文章编号　2095-1531(2018)03-0329-08

双色荧光辐射差分超分辨显微系统研究

张智敏,匡翠方*,王子昂,朱大钊,陈友华,李传康,刘文杰,刘　旭
(浙江大学 光电科学与工程学院,浙江 杭州 310058)

摘要:为了拓展荧光辐射差分(Fluorescence Emission Difference,FED)显微术的应用,使得该方法可以同时对生物样品的不同组织结构进行超分辨成像,本文对双色 FED 显微系统展开了研究。FED 的基本原理是将实心光斑扫描得到的共焦显微图像减去空心光斑扫描得到的负共焦图像,以此获得超分辨显微图像。在对单色 FED 显微系统进行研究后,本文提出了一种可行的双色 FED 显微成像系统方案。实验结果表明,在 488 nm 和 640 nm 激发光下,该系统在荧光颗粒上分别实现了 135 nm 和 160 nm 的空间分辨率,另外也能对生物样品的不同组织进行多色同时超分辨显微成像,满足了实际应用的要求。

关　键　词:光学显微;衍射极限;荧光;荧光辐射差分;超分辨
中图分类号:TH742　　**文献标识码:**A　　doi:10.3788/CO.20181103.0329

Dual-color fluorescence emission difference super-resolution microscopy

ZHANG Zhi-min, KUANG Cui-fang*, WANG Zi-ang, ZHU Da-zhao,
CHEN You-hua, LI Chuan-kang, LIU Wen-jie, LIU Xu
(*College of Optical Science and Engineering*, *Zhejiang University*, *Hangzhou* 310058, *China*)
* *Corresponding author*, *E-mail*: *cfkuang@zju.edu.cn*

Abstract: To perform super-resolution imaging of different tissue structures of biological samples using fluorescence radiation differential microscopy simultaneously, a dual-color FED microscopy system is studied in this paper. The basic principle of the FED is to remove the confocal microscopy image obtained by scanning the solid spot from the confocal microscopy image obtained by scanning the hollow spot to obtain a super-resolution microscopy image. Based on the study of the monochromatic FED microscopy system, a feasible dual-color FED microscopy imaging system is proposed and imaging experiments are performed on fluorescent particles in this paper. The experimental results indicate that under excitation light of 488nm and 640nm, the system realizes spatial resolution of 135 nm and 160 nm of the fluorescent particles respectively. In addition, this system

收稿日期:2018-01-11;**修订日期:**2018-03-05
基金项目:国家重大科学仪器设备开发资助项目(No. 2016YFF0101401)
Supported by National Key Scientific Instrument and Equipment Development Projects of China (No. 2016YFF0101401)

can also perform multi-color super-resolution microscopy imaging simultaneously on different tissues of biological samples, which meets the requirements of practical applications.

Key words: optical microscopy; diffraction limit; fluorescence; fluorescence emission difference (FED); super-resolution

1 引 言

光学显微术作为一门古老的成像技术,为人们打开了一扇通往微观世界的大门,极大地丰富了人们的视界,拓展了人类的认知边界。随着科学技术的不断发展,人们对超高分辨率的显微图像的要求也越来越高,尤其是像生物医学、材料科学等需要对亚百纳米尺度微观结构进行观测和分析的领域更是如此[1]。然而由于阿贝衍射极限的存在,即便是共焦荧光显微技术,其空间分辨率也只能达到半波长左右,无法满足人们对于亚百纳米结构成像的要求[2]。20 世纪 90 年代,Stefan. W. Hell 提出了一种全新的可突破衍射极限的显微方法---荧光受激辐射损耗(Stimulated Emission Depletion,STED)显微成像技术。该方法可以将原先的极限分辨率提高 4.5 倍。STED 技术虽然可以极大地提高显微成像分辨率,但是其过高的损耗调制光容易发生荧光漂白,损坏生物样品[3-4]。2012 年,浙江大学匡翠方教授的超分辨显微研究组提出了一种新的超分辨显微技术---荧光辐射差分(Fluorescence Emission Difference, FED)显微术。该方法是将实心光斑扫描得到的共焦图像减去空心光斑扫描得到的负共焦图像实现的超分辨显微[5-6],其优势在于仅利用单色光便可实现突破衍射极限实现超分辨显微,另外由于其只需要激发荧光样品发射荧光而不用进行受激辐射损耗,其光毒性和荧光漂白相比 STED 技术要弱很多,有利于对样品的长期观测。为了拓展 FED 显微成像的应用能力,本文在单色 FED 的基础上进一步研究并设计出了双色 FED 显微系统,在荧光颗粒上分别实现了 488 nm 激发光和 640 nm 激发光下 135 nm 和 160 nm 的空间分辨率,于此同时也对生物样品进行了多色同时成像,满足了同时观测和研究生物样品不同组织结构的应用要求。

2 原 理

荧光辐射差分显微术的基本原理是将两幅由不同照明光斑获得的共焦荧光显微图像进行相减,即将一幅由实心激发光斑扫描得到的共焦荧光图像减去一幅由空心激发光斑扫描得到的负共焦荧光图像[7-11],图 1 为 FED 原理图解。

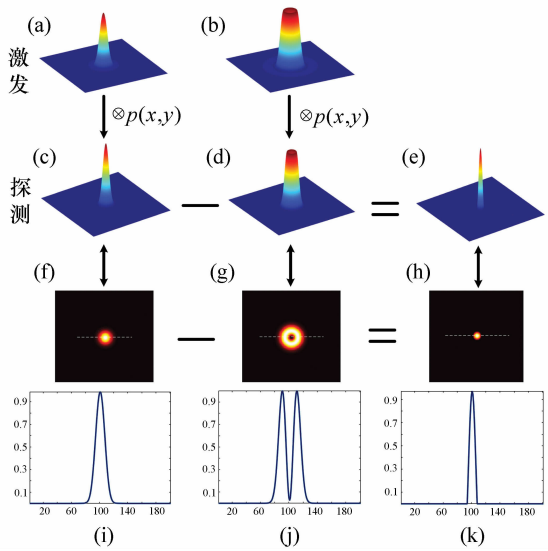


图 1 FED 原理图解:(a),(b)分别为激发的实心光斑和空心光斑的 PSF 三维图;(c),(d)为探测的实心光斑和空心光斑的 PSF 三维图;(e)为 FED 的 PSF 三维图;(f),(g),(h)分别为(c),(d),(e)的平面图;(i),(j),(k)分别为(f),(g),(h)在虚线处的截面图

Fig. 1 Illustration of FED theory. (a) PSF of confocal excited pattern; (b) PSF of negative confocal excited pattern; (c) PSF of confocal image; (d) PSF of negative confocal image; (e) PSF of FED image; (f), (g), (h) the plane graph of (c), (d) and (e); (i), (j), (k) the sectional drawing along the dash line of (f), (g) and (h)

空心光斑由 0 ~2π 涡旋相位板调制产生,其

调制函数如公式(1)所示[6]:

$$P(\phi) = \phi \ , \tag{1}$$

式中,ϕ 为入射光束上一点位置矢量与水平方向的夹角。当调制后光束经二分之一波片和四分之一波片形成圆偏光后聚焦到焦平面时便会产生面包圈型空心光斑。最终的 FED 超分辨显微图像由公式(2)所示[5]:

$$I_{\mathrm{FED}} = I_c - \gamma \cdot U_{\mathrm{d}}, \tag{2}$$

式中,I_c、I_{d} 和 I_{FED} 为归一化的强度分布图,I_c 为归一化共焦强度图,I_{d} 为归一化负共焦强度图,I_{FED} 为归一化的 FED 图像强度图,γ 为小于等于 1 的 FED 校准系数。共焦图像的点扩散函数可有公式(3)得出[5,12]:

$$PSF_{\mathrm{c}} = PSF_{\mathrm{e}} \times PSF_{\mathrm{f}} \otimes p(x,y) \ , \tag{3}$$

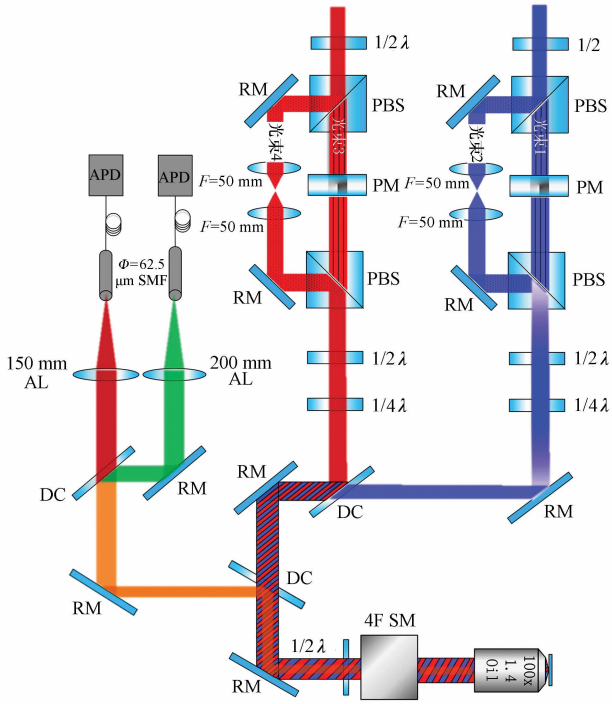
式中,PSF_{c} 表示共焦图像的 PSF,如图 1(c)所示,PSF_{e} 表示激发光经过物镜的 PSF,如图 1(a)所示,PSF_{f} 表示荧光经过物镜的 PSF,$p(x,y)$ 表示小孔的传递函数。同理亦可得到图 1(d)的负共焦图像的 PSF_{d}。两幅图像相减后便可得到一幅 FED 显微图像,其 PSF 如图 1(e)所示。

从图 1 的原理解释中可以看出,理论上,γ 值越接近 1,PSF_{FED} 则会越小,这就意味着其分辨率越高,然而这也就意味着通过相减得到的 FED 图像的有用信息就会损失的越多,即信噪比越低。此外,目前在 FED 系数选择上并没有一个行之有效的评价标准,一般通过实际图像效果进行主观评判,通过多次实验得知,γ 值在 0.7 ~ 0.85 之间可以比较好的保证分辨率与信噪比。

3　光学系统与控制软件设计

3.1　光学系统设计

从图 2(a)双色 FED 系统图中可以看出,激



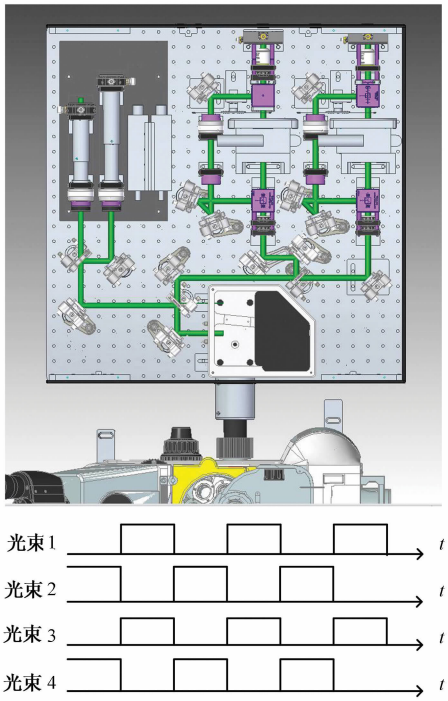


图 2　双色 FED 系统图与时序图(a)双色 FED 系统图,其中 PBS 为偏振分光镜,PM 为涡旋位相板,RM 为反射镜,DC 为二色镜,4F SM 为 4F 扫描模块,AL 为消色差透镜,SMF 为保偏光纤;(b)系统 CAD 设计图;(c)扫描时序图

Fig. 2　Scheme and sequence chart of dual color FED system. (a) Dual color FED system, PBS: polarizing beam splitter, PM: vortex phase mask, RM: reflect mirror, DC: dichroic beam splitter, 4F SM: 4F Scanning Module, AL: achromatic lens, SMF: single-mode polarization maintain fiber; (b) CAD of the system; (c) scan sequence chart

发光需先经过二分之一波片,保证了通过 PBS 后的分光比尽量达到 1∶1,而未经过位相板调制的光路由于其光程相对较长,因此需要一对焦距为 50 mm 的透镜组成的 4F 成像系统做中继透镜,保证了出射光为平行光。在调制光路部分,我们选用了 Vortex Phase Plate RPC Photonics 公司的 VPP-1a 和 VPP-m633 两种涡旋位相板来调制 488 nm和 640 nm 激发光。为了形成圆偏光,调制光和未调制光经过一个 PBS 合束后仍需经过 1/2 波片和 1/4 波片。需要注意的是,激发光在经过 4F 扫描系统之前需要用一片 1/4 波片进行圆偏振矫正,因为激发光通过了多片二色镜和反射镜,其偏振状态会受到影响,为了保证激发光的圆偏振状态,在入射 4F 扫描系统前需进行圆偏振矫正。在该系统的显微镜架和物镜镜头选择上,我们采用了国产永新光学有限公司提供的 N-900 科研级显微镜架和 Nikon 公司提供的 100 ×/1.49 油浸显微物镜。为了满足系统实时扫描成像的要求,本系统使用了自主设计的反射式 4f 电流计式振镜扫描模块,该模块由 1 块焦距为 50 mm 的扫描透镜,2 块焦距分别为 50 mm 和 100 mm 的凹面反射镜以及 Cambridge Technology 公司的 8310k 振镜模块构成,不同焦距的凹面镜不仅可以消除色差的影响,也可在一定程度上缩小量程,使得该扫描模块更加紧凑。

在探测路部分,我们将光纤探头同时作为小孔以及荧光收集器,为了平衡信噪比和分辨率的要求,小孔大约为 0.7 个艾里斑为宜,而艾里斑的计算公式[2]为:

$$\delta = M \times 1.22 \times \lambda / NA \ , \qquad (4)$$

式中,δ 为艾里斑直径,λ 为波长,NA 为物镜数值孔径,M 为系统放大倍数。

由 488 nm 和 640 nm 激发的荧光波长大约为 530 nm 和 670 nm,根据公式(4),可求出这两种荧光在未被放大前的艾里斑直径,大约为434 nm 和 549 nm。经 100 放大后,该艾里斑在后焦面上的大小分别为43.4 μm和 54.9 μm。扫描模块内包含了一个 50 mm 的扫描透镜以及由50 mm和 100 mm 凹面反射镜组成的 4f 系统,因为光纤头的口径被固定为 62.5 μm,为了保证光纤口作为小孔大概能达到 0.7 个艾里斑,在探测路上分别增加一个 200 mm 和 150 mm 的消色差透镜。最终艾里斑在探测终端的投影大小分别为 86.8 μm 和 82.4 μm,使得小孔分别达到了 0.72 个和 0.76 个艾里斑大小,满足匹配要求。

从原理上,可以知道,FED 显微术需要分别采集两种不同的共焦显微图——传统共焦荧光显微图像和负共焦显微图,因此需要对样品进行分时采样。图 2(c)展示了分时采样过程,首先利用实心光斑进行扫描成像,再利用空心光斑进行扫描成像,最后按照公式(2)将两幅图像进行相减操作便可得到 FED 显微图像。需要注意的是,因为 FED 原理上是实心光斑减空心光斑,所以系统的实心光斑与空心光斑在图像上是要重合的。如果实心光斑和空心光斑不重合,则会导致 FED 的图像重心偏移,出现定位误差。因此,在调校系统时需要利用纳米颗粒对实心光斑和空心光斑进行来回切换分时成像,通过调整光路使得实心光斑和空心光斑重合,而振镜造成的定位误差较小,在实际成像中可忽略。

3.2 控制软件设计

为了能够实现实时采样和显示,本文利用 LabVIEW 编写了一套完整的控制与显示软件,可进行样品的实时显示功能。

该控制程序的主要难点有两点,一是激光扫描的控制方法,二是多硬件同步协调。图 3 为该系统采用的激光扫描控制算法。该方法为单向扫描控制算法,虽然执行效率不高,但较容易实现,是比较常用的共焦扫描控制方法。图 4 为软件控制流程图。

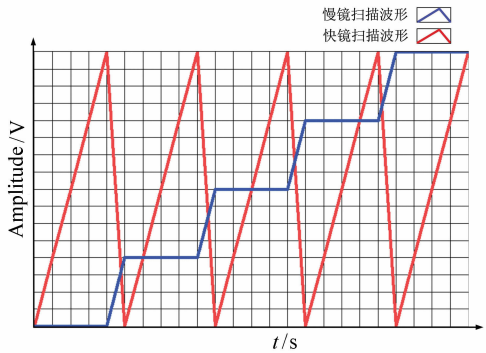


图 3 单向扫描控制波形

Fig. 3 Unidirectional scan control waveform

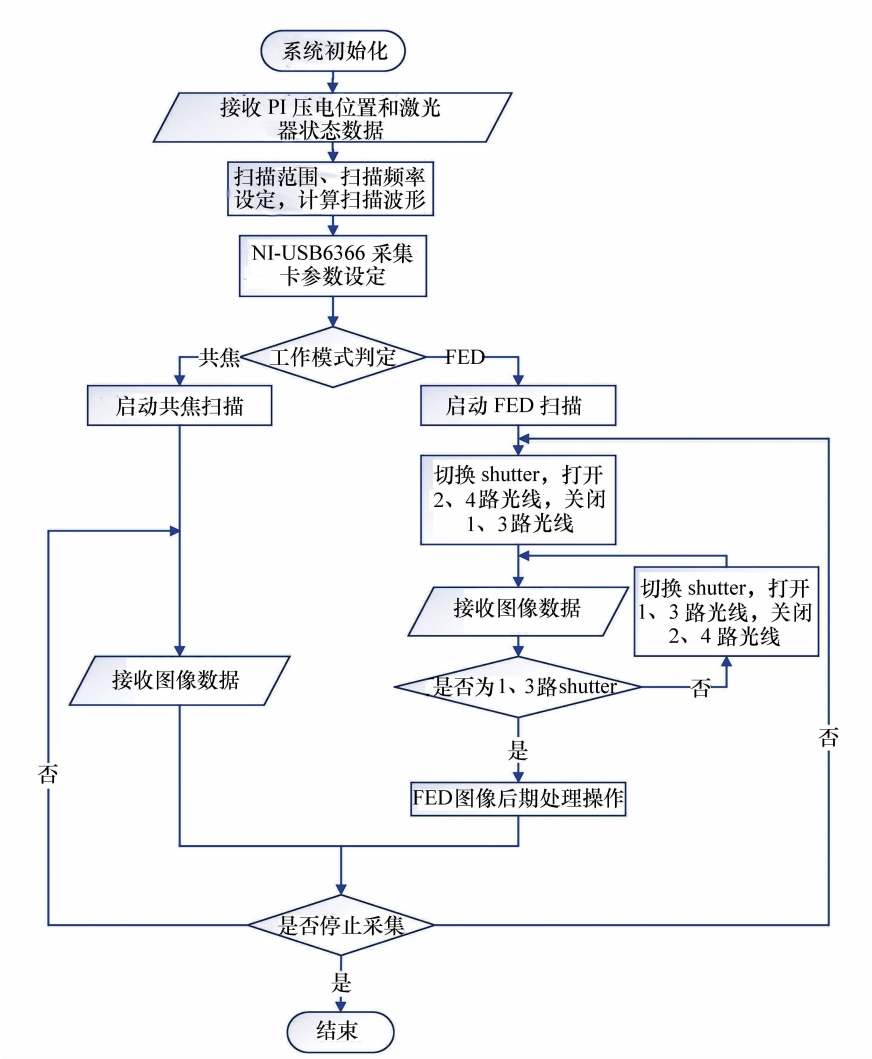


图 4　软件流程图

Fig. 4　Software flow chart

在多硬件同步协调上,由于 FED 特殊的时序要求,(图 2(c)),需要在不同图像中来回切换实心光斑和空心光斑,为了保证不同硬件协调进行,软件在初始设计层面上就进行了消息队列逻辑控制,使得软件执行每一步都必须经过消息队列机,以此达到硬件按照时序严格地进行操作,保证了时序的有效性。

4　实验结果与分析

为了验证系统的有效性,本文分别在荧光颗粒和生物样品上进行了实验。图 5 为 488 nm 激发光扫描得到的荧光样品图像,该图像为 200 nm 荧光颗粒在 10 nm 每像素点和 500 × 500 图像分辨率的条件下扫描得到,先用实心光斑光束扫描得到一张共焦图像,然后用空心光斑光束扫描得到一张负共焦图像,将归一化后的共焦图像减去一张乘上 FED 系数为 0.75 的归一化负共焦图像便可得到一张 FED 图像。

从图 5(e)可以看出,在 488 nm 激发光下,该系统的分辨率可达到 135 nm,基本达到单色 FED 的分辨率水平。图 6 为 640 nm 激发光下扫描得到的荧光颗粒图像。

该样品也为 200 nm 荧光颗粒,该图像是在 20 nm 每像素点 500 × 500 图像分辨率下扫描得到的图像,其处理方法也如在 488 nm 激发的荧光样品图一样,从图 6(e)可以看出,在 640 nm 激发光下,该系统的分辨率可以达到 160 nm,也基本

和单色 FED 系统一致,满足分辨率的基本需求。

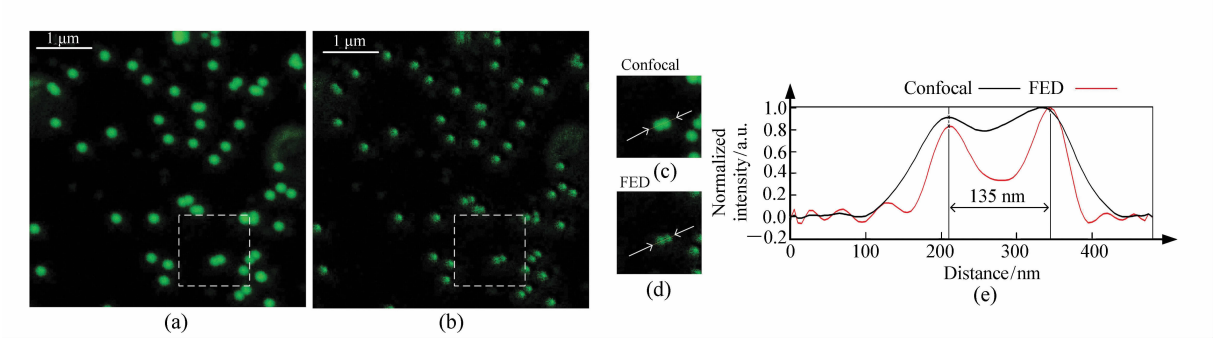


图 5 488 nm 激发的荧光样品共焦和 FED 图像。(a)共焦图像;(b)FED 图像;(c)共焦图像虚框内局部放大图像;(d)FED 图像虚框内局部放大图像;(e)箭头部分归一化后的轮廓图

Fig. 5 Confocal image and FED image of fluorescent beads excited at 488 nm. (a) Confocal image; (b) FED image. (c, d) Magnified view of dashed region at (a) and (b). (e) Normalized outline of arrow section of (c) and (d)

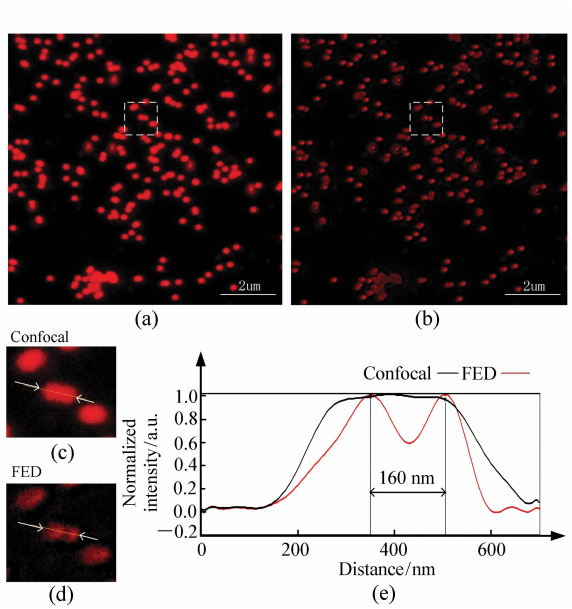


图 6 640 nm 激发的荧光样品共焦和 FED 图像。(a)共焦图像;(b)FED 图像;(c)共焦图像虚框内局部放大图像;(d)FED 图像虚框内局部放大图像;(e)箭头部分归一化后轮廓图

Fig. 6 Confocal image and FED image of fluorescent beads excited at 640 nm. (a) Confocal image; (b) FED image; (c, d) Magnified view of dashed region at (a) and (b); (e) Normalized outline of arrow section of (c) and (d)

为了验证该系统在生物样品上也有比较好的实验效果,本文在多色生物样品 FluoCells™ Prepared Slide #1(BPAE cells with MitoTracker™ Red CMXRos, Alexa Fluor™ 488 Phalloidin, and DAPI)

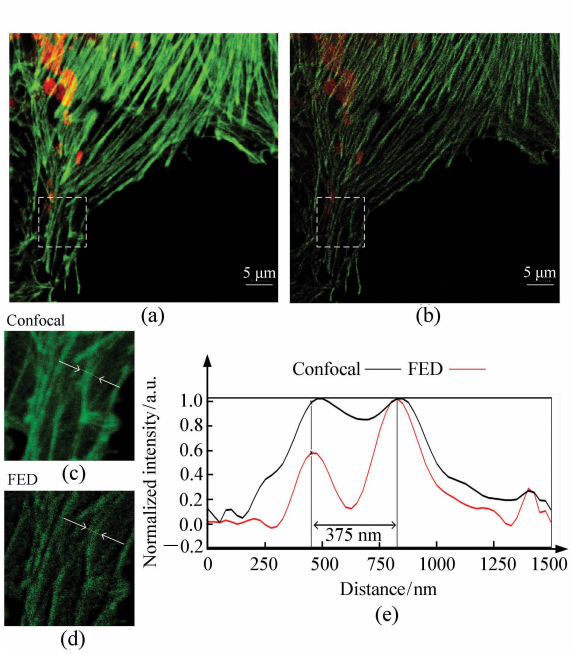


图 7 生物样品多色成像图。(a)共焦图像;(b)FED 图像;(c)共焦图像虚框内局部放大图;(d)FED 图像虚框内局部放大图;(e)箭头指向部分轮廓图

Fig. 7 Confocal image and FED image of biological structures excited at 488nm and 640nm simultaneously. (a) Confocal image; (b) FED image; (c, d) Magnified view of dashed region at (a) and (b); (e) Normalized outline of arrow section of (c) and (d)

上进行了双色同时成像的实验,实验结果如图 7 所示。从图 7 可以看出,与共焦相比较,双色 FED

系统虽然会牺牲一些部分有用信号,降低了图像的信噪比,但却有效的提升了图像的分辨率,可观测样品一些细微结构。从图 7(e)可看出,在共焦下不能清晰分辨的微观交叉位置,FED 可以有效区分开,说明在生物样品中,双色 FED 系统依旧可以保证有良好的双色同时成像效果。需要注意的是,在实验中,由于是在 488 nm 和 640 nm 两种波段的激发光下同时激发,为了保证实验效果,样品染料的激发光谱不能同时涵盖这两种波段的激发光,不然会发生串色干扰。至此,从实验效果来看,无论是在分辨率上还是在生物样品上,该系统都取得了不错的实验效果,满足实际应用的要求。

5　结　论

与共焦显微相比较,FED 超分辨显微方法能够有效地提升图像分辨率,实现超分辨显微效果。本文中双色 FED 显微系统在实验上不仅实现了生物样品的双色同时成像,还在一定程度上实现了超分辨的显微效果以及降低了荧光漂白的发生概率,达到了实际应用的要求。然而,该系统也有些不够完善的地方,第一是有一定的串色干扰,在实验部分,如果选用了宽激发光光谱的染料就有可能会发生串色干扰,使得不能双色同时成像,需要分别进行扫描成像;第二是 FED 系统由于原理上的原因,在实现超分辨的同时会造成一定的信息丢失,造成信噪比降低,如何权衡两者间的平衡,选用合适的 FED 系数成为关键,而每一张不同的样品图则需要调整 FED 系数使其达到平衡,如何根据图像自动调整 FED 系数有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] 李帅,匡翠方,丁志华,等.受激发射损耗显微术(STED)的机理及进展研究[J].激光生物学报,2013,2:103-113.
LI SH,KUANG C F,DING ZH H,*et al*.. A review on concept and development of stimulated emission depletion microscopy(STED)[J]. *Acta Laser Biology Sinica*,2013,2:103-113.(in Chinese)

[2] HUANG B,BATES M,ZHUANG X. Super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Annual Review of Biochemistry*,2009,78:993-1016.

[3] HELL S W,WICHMANN J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy[J]. *Optics Letters*,1994,19(11):780-782.

[4] KLAR T A,JAKOBS S,DYBA M,*et al*.. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,2000,97(15):8206-8210.

[5] KUANG C,LI S,LIU W,*et al*.. Breaking the diffraction barrier using fluorescence emission difference microscopy[J]. *Scientific Reports*,2013,3:1441.

[6] 李帅.超分辨荧光显微方法与系统研究[D].杭州:浙江大学,2014.
LI SH. Research on super-resolution fluorescence microscopy method and system[D]. Huangzhou:Zhejiang University,2014.(in Chinese)

[7] MEYER L,WILDANGER D,MEDDA R,*et al*.. Dual-color STED microscopy at 30-nm focal-plane resolution[J]. *Small*,2008,4(8):1095-1100.

[8] LI S,KUANG C,HAO X,*et al*.. Enhancing the performance of fluorescence emission difference microscopy using beam modulation[J]. *Journal of Optics*,2013,15(12):125708.

[9] YOU S,KUANG C,RONG Z,*et al*.. Eliminating deformations in fluorescence emission difference microscopy[J]. *Optics Express*,2014,22(21):26375-26385.

[10] RONG Z,LI S,KUANG C,*et al*.. Real-time super-resolution imaging by high-speed fluorescence emission difference microscopy[J]. *Journal of Modern Optics*,2014,61(16):1364-1371.

[11] HAO X,KUANG C F,WANG T T,*et al*.. Effects of polarization on the de-excitation dark focal spot in STED microscopy[J]. *Journal of Optics*,010,12(11):115707.

[12] WILSON T. Resolution and optical sectioning in the confocal microscope[J]. *Journal of Microscopy*,2011,244(2):113-121.

[13] BINGEN P, REUSS M, ENGELHARDT J, *et al*.. Parallelized STED fluorescence nanoscopy[J]. *Optics Express*, 2011, 19(24): 23716-23726.

[14] RANKIN B R, KELLNER R R, HELL S W. Stimulated-emission-depletion microscopy with a multicolor stimulated-Raman-scattering light source[J]. *Optics Letters*, 2008, 33(21): 2491-2493.

[15] STAUDT T M. Strategies to reduce photobleaching, dark state transitions and phototoxicity in subdiffraction optical microscopy[D]. Ruperto-Carola University of Heidelberg, Germany, 2009.

[16] HAO X, ALLGEYER E S, BOOTH M J, *et al*.. Point-spread function optimization in isoSTED nanoscopy[J]. *Optics Letters*, 2015, 40(15): 3627-3630.

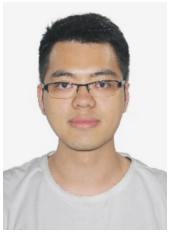
[17] HIGDON P D, T R K P, WILSON T. Imaging properties of high aperture multiphoton fluorescence scanning optical microscopes[J]. *Journal of Microscopy*, 1999, 193(2): 127-141.

[18] RUST M J, BATES M, ZHUANG X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793.

[19] BRODEHL A, HEDDE P N, DIEDING M, *et al*.. Dual color photoactivation localization microscopy of cardiomyopathy-associated desmin mutants[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(19): 16047-16057.

[20] CARRINGTON W A, LYNCH R M, MOORE E D, *et al*.. Superresolution three-dimensional images of fluorescence in cells with minimal light exposure[J]. *Science*, 1995, 268(5216): 1483-1487.

作者简介：



张智敏(1992—)，男，广东河源人，博士研究生，2015 年于华南理工大学获得学士学位，主要从事光学超分辨显微成像方面的研究。E-mail: z_zhimin@ zju. edu. cn

匡翠方(1977—)，男，江西泰和人，博士，教授，博士生导师，主要从事光学超分辨显微成像方面的研究。E-mail: cfkuang@ zju. edu. cn