结构光照明显微成像系统（SIM）

福建师范大学

尤明海

结构光照明显微镜是通过调制照明光源（使用条纹照明），经原本不可获取的高频信息（精细结构）编码到低频区域，使其通过受限的显微系统，之后通过计算机解码将高频信息还原到其原本位置，从而提高分辨率。

如图1（a）所示，两种精细结构的叠加，在其交叉的地方出现了一个明暗相间的粗条纹，即莫尔条纹。由图可知，莫尔条纹比原来两种条纹都更粗，更容易被检测到，这就是结构光照明在现实中的例子。图1（b）即为普通宽场显微镜所能够探测的最大频谱范围，圆圈以外的高频信息不能够被探测到；图1（c）为正弦条纹的三个傅里叶频谱成分，当条纹照明与样品信息进行卷积时，即可得到图1（d）所示的同一方向上的三个频谱成分。由此，得到了一个方向上的频谱扩展，这样重构的分辨率也只有在一个方向上提高。为此，需要在其他方向上也要进行分辨率的提高，就需要采集多个方向的照明信息，如图2-1（e），为三个方向、间隔为π/3上的频谱扩展，可以得到各向同性较好的超分辨图像。因为线性结构光的频率同样受到系统衍射极限的限制，分辨率不能够无限地提高，所以其频谱区域是原来普通荧光显微镜下的两倍。



图1 结构光照明提高分辨率原理图[[1](#_ENREF_1)]。

实验光路如图2所示，首先激光器发出激光后经过偏振片P进行偏振态的转换，之后经过两个会聚透镜L1、L2对激光进行扩束，使得激光器发出的较小的点光源扩束成大的光斑。经反射镜M反射到空间调制器SLM的中心（入射角度应小于10°），射出的各级光经L3会聚，经过挡光板Mask后遮挡住除+1、-1级光的所有光，只允许+1、-1级光通过，实现双光束干涉。透镜L5将两束光耦合进显微镜系统，激发荧光后经二色片DM、透镜L6 会聚到另一个探测器采集，图像采集通过计算机控制完成。



图2 双通道结构光照明显微系统示意图

**具体的图像重构过程包括以下步骤[**[**2**](#_ENREF_2)**]：**

1. 对采集到的原始图像进行图像亮度均一化处理以消除由于光源强度波动引起的成像亮度的影响；
2. 对图像边缘进行轻微切趾，使得由离散傅里叶变换产生边缘伪像最少；对图像进行傅里叶变换操作，获得相应的频谱信息；
3. 由各结构光照明方向的三个相位图像对应频谱信息，求解3×3的线性方程组，分离出0级，+1级和-1级频谱成份信息；
4. 由分离出0级与+1级或-1级频谱的重叠区域的信息，确定结构光照明的空间频率 D k与初始相位f ；
5. 将分离出的+1级频谱平移+ D k，-1级频谱平移- D k；
6. 将各结构光照明方向平移后的+1级和-1级频谱与0级频谱叠加合成，并做维纳滤波，使得其频谱扩宽；
7. 对步骤7得到的扩宽的频谱做傅里叶逆变换，获得超分辨的图像。

100nm小球的模拟结果如图3所示，首先看相互靠近三个小球，三个小球在经过显微系统后，不能互相分辨，叠加在一起，如图3（a）中红色虚线所示。而重构后的小球，互相可以分辨。通过图3（c）可以很好的体现出来，将原来无法分辨的两颗紧挨的小球，很清楚地分出来。图3（d）对箭头指向的小球沿红虚线方向求强度分布，并作高斯拟合，求半峰全宽测量其大小，分辨率受限制图和重构图测到的结果分别为220 nm，134 nm。这结果也充分证明了结构光照明显微术可以提高分辨率。

C:\Users\Administrator\Desktop\3463246436.tif

图3 100nm小球的计算机模拟重构结果。（a）宽场荧光显微镜的小球模拟；（b）结构光照明显微镜下的小球模拟；（c）红色虚线标记的两个小球重构前和重构后沿红色虚线方向的光强分布（d）红色箭头所指的小球重构前后的光强分布图，并做高斯拟合求半峰全宽。

**参考文献**

[1] Gustafsson M G. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy[J]. Journal of microscopy, 2000, 198(2): 82-87.

[2] 陈建玲. 结构光照明超分辨微分干涉相衬显微成像技术[D]. 华中科技大学, 2013.