

结构光照明相位/荧光双模式显微技术*

高兆琳 刘瑞桦 温凯 马英[†] 李建郎 郜鹏[‡]

(西安电子科技大学物理学院, 西安 710071)

(2022年7月26日收到; 2022年8月26日收到修改稿)

本文提出了一种基于结构照明的高分辨相位/荧光双模式显微成像方法. 该方法利用一数字微镜阵列(DMD)产生条纹结构光, 并记录样品在结构光照明下的全息图像和荧光图像, 最终可以重建出样品的定量相位图像和超分辨荧光图像. 此外, 还提出了一种补偿环境扰动对相位成像影响的数值方法, 提高了成像系统的抗干扰能力. 在该双模式成像系统中, 定量相位成像和荧光成像的空间分辨率分别为 840 nm 和 440 nm, 为同一样品提供互补信息. 该方法有望被广泛应用于生物医学、工业和化学等诸多领域.

关键词: 结构光照明, 双模式成像, 定量相位显微, 分辨率增强, 相位补偿

PACS: 42.30.Rx, 42.68.Sq, 42.25.Kb, 42.30.-d

DOI: 10.7498/aps.71.20221518

1 引言

定量相位显微成像技术 (quantitative phase microscopy, QPM) 通过定量测量经过透明样品后的光波相位, 实现对透明样品实现高衬度、高分辨率的定量成像^[1-5]. 数字全息显微^[6-11]是一种最为常用的定量相位显微技术之一. 传统数字全息显微通常采用平行于系统光轴的光束来对样品进行垂直照明, 因而其空间分辨率受到很大的限制. 为了提高数字全息显微技术的空间分辨率, 科研人员们先后提出了多种方法, 例如, 通过倾斜照明和结构光照明来实现合成孔径从而提高空间分辨率^[12-14]. 另外, 将微米尺度的介质微球运用到数字全息显微成像中, 可以显著提高其空间分辨率和图像对比度^[15]. 值得一提的是, 学者们提出了基于空间调制器的条纹结构光照明^[16,17]和散斑照明^[18]数字全息显微技术, 不仅提高了数字全息显微技术的空间

分辨率和信噪比, 还保证了其时间分辨率. 为了简化数字全息显微装置的结构并提高其空间分辨率, Latychevskaia 等^[19]提出了一种基于全息图外推方法的无透镜数字全息显微技术, 随后戎路等^[20]将该方法成功应用于太赫兹同轴无透镜数字全息显微中. 邸江磊等^[21]在无透镜数字全息显微成像的基础上, 结合了线性 CCD 扫描法和合成孔径技术, 极大地提高了数字全息显微成像的空间带宽积.

定量相位显微技术无需荧光标记就可对透明样品实现高衬度且定量化的成像, 但同时也缺乏特异性. 荧光显微成像技术通过特异性的荧光标记技术, 可对特定的亚细胞结构进行高分辨率且高对比度的成像^[22]. 经过多年的不懈努力, 科学家们先后提出多种超分辨荧光显微技术, 例如, 单分子定位显微 (STORM/PALM)^[23,24]、受激发射损耗显微镜 (STED)^[25,26]及结构光照明显微镜 (SIM)^[27,28], 这些技术使荧光显微镜的空间分辨率突破至几十纳米. 其中, 结构光照明显微技术 (structured

* 国家自然科学基金 (批准号: 62075177, 62105251)、国家重点研发计划 (批准号: 2022YFE0100700, 2021YFF0700300)、中国轻工业五粮液浓香型白酒固态发酵重点实验室开放基金 (批准号: 2019JJ012)、中央高校基本科研业务费专项资金 (批准号: QTZX22039, XJS210503)、陕西省自然科学基金 (批准号: 2021JQ-184) 和中波科技人员交流项目 (批准号: 2021-2022) 资助的课题.

[†] 通信作者. E-mail: yingma@xidian.edu.cn

[‡] 通信作者. E-mail: peng.gao@xidian.edu.cn

illumination microscopy, SIM) 是一种最适合用于活体样品高分辨率成像的方法, 其具有成像速度快、光毒性小、对荧光分子和标记方法没有过多苛刻要求等优点, 因而受到众多生物医学科研工作者的青睐. 然而, 荧光显微镜仍然存在很多应用上的限制, 例如, 可同时观察的通道数量有限 (一般只有 4—5 个通道); 荧光标记在一定程度上都会对样品造成影响, 无法准确获得活体样品的动态信息; 光毒性和光漂白性不利于活体样品的长时间连续观察.

将定量相位显微技术和荧光显微技术结合构成一种双模式成像系统是大势所趋, 利用荧光显微通道识别定量相位显微通道中的各种结构, 然后利用定量相位显微通道对天然状态下的样品进行长时间的无损检测, 在不对样品造成影响的情况下可以获得样品的多维信息. 将无标记定量相位显微技术和荧光显微技术相结合还可以特异性地观测样品中特定的化学结构, 为待测样品提供互补的多模式信息^[29].

本文提出了一种基于数字微镜阵列的高分辨率定量相位和超分辨荧光双模式显微技术. 在结构光照明下, 数字全息显微装置可重构获得待测样品

的高分辨率复振幅信息 (振幅和相位), 可再现样品的三维形貌和折射率分布等信息, 而荧光显微通道可实现超分辨结构光照明显微成像 (SIM), 可再现待测荧光样品的精细结构.

2 实验设置

基于结构光照明的相位/荧光双模式显微成像装置如图 1(a) 所示. 中心波长为 561 nm 的激光器 (MLL-U-561, 长春新产业) 出射的光束首先经过一个透光系数可调节的中性密度滤光片 NF, 然后被耦合入一个一分二的光纤分路器. 从光纤分路器的一端出射的光波用来对样品进行照明, 另一端出射的光波用作参考光. 照明光束经过透镜 L_1 扩展准直后, 被反射镜 M_1 反射, 并以一定的角度 (24°) 照射到一数字微镜阵列 (DMD) 上. 通过控制系统在数字微镜阵列 DMD (DLP F6500, 1920×1080 像素, 像素大小 $7.56 \mu\text{m}$, UPO-Labs) 上依次加载方位角分别为 $m\pi/4$ (其中 $m = 0, 1, 2, 3$) 的 4 组正弦条纹图案. 每组条纹图像由相移量依次为 $n = 2(k-1)\pi/5$ (其中 $k = 1, 2, \dots, 5$) 的 5 个条纹图案所组成 (如图 1(b) 所示). 经过透镜 L_2 的傅里叶变换作用, 被 DMD 所调制的光波的频谱出现在

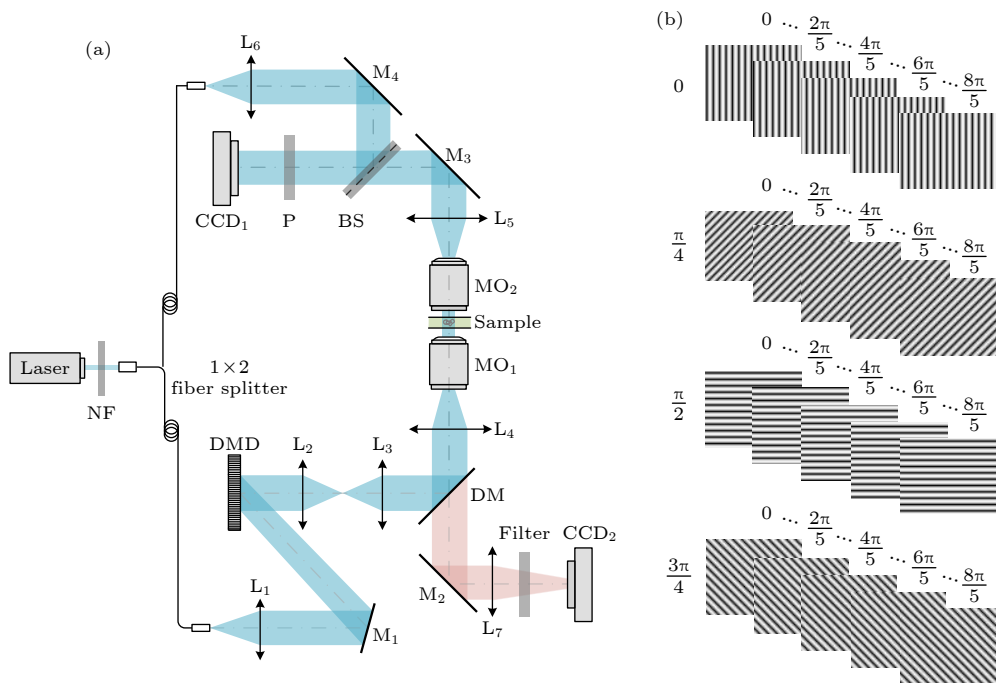


图 1 结构光照明相位/荧光双模式显微成像示意图 (a) 光路原理图; (b) 在 DMD 上加载的正弦条纹图案

Fig. 1. Experimental setup for dual-modality optical microscopy (including quantitative phase microscopy and super-resolution fluorescence microscopy) based on structured light illumination: (a) Optical setup of dual modality; (b) fringe patterns loaded on DMD.

望远镜系统 L_2-L_3 的中间焦平面上. 为了简化重建过程, 在望远镜系统 L_2-L_3 的中间焦平面处放置了一个特制的振幅掩膜片用来滤除 0 级和 ± 1 级以外的衍射光. 如此一来, 该照明光经望远镜系统 L_2-L_3 和 L_4-MO_1 的成像后, 样品面上就产生结构化的条纹图案. 在结构光照明下, 携带有样品信息的物光波经过望远镜系统 MO_2-L_5 成像到 CCD_1 (4000×3000 像素, 像素大小 $1.85 \mu\text{m}$, DMK 33UX226, The Imaging Source) 上. 同时, 从一分二光纤分路器出射的另一束光经透镜 L_6 的准直作用变成平行光, 然后通过分光棱镜 BS 后斜照射到 CCD_1 上, 形成参考光. 物光和参考光干涉形成的离轴干涉图样被 CCD_1 所记录. 为了提高全息图的条纹对比度, 在 CCD_1 前放置了一个线偏振片 (P) 以使物光波和参考光拥有相同的偏振方向. 图 2(a) 是 CCD_1 记录的一幅干涉全息图, 从图中放大区域可以看出全息图的条纹对比度很高, $V = 0.64$. 进一步地, 利用 3.1 节所介绍的数值再现方法, 就可以获得待测样品的高分辨振幅/相位图像.

图 1 所示的光路还可以用来实现超分辨荧光显微成像. 具体来说, 在望远镜系统 L_2-L_3 的焦平面处放置一个振幅掩膜片, 仅使 ± 1 级衍射光通过, ± 1 级衍射光干涉形成的正弦条纹对样品进行结构化照明. 超分辨荧光显微通道的照明光路和荧光探测光路由一个二向色镜 (DM) 耦合. 在结构光照明下产生的荧光信号沿与照明光相反的方向传播, 被探测物镜 MO_1 和透镜 L_4 收集后被 CCD_2 (4096×3000 像素, 像素大小 $3.45 \mu\text{m}$, Basler ace acA4112-20 μm , 宝视纳视觉技术有限公司) 采集, 为了进一步消除反射回的照明光, 我们在 CCD_2 前加了一个高通滤光片. 具体超分辨荧光重建过程见 3.2 节.

3 原理与实验

3.1 结构光照明定量相位显微成像

为方便起见, 这里使用 $\Phi_{\theta,n}$ 表示样品平面内的条纹结构光:

$$\Phi_{\theta,n}(\mathbf{r}) = K_1 + K_2 \cos(2\mathbf{p}_\theta \cdot \mathbf{r} + \varphi_n), \quad (1)$$

式中, $\theta = m\pi/4$ 表示条纹的方向, m 一般取 0, 1, 2 和 3; K_1, K_2 表示结构光的直流分量和调制度; $\mathbf{r} = (x, y)$ 表示样品面内的空间坐标; $\mathbf{p}_\theta = (p\cos\theta, p\sin\theta)$ 表示二维照明向量, 这里, $p = \sin\mu/\lambda$, μ 表

示 ± 1 级照明光与 z 轴之间的夹角, λ 表示照明光的中心波长. 为了最大化结构光照明下的数字全息显微成像空间分辨率, 设置 DMD 上加载的条纹周期为 5 个像素. 实验中进行了 5 次相移操作, 对应 $\varphi_n = 2\pi(n-1)/5$, $n = 1, 2, \dots, 5$.

其次, 使用 $\Psi_{\theta,n}(\mathbf{r})$ 表示待测样品在结构光 $\Phi_{\theta,n}(\mathbf{r})$ 的照明下产生的物光波. 此处, 假定从样品平面到 CCD_1 平面的放大率为 1. 在 CCD_1 平面内物光和参考光波 ($R(\mathbf{r})$) 发生干涉后产生的光强分布可以表示为 $I_{\theta,n}(\mathbf{r}) = |R(\mathbf{r}) + \Psi_{\theta,n}(\mathbf{r})|^2$. 然后对 CCD_1 记录的全息图进行二维空间傅里叶变换, 可以得到如图 2(b) 所示的频谱分布. 该频谱包含位于频谱中央的零级分量, 以及位于两侧的原级项 $\Psi_{\theta,n}(\mathbf{r})R^*$ 和共轭项 $\Psi_{\theta,n}^*(\mathbf{r})R$. 由于采用了结构光照明, 全息图零级分量、实像和共轭像中都分别出现了结构照明光 0, ± 1 级衍射光的频谱. 通过窗口函数 W_f 选择原级项 $\Psi_{\theta,n}(\mathbf{r})R^*$ 对应的频谱分布 (如图 2(b) 中白色圆部分), 进而得到该结构光照明下的物光波^[16]:

$$\Psi_{\theta,n}^r(\mathbf{r}) = \text{IFT} \{ \text{FT} \{ I_{\theta,n}(\mathbf{r}) \cdot R_D(\mathbf{r}) \} \cdot W_f \}, \quad (2)$$

式中, $R_D(\mathbf{r})$ 表示模拟的数字参考光波, $\text{FT}\{\cdot\}$ 和 $\text{IFT}\{\cdot\}$ 分别表示空间傅里叶变换和傅里叶逆变换. 需要注意的是, 由 (2) 式计算得到的 $\Psi_{\theta,n}^r(\mathbf{r})$ 本质上是由沿着结构光 $\Phi_{\theta,n}(\mathbf{r})$ 的 0, ± 1 级衍射光传播的 3 个物光 ($A_{\theta,0}(\mathbf{r})$, $A_{\theta,-1}(\mathbf{r})$ 和 $A_{\theta,+1}(\mathbf{r})$) 的线性组合:

$$\begin{aligned} \Psi_{\theta,n}^r(\mathbf{r}) = & \frac{K_2}{2} A_{\theta,-1}(\mathbf{r}) \exp(-i\varphi_n) + K_1 A_{\theta,0}(\mathbf{r}) \\ & + \frac{K_2}{2} A_{\theta,+1}(\mathbf{r}) \exp(i\varphi_n). \end{aligned} \quad (3)$$

进一步地, 在某一方向的结构光照明下, 通过 5 次平移结构光改变条纹的相位 φ_n 并记录多幅全息图, 分别再现获得 $\Psi_{\theta,n}^r$, $n = 1, 2, \dots, 5$. 实验发现空气扰动会对相移操作中的物光波 $\Psi_{\theta,n}^r$ 的相位产生一定的影响, 在相移操作中, 空气扰动引起 $\Psi_{\theta,n}^r(\mathbf{r})$ 的相位变化为空间均匀分布的常数相位 $\varphi_{\text{dis},n}$, 并且 $\Psi_{\theta,n}^r(\mathbf{r})$ 中 3 个衍射级 ($A_{\theta,0}(\mathbf{r})$, $A_{\theta,+1}(\mathbf{r})$, $A_{\theta,-1}(\mathbf{r})$) 是具有相同的 $\varphi_{\text{dis},n}$. 由于 3 个衍射级 ($A_{\theta,0}(\mathbf{r})$, $A_{\theta,+1}(\mathbf{r})$, $A_{\theta,-1}(\mathbf{r})$) 在频率域是彼此分离的, 因此, $A_{\theta,0}(\mathbf{r})$ 的复振幅可通过在 $\Psi_{\theta,n}^r$ 频谱中利用一圆形掩膜选择 $A_{\theta,0}(\mathbf{r})$ 的频谱并进行逆傅里叶变换来获得. $\varphi_{\text{dis},n}$ 可通过选取第 2—5 步相移中 $\Psi_{\theta,n}^r(\mathbf{r})$ 中 $A_{\theta,0}(\mathbf{r})$ 与第 1 步相移的 $A_{\theta,0}(\mathbf{r})$ 的相位差

来确定. 之后, 采用 $\Psi_{\theta,n}^r(\mathbf{r}) = \Psi_{\theta,n}^r(\mathbf{r}) \cdot \exp(-i\varphi_{\text{dis},n})$ 来补偿空气扰动对 $\Psi_{\theta,n}^r(\mathbf{r})$ 的影响. 当获得 5 个不

同相移下的 $\Psi_{\theta,n}^r(\mathbf{r})$ 后, 可以利用以下线性方程组求解出 $A_{\theta,0}(\mathbf{r})$, $A_{\theta,-1}(\mathbf{r})$ 和 $A_{\theta,+1}(\mathbf{r})$:

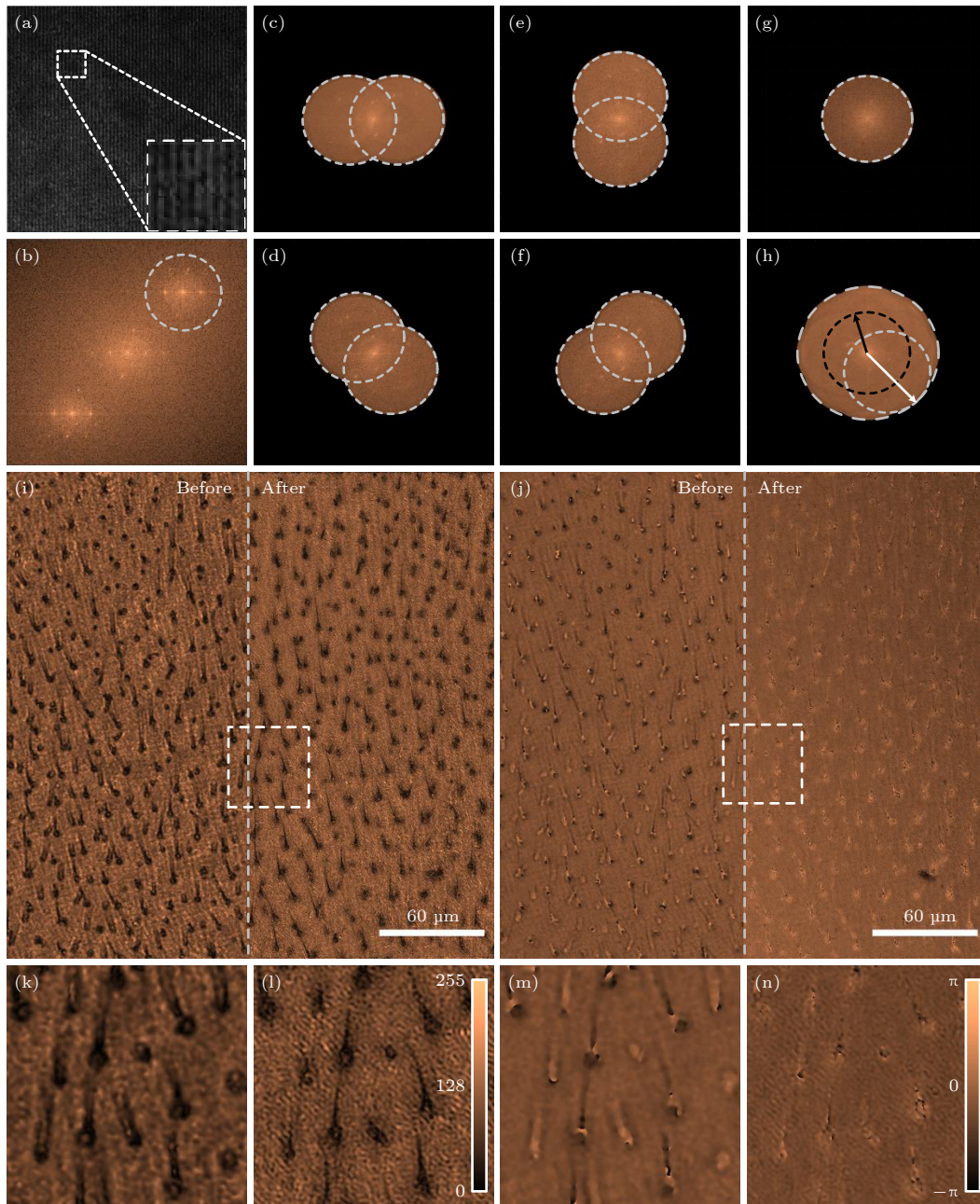


图 2 结构光照明显量相位显微的图像重构以及对苍蝇翅切片的成像结果 (a) 结构光照明显量数字全息显微的全息图; (b) 图 (a) 中全息图的频谱分布; (c)–(f) 条纹方向为 0° , 45° , 90° 和 135° 的结构光照明下得到的物光频谱分布; (g) 和 (h) 平行光照明和结构光照明下的样品频谱分布; (i) 和 (j) 苍蝇翅切片的振幅图和相位图, 其中左/右半部分别为使用平行光照明/结构光照明对应的图像; (k) 和 (l) 图 (i) 中虚框部位在平行光照明和结构光照明下恢复的振幅结果; (m) 和 (n) 图 (j) 中虚框部位在平行光照明和结构光照明下恢复的相位结果

Fig. 2. Image reconstruction of quantitative phase microscopy with structured light illumination and imaging results on fly wing sections: (a) Hologram of digital holographic microscopy (DHM) illuminated by structured light; (b) spectral distribution of the hologram in Fig. 2(a); (c)–(f) spectra of the object waves obtained using 0° , 45° , 90° and 135° structured illumination; (g) and (h) frequency spectrum of samples under parallel and structured light illumination; (i) and (j) amplitude and phase images of a fly wing slice, where the left/right halves are images using parallel/structured light illumination, respectively; (k) and (l) the reconstructed amplitude results of the virtual box in the Fig. 2(i) under plane-wave illumination and structured illumination; (m) and (n) reconstructed phase results of the dashed box in the Fig. 2(j) under plane-wave illumination and structured illumination.

$$\begin{bmatrix} \Psi_{\theta 1}^r(\mathbf{r}) \\ \Psi_{\theta 2}^r(\mathbf{r}) \\ \Psi_{\theta 3}^r(\mathbf{r}) \\ \Psi_{\theta 4}^r(\mathbf{r}) \\ \Psi_{\theta 5}^r(\mathbf{r}) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{K_2}{2} \exp(-i\varphi_1) & K_1 & \frac{K_2}{2} \exp(i\varphi_1) \\ \frac{K_2}{2} \exp(-i\varphi_2) & K_1 & \frac{K_2}{2} \exp(i\varphi_2) \\ \frac{K_2}{2} \exp(-i\varphi_3) & K_1 & \frac{K_2}{2} \exp(i\varphi_3) \\ \frac{K_2}{2} \exp(-i\varphi_4) & K_1 & \frac{K_2}{2} \exp(i\varphi_4) \\ \frac{K_2}{2} \exp(-i\varphi_5) & K_1 & \frac{K_2}{2} \exp(i\varphi_5) \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} A'_{\theta,-1}(\mathbf{r}) \\ A'_{\theta,0}(\mathbf{r}) \\ A'_{\theta,+1}(\mathbf{r}) \end{bmatrix}, \quad (4)$$

式中 $A'_{\theta,-1}(\mathbf{r})$ 和 $A'_{\theta,+1}(\mathbf{r})$ 为沿着结构光 ± 1 级衍射光传播的物光, 具有倾斜相位因子. 利用如下公式补偿它们的倾斜相位:

$$A_{\theta,-1}(\mathbf{r}) = A'_{\theta,-1}(\mathbf{r}) \exp(-i2\pi \mathbf{p}_\theta \mathbf{r}), \quad (5a)$$

$$A_{\theta,+1}(\mathbf{r}) = A'_{\theta,+1}(\mathbf{r}) \exp(i2\pi \mathbf{p}_\theta \mathbf{r}). \quad (5b)$$

依次改变条纹结构光的方向 ($\theta = m\pi/4$, m 一般取 0, 1, 2 和 3), 可恢复 4 个方向上 $A_{\theta,1}(\mathbf{r})$, $A_{\theta,-1}(\mathbf{r})$ 频谱分布, 分别如图 2(c)—(f) 所示. 然后将不同方向上的 $A_{\theta,1}(\mathbf{r})$, $A_{\theta,-1}(\mathbf{r})$ 频谱分量线性叠加在一起, 得到合成孔径的频谱分布, 如图 2(h) 所示. 通过对该频谱进行逆傅里叶变换, 可以获得分辨率增强的振幅 (图 2(l)) 和相位图像 (图 2(n)). 这里, 成像物镜 MO_2 的数值孔径 $NA_{\text{det}} = 0.3$, 照明数值孔径 $NA_{\text{illu}} = 0.3$. 在平行于 z 轴的零级光下获得的物体频谱如图 2(g) 所示, 此时系统所能探测到的物体最大频谱为 $NA_{\text{det}}/\lambda = 0.3/0.561 \mu\text{m}^{-1} = 0.53 \mu\text{m}^{-1}$, 如图 2(h) 中黑色圆圈所示. 相比而言, 结构光照明下获取到的物体频谱分布包含了更多的高频成分: $(NA_{\text{det}} + NA_{\text{illu}})/\lambda = (0.3+0.3)/0.561 \mu\text{m}^{-1} = 1.10 \mu\text{m}^{-1}$, 如图 2(h) 中黑色圆圈和黄色圆圈所示. 因此, 在条纹结构光下, 数字全息显微成像的空间分辨率提升了 $1.10/0.53 = 2.07$ 倍.

为了验证条纹结构光对数字全息显微技术空间分辨率提升的有效性, 对苍蝇翅切片进行了成像. 图 2(i) 和图 2(j) 的左侧分别为使用平行于 z 轴的平行光照明所获得的振幅图和相位图; 图 2(i) 和图 2(j) 的右侧分别为使用条纹结构光照明所获得的振幅图和相位图. 对比结果表明, 条纹结构光照明下苍蝇翅切片的图像比在传统的平行光照明下的图像更加清晰, 具有更多的细节.

3.2 结构光照明荧光显微成像

实验中, 采用方位角依次为 $\pi/4$ 的 4 组条纹结构光对样品进行照明, 每组结构光依次进行 5 次相移操作. 在样品平面上, 照明光强分布为余弦条纹时, 可表示为

$$I_{i,j}(\mathbf{r}) = I_0[1 + m \cos(2\pi \mathbf{k}_i \cdot \mathbf{r} + \phi_j)], \quad (6)$$

式中, I_0 表示激发光的平均强度, m 表示条纹的调制度, \mathbf{r} 表示位置向量, \mathbf{k}_i 表示第 i 次条纹结构光对应的空间频率 ($i = 1, 2, 3, 4$), $\phi_j = 2\pi(j-1)/5$ 表示条纹结构光第 j 次相移时对应的相移量 ($j = 1, 2, \dots, 5$). 样品在结构光 $I_{i,j}(\mathbf{r})$ 照明下发出的荧光被成像到 CCD_2 上. 相机探测到的图像可以使用以下公式表示:

$$D_{i,j}(\mathbf{r}) = (I_{i,j}(\mathbf{r}) \cdot s(\mathbf{r})) \otimes h(\mathbf{r}), \quad (7)$$

式中, $s(\mathbf{r})$ 表示待测样品的结构分布, $h(\mathbf{r})$ 表示非相干成像系统的点扩散函数 (PSF), \otimes 表示卷积操作. 对 (7) 式两侧进行空间傅里叶变换就可得到

$$\tilde{D}_{i,j}(\mathbf{k}) = \left(\tilde{I}_{i,j} \otimes \tilde{S} \right) \tilde{h}(\mathbf{k}), \quad (8)$$

式中, 变量上方的波浪号表示该变量的空间频谱分布, \mathbf{k} 表示频域坐标, $\tilde{h}(\mathbf{k})$ 表示荧光显微成像系统的光学传递函数. 把 (6) 式代入 (8) 式可得

$$\begin{aligned} \tilde{D}_{i,j}(\mathbf{k}) = & I_0 \tilde{h}(\mathbf{k}) [\tilde{S}_i(\mathbf{k}) + \frac{m}{2} e^{i\phi_j} \tilde{S}_i(\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) \\ & + \frac{m}{2} e^{-i\phi_j} \tilde{S}_i(\mathbf{k} + \mathbf{k}_0)]. \end{aligned} \quad (9)$$

为了最大化地获得空间分辨率增强的样品图像, 在 DMD 上加载周期为 5 个像素的正弦条纹. 通过遮挡条纹的零级衍射级后, 条纹结构光在样品平面的空间频率为 $1.06 \mu\text{m}^{-1}$ (系统截止频率为: $1.29 \mu\text{m}^{-1}$). 实验中, 采用五步相移 (每次相移 1 个像素, 对应的相移量为 $\phi_j = 2\pi/5$) 来解调样品的零级和 ± 1 级频谱分量 [30]:

$$\begin{bmatrix} \tilde{D}_{i,1}(\mathbf{k}) \\ \tilde{D}_{i,2}(\mathbf{k}) \\ \tilde{D}_{i,3}(\mathbf{k}) \\ \tilde{D}_{i,4}(\mathbf{k}) \\ \tilde{D}_{i,5}(\mathbf{k}) \end{bmatrix} = I_0 \begin{bmatrix} 1 & \frac{m}{2} e^{-i\phi_1} & \frac{m}{2} e^{i\phi_1} \\ 1 & \frac{m}{2} e^{-i\phi_2} & \frac{m}{2} e^{i\phi_2} \\ 1 & \frac{m}{2} e^{-i\phi_3} & \frac{m}{2} e^{i\phi_3} \\ 1 & \frac{m}{2} e^{-i\phi_4} & \frac{m}{2} e^{i\phi_4} \\ 1 & \frac{m}{2} e^{-i\phi_5} & \frac{m}{2} e^{i\phi_5} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} \tilde{S}_i(\mathbf{k}) \tilde{h}(\mathbf{k}) \\ \tilde{S}_i(\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) \tilde{h}(\mathbf{k}) \\ \tilde{S}_i(\mathbf{k} + \mathbf{k}_0) \tilde{h}(\mathbf{k}) \end{bmatrix}. \quad (10)$$

进一步地, 对恢复得到的 ± 1 级频谱分量 $\tilde{S}_i(\mathbf{k} - \mathbf{k}_0)$ 和 $\tilde{S}_i(\mathbf{k} + \mathbf{k}_0)$ 在频域空间进行 $+\mathbf{k}_0$ 和 $-\mathbf{k}_0$ 的频移, 从而将它们移动到正确的位置. 图 3(a)—(d) 表示条纹结构光的方向分别为 0° , 45° , 90° 以及 135° 时, 利用 (10) 式恢复且频移后的 ± 1 级频谱分量分布. 然后对图 3(a)—(d) 所示的各频谱分布进行线性叠加, 就得到图 3(f) 所示的结果. 相比于普通宽场荧光显微成像 (如图 3(e) 所示), 结构光照明荧光显微成像可以获得样品更高空间频率的信

息. 通过对该频谱进行逆傅里叶变换, 可以获得超分辨的荧光图像.

对女贞叶切片的同一位置分别进行了普通宽场荧光显微和结构光照明荧光显微成像. 图 3(g) 的左右两侧为宽场荧光显微和结构光照明荧光显微成像结果. 图 3(h) 和图 3(i) 分别是图 3(g) 中白色方框内两个模式成像结果的放大图像. 对比两图可发现, 结构光照明荧光显微成像可以探测女贞叶切片更精细的结构.

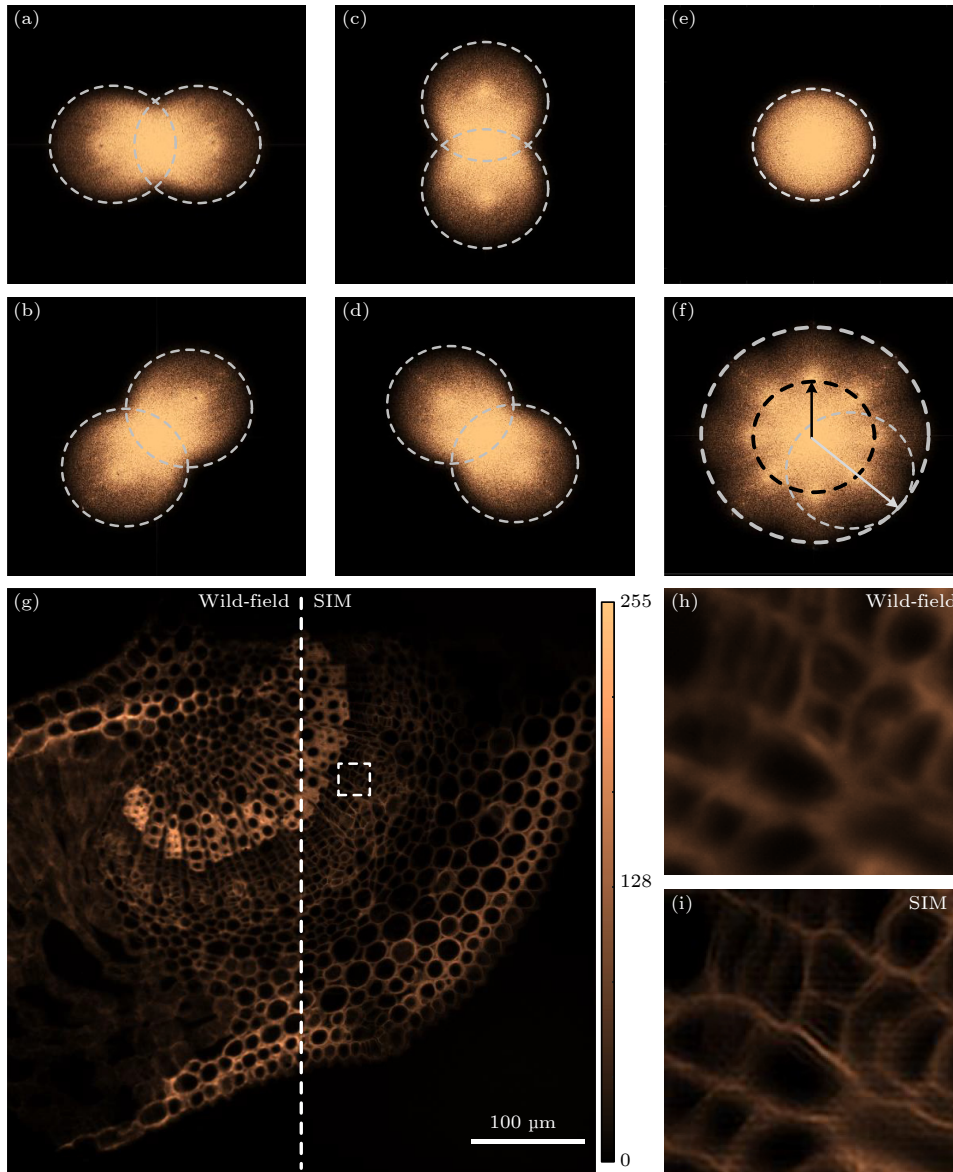


图 3 结构光照明荧光显微成像的图像重构以及女贞叶切片的成像结果 (a)—(d) 条纹方向为 0° , 45° , 90° 和 135° 的结构光照明下得到的物光频谱分布; (e) 和 (f) 平行光照明和结构光照明下的样品频谱分布; (g) 该图左侧和右侧为使用平行光照明和结构光照明女贞叶切片的荧光图像; (h) 和 (i) 图 (g) 中方框部位在使用平行光照明和结构光照明的荧光图像放大图

Fig. 3. Image reconstruction of structured light-illuminated fluorescence microscopy and imaging results of privet leaf slices: (a)—(d) Spectral distribution of object waves under structured light illumination with fringe directions of 0° , 45° , 90° and 135° ; (e) and (f) spectral distribution of samples under parallel and structured light illumination; (g) the left and right halves of the figure are fluorescence images of privet leaf sections illuminated using parallel and structured light illumination; (h) and (i) magnified wide-field and SIM images of the sample within the white-dash box in Fig. 3(g).

4 实验结果与讨论

4.1 结构光照明数字全息显微的空间分辨率验证

实验中, 成像物镜 MO_2 的数值孔径 NA_{det} 为 0.3, 所以当照明光是平行于 z 轴的平行光时, 数字全息显微成像的横向空间分辨率为 $\delta = 0.82\lambda/NA_{\text{det}} = 1.53 \mu\text{m}$. 另一方面, 照明物镜 MO_1 的数值孔径 NA_{illum} 为 0.4, 所以结构光照明数字全息显微成像时的最大空间分辨率可达 $\delta_{\text{max}} = 0.82\lambda/(NA_{\text{det}}+NA_{\text{illum}}) = 0.66 \mu\text{m}$. 当 DMD 加载周期为 5 个像素的正弦条纹时, 照射到样品上的 ± 1 级衍射光的照明角度为 $\theta_{\text{illum}} = 0.30 \text{ rad}$, 此时结构光照明数字全息显微的横向分辨率 $\delta_{\text{str}} = 0.82\lambda/(NA_{\text{det}}+\sin\theta_{\text{illum}}) = 0.77 \mu\text{m}$.

我们利用结构光照明数字全息显微对直径为

500 nm 的二氧化硅小球进行了成像. 图 4(a) 的左/右侧分别为使用平行于 z 轴的平行光照明/结构光照明时数字全息显微获得的振幅图像. 其中, 白色虚框部位的两个模式的放大图如图 4(b) 和图 4(c) 所示. 图 4(d) 表示图 4(b) 和图 4(c) 中经过同一二氧化硅小球中心的强度分布. 通过对比可以发现, 条纹结构光照明可以显著提高数字全息显微成像的空间分辨率. 为了定量分析两个成像模式的空间分辨率, 随机选取了成像视场中的 35 个二氧化硅小球, 并通过高斯函数拟合测到一系列半高全宽, 统计结果如图 4(e) 所示. 统计结果表明, 使用平行于 z 轴的平行光照明时数字全息显微成像的横向空间分辨率为 $1.72 \mu\text{m} \pm 0.13 \mu\text{m}$, 而结构光照明数字全息显微成像的横向空间分辨率为 $0.84 \mu\text{m} \pm 0.07 \mu\text{m}$, 使用结构光照明的方式可以将横向空间分辨率提高 2.04 倍. 因此, 结构光照明有效地提高了数字全息显微成像的横向空间分辨率.

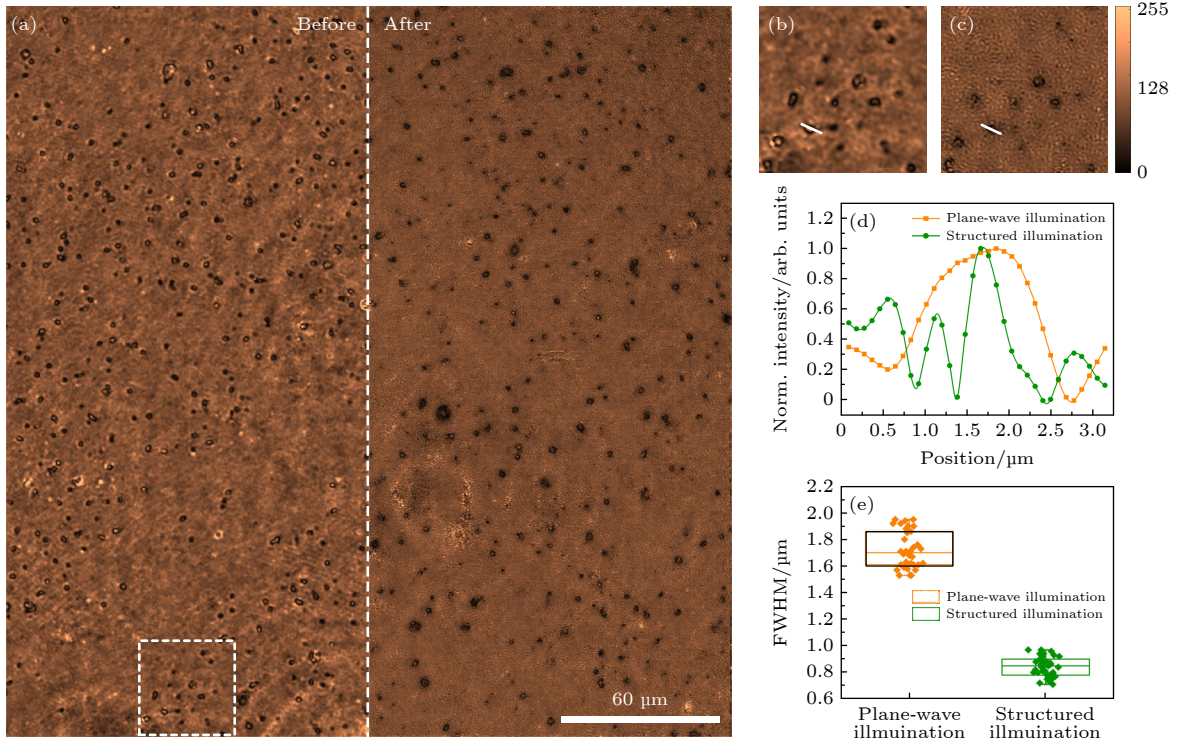


图 4 基于平行光/结构光照明数字全息显微对二氧化硅小球的成像结果 (a) 平行光(左)和结构光(右)照明时 DHM 获得的振幅图像; (b) 和 (c) 图 (a) 中白色方框区域在使用平行光照明和结构光照明的重构结果; (d) 图 (b) 和 (c) 中沿白色虚线的强度分布; (e) 平行光/结构光照明 DHM 的空间分辨率比较, 在图 (a) 中随机选择 35 个小球, 并对其在两个成像模式下半高全宽进行统计

Fig. 4. Plane-wave/structured-illumination based DHM imaging of SiO₂ beads: (a) Images of SiO₂ beads obtained by DHM with parallel illumination and structure illumination, respectively; (b) and (c) the magnified images within the white-box area in panel (a) obtained by plane-wave and structured illumination based DHM, respectively; (d) the intensity distributions along the white lines in panel (b) and (c); (e) statistics of lateral resolution of the two imaging modalities by randomly choosing and FWHM analysis of 35 beads for in panel (a).

4.2 结构光照明超分辨荧光显微的空间分辨率验证

由于物镜 MO_1 的数值孔径 $NA_{\text{illum}} = 0.4$, 荧光样品的发射波长 $\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$, 因此传统宽场荧光显微成像的横向空间分辨率为 $0.5\lambda_{\text{em}}/NA_{\text{illum}} = 0.78 \mu\text{m}$. 如前所述, 实验中给 DMD 加载周期为 5 个像素的正弦条纹, 因此投影到样品平面内的正弦条纹周期 $P_{\text{SIM}} = 0.95 \mu\text{m}$, 在该结构光照明下 SIM 的空间分辨率比平行光照明的成像模式提高了 1.81 倍 $((2 \times NA_{\text{illum}}/\lambda_{\text{em}} + 1/P_{\text{SIM}})/(2 \times NA_{\text{illum}}/\lambda_{\text{em}}) = 1.81)^{[31]}$. 由此可得, SIM 的理论空间分辨率为 $0.43 \mu\text{m}$. 分别使用传统的宽场显微(平行光照明)和 SIM 对直径为 500 nm 的荧光聚苯乙烯小球 (RF500C, 发射波长 620 nm , 中国上海辉质生物科技有限公司) 进行成像. 图 5(a) 的左/右侧分别为使用平行于 z 轴的平行光照明/结构光照明荧光显微成像所获得的荧光小球图像. 图 5(b) 和图 5(c) 分别是图 5(a) 中白色虚框对应的宽场显微

和 SIM 的放大图像. 图 5(d) 为图 5(b) 和图 5(c) 中白色虚线对应的强度分布. 通过对比可以发现, 结构光照明荧光显微成像能够分辨而宽场荧光显微成像无法分辨的两个小球. 进一步随机选取 35 个荧光小球, 并测量了它们在宽场荧光成像和结构光照明荧光显微成像下的半高全宽, 结果见图 5(e) 所示. 统计结果表明宽场荧光成像的横向空间分辨率为 $0.91 \mu\text{m} \pm 0.02 \mu\text{m}$, 而结构光照明荧光显微成像的横向空间分辨率为 $0.44 \mu\text{m} \pm 0.04 \mu\text{m}$. 因此, 相比于传统宽场荧光显微成像, 结构光照明荧光显微成像的横向空间分辨率提高了 2.07 倍.

4.3 结构光照明相位/荧光双模式显微成像

本文所提出的结构光照明相位/荧光双模式显微成像技术, 可以对同一透明荧光样品进行高分辨率的相位/荧光检测. 在两种成像模式中, DMD 上加载的条纹周期均为 5 个像素. 当条纹结构光照射到待测样品上后, 携带有透明样品相位信息的光波沿着透射光路被 CCD_1 记录. 结构光在同一样品

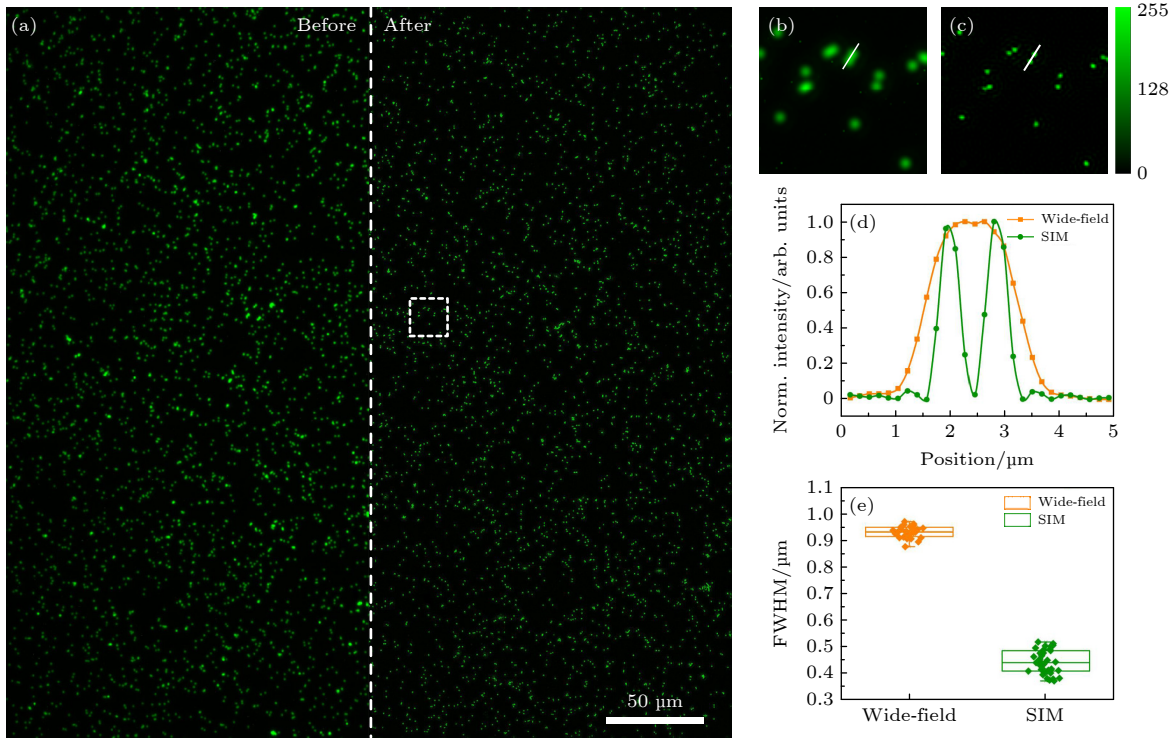


图 5 宽场显微和 SIM 对荧光小球的成像结果 (a) 宽场显微(左)和 SIM(右)图像; (b) 和 (c) 图 (a) 中白色方框区域对应的宽场和 SIM 图像的放大图; (d) 图 (b) 和 (c) 中沿白色虚线的强度分布; (e) 图 (a) 宽场和 SIM 模式空间分辨率的统计, 在图 (a) 中随机选择 35 个小球, 并对其在两个成像模式下半高全宽进行统计

Fig. 5. Wide-field and SIM imaging of fluorescent beads: (a) Wide-field (left) and SIM (right) images of the sample; (b) and (c) the magnified wide-field and SIM images of the sample within the white-box in panel (a); (d) the intensity distribution along the white lines in panel (b) and (c); (e) statistics of lateral resolution of the two imaging modalities by randomly choosing and FWHM analysis of 35 beads for in panel (a).

激发的荧光经过反射光路由 CCD₂ 记录. 利用上述两种成像模式的重构算法可以得到待测样品的高分辨相位和超分辨荧光图.

首先使用 3 个样品进行双模式成像, 图 6(a)—(c)、图 6(d)—(f) 和图 6(g)—(i) 分别为迎春叶横切、水稻叶和鼠尾横切的结构光照明相位/荧光双模式显微成像结果, 图 6(c), (f) 和 (i) 是 3 种样品

的相位/荧光合并图. 可以看出, 同一样品的相位/荧光图像具有高度的一致性和互补性. 为了进一步反映所提系统的高分辨率相位/荧光双模式成像的能力, 对 SiHa 细胞进行了进一步的实验. 实验中, 首先用荧光染料 (线粒体红色荧光探针, C1049B-50 μg, 碧云天生物) 对 SiHa 细胞内的线粒体进行特异性地标记, 然后使用 4% 的甲醛对整个细胞进

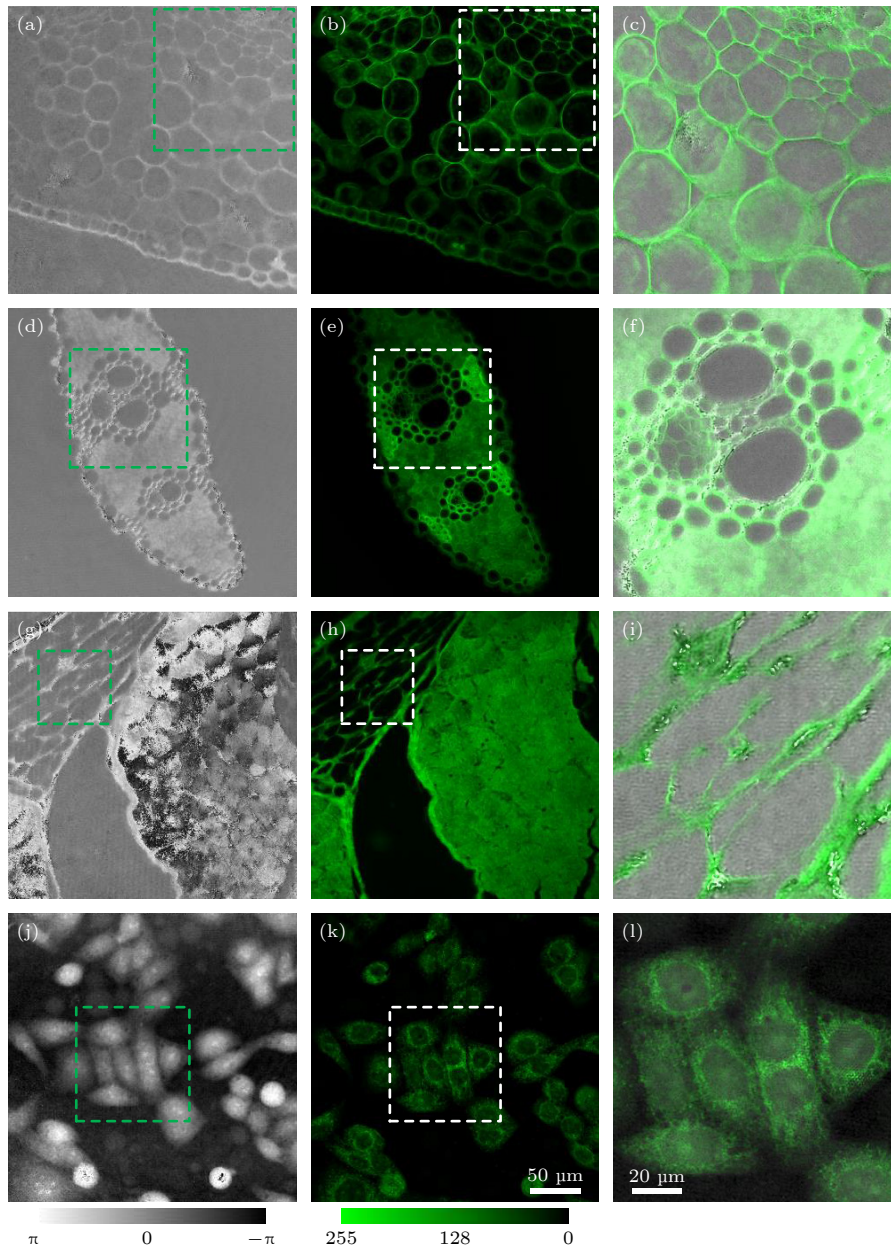


图 6 结构光照明相位/荧光双模式显微成像 (a) 和 (b) 迎春叶切片的相位和荧光图像; (d) 和 (e) 水稻叶的相位和荧光图像; (g) 和 (h) 鼠尾切片的相位和荧光图像; (j) SiHa 细胞的相位图像; (k) SiHa 细胞中的线粒体的荧光图像; (c), (f), (i) 和 (l) 4 种样品的相位/荧光融合图

Fig. 6. Structured illumination based phase/fluorescence dual-mode microscopic imaging of spring leaves, rice leaves, and mouse tail transection: (a) and (b) Phase and fluorescence images of cross-sections of spring leaves; (d) and (e) phase and fluorescence images of rice leaves; (g) and (h) phase and fluorescence images of mouse tail transection; (j) phase image of SiHa cells; (k) fluorescence image of mitochondria in SiHa cells; (c), (f), (i) and (l) combined phase/fluorescence images of the four samples.

行固定. 图 6(j) 是结构光照明下 SiHa 细胞的相位图像, 图 6(k) 是 SiHa 细胞中线粒体的超分辨荧光图像, 图 6(l) 是 SiHa 细胞的相位/荧光模式合并图像. 通过对比可以看出, 相位图像可以反映细胞的整体形态, 而荧光图像只能展示细胞核周围的线粒体分布情况, 两种模式耦合后可以反映 SiHa 细胞内线粒体的分布情况, 说明两种成像模式具有一定的互补性. 值得注意的是, 结构光照明数字全息显微可以得到待测样品的振幅和相位信息, 而结构光照明荧光显微 (尤其是借助荧光标记) 可以更好地呈现样品特定的功能结构. 因此, 采用本文所提的结构光照明相位/荧光双模式显微技术可以获得待测样品更全面的信息.

5 总 结

本文提出了一种基于 DMD 的结构光照明相位/荧光双模式显微技术, 利用该装置可以获得待测样品 (相位和荧光) 双模式图像信息. 在传统相位重建方法中引入了针对环境扰动对相位成像影响的数值补偿方法, 提高了相位测量精度. 高分辨相位显微成像方法可以对透明样品进行无标记、高衬度、高分辨率成像. 超分辨荧光显微成像方法借助荧光标记, 可以看到样品中特定的功能结构. 将以上两种方法结合可以获得样品的多维信息, 更有利于科研人员对样品结构和特性的深入研究. 在接下来的工作研究中将继续开展基于结构光照明的光学断层扫描成像, 获得透明样品的三维折射率分布.

参考文献

- [1] Shin S, Kim K, Yoon J, Park Y K 2015 *Opt. Lett.* **40** 5410
- [2] Popescu G, Ikeda T, Dasari R R, Feld M S 2006 *Opt. Lett.* **31** 775
- [3] Yoon J, Kim K, Park H, Choi C, Jang S, Park Y 2015 *Biomed. Opt. Express* **6** 3856
- [4] Yoon J, Kim K, Kim M H, Jo Y, Kang S J, Park Y 2015 *Asia Communications and Photonics Conference 2015*, Hong Kong, China, November 19, 2015 ASu2A.159
- [5] Ma Y, Dai T, Lei Y, Zheng J, Liu M, Sui B, Smith Z J, Chu K, Kong L, Gao P 2022 *Opt. Express* **30** 9505
- [6] Zhuo K Q, Wang Y, Wang Y, Wen K, Liu M, Ma Y, Zheng J J, Gao P 2021 *Front. Phys.* **9** 689
- [7] Schnars U, Jüptner W 1994 *Appl. Opt.* **33** 179
- [8] Goodman J W, Lawrence R 1967 *Appl. Phys. Lett.* **11** 77
- [9] Kim M K 2009 *J. Photon. Energy* **1** 8005
- [10] Osten W, Faridian A, Gao P, Körner K, Naik D, Pedrini G, Singh A K, Takeda M, Wilke M 2014 *Appl. Opt.* **53** G44
- [11] Gao P, Yuan C J 2022 *Light: Adv. Manuf.* **3** 105
- [12] Kuznetsova Y, Neumann A, Brueck S R J 2008 *J. Opt. Soc. Am. A* **25** 811
- [13] Schwarz C J, Kuznetsova Y, Brueck S R J 2003 *Opt. Lett.* **28** 1424
- [14] Cheng C J, Lai X J, Lin Y C, Tu H Y 2013 *IEEE 4th International Conference on Photonics (ICP)*, Malaysia Melaka, October 28–30, 2013 pp215–217
- [15] Xin W Y, Sha G, Yong W D, Wen L Q, Rong L, Jie Z 2016 *Opt. Commun.* **366** 81
- [16] Gao P, Pedrini G, Osten W 2013 *Opt. Lett.* **38** 1328
- [17] Chowdhury S, Eldridge W J, Wax A, Izatt J 2017 *Optica* **4** 537
- [18] Zheng J, Pedrini G, Gao P, Yao B, Osten W 2015 *J. Opt.* **17** 085301
- [19] Latychevskaia T, Fink H W 2013 *Opt. Express* **21** 7726
- [20] Rong L, Latychevskaia T, Wang D, Zhou X, Huang H, Li Z, Wang Y 2014 *Opt. Express* **22** 17236
- [21] Di J, Zhao J, Jiang H, Zhang P, Fan Q, Sun W 2008 *Appl. Opt.* **47** 5654
- [22] Conchello J A, Lichtman J W 2005 *Nat. Methods* **2** 920
- [23] Rust M J, Bates M, Zhuang X 2006 *Nat. Methods* **3** 793
- [24] Fölling J, Bossi M, Bock H, Medda R, Wurm C A, Hein B, Jakobs S, Eggeling C, Hell S W 2008 *Nat. Methods* **5** 943
- [25] Liu Y J, Lu Y Q, Yang X S, Zheng X L, Wen S H, Wang F, Vidal X, Zhao J B, Liu D M, Zhou Z G, Ma C S, Zhou J J, Xi P, Jin D Y 2017 *Nature* **543** 229
- [26] Török P, Munro P 2004 *Opt. Express* **12** 3605
- [27] Kim Y D, Ahn M K, Kim T, Yoo H, Gweon D G 2012 *Meas. Sci. Technol.* **23** 105403
- [28] Chen L, Huang X, Fan J, Li L, Shan T 2018 *Nat. Biotechnol.* **36** 451
- [29] Wen K, Gao Z, Fang X, Liu M, Zheng J, Ma Y, Zalevsky Z, Gao P 2021 *Opt. Express* **29** 33679
- [30] Lal A, Shan C, Xi P 2016 *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **22** 50
- [31] Brown P T, Kruthoff R, Sedorf G J, Shepherd D P 2021 *Biomed. Opt. Express* **12** 3700

Phase/fluorescence dual-mode microscopy imaging based on structured light illumination*

Gao Zhao-Lin Liu Rui-Hua Wen Kai Ma Ying[†] Li Jian-Lang Gao Peng[‡]

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

(Received 26 July 2022; revised manuscript received 26 August 2022)

Abstract

Quantitative phase microscopy (QPM) is a label-free imaging technique often employed for long-term, high-contrast imaging of live bio-samples. Yet, QPM is not specific to a certain subcellular organelle. As a remedy, fluorescence microscopy can visualize specific subcellular organelles once being labeled with fluorescent markers. In this paper, a high-resolution phase/fluorescence dual-modality microscopic imaging method based on structured light illumination is proposed. In a dual-modality microscopic system, periodic stripes are generated by a digital micromirror array (DMD), and are used as the common illumination for both modalities. For QPM imaging, the holograms of the sample under structured light illuminations from different directions and phase shifts are recorded, from which a quantitative phase image with resolution enhancement can be reconstructed via a synthetic aperture procedure. Furthermore, a numerical approach is proposed to compensate for the environmental disturbances that often challenge aperture synthesis of phase imaging. This method determines each time the phase distortions caused by environmental disturbances through using the spectrum of the 0th order of the structured light illumination, and the phase distortions are removed from the phase distributions of the waves along the 0th and the ± 1 st diffraction orders. Resolution enhancement of QPM imaging is realized by synthesizing the spectra of all the waves along different diffraction orders of the structured light illuminations of different orientations. With phase images, three-dimensional shapes, inner structures, or refractive index distributions of transparent and translucent samples can be obtained. For fluorescence imaging, intensity images (moire patterns) of the sample under different structured light illuminations are recorded. The spectra along different diffraction orders are separated by using a phase shifting reconstruction algorithm, and are shifted to their original positions, forming a synthesized spectrum that is much broader than the spectra of raw intensity images (NA-limited spectra). An inverse Fourier transform on the synthesized spectrum yields a super-resolution fluorescence image of the sample. With the reconstructed fluorescence images, specific subcellular organelles labeled with fluorescent markers can be visualized. The combination of quantitative phase microscopy and fluorescence microscopy can obtain multidimensional information about the sample. In this dual-mode imaging system, the spatial resolution of quantitative phase imaging and fluorescence imaging are 840 nm and 440 nm, respectively. The proposed dual-mode microscopy imaging technique has been demonstrated for imaging fluorescent beads, fly wings, spring/rice leaves, mouse tail transection, and fluorescence-stained SiHa cells. We envisage that this method can be further applied to many fields, such as biomedicine, industry, and chemistry.

Keywords: structured illumination, dual-modality imaging, quantitative phase microscopy, resolution enhancement, phase compensation

PACS: 42.30.Rx, 42.68.Sq, 42.25.Kb, 42.30.-d

DOI: 10.7498/aps.71.20221518

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 62075177, 62105251), the National Key Research and Development Program of China (Grant Nos. 2022YFE0100700, 2021YFF0700300), the Key Laboratory of Wuliangye-flavor Liquor Solid-state Fermentation, China National Light Industry (Grant No. 2019JJ012), the Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (Grant Nos. QTZX22039, XJS210503), the Natural Science Foundation of Shaanxi Province, China (Grant No. 2021JQ-184), and the Exchange Program Between China and Poland (Grant No. 2021-2022)..

[†] Corresponding author. E-mail: yingma@xidian.edu.cn

[‡] Corresponding author. E-mail: peng.gao@xidian.edu.cn



结构光照明相位/荧光双模式显微技术

高兆琳 刘瑞桦 温凯 马英 李建郎 郜鹏

Phase/fluorescence dual-mode microscopy imaging based on structured light illumination

Gao Zhao-Lin Liu Rui-Hua Wen Kai Ma Ying Li Jian-Lang Gao Peng

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 71, 244203 (2022) DOI: 10.7498/aps.71.20221518

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.71.20221518>

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

基于希尔伯特变换的结构光照明快速三维彩色显微成像方法

Fast structured illumination three-dimensional color microscopic imaging method based on Hilbert-transform

物理学报. 2020, 69(12): 128701 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200352>

基于单一分光棱镜干涉仪的双通路定量相位显微术

Dual-channel quantitative phase microscopy based on a single cube beamsplitter interferometer

物理学报. 2018, 67(14): 140704 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20172722>

结构光照明技术在二维激光诱导荧光成像去杂散光中的应用

Structured illumination for two-dimensional laser induced fluorescence imaging to eliminate stray light interference

物理学报. 2019, 68(21): 218701 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20190977>

平场复用多焦点结构光照明超分辨显微成像

Flat-field multiplexed multifocal structured illumination super-resolution microscopy

物理学报. 2022, 71(4): 048704 <https://doi.org/10.7498/aps.71.20211712>

结合虚拟单像素成像解卷积的双边照明光片荧光显微技术

Dual-sided illumination light-sheet fluorescence microscopy with virtual single-pixel imaging deconvolution

物理学报. 2022, 71(2): 028701 <https://doi.org/10.7498/aps.71.20211358>

基于分数阶螺旋相位片的定量相位显微成像

Quantitative phase microscopy imaging based on fractional spiral phase plate

物理学报. 2021, 70(15): 158702 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20201884>