (4)$$

再结合 (1) 式, 2P-MSIM 有效图像可重新表示为

$$\begin{aligned} U_{2P\text{-eff}}(\mathbf{u}) \\ \propto \int U\left(\frac{k^2+2}{k^2}\mathbf{v}\right) E\left(\frac{k^2+2}{k^2}\mathbf{u} - \frac{k^2+2}{k^2}\mathbf{v}\right) d\mathbf{v}. \end{aligned} \quad (5)$$

如果从频率域来考虑, 那么两边同时进行傅里叶变换将得到:

$$\tilde{U}_{\text{eff}}(\mathbf{K}) \propto \tilde{U}\left(\frac{k^2}{k^2+2}\mathbf{K}\right) \tilde{E}\left(\frac{k^2}{k^2+2}\mathbf{K}\right). \quad (6)$$

从 (6) 式可以看出, 有效图像包含的频谱范围是宽场照明得到 $(k^2+2)/k^2$, 所以, 通过像素重定位 (pixel reassignment) 和反卷积 (deconvolution) 处理, 理论上 2P-MSIM 相比于宽场显微镜能实现 $(k^2+2)/k^2$ 倍分辨率的提升.

2.2 系统光路设计

2P-MSIM 是基于尼康显微镜实现的 (Nikon ECLIPSE Ti-U). 一台波长为 1036 nm、功率为 1 W、脉宽为 145 fs 的激光从光纤激光器发出 (安扬, FemotoYL-6), 首先通过一个可用来调节激光出射功率的半波片 (Thorlabs, AHWP05M-980) 和偏振分光棱镜对; 从偏振分光棱镜出射的 P 偏振光再次经过半波片 (Thorlabs, AQWP10M-980), 用来调整飞秒光在通过 SLM 之前的偏振方向. 然后, 光束被一对包含焦距为 25 mm (Thorlabs, AC127-025-B-ML) 以及焦距为 80 mm (Thorlabs, AC254-080-B-ML) 的透镜对扩束; 经扩束后的光束通过一个可调光阑照射在一个高速相位型 SLM (Meadowlark Optics, 像元数为 1920×1152 , 像素尺寸为 $9.2 \mu\text{m} \times 9.2 \mu\text{m}$) 上; 通过在 SLM 上加载生成点阵和线性相位光栅的合成相位图, 能够实现多个聚焦点阵列在其傅里叶面上的扫描移动;

经 SLM 调制的激发光经过一个焦距为 300 mm 的透镜 (Thorlabs, AC508-300-B) 后照射在显微镜的管镜上; 为了满足 SLM 采光面大小与物镜后孔径面大小尽可能匹配, 将原来的管镜替换成焦距为 300 mm, 尺寸为 2 英寸的透镜 (Thorlabs, A508-300-AB-ML), 与前一个透镜构成一个无扩束的 4f 系统; 为了只让 SLM 的一级光通过系统, 在 4f 系统两个透镜间放置一个可调光阑用来滤除 SLM 的其他衍射级的光; 光束经过管镜后又经过水浸物镜 (Nikon, 60 \times , NA 为 1.27) 在样品面上形成多个聚焦点; 样品被激发后产生的荧光信号经二向色镜与发射片后由 sCMOS 相机 (滨松, ORCA-Flash4.0 v3) 接收. 整个光路的示意图如图 1 所示.

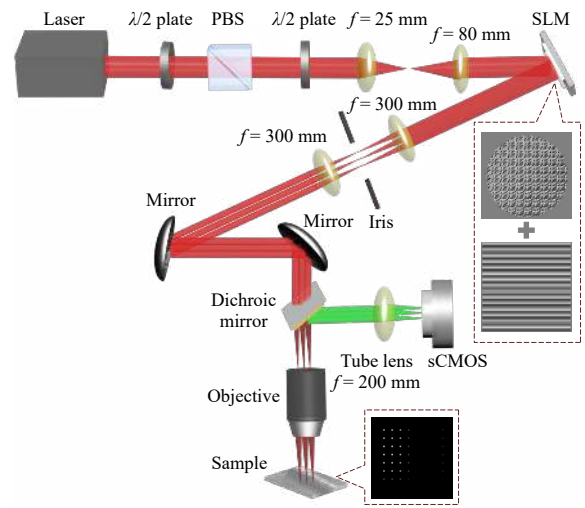


图 1 2P-MSIM 系统光路示意图
Fig. 1. Schematic diagram of 2P-MSIM system.

2.3 点阵产生和扫描相位图设计

2.3.1 点阵相位图设计原理

整个相位图的设计分成 3 步: 1) 点阵相位图的设计; 2) 用于点阵扫描的线性相位光栅的设计; 3) 将两个相位图进行叠加生成最终的复合相位图.

点阵相位图的生成方法采用的是一种改进的 WGS 算法^[20], 即当 WGS 算法迭代几次后, 一直保持频谱面的相位不变, 用作下一次的迭代, 直至算法收敛. 利用这种方式大大减少了迭代次数, 加快了收敛速度. 在传统的 WGS 算法中, 初值相位可以设置成分布范围为 $-\pi$ — π 的随机矩阵, 当算法执行第 i 次迭代时, 傅里叶平面的振幅和相位可以根据输入平面的振幅 $\sqrt{I(x)}$ 和相位 $\Phi_i(x)$ 经过二维

傅里叶变换得到. 保持傅里叶面的相位 $\Psi_i(u)$ 不变, 振幅 $B_i(u)$ 用目标振幅 $\Gamma(u)$ 乘以一个不均匀性矫正的加权系数 $g_i(u)$ 来替换. $g_i(u)$ 可以表达为

$$g_i(u) = \left[\sum_m \frac{\langle B_i(u) \rangle_M}{B_i(u_m)} \delta(u - u_m) \right] g_{i-1}(u), \quad (7)$$

其中, $\langle B_i(u) \rangle_M$ 表示计算得到的 M 个点的振幅平均值, $\delta(u)$ 表示的是狄拉克函数, $g_0(u)$ 设置为 1.

然后, 用替换后的振幅和计算得到的相位进行二维逆傅里叶变换就得到输入平面的振幅 $A_{i+1}(x)$ 和相位 $\Phi_{i+1}(x)$, 通过这种方式不断迭代下去, 最后就能得到均匀性好的点阵的输入相位. 但是当用传统的 WGS 算法生成点阵时, 我们发现在迭代过程中用 $\sqrt{I(x)}$ 替换 $A_{i+1}(x)$ 使 $g_i(u)$ 在矫正均匀性时很难有较大的改善, 往往需要较长的时间才能实现较好的矫正效果. 主要原因是对于输入平面的傅里叶变换, 振幅的替换引入了一个相位改变量 $\delta\Psi_i(u)$, 这个改变量要比加权系数改变量 $\delta g_i(u)$ 大得多, 所以导致了 $g_i(u)$ 在矫正不均匀性方面很难有比较好的效果. 值得注意的是, 通过对后续的 $i+1$ 次迭代的相位改变施加影响, 能有效地移除相位改变量 $\delta\Psi_i(u)$. 具体做法是在 WGS 算法执行 N 次迭代达到目标调制效率后, 保持后续迭代中傅里叶平面的相位不变, 即 $\Psi_i(u) = \Psi_N(u)$. 利用这种方法, 算法可以在很少的迭代次数就完成了收敛, 且最终生成了一个均匀性好、效率高的多焦点阵列. 算法的执行过程可以通过图 2(a) 来表示, 图 2(b) 和图 2(c) 分别表示利用该算法得到的相位图和点阵图.

2.3.2 线性相位光栅的设计

线性相位光栅的相位表达式可以表示为

$$\varphi_i(r) = 2\pi kr, \quad (8)$$

其中, k 表示光栅的频率, r 表示 SLM 面的坐标.

相应地, 复振幅表达式可以写成 $\exp(i2\pi kr)$, 从频率空间来考虑, 其傅里叶变换为 $\delta(u - k)$. 考虑到光学的傅里叶变换和数学上傅里叶变换的坐标变换关系, 相位光栅对应的傅里叶面的复振幅分布为 $\delta\left(\frac{u}{f\lambda} - k\right)$, 其中 f 表示透镜的焦距, λ 表示激光器的波长. 再令 $k = \frac{\rho}{f\lambda}$, 则该复振幅表达式变为 $\delta\left(\frac{u - \rho}{f\lambda}\right)$. 假设生成的点阵对应的复振幅为 $B_i(u)\Psi_i(u)$ 且激光器的波长带宽很窄, 考虑到空域内的复振幅的乘积对应频域内的复振幅的卷积, 则相应的叠加相位图对应傅里叶面的复振幅分布为 $B_i\left(\frac{u - \rho}{f\lambda}\right)\Psi_i\left(\frac{u - \rho}{f\lambda}\right)$. 从这个表达式上看, 点阵的位置被移动了 ρ .

由于 SLM 本身是由一个个的像素单元构成的, 在 SLM 面上的相位光栅的相位值被离散化, 所以实际的线性相位光栅不可能实现点阵的连续移动. 根据文献 [23], 相位光栅能实现的扫描精度为 δ_f/k_{\max} , 这里 $\delta_f = f\lambda/D$, D 表示物镜的通光孔径; k_{\max} 表示相位光栅产生位移在 $j\delta_f - \delta_f$ 的最大可实现个数, k_{\max} 可以表示为

$$k_{\max} \propto (\pi N) \times (g/2\pi) = Ng/2, \quad (9)$$

其中, N 为产生的相位光栅在 SLM 上所占据的像素个数, g 为是 SLM 的灰度级. 综合以上的分析, 利用线性相位光栅可实现亚纳米级的扫描步长.

根据以上的相位图的设计理论, 利用 MATLAB 软件分别生成点阵的相位图和线性相位光栅的相位图, 最后通过相位叠加的方式生成最后的相位图.

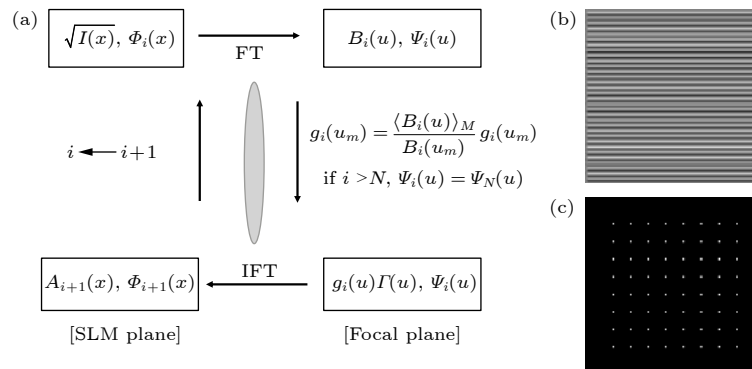


图 2 (a) WGS 算法流程图; (b) 得到的相位图; (c) 生成的点阵图

Fig. 2. (a) Flow chart of WGS algorithm; (b) generated phase map; (c) generated multi-focus array.

2.4 2 P-MSIM 数据获取与分析

为了实现同步扫描同步记录的目的, 用 LABVIEW 软件分别控制纳米位移台 (Pi, E-709)、相机和空间光调制器. 实验中, 纳米位移台每上升一步, 就用 SLM 和相机完成一层的成像. SLM 每加载一张图片, 相机同时曝光记录一次, 直至成像完成整个二维平面. 根据每一层的图像信息能够完成对荧光样品的三维重构.

与单光子的 MSIM 的数据处理方法^[6]相类似, 2P-MSIM 超分辨图像也可以通过像素重定位技术, 即: 多焦激发 (multifocal-exciting)、数字高斯针孔 (pinholing) 滤波、图像缩放 (scaling)、求和 (summing) 4 个图像处理步骤来重建超分辨图像 (multifocal-exciting pinholing scaling summing, MPSS), 再经过 Richardson-Lucy (RL) 反卷积来进一步提升图像的分辨率, 获得 2 倍分辨率提升的 2P-MSIM 图像. 考虑到激发点大小的改变和波长的差异, 实际的处理过程需要对实验室已有程序^[24]略微加以改进, 即可获得近似 2 倍分辨率提升的双光子超分辨图像.

3 结果与讨论

3.1 荧光珠成像

为了测试系统的空间分辨率, 首先对尺寸 100 nm, 中心发射波长为 580 nm 的荧光珠进行成像, 由于所选荧光珠尺寸小于该成像系统的理论分辨率, 所以实验分析时未考虑荧光珠直径对测量的半高全宽的影响. 对得到的 2P-MSIM 原始数据进行重构, 分别获得了点阵激发图通过添加高斯数字针孔再叠加 (pinholed+summed) 的初步降噪的宽场图像 (pinholed widefield, Pinholed WF)、像素重定位的 MPSS 图像及 MSIM 图像, 结果如图 3 所示. 图 3(a)—(c) 分别表示荧光珠在经过这 3 个过程后得到的图像, 大的虚线框内的荧光珠为小的虚线框内的荧光珠的放大, 可以明显观察到在 PinholedWF 图像中原本分不开的荧光珠图像在 MPSS 和 MSIM 图像中能明显地分开. 图 3(d) 为图 3(a)—(c) 中黄色实线所在像素的值的大小与对应的像素所占的宽度作的曲线拟合, 每条曲线都经过了归一化处理. 为了能标定系统的分辨率,

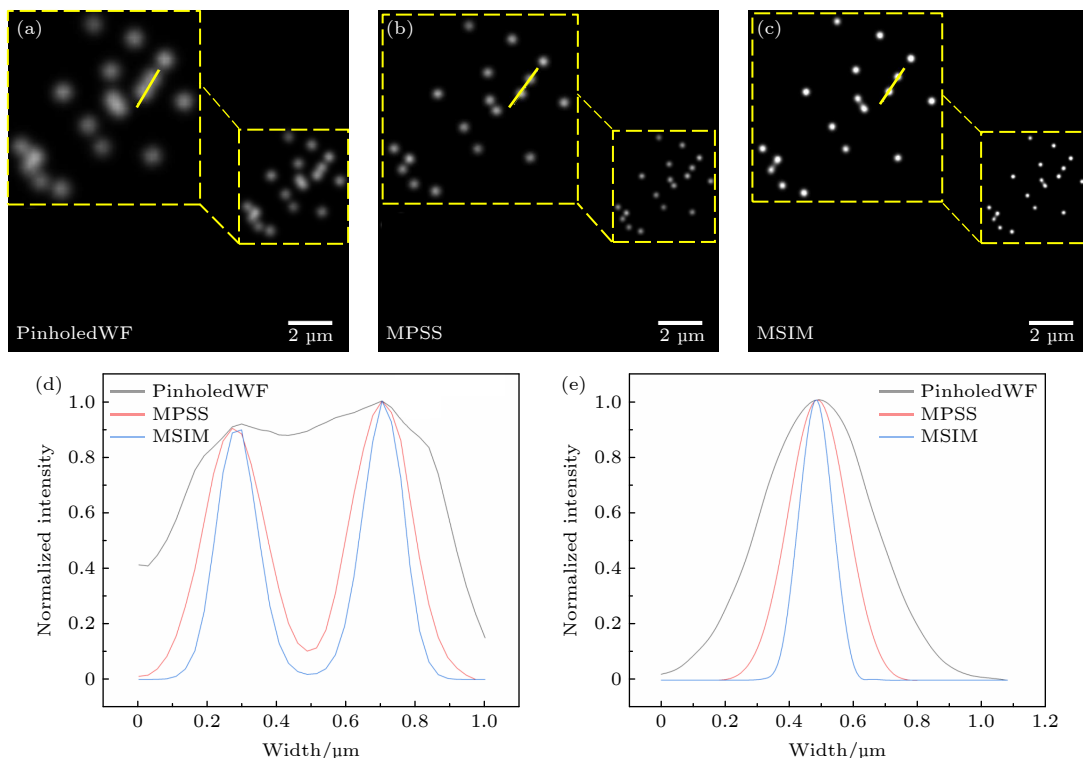


图 3 100 nm 荧光珠成像 (a) PinholedWF 图像; (b) MPSS 图像; (c) MSIM 图像; (d) 图 (a)—(c) 中黄色实线所在像素值的大小与对应像素所占宽度的拟合曲线; (e) 单个荧光珠的高斯拟合曲线

Fig. 3. 100 nm fluorescent bead imaging: (a) PinholedWF image; (b) MPSS image; (c) MSIM image; (d) fitting curves of the size of the pixel value of the yellow solid lines in panel (a) – (c) vs. the width of corresponding pixel; (e) Gaussian fitting curves of a single fluorescent bead.

也对视场范围内 10 颗荧光珠的图像进行高斯曲线拟合, 并进行统计平均, 得到了系统的平均分辨率, 如图 3(e) 所示. 经过对单个荧光珠的 Pinholed-WF, MPSS 和 MSIM 图像拟合, 得到荧光珠的半高全宽值分别是 (360 ± 15) nm, (207 ± 15) nm 和 (148 ± 13) nm, 与系统的宽场分辨率相比基本实现了近似 2 倍的分辨率提升.

3.2 小鼠肾切片三维成像

2P-MSIM 相比于 1P-MSIM 在成像深度方面有明显的提升, 具有良好的三维层析成像能力. 为了测试 2P-MSIM 的三维成像能力, 对商用的小鼠肾切片进行成像. 为了尽可能提高成像速度, 同时保证超分辨成像质量, 避免图像出现伪影及点阵信号之间的串扰. 设置点阵间隔为 3250 nm, 点阵数

量为 8×8 , 横向的扫描步长为 130 nm, 整幅图像的成像时间是 6.25 s, 成像区域大小为 $26.1 \mu\text{m} \times 26.1 \mu\text{m}$. 通过控制纳米位移台, 实现了同一个小鼠肾切片的不同厚度的成像, 分别是 0, 5, 10 μm , 如图 4 所示. 可以明显地观察到小鼠肾切片在不同深度结构的改变, 同时 MSIM 处理后的图像分辨率具有显著的提高.

为了能更直观地观察生物样品的三维结构, 进一步扫描了小鼠肾切片的一个三维成像区域, 横向的扫描参数设置保持不变, 轴向的扫描步长设置为 200 nm, 扫描层数为 30 层, 这样总的成像深度为 6 μm . 对每层进行超分辨处理后的数据通过 Imaris 软件进行三维堆栈. 如图 5 所示, 重构出的三维超分辨小鼠肾切片图像实现了近似 2 倍的分辨率提升.

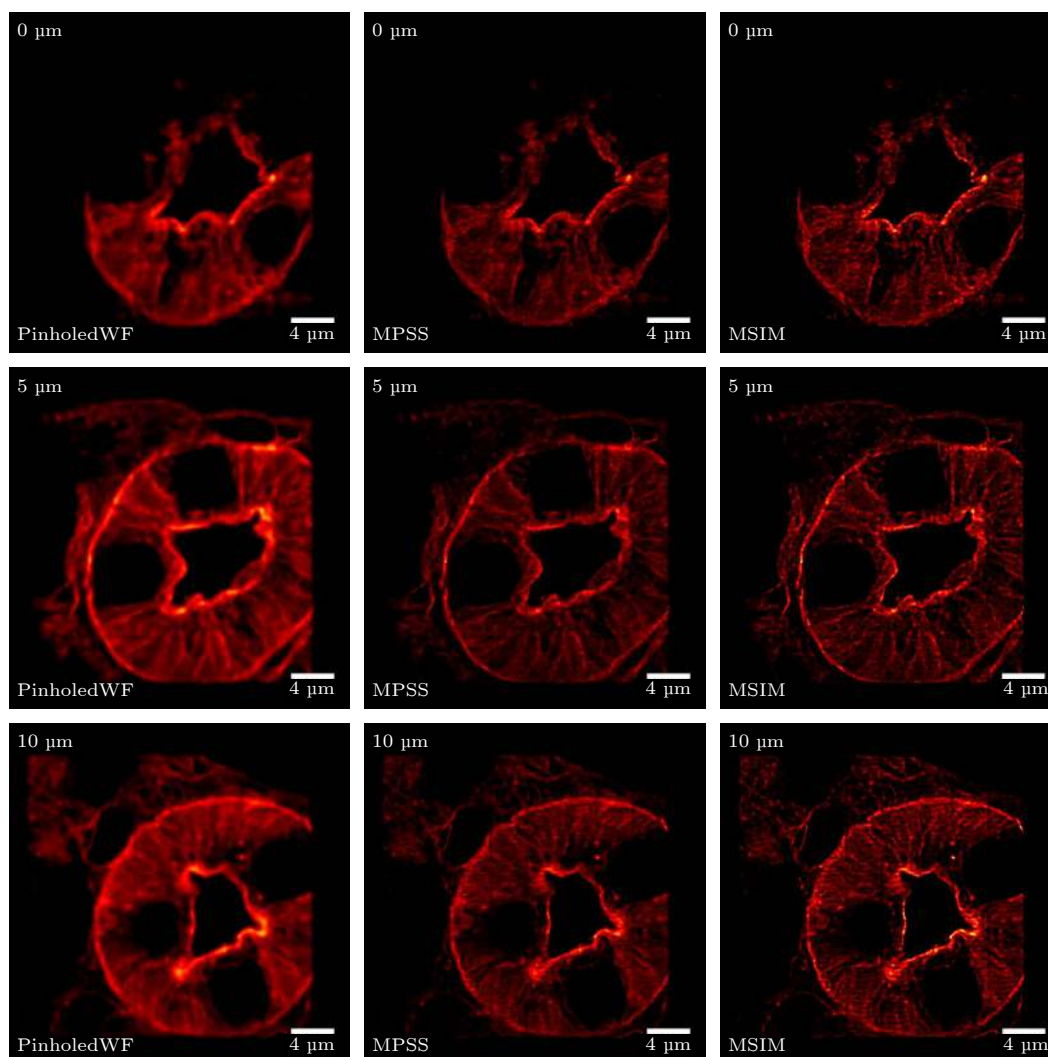


图 4 小鼠肾切片的不同厚度层成像图

Fig. 4. Images of different thickness layers of mouse kidney section.

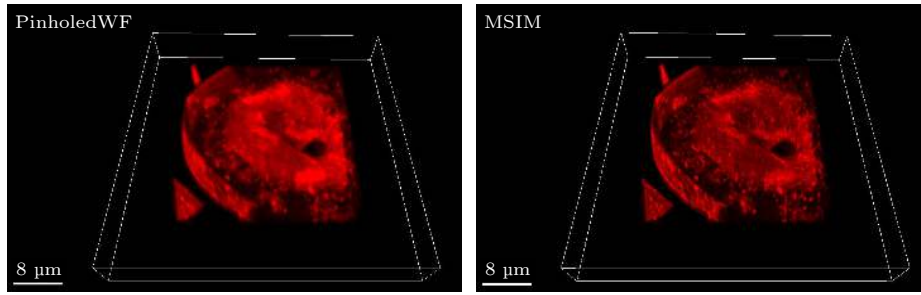


图 5 小鼠肾切片三维成像图 (a) PinholedWF 图像; (b) MSIM 图像

Fig. 5. Three-dimensional image of mouse kidney section: (a) PinholedWF image; (b) MSIM image.

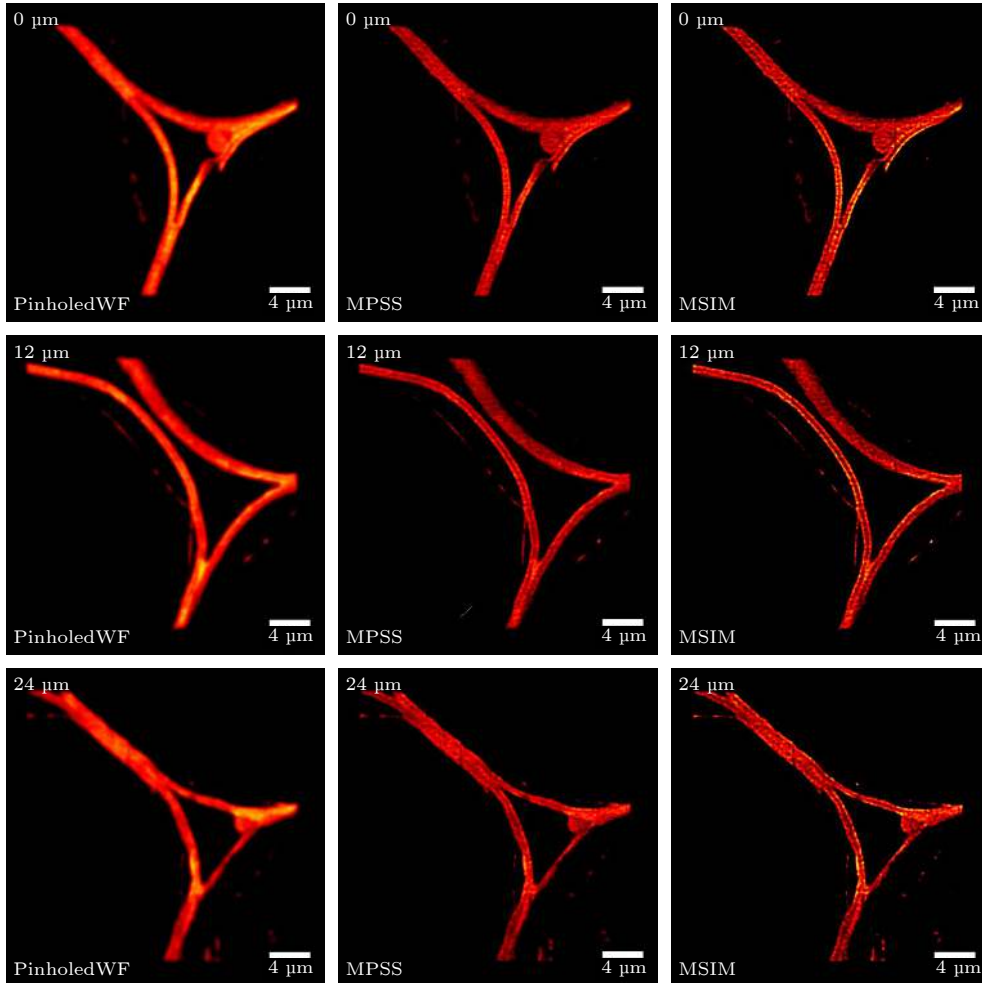


图 6 铃兰根茎不同厚度层成像图

Fig. 6. Images of different thickness layers of lily of the valley rhizome.

3.3 铃兰根茎成像

为了进一步测试 2P-MISM 的成像能力和分辨率, 对铃兰根茎进行了成像. 和前文描述的方法一样, 对铃兰根茎的不同深度的区域完成了成像, 成像深度分别是 0, 12, 24 μm , 如图 6 所示. 可以看出原本无法观测到的铃兰根茎内部结构变化在超分辨处理后能较清晰地观测到, 进一步验证了所搭建 2P-MSIM 的成像能力.

4 结 论

本文提出和搭建了一套新的双光子多焦点结构光超分辨显微成像系统. 利用了一个高速相位型空间光调制器同时完成了多焦点阵列的生成及点阵在样品面上的高精度扫描移动, 实现了双光子多焦点成像的目的, 解决了扫描振镜在多焦点成像中的机械惯性问题, 同时降低了系统的复杂性, 提高

了灵活性. 另外, 为了进一步提高双光子多焦点成像的分辨率, 把点扫描结构光成像和双光子成像结合在一起, 实现了双光子多焦点结构光照明的超分辨成像, 将双光子多焦点的成像分辨率提高了近2倍. 最后, 利用该系统完成了小鼠肾切片和铃兰根茎的三维超分辨成像, 证实了该系统具有优异的成像特性, 为进一步开展活体细胞及组织的超分辨成像打下了基础.

参考文献

- [1] Hell S W, Wichmann J 1994 *Opt. Lett.* **19** 780
- [2] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, Lindwasser O W, Olenych S, Bonifacino J S, Davidson M W, Lippincott-Schwartz J, Hess H F 2006 *Science* **313** 1642
- [3] Rust M J, Bates M, Zhuang X W 2006 *Nat. Methods* **3** 793
- [4] Gustafsson M G L 2000 *J. Microsc.* **198** 82
- [5] Muller C B, Enderlein J 2010 *Phys. Rev. Lett.* **104**
- [6] York A G, Parekh S H, Nogare D D, Fischer R S, Temprine K, Mione M, Chitnis A B, Combs C A, Shroff H 2012 *Nat. Methods* **9** 749
- [7] Nielsen T, Frick M, Hellweg D, Andresen P 2001 *J. Microsc.-Oxford* **201** 368
- [8] Bewersdorf J, Pick R, Hell S W 1998 *Opt. Lett.* **23** 655
- [9] Qu J L, Liu L X, Chen D N, Lin Z Y, Xu G X, Guo B P, Niu H B 2006 *Opt. Lett.* **31** 368
- [10] Ingaramo M, York A G, Wawrzusin P, Milberg O, Hong A, Weigert R, Shroff H, Patterson G H 2014 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111** 5254
- [11] Sacconi L, Froner E, Antolini R, Taghizadeh M R, Choudhury A, Pavone F S 2003 *Opt. Lett.* **28** 1918
- [12] Jureller J E, Kim H Y, Scherer N F 2006 *Opt. Express* **14** 3406
- [13] Shao Y, Qin W, Liu H, Qu J, Peng X, Niu H, Gao B Z 2012 *Appl. Phys. B* **107** 653
- [14] Matsumoto N, Okazaki S, Fukushi Y, Takamoto H, Inoue T, Terakawa S 2014 *Opt. Express* **22** 633
- [15] Matsumoto N, Konno A, Ohbayashi Y, Inoue T, Matsumoto A, Uchimura K, Kadomatsu K, Okazaki S 2017 *Opt. Express* **25** 7055
- [16] Sinclair G, Leach J, Jordan P, Gibson G, Yao E, Laczik Z J, Padgett M J, Courtial J 2004 *Opt. Express* **12** 1665
- [17] Curtis J E, Koss B A, Grier D G 2002 *Opt. Commun.* **207** 169
- [18] Meister M, Winfield R J 2002 *Opt. Commun.* **203** 39
- [19] Di Leonardo R, Ianni F, Ruocco G 2007 *Opt. Express* **15** 1913
- [20] Kim D, Keesling A, Omran A, Levine H, Bernien H, Greiner M, Lukin M D, Englund D R 2019 *Opt. Lett.* **44** 3178
- [21] Sheppard C J R, Gu M 1990 *Optik* **86** 104
- [22] Roeder C, Heintzmann R, Piestun R, Jesacher A 2016 *Opt. Express* **24** 15456
- [23] Schmitz C H J, Spatz J P, Curtis J E 2005 *Opt. Express* **13** 8678
- [24] Li S W, Wu J J, Li H, Lin D Y, Yu B, Qu J L 2018 *Opt. Express* **26** 23585

Two-photon multifocal structured light microscopy based on high-speed phase-type spatial light modulator*

Yu Huan-Huan Zhang Chen-Shuang Lin Dan-Ying Yu Bin[†] Qu Jun-Le

(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 29 October 2020; revised manuscript received 24 November 2020)

Abstract

Multifocal structured illumination microscopy (MSIM) can achieve a doubled improvement in the resolution of the diffraction limit within an imaging depth of 50 μm . But when imaging thick samples, scattered light and defocused light limit its optical sectioning capability and image contrast. Two-photon MSIM (2P-MSIM) overcomes the influence of sample tissue scattering and further improves the imaging depth and imaging characteristics. However, the existing 2P-MSIM usually adopts galvanometer based scanning mirrors for precisely scanning imaging, which is a complicated and poor flexibility system. Here we propose a simpler 2P-MSIM. Two-photon multifocal scanning imaging can be realized by a spatial light modulator (SLM) with a high frame rate (< 845 Hz). The phase map of generating multi-focus array and linear phase grating loaded on the SLM simultaneously, high-precision parallel digital random address scanning and excitation imaging on the sample surface can be realized. The mechanical inertia problem of the galvanometer scanner in multifocal imaging can be solved by the proposed method while reducing the complexity of the system and improving flexibility. We finally realize two-photon multifocal imaging of mouse kidney tissue slices and lily of the valley rhizome by this system, which verifies the three-dimensional super-resolution imaging capability of this method. It is of great significance in developing the 2P-MSIM.

Keywords: multifocal structured illumination microscopy, two-photon, fluorescence microscope, spatial light modulator

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

DOI: [10.7498/aps.70.20201797](https://doi.org/10.7498/aps.70.20201797)

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 61975131, 61775144, 61835009), the Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (Grant No. 2018A030313362), the Scientific and Technological Innovation (Key) Projects of Department of Education of Guangdong Province, China (Grant No. 2016KCXTD007), and the Shenzhen Basic Research Project, China (Grant Nos. JCYJ20170818141701667, JCYJ20170818144012025, JCYJ20170412105003520, JCYJ20180305125649693).

[†] Corresponding author. E-mail: yubin@szu.edu.cn