

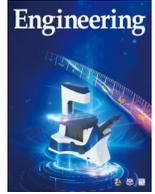


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
High-End Measuring Instruments—Article

基于谐波的多光子扫描结构光照明超分辨显微成像

汪磊^a, 郑晓敏^a, 周洁^a, 王美婷^a, 陈嘉杰^a, 曾佑君^a, 许改霞^a, 王颖^b, 邱海霞^b, 邵永红^{a,*}, 屈军乐^a, 高志^c, 顾瑛^b

^a College of Physics and Optoelectronic Engineering, Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

^b Department of Laser Medicine, First Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China

^c Department of Bioengineering and COMSET, Clemson University, Clemson, SC 29634, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 February 2021

Revised 10 June 2021

Accepted 22 December 2021

Available online 16 February 2022

关键词

超分辨显微成像

结构光照明超分辨显微成像

多光子结构光照明超分辨显微成像

SIM

二次谐波产生 (SHG)-SIM

摘要

本文提出了一种利用多光子非线性效应的多光子结构光照明超分辨显微成像 (multiphoton-structured illumination microscopy, mP-SIM) 技术, 可实现比线性 SIM 更高的成像分辨率。通过扫描正弦结构的照明光激发样本产生多光子荧光信号或谐波信号, 从而利用由光学非线性效应产生的非正弦结构信号光的谐波来提高分辨率。本文提出了 mP-SIM 理论以重建系统的超分辨图像。如果考虑多光子非线性效应的所有高阶谐波 (阶数足够高, 即 m 足够大), 则 mP-SIM 在理论上可实现无限分辨率。通过实验证实了双光子荧光 (2P)-SIM 和二次谐波产生 (second harmonic generation, SHG)-SIM 分别可实现 86 nm 和 72 nm 的横向分辨率。对细胞内染色 F-肌动蛋白和小鼠尾腱胶原纤维成像, 进一步验证了 mP-SIM 的超分辨成像能力。该方法不但适用于多光子荧光超分辨显微成像, 而且适用于非标记的如 SHG 等超分辨显微成像; 重要的是, 该方法不需要特定的荧光团或高功率激发光, 可直接用于商用 mP 显微系统来实现超分辨成像。

© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

多光子 (multiphoton, mP) 显微成像技术使用近红外脉冲激光器, 具有成像深度大、光漂白少、光毒性小的优点, 因此已广泛应用于活细胞、厚组织和器官的成像研究 [1–5]。然而该技术的空间分辨率受光学衍射极限限制, 不能应用于活体样品的超微结构成像。随着高功率激光器、高灵敏度探测器、荧光探针和相关光电器件的快速发展, 超分辨远场光学显微技术取得了显著成就。目前超越

衍射极限的超分辨方法包括光激活定位显微成像 (photo-activated localisation microscopy, PALM) [6–7]、随机光学重建显微成像 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM) [8–10]、受激辐射耗尽显微成像 (stimulated emission depletion, STED) [11–12] 和结构光照明显微成像 (structured illumination microscopy, SIM) 技术 [13–14]。

在 PALM 和 STORM 中, 荧光分子以可控的方式稀疏地发出荧光, 通过对单个荧光分子的精确定位重建出荧光超分辨图像——在每个成像面衍射受限的局部区域内, 仅

* Corresponding author.

E-mail address: shaoyh@szu.edu.cn (Y. Shao).

有单个分子发出荧光并被记录，随后以纳米或亚纳米的精度确定单个分子的位置。获得这样的超分辨图像需通过 PALM 和 STORM 获取数千张原始图像。尽管这两种方法可实现约 10 nm 的分辨率[15–16]，但对于以超分辨成像的方式对活细胞快速运动过程进行实时成像或对细胞过程进行长期监测仍然是一个难题。

在 STED 中，激发光的衍射受限焦点与 STED 光重叠，利用斯托克斯红移的甜甜圈形状的光（即 STED 光）抑制激发态处的荧光分子发光，仅 STED 光束的中空中心区域（该区域小于激发光束的衍射受限焦点）内的荧光分子可被激发产生荧光 [11–12]，从而突破衍射极限。尽管 STED 能够实现 20~30 nm 分辨率的细胞成像，并可用于厚样品成像[17–20]，但它通常需要一个高功率 STED 激光器，比 STORM 或 PALM 的激发光功率要高 4~6 个数量级；因此用 STED 对活细胞成像可能使活细胞受到损害，在活细胞实验中必须权衡空间分辨率和光毒性之间的关系。

SIM 是另一种超分辨成像技术，该技术不需要特定的荧光团（如 STORM 中的“开-关”荧光分子或 STED 中的特定荧光分子）。在 SIM 中，莫尔效应用于提高显微成像分辨率[13]；SIM 通常通过结构光照明激发样本，从而将不可探测的高空间频率信息转移到显微成像系统的可探测通频带内。在线性 SIM 中，通过将不同相移和不同方向的结构光条纹投射到样本上获得原始图像，然后进行反卷积运算和图像重构，重建图像的分辨率比宽场显微成像提高了两倍。饱和结构光照明显微成像（saturated structured-illumination microscopy, SSIM）通过荧光饱和和激发形成高频条纹，以获得更高的分辨率，但饱和和激发导致了显著的光漂白和对细胞的光损伤[21–22]。最近，基于可开关的荧光蛋白的 SSIM 实现了分辨率约为 40 nm 的细胞成像 [23–24]。在线性 SIM 中，重建一幅超分辨图像所需的原始图像数量远少于 STORM 或 PALM 所需的原始图像，所需激光功率也明显小于 STED；这些优势使 SIM 适用于活细胞的快速成像[25–27]。研究者已成功利用光栅[13]、空间光调制器[23]或数字微镜器件[28]在样本中实现了结构光照明。SIM 可灵活应用于各种生物结构成像，包括线粒体[27,29]、细菌[30–31]和其他样本[32–34]。

虽然超分辨显微技术取得了显著的进步，但 mP 超分辨显微技术的发展仍然很缓慢[35]。mP 效应来源于样本对激发光强度的非线性响应。例如，双光子（2P）荧光强度与激发光强度的平方成正比，因此由正弦结构照明图案激发的均匀荧光溶液产生的 2P 荧光图案是一种非正弦结构，该图案由所有频率叠加而成，包括基频及其振幅不

等的高阶谐波。为了解决 mP 显微成像中荧光团的非线性响应问题，研究者开发了用于 2P-SIM 的扫描结构照明成像（scanning patterned illumination, SPIN）和扫描结构探测成像（scanning patterned detection, SPADE）两种成像方法[36]。在 SPIN 中，通过去除 2P 光学传递函数（optical transfer function, OTF）通频带内的谐波（ $2\omega_i$, t 表示时间）来实现将分辨率提高两倍的超分辨成像。具体做法是控制时间调制频率 ω_i ，令 ω_i 接近或等于探测荧光点扩散函数（point spread function, PSF）的截止频率 ω_c ； ω_i 由电光调制器（electro-optical modulator, EOM）和振镜的扫描速度决定。同时，通过将正弦结构照明图案改为正弦平方根结构照明图案以避免谐波，可以使 SPADE 显微技术的分辨率提高两倍[35–36]。最近，研究者通过实验实现了横向分辨率为 141 nm 的 SPIN 2P-SIM；与衍射极限[37]相比，其分辨率提高了约两倍。此外，利用 SPADE 2P-SIM 实现了三维活体生物成像，其横向分辨率约为 150 nm，轴向分辨率约为 400 nm，成像深度为 100 μm [38]。报道的 2P-SIM 方法大多数都是基于去除结构荧光照明图案中谐频的方法将分辨率提高两倍。然而研究发现谐波对进一步提高成像分辨率至关重要——如果可以将探测荧光 OTF 通频带外的谐波利用起来，则基于这些谐波的 mP-SIM 可以将分辨率提高很多倍。

在此，本文提出了利用非正弦结构荧光照明图案的 mP-SIM 和相应的超分辨重建算法；当荧光团在 mP 激发过程中的非线性响应阶数 m 足够多时，在理论上 mP-SIM 可实现无限分辨率。mP-SIM 类似于 SPIN，均使用 EOM 对激发光进行正弦强度调制。扫描正弦结构照明图案可以激发出样本中的非正弦结构荧光照明图案，其原理是在非饱和和激发的前提下，将直流项、基频和荧光团在 mP 激发中因非线性响应产生的一系列谐波叠加在一起。谐波与样本结构相互作用，将更高频率的信息转移到探测荧光 OTF 的通频带内，从而进一步提高分辨率。本文还研发了所需的超分辨重建算法，可根据所要求的分辨率选择合适的谐波数量来重建超分辨图像。理论结果表明，与传统 2P 显微成像（2P microscopy, 2PM）相比，mP-SIM 最高可将横向分辨率提高 $m + 1$ 倍，且不需要特定的荧光团或高功率激光。此外，本研究展示了 2P-SIM 在纳米颗粒和牛肺动脉内皮细胞（bovine pulmonary artery endothelia, BPAE）内染色 F-肌动蛋白上的应用。2P-SIM 和二次谐波产生（second-harmonic-generation, SHG）-SIM 分别可实现 86 nm 和 72 nm 的横向分辨率。据了解，上述分辨率是迄今为止在 2P-SIM 中实现的最高分辨率。

2. 材料与方 法

2.1. 光学成像系统

光学成像系统（图1）主要由Nikon倒置显微镜，60×油浸物镜（CFI Plan Apochromat Lambda, Japan）和中心波长被调至810 nm的锁模钛蓝宝石激光器（Mai Tai DeepSee, Spectra-Physics, USA）组成。激光脉冲宽度为100 fs，输出功率为2.7 W。使用EOM（Model 350, Conoptics, USA）对激光光强进行正弦调制。由数据采集卡（data acquisition, DAQ; NI-PCI6110）产生锯齿波信号，并以此信号驱动二维振镜（two-dimensional galvo scanner, 2D GS; Model 6210H, Cambridge Technology, USA）对激光进行逐行扫描。扫描透镜的焦距为60 mm。激发光照明图案是通过扫描激发光光束与对激发光光强进行正弦调制产生的。通过控制EOM改变正弦波的相位和周期，可以改变照明图案的相位和方向。荧光经过物镜后由二向色镜反射，并用2P滤光片（ET625SP-2P, Chroma, USA）过滤以阻挡激发光，随后荧光信号通过一个短焦透镜聚焦到光电倍增管（photo multiplier tube, PMT; H7422-50, Hamamatsu, Japan）。对于SHG成像，需将荧光发射滤光片替换为SHG滤光片（ET405/10×, Chroma）以对后向SHG信号进行滤波，随后SHG信号被聚焦到PMT。

2.2. 系统控制与数据采集

该系统由个人计算机控制。通过基于LabVIEW编写的自定义控制程序同步控制EOM、2D GS和PMT。正弦波和锯齿波信号由型号为NI-PCI-6110的数据卡产生，分别用于控制EOM和2D GS。PMT的输出电压信号由低噪声前置放大器（Model SR570, Stanford Research Systems, USA）放大，并通过相同的数据卡获取，获得的数据用于

重建原始的结构荧光图像。在不旋转样品的情况下，通过改变正弦波信号的初始相位和周期，可得到相对于2D GS快轴方向15°、75°和135°的扫描结构照明图案。对于每个方向上的扫描结构照明图案，至少需要5种不同的初始相位（即0、 $2\pi/5$ 、 $4\pi/5$ 、 $6\pi/5$ 、 $8\pi/5$ ）。在实验中扫描速率设置为每秒一帧。

2.3. 数据处理

通过用MATLAB（MathWorks, USA）编写的自定义程序对原始图像进行处理以获得超分辨图像。数据处理主要包括以下几个步骤：①重新调整原始图像。为了补偿光源光强波动和光漂白，对原始图像进行了强度调整，以使所有图像在减去背景后总强度相等。②通过每个方向的5幅原始图像计算出分离的各个频率分量。利用切趾法略微调整频谱，以减少离散傅里叶变换引入的噪声和边缘伪影。③将在三个方向上分离出来的频率分量移动到频谱实际位置，并根据它们的权重进行线性叠加。④对叠加频谱进行维纳滤波，重建超分辨图像。

2.4. 荧光微珠制备

黄绿色荧光微珠（直径75 nm; Fluoro-Max, G75; Thermofisher Scientific, Germany）用于评定系统的横向分辨率。荧光微珠按1:1300的比例稀释（蒸馏水中为1:100，乙醇中为1:13），并分散在清洁过的常规盖玻片上。风干几分钟后，盖玻片上的乙醇和水都被蒸发。随后，用清水轻轻清洗盖玻片，以去除多余和未固定的荧光微珠。再次风干后，荧光微珠被分散在硅油中并沉积在盖玻片上，最后将盖玻片覆盖在载玻片上并用指甲油密封。

2.5. BPAE 细胞样本

FluoCells® 玻片#1（F36924, Thermofisher Scientific）

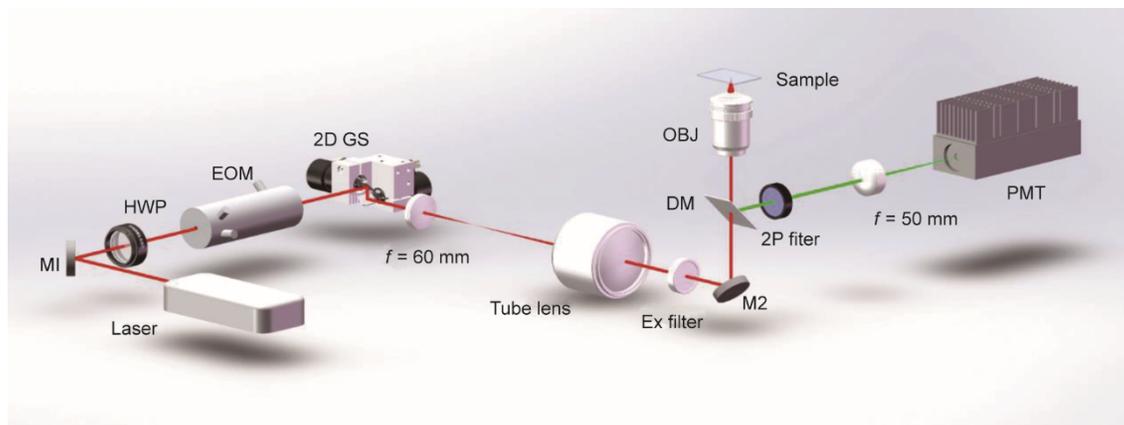


图1. 光学成像系统示意图。锁模近红外钛蓝宝石激光（红色）经EOM进行光强正弦调制，由2D GS逐行扫描，随后通过60×物镜到达样本以激发样本产生荧光。荧光（绿色）经物镜后被二向色镜反射离开激发光路，并被PMT检测。M1、M2：反射镜1、反射镜2；f：焦距；Ex：激发；HWP：半波片；DM：二向色镜；OBJ：物镜；PMT：光电倍增管。注：图片不按比例绘制。

上的BPAE细胞被多种荧光染料染色。线粒体用红色荧光染料MitoTracker[®] Red CMXRos标记，F-肌动蛋白用绿色荧光染料Alexa Fluor[®] 488 phalloidin标记，细胞核用蓝色荧光染料4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)标记。

2.6. 胶原纤维样本

从Balb/C小鼠尾巴上取出尾腱，并在磷酸盐缓冲液中保存10 min。载玻片和盖玻片用乙醇超声清洗10 min，用氮气吹干，并用氧气等离子清洗5 min。从尾腱上切下10 mm长的切片，放置在载玻片上，盖上盖玻片，用口腔胶合剂密封。甘油用于匹配样本和盖玻片之间的折射率。

3. 理论

在附录A的注释A中详细介绍了基于mP激发过程中荧光非线性响应的mP-SIM的广义理论。理论表明，在扫描mP-SIM中，将正弦结构图案激发产生的非正弦结构荧光图案的谐波完全利用起来可以实现无限分辨率。理论方程中不足以影响结果的常数因子被省略。由于mP激发过程是非线性的，在宽场模式下难以激发mP荧光。可通过同步激发光的正弦强度调制与扫描，产生正弦结构激发照明图案。

随后以一维分辨率提高为例进一步阐释：在利用扫描正弦结构激发光图案激发荧光团时，荧光团在mP激发过

$$\begin{pmatrix} \tilde{p}^{\varphi_1} \\ \tilde{p}^{\varphi_2} \\ \tilde{p}^{\varphi_3} \\ \vdots \\ \tilde{p}^{\varphi_{2m+1}} \end{pmatrix} = \frac{\pi}{2^m} [\tilde{h}_{\text{mP-ex}}^m(k) \otimes \tilde{h}_{\text{em}}(k)] \begin{pmatrix} U_0 & U_1 e^{-i\varphi_1} & U_1 e^{i\varphi_1} & \cdots & U_m e^{-im\varphi_1} & U_m e^{im\varphi_1} \\ U_0 & U_1 e^{-i\varphi_2} & U_1 e^{i\varphi_2} & \cdots & U_m e^{-im\varphi_2} & U_m e^{im\varphi_2} \\ U_0 & U_1 e^{-i\varphi_3} & U_1 e^{i\varphi_3} & \cdots & U_m e^{-im\varphi_3} & U_m e^{im\varphi_3} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ U_0 & U_1 e^{-i\varphi_{2m+1}} & U_1 e^{i\varphi_{2m+1}} & \cdots & U_m e^{-im\varphi_{2m+1}} & U_m e^{im\varphi_{2m+1}} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \tilde{s}(k) \\ \tilde{s}(k+\omega_t) \\ \tilde{s}(k-\omega_t) \\ \vdots \\ \tilde{s}(k+m\omega_t) \\ \tilde{s}(k-m\omega_t) \end{pmatrix} \quad (2)$$

式中， $\varphi_n = \frac{2\pi n}{2m+1}$, $n = 1, 2, \dots, 2m+1$; k 为空间频率； U_0, \dots, U_m 为常数。

由于在mP激发过程中的荧光非线性响应，谐波首先出现在激光激发的峰值处，代表精细的结构信息。根据式(2)，更高阶谐波与样本结构的相互作用将更高的不可探测的频率信息转移到显微系统的通频带内。谐波频率越高，可实现的分辨率越高。因此，在mP-SIM重建算法中，可以根据需要提高的分辨率，选择合适的谐波数量来重建超分辨图像。

随后以4P-SIM为例，对mP-SIM理论的广泛性进行更详细地阐述。将直流项、基频(ω_t)、二阶谐波($2\omega_t$)、三阶谐波($3\omega_t$)、四阶谐波($4\omega_t$)等不同振幅的频率叠

程中通过非线性响应产生高达 m 阶的谐波频率，从而在mP显微成像中提高一维分辨率。探测器逐点累积获取荧光信号以生成最终的图像(见附录A中的注释A)。

$$\begin{aligned} p(t) &= \int [I_{\text{mP-ex}}^{\text{max}}(r, t) h_{\text{mP-ex}}(t-r)]^m s(r) h_{\text{em}}(r-t) dr \\ &= \left\{ [I_{\text{mP-ex}}^{\text{max}}(t)]^m s(t) \right\} \otimes [h_{\text{mP-ex}}^m(t) h_{\text{em}}(t)] + \\ &\quad [I_{\text{mP-ex}}^{\text{max}}(t)]^m \left\{ s(t) \otimes [h_{\text{mP-ex}}^m(t) h_{\text{em}}(t)] \right\} \end{aligned} \quad (1)$$

式中， $I_{\text{mP-ex}}^{\text{max}} \in [0, 1]$ 是激发光在焦点处的归一化峰值强度，表示结构激发照明图案； r 为扫描光束的中心位置； $h_{\text{mP-ex}}$ 为激发波长处的激发PSF，其截止频率为 $\omega_{\text{mP-ex}}^c$ ； $h_{\text{mP-ex}}^m$ 是mP显微成像系统的有效激发PSF，其截止频率为 $m\omega_{\text{mP-ex}}^c$ ； $s(r)$ 为荧光团浓度； h_{em} 为探测荧光PSF，其截止频率为 ω_c 。如果不考虑荧光斯托克斯红移，则 $m\omega_{\text{mP-ex}}^c = \omega_c$ 。 \otimes 为卷积运算， $[I_{\text{mP-ex}}^{\text{max}}(t)]^m$ 为 $I_{\text{mP-ex}}^{\text{max}}(t)$ 激发样本产生的结构荧光照明图案。在式(1)中，只有第一项 $\left\{ [I_{\text{mP-ex}}^{\text{max}}(t)]^m s(t) \right\} \otimes [h_{\text{mP-ex}}^m(t) h_{\text{em}}(t)]$ 表示 $s(t)$ 和 $[I_{\text{mP-ex}}^{\text{max}}(t)]^m$ 产生莫尔条纹，产生SIM所需的混频；而第二项 $[I_{\text{mP-ex}}^{\text{max}}(t)]^m \left\{ s(t) \otimes [h_{\text{mP-ex}}^m(t) h_{\text{em}}(t)] \right\}$ 则不能产生莫尔条纹，因此 $[I_{\text{mP-ex}}^{\text{max}}(t)]^m [h_{\text{mP-ex}}^m(t) h_{\text{em}}(t)]$ 可看作背景噪声。

为了更直观地计算，傅里叶空间中图像 $p'(t)$ 的广义矩阵方程总结如下(见附录A中的注释A)：

$$\begin{pmatrix} \tilde{p}'(k) \\ \tilde{p}'(k+\omega_t) \\ \tilde{p}'(k-\omega_t) \\ \vdots \\ \tilde{p}'(k+m\omega_t) \\ \tilde{p}'(k-m\omega_t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} U_0 & U_1 e^{-i\varphi_1} & U_1 e^{i\varphi_1} & \cdots & U_m e^{-im\varphi_1} & U_m e^{im\varphi_1} \\ U_0 & U_1 e^{-i\varphi_2} & U_1 e^{i\varphi_2} & \cdots & U_m e^{-im\varphi_2} & U_m e^{im\varphi_2} \\ U_0 & U_1 e^{-i\varphi_3} & U_1 e^{i\varphi_3} & \cdots & U_m e^{-im\varphi_3} & U_m e^{im\varphi_3} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ U_0 & U_1 e^{-i\varphi_{2m+1}} & U_1 e^{i\varphi_{2m+1}} & \cdots & U_m e^{-im\varphi_{2m+1}} & U_m e^{im\varphi_{2m+1}} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \tilde{s}(k) \\ \tilde{s}(k+\omega_t) \\ \tilde{s}(k-\omega_t) \\ \vdots \\ \tilde{s}(k+m\omega_t) \\ \tilde{s}(k-m\omega_t) \end{pmatrix} \quad (2)$$

加得到非正弦结构荧光照明图案(见附录A中的注释A)；通过调节调制频率将非正弦结构荧光照明图案的基频设置为 ω_c 。如果只使用直流项重建超分辨图像，那么分辨率与传统4P显微成像相同。如果使用直流项和基频 ω_c 重建超分辨图像，则对应的显微成像被命名为4P一阶线性SIM(4P1-LSIM)，其分辨率比传统的4P显微成像提高了两倍。如果使用直流项、基频 ω_c 和二阶谐波频率 $2\omega_c$ ，则相应的显微成像被命名为4P二阶非线性SIM(4P2-NLSIM)，分辨率提高了3倍。如果使用直流项、基频 ω_c 、二阶谐波频率 $2\omega_c$ 、三阶谐波频率 $3\omega_c$ ，则相应的显微成像命名为4P三阶非线性SIM(4P3-NLSIM)，分辨率提高了4倍。最后，如果使用直流项、基频 ω_c 、二阶谐波频率

$2\omega_c$ 、三阶谐波频率 $3\omega_c$ 、四阶谐波频率 $4\omega_c$ ，则对应的显微成像被命名为4P四阶非线性SIM (4P4-NLSIM)，与传统的4P显微成像相比，其分辨率提高了5倍。该命名方式与其他非线性显微成像所采用的命名方式相似，如2P-SIM。

根据矩阵方程可知，4P4-NLSIM至少需要9帧不同相位 φ_n ($n = 1, 2, \dots, 9$) 的原始图像来计算每个方向上的频率分量 $\tilde{s}(k)$, $\tilde{s}(k \pm \omega_i)$, \dots , $\tilde{s}(k \pm 4\omega_i)$ 。为了获得具有各向同性分辨率的图像，需要使用7个方向间隔为 $2\pi/7$ 弧度的结构照明图案来填充傅里叶空间。因此，4P4-NLSIM需要63张原始图像来重建一幅各向同性的超分辨图像。在重建过程中，需要将各个频率分量移回其实际位置并进行线性叠加，以得到样本在频域的频谱。最后，通过对该频谱的逆傅里叶变换得到超分辨图像。为了减少在重建图像中因频谱不连续引起的伪影，应在重建过程中进行低通滤波。虽然基于mP-SIM理论的超分辨图像重建过程变得更加复杂，但如果荧光团的非线性响应的阶数 m 足够高，则可以通过对结构荧光照明图案的多个高阶谐波进行叠加来实现无限分辨率。然而，可实现的分辨率受到可能实现的高阶谐波的限制。迄今为止mP显微成像技术可达到的最高阶次为四阶[39]，基于4P4-NLSIM方法可达到的最高分辨率约为43 nm。

4. 实验结果

为了验证mP-SIM成像理论，本研究仿真了不同成像图案下的纳米颗粒成像，包括传统2PM、2P1-LSIM、2P2-NLSIM、3P3-NLSIM和4P4-NLSIM，并比较了这些成像图案的PSF（见附录A中的注释B）。可通过提高非线性效应阶数 m （以 $m = 1, 2, 3$ 和 4 为例）来研究mP-SIM的分辨率提高程度。以数字生成了一个理想样本（见附录A中的图S1），该样本包含了随机分布在物平面上的纳米颗粒。纳米颗粒的尺寸为1 nm，其大小远小于衍射极限，与仿真物平面的像素大小相当。同时，图像像素均为 512×512 。在物平面上，将被纳米颗粒占据的像素的灰度值设为1，其他像素的灰度值设为0。随后用显微系统的艾里斑表示纳米颗粒在成像平面上的成像图案。此外将所有成像图案的发射波长设置为535 nm。仿真实验使用60×物镜，其数值孔径（numerical aperture, NA）为1.4，并采用空间周期为210 nm的正弦结构照明图案。为了更清楚地比较这些成像图案的分辨率差异，本研究只给出了两个颗粒的仿真图像（见附录A中的图S1），并提供

了衍射图像中沿粒子中心黄线的归一化横向强度分布（见附录A中的图S2）。结果表明，衍射图像的PSF随着非线性阶数的增加而缩小。传统2PM、2P1-LSIM、2P2-NLSIM、3P3-NLSIM和4P4-NLSIM的归一化光强分布的半高宽（full-width at half maximum, FWHM）分别为210 nm、112 nm、74 nm、53 nm和43 nm。另外，为了直接比较上述方法的分辨能力，使用了常用荧光团的激发波长和发射波长的真实值，并给出相应的Siemens星靶仿真图像（见附录A中的图S3）。与传统2PM相比，4P4-NLSIM的分辨率提高了约5倍。为了更好地说明mP-SIM的超分辨能力，仿真了mP-SIM的OTF（见附录A中的图S4）。根据仿真结果，在mP-SIM中非线性效应阶数 m 与重建图像分辨率 d 之间的关系可表示为

$$d = \frac{1}{\omega_c + mf'} \quad (3)$$

式中， d 为mP-SIM的最高分辨率； ω_c 为传统mP显微系统的探测荧光PSF的截止频率； f' 为结构荧光照明图案的空间频率。

为了通过实验证明2P-SIM（图1）的分辨率提高程度，使用传统2PM、2P1-LSIM和2P2-NLSIM对75 nm荧光微珠成像。控制信号由DAQ产生：生成频率分别为32.3 kHz、120.8 kHz和88.49 kHz的正弦波，使得EOM分别产生15°、75°和135°方向的结构照明图案。同时，采用1 kHz和1 Hz的锯齿波控制2D GS运行。每帧非正弦结构荧光照明图案原始图像的采集时间为1 s。在每个方向上由5种相位间隔为 $2\pi/5$ 弧度的正弦结构激发照明图案激发样本产生荧光，以获取五帧非正弦结构荧光原始图像。对于三个方向，共记录了15帧非正弦结构荧光原始图像。图2展示了在不同成像图案下采用mP-SIM算法获得的重建图像，以及沿黄线和紫线并经衍射像点中心的归一化强度曲线。图2（a）为2PM（左下）、2P1-LSIM（中）和2P2-NLSIM（右上）的75 nm荧光微珠图像。图2（a）内的黄框放大图如图2（b）~（d）所示。提高的分辨率如图2（e）所示，其中2P1-LSIM无法区分开的两颗荧光微珠可以通过2P2-NLSIM辨别分开。在图2（f）中，2PM、2P1-LSIM和2P2-NLSIM的横向分辨率分别为 (233 ± 10) nm、 (120 ± 8) nm和 (86 ± 4) nm。与传统2PM相比，2P2-NLSIM将横向分辨率提高了2.7倍。

为了验证mP-SIM在生物成像方面的潜力，使用与上述相同的显微系统和参数，并以不同的成像图案对BPAE细胞中由荧光染料标记的细胞核和F-肌动蛋白进行成像（图3）。与传统2PM和2P1-LSIM相比，2P2-NLSIM提高了图像的分辨率和对比度。F-肌动蛋白微丝的FWHM为

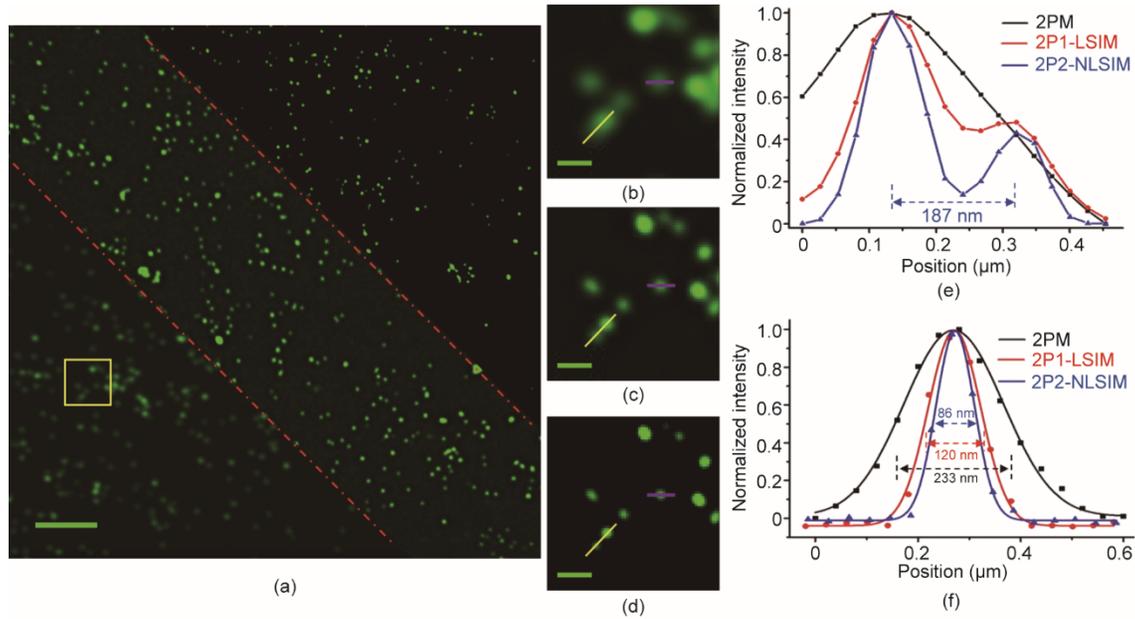


图2. 2PM、2P1-LSIM和2P2-NLSIM对75 nm荧光微珠成像。(a)由传统2PM(左下)、2P1-LSIM(中)和2P2-NLSIM(右上)成像的75 nm荧光微珠图像。放大的黄框区域用于比较三种成像图案:(b) 2PM;(c) 2P1-LSIM;(d) 2P2-NLSIM。(e)、(f) (b)~(d)中黄色和紫线的归一化强度分布图,显示平均FWHM分别为 (233 ± 10) nm、 (120 ± 8) nm和 (86 ± 4) nm。扫描荧光条纹基频周期为273 nm。比例尺:(a) 2 μ m;(b)~(d) 0.3 μ m。

87 nm, 其分辨率相比于传统2PM提高了2.7倍。

接下来,将mP-SIM应用于对小鼠尾腱胶原纤维的SHG成像。胶原纤维具有非中心对称结构,可产生强烈的SHG信号。本次实验探测到的是后向SHG信号。图4为传统SHG显微成像(SHG microscopy, SHGM)、SHG1-

LSIM和SHG2-NLSIM之间的比较;可观察到SHG2-NLSIM在分辨率和对比度方面有显著改善。传统SHGM、SHG1-LSIM和SHG2-NLSIM的胶原纤维FWHM分别为195 nm、98 nm和72 nm。对比SHGM,SHG2-NLSIM的分辨率提高了三倍,与理论分辨率值相近。

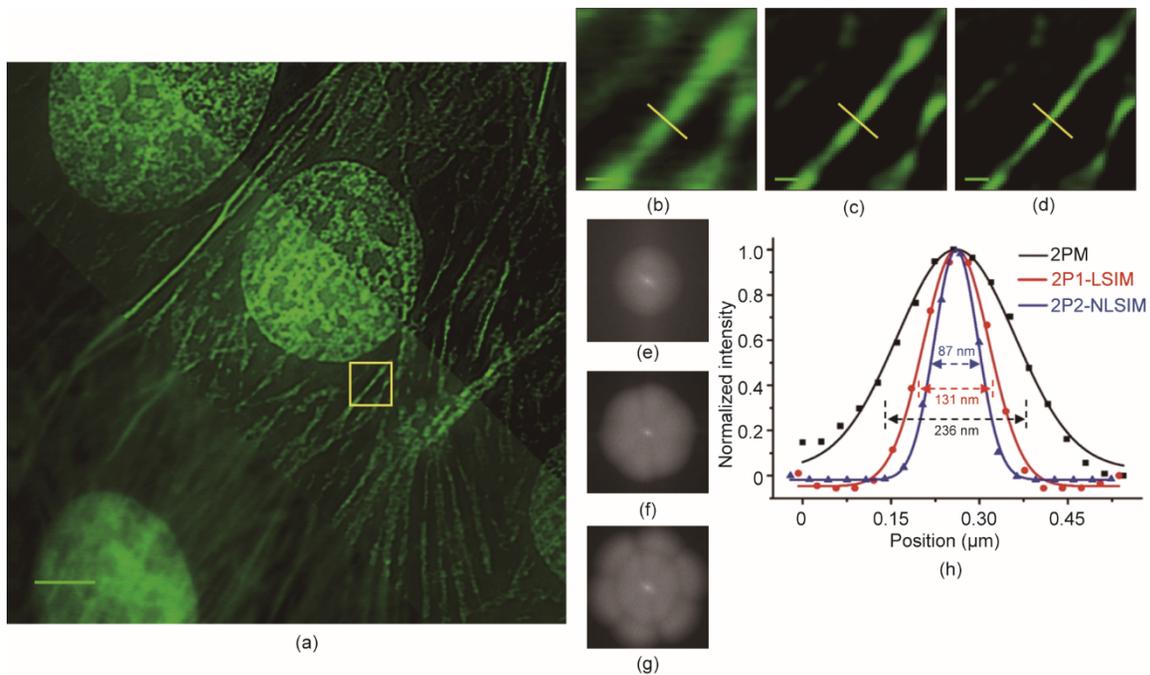


图3. 由2P2-NLSIM实现的分辨率提高。(a)对BPAE细胞中F-肌动蛋白微丝和细胞核成像得到的传统2PM(左下)、2P1-LSIM(中)和2P2-NLSIM(右上)图像。(b)~(d) (a)中黄框区域的放大视图,突出显示了由2PM(b)、2P1-LSIM(c)和2P2-NLSIM(d)获取的图像之间的分辨率差异。(e)~(g)传统2PM(e)、2P1-LSIM(f)和2P2-NLSIM(g)分别为对(b)~(d)的图像进行傅里叶变换后获得的可观空间频谱。(g)更大的可观空间频谱代表重建样本图像具有更高的空间分辨率。(h)三幅图像中沿同一黄线的强度分布。结果表明,传统2PM、2P1-LSIM和2P2-NLSIM的FWHM分别为236 nm、131 nm和87 nm。扫描荧光条纹基频周期为273 nm。比例尺:(a) 3 μ m;(b)~(d) 0.3 μ m。

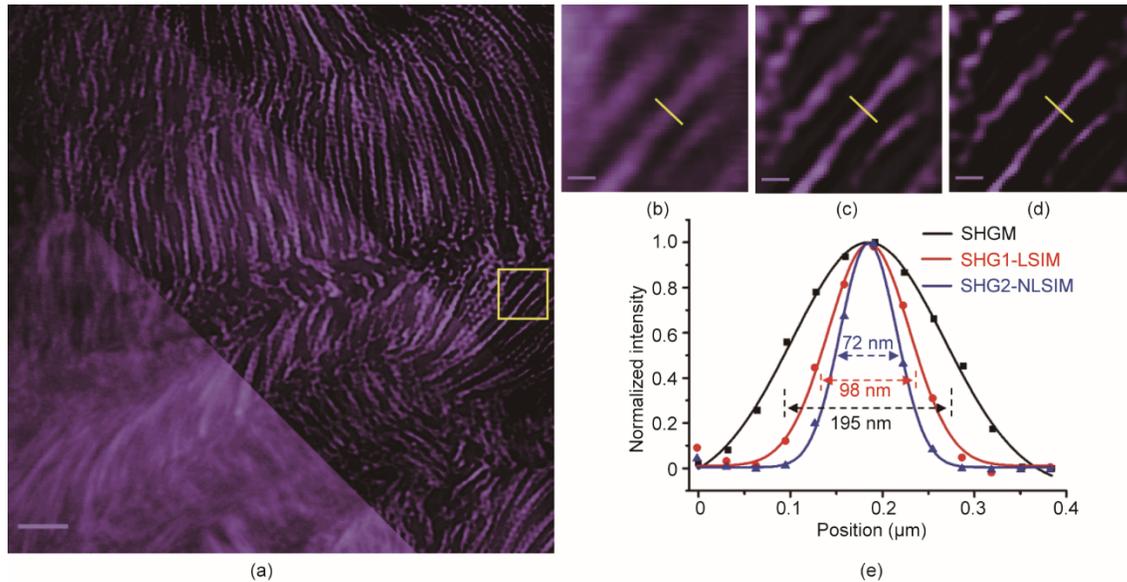


图4. SHG2-NLSIM中的分辨率和对比度提高。(a) 对小鼠尾腱胶原纤维成像得到的传统SHGM (左下)、SHG1-LSIM (中) 和SHG2-NLSIM (右上) 图像。(b) ~ (d) (a) 中黄框区域的放大视图, 突出显示了由传统SHGM (b)、SHG1-LSIM (c) 和SHG2-NLSIM (d) 获取的图像之间的分辨率和对比度差异。(e) 三幅图像中沿同一黄线的强度分布。结果表明, 传统SHGM、SHG1-LSIM 和SHG2-NLSIM 的FWHM 分别为195 nm、98 nm 和72 nm。扫描荧光条纹基频周期为273 nm。比例尺: (a) 3 μm; (b) ~ (d) 0.3 μm。

5. 讨论

虽然超分辨显微技术近年来进展迅速, 但mP超分辨显微技术的发展却很缓慢。本文提出了非线性效应的mP-SIM超分辨成像方法, 其横向分辨率随着非线性效应阶数 m 增大而提高。虽然在惠更斯图像处理软件 (Scientific Volume Imaging, the Netherlands) 的反卷积过程中可能使用了不恰当的维纳参数并造成了重建图像中的伪影, 但本研究首次利用mP非线性效应将传统2PM和SHGM的横向分辨率提高了约三倍。实验证实: 2P-SIM可实现86 nm的横向分辨率和SHG-SIM可实现72 nm的横向分辨率。此外, mP-SIM具有以下优点: 首先, 可以在现有的mP显微镜上插入激发光强度调制器来实现mP-SIM的光学成像系统。其次, mP-SIM可以使用在传统2PM中常用的荧光团和激发光功率。再次, mP-SIM可以直接应用于其他相干非线性光学显微成像技术, 如相干反斯托克拉曼散射 (coherent anti-stokes Raman scattering, CARS) 和受激拉曼散射 (stimulated Raman scattering, SRS) 成像。值得注意的是, mP激发和SHG是不同的物理过程: 2P成像是一个包含非相干PSF的非相干过程, SHG成像是一个包含相干PSF的相干过程。因此, 不能利用宽场SIM原理提高SHG成像分辨率[40–41]。但对于点扫描SIM, 可通过扫描成像在样本相邻点引入时间延迟, 使得SHG的相干特性无效。因此可以直接将点扫描SIM理论应用在SHG成像上以此提高点扫描SHG显微技术的分辨率。

6. 结论

在本研究中, 首先通过mP显微系统以较低的激发光功率产生荧光和激发光之间的非线性效应, 而不需要使用饱和和激发的高功率。其次, 将扫描与正弦强度调制相结合, 在仿真物平面上生成时间累积的条纹结构图案。由于mP成像系统的荧光非线性响应, 因此正弦结构图案 (如 ω) 触发了非正弦荧光结构图案 (如2P的 2ω)。荧光结构与样品结构叠加混合, 混合后的荧光信息直接由PMT检测。mP-SIM可以直接解调谐波, 因此不需要锁相探测器[42]。最后, mP-SIM图像重建算法的核心是在常规SIM重建原理的基础上增加了谐波项运算。由于荧光团在mP激发过程中的非线性响应, 谐波首先出现在激光激发的峰值处, 因此具有更精细的结构信息。与传统的mP显微成像相比, mP-SIM中的谐波将分辨率提高了 $m + 1$ 倍。在mP-SIM重建算法中, 可以根据需要提高的分辨率来选择谐波数量。分辨率越高, 所需谐波的阶数就越多。然而使用更多的谐波, 需要更多具有不同相位的荧光结构原始图像。例如, 在2P2-NLSIM或SHG2-NLSIM中, 至少需要15帧相移图像 (每个方向5帧) 来重建一幅各向同性分辨率, 理论分辨率分别为74 nm或58 nm。因此, 期望在未来可通过共振镜或多焦点方案来提高成像速度。此外, 利用声光偏转器对感兴趣的区域成像也能提高局部成像速度。

致谢

本研究得到国家重点研发计划项目(2017YFB0403804)、国家自然科学基金项目(61775148、61527827)、深圳市科技研发创新基金项目(JCYJ20180305124754860、JCYJ20200109105608771)的资助。

Compliance with ethics guidelines

Lei Wang, Xiaomin Zheng, Jie Zhou, Meiting Wang, Jiajie Chen, Youjun Zeng, Gaixia Xu, Ying Wang, Haixia Qiu, Yonghong Shao, Junle Qu, Bruce Zhi Gao, and Ying Gu declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.12.010>.

References

- [1] Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 1990;248(4951):73–6.
- [2] Centonze VE, White JG. Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging. *Biophys J* 1998; 75(4):2015–24.
- [3] Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* 2005; 2(12):932–40.
- [4] König K. Multiphoton microscopy in life sciences. *J Microsc* 2001; 200(2): 83–104.
- [5] Ingaramo M, York AG, Wawrzusinska P, Milberg O, Hong A, Weigert R, et al. Two-photon excitation improves multifocal structured illumination microscopy in thick scattering tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 111(14):5254–9.
- [6] Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 2006; 313(5793):1642–5.
- [7] Hess ST, Girirajan TPK, Mason MD. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys J* 2006; 91(11): 4258–72.
- [8] Rust MJ, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods* 2006; 3(10):793–5.
- [9] Bates M, Huang B, Dempsey GT, Zhuang X. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science* 2007; 317(5845): 1749–53.
- [10] Huang B, Wang W, Bates M, Zhuang X. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science* 2008; 319(5864):810–3.
- [11] Hell SW, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* 1994; 19(11):780–2.
- [12] Klar TA, Hell SW. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. *Opt Lett* 1999; 24(14):954–6.
- [13] Gustafsson MGL. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc* 2000; 198(2):82–7.
- [14] Heintzmann R, Crème CG. Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating. In: *Proceedings of Optical Biopsies and Microscopic Techniques III*; 1998 Sep 8–12; Stockholm, Sweden. SPIE; 1998. p. 185–96.
- [15] Huang B, Babcock H, Zhuang X. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells. *Cell* 2010; 143(7):1047–58.
- [16] Sahl SJ, Hell SW, Jakobs S. Fluorescence nanoscopy in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017; 18(11):685–701.
- [17] Eggeling C, Willig KI, Sahl SJ, Hell SW. Lens-based fluorescence nanoscopy. *Q Rev Biophys* 2015; 48(2):178–243.
- [18] Kolmakov K, Wurm CA, Meineke DNH, Göttfert F, Boyarskiy VP, Belov VN, et al. Polar red-emitting rhodamine dyes with reactive groups: synthesis, photophysical properties, and two-color STED nanoscopy applications. *Chem Eur J* 2014; 20(1):146–57.
- [19] Schmidt R, Wurm CA, Jakobs S, Engelhardt J, Egnér A, Hell SW. Spherical nanosized focal spot unravels the interior of cells. *Nat Methods* 2008; 5(6): 539–44.
- [20] Westphal V, Hell SW. Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope. *Phys Rev Lett* 2005; 94(14):143903.
- [21] Gustafsson MGL. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(37):13081–6.
- [22] Heintzmann R, Gustafsson MGL. Subdiffraction resolution in continuous samples. *Nat Photonics* 2009; 3(7):362–4.
- [23] Rego EH, Shao L, Macklin JJ, Winoto L, Johansson GA, Kamps-Hughes N, et al. Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(3):E135–43.
- [24] Li D, Shao L, Chen BC, Zhang X, Zhang M, Moses B, et al. Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics. *Science* 2015; 349(6251):aab3500.
- [25] Kner P, Chhun BB, Griffis ER, Winoto L, Gustafsson MGL. Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination. *Nat Methods* 2009; 6(5):339–42.
- [26] Fiolka R, Shao L, Rego EH, Davidson MW, Gustafsson MGL. Time-lapse two-color 3D imaging of live cells with doubled resolution using structured illumination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(14):5311–5.
- [27] Shao L, Kner P, Rego EH, Gustafsson MGL. Super-resolution 3D microscopy of live whole cells using structured illumination. *Nat Methods* 2011; 8(12): 1044–6.
- [28] Dan D, Lei M, Yao B, Wang W, Winterhalder M, Zumbusch A, et al. DMD-based LED-illumination super-resolution and optical sectioning microscopy. *Sci Rep* 2013; 3(1):1116.
- [29] Swayne TC, Zhou C, Boldogh IR, Charalel JK, McFaline-Figueroa JR, Thoms S, et al. Role for cER and Mmr1p in anchorage of mitochondria at sites of polarized surface growth in budding yeast. *Current Biology* 2011; 21(23): 1994–9.
- [30] Olshausen PV, Defeu Soufo HJ, Wicker K, Heintzmann R, Graumann PL, Rohrbach A. Superresolution imaging of dynamic MreB filaments in *B. subtilis*—a multiple-motor-driven transport? *Biophys J* 2013; 105(5):1171–81.
- [31] Wheeler R, Mesnage S, Boneca IG, Hobbs JK, Foster SJ. Super-resolution microscopy reveals cell wall dynamics and peptidoglycan architecture in *ovococcal* bacteria. *Mol Microbiol* 2011; 82(5):1096–109.
- [32] Markaki Y, Smeets D, Fiedler S, Schmid VJ, Schermelleh L, Cremer T, et al. The potential of 3D-FISH and super-resolution structured illumination microscopy for studies of 3D nuclear architecture. *BioEssays* 2012; 34(5): 412–26.
- [33] Fitzgibbon J, Bell K, King E, Oparka K. Super-resolution imaging of plasmodesmata using three-dimensional structured illumination microscopy. *Plant Physiol* 2010; 153(4):1453–63.
- [34] Sonnen KF, Schermelleh L, Leonhardt H, Nigg EA. 3D-structured illumination microscopy provides novel insight into architecture of human centrosomes. *Biol Open* 2012; 1(10):965–76.
- [35] Bianchini P, Harke B, Galiani S, Vicidomini G, Diaspro A. Single-wavelength two-photon excitation-stimulated emission depletion (SW2PE-STED) superresolution imaging. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(17):6390–3.
- [36] Lu J, Min W, Conchello JA, Xie XS, Lichtman JW. Super-resolution laser scanning microscopy through spatiotemporal modulation. *Nano Lett* 2009; 9(11):3883–9.
- [37] Urban BE, Yi J, Chen S, Dong B, Zhu Y, DeVries SH, et al. Super-resolution two-photon microscopy via scanning patterned illumination. *Phys Rev E Stat Nonlinear Soft Matter Phys* 2015; 91(4):042703.
- [38] Winter PW, York AG, Nogare DD, Ingaramo M, Christensen R, Chitnis A, et al.

- Two-photon instant structured illumination microscopy improves the depth penetration of super-resolution imaging in thick scattering samples. *Optica* 2014;1(3):181–91.
- [39] Cheng LC, Horton NG, Wang K, Chen SJ, Xu C. Measurements of multiphoton action cross sections for multiphoton microscopy. *Biomed Opt Express* 2014; 5(10):3427–33.
- [40] Wicker K, Heintzmann R. Resolving a misconception about structured illumination. *Nat Photonics* 2014;8(5):342–4.
- [41] Bianchini P, Diaspro A. Three-dimensional (3D) backward and forward second harmonic generation (SHG) microscopy of biological tissues. *J Biophotonics* 2008;1(6):443–50.
- [42] Fujita K, Kobayashi M, Kawano S, Yamanaka M, Kawata S. High-resolution confocal microscopy by saturated excitation of fluorescence. *Phys Rev Lett* 2007;99(22):228105–9.