



基于三通道的超分辨率显微镜成像

俞珠颖¹⁾ 吉 凡¹⁾ 郭京雨²⁾ 鲁统一²⁾ 夏兆厦²⁾ 张宁博²⁾ 孙耀杰^{1)*} 王 瑜^{1)*}

(¹⁾ 复旦大学信息科学与工程学院光源与照明工程系, 上海 200433; ²⁾ 宁波力显智能科技有限公司, 宁波 315000)

摘要 显微技术经过快速发展, 已经突破了光学衍射极限, 目前主要包含受激发射损耗显微术 (STED)、结构光照明显微镜 (SIM)、光激活定位显微成像 (PALM)、随机光学重构显微术 (STORM)、基于最少光子数的纳米尺度定位 (MINFLUX)、结合结构光照明技术的 MINFLUX 技术变体 (SIMFLUX) 等技术。STORM 技术具有优越性, 在其基础上叠加多色成像技术 (目前有 6 种), 本文介绍了目前最新的多色成像技术以及分光成像实现的三通道成像技术。分光成像实现的三通道成像存在光谱串色、通道对齐误差等影响, 基于此介绍了相关的优化算法原理。展示了在三通道 STORM 显微成像平台上实现的 COS-7 细胞成像。说明三通道 STORM 显微成像的优越性。

关键词 超高分辨率, 显微镜, 三通道, 成像

中图分类号 Q27, Q63

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0044

自 2014 年超分辨率显微成像技术荣获诺贝尔化学奖以来, 该领域技术研发进程快速发展, 并且实现了大量的技术产业化。由于超分辨率显微镜将成像分辨率提升到 20 nm^[1], 可以提供更多的生物信息数据, 不仅可以用于生命科学基本问题以及生物学过程的前沿研究, 也可以在诸如纳米给药机制研究及纳米药物与核酸疫苗生产质量控制等领域中发挥出重要的应用价值。细胞内生物大分子的观测除了要提高分辨率外, 还需要提高观测数据的准确性, 增加生物信息的提取量, 因此通过多通道共定位成像也起到了一定的辅助作用。本文主要总结了超分辨率显微镜的发展历程、基于分光成像技术的三通道显微成像技术, 以及将两项技术应用到细胞和金纳米粒子的成像, 证明这两项技术对生物大分子观测效果具有质的提升。

1 超分辨显微镜的发展

1873 年恩斯特阿贝尔 (Ernst Abbe) 提出了光学衍射极限准则^[2], 认为能够区分艾里斑的最小距离受可见光波长的影响。根据瑞利判断, 光学显微镜能够分辨两点间的最小距离, 即光学显微镜的分辨极限为:

$$d = \frac{0.66\lambda}{NA} \quad (1)$$

d 表示分辨率, λ 是发射光的波长, NA 是物镜数值孔径。由于可见光波长的波长范围在 390~780 nm, NA 代表的数值孔径一般为 1, 根据介质折射率的不同, 可以达到更高^[3]。在这些条件下, 横向分辨率达到的极限在 200 nm 左右, 轴向分辨率在 500 nm 左右^[4]。可以模糊地分辨出细胞的轮廓, 但不能将分辨率提高到生物大分子的大小范围内, 对细胞间生物大分子生命活动的研究造成了一定的阻碍。根据光学衍射极限, 许多科研人员在减小照射光波长和增大物镜的数值孔径中下功夫, 一直没有太大的突破。

由于生物、医学等领域对微观粒子观测的需求, 以及轴向分辨率远小于横向分辨率的情况, 1992 年, 斯特凡·W·赫尔 (Stefan W. Hell)^[5] 研发了 4pi 显微镜, 基于干涉原理, 采用两个焦点一致的大孔径物镜进行聚焦, 分别放置在样品前后, 产生全空间立体角 (图 1), 整体分辨率均得到提高。

* 通讯联系人。

孙耀杰 Tel: 021-31242581, E-mail: yjsun@fudan.edu.cn

王瑜 Tel: 021-31242581, E-mail: y_wangfdu@fudan.edu.cn

收稿日期: 2022-02-01, 接受日期: 2022-11-28

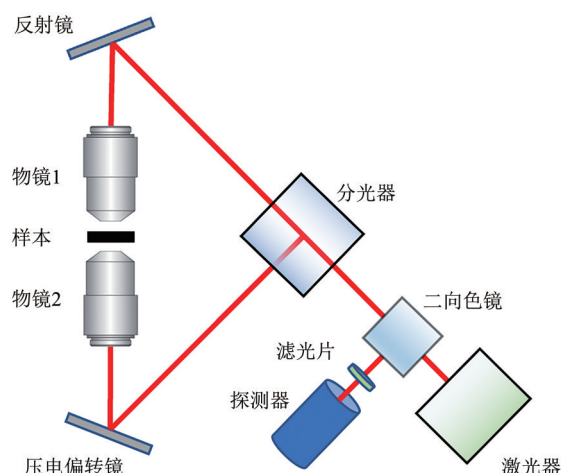


Fig. 1 Schematic of a 4pi microscope

图1 4pi显微镜示意图

横向分辨率减小到100 nm以内, 轴向分辨率提高4~7倍, 从而实现超分辨率显微成像。除此之外, 斯特凡·W·赫尔还研发出了受激发射损耗显微术 (stimulated emission depletion microscopy, STED) [6]。通过激发光和损耗光将荧光分子分别进行激发和以受激发射的方式回到基态 [7], 有效减小荧光分子激发的范围, 从而提高成像分辨率。该方法能够将横向成像分辨率提高到50 nm左右。

在STED显微成像技术问世以后, 该领域中的科研进展有了突飞猛进的势头, 全球多项超分辨率显微成像技术如雨后春笋般层出不穷, 其中就有结构光照明显微镜 (structured-illumination microscopy, SIM) [8]。SIM显微成像技术是基于莫尔条纹的原理, 在显微成像的光路中插入产生结构光的设备, 通过调制照射光, 形成拍摄图像。将该图像以旋转、平移等多种设定方式扫描完整个视野, 采用计算机及相应算法, 重构出完整图像 [9]。

在对显微镜结构和图像成像原理上进行成像分辨率突破外, 威廉·E·莫纳尔 (William E. Moerner) 观察到了单个荧光分子, 发现荧光分子能够通过不同波长的激光呈现出亮态和暗态, 为实现超分辨率显微成像提供了新的思路 [10]。埃里克·白兹格 (Eric Betzig) 在威廉·E·莫纳尔 (William E. Moerner) 的研究基础上, 研发出了光敏定位显微镜 (photoactivated localization microscopy, PALM) [11]。光激活荧光蛋白和目标分子结合, 先用适当的激光随机激活一部分荧光蛋白, 再用另一种适当波长的

激光激发荧光。采集完数据之后, 需要将荧光蛋白进行光漂白, 直到完全失活, 再激活其他部分的荧光蛋白, 进行定位数据采集。同一时间段内被激发的荧光蛋白的数量少且间隔大于最大分辨率, 因此将这些图像进行重构, 就能超越光学衍射极限。与之原理相近的就是随机光学重构显微术 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM) [4], 与光敏定位显微镜相似均采用荧光分子激发荧光成像, 但存在的偏差是, STORM是利用可反复激活的荧光探针对样品进行标记。采用的照射光强度很小, 不需要将荧光分子进行光漂白, 横向成像分辨率可以达到10 nm左右 [1]。

2017年时, Balzarotti等 [12] 研发了一种不同于高斯拟合算法的超分辨成像方法——基于最少光子数的纳米尺度定位 (nanoscopy with minimal photon fluxes, MINFLUX) 技术。该方法将差分思想与照明光位置的空间偏移相结合, 通过荧光分子的相对偏移信息, 构建概率分布模型。将样本放置在视野正中间和圆周三等分点处。不同的观测位置会有不同的光强, 因此同一个荧光分子可以产生4种强度的荧光, 光子数较少的情况下, 也能获得单分子定位的准确信息, 分辨率可达1 nm, 光子利用率高。MINFLUX技术和结构光照明、高斯拟合相结合, 衍生出了结合结构光照明技术的MINFLUX技术变体 (SIMFLUX) [13] 技术。SIMFLUX先采用高斯拟合确定视野中的荧光分子位置, 再通过2个反向传播的倏逝波构成的正弦照明模式分别在X和Y上的3次幅度移动, 1个荧光分子即可产生6种强度的荧光, 6帧的高斯拟合估计以及与模式偏移相关的光子计数相结合, 可以在原基础上将定位精度提高1倍。由于存在视野位置偏移, 这两种方法数据采集时间长, 迭代次数多, 图像重构时计算时间长。

综上所述, 超分辨率成像显微技术目前包含STED、SIM、PALM、STORM、MINFLUX、SIMFLUX技术等。根据实验成像需求, 可以选择需要的显微成像技术。一般进行显微观测时, 需要考虑荧光分子信号采集的信噪比, 实验时间短, 激光引起的光漂白少, 并且成像分辨率尽可能大, STORM显微成像技术变成了首选。本文通过金纳米粒子和细胞样本的显微成像, 综合说明STORM技术的优越性。

2 三通道成像

一般情况下, 显微镜都采用单通道, 进行成像采样。这样只能观察细胞内的单一物质, 而无法观测细胞中生命运动的多样性, 不能满足生物、医药等相关领域的研究需求。因此为了更加明确细胞中存在的物质多样性, 这些物质是怎样进行相互运动的, 产生了多种多色成像技术^[14]。现有多色成像技术路线大致包含荧光激发、荧光激活、荧光猝灭、分光技术、光谱技术、点扩散函数等。目前在超分辨率领域多色成像研究中, 能够实现最多色彩成像数的为四色成像, 由加州大学伯克利分校徐克老师研究完成^[15]。该四色成像采用了三棱镜分光的光谱技术, 结合双物镜进行双通道信息提取, 能够实现更高的信噪比(图2)。但由于需要将三棱镜分光路径和超分辨荧光信息提取路径中拍摄的图像进行数据处理, 复杂度比较高。

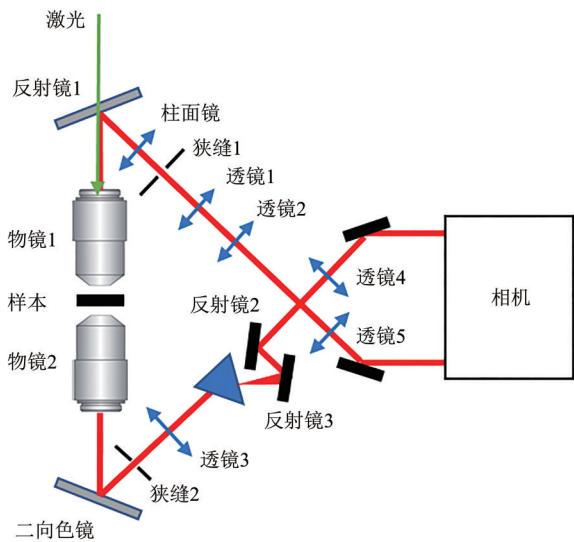


Fig. 2 Four color imaging optical path diagram
图2 四色成像光路图

由于分光成像技术信号采集效率高, 不需额外进行特点矫正, 数据处理简单, 对使用者来说比较友好、容易上手, 因此选择分光成像技术进行多色成像。荧光分子通过激光激发, 可以产生暗态和亮态两种形态^[16], 不同的荧光分子由不同波长的激

光进行特异性激发^[17], 目前比较常用的波段为488、561、647、750 nm。该方法是依次照射不同波长的荧光, 顺序成像导致成像存在时间差, 由于液体移动, 拍摄的荧光数据不在同一视野中产生误差。在此基础上研发了将不同波长激光合成到同一光纤传输, 通过二向色镜分出不同光路通道, 按照透射和反射的比例分出不同颜色的激光照射下的数据, 经过一系列数据处理, 能够形成多色成像。由于该项技术进行区分激光颜色是通过激光透射和反射比例计算的, 激光的光谱存在重叠, 其串色现象会比较严重, 而且二向色镜、透镜等光学硬件存在器件误差, 会反映在数据采集时不同波长的激光产生的数据之间存在一定的位置偏移。且透镜等存在曲率, 不同地方的位置偏移量不同, 需要进行算法对齐。为了达到更好的成像效果, 目前只采用3种波长的激光进行成像, 也就是三通道成像, 其光路原理见图3, 然后通过算法减小串色和位置偏移的干扰。

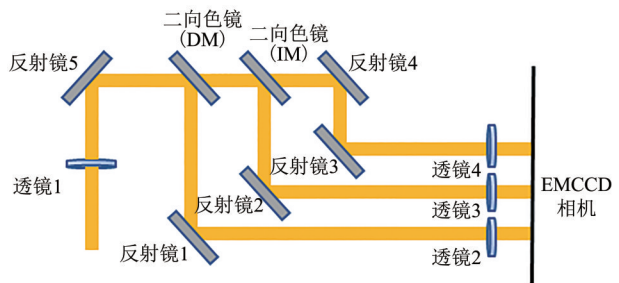


Fig. 3 Three channel principle
图3 三通道原理

串色问题通过将单个激光在宽场中进行三通道拍摄, 获得单个激光在每个通道的平均强度(图4), 为金纳米粒子拍摄。将每个激光对应成像通道内的总强度除去其他激光在该通道上的平均强度, 即可消除串色影响。而位置偏移问题, 采用了将图像直接进行三通道的超分辨成像, 将各通道的图像进行两两四次多项式拟合, 进行成像光斑中心对齐的方法, 能够将成像误差缩小到20 nm以内(图5), 也就是超分辨率显微镜误差。

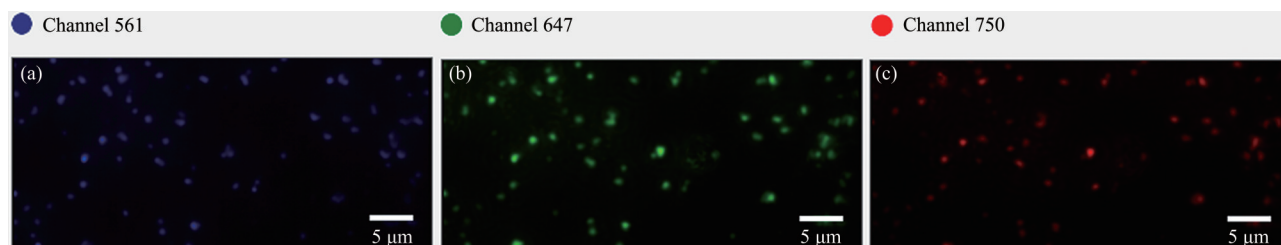


Fig. 4 Polychromatic imaging

图4 三色成像

(a) 561 nm的激光成像; (b) 647 nm的激光成像; (c) 750 nm的激光成像。

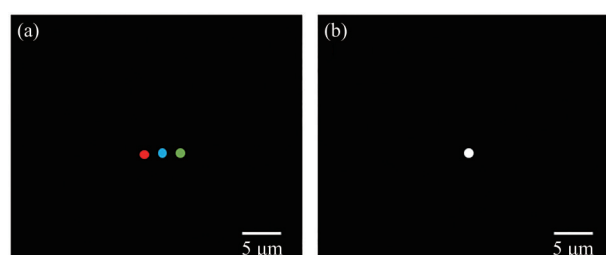


Fig. 5 Three channel imaging alignment

图5 三通道成像对齐

(a) 对齐前; (b) 对齐后。

3 显微镜成像系统

综上采用STORM显微成像技术和三通道成像的超分辨率显微镜成像系统主要包含主体、三通道成像系统、TIRF照明系统、激光和控制器系统、光学平台和成像工作站(图6)。

主体由基本显微镜主体构成, 并包括主动式锁定系统、PI平移台、显微镜成像控制器等零部件。显微镜成像控制器主要用来调节物镜上下高度、聚焦平面深度也就是确认成像视野的Z轴位置等, PI平移台是用来操纵载玻片成像视野。而主动式锁定系统则是为了减少细胞因环境因素造成抖动产生的位置偏移量, 其将某一聚苯乙烯凝珠作为参考系, 实时进行位置偏移量校准。成像相机采用探测灵敏度高的EMCCD相机, 能够提高信噪比。成像工作站也就是计算机处理器。

由于显微镜成像过程中, 显微镜本身具备一些硬件精度的缺陷, 例如分光器不能将不同波长的激光完全分离开, 会导致成像中存在串色情况; 分光器造成的光路偏移, 导致三束光之间存在位置偏移量, 需要进行对齐等算法上的优化操作。处理算法原理见第2节。

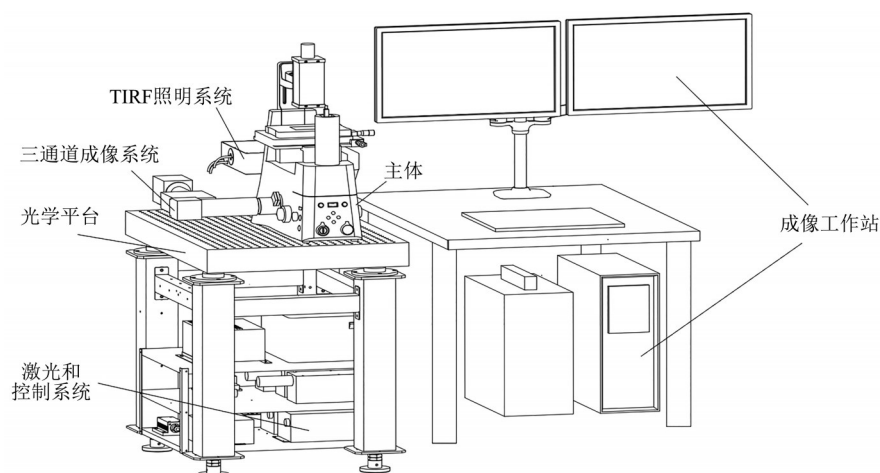


Fig. 6 STORM based three channel super-resolution microscope imaging system

图6 基于STORM的三通道超分辨率显微镜成像系统

4 超分辨率显微镜成像实测

COS-7细胞来源于非洲绿猴肾成纤维细胞并经SV40病毒基因转化的细胞系,一般用于病毒和感染研究以及对细胞基因转录的研究。为了测试经过算法优化后的三通道超分辨率显微镜的成像效果,现通过COS-7细胞进行实际测试。

实验测试时,需要进行2步配置操作: a. 聚苯乙烯载玻片; b. COS-7细胞样本配置。用鬼笔环肽标记微丝, Tom20标记线粒体, Tublin标记微管蛋白, 并采用561、647、750 nm的激光进行激发, 在宽场和超高分辨率条件分别成像(图7)。

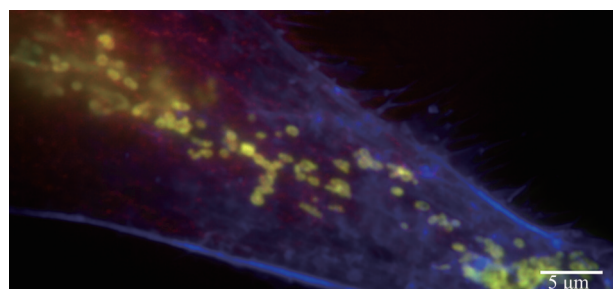


Fig. 7 Wide field imaging of COS-7 cell sample

图7 COS-7细胞样本宽场成像

COS-7细胞内鬼笔环肽、Tom20、Tublin在受激光激发后,将在不同的通道上产生不同的图像。在受激发的过程中,并不是所有的荧光分子都会同时发光,而是会有随机性的发光一部分,但是另一部分不发光。本系统应用的3个通道都会同时产生COS-7细胞的受激发光现象,但是由于每次发光的粒子不同,本系统可以时间交换分辨率的方式,在不同的时间上拍摄不同的COS-7细胞样本,从而对COS-7细胞内标记的3种物质位置获取更详细的信息。在设定的拍摄时间之后,再将所有的拍摄图片重新合成,这样就可以获得更高分辨率的图像(图8)。

从图像中可见,图8在超高分辨率荧光显微镜下的图片成像分辨率高于图7,实现了超高分辨率显微镜的成像分辨率超越光学衍射极限的基本目标。图8的光斑大小明显小于图7,使光斑中心点位置提取的精确度提高。进行三通道位置对齐后,即可确定各荧光分子的位置。为了将三通道对齐能普遍适用于每一次检测过程中,需要进行多次实验,将参数值进行实时数据调节,保证每一次对齐误差在超分辨率显微镜的分辨率20 nm以内。

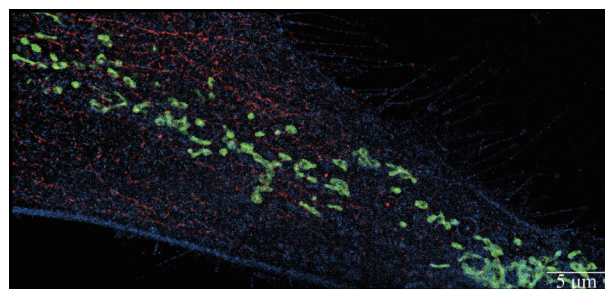


Fig. 8 Super-resolution imaging of COS-7 cell sample

图8 COS-7细胞超高分辨率成像

5 总 结

以STORM显微成像技术为基础的超分辨率显微成像系统,现已能达到20 nm分辨率。通过COS-7细胞样本成像,可以观测出比宽场有更好的成像效果,光斑尺寸明显减小。通过三通道成像,荧光分子位置确定更加的精确,提供更准确的生物信息。通过初步验证,此项技术对生物医药领域研究有很好的技术支持作用,其他场景的应用情况需要更多的生物样本测试和反馈调节。

参 考 文 献

- [1] Szalai A M, Siarry B, Lukin J, *et al.* Three-dimensional total-internal reflection fluorescence nanoscopy with nanometric axial resolution by photometric localization of single molecules. *Nat Commun*, 2021, **12**(1):517
- [2] 毛峥乐,王琛,程亚. 超分辨远场生物荧光成像——突破光学衍射极限. *中国激光*, 2008, **35**(9):1283-1307
Mao Z L, Wang C, Cheng Y. *Chin J Lasers*, 2008, **35**(9): 1283-1307
- [3] Barak N, Kumari V, Sheoran G. Simulation and analysis of variable numerical aperture wide-field microscopy for telecentricity with constant resolution. *Micron*, 2021, **145**(7): 103064
- [4] Kaderuppan S S, Wong E, Sharma A, *et al.* Smart nanoscopy: a review of computational approaches to achieve super-resolved optical microscopy. *IEEE Access*, 2020, **8**: 214801-214831
- [5] Chi K R. Super-resolution microscopy: breaking the limits. *Nat Methods*, 2009, **6**(1):15-18
- [6] Heller S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett*, 1994, **19**(11): 780-782
- [7] Weber M, Khan T A, Patalag L J, *et al.* Photoactivatable fluorophore for stimulated emission depletion microscopy and bioconjugation technique for hydrophobic labels. *Chem Eur J*, 2021, **27**(1): 451-458
- [8] Sheppard C. Structured illumination microscopy and image

- scanning microscopy: a review and comparison of imaging properties. *Philos Trans Royal Soc A*, 2021, **379**(2199): 20200154
- [9] III A D, Li D, Vu T, *et al.* Reconstructing undersampled photoacoustic microscopy images using deep learning. *IEEE Trans Med Imaging*, 2020, **40**(2): 562-570
- [10] Moerner W E, Orrit M. Optical detection of single molecules. *Science*, 1997, **277**(5322): 479-483
- [11] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 2006, **313**(5793): 1642-1645
- [12] Balzarotti F, Eilers Y, Gwosch K C, *et al.* Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes. *Science*, 2017, **355**(6325): 606-612
- [13] Cnossen J, Hinsdale T, Thorsen R Ø, *et al.* Localization microscopy at doubled precision with patterned illumination. *Nat Methods*, 2020, **17**: 59-63
- [14] Kaya M, Stein F, Rouwkema J, *et al.* Serial imaging of microagents and cancer cell spheroids in a microfluidic channel using multicolor fluorescence microscopy. *PLoS One*, 2021, **16**(6): e0253222
- [15] Zhang Z, Kenny S J, Hauser M, *et al.* Ultrahigh-throughput single-molecule spectroscopy and spectrally resolved super-resolution microscopy. *Nat Methods*, 2015, **12**(10): 935-938
- [16] Huang B, Wang W, Bates M, *et al.* Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, 2019, **319**(5864): 810-813
- [17] Mulder W, Strijkers G J, Tilborg G V, *et al.* Nanoparticulate assemblies of amphiphiles and diagnostically active materials for multimodality imaging. *Acc Chem Res*, 2009, **42**(7): 904-914

Super Resolution Microscope Imaging Based on Three Channels

YU Zhu-Ying¹⁾, JI Fan¹⁾, GUO Jing-Yu²⁾, LU Tong-Yi²⁾, XIA Zhao-Sha²⁾, ZHANG Ning-Bo²⁾,
SUN Yao-Jie^{1)*}, WANG Yu^{1)*}

¹⁾College of Information Science and Engineering, Fudan University, Shanghai 200433, China;

²⁾Ningbo Lixian Intelligent Technology Co., Ltd, Ningbo 315000, China)

Abstract Microscopy technology has undergone rapid development and has surpassed the limits of optical diffraction. Currently, it mainly includes stimulated emission depletion microscopy (STED), structured illumination microscopy (SIM), photoactivation localization microscopy (PALM), stochastic optical reconstruction microscopy (STORM), minimal photon fluxes (MINFLUX) based on the localization of the minimum number of photons, and a variant of MINFLUX technology combining structured illumination microscopy (SIMFLUX). STORM technology has superiority, and on top of it, there are six multi-color imaging technologies currently available. This article introduces the latest multi-color imaging technology and a three-channel imaging technique implemented using spectral imaging. However, three-channel imaging using spectral imaging has issues such as spectral crosstalk and channel alignment errors. Therefore, relevant optimization algorithm principles are introduced. The article also demonstrates the imaging of COS-7 cells on a three-channel STORM microscopy platform, showcasing the superiority of three-channel STORM microscopy.

Key words ultra high resolution, microscope, three channels, imaging

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0044

* Corresponding author.

SUN Yao-Jie. Tel: 86-21-31242581, E-mail: yjsun@fudan.edu.cn

WANG Yu. Tel: 86-21-31242581, E-mail: y_wangfdu@fudan.edu.cn

Received: February 1, 2022 Accepted: November 28, 2022