

双光子激光扫描实时立体显微镜及应用

杨延龙, 尹威禹, 杨睿文, 姚保利*

(中国科学院 西安光学精密机械研究所 瞬态光学与光子技术国家重点实验室, 陕西 西安
710119)

摘要: 双光子激发激光扫描荧光显微镜具有三维成像能力, 但对于大视场快速动态成像的应用场合, 三维成像速度较慢, 成像视场也受限于扫描器件和物镜的约束。本文基于光场调控技术与双视角延伸焦场立体扫描技术相结合的方法, 以及高速轴向扫描与自动化平移样品的装置, 构建了一套双光子激发激光扫描实时立体显微镜。与国内外同类仪器相比, 主要特点是利用光场调控技术实现变景深的显微成像, 以适应生物成像中灵活多变的成像需求; 利用延伸焦场的双视角快速切换扫描技术, 实现快速立体成像, 以获取样品的深度信息; 通过高速轴向压电平移台和横向平移台实现自动化三维视场扫描成像和拼接, 为活体生物的深层组织成像和大视场自动化三维成像提供一种新的观测手段。

关键词: 双光子激发; 光场调控; 体成像; 大视场拼接

Two-photon laser scanning real-time stereo microscopy and applications

Yang Yanlong, Yin Weiyu, Yang Ruiwen, Yao Baoli*

(State Key Laboratory of Transient Optics and Photonics, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics,
Chinese Academy of Sciences, Xi'an, Shaanxi 710119)

Abstract: Two-photon excitation laser scanning fluorescence microscopy has the intrinsic three-dimensional imaging capability, but suffers from the limited imaging speed for observing fast dynamic samples across a large field of view. Here we developed a set of two-photon laser scanning real-time stereomicroscope with a variable depth of field, which can work in several imaging modes, including point scanning mode, line scanning mode and stereoscopically line scanning mode. By using a fast moving piezo z-stage and an electronic motorized xy-stage, samples across several millimetres wide and hundreds micrometres deep can be imaged automatically with stack stitching process. This microscope is demonstrated for fast and volumetric imaging of dynamic biological tissues.

Keywords: Two-photon excitation; modulation of optical field; volumetric imaging; stitching for large field of view

1 研制背景

光学显微成像技术，特别是复式显微镜自十七世纪发明至今已被广泛应用于生物医学、材料工程、微加工和监测等领域，成为非常重要的信息获取手段。近年来发展迅速的宽场三维显微成像技术，如结构光照明光学显微[1]和光片荧光显微[2]可实现快速、超分辨、低光毒性的三维成像结果，被广泛应用于细胞级的生命现象研究以及模式小动物的研究。其试验样品都比较透明，成像深度一般在数十微米，生物组织对光散射的影响可以忽略。

对于更大的成像深度，光的散射成为影响成像的关键限制因素。目前最有效的对深层组织或厚样品成像的光学显微方法是上世纪 90 年代 Denk 等人[3]提出的双光子激发激光扫描荧光显微技术。它通过近红外超短脉冲激光作为激发光源来提高在生物组织中的穿透深度，并且利用高灵敏的探测器（PMT 或 APD）来捕获荧光信号，可对数百微米至毫米量级的深层组织进行成像，所以近年来发展迅速并成为神经科学研究的主要成像工具。但由于聚焦光场的轴向分布一般在微米量级，虽然使其具有光学层切效果，也意味着成像景深很短，所以一次只能对三维样品中的一薄层进行成像。为了观测样品的三维分布，需要移动样品或者显微物镜，让样品的不同深度依次经过物镜的焦面，从而获取一系列的二维图像，最后再通过计算机完成图像融合与三维重建。获取单幅二维图像一般在数毫秒到秒量级（取决于激光扫描速度、荧光标记物的量子效率、激发光的功率以及探测器的灵敏度等条件），三维成像的时间分辨率则一般在数分钟至数十分钟，这成为观测组织中的三维动态过程的主要瓶颈。

针对目前双光子激发荧光显微镜三维成像速度慢和成像景深受限的问题，本文采用光场调控技术与双视角延伸焦场立体扫描技术相结合的方法，实现变景深多模式双光子扫描成像[4,5]。其主要特点是利用光场调控技术实现变景深的显微成像，以适应生物成像中灵活多变的成像需求。利用延伸焦场的双视角快速切换扫描技术，实现快速立体成像，以获取样品的深度信息，结合三维显示技术，使用者可对样品进行实时三维动态观察。通过高速轴向压电平移台和横向平移台，实现自动化三维视场扫描成像和拼接，为活体生物的深层组织成像和大视场自动化三维成像提供一种新的观测手段。

2 双光子激光扫描实时立体显微镜



图 1 双光子激光扫描实时立体显微镜

2.1 仪器主要性能指标

双光子激光扫描实时立体显微镜如图 1 所示，设备的最佳横向分辨率为 $0.6\mu\text{m}$ ，景深调谐范围为 $3\sim 90\mu\text{m}$ ，单帧成像速度 ≥ 30 帧/秒@ 512×512 像素，双视角立体成像速度大于 5 帧/秒，单成像视场 $600\times 600\mu\text{m}^2$ ，大视场图像拼接成像横向尺寸可达 $5\text{mm}\times 5\text{mm}$ 。

2.2 仪器构成

仪器主要由光学成像部分、电控及数据采集以及显示模块组成，具体包括：1、激光光源和变景深光场调制模块。2、激光扫描模块。3、荧光探测模块。4、立体实时显示模块。最终图像通过立体显示器把经过实时处理的高景深、双视角立体荧光图像显示，供使用者对三维样品进行实时动态观测。

2.3 仪器工作模式

本仪器把点扫描成像、延伸焦场的线扫描成像、以及双视角线扫描的立体成像三种成像模式合为一体，并可以快速切换。三种工作模式如下：

(1) 点聚焦扫描模式。用于高轴向分辨率的光学层切成像，成像分辨率高且景深较短，需要配合电动平移台进行轴向扫描三维成像，可作为延伸焦场扫描成像的参考和校准之用。

(2) 延伸焦场扫描成像模式。利调控贝塞尔光束或其他延伸焦场可以同时激发高景深范围的荧光样品，从而实现无轴向扫描的三维体积的投影成像，可大大提高成像的速度，适用于分布较为稀疏的样品的动态观测。

(3) 双视角立体扫描成像模式。将延伸焦场光束从两个方向呈一定角度照射样品，通过双目视觉原理获取立体图像。立体成像设置模块中可以设置视差角，还可以选择立体成像

模式，包括 3D 眼镜、双色图像和并排显示等，用户佩戴相应的眼镜，即可从计算机显示界面中实时观察到立体荧光图像。

2.4 仪器控制软件

本仪器软件包含多模式成像、光场调控、像差校正、数据处理及立体显示、大视场拼接等功能，扫描成像引擎采用开放源代码的 Scanimage 项目，软件界面如图 2 所示。

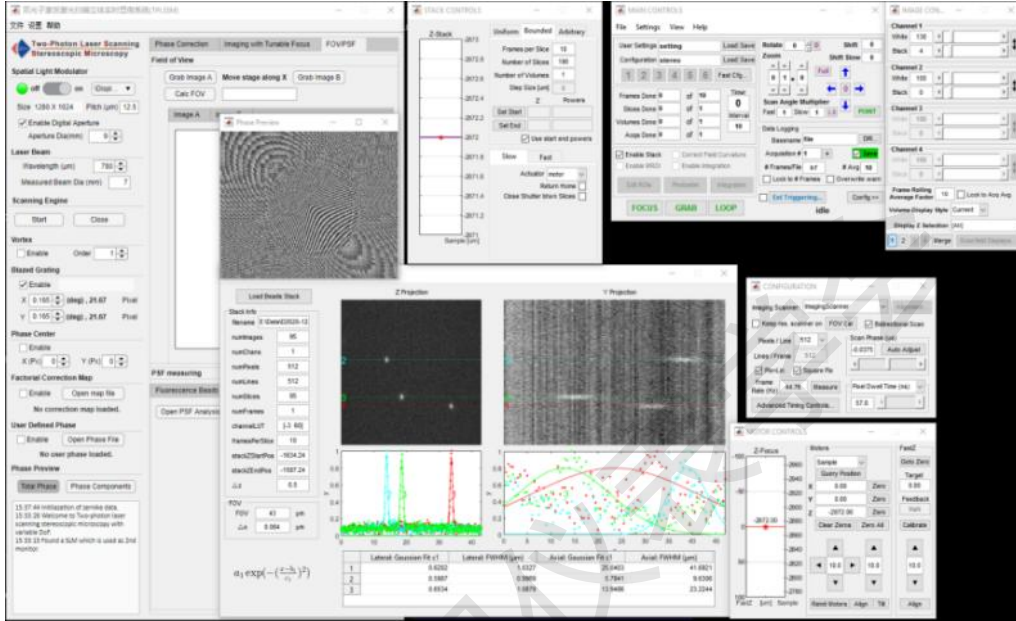


图 2 光场调控及扫描成像控制软件

通过光场调控面板，可以检测空间光调制器并设置其连接参数，设定工作波长、衍射角、面型校正相位以及其他用户自定义相位。

在成像模式选择面板中可以选择三种成像模式的光场调控参数，包括菲涅尔透镜相位因子和贝塞尔光束的各种参数，以及配合辅助光场测量光路对光束完成拍摄和分析。在立体成像模式中，可以选择体视角度、立体显示方式及成像速度等参数的选择。

为了定量分析成像结果，软件在测量面板中设置了通过荧光小球测量系统点扩散函数的功能，可方便对采集的数据进行横向和轴向分辨率的测定。

对于毫米量级的大视场区域，需要利用软件的大视场拼接成像模式。首先，在实时成像模式由用户根据样品的分布设定三维成像的深度范围以及轴向步进值，然后选择需要成像的整个区域的边界点，由程序自动分割视场，生成边界区域重叠的数个视场，并规划扫描路径，开始多视场图像 Stack 的扫描。扫描完成后，调用程序的图像拼接模块，对图像进行拼接和融合，以及去噪声等后处理，生成完整的大视场三维图像数据。

3 仪器使用效果

通过对激发光场焦深的控制实现变景深成像,可以实现对不同结构复杂性的样品实现灵活的显微成像。如图 3 有高的轴向分辨率,但是成像速度较慢,一般在数十秒到数分钟;(b)和(c)展示了通过立体成像模式获得的高景深立体图像。整个成像区域的厚度约为约 $82\mu\text{m}$ 。图 4 展示了植物花粉样品的显微成像结果,景深约 $65\mu\text{m}$ 。

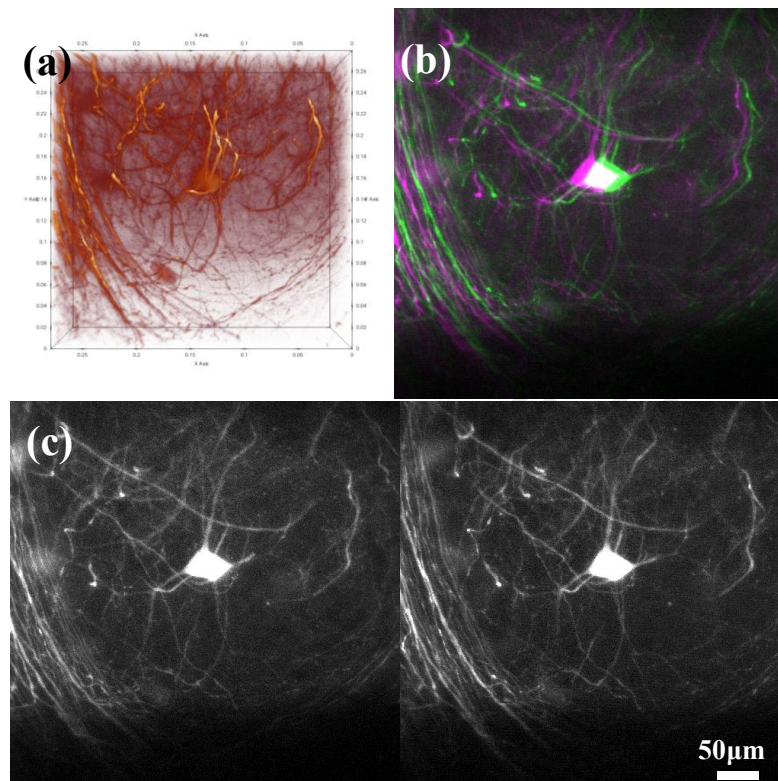


图 3 小鼠脑神经显微成像结果。(a)点扫描三维成像(41层);(b)、(c)立体成像伪彩色图及左右视角图像。

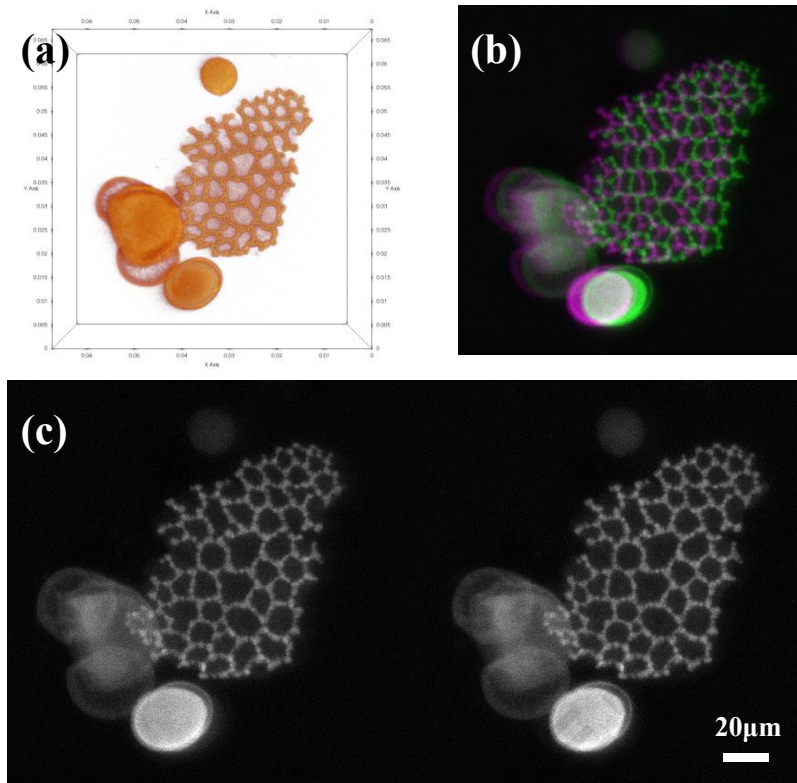


图 4 植物花粉显微成像结果。(a)点扫描三维成像(30层); (b)、(c)立体成像伪彩色图及左右视角图像。

图 5 为小鼠角膜神经的大视场拼接成像结果，成像模式为传统的点扫描方式。整个视场由 4×4 个单独的扫描视场组成，每个成像视场的覆盖约 $600\mu\text{m} \times 600\mu\text{m}$ 的区域，轴向移动间隔为 $2\mu\text{m}$ ，共 101 层，相邻区域的重叠区域根据样品的特点设置，一般为 $1/10$ 左右。扫描获得的原始图像的 z 向投影图见图 5(a)；经算法辅助的手动图像对齐方式，图像 Stack 完成配准，如图 5(b)所示；再对重叠区域的图像强度做强度融合处理，获得均匀的背景和信号强度分布，最终获得如图 5(c)的完整的三维大视场图像数据，覆盖区域约 $2.4\text{mm} \times 2.4\text{mm} \times 300\mu\text{m}$ ，全视场成像速度耗时约 10 分钟。

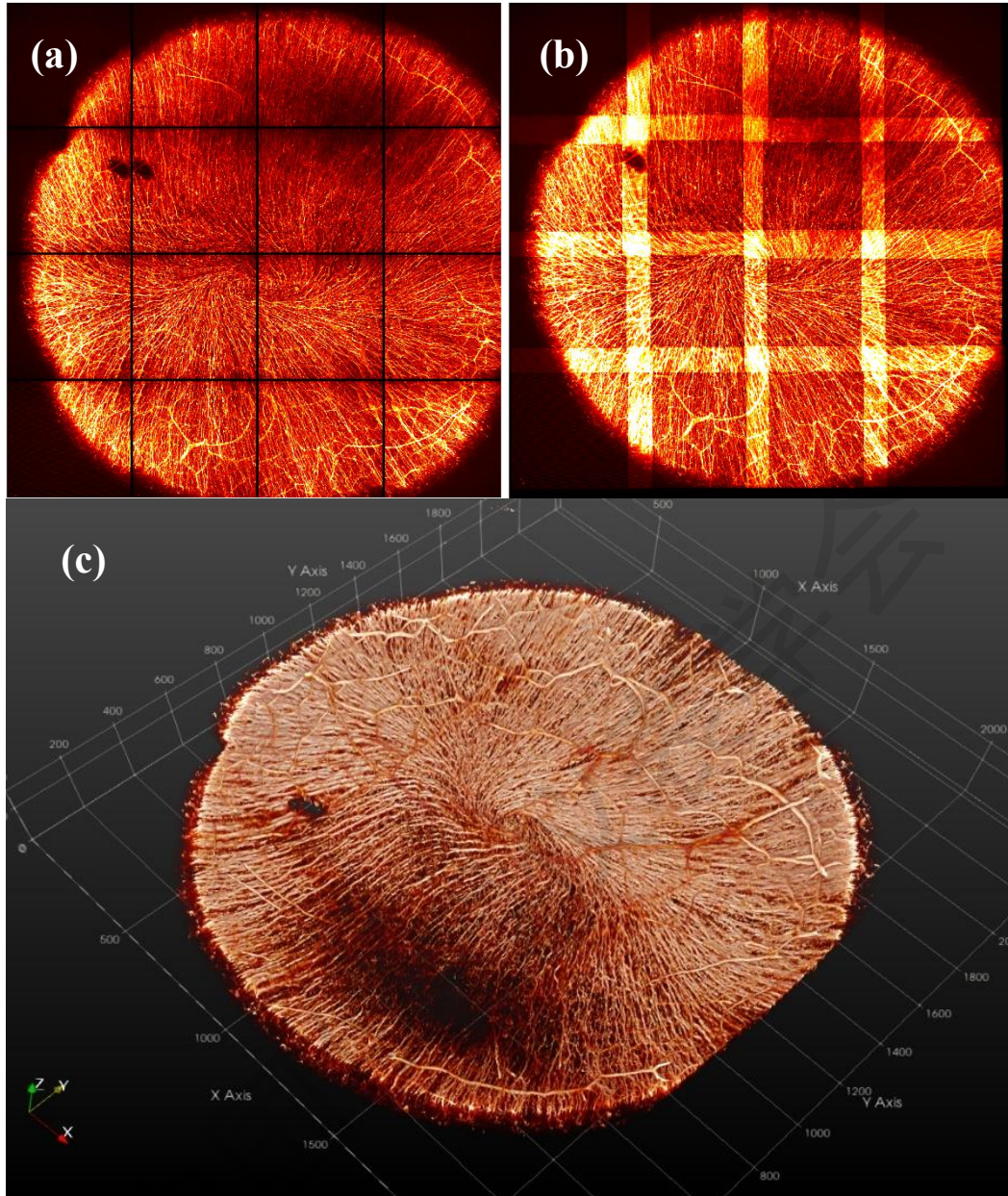


图 6 小鼠角膜神经大视场拼接三维成像结果。(a)4×4 视场 z 向投影图，单视场 512×512 像素，共 101 层；
(b) 拼接完成的图像，2048×2048×101 像素。(c)经过后处理的拼接图像的三维渲染图。

参考文献：

- [1] Gustafsson M J, Shao L, Carlton P M, et al. Three-Dimensional Resolution Doubling in Wide-Field Fluorescence Microscopy by Structured Illumination[J]. Biophysical Journal, 2008, 94: 4957–4970.
- [2] Verveer P J, Swoger J, Pampaloni F, et al. High-resolution three-dimensional imaging of large specimens with light sheet-based microscopy[J], Nature Methods, 2007, 4: 311-313.

- [3] Denk W, Strickler J, Webb W, Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. Science, 1990, 248: 73–76.
- [4] Yang, Y L, Yao B L, Lei M, et al. Two-Photon Laser Scanning Stereomicroscopy for Fast Volumetric Imaging[J], PLOS ONE, 2016, 11(12): e0168885.
- [5] Yin W Y, Yang Y L, Yang R W, et al. Tunable Depth of Focus with Modified Complex Amplitude Modulation of an Optical Field[J]. Applied Optics, 2022, 61(12): 3502–9.

中国仪器仪表表学会