

## 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

胡金虎 林丹樱 张炜 张晨爽 屈军乐 于斌

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

Hu Jin-Hu Lin Dan-Ying Zhang Wei Zhang Chen-Shuang Qu Jun-Le Yu Bin

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 71, 028701 (2022) DOI: 10.7498/aps.71.20211358

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.71.20211358>

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>

#### 基于电动可调焦透镜的大范围快速光片显微成像

High-speed and large-scaled light-sheet microscopy with electrically tunable lens

物理学报. 2020, 69(8): 088701 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20191908>

#### 受激辐射损耗超分辨显微成像系统研究的新进展

New advances in the research of stimulated emission depletion super-resolution microscopy

物理学报. 2020, 69(10): 108702 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200168>

#### 基于Hadamard矩阵优化排序的快速单像素成像

Fast single-pixel imaging based on optimized reordering Hadamard basis

物理学报. 2019, 68(6): 064202 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20181886>

#### 偏振成像激光雷达与短波红外复合光学接收系统设计与分析

Design and analysis of polarization imaging lidar and short wave infrared composite optical receiving system

物理学报. 2020, 69(24): 244202 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200920>

#### 基于数字微镜器件的数字线扫描荧光显微成像技术

Digital line scanning fluorescence microscopy based on digital micromirror device

物理学报. 2020, 69(23): 238701 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200908>

# 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\*

胡金虎<sup>1)</sup> 林丹樱<sup>1)†</sup> 张炜<sup>2)</sup> 张晨爽<sup>1)</sup> 屈军乐<sup>1)</sup> 于斌<sup>1)‡</sup>

1) (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)

2) (佛山职业技术学院机电工程学院, 佛山 528137)

(2021 年 7 月 22 日收到; 2021 年 9 月 3 日收到修改稿)

光片荧光显微术 (light-sheet fluorescence microscopy, LSFM) 采用薄片光束从侧面激发样品, 在垂直于光片方向上进行成像, 具有成像速度快、光学层析能力强以及光漂白和光毒性低等优点, 适用于对较大活体生物样品进行高质量、长时间三维动态观测. 然而, 传统高斯光束 LSFM 存在分辨率低和成像视场小的问题. 本文在双边照明 LSFM 的基础上, 结合虚拟单像素成像解卷积技术, 提出了一种大视场高分辨双边照明 LSFM, 实现了视场和分辨率的同时提升. 设计和搭建了双边照明 LSFM, 开展了荧光珠和转基因斑马鱼样品的三维光切片显微成像实验, 实验结果证明了系统的三维高分辨成像能力, 对于大视场、高分辨 LSFM 的发展和应用具有重要意义.

**关键词:** 光片荧光显微术, 虚拟单像素成像, 解卷积, 三维成像

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

**DOI:** 10.7498/aps.71.20211358

## 1 引言

光片荧光显微术 (light-sheet fluorescence microscopy, LSFM), 也称选择性平面照明显微术 (selective plane illumination microscopy, SPIM)<sup>[1]</sup>, 它采用激发光路与探测光路相互垂直的特殊设计, 即利用薄片光束从侧面激发样品, 并通过垂直光片方向的显微物镜和探测器获取照明层面的荧光图像, 从而避免非成像平面的荧光信号干扰, 实现厚样品的三维层析成像. 与同样具有光学层析成像能力的共聚焦及双光子荧光显微成像技术相比, LSFM 采用光片面照明宽场成像取代点扫描成像方式, 成像速度快, 样品受光照时间大幅缩短, 光

漂白和光毒性低, 适用于对较大活体生物样品进行高质量、长时间三维动态观测. 目前, LSFM 已被广泛应用于细胞生物学、发育生物学和神经生物学等领域的研究<sup>[2]</sup>.

早期 LSFM 或 SPIM 中的照明光片一般是由高斯光束通过狭缝和柱面镜聚焦产生的<sup>[3,4]</sup>, 能量利用率低, 且光片沿传播方向的强度不均匀, 容易受样品吸收和散射影响, 光片有效照明深度有限, 成像视场较小. Swoger 等<sup>[5]</sup>和 Krzic 等<sup>[6]</sup>提出了双边照明 LSFM, 利用两个相反方向的高斯光片同时激发样品, 成功减少了散射的影响, 提升了照明深度, 扩大了成像视场. 2008 年, Keller 等<sup>[7]</sup>提出利用高斯光束快速扫描形成虚拟光片以进一步改善高斯光片的光强均匀性, 不仅光能利用率高 (可达

\* 国家自然科学基金 (批准号: 61975131, 61775144, 61835009) 和深圳市基础研究项目 (批准号: JCYJ20200109105411133, JCYJ20170412105003520, JCYJ20180305125649693) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: dylin@szu.edu.cn

‡ 通信作者. E-mail: yubin@szu.edu.cn

95%), 还可以生成多种类型的光片. 但由于扫描速度很快, 需要比静态高斯光片更高的峰值激发功率. 随后 LSFM 研究进入一个高速发展阶段, 各种新型的 LSFM 相继出现, 并被广泛应用于斑马鱼、果蝇等模式生物的发育过程研究<sup>[8,9]</sup>.

然而这些基于高斯光束的 LSFM 技术在应用于强散射的活体组织等厚样品成像时, 其视场和分辨能力仍十分有限. 为此, 贝塞尔光束、艾里光束等无衍射光束被相继应用于产生数字扫描的照明光片并较好地解决了 LSFM 视场受限的问题<sup>[10–13]</sup>. 但无衍射光束光片存在旁瓣, 会导致非焦平面的样品激发, 既降低了成像质量, 又增大了对样品的光毒性, 因此需要设法消除其影响<sup>[14]</sup>. 此外, 也有文献<sup>[15]</sup>报道了利用平铺拼接的方法实现了大视场成像. 为了进一步提高 LSFM 的空间分辨率, 研究人员还将 LSFM 与多种超分辨荧光显微术结合<sup>[16–23]</sup>, 以期实现对活体生物厚样品的超高时空分辨显微成像. 例如, 2014 年, Betzig 研究组<sup>[24]</sup>发明了晶格光片显微术 (lattice light-sheet microscopy, LLSM), 利用贝塞尔光学晶格大幅减小了光片厚度并抑制了旁瓣, 提升了 LSFM 的层析能力和扫描速度, 结合结构光照明超分辨技术, LLSM 可成功以较高的时空分辨率研究活细胞内甚至活体组织内的动力学过程. 然而, 受生物样品散射影响, 其典型的成像深度也只有 20  $\mu\text{m}$ , 限制了在活体厚样品中的应用, 且这种技术光学扫描系统复杂, 不便推广应用.

综上, 如何在保持 LSFM 成像速度快、光学层析能力强的优势基础上实现对厚样品的大视场、高分辨三维成像, 仍然是 LSFM 发展及其推广应用面临的关键问题. 研究和开发新型 LSFM 系统和方法, 进一步提升其性能, 使其更适用于活体厚样品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.

本课题组在前期研究工作中提出了一种新的宽场超分辨成像解卷积算法, 即虚拟单像素成像 (virtual single-pixel imaging, v-SPI)<sup>[25]</sup> 技术, 采用数字结构光模板调制宽场荧光图像, 并根据积分等量关系将虚拟调制图像转换为单像素成像数据, 进而结合单像素图像重构技术获得宽场超分辨图像. v-SPI 可将宽场荧光显微成像的横向分辨率提高 2 倍, 与传统结构光照明显微术可相比拟, 但由于只需采集单幅宽场图像, 成像速度至少提高了 9 倍. 在此基础上, 本文提出了基于 v-SPI 的大视场高分

辨双边照明 LSFM (dual-sided illumination LSFM, dLSFM) 成像方法和系统, 实现了传统高斯光束 LSFM 视场和分辨率的同时提升. 设计和搭建了 dLSFM 系统, 开展了荧光珠和斑马鱼样品的三维光切片显微成像实验, 验证了系统的分辨率和视场; 编制了 v-SPI 图像重构程序, 实现了厚样品的高分辨光切片层析成像和三维图像重构; 实验结果证明, 系统具有同时提升 LSFM 视场和分辨率的能力, 为高分辨率 LSFM 进一步发展及其在活体厚样品快速高分辨成像方面的应用提供理论和技术基础.

## 2 系统与方法

### 2.1 dLSFM 系统设计与搭建

所搭建的双边 LSFM 系统示意图如图 1 所示. 首先, 波长为 488 nm 的固体激光器 (Sapphire 488-200 CW CDRH, Coherent, ) 发出的激光束经透镜 L1 ( $f_1 = 25 \text{ mm}$ ) 和 L2 ( $f_2 = 250 \text{ mm}$ ) 扩束准直后经反射镜 M1、分束镜 BS 分为两束: 一束沿原方向传播, 经狭缝 MS1、柱透镜 CL1 聚焦后再经过照明物镜 IO1 (10 $\times$ /NA 0.3 水镜, 尼康) 形成光片; 另一束经反射镜 M2, M3 和 M4 后, 经狭缝 MS2 和柱透镜 CL2 进入照明物镜 IO2, 形成另一侧的光片. 其中, 两路光中狭缝、柱透镜和物镜的参数和相对位置保持相同, 且物镜的前焦面均要与柱透镜的后焦面重合, 光片的厚度和宽度可通过改变狭缝的宽度来调节. 这样, 两束激发光以相反方向汇入样品池, 生成的两束光片在同一焦面处对样品进行激发. 样品产生的荧光信号通过探测物镜 DO (40 $\times$ /NA 0.8 水镜, 尼康)、滤光片 F 和管镜 TL, 在高灵敏度 sCMOS 相机 (ORCA-Fusion BT, 像素数 2304  $\times$  2304, 像素尺寸 6.5  $\mu\text{m} \times$  6.5  $\mu\text{m}$ , 滨松) 上成像. 样品固定在一个 4D 微米位移台 (USB 4D-Stage, Picard Industries, ) 上, 可在电机系统控制下实现 X, Y, Z 和 R 方向上的移动, 实现成像区域的选择和轴向扫描三维成像.

### 2.2 光片性能参数分析

光片的厚度和宽度决定了 LSFM 的轴向分辨率和视场, 且二者相互制约, 由照明物镜的等效数值孔径  $NA_{\text{ill}}$  决定. 光片的厚度和宽度均随着  $NA_{\text{ill}}$  值的增大而减小, 即系统轴向分辨率提升的同时成

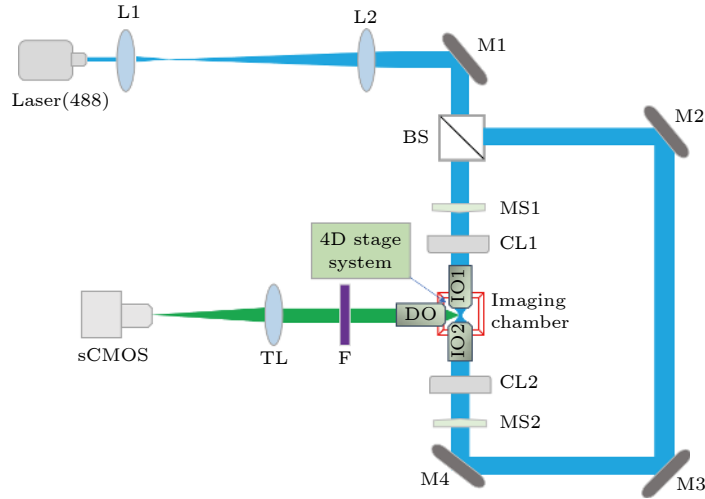
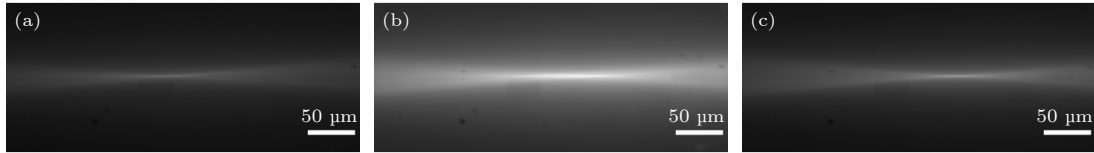


图 1 dLSFM 系统光路示意图

Fig. 1. Schematic diagram of the dLSFM system.


 图 2 用于厚度和宽度标定的光片侧视图 (a) 通道 I 单边照明时的光片; (b) 双边照明时的光片; (c) 通道 II 单边照明时的光片  
 Fig. 2. Side view images of light sheet for thickness and width calibration: (a) Single-sided illumination with the path I; (b) dual-sided illumination; (c) single-sided illumination with path II.

像视场变小. 理想的 LSFM 成像要求光片厚度尽可能薄且强度均匀, 因此如何生成厚度薄而视场大的光片一直以来都是 LSFM 追求的重要目标. 本文所搭建的双边照明 LSFM 系统, 与传统单边照明的高斯光束 LSFM 系统相比, 能在保持光片厚度不变的情况下扩大系统的视场, 还能通过改变狭缝的大小生成多种不同厚度和视场的光片, 来适应不同的样品成像. 在本文涉及的实验中, 狭缝的宽度设置为 6 mm, 则相应的照明物镜  $NA_{\text{ill}}$  值为 0.15. 可利用均匀罗丹明溶液对光片的光学参数进行标定. 此时需要将柱面镜旋转  $90^\circ$ , 使光片方向垂直于探测面, 从侧面采集光片图像, 结果如图 2 所示. 对其强度分布进行高斯拟合, 得到高斯光片束腰处的强度轮廓的半高宽 (full width at half maximum, FWHM) 厚度为  $1.9 \mu\text{m}$ , 单边照明时视场为  $53.8 \mu\text{m}$ , 双边同时照明时在光片厚度不变的情况下视场为  $106.3 \mu\text{m}$ , 近似为单边照明时的 2 倍.

### 2.3 超分辨图像重构方法

在宽场荧光显微成像中, 常用解卷积技术来滤除非焦面背景荧光噪声, 进而提高焦面图像的对比

度. 与传统的解卷积方法相比, v-SPI 方法除了提高图像对比度, 还可以显著提高图像的分辨率, 实现单帧宽场图像的超分辨重构<sup>[25]</sup>. 其基本原理基于如下积分等量关系:

$$\int (S * h) \cdot P = \int S \cdot (P * h), \quad (1)$$

其中  $S$  为理想像 (对应样品的真实分布),  $h$  为系统的点扩散函数,  $*$  表示卷积运算, 因此  $S * h$  为宽场图像;  $P$  为虚拟数字模板,  $\cdot$  表示点积运算,  $(S * h) \cdot P$  表示对宽场图像进行虚拟调制.

v-SPI 技术首先采用虚拟数字模板调制普通宽场荧光图像, 然后根据该积分等量关系将虚拟调制图像转换为单像素成像数据, 再结合单像素图像重构技术实现超分辨图像的重构. 根据采集的荧光图像、数字模板和系统点扩散函数计算出积分值和卷积模板. 因此, 可以采用 SPI 方程求解方法重构出待求的样品分布. 在实际样品重构过程中使用的是简单数字模板, 每个模板上仅有一个像素亮度轮流设置为 1, 其余像素亮度设置为 0. 在本文中, v-SPI 技术被用于改善 dLSFM 系统的空间分辨率, 从而达到同时提升 LSFM 视场和分辨率的目的.



### 3 成像结果与讨论

#### 3.1 系统分辨率标定

为了验证 dLSFM 系统的成像能力, 以直径 100 nm 的荧光珠为样品对该系统的分辨率进行标定. 在实验之前, 首先, 利用体积浓度为 1% 的琼脂糖溶液将原始荧光珠溶液 (TetraSpeck™ 微球, 0.1  $\mu\text{m}$ ,  $1.8 \times 10^{11}$  个/mL, ThermoFisher) 稀释 200 倍左右, 摇匀以后将混合溶液吸入到氟化乙烯丙烯 (FEP) 细管 (外径为 1.6 mm, 内径为 0.8 mm) 中, 在室温下放置 5 min 左右, 混合溶液成凝胶状态, 然后将 FEP 浸入到充满水的样品池中, 从 FEP 中推出荧光珠凝胶, 对荧光珠进行成像, 结果如图 3 所示. 选取视场范围内的若干荧光珠图像进行分析和统计, 以每个荧光珠强度分布曲线的 FWHM 作为其尺寸并进行统计分析 ( $N = 25$ ), 以其平均值表征系统的横向分辨率 (这里以  $X$  方向的分辨率为例). 荧光珠尺寸的统计直方图如图 3(b) 和

图 3(d) 所示, 其中前者为未采用 v-SPI 技术处理的结果, 荧光珠直径的平均值为  $407 \text{ nm} \pm 14 \text{ nm}$ , 后者为利用 v-SPI 处理后的结果, 荧光珠直径的平均值减小为  $300 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$ . 可见, 双边照明 LSFM 系统获取的光片荧光显微图像经 v-SPI 技术处理后, 横向分辨率提升了约 26%.

#### 3.2 成像视场验证

为了验证双边照明 LSFM 系统的成像视场, 选用心血管特异标记的转基因斑马鱼 (CZ62, s843 Tg/+, Tg(kdrl:EGFP), 国家斑马鱼资源中心) 作为实验样品进行成像. 图 4 所示为斑马鱼心脏附近血管结构的成像结果, 其中图 4(a) 为通道 I 成像结果, 图 4(b) 为双通道成像结果, 图 4(c) 为通道 II 成像结果. 从图 4 中可以可出, 单通道成像, 即采用单边照明时, 由于样品的散射, 照明光束的穿透深度有限, 成像视场受限; 而双边照明可以成倍地增加穿透深度, 扩大了系统的成像视场.

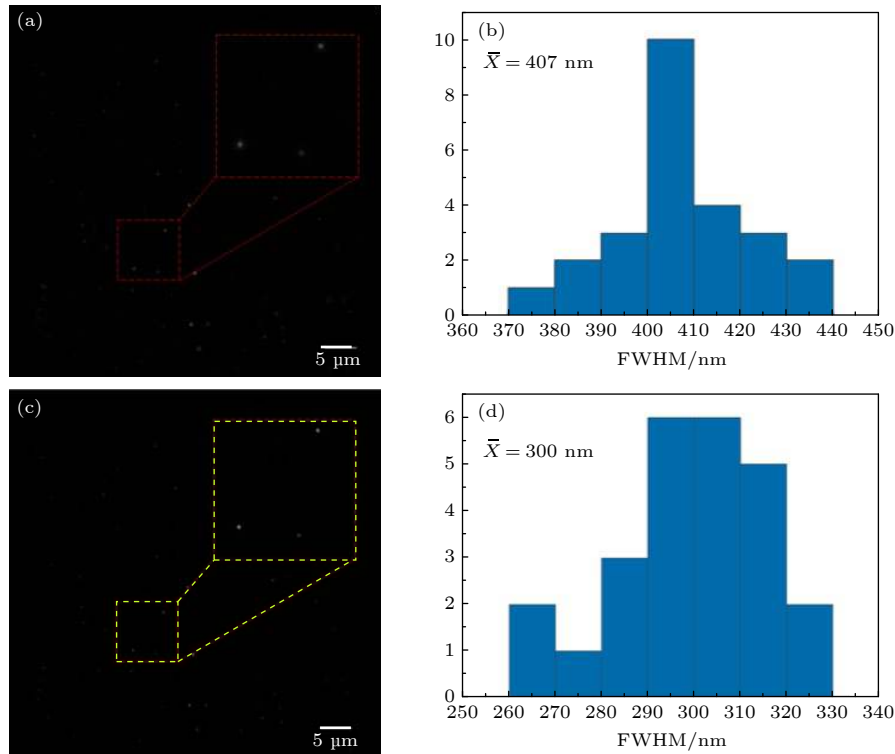


图 3 用于系统成像分辨率标定的直径 100 nm 荧光珠图像及其尺寸统计直方图 (a) 未经 v-SPI 处理的图像; (b) 图 (a) 中荧光珠沿  $X$  方向强度曲线 FWHM 的直方图分布 ( $N = 25$ ); (c) 经 v-SPI 处理的图像; (d) 图 (c) 中相同荧光珠沿  $X$  方向强度曲线 FWHM 的直方图分布;  $\bar{X}$  为平均值

Fig. 3. Images of 100-nm-diameter fluorescent beads for system resolution calibration: (a) Image without v-SPI processing; (b) the corresponding histogram distribution of the intensity profile FWHM from 25 fluorescent beads in  $X$  direction; (c) image with v-SPI processing; (d) the corresponding FWHM histogram distribution from the same beads in  $X$  direction;  $\bar{X}$  is the average value.

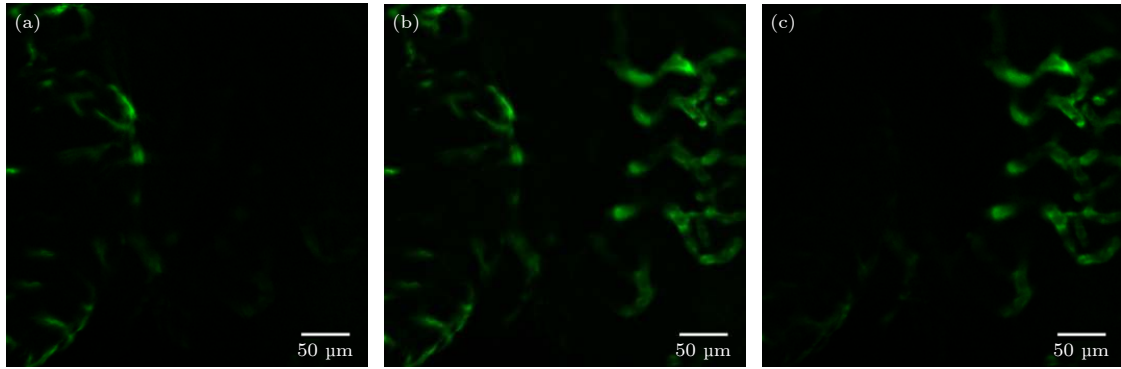


图4 斑马鱼血管结构的大视场成像 (a) 通道 I 单边照明成像; (b) 双边照明成像; (c) 通道 II 单边照明成像

Fig. 4. Large FOV imaging of vascular structures in a zebrafish: (a) Single-sided illumination imaging with path I; (b) dual-sided illumination imaging; (c) single-sided illumination imaging with path II.

进一步地, 通过比较双边照明 LSFM 系统获取的大视场生物样品图像在经过 v-SPI 技术处理前后的效果, 验证本文所提技术在同时提升视场和分辨率方面的能力, 结果如图 5 所示. 实验样品为神经系统特异性标记的转基因斑马鱼 (CZ79, ml3Tg/+, Tg(mnx1:mGFP), 国家斑马鱼资源中心). 图 5(a) 为 dLSFM 系统采集的未经特殊处理的原始图像, 图 5(b) 为采用传统 Richardson-Lucy (RL) 解卷积算法处理的图像, 图 5(c) 为采用 v-SPI 算法处理的图像, 图 5(d) 为对三个图像中划线的同一位置的归一化强度曲线. 对比图像 (图 5(c)) 和强度曲线 (图 5(d)) 可以明显看出, 双边照明 LSFM 系统获取的大视场生物样品图像经 v-SPI 技术处理后, 图像的对比度和分辨率均得到明显提升, 且效果比传统 RL 算法更好. 该结果同时也和前文 100 nm 荧光珠的分辨率标定结果相符合. 可见, 结合了 v-SPI 技术的双边照明 LSFM, 可以在实现大视场成像的前提下获得较高的分辨率, 即同时实现 LSFM 视场和分辨率的提升, 适合用于较厚生物样品的成像.

### 3.3 厚样品三维成像

为了验证系统对厚样品的三维成像能力, 利用上述神经系统特异标记的转基因斑马鱼作为样品进行成像, 通过微米位移台的轴向移动采集运动神经元的光切片数据并进行三维重构. 采集间隔为 1  $\mu\text{m}$ , 共采集 20 幅源图像进行三维重构, 结果如图 6 所示, 其中图 6(a)–(c) 为不同采集深度的二维图像, 图 6(d) 和图 6(e) 为三维重建后不同视角的效果图. 所有图像均已用 v-SPI 技术进行处理.

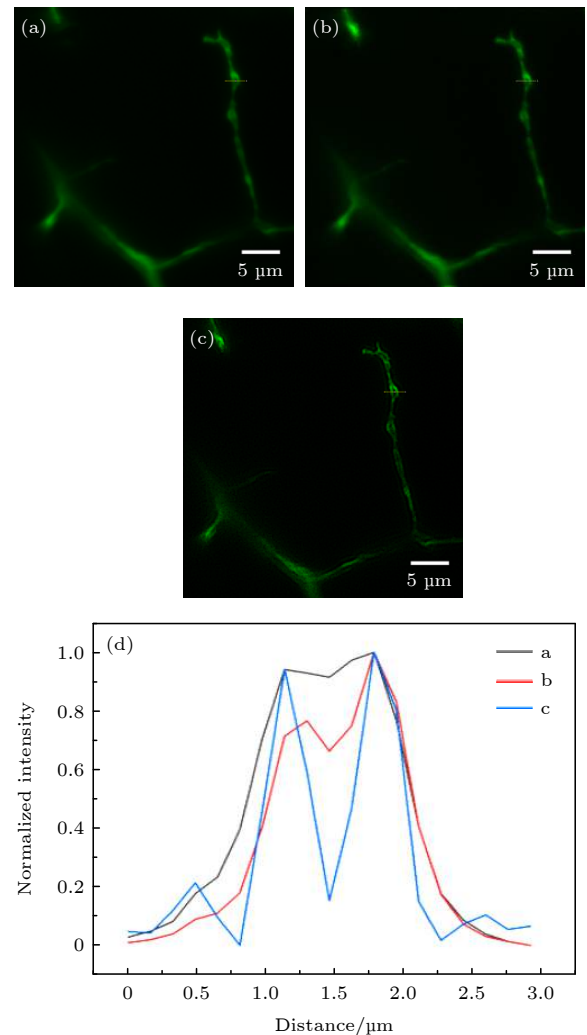


图5 斑马鱼运动神经元成像 (a) 未经特殊处理的图像; (b) RL 解卷积处理的图像; (c) v-SPI 处理图像; (d) 图 (a)–(c) 中黄色色实线标记位置的归一化强度曲线

Fig. 5. Images of motoneurons in a zebrafish: (a) Image without special processing; (b) image with RL deconvolution; (c) image with v-SPI processing; (d) normalized intensity profiles along the yellow solid lines in panels (a)–(c).

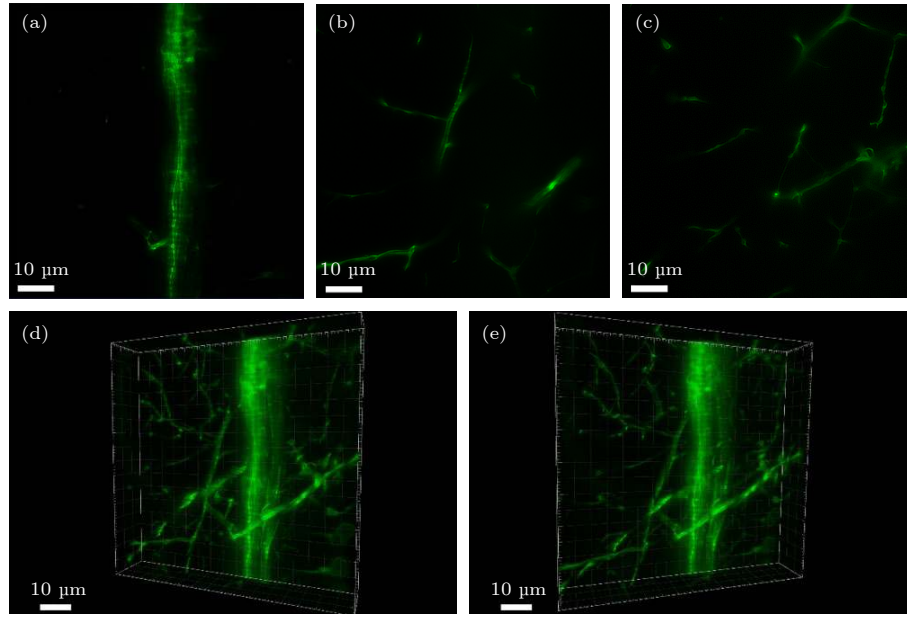


图6 斑马鱼运动神经元的三维成像 (a)–(c) 不同轴向位置拍摄的图像; (d), (e) 三维重建效果图

Fig. 6. Three-dimensional imaging of motoneurons in a zebrafish: (a)–(c) Images from different axial positions; (d), (e) three-dimensional reconstruction renderings.

## 4 结 论

本文将双边照明光片荧光显微技术与虚拟单像素成像技术相结合, 发展了一种大视场高分辨光片荧光显微成像技术, 相比传统高斯光束 LSFM, 可将视场扩大至原来的两倍 (达到约 100  $\mu\text{m}$ ), 同时可将系统横向分辨率提升约 26%, 并实现了对斑马鱼等较大生物样品的三维高分辨率层析成像, 为进一步开展活体生物样品快速高分辨成像以及生物样品的超分辨成像奠定了基础.

## 参考文献

- [1] Power R M, Huiskens J 2017 *Nat. Methods* **14** 360
- [2] Royer L A, Lemon W C, Chhetri R K, Wan Y N, Coleman M, Myers E W, Keller P J 2016 *Nat. Biotechnol.* **34** 1267
- [3] Voie A H, Burns D H, Spelman F A 1993 *J. Microsc.-Oxford* **170** 229
- [4] Huiskens J, Swoger J, Del Bene F, Wittbrodt J, Stelzer E H K 2004 *Science* **305** 1007
- [5] Swoger J, Huiskens J, Stelzer E H K 2003 *Opt. Lett.* **28** 1654
- [6] Krzic U, Gunther S, Saunders T E, Streichan S J, Hufnagel L 2012 *Nat. Methods* **9** 730
- [7] Keller P J, Schmidt A D, Wittbrodt J, Stelzer E H K 2008 *Science* **322** 1065
- [8] Truong T V, Supatto W, Koos D S, Choi J M, Fraser S E 2011 *Nat. Methods* **8** 757
- [9] Liu S, Nie J, Li Y S, Yu T T, Zhu D, Fei P 2017 *J. Innovative Opt. Health. Sci.* **10** 1743006
- [10] Planchon T A, Gao L, Milkie D E, Davidson M W, Galbraith J A, Galbraith C G, Betzig E 2011 *Nat. Methods* **8** 417
- [11] Gao L, Shao L, Chen B C, Betzig E 2014 *Nat. Protoc.* **9** 1083
- [12] Vettenburg T, Dalgarno H I C, Nylk J, Coll-Lladó C, Ferrier D E K, Čížnár T, Gunn-Moore F J, Dholakia K 2014 *Nat. Methods* **11** 541
- [13] Yang Z Y, Prokopas M, Nylk J, Coll-Lladó C, Gunn-Moore F J, Ferrier D E K, Vettenburg T, Dholakia K 2014 *Biomed. Opt. Express* **5** 3434
- [14] Jia H, Yu X H, Yang Y L, Zhou X, Yan S H, Liu C, Lei M, Yao B L 2019 *J. Biophotonics* **12** e201800094
- [15] Gao L 2015 *Opt. Express* **23** 6102
- [16] Westphal V, Rizzoli S O, Lauterbach M A, Kamin D, Jahn R, Hell S W 2008 *Science* **320** 246
- [17] Li D, Shao L, Chen B C, Zhang X, Zhang M S, Moses B, Milkie D E, Beach J R, Hammer J A, Pasham M, Kirchhausen T, Baird M A, Davidson M W, Xu P Y, Betzig E 2015 *Science* **349** aab3500
- [18] 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
- [19] Rust M J, Bates M, Zhuang X W 2006 *Nat. Methods* **3** 793
- [20] Dertinger T, Colyer R, Iyer G, Weiss S, Enderlein J 2009 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106** 22287
- [21] Zanicchi F C, Lavagnino Z, Donnorso M P, Del Bue A, Furia L, Faretta M, Diaspro A 2011 *Nat. Methods* **8** 1047
- [22] Liu Z, Lavis L D, Betzig E 2015 *Mol. Cell* **58** 644
- [23] Legant W R, Shao L, Grimm J B, Brown T A, Milkie D E, Avants B B, Lavis L D, Betzig E 2016 *Nat. Methods* **13** 359
- [24] Chen B C, Legant W R, Wang K, Shao L, Milkie D E, Davidson M W, Janetopoulos C, Wu X F S, Hammer J A, Liu Z, English B P, Mimori-Kiyosue Y, Romero D P, Ritter A T, Lippincott-Schwartz J, Fritz-Laylin L, Mullins R D, Mitchell D M, Bembek J N, Reymann A C, Bohme R, Grill S W, Wang J T, Seydoux G, Tulu U S, Kiehart D P, Betzig E 2014 *Science* **346** 439
- [25] Zhang W, Li S W, Yang Z G, Yu B, Lin D Y, Xiong J, Qu J L 2020 *Biomed. Opt. Express* **11** 3648

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

Hu Jin-Hu<sup>1)</sup> Lin Dan-Ying<sup>1)†</sup> Zhang Wei<sup>2)</sup> Zhang Chen-Shuang<sup>1)</sup>  
 Qu Jun-Le<sup>1)</sup> Yu Bin<sup>1)‡</sup>

1) (*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*)

2) (*College of Electromechanical Engineering, Foshan Polytechnic, Foshan 528137, China*)

( Received 22 July 2021; revised manuscript received 3 September 2021 )

## Abstract

In light-sheet fluorescence microscopy (LSFM) a thin light sheet is used to excite the specimen from the side and imaging is performed in the direction perpendicular to the light-sheet. It has the advantages of fast imaging speed, high optical sectioning capability and low photobleaching and phototoxicity to samples. Therefore, it is suitable for high-quality, long-term three-dimensional dynamic observation of large living biological samples. However, the traditional Gaussian light sheet illumination microscopy technology has the problems of small imaging field of view and low spatial resolution. Based on the existing dual-sided illumination LSFM, a large field of view and high resolution LSFM combined with virtual single-pixel imaging deconvolution is presented in this paper, which improves the field of view and resolution of LSFM simultaneously. The relevant microscope is designed and built, and three-dimensional optical sectioning imaging experiments on fluorescent beads and transgenic zebrafish standard samples are carried out. The experimental results prove the three-dimensional high resolution imaging capability of the microscope, which is of great significance in developing the large field of view and high resolution LSFM.

**Keywords:** light-sheet fluorescence microscopy, virtual single-pixel imaging, deconvolution, three-dimensional imaging

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

**DOI:** 10.7498/aps.71.20211358

\* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 61975131, 61775144, 61835009) and the Basic Research Project of Shenzhen, China (Grant Nos. JCYJ20200109105411133, JCYJ20170412105003520, JCYJ20180305125649693).

† Corresponding author. E-mail: [dylin@szu.edu.cn](mailto:dylin@szu.edu.cn)

‡ Corresponding author. E-mail: [yubin@szu.edu.cn](mailto:yubin@szu.edu.cn)