



基于动态散斑照明的宽场荧光显微技术理论研究

尹君 王少飞 张俊杰 谢佳湛 陈宏宇 贾源 胡徐锦 于凌尧

Theoretical study of wide-field fluorescence microscopy based on dynamic speckle illumination

Yin Jun Wang Shao-Fei Zhang Jun-Jie Xie Jia-Chen Chen Hong-Yu Jia Yuan Hu Xu-Jin Yu Ling-Yao

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 70, 238701 (2021) DOI: 10.7498/aps.70.20211022

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.70.20211022>

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

基于动态散斑照明的宽场荧光显微技术理论研究*

尹君¹⁾ 王少飞¹⁾ 张俊杰¹⁾ 谢佳谔¹⁾ 陈宏宇¹⁾
贾源¹⁾ 胡徐锦¹⁾ 于凌尧^{1)2)†}

1) (桂林电子科技大学电子工程与自动化学院, 光子学中心, 桂林 541004)

2) (桂林电子科技大学, 广西自动检测技术与仪器重点实验室, 桂林 541004)

(2021年5月30日收到; 2021年7月27日收到修改稿)

为获取生物组织和活体细胞内部精细结构, 要求显微成像技术具备层析成像能力. 基于动态散斑照明的宽场荧光显微技术利用动态变化的散斑图案全场照明待测样品, 通过提取焦平面内变化剧烈的荧光信号, 获得三维结构的荧光层析图像. 本文通过理论分析和模拟仿真, 研究了这一荧光显微技术获取荧光层析图像的过程. 模拟仿真了影响荧光层析图像成像质量的主要因素, CCD记录的原始荧光图像数量和散射体颗粒度与成像质量的关系. 模拟仿真结果表明, 荧光层析图像的成像质量随原始荧光图像数量的增加先提高后趋向饱和, 随散射体颗粒度的增大先增大后降低. 综合考虑成像质量和成像时间等因素, 当用于提取荧光层析图像的原始荧光图像的数量为60幅, 散射体颗粒度为1000左右时, 可获得图像对比度高于85%的高空间分辨率荧光层析图像. 理论分析和模拟仿真研究作为基于动态散斑照明的宽场荧光显微技术的系统结构设计、实现和优化提供了理论基础和指导.

关键词: 散斑, 荧光显微技术, 层析成像, 宽场照明

PACS: 87.64.M-, 42.30.Ms, 87.64.kv, 87.57.-s

DOI: 10.7498/aps.70.20211022

1 引言

近年来, 随着激光、荧光标记、微弱信号探测、图像处理 and 计算机等技术的飞速发展, 激光扫描共焦荧光显微技术 (laser scanning confocal fluorescence microscopy, LSCM) 已成为快速获取生物组织和活体细胞内部精细结构和功能信息的重要研究工具, 从根本上改变了观察、记录、解释和理解生命体生命活动过程的方式^[1-4]. LSCM 基于生物样品自体荧光或通过荧光标记提供高的化学特异性和成像对比度, 采用聚焦激光光束逐点扫描的方式激发待测样品中的荧光团产生荧光信号. 通过安装在光电探测器共轭位置处的共焦光阑有效消除离焦

荧光信号的影响, 从而实现具有高空间分辨率的三维层析成像^[5,6]. 然而, LSCM 系统采用逐点扫描的成像方式, 导致成像时间长, 激发效率低, 结构复杂, 造价昂贵. 此外, 光毒性、光损伤和光致漂白等也是其无法回避的问题^[7-9]. 因此, 开发一种能够在较长观察时间内快速获取生物样品, 具有高时空分辨率三维结构层析图像的显微成像方法一直是研究的热点.

基于动态变化的激光散斑宽场照明实现的动态散斑照明荧光显微技术 (dynamic speckle illumination fluorescence microscopy, DSIFM) 是一种在宽场照明条件下, 快速获取具有高时空分辨率的生物组织和活体细胞三维结构荧光层析图像的有效方法^[10-13]. 在使用 DSIFM 获取荧光层析图像的过程

* 国家自然科学基金地区科学基金 (批准号: 61965008) 和广西自动检测技术与仪器重点实验室基金 (批准号: YQ21109) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: lingyaoyu01@163.com

程中, 散斑颗粒度和重构层析图像所需采集的原始图像数量是影响图像质量和成像时间的关键因素. 本论文基于 DSIFM 的成像原理, 理论分析了基于动态变化的散斑宽场照明, 获取待测生物样品高空间分辨率荧光层析图像的过程. 在此基础上, 模拟仿真了在 DSIFM 技术中不同颗粒度和原始荧光图像数量两个主要的技术参数, 对获取不同尺寸待测样品的荧光层析图像的成像质量, 包括图像对比度和空间分辨率的影响. 模拟仿真结果对于有效提高系统成像质量, 缩短成像时间具有重要的参考价值和指导意义.

2 理论基础

当激光光束通过具有一定颗粒度的散射体时, 由于散射体中散射颗粒的随机分布, 产生的散射光会在自由空间中相互干涉叠加, 形成强度随机分布的干涉图案, 即“散斑图案”. 在 DSIFM 系统中, 激光光束通过散射体后形成的散斑图案经光学系统在显微物镜后焦平面上形成清晰的像, 通过显微物镜在待测样品中形成宽场科勒照明. 照明散斑图案激发样品中的荧光团产生荧光信号, 经带通滤光片滤除激发光和杂散光等背景噪声, 由 CCD 相机探测接收. 这些荧光信号主要有两个来源, 包括产生自显微物镜焦平面上的荧光信号和产生自视场范围内焦平面以外的背景荧光. 理论上可以将 CCD 相机接收到的荧光信号表示为^[1]

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

式中, $C(\rho, z)$ 为样品中荧光团浓度, $I_s(\rho, z)$ 为照明散斑图案激发样品产生的荧光信号强度, PSF_{det} 为探测点扩展函数, ρ 为散斑场半径, ρ_d 为 CCD 相机的探测面半径.

通过改变激光光束通过散射体的位置, 即可在显微物镜视场范围内形成一系列光强分布随机变化的照明散斑图案. 随着照明散斑图案的不断变化, 在样品中焦平面上激发产生的荧光信号相比于焦平面以外的离焦荧光信号变化更为剧烈. 在样品中纵向位置 z_c 处, CCD 相机的每个像素接收到的荧光信号强度变化可以表示为^[4]

$$D(\rho_d) = \langle I_d(\rho_d)^2 \rangle - \langle I_d(\rho_d) \rangle^2, \quad (2)$$

式中, 角括号表示对相互独立的照明散斑图案激发

产生的荧光信号强度取平均值.

为求解 (2) 式表示的荧光信号强度变化量, 在此引入自相关函数定义为

$$R_{\text{det}}(\Delta\rho, z_c) = \int \text{PSF}_{\text{det}}(\rho_d - \rho, -z_c) \text{PSF}_{\text{det}}(\rho_d - \rho + \Delta\rho, -z_c) d^2\rho, \quad (3)$$

式中, $\Delta\rho = |\rho - \rho'|$. 则 CCD 探测器上接收的荧光信号的变化可以表示为

$$D(\rho_d) = \langle I_s \rangle^2 C^2 \int R_{\text{det}}(\Delta\rho, z_c) \text{PSF}_{\text{ill}}(\Delta\rho, 0) d^2\Delta\rho, \quad (4)$$

式中, PSF_{ill} 为照明点扩展函数. 均方根 (root mean square, RMS) 图像强度可以由 $\sqrt{D(\rho_d)}$ 得到, 其与样品中的荧光团浓度具有线性关系.

在实际应用中, 为了实现在动态变化的照明散斑图案全场照明的条件下, 消除离焦荧光信号的干扰, 获取具有高空间分辨的焦平面的荧光层析图像, 需要 CCD 相机采集对应于不同照明散斑图案激发产生的一系列原始荧光图像. 随后, 利用层析图像提取算法, 对原始荧光图像进行处理, 从而重构均方根图像 I_{RMS} , 实现层析成像. 经常采用的荧光层析图像提取算法如 (5) 式所示:

$$I_{\text{RMS}} = \left\{ \sum_{i=1}^N (I_i - I_{i-1})^2 / (2N) \right\}^{1/2}, \quad (5)$$

式中, N 为需采集的原始荧光图像数量; I_i 为在动态散斑照明条件下, CCD 相机记录的第 i 幅原始荧光图像强度. 因此, 照明散斑图案的强度分布, 即散射体的颗粒度 G , 和所需记录的原始荧光图像的数量 N 是影响荧光层析图像成像质量的重要因素.

3 模拟仿真结果分析

为深入研究散射体颗粒度 G 和需记录的原始荧光图像数量 N 对具有不同几何尺寸的待测样品的层析图像成像质量的影响, 模拟仿真过程中首先设计了半径分别为 R 和 $10R$ 的两个小球作为待测样品. 模拟生成的具有不同半径的小球样品的焦平面荧光图像和叠加了离焦信号的离焦荧光图像如图 1 所示.

当激光光束通过具有不同颗粒度的散射体时, 形成的一系列强度分布不同的照明散斑图案模拟结果如图 2 所示.

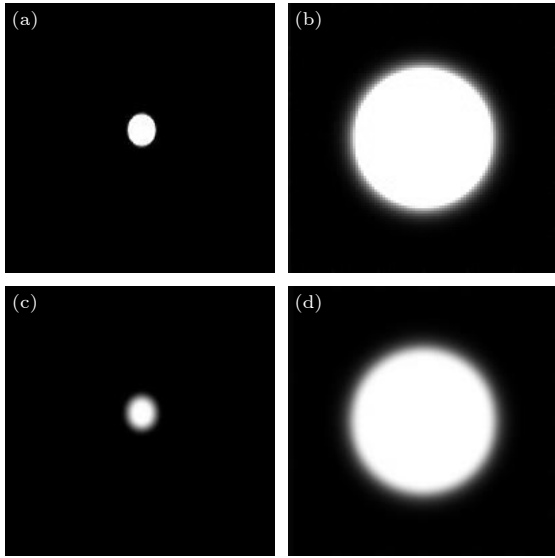


图 1 不同半径的两个小球样品的焦平面荧光图像 R (a), $10R$ (b) 和离焦荧光图像 R (c), $10R$ (d)

Fig. 1. Fluorescence images of focal (a), (b) and defocus (c), (d) planes of two small spherical samples with radii of R and $10R$ respectively.

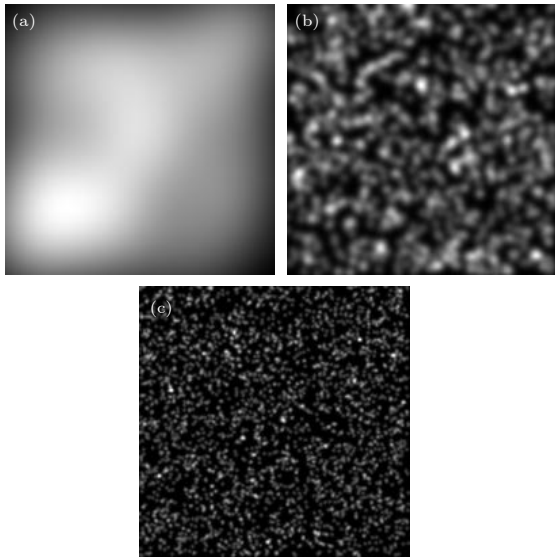


图 2 激光光束通过颗粒度分别为 100 (a), 1000 (b) 和 3000 (c) 的散射体形成的照明散斑图案

Fig. 2. Illumination speckle patterns are formed when a laser beam passes through diffusers with different granularity of 100 (a), 1000 (b) and 3000 (c), respectively.

将模拟仿真生成的不同散斑强度分布的 N 幅照明散斑图案与具有不同半径的小球样品的离焦图像叠加, 获得照明散斑图案激发小球样品的离焦荧光图像. 随后, 利用层析图像提取算法处理离焦荧光图像, 获得消除离焦背景噪声干扰的荧光层析图像. 利用上述基于动态散斑照明的宽场荧光显微成像技术实现荧光层析成像方法, 分析了当颗粒度

为固定值时, 对于不同半径的小球样品, 荧光层析图像的对比度和空间分辨率与原始荧光图像的数量之间的关系. 对于半径为 R 的小球样品, 当散射体颗粒度固定为 $G = 1000$ 时, 原始荧光图像的数量 N 分别为 20, 60 和 200 时, 层析图像的模拟仿真结果如图 3(a)—(c) 所示. 图 3(d)—(f) 分别为半径为 R 的小球样品的重构层析图像中心位置处荧光信号归一化强度曲线. 其中, 实线为焦平面上小球样品的荧光信号的归一化强度, 虚线为利用层析图像处理算法处理包含离焦信号的小球样品离焦荧光图像得到的层析图像的荧光信号归一化强度, 即图像对比度. 层析图像的荧光信号归一化强度平均值分别为 63.14%, 86.42% 和 86.21%, 先提高后趋于饱和. 用信号归一化强度曲线的半高全宽 (full width at half maximum, FWHM) 表示图像的空间分辨率. 由仿真结果可以看出, 重构得到的小球样品的荧光层析图像的空间分辨率与焦平面图像的基本一致.

对于半径为 $10R$ 的小球样品而言, 当颗粒度固定为 $G = 500$ 时, 原始荧光图像的数量 N 分别为 20, 60 和 200 时, 层析成像的模拟仿真结果如图 4(a)—(c) 所示. 图 4(d)—(f) 分别为半径为 $10R$ 的小球样品层析重构图像中心位置处信号归一化强度曲线. 其中, 实线为焦平面上小球样品的荧光信号的归一化强度, 虚线为利用层析图像处理算法处理包含离焦信号的小球样品离焦荧光图像得到的层析图像的荧光信号归一化强度. 层析图像的荧光信号归一化强度平均值分别为 50.5%, 81.71% 和 83.02%, 先提高后趋于饱和. 小球样品的荧光层析图像的空间分辨率与焦平面图像的基本一致.

为获得不同颗粒度条件下, 荧光层析图像的图像质量与原始荧光图像数量之间的关系. 利用上述层析图像提取算法进一步分析了在不同散射体的颗粒度 $G = 20, 100, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 3500$ 条件下, 不同直径的小球样品的层析图像的荧光信号归一化强度平均值与 CCD 相机记录小球样品的原始荧光图像数量之间的关系, 如图 5 所示.

由图 5 可知, 对于不同直径的小球样品而言, 当散射体的颗粒度一定时, 荧光层析图像的对比度随着 CCD 相机记录的原始荧光图像数量的增加而增大, 并逐渐趋于饱和. 根据模拟仿真结果分析可知, 在动态散斑照明条件下, 散斑照明区域随机分布, 激发产生的荧光信号也是随机产生的. 当散射

体的颗粒度一定时,采集的原始荧光图像数量过少,利用算法提取得到的图像信息有所丢失,导致获得的荧光层析图像的图像质量较差.当采集的原始荧光图像达到一定数量后,即可较完整地恢复焦

平面上待测样品的荧光图像,从而获得高质量的荧光层析图像.随着原始荧光图像数量的进一步增加,对图像质量的提升没有影响,反而会降低系统的成像速度.

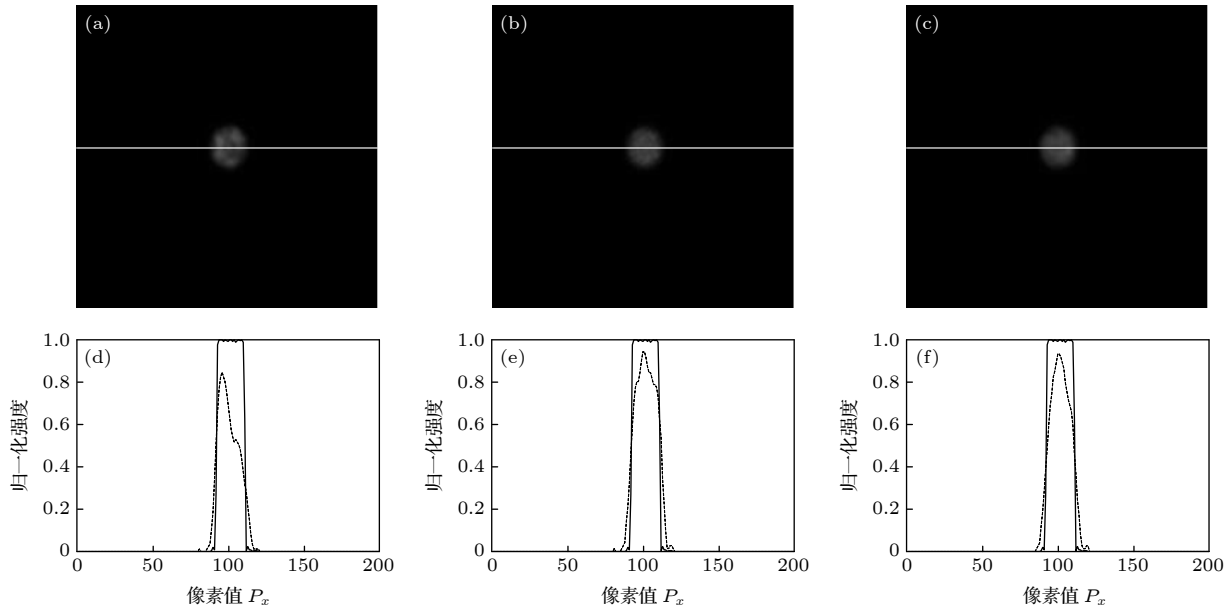


图 3 颗粒度为 1000 时,半径为 R 的小球样品荧光层析图像 (a)—(c) 及中心位置处荧光信号归一化强度 (d)—(f) (a), (d) $N = 20$; (b), (e) $N = 60$; (c), (f) $N = 200$

Fig. 3. The fluorescence sectioning images (a)–(c) of a small spherical sample with a radius of R and the normalized intensity (d)–(f) of the fluorescence signal at the center position with the granularity of diffuser being 1000: (a), (d) $N = 20$; (b), (e) $N = 60$; (c), (f) $N = 200$.

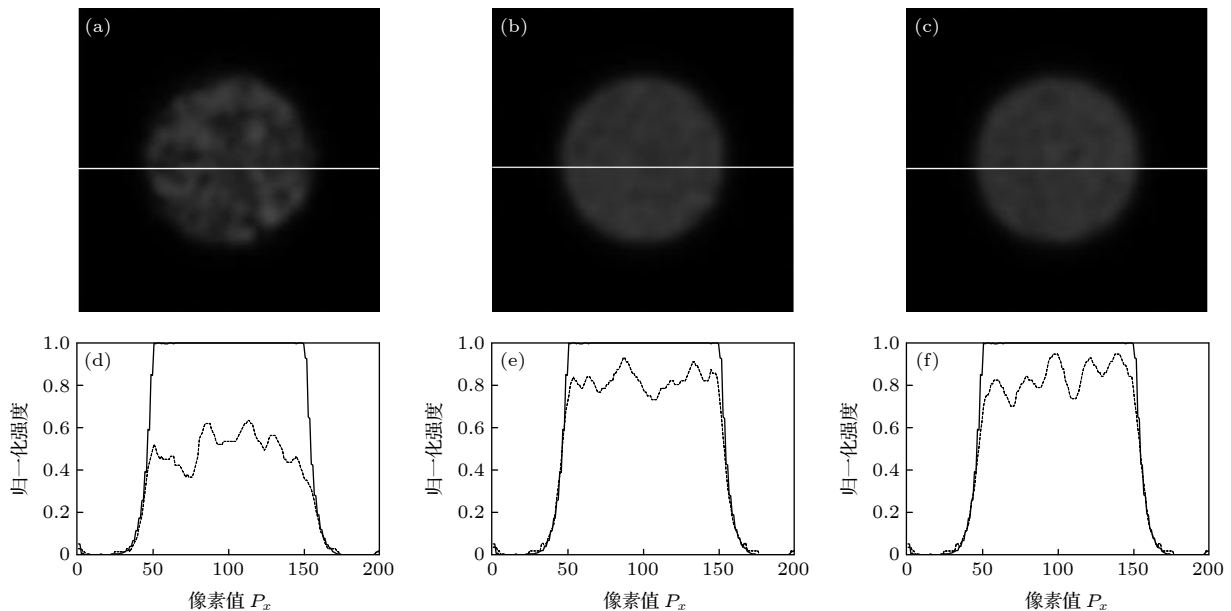


图 4 颗粒度为 500 时,半径为 $10R$ 的小球样品荧光层析图像 (a)—(c) 及中心位置处荧光信号归一化强度 (d)—(f) (a), (d) $N = 20$; (b), (e) $N = 60$; (c), (f) $N = 200$

Fig. 4. The fluorescence sectioning images (a)–(c) of a small spherical sample with a radius of $10R$ and the normalized intensity (d)–(f) of the fluorescence signal at the center position with the granularity of diffuser being 500: (a), (d) $N = 20$; (b), (e) $N = 60$; (c), (f) $N = 200$.

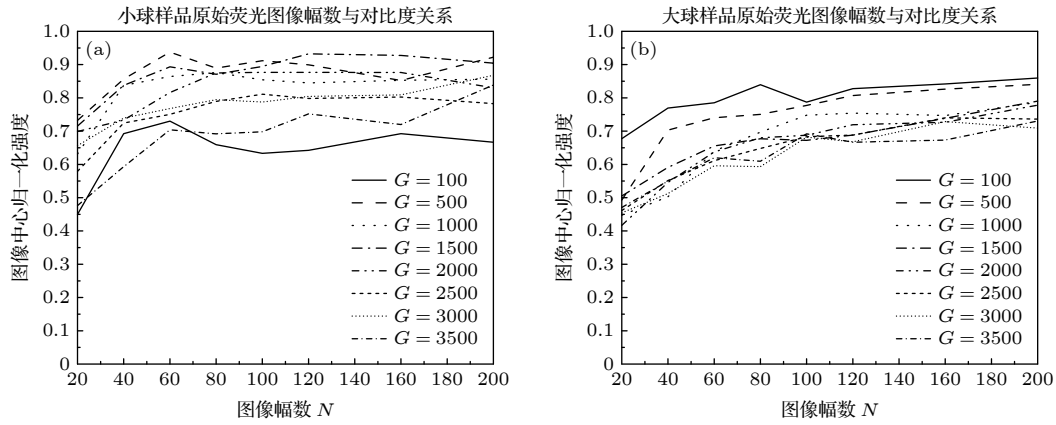


图 5 不同颗粒度条件下,层析图像荧光信号归一化强度平均值与原始荧光图像数量之间的关系 (a) 小球样品; (b) 大球样品
 Fig. 5. When the granularities of diffusers are different, the relationships between the average values of the normalized intensity of the fluorescence signals of sectioning images and the numbers of the original fluorescence images: (a) Small ball; (b) large ball.

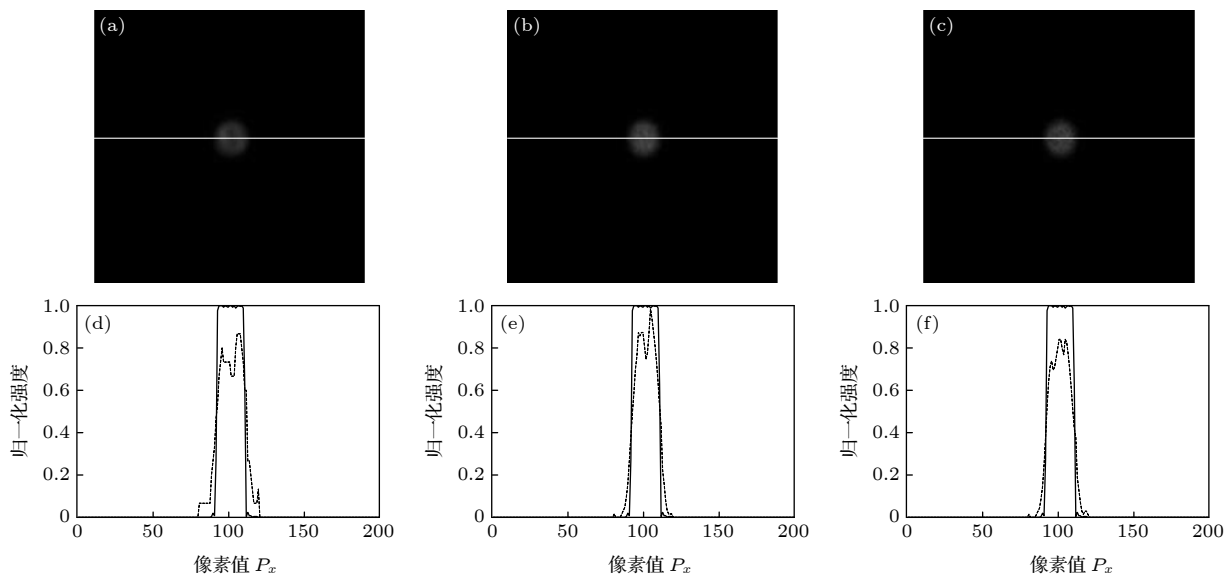


图 6 CCD 记录 120 幅原始荧光图像时,半径为 R 的小球样品荧光层析图像 (a)–(c) 及中心位置处荧光信号归一化强度 (d)–(f) (a), (d) $G=100$; (b), (e) $G=1000$; (c), (f) $G=3000$
 Fig. 6. The fluorescence sectioning images (a)–(c) of a small spherical sample with a radius of R and the normalized intensity (d)–(f) of the fluorescence signal at the center position with 120 original fluorescence images being recorded by CCD: (a), (d) $G=100$; (b), (e) $G=1000$; (c), (f) $G=3000$.

此外,利用这一方法分析了对于不同半径的小球样品,当 CCD 记录的原始荧光图像数量为固定值时,荧光层析图像的对比度和空间分辨率与散射体颗粒度之间的关系.对于半径为 R 的小球样品而言,当原始荧光图像的数量 N 固定为 120,颗粒度 G 分别为 100, 1000 和 3000 时,层析成像的模拟仿真结果如图 6(a)–(c) 所示.层析图像的荧光信号归一化强度平均值分别为 80.03%, 97.22% 和 76.81%,先增加后减小,如图 6(d)–(f) 所示.小球样品的荧光层析图像的空间分辨率与焦平面图像的基本一致.

对于半径为 $10R$ 的小球样品而言,当原始荧光图像的数量 N 固定为 120,颗粒度 G 分别为 20, 1000 和 3000 时,层析成像的模拟仿真结果如图 7(a)–(c) 所示.层析图像的荧光信号归一化强度平均值分别为 63.27%, 83.28% 和 73.04%,如图 7(d)–(f) 所示,也是呈现先增大后减小的趋势.小球样品的荧光层析图像的空间分辨率与焦平面图像的基本一致.

由仿真结果还可以看出,当 $G=20$ 时,由于散射体颗粒度较小,单位面积内照明的散斑面积较大.照明散斑图案强度分布变化的过程中,较大体

积的均匀待测样品的中心部分荧光信号强度的变化不大, 而边缘部分的则变化较大. 因此, 荧光层析图像中心位置的对比度低于边缘部分, 如图 7(d) 所示. 仿真结果说明, 利用小颗粒度的散射体可获取包含均匀介质的较大体积样品边界轮廓的荧光层析图像.

为了获得不同原始荧光图像数量条件下, 荧光层析图像的质量与散射体颗粒度之间的关系. 利用上述层析图像提取算法分析了在 CCD 相机记

录小球样品的不同原始荧光图像数量 $N = 20, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 200$ 条件下, 不同直径的小球样品的层析图像归一化强度平均值与散射体颗粒度 G 之间的关系, 如图 8 所示.

由图 8 可知, 基于动态散斑照明的条件下, 当 CCD 相机记录的原始荧光图像数量较少时 ($N = 20$), 有较多的荧光信号未被记录, 利用层析图像提取算法得到的不同直径的小球样品焦平面层析图像对比度较低. 当 CCD 相机记录一定数量的原始

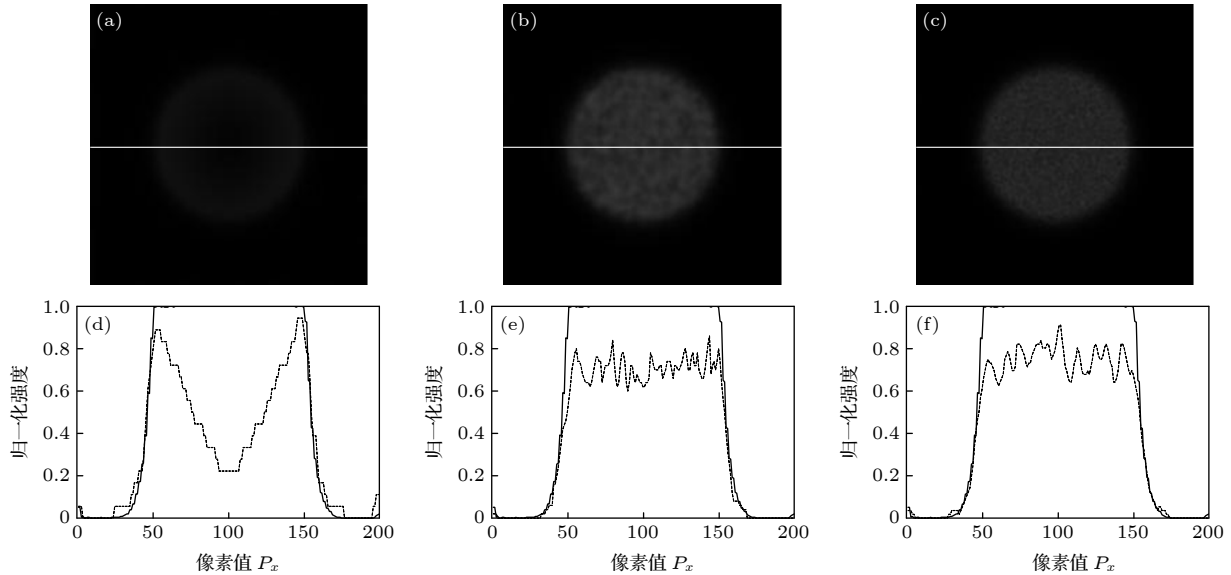


图 7 CCD 记录 120 幅原始荧光图像时, 半径为 $10R$ 的小球样品荧光层析图像 (a)–(c) 及中心位置处荧光信号归一化强度 (d)–(f) (a), (d) $G=20$; (b), (e) $G=1000$; (c), (f) $G=3000$

Fig. 7. When 120 original fluorescence images are recorded by CCD and the different granularity of diffuser, $G=20, 1000, 3000$, The fluorescence sectioning images (a)–(c) of a small spherical sample with a radius of $10R$ and the normalized intensity (d)–(f) of the fluorescence signal at the center position with 120 original fluorescence images being recorded by CCD: (a), (d) $G=20$; (b), (e) $G=1000$; (c), (f) $G=3000$.

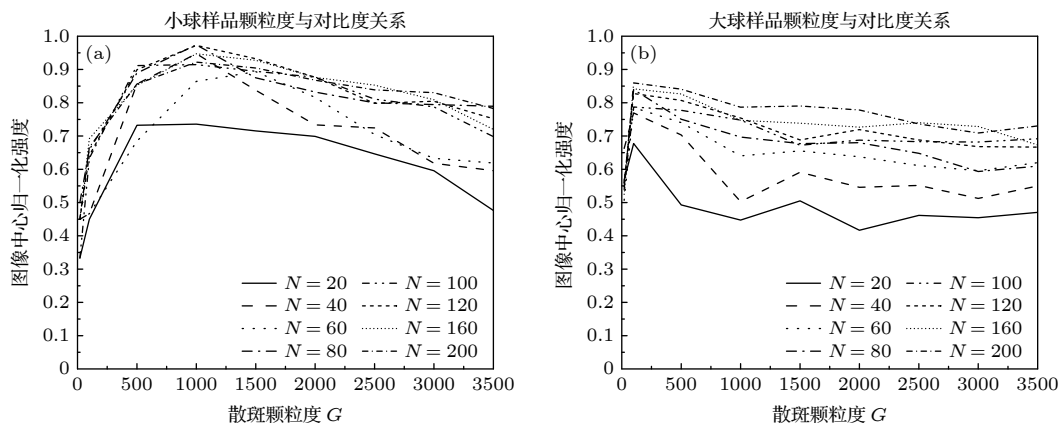


图 8 CCD 记录不同原始荧光图像数量时, 层析图像荧光信号归一化强度平均值与散斑颗粒度之间的关系 (a) 小球样品; (b) 大球样品

Fig. 8. The relationships between the average values of the normalized intensity of the fluorescence signals of sectioning images and the diffuser granularities with different numbers of the original fluorescence images being recorded by CCD: (a) Small ball; (b) large ball.

荧光图像, $N \geq 60$ 时, 随着散射体颗粒度的增大, 小球样品的焦平面层析图像对比度先增加后下降. 根据模拟仿真结果分析可知, 在动态散斑照明条件下, 散斑照明区域随机分布, 激发产生的荧光信号也是随机产生的. 当采集的原始荧光图像数量一定时, 散射体的颗粒度较小, 激发产生荧光信号的散斑照明区域较大. 而当散射体的颗粒度较大时, 激发产生荧光信号的散斑照明区域密度较大. 因此, 在上述两种情况下, 照明区域内随机激发产生的荧光信号变化不剧烈, 无法分离离焦荧光信号实现荧光层析成像.

4 结 论

基于动态散斑照明的宽场荧光显微成像方法利用动态变化的散斑图案全场照明待测生物组织或细胞样品, 通过层析图像提取算法获取待测样品高时间和空间分辨率的三维结构层析图像, 具有结构简单、造价低廉和操作容易等特点, 在生物学、医学和生命科学等研究领域中具有广阔的应用前景. 本论文通过模拟仿真方法, 研究分析了这种荧光层析成像方法中影响图像质量的主要因素, 即散斑颗粒度和 CCD 记录的原始荧光图像数量. 在动态散斑照明条件下, 散斑照明区域随机分布, 激发产生的荧光信号也是随机产生的. 模拟仿真结果表明, 荧光层析图像的图像质量随原始荧光图像数量的增加先提高后趋向饱和. 原始荧光图像数量过少, 导致信息丢失, 获得的层析图像质量差; 而数量过多, 又会降低成像速度. 此外, 荧光层析图像的质量随散射体颗粒度的增加先增加后减少. 颗粒

度过低或过高时, 系统均不具备层析成像能力. 综合考虑图像质量和成像时间等因素, 当用于提取层析图像的原始荧光图像数量为 60 幅, 散射体颗粒度为 1000 左右时, 可获得图像对比度高于 85% 的高空间分辨率荧光层析图像. 上述理论分析和模拟仿真研究为实现基于动态散斑照明的宽场荧光层析成像方法提供了理论基础和指导, 对基于该方法的系统结构设计、实现和进一步优化, 以及利用该方法获取生物组织或细胞的高分辨率三维结构图像, 从而深入研究和解决生命科学问题具有重要意义.

参考文献

- [1] Minsky M *US Patent* 3013467 [1957-12-19]
- [2] Minsky M 1988 *Scanning* **10** 128
- [3] Kohen E, Hirschberg J G 1989 *Cell Structure and Function by Microspectrofluorometry* (San Diego, CA: Academic) p13
- [4] Tsien R Y, Miyawaki A 1998 *Science* **280** 1954
- [5] Wilson T, Sheppard C 1984 *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy* (Orlando, FL: Academic) p47
- [6] Pawley J B 1995 *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (New York: Plenum) p9
- [7] Ikagawa H, Yoneda M, Iwaki M, Isogai Z, Tsujii K, Yamazaki R, Kamiya T, Zako M 2005 *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46** 2531
- [8] Szeto H H, Schiller P W, Zhao K, Luo G X 2004 *FASEB J.* **19** 118
- [9] Mason W T 1999 *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity* (San Diego, CA: Academic) p99
- [10] Somekh M G, See C W, J Goh 2000 *Opt. Comm.* **174** 75
- [11] Ventalon C, Mertz J 2005 *Opt. Lett.* **30** 3350
- [12] Ventalon C, Mertz J 2006 *Opt. Express* **14** 7198
- [13] Lin H M, Shao Y H, Qu J L, Yin J, Chen S P, Niu H B 2008 *Acta Phys. Sin.* **57** 7641 (in Chinese) [林浩铭, 邵永红, 屈军乐, 尹君, 陈思平, 牛憨笨 2008 *物理学报* **57** 7641]
- [14] Wilson T, Juskaitis R, Neil M A A, Kozubek M 1996 *Opt. Lett.* **21** 1879

Theoretical study of wide-field fluorescence microscopy based on dynamic speckle illumination*

Yin Jun¹⁾ Wang Shao-Fei¹⁾ Zhang Jun-Jie¹⁾ Xie Jia-Chen¹⁾
Chen Hong-Yu¹⁾ Jia Yuan¹⁾ Hu Xu-Jin¹⁾ Yu Ling-Yao^{1)2)†}

1) (*Photonics Research Center, School of Electronic Engineering and Automation, Guilin University of Electronic Technology, Guilin 541004, China*)

2) (*Guangxi Key Laboratory of Automatic Detecting Technology and Instruments, Guilin University of Electronic Technology, Guilin 541004, China*)

(Received 30 May 2021; revised manuscript received 27 July 2021)

Abstract

In order to obtain the internal fine structure of biological tissues and living cells, the microscopic imaging technology is required to be capable of microscopy. In the wide-field fluorescence microscopy with dynamic speckle illumination, a series of dynamically changing speckle patterns are used to illuminate a biological sample in the whole field. The fluorescence sectioning images of sample's three-dimensional structural are obtained by extracting intensely changing fluorescence signals in the focal plane. In this paper, the process of obtaining fluorescence sectioning images by the fluorescence microscopy is studied by theoretical analysis and simulation. Two main factors affecting the imaging quality of fluorescence sectioning image are analyzed, which are the number of original fluorescence images recorded by CCD and granularity of diffuser. The simulation results indicates that the imaging quality of fluorescence sectioning images first increases and then tends to saturation with the number of original fluorescence images increasing. It first increases and then decreases with the graininess of diffusers increasing. Considering the imaging quality and imaging time, when the number of original fluorescence images is 60 that is used to extract fluorescence sectioning images, and the granularity of diffuser is about 1000, the high spatial resolution fluorescence sectioning images with contrast higher than 85% can be obtained. Theoretical analysis and simulation research provide a theoretical basis and guidance for designing the system structure, implementing and optimizing the wide-field fluorescence microscopy with dynamic speckle illumination.

Keywords: speckle, fluorescence microscopy, sectioning imaging, wide-field illumination

PACS: 87.64.M-, 42.30.Ms, 87.64.kv, 87.57.-s

DOI: 10.7498/aps.70.20211022

* Project supported by the Fund for Less Developed Regions of the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 61965008) and the Guangxi Key Laboratory of Automatic Detecting Technology and Instruments, China (Grant No. YQ21109).

† Corresponding author. E-mail: lingyaoyu01@163.com