

## 大视场高分辨HiLo光切片显微成像系统

郎松 张艳微 郑汉青 徐林钰 汪路涵 巩岩

### Wide-field-of-view and high-resolution HiLo optical sectioning microscopy system

LANG Song, ZHANG Yan-wei, ZHENG Han-qing, XU Lin-yu, WANG Lu-han, GONG Yan

引用本文:

郎松, 张艳微, 郑汉青, 徐林钰, 汪路涵, 巩岩. 大视场高分辨HiLo光切片显微成像系统[J]. *中国光学*, 2022, 15(6): 1302–1312.

doi: 10.37188/CO.2022–0087

LANG Song, ZHANG Yan-wei, ZHENG Han-qing, XU Lin-yu, WANG Lu-han, GONG Yan. Wide-field-of-view and high-resolution HiLo optical sectioning microscopy system[J]. *Chinese Optics*, 2022, 15(6): 1302–1312. doi: 10.37188/CO.2022–0087

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.37188/CO.2022–0087>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 仿生复眼系统的子眼安装孔对准误差检测方法

Alignment error detection method of sub-eye mounting hole for bionic compound eye system

*中国光学 (中英文)*. 2019, 12(4): 880 <https://doi.org/10.3788/CO.20191204.0880>

#### 地球同步轨道暗弱目标地基光学成像技术综述

Review of ground-based optical imaging techniques for dim GEO objects

*中国光学 (中英文)*. 2019, 12(4): 753 <https://doi.org/10.3788/CO.20191204.0753>

#### LAMOST高分辨率光谱仪研制

Construction of a LAMOST high resolution spectrograph

*中国光学 (中英文)*. 2019, 12(1): 148 <https://doi.org/10.3788/CO.20191201.0148>

#### 大视场高像质简单光学系统的光学-算法协同设计

Optical/algorithmic co-design of large-field high-quality simple optical system

*中国光学 (中英文)*. 2019, 12(5): 1090 <https://doi.org/10.3788/CO.20191205.1090>

#### 结构光照明超分辨光学显微成像技术与展望

Structured illumination super-resolution microscopy technology: review and prospect

*中国光学 (中英文)*. 2018, 11(3): 307 <https://doi.org/10.3788/CO.20181103.0307>

#### 大视场空间可见光相机的杂散光分析与抑制

Analysis and suppression of space stray light of visible cameras with wide field of view

*中国光学 (中英文)*. 2019, 12(3): 678 <https://doi.org/10.3788/CO.20191203.0678>

文章编号 2097-1842(2022)06-1302-11

# 大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统

郎松<sup>1,2</sup>, 张艳微<sup>1,2</sup>, 郑汉青<sup>2</sup>, 徐林钰<sup>2</sup>, 汪路涵<sup>1,2</sup>, 巩岩<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国科学技术大学生物医学工程学院(苏州)生命科学与医学部, 江苏苏州 215163;

2. 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏苏州 215163)

**摘要:**现代生物学和生物医学领域迫切需要研制兼顾大视场、高分辨率的显微成像技术和仪器以对生物样品实现跨尺度观测, 满足重大科学问题的研究需求。受限于系统的空间带宽积, 传统商业显微镜无法满足这一需求, 且现有高空间带宽积显微成像系统存在体积庞大、实施成本高昂等问题。本文基于 HiLo 光切片技术和自主设计的大视场高分辨显微物镜, 研发了具有高空间带宽积特点的大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统, 测试了系统的成像视场和分辨率。应用该系统对小鼠脑切片开展了白光照明明场成像实验, 并与 OLYMPUS 商业显微镜成像结果做了对比; 对小麦种子荧光切片开展了光切片成像和宽场荧光成像对比实验。实验结果表明, 大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统的成像视场达到 4.8 mm×3.6 mm (对角视场为 6.0 mm), 横向分辨率达到 0.74 μm, 轴向分辨率达到 4.16 μm。大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统兼有大视场和高分辨率成像的优势和快速光切片成像的能力, 能够对大体积生物样本开展快速三维成像, 将为胚胎发育、脑成像、数字病理诊断等研究提供有力的技术支撑。

**关键词:**大视场; 高分辨率; 高空间带宽积; 光切片显微技术

中图分类号: O439 文献标志码: A doi: 10.37188/CO.2022-0087

## Wide-field-of-view and high-resolution HiLo optical sectioning microscopy system

LANG Song<sup>1,2</sup>, ZHANG Yan-wei<sup>1,2</sup>, ZHENG Han-qing<sup>2</sup>, XU Lin-yu<sup>2</sup>, WANG Lu-han<sup>1,2</sup>, GONG Yan<sup>1,2\*</sup>

(1. Division of Life Sciences and Medicine, School of Biomedical Engineering (Suzhou)

University of Science and Technology of China, Suzhou 215163, China;

2. Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese

Academy of Sciences, Suzhou 215163, China)

\* Corresponding author, E-mail: gongy@sibet.ac.cn

**Abstract:** The fields of modern biology and biomedicine urgently need wide-field-of-view (FOV), high-resolution microscopic technology and instruments for trans-scale observation of biological samples to meet the requirement of major scientific for research. Limited by the spatial bandwidth product, traditional commercial microscopes cannot meet this demand. Besides, the existing high spatial bandwidth product microscopy

收稿日期: 2022-04-29; 修订日期: 2022-05-19

基金项目: 国家自然科学基金(No. 61975228; No. 62005307); 中国科学院科研仪器设备研制项目(No. YJKYYQ20190048)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 61975228, No. 62005307); Scientific Instrument Developing Project of the Chinese Academy of Sciences (No. YJKYYQ20190048)

systems have problems such as bulky volume and high implementation costs. In this paper, based on the HiLo optical sectioning technology and the self-designed wide-field-of-view and high-resolution objective, a wide-field-of-view and high-resolution HiLo optical sectioning microscopy system was developed. The FOV and imaging resolution of this system were tested. Brightfield imaging experiments were carried out on mouse brain slices by this system and the results were compared with that of OLYMPUS commercial microscope. At the same time, wide-field fluorescence imaging comparison experiments were carried out on wheat seed fluorescent slices. The experiment results show that the FOV of this system reaches 4.8 mm×3.6 mm (the diagonal FOV is 6.0 mm), the lateral resolution reaches 0.74 μm, and the axial resolution reaches 4.16 μm. The comparative experiment proved that this system has the advantages of wide FOV, high resolution and the ability of fast optical sectioning imaging simultaneously. This system can carry out rapid 3D imaging of large-volume biological samples, which will provide strong technical support for researches such as embryonic development, brain imaging, and digital pathology diagnosis.

**Key words:** wide field of view; high resolution; high space bandwidth product; optical sectioning microscopy

## 1 引言

现代生物学和生物医学领域迫切需要大视场、高分辨率的显微成像技术和仪器对生物样品进行兼顾“全局形态”和“细节特征”的跨尺度观测,以满足重大科学问题的研究需求。在脑科学研究领域,需要在全脑范围内获取介观尺度的单神经元结构和功能信息,揭示脑连接及脑活动的运行机制<sup>[1-2]</sup>;在发育生物学和胚胎学研究领域,需要对发育早期的胚胎进行快速三维成像,同时以亚细胞尺度的分辨率对器官或组织进行更加精细的追踪分析<sup>[3-4]</sup>;在肿瘤学研究领域,需要对活体肿瘤组织进行大视野、亚细胞分辨率成像,进而对肿瘤发生和发展的机理、肿瘤分子诊断及边界识别等开展研究<sup>[5-6]</sup>。

然而,通过传统的显微镜捕捉到的图像,样品的成像范围和图像的细节水平间存在矛盾,即成像视场(Field of View, FOV)和分辨率相互制约,这主要受限于系统的空间带宽积(Space Bandwidth Product, SBP)。空间带宽积指显微系统的成像视场中可解析像素的数量,用于表征系统所传递的信息量。显微系统的空间带宽积由显微物镜的空间带宽积和探测器的空间带宽积共同决定。一般而言,探测器的空间带宽积(指探测器的像素数)需与显微物镜的空间带宽积相匹配。显微物镜的空间带宽积与成像视场成正比,与分辨率的平方成反比,即  $SBP=FOV/(0.5\varepsilon)^2$ ,其中,系数 0.5 来源于奈奎斯特采样定律, $\varepsilon$  为显微物镜的横

向分辨率,其由显微物镜的工作波长和数值孔径(Numerical Aperture, NA)决定。现有商业显微镜的空间带宽积通常在几兆至几十兆范围内。一方面,受设计、加工和装调工艺的限制,显微物镜的空间带宽积难以提升,此外,商业显微镜的物镜需满足互换性要求,通常按照一定行业标准或企业标准设计,这也限制了显微物镜的设计空间;另一方面,商业图像传感器的像素数量有限,无法满足高空间带宽积成像需求。

为了突破成像系统空间带宽积的限制,研究者们采取了以下两种方法:(1)扫描拼接成像<sup>[7-10]</sup>;(2)傅立叶切片成像<sup>[11-12]</sup>。然而,这两类方法的缺点是全视场成像速度慢,在成像过程中样本需要保持静态,这在生物动力学的研究中很难实现<sup>[13]</sup>。在半导体器件制造领域,为了提高成像系统的空间带宽积,研究者们开发了大视场浸水光刻物镜及成像系统,但这些系统仅适用于单色光(例如波长为 193 nm 的单色光)和固定物距的工作场景,难以应用于生物医学成像领域<sup>[14]</sup>。在生物医学成像领域,英国科学家 McConnell 等人研发了大视场高分辨率显微物镜 Mesolens<sup>[14-16]</sup>。该显微物镜成像视场为  $\Phi 6$  mm,数值孔径为 0.47,基于 Mesolens 设计的共聚焦显微镜横向分辨率和轴向分辨率分别为 0.7 μm 和 7 μm,可以对直径达  $\Phi 6$  mm、厚达 3 mm 的生物样本进行三维成像,由于采用点扫描共聚焦成像的策略,该显微镜需要大约 200 s 才能获得全视场的图像,这极大地限制了其在高动态样品上的应用<sup>[14-16]</sup>。美国科

学家 Spencer LaVere Smith 团队开发了大视场、双路径扫描的双光子显微镜系统 Diesel2p, 该系统在全视场成像模式下, 成像视场略小于  $5\text{ mm} \times 5\text{ mm}$ , 横向分辨率约为  $1\ \mu\text{m}$ , 轴向分辨率约为  $8\ \mu\text{m}$ , 成像深度可达  $500\ \mu\text{m}$ ; 在多区域成像模式下, 两束独立的激光同时在两个不同的区域采集图像, 成像视场均为  $1.5\text{ mm} \times 5\text{ mm}$ , 分辨率为  $1.5\ \mu\text{m} \times 1.2\ \mu\text{m}$ , 成像速率为  $3.84\text{ frame/s}$ <sup>[17]</sup>。采用双光子成像技术的 Diesel2p 较好地抑制了离焦信号的干扰且具有较深的成像穿透深度, 但是其成像速度和成像分辨率仍有较大的提升空间。国内方面, 戴琼海院士团队研发了超宽视场高分辨率实时显微成像仪器 (RUSH), 采用特制高空间带宽积显微物镜 (成像视场为  $10\text{ mm} \times 12\text{ mm}$ , 数值孔径为 0.35) 和 35 个像素为  $2560 \times 2160$  的相机阵列, 构建了多尺度曲面中继协同的显微成像系统, 实现了兼具  $1\text{ cm} \times 1.2\text{ cm}$  超宽视场、 $1.2\ \mu\text{m}$  高分辨率、 $30\text{ frame/s}$  高帧率、 $5.1\text{ GPixel/s}$  高数据通量的生物动态成像<sup>[13]</sup>。然而, RUSH 系统的轴向分辨率偏低, 仅有  $15.52\ \mu\text{m} \pm 1.80\ \mu\text{m}$ , 而且视场拼接的成像方式会不可避免地降低全视场图像中重叠区域的分辨率和强度。此外, 上述高空间带宽积显微成像系统共同的特征是体积庞大、实施成本高昂、难以推广应用。

为了获取大体积生物组织的三维精细结构, 显微成像系统需具备光切片成像能力。通常采用两种策略实现光切片成像<sup>[18]</sup>: 一种是通过控制照明光仅激发样品焦面附近信号, 避免激发离焦信号, 如多光子显微成像技术<sup>[19]</sup>、光片照明显微成像技术<sup>[20]</sup>、全内反射显微成像技术<sup>[21]</sup>等; 另一种是通过物理阻挡、解调或去卷积算法实现对离焦信号的去除, 留下焦面上的清晰信号, 如共聚焦显微成像技术<sup>[22]</sup>、结构光照明显微成像技术<sup>[23]</sup>、动态散斑照明显微成像技术<sup>[24]</sup>、HiLo 显微成像技术<sup>[25]</sup>等。相关的研究证明了 HiLo 显微成像与共聚焦显微成像技术的光切片能力相当, 但前者全视场光切片成像速度明显优于后者, 原则上仅受相机曝光时间的限制, 此外, HiLo 显微镜仅需要消散斑装置和相干照明光源 (如激光) 即可低成本地实施<sup>[25]</sup>, 且与常规荧光显微镜具有良好的兼容性。

因此, 针对现代生物学和生物医学领域对生物样品进行大视野、高分辨率的跨尺度观测需求, 以及现有高空间带宽积显微成像系统存在体积庞大、实施成本高昂等问题, 本文基于 HiLo 光

切片技术和自主设计的大视场高分辨显微物镜, 研发了具有高空间带宽积特点的大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统, 测试了系统的成像视场和分辨率, 开展了生物样本成像实验, 旨在展示该系统具有兼顾大视场和高分辨率成像的优势和快速光切片成像的能力, 能够对大体积生物样本开展快速三维成像, 为胚胎发育、脑成像、数字病理诊断等研究提供有力的技术支撑。

## 2 方法及原理

### 2.1 HiLo 光切片技术

HiLo 光切片技术最早由 Mertz 等人提出, 其中, “Hi”和“Lo”分别代表焦面高 (High) 空间频率和焦面低 (Low) 空间频率分量。该技术需对样本采集一幅散斑照明图像  $I_s$  和一幅均匀照明图像  $I_0$  (包含焦面高频信息、焦面低频信息和离焦信息), 然后对  $I_s$  和  $I_0$  的差分图像进行对比度评价, 得到加权函数, 以此函数作为  $I_0$  中焦面信息的比例, 将低通滤波器应用于加权的均匀照明图像, 得到  $I_0$  中的焦面低频分量, 然后, 将互补的高通滤波器应用于  $I_0$ , 获得焦面高频分量, 最后, 将二者加权融合, 得到光切片图像<sup>[25-26]</sup>。相应算法的流程如下:

首先, 计算散斑照明图像和均匀照明图像的差分图像  $\delta I$  的散斑对比度  $C_{\delta s}(z)$ ,  $C_{\delta s}(z)$  在样本对焦时达到峰值, 而在样本离焦时衰减为零, 因此可以用于区分均匀照明图像中焦面信息和离焦信息, 具体表达式为<sup>[26]</sup>:

$$C_{\delta s}^2(z) = A_s \int |W(k)|^2 |\text{OTF}_{\text{det}}(k, z)|^2 |\text{OTF}_{\text{ill}}(k, 0)|^2 d^2k, \quad (1)$$

其中,  $A_s$  是散斑颗粒的平均横向面积,  $\text{OTF}_{\text{det}}(k, z)$  是显微系统光学传递函数,  $\text{OTF}_{\text{ill}}(k, 0)$  是照明光学传递函数,  $W(k)$  是通过两个高斯低通滤波器相减生成的带通滤波器, 用于加速  $C_{\delta s}(z)$  离焦衰减,

$$W(k) = \exp\left(-\frac{k^2}{2\sigma^2}\right) - \exp\left(-\frac{k^2}{\sigma^2}\right), \quad (2)$$

其中,  $k$  是空间频率,  $\sigma$  是带通滤波器的标准偏差。仿真实验已经证明, 光切片能力 (即系统轴向分辨率) 与  $\sigma$  成反比<sup>[26]</sup>。系统的轴向分辨率与其三维点扩散函数相关, 可通过显微物镜焦深计算



公式确定系统的轴向分辨率理论值, 进而估计 $\sigma$ 。

以上述散斑对比度 $C_{\delta_s}(z)$ 为加权函数得到均匀照明图像中焦面信息的比例, 将低通滤波器 $LP(k)$ 应用于加权的均匀照明图像, 得到均匀照明图像中的焦面低频信息 $I_{LP}$ 为

$$I_{LP} = LP[C_{\delta_s}(z)I_u] \quad (3)$$

进一步, 将高通滤波器 $HP(k) = 1 - LP(k)$ 直接应用于均匀照明图像, 得到互补的焦面高频信息, 即

$$I_{HP} = HP[I_u] \quad (4)$$

最后, 由上述两幅图像加权融合得到 HiLo 光切片图像, 即

$$I_{HiLo} = \eta I_{LP} + I_{HP} \quad (5)$$

其中,  $\eta$ 是一个缩放函数, 用于补偿实际成像中散斑对比度通常不等于 1 的情况, 确保低空间频率到高空间频率的平滑过渡。  $\eta$ 可以通过以下公式计算,

$$\eta = I_{HP}(k_c) / I_{LP}(k_c) \quad (6)$$

实践中, 高通滤波器和低通滤波器的分割频率 $k_c$ 可以按照 $k_c = 0.18\sigma$ 估计<sup>[26]</sup>。

### 2.2 大视场高分辨显微物镜

显微成像系统的视场和分辨率主要由显微物镜决定。根据瑞利判据和显微物镜焦深计算公式, 显微物镜的横分辨率 $\varepsilon$ 和轴向分辨率 $z_{min}$ 分别为

$$\varepsilon = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad (7)$$

$$z_{min} = \frac{2n\lambda}{(NA)^2} \quad (8)$$

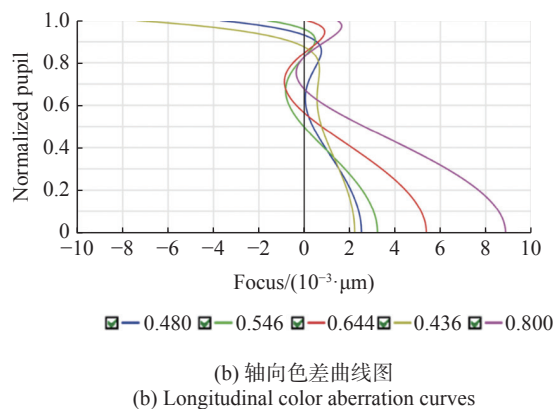
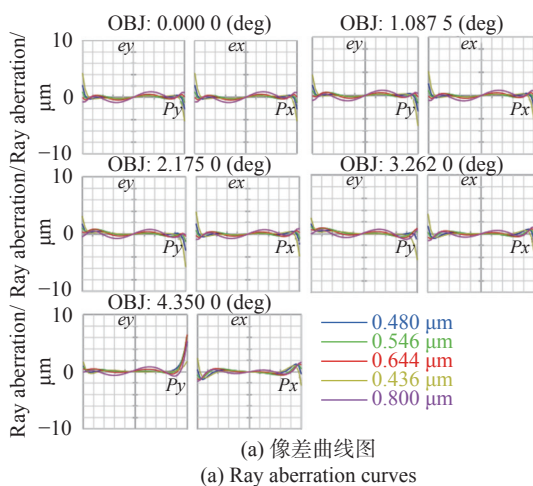
式中,  $\lambda$ 为工作波长,  $n$ 为物方介质折射率,  $NA$  为显微物镜的数值孔径。若显微物镜工作波段为可见光波段, 为保证系统横向分辨率达到亚微米级, 显微物镜数值孔径至少为 0.49。据此, 设计了大视场高分辨显微物镜, 其参数如表 1 所示。

表 1 大视场高分辨显微物镜设计参数

Tab. 1 Design parameters of the wide-field-of-view and high-resolution objective

参数	指标
物方视场(Field of View, FOV)	Φ6.0 mm
数值孔径(Numerical Aperture, NA)	0.5
工作距(Working Distance, WD)	2 mm
焦距(Focus, F)	40 mm
工作波段(Working Waveband)	436 ~ 800 nm
浸没介质(Immersion Medium)	空气

大视场高分辨显微物镜光学采用无限远共轭距结构, 初始结构采用传统显微物镜的 8 组 11 片镜片结构形式, 通过改变各个镜片的曲率半径与间距、选择特殊玻璃材料以及控制镜头组的光焦度等一系列手段, 对像差进行优化校正, 得到满足性能要求的光学设计, 如图 1(彩图见期刊电子版)所示。图 1(a)像差曲线表明, 物镜的球差和慧差控制良好; 图 1(b)轴向色差曲线表明, 各波长的光在 0.85 归一化光瞳坐标下几乎交于一点, 表明良好地校正了轴向色差, 实现了复消色差; 图 1(c)场曲和畸变曲线表明, 该镜头满足平场条件, 最大畸变小于 1%; 图 1(d)MTF 曲线图表明, 全视场全波段的 MTF 接近衍射极限, 在 1000 lp/mm 处 MTF 达到 0.2, 物镜设计良好。



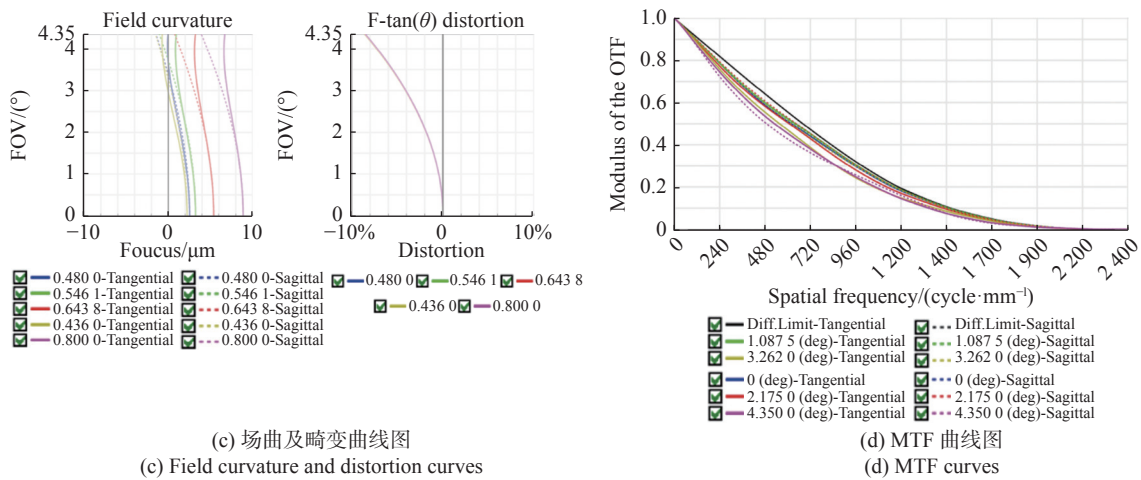


图 1 大视场高分辨显微镜物镜光学设计评价图

Fig. 1 Design evaluation graphs of the wide-field-of-view and high-resolution objective

2.3 大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统

基于 HiLo 光切片技术和大视场高分辨显微镜设计了大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统, 系统光学原理如图 2 所示, 其主要由激光光源模块、落射式照明模块、白光照明模块和成像模块等组成。激光光源模块由波长为 488 nm 和 561 nm 的双色激光器、消散斑装置和光纤耦合器构成, 消散斑装置基于多模光纤振动的方法抑制激光散斑, 通过控制消散斑装置中音圈电机模组

振动的关闭/开启, 获取散斑照明激光和均匀照明激光。落射式照明模块由光纤耦合器、两套 4f 中继镜组和光阑构成, 用于将激光光源模块传导过来的激光光束准直、扩束、会聚、再准直, 最后, 形成平行光照射样品面。白光照明模块由白光 LED 光源、科勒照明光路构成, 用于为显微系统提供合适的白光照明光源。成像模块由轴向电动精密位移台、二维载物台、大视场显微镜、荧光滤光器模组、反射镜、管镜、大靶面相机构成。其中,

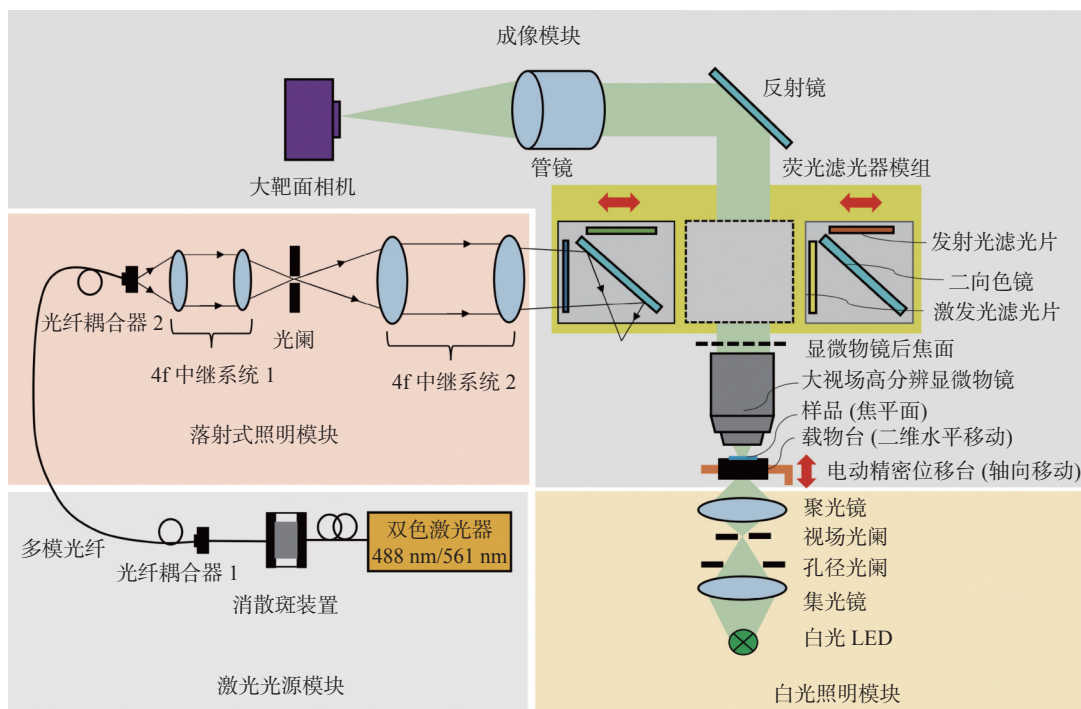


图 2 大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统光学原理图

Fig. 2 Schematic diagram of wide-field-of-view and high-resolution HiLo optical sectioning microscopy system

荧光滤光器模组由 488 nm 荧光滤光器和 561 nm 荧光滤光器构成,它们可以切换至成像模块主光路中,每一组荧光滤光器由对应的激发光滤光片、二向色镜、发射光滤光片构成。成像模块用于接收样品的透射光和荧光信号,实现明场成像或荧光成像。

为了匹配大视场显微物镜的空间带宽积,需选用大靶面科学级相机(sCMOS),根据奈奎斯特采样定理,探测器对角线方向需要的像素数为  $6\text{ mm}/(0.98\text{ }\mu\text{m}/2)=12245$ 。因此,选用韩国 LAON PEOPLE 公司 LPMVC-CXP151M 面阵相机,像素为  $14192(\text{H})\times 10640(\text{V})$ ,像元大小为  $3.76\text{ }\mu\text{m}\times 3.76\text{ }\mu\text{m}$ ,全分辨率帧率为 6 frame/s。由于该相机数据通量高达 0.9 GPixel/s,为其配备了高速数据采集卡。高速数据采集卡型号为以色列 KAYA Instruments 公司的 Komodo CoaXPress 4CH,具备 4 个 CoaXPress 接口通道,每个通道数据传输速度为 6.25 frame/s。此外,根据大视场显微物镜和大靶面相机参数,匹配设计了成像管镜,焦距为 444 mm。

基于上述原理研发了大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统,实物照片如图 3 所示。相较现有商业显微镜几兆 (Million, M) 至几十兆的空间带宽积,本系统空间带宽积高达 151 M,系统参数如表 2 所示。系统具备 3 种成像模式:(1)白光照明的明场成像;(2)均匀激光照明的宽场荧光成像;(3)散斑和均匀激光混合照明的 HiLo 光切片成像。

综上,HiLo 光切片显微成像系统与落射式荧

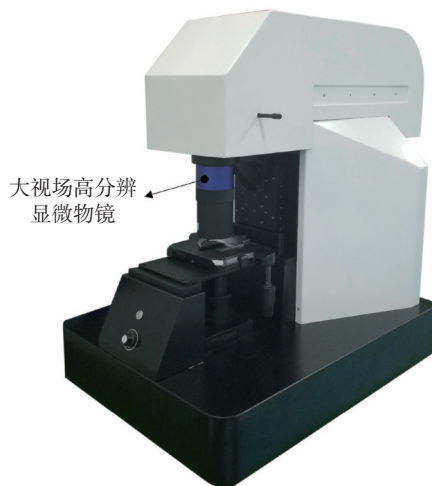


图3 系统实物照片

Fig. 3 Photo of the system

表2 系统参数

Tab. 2 Parameters of the system

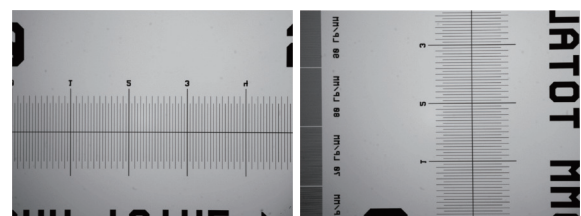
参数	指标
照明光源	白光、488 nm/561 nm激光
成像视场	4.8 mm×3.6 mm(对角6.0 mm)
分辨率	横向0.74 $\mu\text{m}$ ,轴向4.16 $\mu\text{m}$
放大倍率	11.1 ×
系统空间带宽积	151 M
工作模式	明场成像、宽场荧光成像、HiLo光切片成像
外形尺寸	565 mm(宽)×890 mm(长)×830 mm(高)

光显微镜类似,只是在照明路径中增加了激光束和消散斑装置,以形成散斑照明和均匀照明光。当消散斑装置处于静态时,在样品面上形成散斑照明;当消散斑装置工作时,产生的散斑在相机曝光过程中变得模糊,有效地在样品面上形成了均匀照明。对采集的散斑照明图像和均匀光照明图像进行处理,得到 HiLo 光学切片图像。

### 3 系统性能测试

#### 3.1 成像视场测试

利用大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统对 Thorlabs 公司测试靶标 R1L3S5P 进行白光照明明场成像,开展系统成像视场测试实验,测试结果如图 4 所示,其中,图 4(a)为横向视场测试结果,图 4(b)为纵向视场测试结果。由图 4 可知,系统的横向视场  $H$  约为 4.8 mm,纵向视场  $V$  约为 3.6 mm。计算可得,系统的对角视场  $L = \sqrt{H^2 + V^2} = 6.0\text{ mm}$ 。



(a) 横向视场测试结果  
(a) The test result of the horizontal FOV

(b) 纵向视场测试结果  
(b) The test result of the vertical FOV

图4 系统成像视场测试结果图

Fig. 4 The test results of FOV of the system

#### 3.2 分辨率测试

利用大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统对经过标定的星点直径为  $\Phi 200\text{ nm}$  的星点板进



行白光照明明场成像,开展系统横向分辨率测试实验。在采集的星点图像上随机选取 15 个星点像,对其横向光强分布进行高斯拟合,得到横向光强分布半峰全宽(Full Width at Half Maximum, FWHM),FWHM 取平均值后,由以下公式计算得到系统横向分辨率 $\varepsilon$ ,即

$$\varepsilon = \text{FWHM} \times dx / X \quad (9)$$

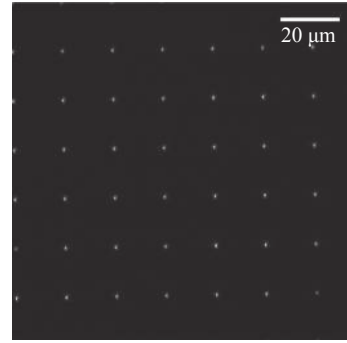
式中,  $dx$ 是相机像元大小,  $X$ 是大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统的放大倍率。

系统横向分辨率测试结果如图 5(彩图见期刊电子版)所示。图 5(a)是 200 nm 星点板白光照明明场成像结果,图 5(b)是随机选取的 15 个星点像横向光强分布曲线,图 5(c)是 15 个星点像横向光强分布高斯拟合曲线的 FWHM。FWHM 平均值为 2.19 pixel,相机像元尺寸为 3.76  $\mu\text{m}$ ,系统放大倍率设计值为 11.1 $\times$ ,由式(9)计算得到系统的横向分辨率为 0.74  $\mu\text{m}$ 。

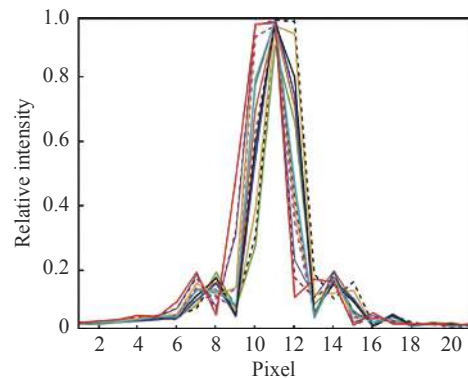
利用大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统对 2  $\mu\text{m}$  绿色荧光聚甲基丙烯酸甲酯微球(无锡瑞格生物科技有限责任公司,型号 UniFlu PMMA-0202G,以下简称“荧光微球”)进行三维光切片成像,开展系统轴向分辨率测试实验。将稀释后的荧光微球溶液用浓度为 6% 甲基纤维素凝胶固定在培养皿中,然后将培养皿固定在样品台上。在 488 nm 激发光照明下,系统以 0.3  $\mu\text{m}$  的运动步长对荧光微球样品轴向(Z 向)扫描成像,共采集 50 层图像,每层图像包含一幅散斑照明荧光图像和一幅均匀照明荧光图像。

利用 HiLo 光切片算法处理每层散斑照明图像和均匀照明图像,得到 50 层荧光微球光切片图像,合成为荧光微球三维光切片图像。在三维光切片图像中随机选取 15 个荧光微球,对其光强分布进行去卷积处理,排除荧光微球直径对测量结果的影响,得到系统三维点扩散函数(Point Spread Function, PSF),然后对三维 PSF 轴向光强分布进行高斯拟合,得到 FWHM,FWHM 取平均值后,结合电动精密位移台运动步长 $dz$ 计算得到系统轴向分辨率 $z_{\min}$ ,即

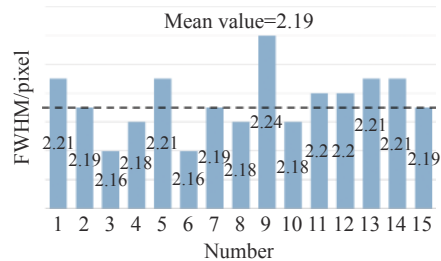
$$z_{\min} = \text{FWHM} \times dz \quad (10)$$



(a) 200 nm 星点板白光照明明场成像结果  
(a) Bright field imaging of a 200 nm star point plate illuminated by white light



(b) 随机选取的 15 个星点像横向光强分布曲线  
(b) Transverse light intensity distribution curve of 15 randomly selected star points images



(c) 15 个星点像横向光强分布高斯拟合曲线的 FWHM  
(c) FWHM of Gaussian fitting curve of transverse light intensity distribution of the 15 star points images

图 5 系统横向分辨率测试结果图

Fig. 5 The test results of lateral resolution of the system

系统轴向分辨率测试结果如图 6(彩图见期刊电子版)所示:图 6(a)是荧光微球部分 Z 平面的荧光图像,图 6(b)是随机选取的 15 个荧光微球去卷积后得到的三维 PSF 轴向光强分布曲线,图 6(c)是三维 PSF 轴向光强分布高斯拟合曲线的 FWHM。FWHM 平均值为 13.87 步(step),由式(10)计算得到系统轴向分辨率为 4.16  $\mu\text{m}$ 。

综上,系统成像视场测试值为 6.0 mm,与设计值一致;系统横向分辨率测试值为 0.74  $\mu\text{m}$ ,轴向分辨率测试值为 4.16  $\mu\text{m}$ 。



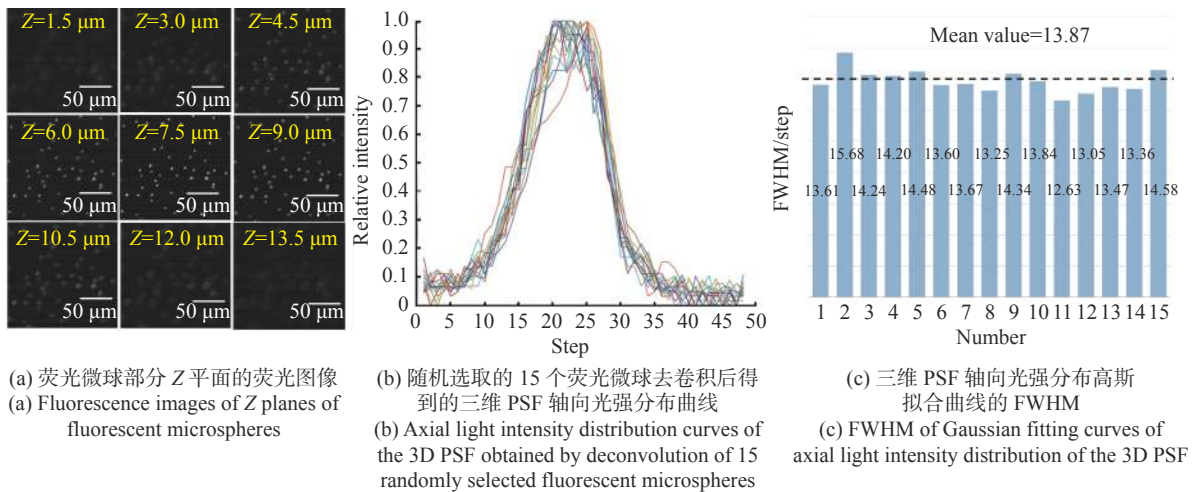


图 6 系统轴向分辨率测试结果图

Fig. 6 The test results of the axial resolution of the system

## 4 生物样本成像实验

### 4.1 小鼠脑切片明场成像实验

利用大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统对苏木精-伊红 (HE) 染色的小鼠脑冠状切片开展白光照明明场成像实验, 并与成像视场相近的 OLYMPUS 显微镜 BX50 (配备 PLN4X 物镜: NA, 0.1, FOV,  $\Phi 5.5$  mm) 和分辨率相近的 OLYMPUS 显微镜 BX50 (配备 PLN20X 物镜: NA, 0.4; FOV,  $\Phi 1.1$  mm) 成像结果对比, 成像结果如图 7 (彩图见期刊电子版) 所示。图 7(a) 是大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统的成像结果, 图 7(b) 是成像视场相近的 OLYMPUS 显微镜成像结果, 图 7(c) 是分辨率相近的 OLYMPUS 显微镜成像结果。图 7 表明, 大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统与成像视场相近的 OLYMPUS 显微镜相比, 具有更高的分辨率; 与分辨率相近的 OLYMPUS 显微镜相比, 具有更大的成像视场。因此, 系统具有兼顾大视场和高分辨成像的优势。

### 4.2 小麦种子荧光切片三维光切片成像实验

利用大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统对异硫氰酸荧光素-小麦胚芽凝集素 (FITC-WGA) 染色的小麦种子切片开展三维 (Three-dimensional, 3D) 光切片成像实验。被测样品体积约为  $4.2 \text{ mm} \times 3.6 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm}$ , 激发光波长为 488 nm, 激光器功率约为 50 mW, 样品平面上的光功率密度约为  $1.2 \text{ mW/cm}^2$ , 相机曝光时间设为 500 ms, 以  $2 \mu\text{m}$  的运动步长对样本进行轴向 (Z 向) 扫描

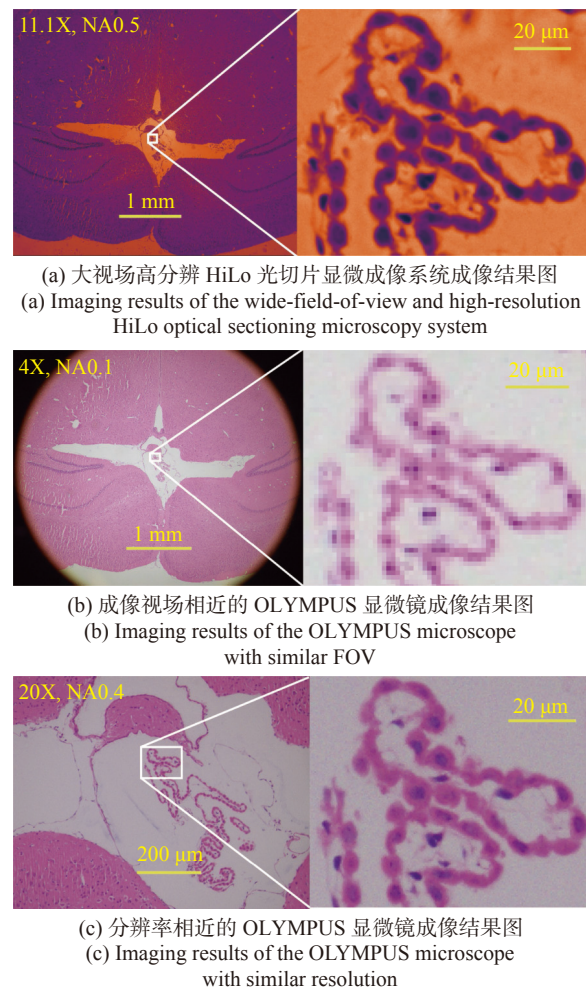


图 7 HE 染色的小鼠脑切片白光照明明场成像结果对比图  
Fig. 7 Comparison of brightfield imaging results of a HE-stained mouse brain slice illuminated by white light

成像, 共采集 50 层 100 幅图像 (每层采集一幅散斑照明图像和一幅均匀照明图像)。利用 HiLo 光

切片算法处理每层采集的散斑照明图像和均匀照明图像(即宽场荧光图像),得到 50 层图像切片,将所有切片合成为三维光切片图像栈,相应的均匀照明图像切片合成为三维宽场图像栈,成像结果对比图如图 8(彩图见期刊电子版)所示。图 8(a)和 8(b)分别是三维光切片图像栈和三维宽场图像栈全视场  $XY$  平面均值投影图,图 8(c)和 8(d)

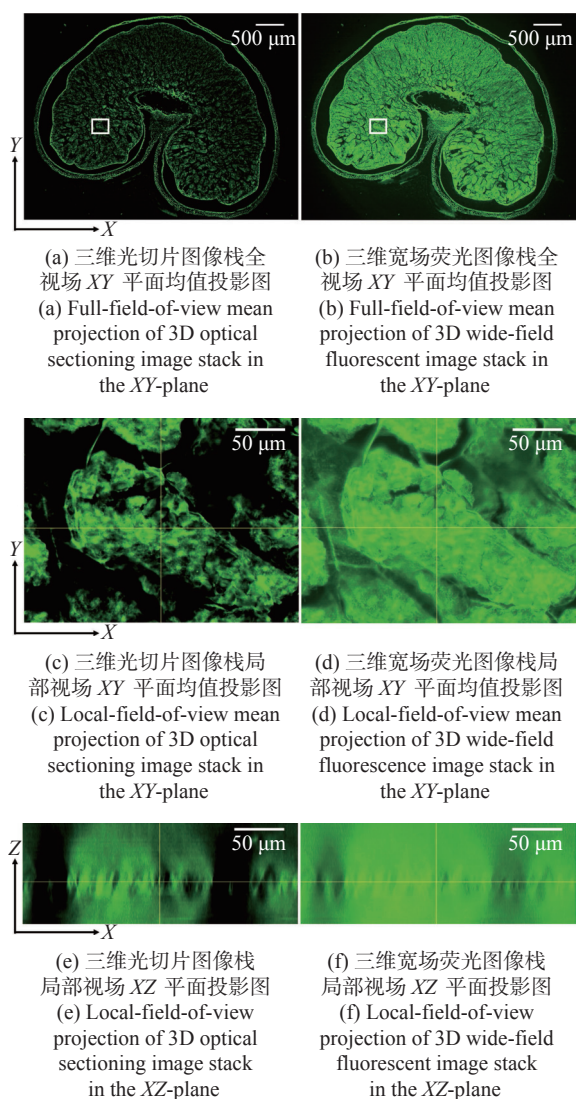


图 8 FITC-WGA 染色的小麦种子荧光切片三维光切片成像和三维宽场荧光成像结果对比图(50 层图像切片,单层图像切片厚  $2\ \mu\text{m}$ )

Fig. 8 Comparison of 3D optical sectioning and wide-field fluorescence imaging results of a FITC-WGA-stained wheat seed fluorescence slice (50 slices,  $2\ \mu\text{m}$  thick of every slice)

#### 参考文献:

- [1] 骆清铭. 脑空间信息学——连接脑科学与类脑人工智能的桥梁[J]. 中国科学:生命科学, 2017, 47(10): 1015-1024.

分别是三维光切片图像栈和三维宽场图像栈局部视场  $XY$  平面均值投影图,图 8(e)和 8(f)分别是三维光切片图像栈和三维宽场荧光图像栈局部视场  $XZ$  平面投影图。图 8 表明,大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统具有显著的光切片能力,在对厚样本成像时,能够有效抑制传统宽场荧光成像时的离焦信息,提高图像的横向分辨率和轴向分辨率。

此外,系统对小麦种子荧光切片 50 层图像的采集共计耗时约 150 s(包含轴向精密位移台的运动时间和图像存储时间),这表明,大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统能够对大体积生物样本开展快速光切片成像。

## 5 结 论

现代生物学和生物医学领域迫切需要大视场、高分辨率的显微成像技术和仪器对生物样品进行兼顾“全局形态”和“细节特征”的跨尺度观测,以满足重大科学问题的研究需求。受限于系统的空间带宽积,传统商业显微镜无法满足这一需求,且现有高空间带宽积显微成像系统存在体积庞大、实施成本高昂等问题。本文基于 HiLo 光切片技术和自主设计的大视场高分辨显微物镜,研发了具有高空间带宽积特点的大视场高分辨显微成像系统,测试了系统的成像视场和分辨率,应用该系统对小鼠脑切片开展了白光照明场成像实验,并与成像视场和分辨率相近的 OLYMPUS 显微镜成像结果做了对比,同时,应用该系统对小麦种子荧光切片开展了光切片成像和宽场荧光成像对比实验。实验结果表明,大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统的成像视场为  $4.8\ \text{mm} \times 3.6\ \text{mm}$ (对角视场  $6.0\ \text{mm}$ ),横向分辨率为  $0.74\ \mu\text{m}$ ,轴向分辨率为  $4.16\ \mu\text{m}$ 。大视场高分辨 HiLo 光切片显微成像系统具有兼顾大视场和高分辨率成像的优势和快速光切片成像的能力,能够对大体积生物样本开展快速三维成像,将为胚胎发育、脑成像、数字病理诊断等研究提供有力的技术支撑。

- LUO Q M. Brainsmatics—bridging the brain science and brain-inspired artificial intelligence[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2017, 47(10): 1015-1024. (in Chinese)
- [2] QU L, LI Y, XIE P, *et al.* Cross-modal coherent registration of whole mouse brains[J]. *Nature Methods*, 2022, 19(1): 111-118.
- [3] YU W, KANG L, TSANG V T C, *et al.* Three-dimensional multicolor subcellular imaging by fast serial sectioning tomography for centimeter-scale specimens[J]. *Biorxiv*, 2021, doi: 10.1101/2021.11.11.468237.
- [4] BERTELS S, JAGGY M, RICHTER B, *et al.* Geometrically defined environments direct cell division rate and subcellular YAP localization in single mouse embryonic stem cells[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 9269.
- [5] WU J M, LU ZH, JIANG D, *et al.* Iterative tomography with digital adaptive optics permits hour-long intravital observation of 3D subcellular dynamics at millisecond scale[J]. *Cell*, 2021, 184(12): 3318-3332.e17.
- [6] HUGONNET H, KIM Y W, LEE M, *et al.* Multiscale label-free volumetric holographic histopathology of thick-tissue slides with subcellular resolution[J]. *Advanced Photonics*, 2021, 3(2): 026004.
- [7] LI A N, GONG H, ZHANG B, *et al.* Micro-optical sectioning tomography to obtain a high-resolution atlas of the mouse brain[J]. *Science*, 2010, 330(6009): 1404-1408.
- [8] ZHANG Y, KANG L, YU W T, *et al.* Three-dimensional label-free histological imaging of whole organs by microtomy-assisted autofluorescence tomography[J]. *iScience*, 2022, 25(1): 103721.
- [9] TSAI P S, MATEO C, FIELD J J, *et al.* Ultra-large field-of-view two-photon microscopy[J]. *Optics Express*, 2015, 23(11): 13833-13847.
- [10] ZHONG Q Y, JIANG CH Y, ZHANG D J, *et al.* High-throughput optical sectioning via line-scanning imaging with digital structured modulation[J]. *Optics Letters*, 2021, 46(3): 504-507.
- [11] ZHENG G A, HORSTMAYER R, YANG CH H. Wide-field, high-resolution Fourier Ptychographic microscopy[J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(9): 739-745.
- [12] ZHENG G A, SHEN CH, JIANG SH W, *et al.* Concept, implementations and applications of Fourier Ptychography[J]. *Nature Reviews Physics*, 2021, 3(3): 207-223.
- [13] FAN J T, SUO J L, WU J M, *et al.* Video-rate imaging of biological dynamics at centimetre scale and micrometre resolution[J]. *Nature Photonics*, 2019, 13(11): 809-816.
- [14] MCCONNELL G, TRÄGÄRDH J, AMOR R, *et al.* A novel optical microscope for imaging large embryos and tissue volumes with sub-cellular resolution throughout[J]. *Elife*, 2016, 5: e18659.
- [15] MCCONNELL G, AMOS W B. Application of the mesolens for subcellular resolution imaging of intact larval and whole adult *Drosophila*[J]. *Journal of Microscopy*, 2018, 270(2): 252-258.
- [16] SOFRONIEW N J, FLICKINGER D, KING J, *et al.* A large field of view two-photon mesoscope with subcellular resolution for in vivo imaging[J]. *Elife*, 2016, 5: e14472.
- [17] YU CH H, STIRMAN J N, YU Y Y, *et al.* Diesel2p mesoscope with dual independent scan engines for flexible capture of dynamics in distributed neural circuitry[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 6639.
- [18] 张小宇. 基于深度学习的显微光学层析[D]. 武汉: 华中科技大学, 2020.
- ZHANG X Y. Deep learning-based optical sectioning microscopy[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2020. (in Chinese)
- [19] YANG M K, ZHOU ZH Q, ZHANG J X, *et al.* Matriex imaging: multiarea two-photon real-time in vivo explorer[J]. *Light: Science & Applications*, 2019, 8: 109.
- [20] STELZER E H K, STROBL F, CHANG B J, *et al.* Light sheet fluorescence microscopy[J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2021, 1(1): 73.
- [21] PRIYADARSHI A, DULLO F T, WOLFSON D L, *et al.* A transparent waveguide chip for versatile total internal reflection fluorescence-based microscopy and nanoscopy[J]. *Communications Materials*, 2021, 2(1): 85.
- [22] NWANESHIUDU A, KUSCHAL C, SAKAMOTO F H, *et al.* Introduction to confocal microscopy[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2012, 132(12): 1-5.
- [23] XU L Y, ZHANG Y W, LANG S, *et al.* Structured illumination microscopy based on asymmetric three-beam interference[J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2021, 14(2): 2050027.
- [24] 尹君, 王少飞, 张俊杰, 等. 基于动态散斑照明的宽场荧光显微技术理论研究[J]. *物理学报*, 2021, 70(23): 238701.
- YIN J, WANG SH F, ZHANG J J, *et al.* Theoretical study of wide-field fluorescence microscopy based on dynamic



- speckle illumination[J]. *Acta Physica Sinica*, 2021, 70(23): 238701. (in Chinese)
- [25] LIM D, CHU K K, MERTZ J. Wide-field fluorescence sectioning with hybrid speckle and uniform-illumination microscopy[J]. *Optics Letters*, 2008, 33(16): 1819-1821.
- [26] LIM D, FORD T N, CHU K K, *et al.*. Optically sectioned *in vivo* imaging with speckle illumination HiLo microscopy[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(1): 016014.

#### 作者简介:



郎 松(1991—),男,安徽阜阳人,助理研究员,中国科学技术大学博士研究生,2013年于西北工业大学获得学士学位,2015年于哈尔滨工业大学获得硕士学位,主要从事光机结构设计、生物医用光学成像技术等方面的研究。E-mail: langsong@sibet.ac.cn



巩 岩(1968—),男,吉林梅河口人,中科院苏州医工所研究员,博士生导师,1990年于浙江大学获得学士学位,2002年于中国科学院长春光学精密机械与物理研究所获得博士学位,主要从事光学系统设计、先进计算显微光学和成像技术等方面的研究。E-mail: gongyi@sibet.ac.cn

## 向您推荐《液晶与显示》期刊

- 中文核心期刊
- 中国液晶学科和显示技术领域的综合性专业学术期刊
- 中国物理学会液晶分会会刊、中国光学光电子行业协会液晶分会会刊
- 英国《科学文摘》(INSPEC)、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、美国《剑桥科学文摘》(CSA)、“中国科技论文统计源期刊”等 20 余种国内外著名检索刊物和文献数据库来源期刊

《液晶与显示》以材料物理和化学、器件制备技术及器件物理、器件驱动与控制、成像技术与图像处理等栏目集中报道国内外液晶学科和显示技术领域最新理论研究、科研成果和创新技术,及时反映国内外本学科领域及产业信息动态,是宣传、展示我国该学科领域和产业科技创新实力与硕果,进行国际交流的平台。其内容丰富,涵盖面广,信息量大,可读性强,是我国专业学术期刊发行量最大的刊物之一。

《液晶与显示》征集有关液晶聚合物、胶体等软物质材料和各类显示材料及制备方法、液晶物理、液晶非线性光学、生物液晶;液晶显示、等离子体显示、发光二极管显示、电致发光显示、场发射显示、3D 显示、微显示、真空荧光显示、电致变色显示及其他新型显示等各类显示器件物理和制作技术;各类显示新型模式和驱动技术、显示技术应用;显示材料和器件的测试方法与技术;各类显示器件的应用;与显示相关的成像技术与图像处理等研究论文。

《液晶与显示》热忱欢迎广大作者、读者广为利用,踊跃投稿和订阅。

地 址:长春市东南湖大路 3888 号

《液晶与显示》编辑部

邮 编:130033

电 话:(0431)6176059

E-mail:yjyxs@126.com

国内统一刊号:CN 22-1259/O4

国际标准刊号:ISSN 1007-2780

国内邮发代号:12-203

国内定价:50 元/期

网 址:www.yjyxs.com