

# 快速、直接的超分辨显微成像

赵唯淞<sup>1</sup>

(1. 哈尔滨工业大学 仪器科学与工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150080)

**摘要:** 高通量超分辨成像对于生物医学应用中普遍需要的快速高精度分析具有重要意义。但是, 大多数超分辨方法需要复杂的采集设备和特定的成像控制, 并且可能在单个视野上花费很长时间。而这些都本质上增加了高通量系统的建设难度, 包括成像吞吐量, 系统建立和自动化等方面的挑战。另一方面, 利用荧光分子的光物理特性, 波动超分辨显微技术 (SOFI) 可以在不需要特殊光学设置的前提下打破衍射极限, 但其较长的收集时间仍然对高通量成像构成挑战。我们提出一种基于两步反卷积和自相关累积量计算 (SACD) 的超分辨方法, 它只需要20帧就能得到2~3倍的三维空间分辨率提升, 而对比之下, SOFI则需要超过1000帧。在十分钟的成像过程中, 我们记录了一张具有~128 nm分辨率及24亿像素, 覆盖~2.0 mm × 1.4 mm的面积, 包括超过2,000个细胞的超分辨图像。总体而言, 作为一个开源和自动化的模块, 我们期望SACD可以使高通量超分辨照进现实, 以此助力于生物高通量与高精度分析。

**关键词:** 超分辨显微成像; 解卷积; 生物医学成像; 计算成像; 细胞生物学

## Fast and direct super-resolution imaging

Weisong Zhao<sup>1</sup>

(1. School of Instrumentation Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150080, China)

**Abstract:** Super-resolution (SR) imaging with high-throughput is invaluable to fast and high-precision profiling in a wide range of biomedical applications. However, prevalent SR methods require sophisticated acquisition devices and specific imaging control, and may cost a fairly long time on a single field-of-view. These essentially increase the construction difficulty, including challenges in imaging throughput, system establishment, and automation. Using the natural photophysics of fluorescence, fluctuation-based microscopy techniques (SOFI) can routinely break the diffraction limit with no need for additional optical components, but its long acquisition time still poses a challenge for high-throughput imaging. Here, we propose an SR method based on the Auto-Correlation with two-step Deconvolution (SACD) that reduces the number of frames required. It only needs 20 frames for twofold 3D resolution improvements, while the SR optical fluctuation imaging (SOFI) needs more than 1,000 frames. By capturing raw

images for ~10 minutes, we record an SR image with ~128 nm resolution that contains 2.4 gigapixels covering an area of ~2.0 mm × 1.4 mm, including more than 2,000 cells. Overall, as an open-sourced and parameter-free module, we anticipate SACD can offer a direct access to make SR easier, which may facilitate the biology studies of cells and organisms in high-throughput and low-cost.

**Keywords:** Super-resolution microscopy; Deconvolution; Biomedical imaging; Computational imaging; Cell biology.

## 1 研究背景

超分辨成像技术的出现标志着成像领域对于光学衍射极限的突破,也极大地推动了生物医学领域的发展。利用超分辨技术,生物学家得以对病态细胞内的亚细胞结构进行精准的量化统计和直观的可视化分析。然而,常见的超分辨技术往往需要复杂的采集设备和特定的成像控制,并且时间分辨率低,成像通量不足,这限制了超分辨成像在生物医学中的广泛应用。基于荧光涨落物理特性的超分辨成像技术(Super-resolution optical fluctuation imaging, SOFI)<sup>[1]</sup>是一种经典的基于荧光自发涨落的统计学的超分辨方法,可以在不借助额外光学元件的条件下突破衍射极限。但在传统的 SOFI 技术中,广泛存在的离焦信号和胞浆背景削弱了波动信号的开关对比度,往往需要 1000 帧以上的原始图像用于重建,至今仍然难以满足生物医学中对于大视场和细胞器瞬时动态等研究的高通量成像需求。

## 2 研究内容

研究提出了自相关两步解卷积超分辨成像 (Super-resolution imaging based on Auto-Correlation with two-step Deconvolution, SACD) 方法<sup>[2]</sup>。其可以利用预解卷积技术对图像进行处理,以提升荧光涨落现象的开关对比度,从而将重建所需的原始图像数量缩减至少两个数量级。同时在计算自相关累积量后再次进行解卷积,以进一步提升结果的分辨率。SACD 技术在不使用无需额外硬件的条件下,实现了目前活细胞中通量最高的超分辨成像。从原来的需要 1000 帧的成像降低到只需要 20 帧,即可就能实现超过 2 倍的三维空间分辨率提升。结合商业的转盘共焦 (Spinning Disk Confocal, SDC) 显微镜,可以实现快速毫米级视场成像或者四维活体成像。

采用结构光超分辨显微镜 (SIM)<sup>[3]</sup>对使用量子点标记的微管进行成像。使用 20 帧原始图像重建的 SACD 结果成功地解析了与相应 2D-SIM 图像相同的细胞骨架结构。通过对相邻

微管细丝的双峰分析,发现 SACD 的分辨率可达 120 纳米,2D-SIM 的分辨率可达 124 纳米。通过傅里叶环相关 (Fourier ring correlation, FRC) 分析, 研究进一步证明了 SACD 的分辨率提升能力。

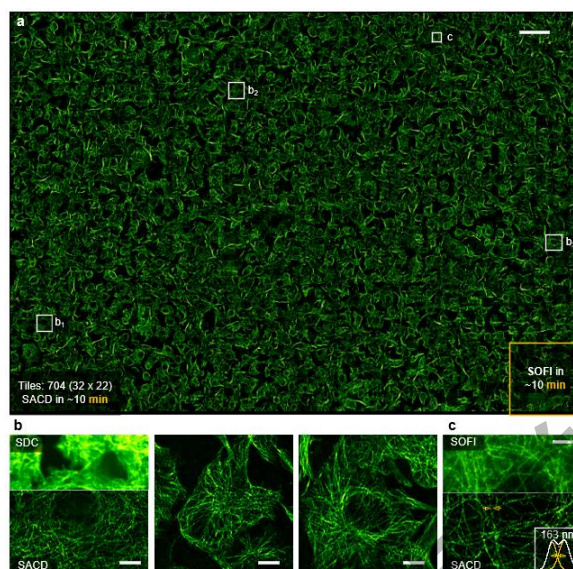


图 1 SACD 实现大视场高通量成像

由于 SADC 不需要特定的光学照明和配置,可以直接使用 sCMOS 相机来实现三维超分辨成像,其相比于现有的商业 SIM 拥有进而具备更大的视场范围。利用这一点优势,研究在深度达 9 微米的范围内同时对多个 COS-7 细胞进行了成像,并实现了两倍分辨率提升。同时,研究还实现了对毫米级视场内 (2 毫米 $\times$ 1.4 毫米) 微管的高通量超分辨成像,包含多达 2000 个细胞。传统 SOFI 需要几乎半天的连续采样才能对整块区域完成重建,而 SADC 只需 10 分钟便可达到相似甚至更加优越的成像性能。

真正高稳定性和高保真度的活细胞超分辨成像总是具有挑战性的,其受到信噪比、光漂白和光毒性的严重限制。在这种情况下,研究引入了之前开发的稀疏解卷积[3]方法,其主要通过时空上的连续性和稀疏性对原始图像进行背景预滤除和后解卷积,以最大限度地利用原始图像中的信息。最后,研究使用 SADC 技术进行了全活细胞四维超分辨成像,即在超过 10 分钟时间内对 COS-7 活细胞的线粒体外膜网络进行三维超分辨体成像。与传统共焦系统相比,精细结构的可见性得到了彻底地提高,线粒体被清晰地成像为锐利的中空膜结构。通过稀疏性和连续性的双重约束,SADC 高保真地实现了随时间变化的全细胞线粒体裂变与融合成像。

### 3 结论

总之,通过充分利用原始图像中的荧光波动,SADC 可以在商业系统上直接实现三维分

分辨率的提高。因此，我们期待 SACD 成为生物学家分析活细胞中复杂瞬态动力学的常规工具，以助于高通量、高分辨率和低成本地进行基于显微镜的筛查。

#### 参考文献

- [1] Dertinger T, Colyer R, Iyer G, et al. Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI). *PNAS*, 2009, 106(52): 22287-22292.
- [2] Zhao W, Zhao S, Han Z, et al. Enhanced detection of fluorescence fluctuations for high-throughput super-resolution imaging. *Nature Photonics*, 2023: DOI: <https://doi.org/10.1038/s41566-023-01234-9>.
- [3] Zhao W, Zhao S, Li L, et al. Sparse deconvolution improves the resolution of live-cell super-resolution fluorescence microscopy. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(4): 606-617.

中国仪器仪表装备网