

光片荧光显微镜

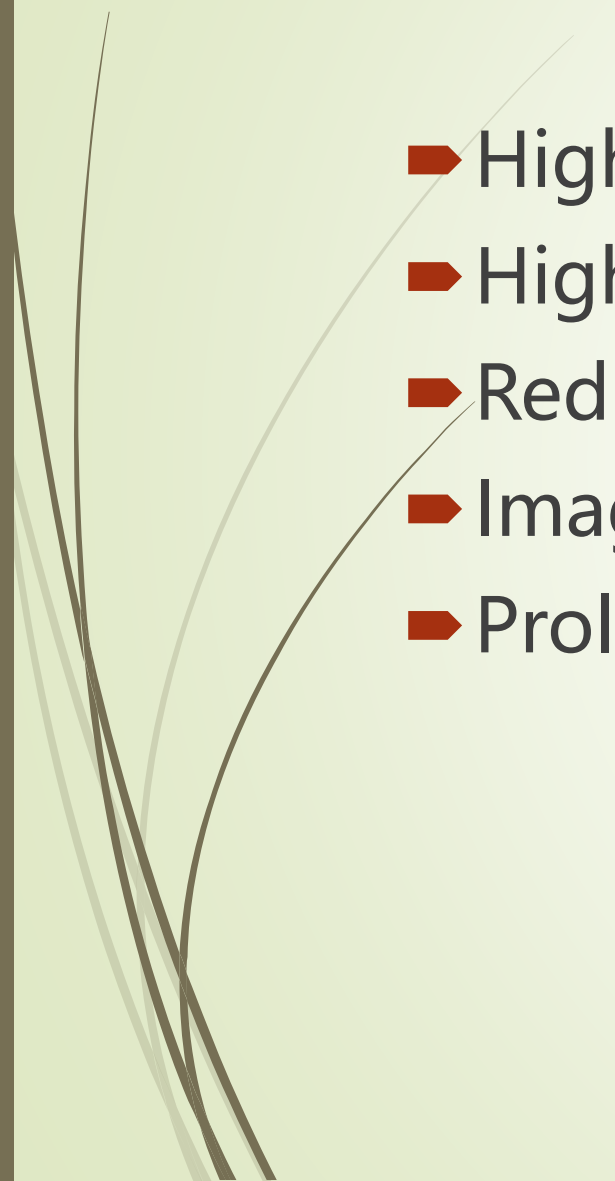
Light-sheet Fluorescence Microscopy

畅星兆

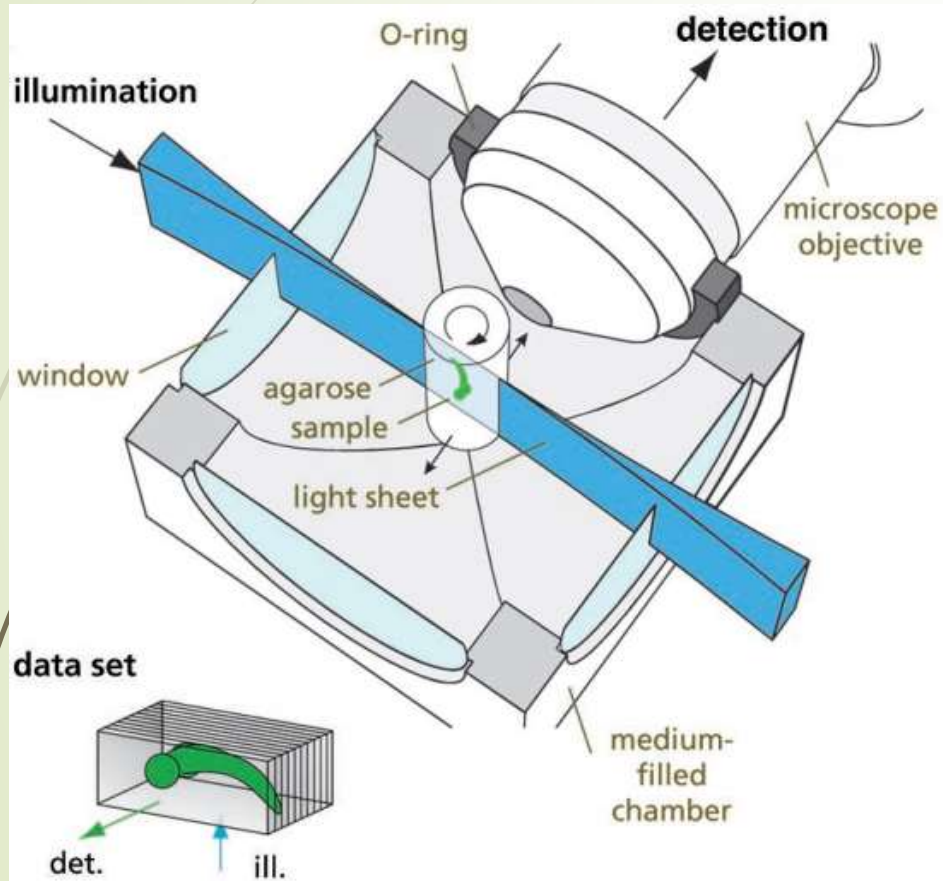
日期：2018.12.25



LSFM (SPIM) 的优势

- High sectioning capability
 - High contrast
 - Reduced photo bleaching and toxicity
 - Imaging speed
 - Prolonged duration
- 

LSFM的产生



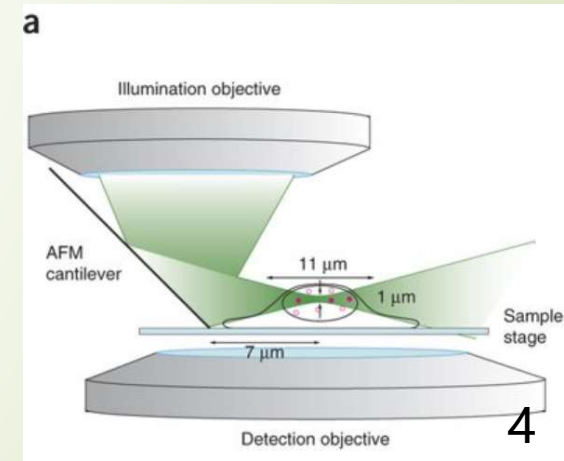
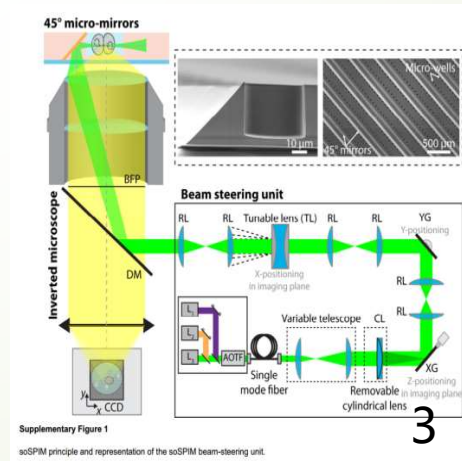
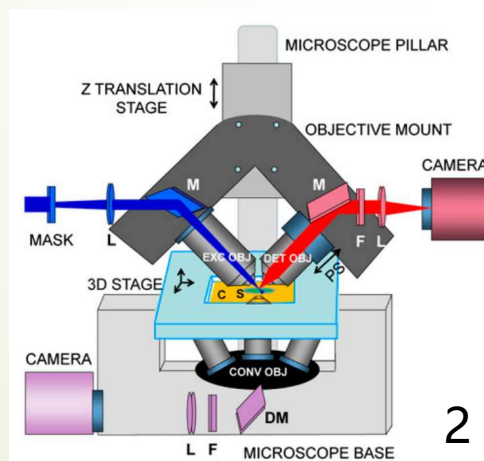
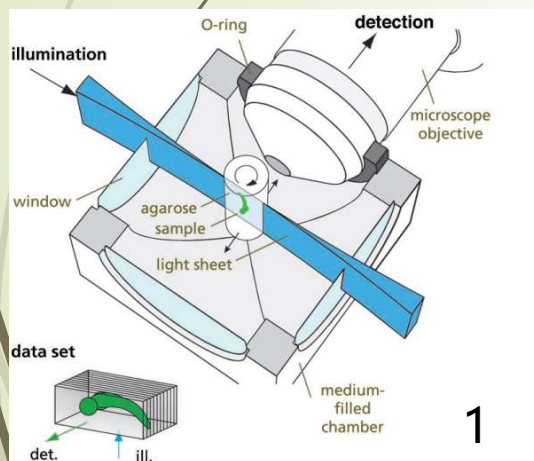
2004年, J. Huisken等人将光片结构光照明与荧光结合, 发明了光片荧光显微镜 (light sheet fluorescence microscopy, LSFM)。


LSFM共包含两束光路, 分别是照明光路 (illumination) 和探测光路 (detection)。照明光路用来产生光片状结构光, 探测光路用来收集荧光分子释放出的荧光信号, 再通过扫描, 便可以实现对样品的三维扫描成像。

对LSFM进行分类

按照物镜放置结构对光片荧光显微镜进行分类，可以分为：

1. 普通正交结构
2. 基于倒置显微镜的正交结构
3. 单物镜
4. 非正交结构的双物镜
5. 多物镜

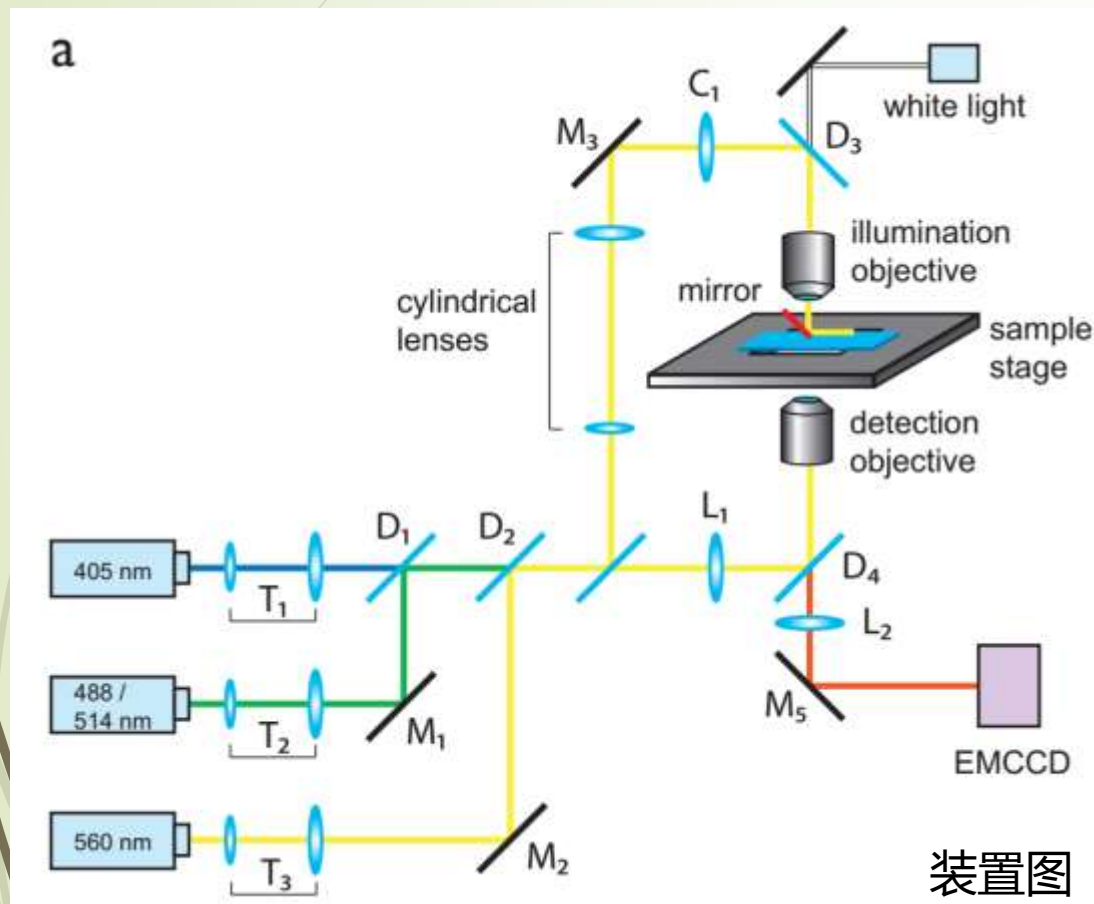




之后，根据观测样品尺寸、时间空间分辨率等要求的不同以及某些特殊需要，产生了不同的显微镜变种。以下是几个光片荧光显微镜的变种。

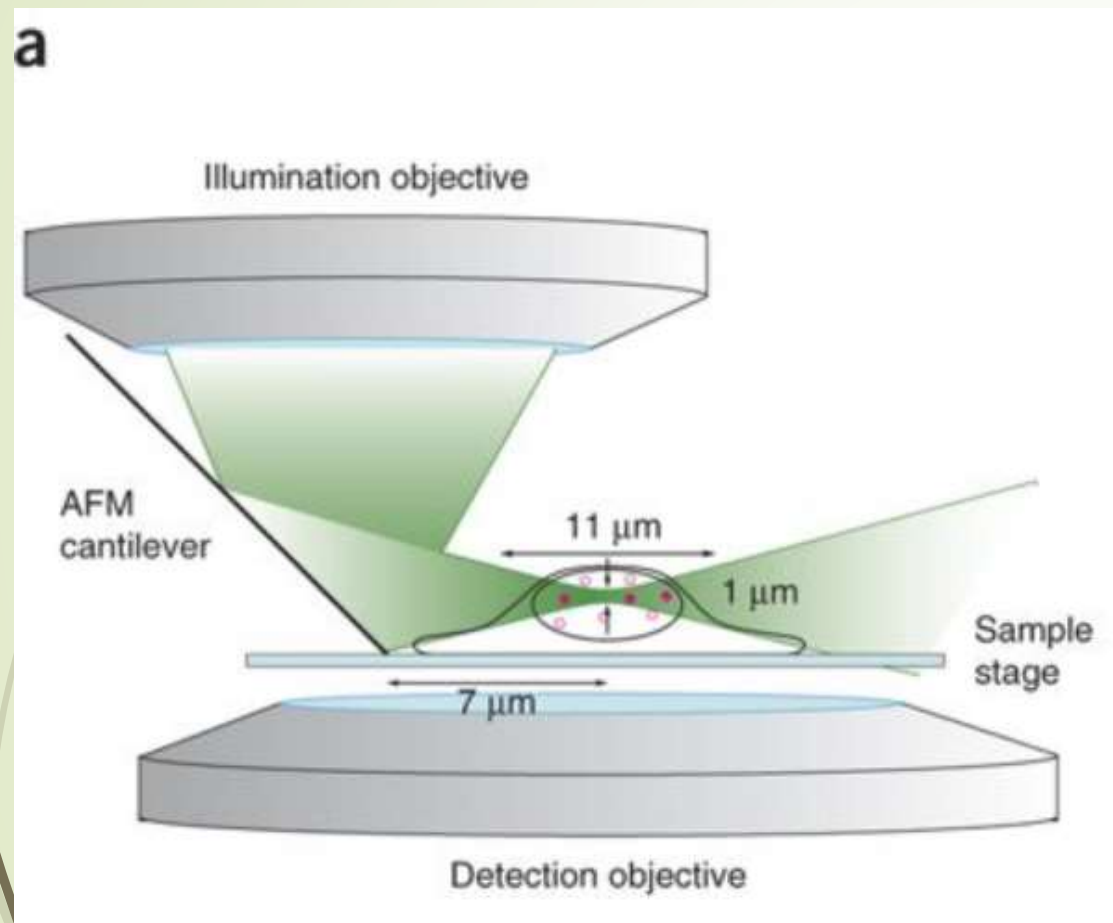
- RLSM (Reflected light sheet microscope)
- soSPIM (Single-objective selective plane illumination microscopy)
- APOM (axial plane optical microscopy)
- IML-SPIM (individual molecule localization-selective plane illumination microscopy)
- π SPIM
- FCS (Fluorescence correlation spectroscopy)
- DSLM (digital scanned laser light sheet fluorescence microscopy)
- Bessel beam plane illumination microscope
- iSPIM (Inverted selective plane illumination)

1. Reflected Light Sheet Microscope (RLSM)

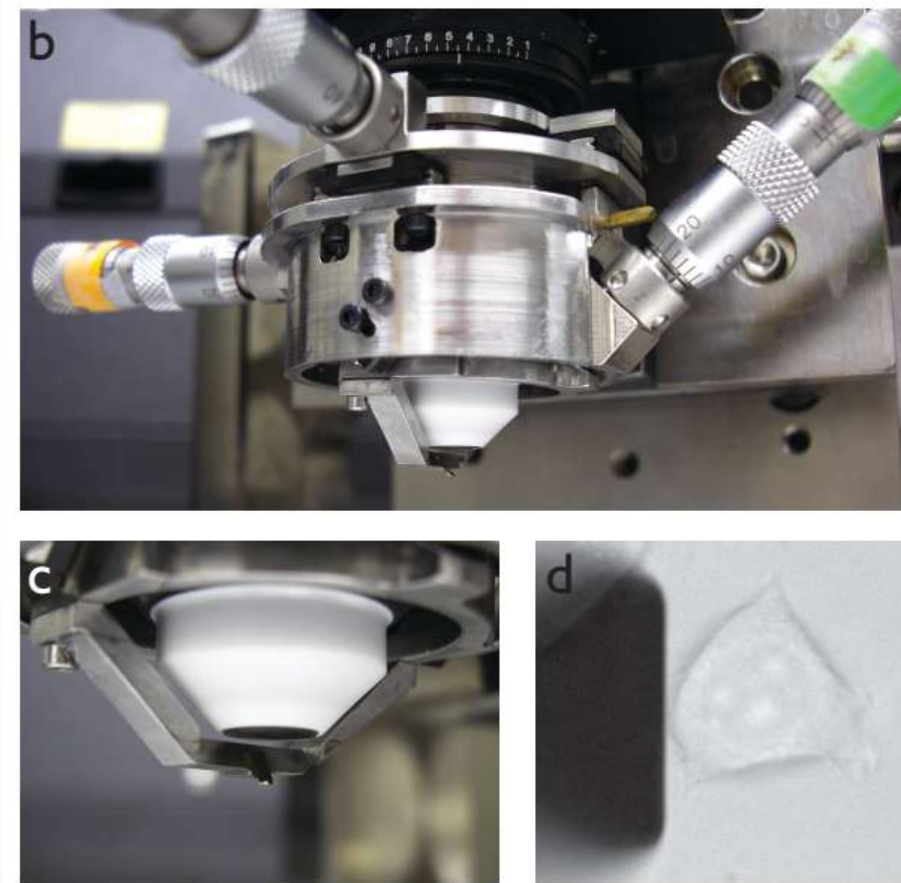


在普通的LSFM结构中，照明物镜与探测物镜相对于待测样品**正交放置**，这限制了高数值孔径物镜的使用。


RLSM通过用反射镜将从顶部入射的光片反射，使得两个物镜可以相向放置，从而解决了上述问题。




样品处光束图



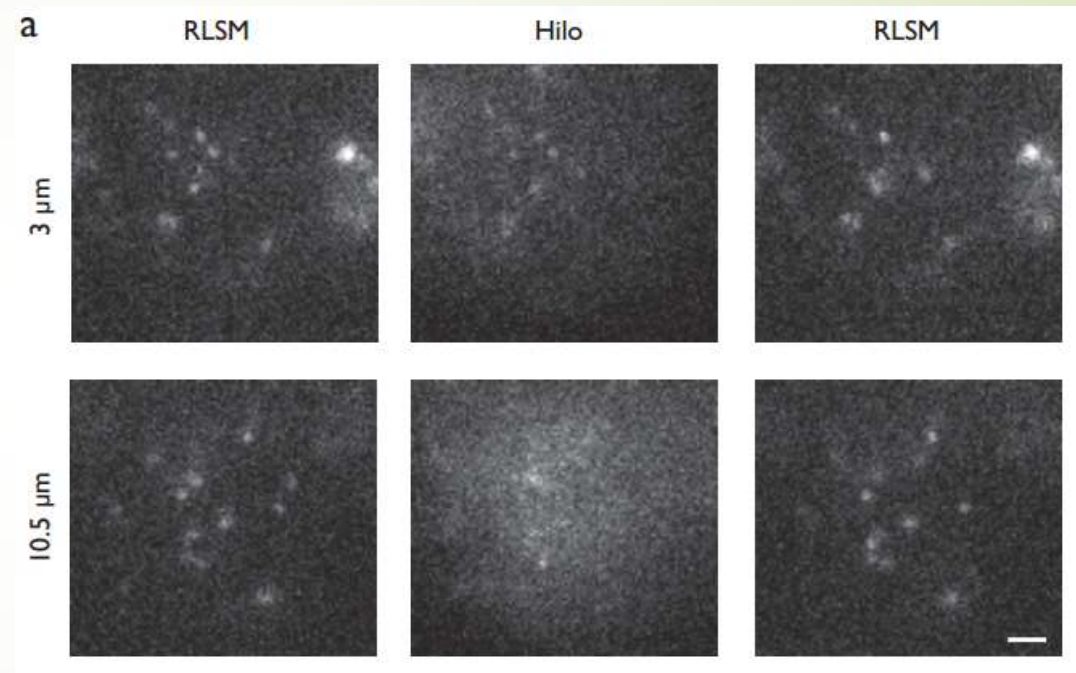
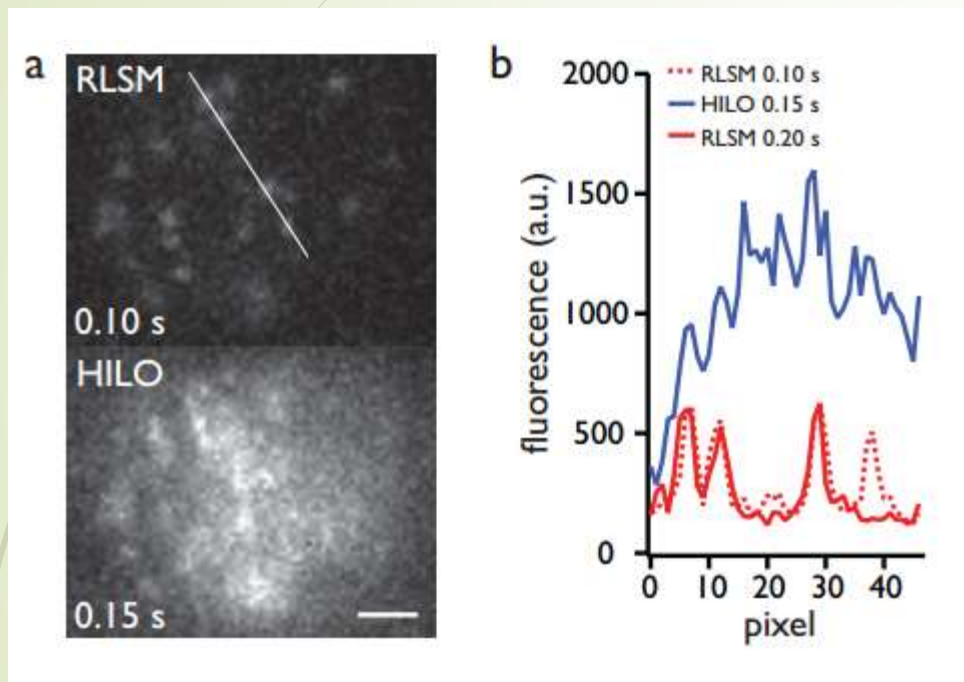
AFM Cantilever, aluminum coated



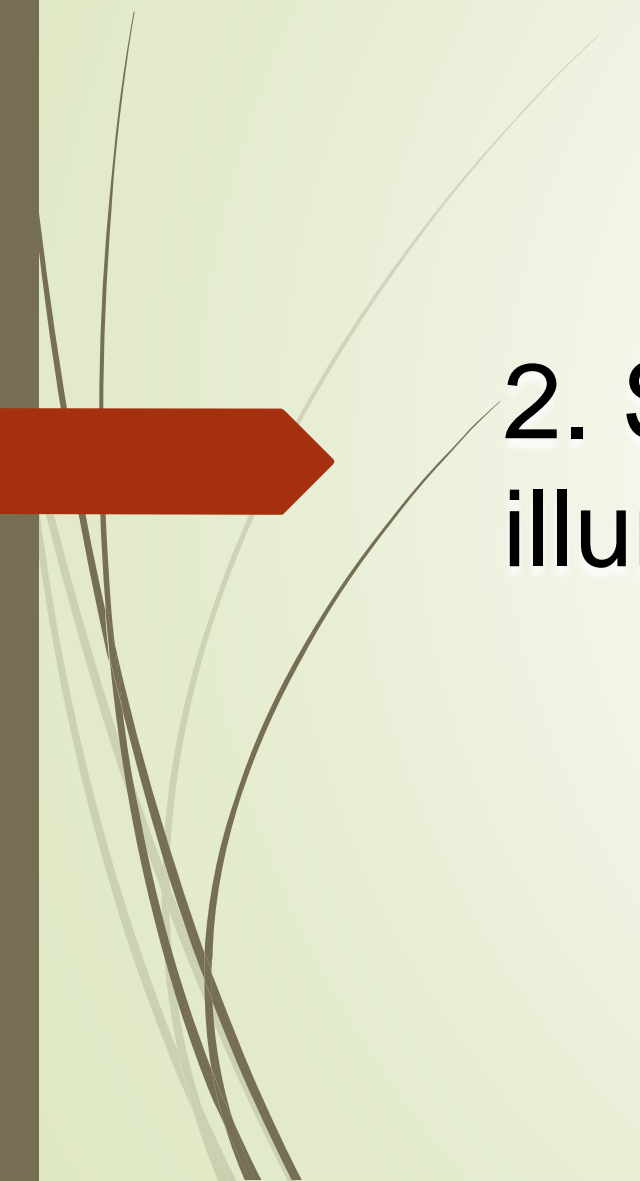
特点

- ➡ 集成于普通的倒置型显微镜(IX71, Olympus)
 - ➡ 反射镜的使用
 - ➡ 非正交放置
- 

结果图

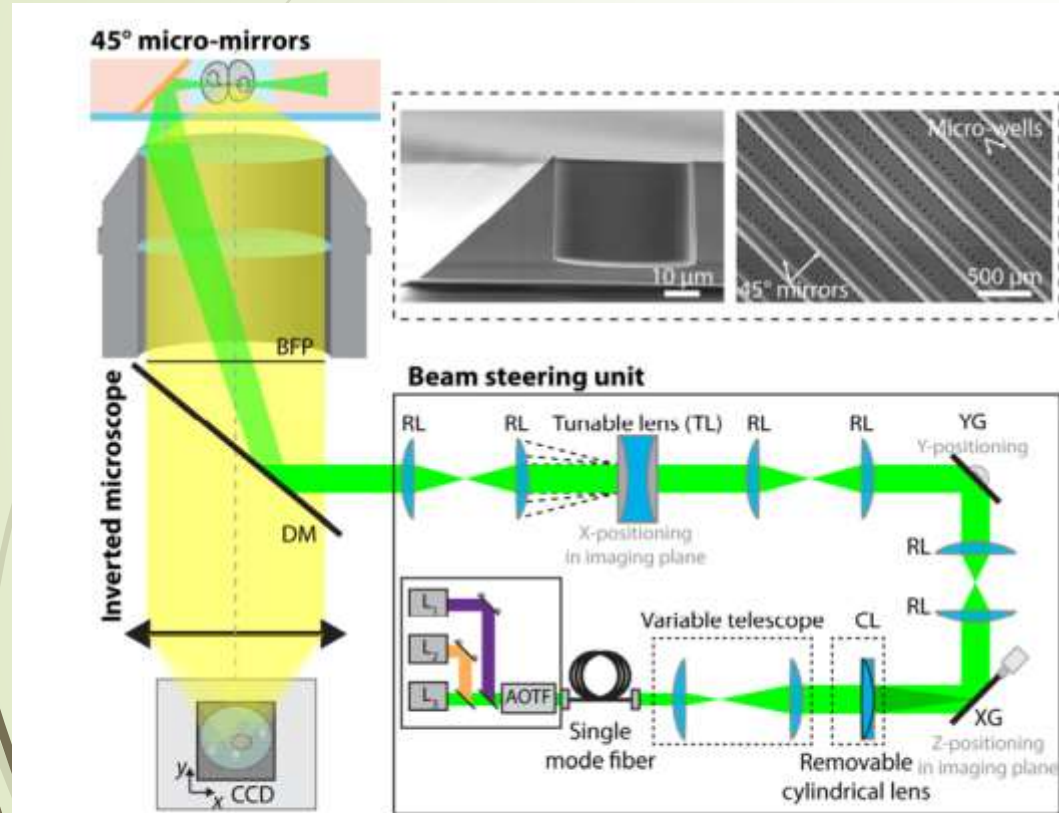


比较了了RLSM和HILO成像结果，HILO (highly inclined and laminated optical sheet microscopy)。



2. Single-objective selective-plane illumination microscopy (soSPIM)

2. Single-objective selective-plane illumination microscopy (soSPIM)



Supplementary Figure 1

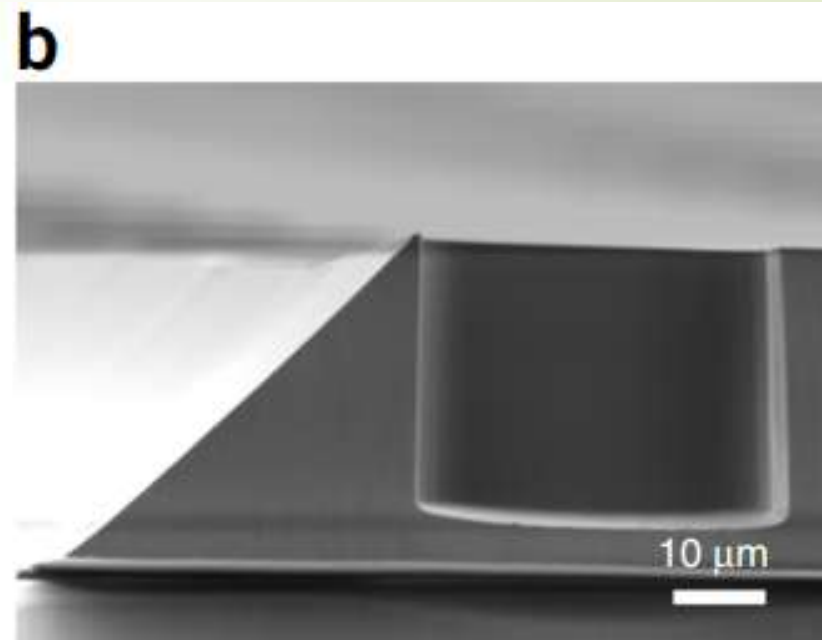
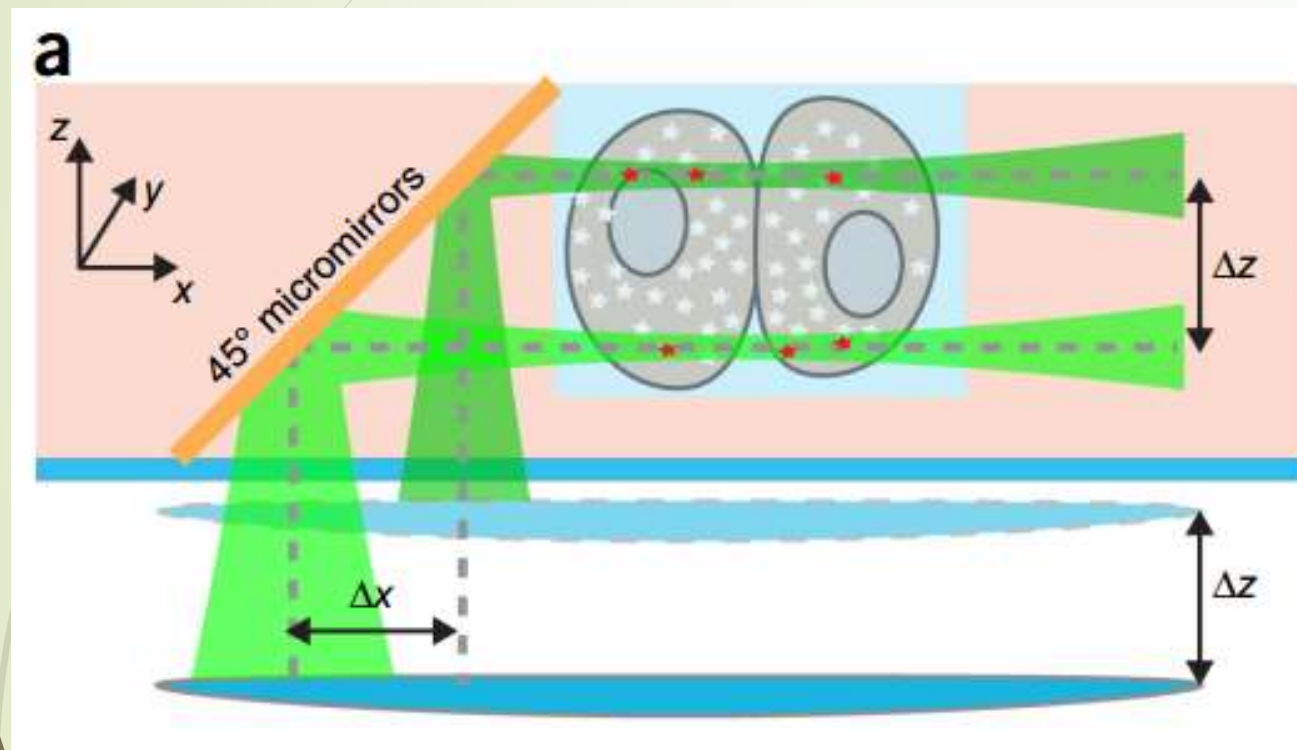
soSPIM principle and representation of the soSPIM beam-steering unit.

soSPIM通过照明光路和探测光路使用同一物镜，解决了两个目镜正交放置时对于物镜数值孔径的限制。

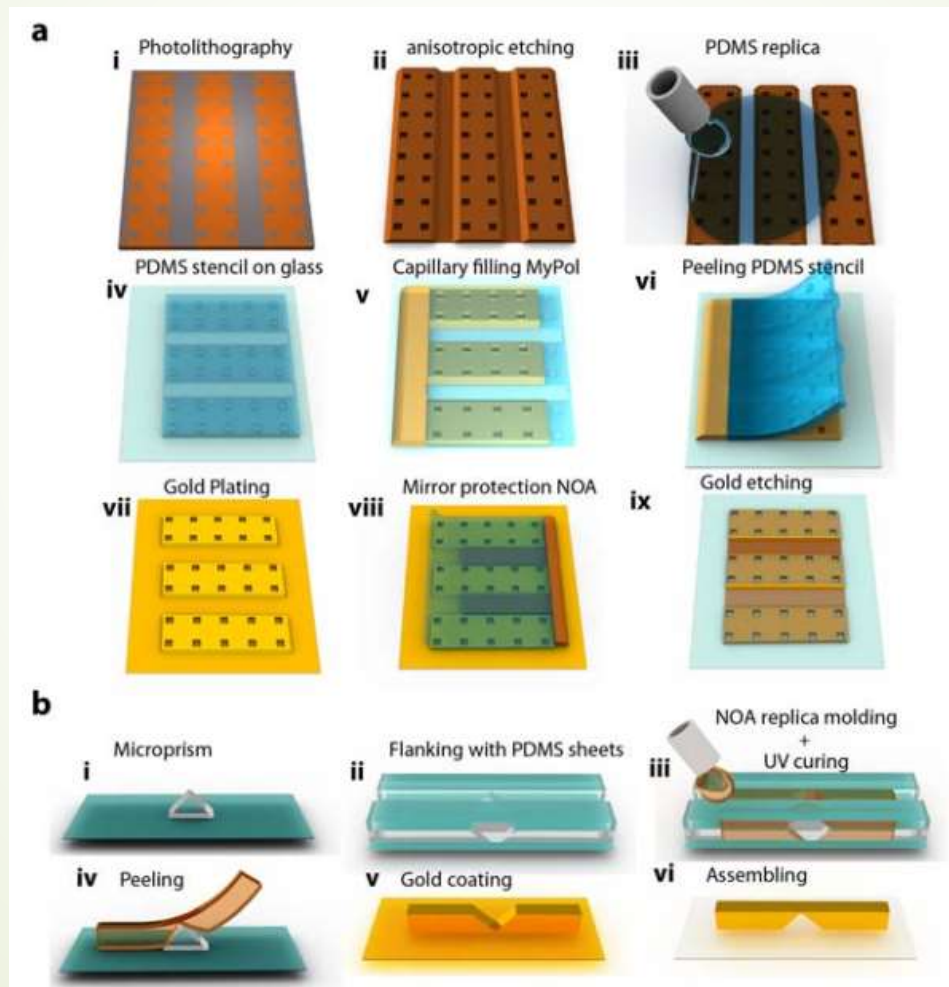
在soSPIM中，可以使用的物镜数值孔径高达1.3（浸油）。

同时，结合超分辨显微技术后，横向分辨率突破衍射极限，高达40μm。

装置图



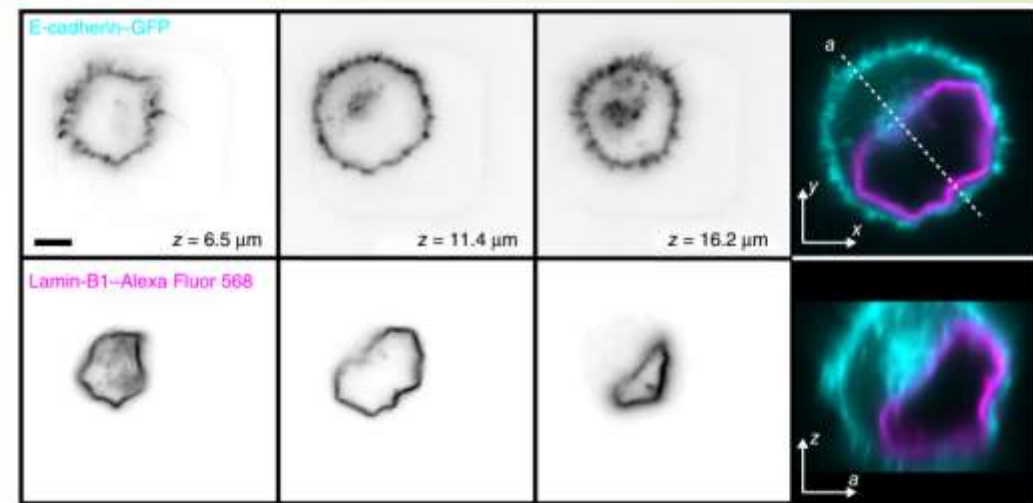
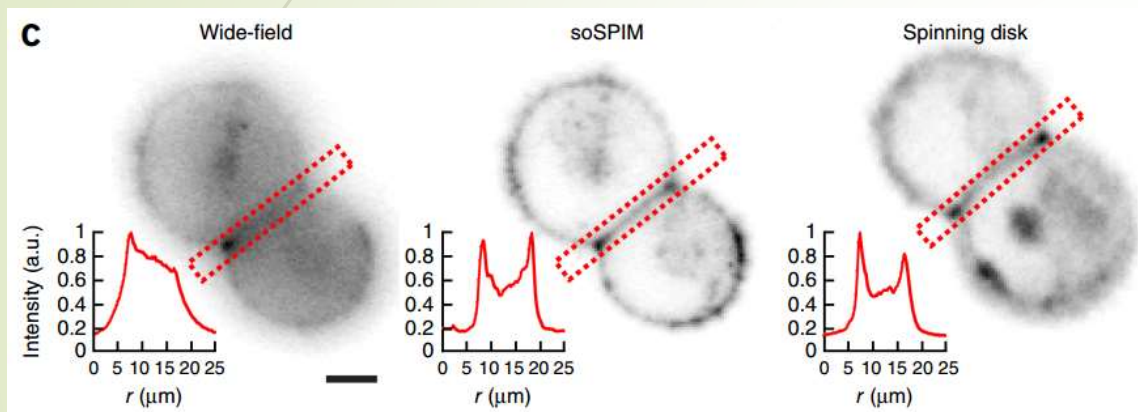
Microwell制造过程



特点

- 集成于普通的倒置型显微镜(Nikon, Ti-E)
- 反射镜的使用
- 照明光路和探测光路使用了同一目镜
- 结合了超分辨显微技术(PALM, STORM)
- 样品室制造过程复杂

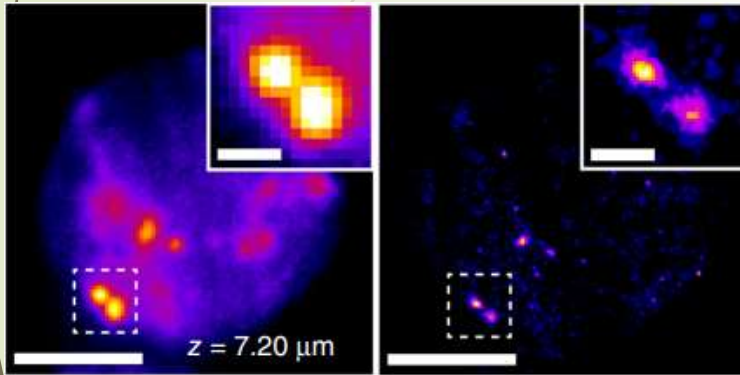
结果图



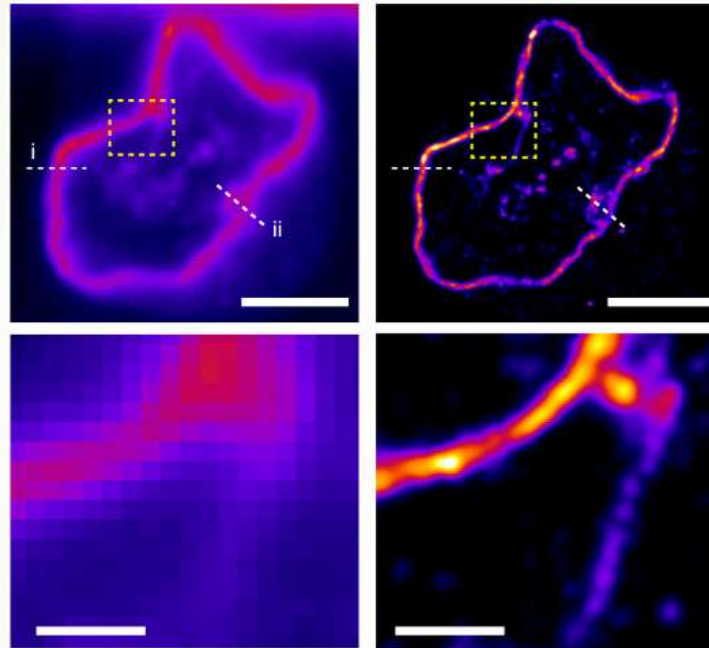
宽场荧光显微镜、soSPIM、旋转盘共聚焦显微镜切片能力比较

双色成像

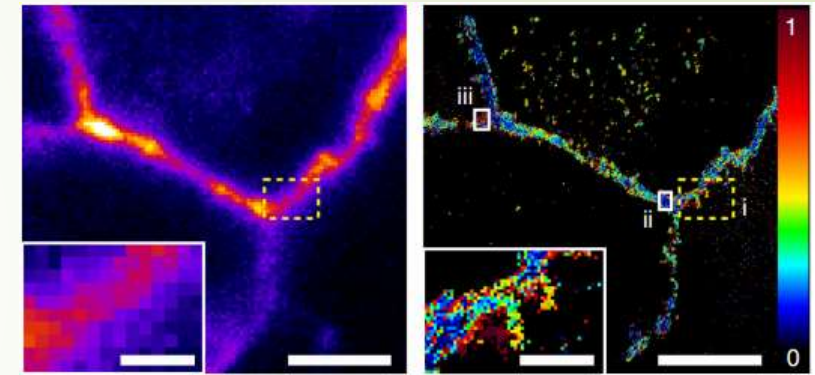
结合超分辨显微技术



PALM, photoactivated localization microscopy

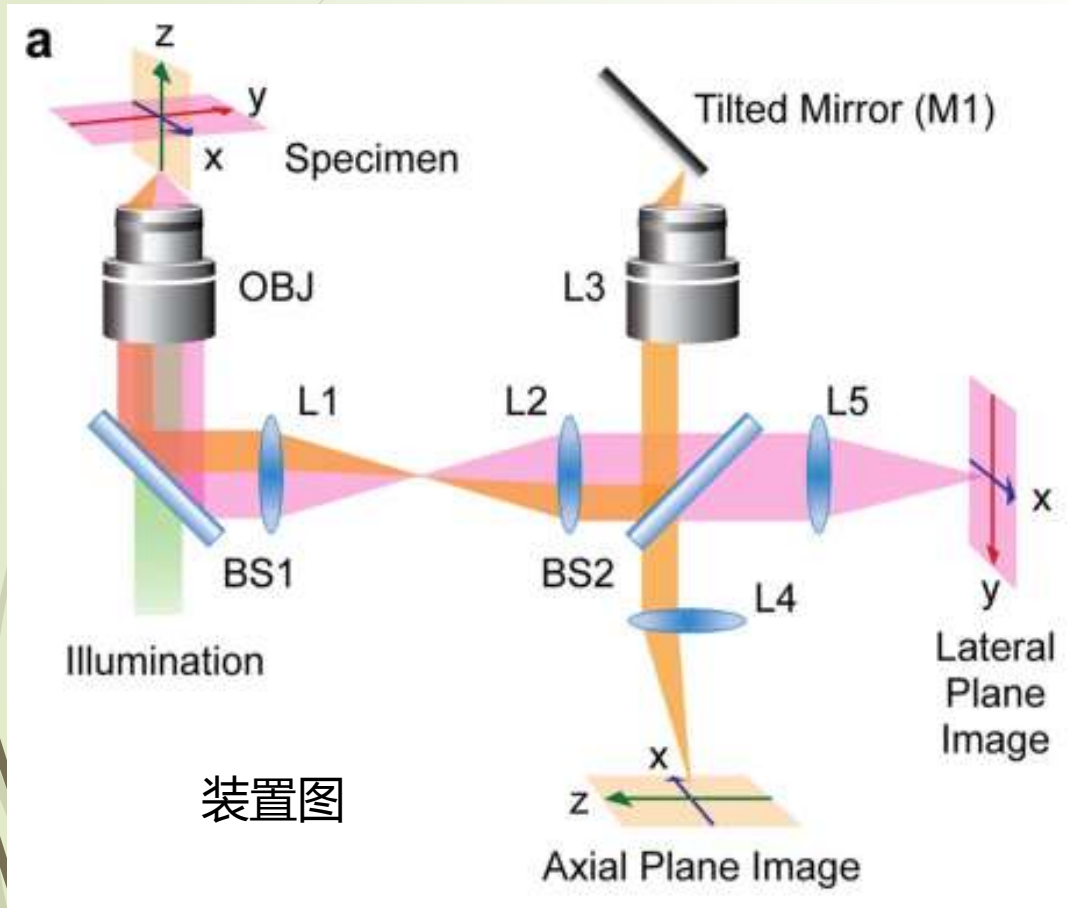


STORM, stochastic optical reconstruction microscopy



Astigmatic-imaging-based 3D single-molecule localization

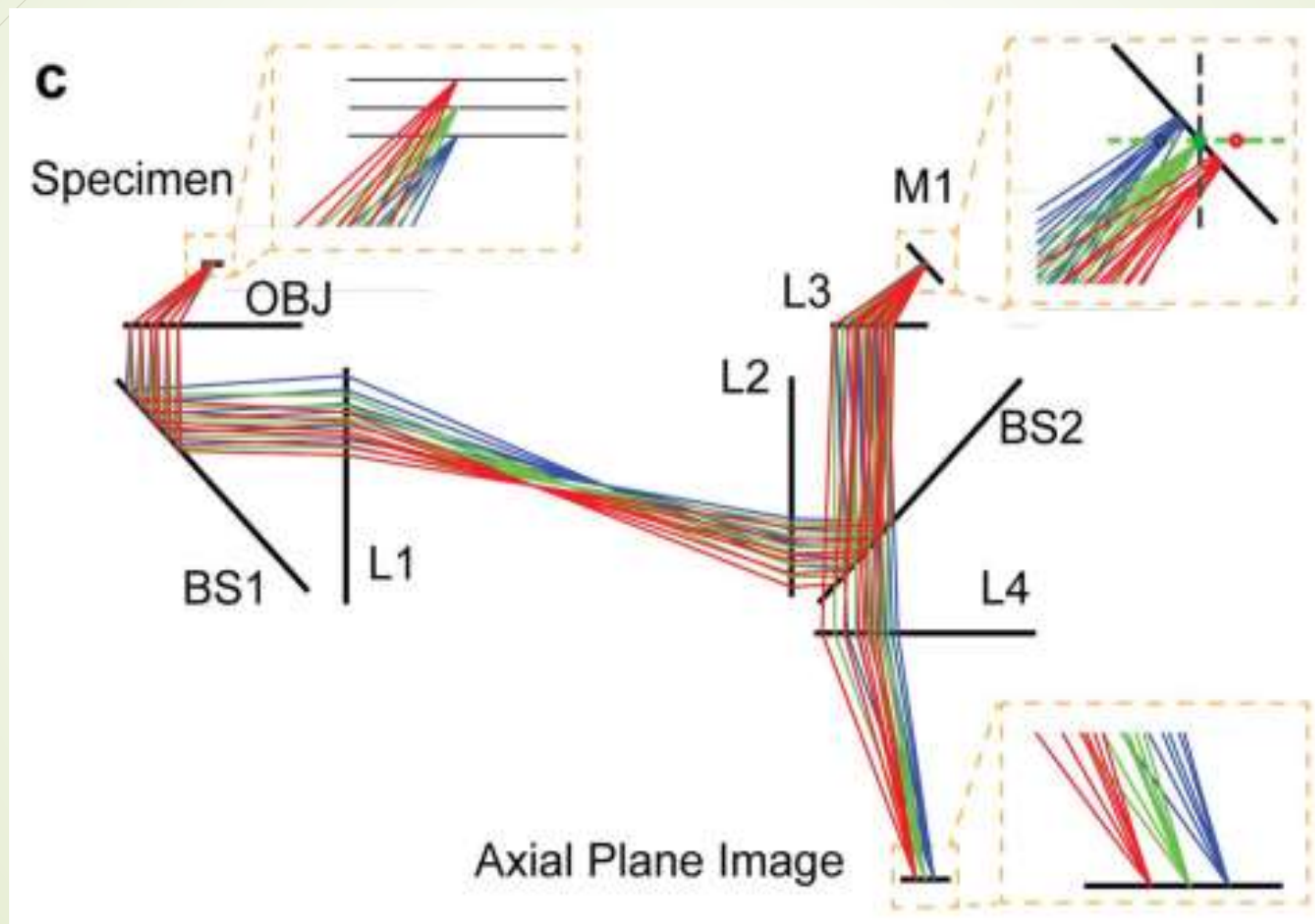
3. Axial Plane Optical Microscopy (APOM)



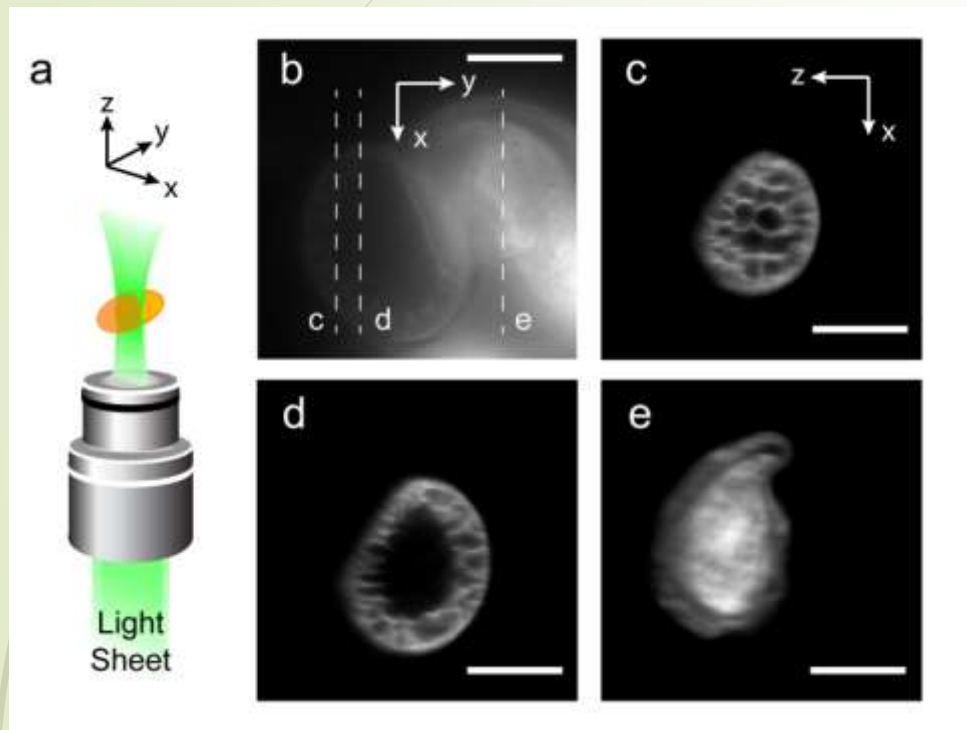
APOM最大特点就是可以直接得到轴向图像。

同时，在APOM结构中，样品附近只有一个透镜，这使得该物镜可以使用大数值孔径的物镜。

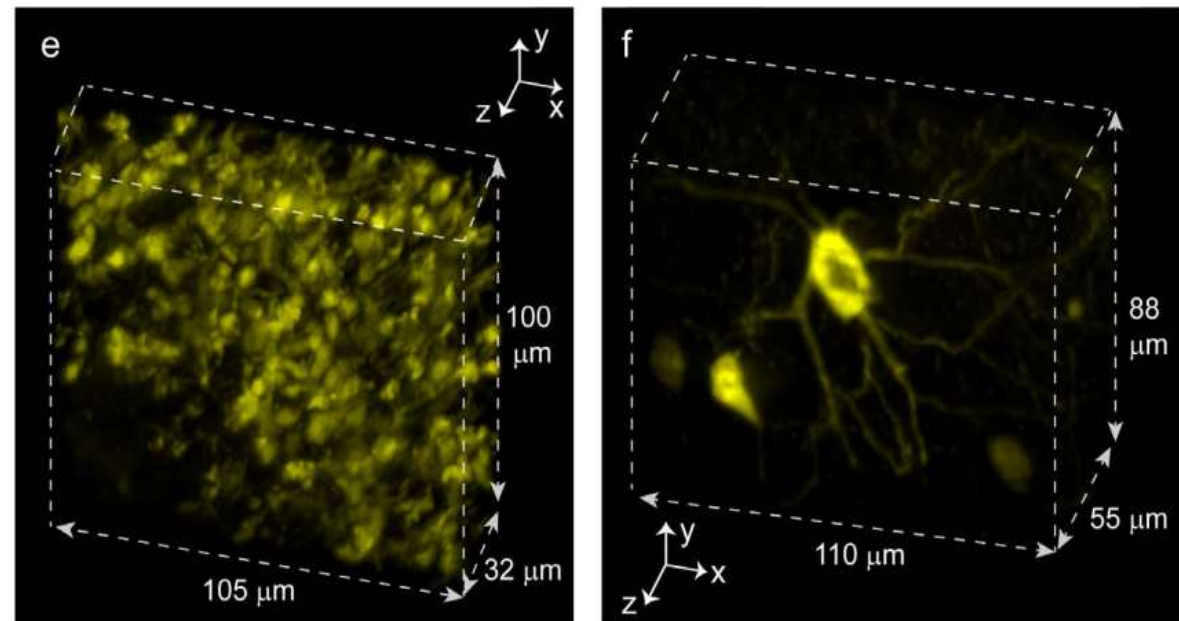
仿真图



结果图

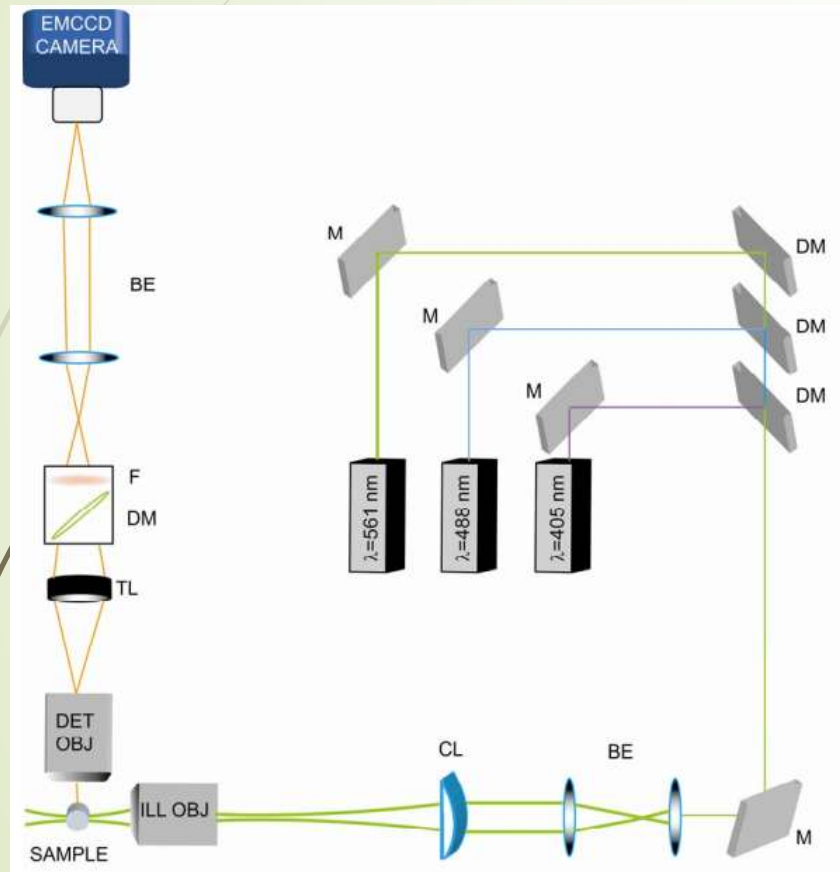


b为横向图像，c d e为b图中对应位置处的轴向图像



三维成像

4. Individual Molecule Localization-Selective Plane Illumination Microscope (IML-SPIM)

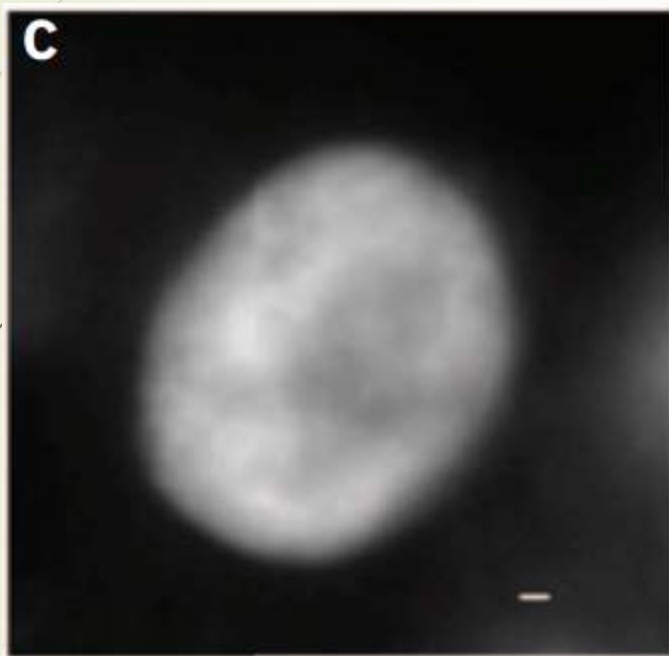


光路图

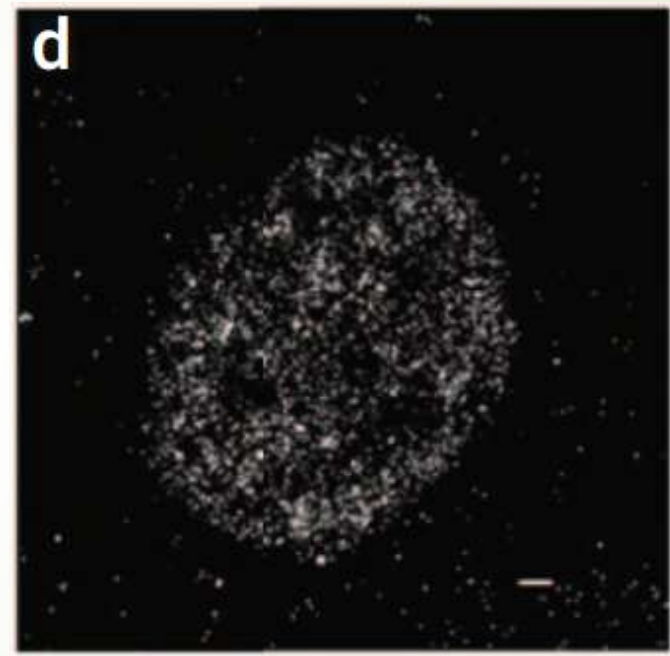
IML-SPIM结合了远场单分子定位方法于光片荧光显微镜。

IML-SPIM在结构方面采用了传统的正交放置物镜的结构，在超分辨显微技术方面，其采用了椭圆点扩散函数失真技术(elliptical point spread function distortion)。

结果图



普通的SPIM图像



IML-SPIM图像，超分辨显微技术：
fluorescence photoactivation localization
microscopy

5. π SPIM

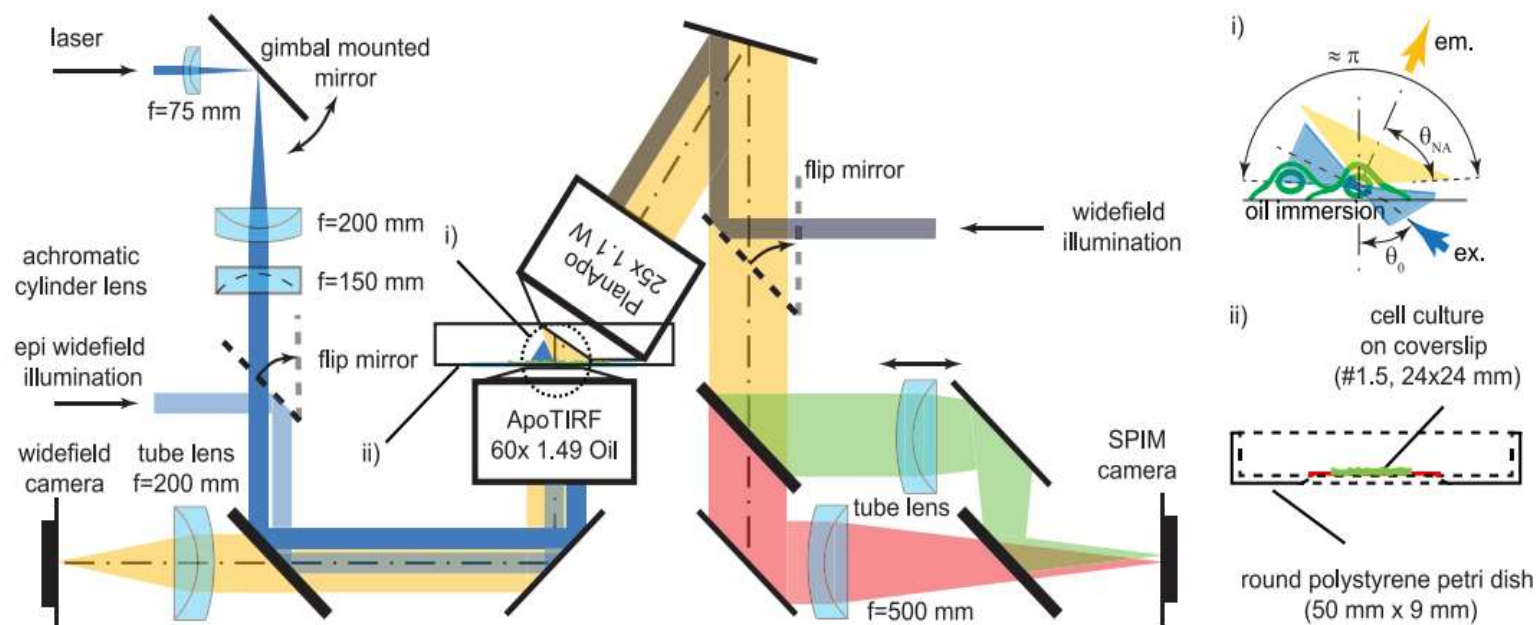
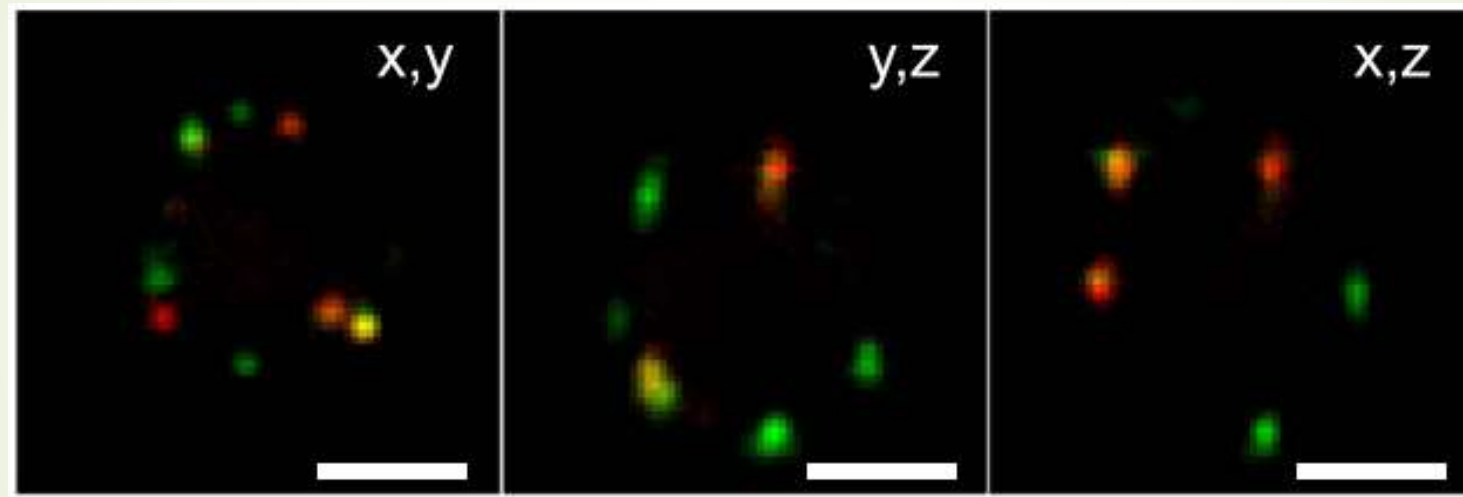


Figure 1. π SPIM set-up. Schematic dual-color π SPIM set-up with an oblique light-sheet produced by off-center passage of the beam through the illumination lens (1.49 ApoTIRF 60 \times), and the detection lens (1.1 W, 25 \times) arranged orthogonally to the oblique light-sheet. (i) Close-up of the focal region showing the angular range of the complementing illumination and emission cones. (ii) Mid-plane cross-section of the glass-bottom dish used for sample mounting.

π SPIM通过倾斜光片照明的方式实现了两物镜非正交放置的结构。

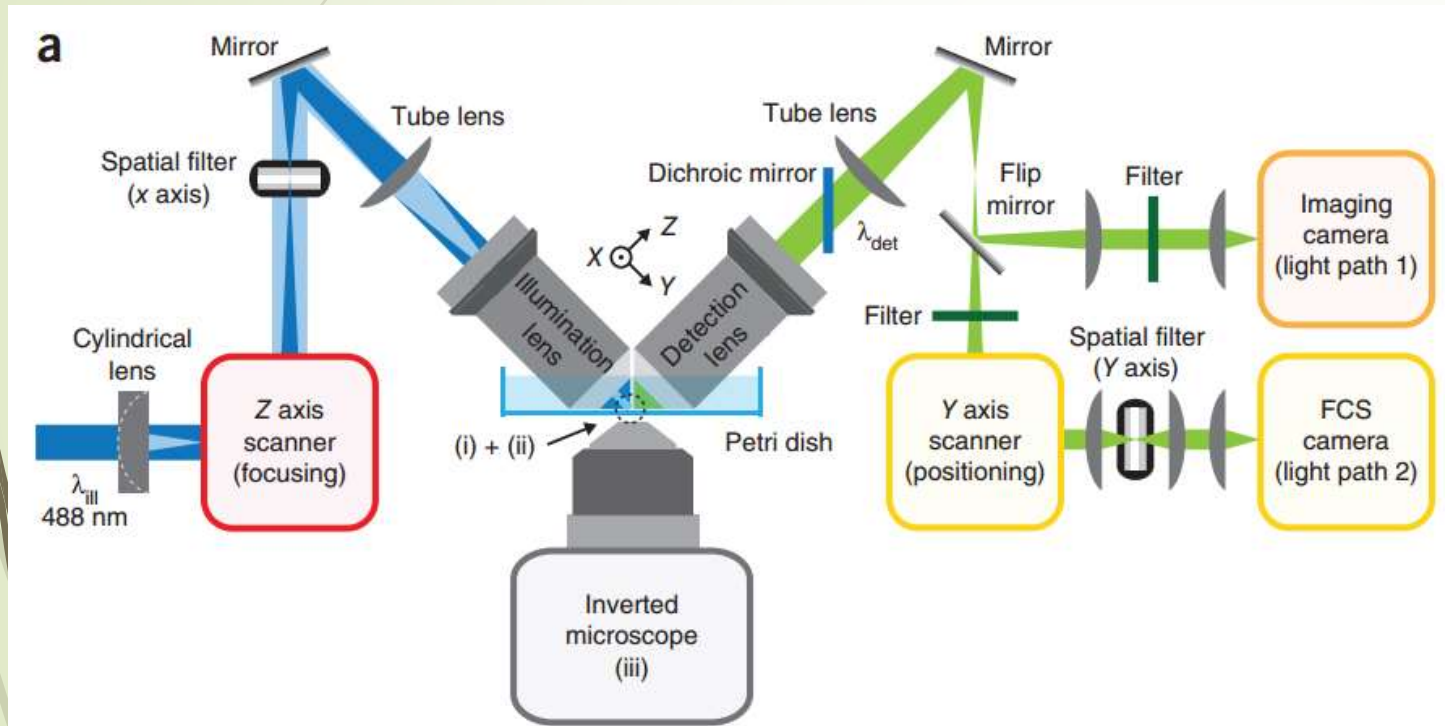
示意图

结果图



比例尺2微米

6. SPIM combined with fluorescence correlation spectroscopy (FCS)

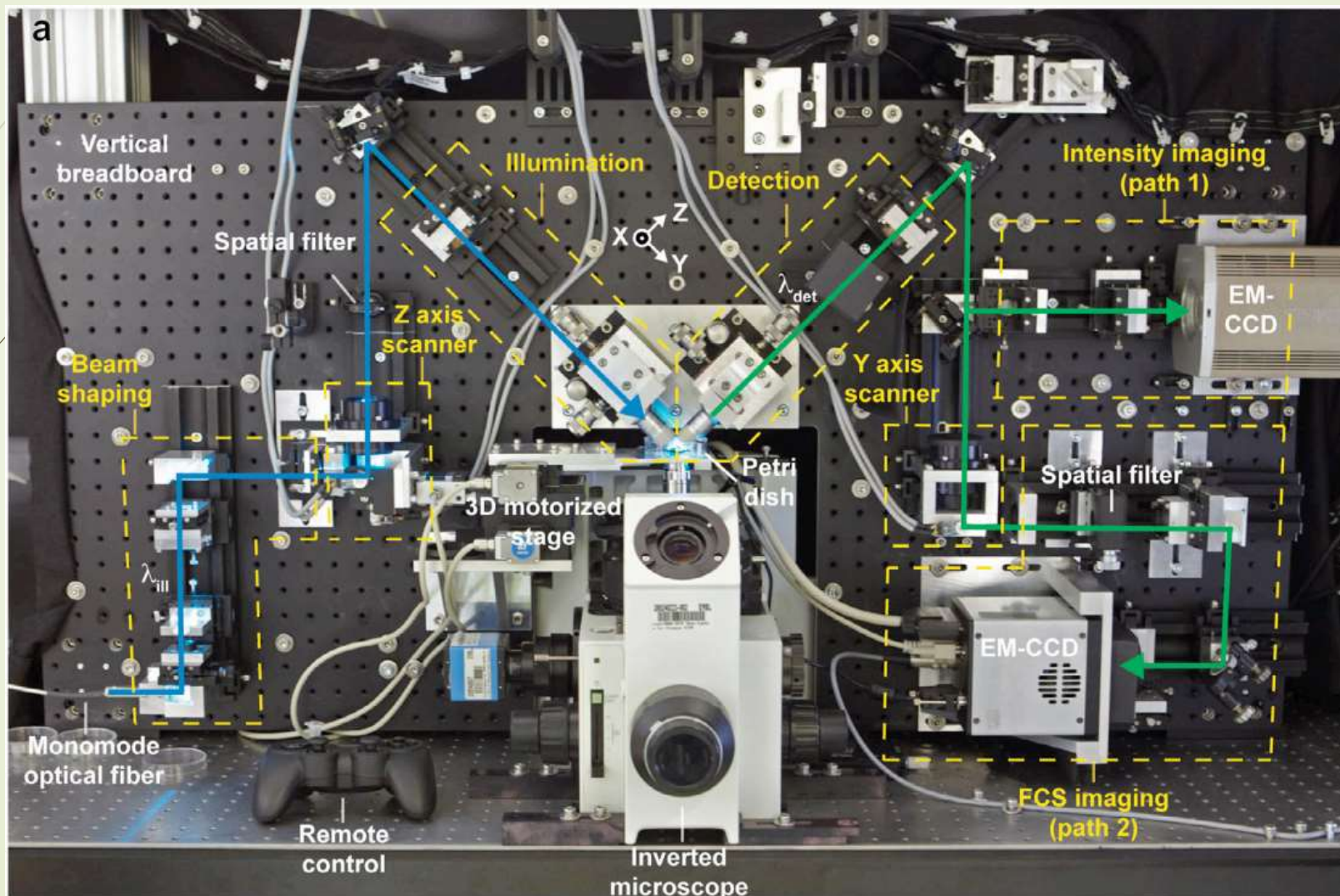


这个光片显微镜虽仍保持两物镜正交放置的结构，但照明光路和探测光路与样品不处于同一水平面。

在此结构中，照明物镜和探测物镜与样品平面均成45度角。

示意图

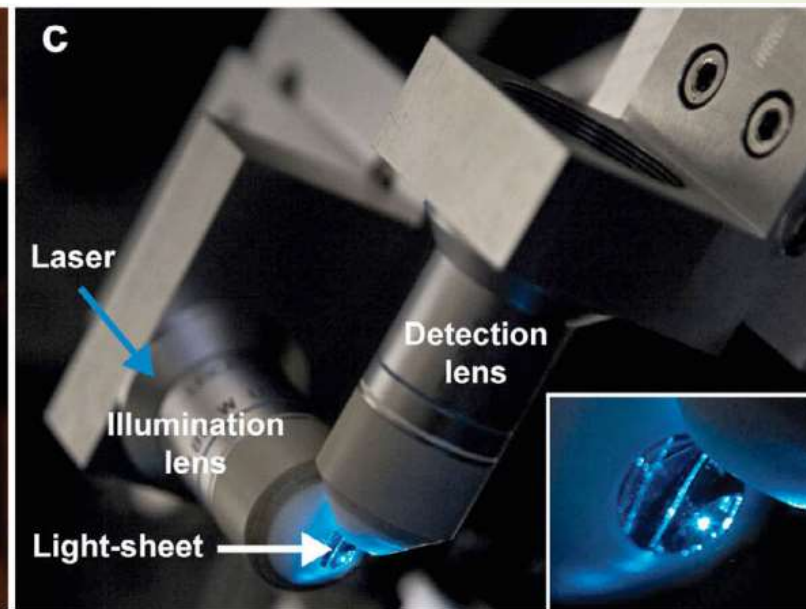
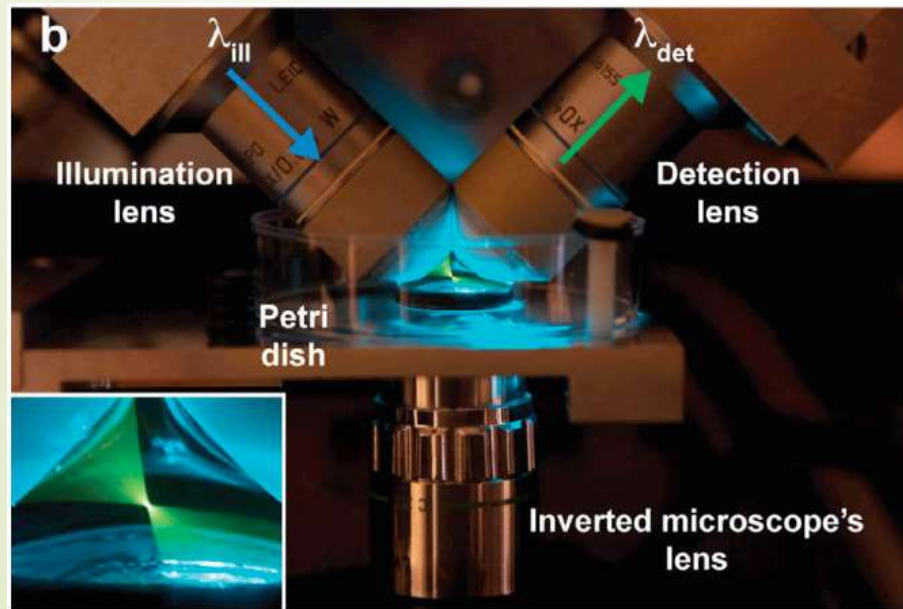
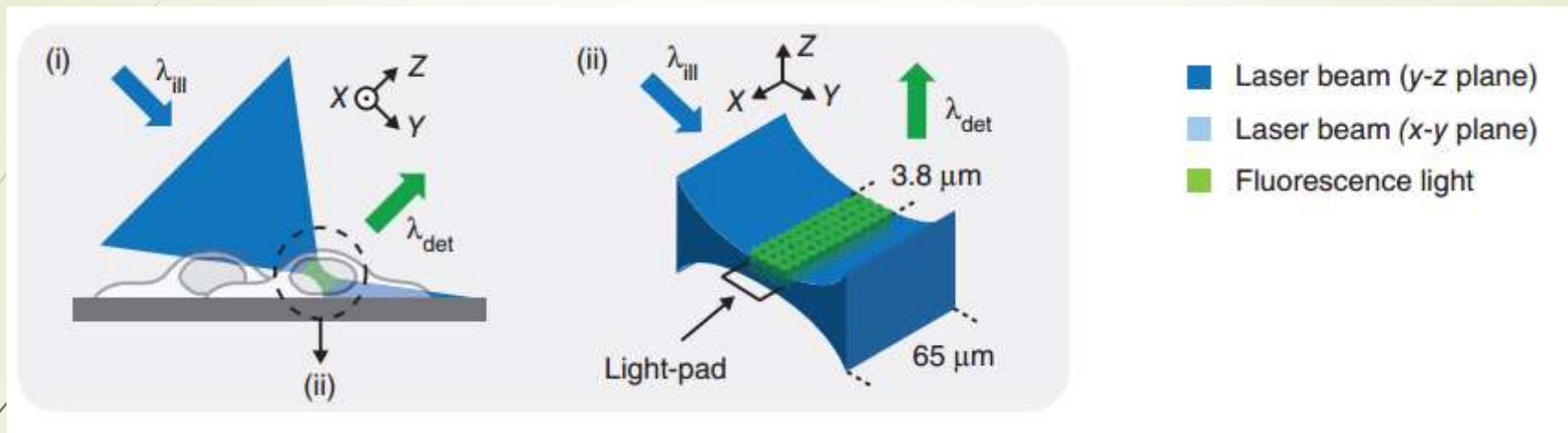
实拍图



简单介绍

- FCS技术介绍：Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) is an experimental technique using statistical analysis of the fluctuations of fluorescence in a system in order to decipher dynamic molecular events, such as diffusion or conformational fluctuations of biomolecules.
- FCS技术仅仅是出于特定目的的数字信号处理技术，在硬件光路部分和普通的SPIM基本一致。

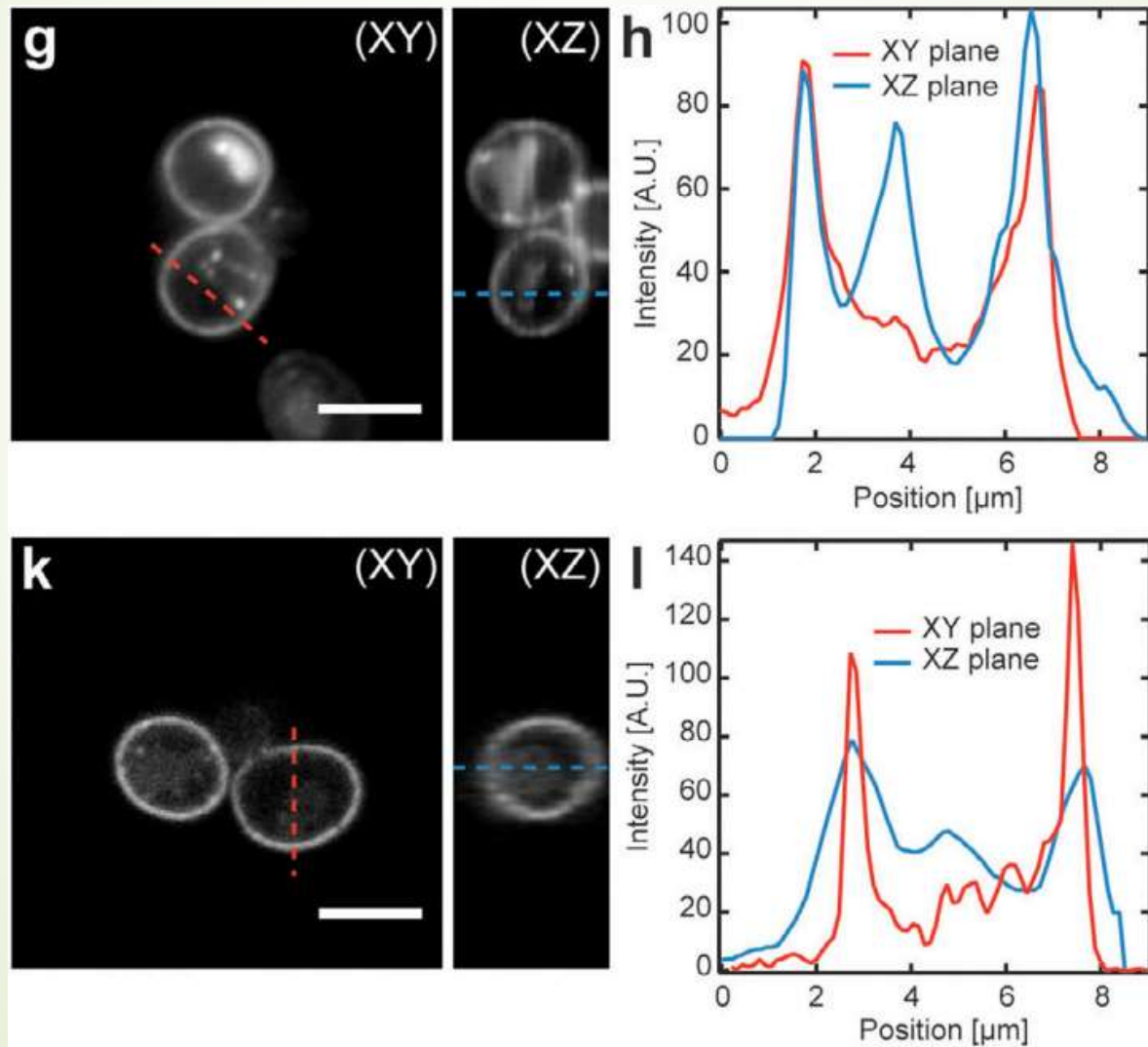
光片位置图



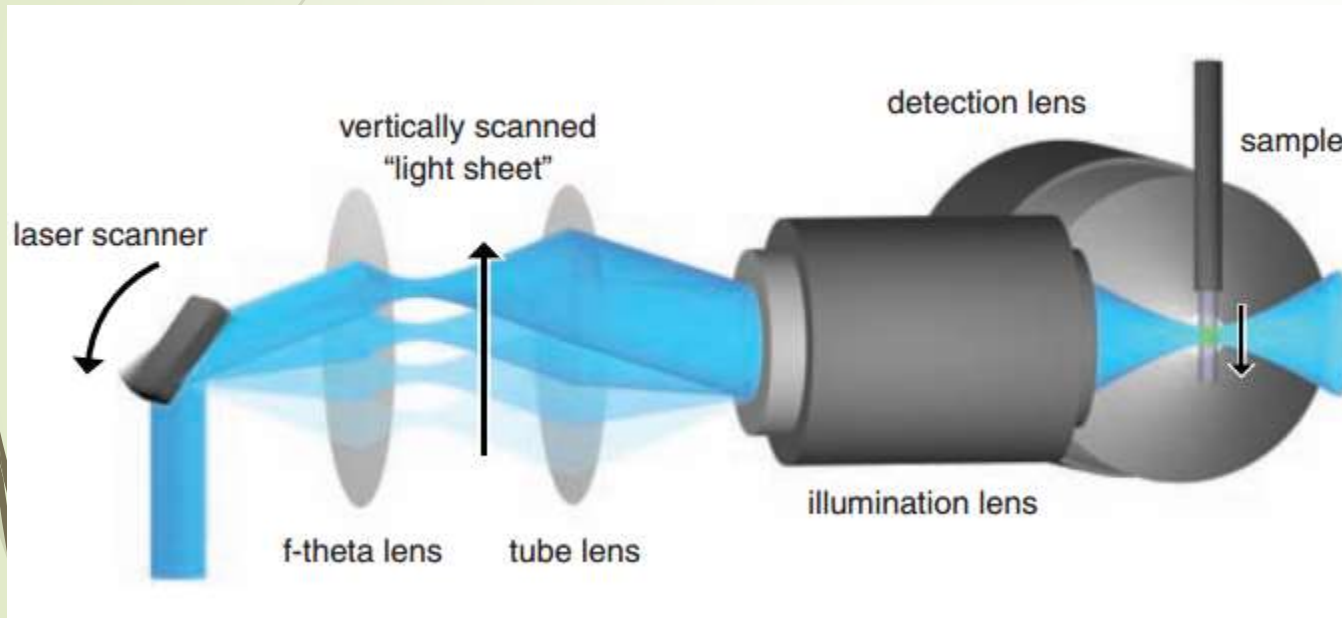
简单介绍

- FCS技术介绍：Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) is an experimental technique using statistical analysis of the fluctuations of fluorescence in a system in order to decipher dynamic molecular events, such as diffusion or conformational fluctuations of biomolecules.
- FCS技术仅仅是出于特定目的的数字信号处理技术，在硬件光路部分和普通的SPIM基本一致。

结果图

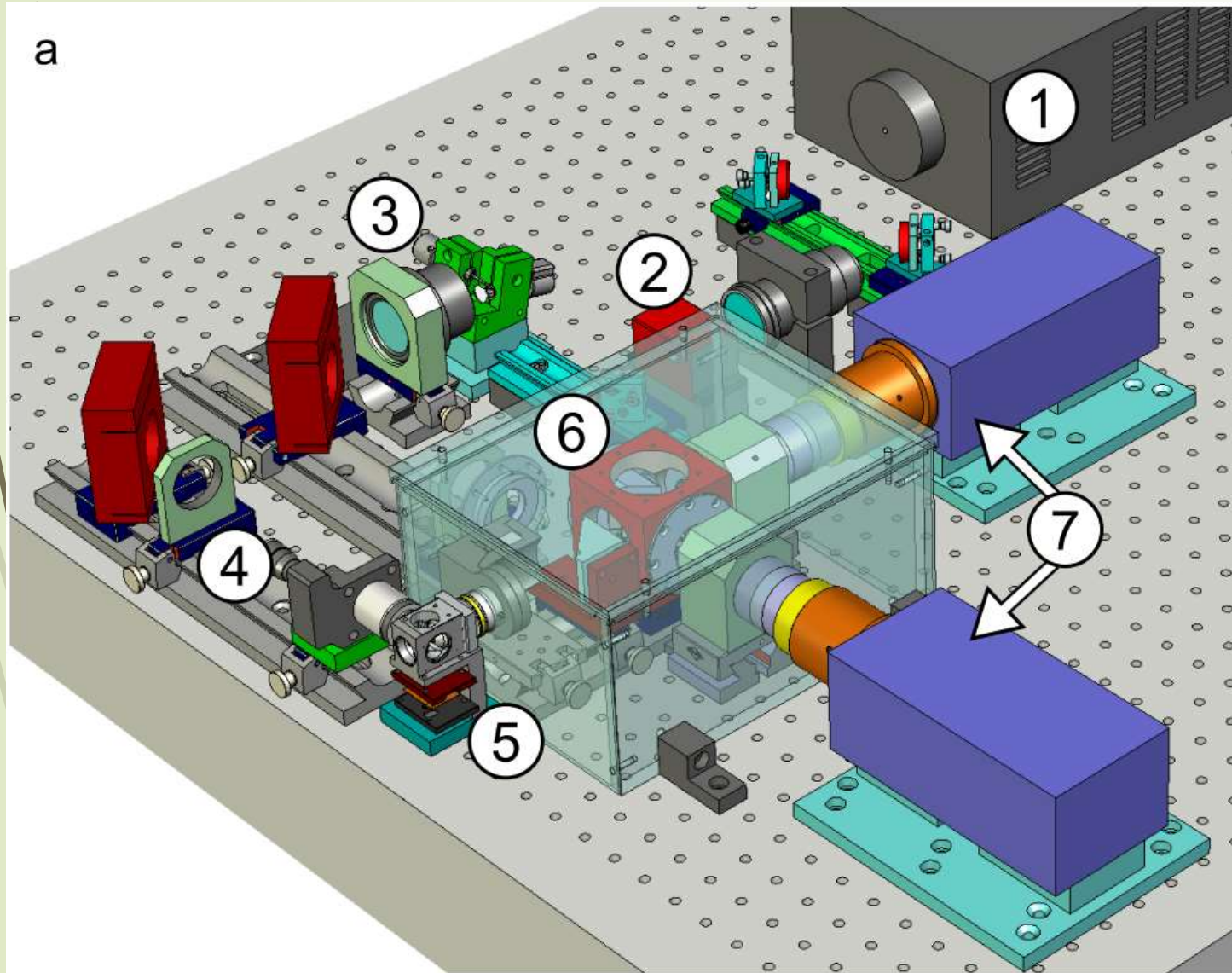


7. Digital scanned laser light sheet fluorescence microscopy(DSLM)



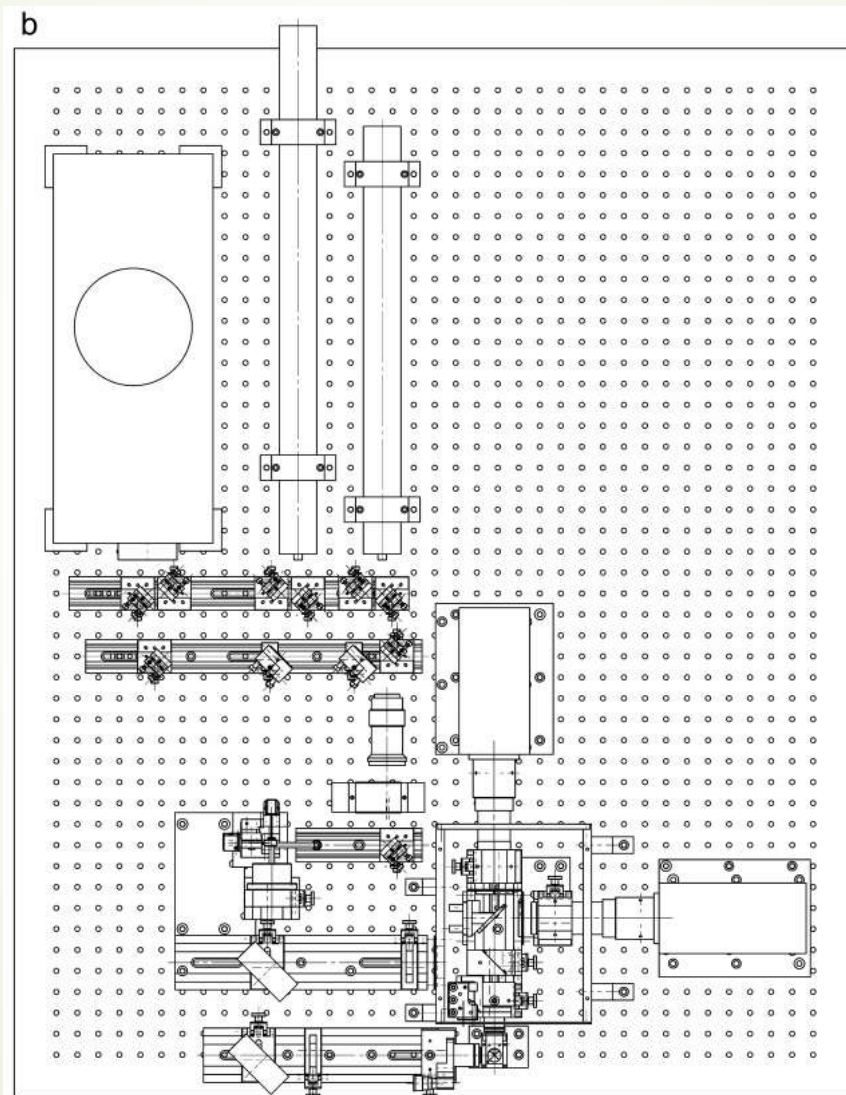
DSLM的原理是使用一束快速摆动的激发光形成一个虚拟的“光片”，通过恒定扫描速度的控制来实现均匀光片的产生。f-theta透镜的作用是讲光束的倾斜摆动转化为光束在垂直方向的位移，从而实现扫描。

示意图



1. 光源 laser light source
2. 声光可调谐滤波器 acousto-optical tunable filter
3. 扫描装置 (f-theta 透镜) the laser scanner
4. 照明光路 beam illumination arm
5. 样品温控装置 the temperature-controlled specimen chamber
6. 探测光路
7. 两个独立的相机

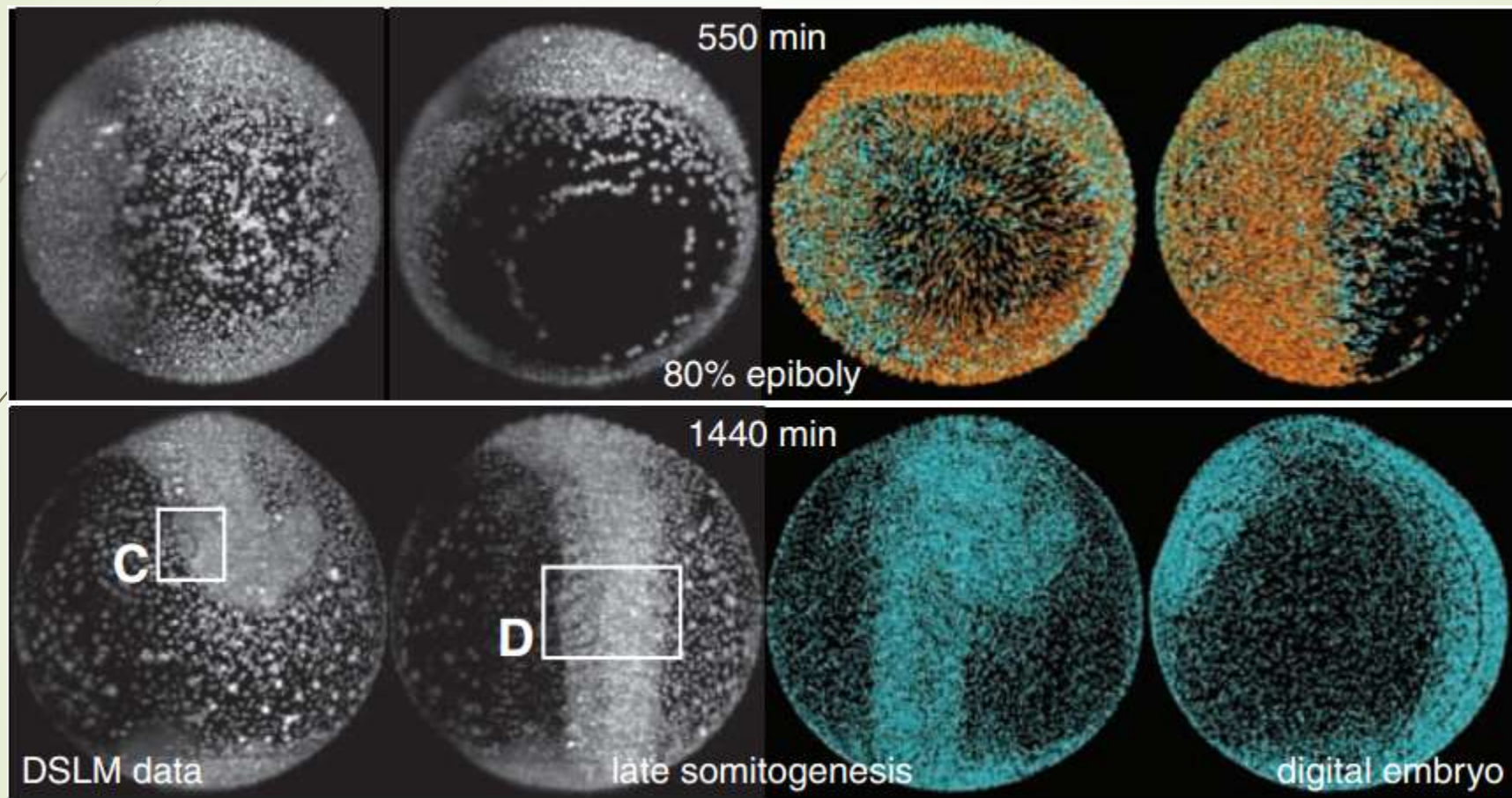
示意图



DSLM优势

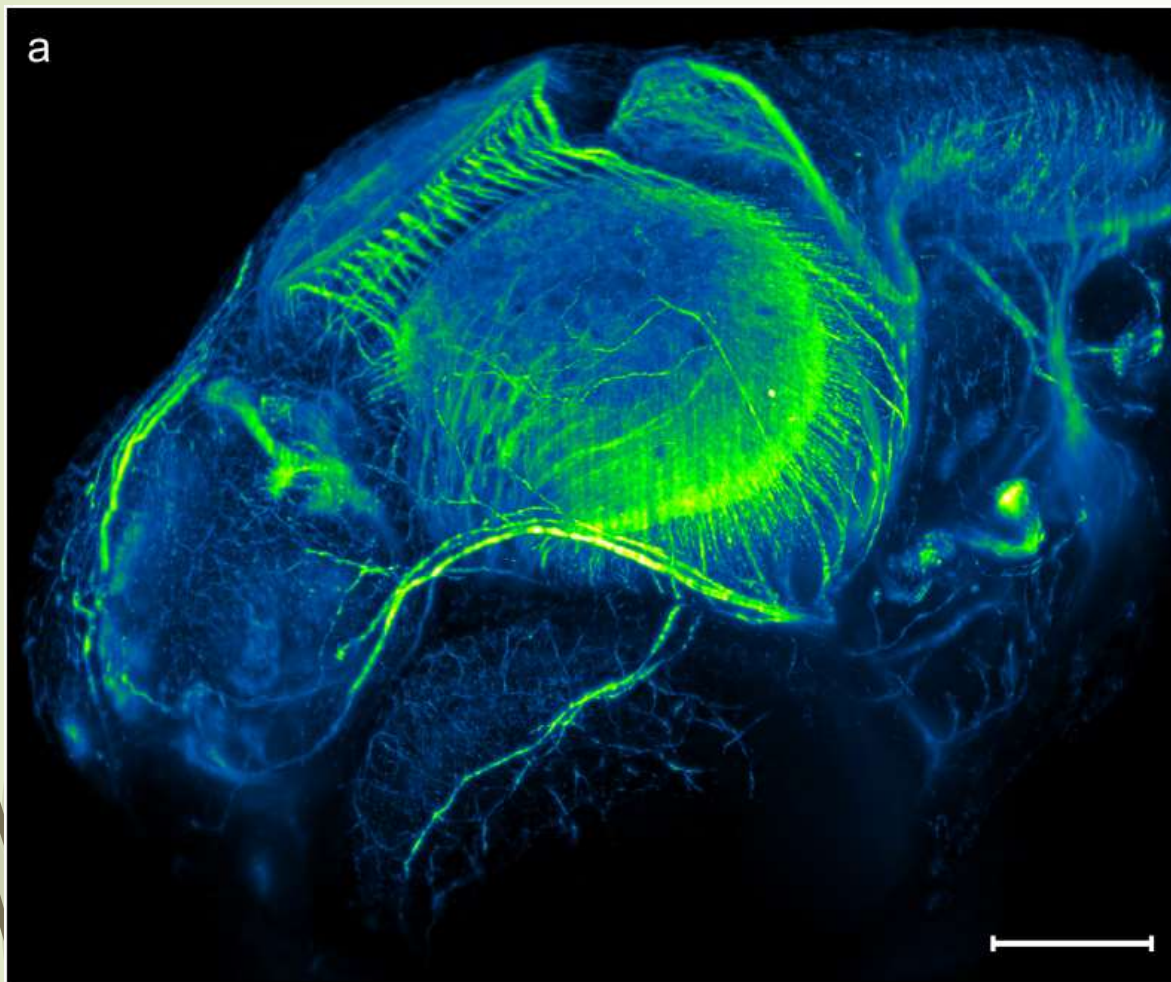
- ➡ 光路得到简化
- ➡ 照明效率高：由于无需光圈来对光束进行整形，照明效率可达95%，传统的SPIM平均只有3%
- ➡ 成像速度比普通SPIM提高了至少了两倍
- ➡ 装置紧凑：除去光源外，占地0.3平方米
- ➡ 对于扫描的控制更加灵活
- ➡ 费用相对较低：除去电子系统（电脑）以及软件，共耗费8万欧

结果图



比例尺: 100um

结果图

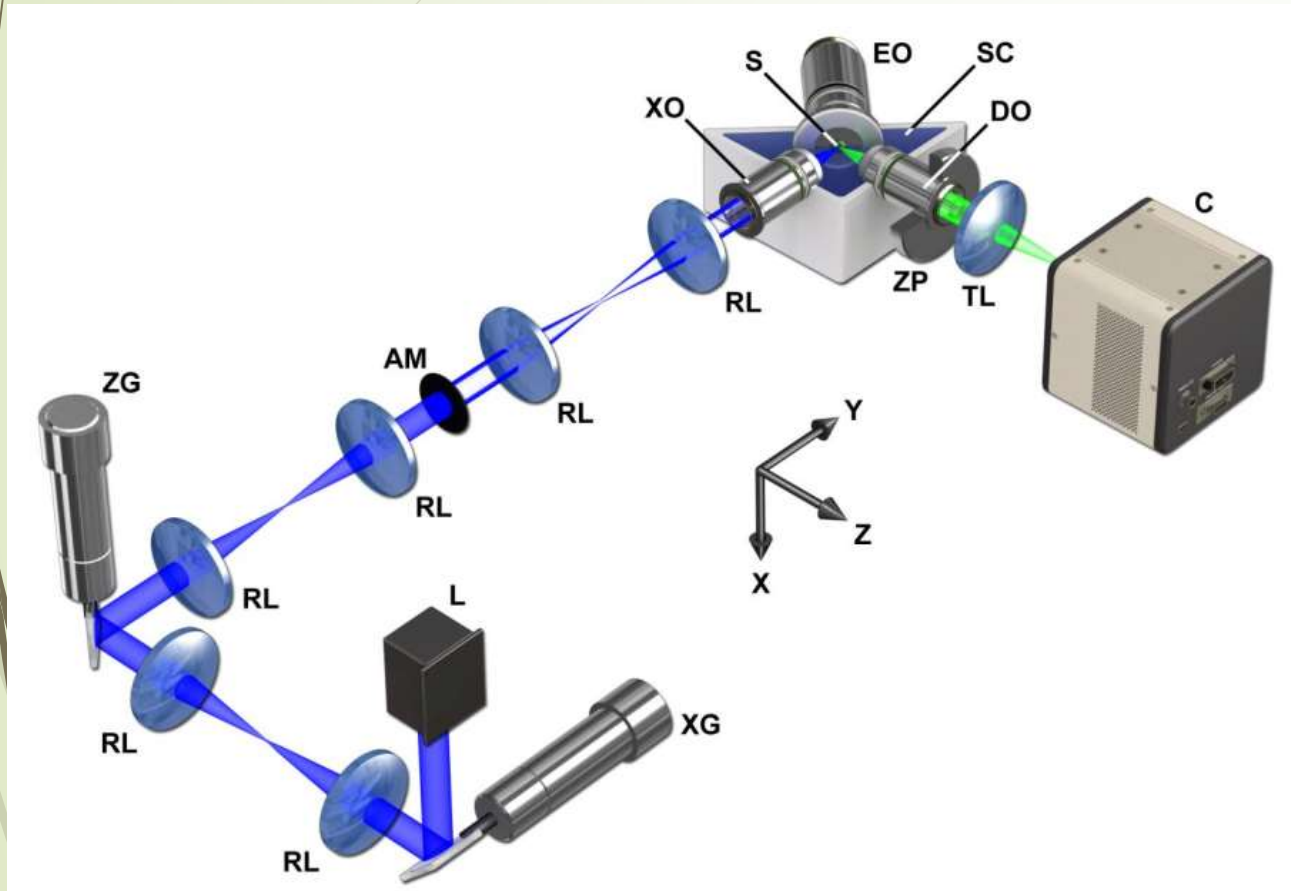


比例尺: 100um



比例尺: 500um

8. Bessel beam plane illumination

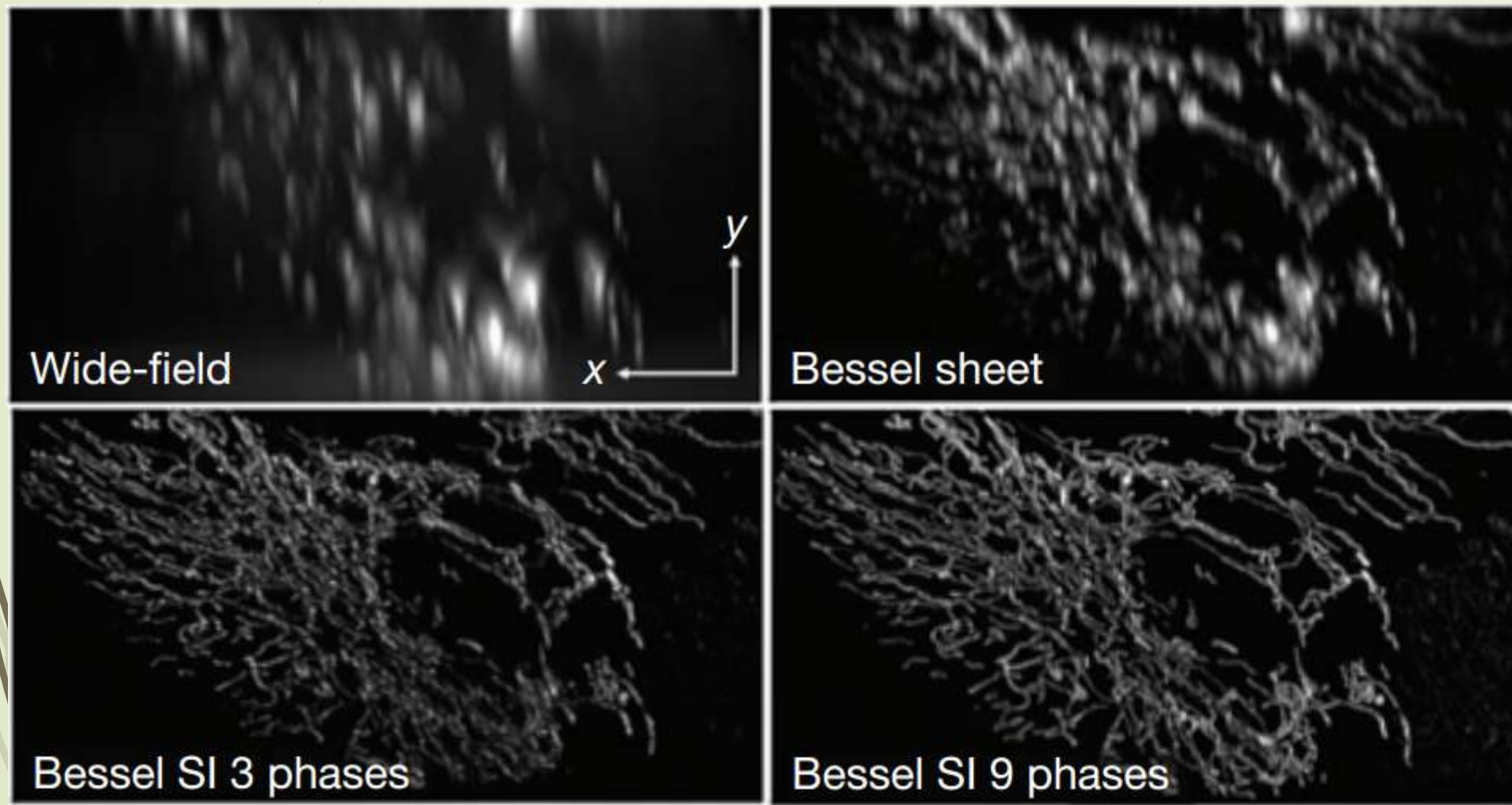


Bessel beam plane illumination的结构同6, 其光片产生方式与DSLM相同。

Bessel beam plane illumination的特点是使用贝塞尔光束替换了之前的高斯光束, 从而产生更薄的光片。

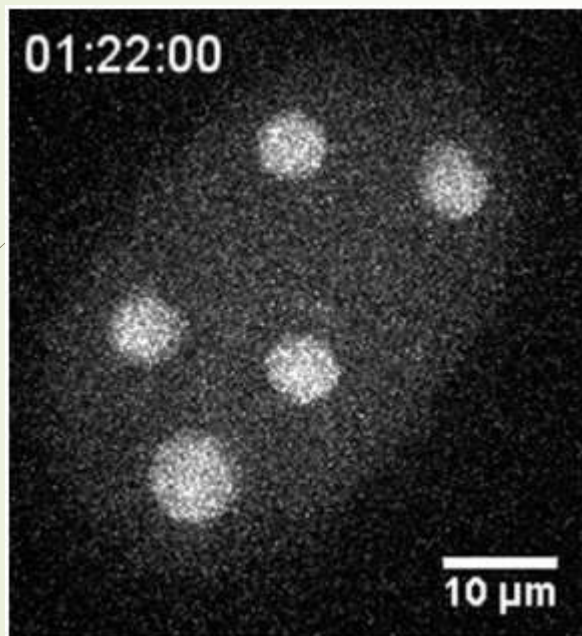
同时, 在此实验中结合了结构光照明 (structured illumination) 的超分辨显微技术。

结果图

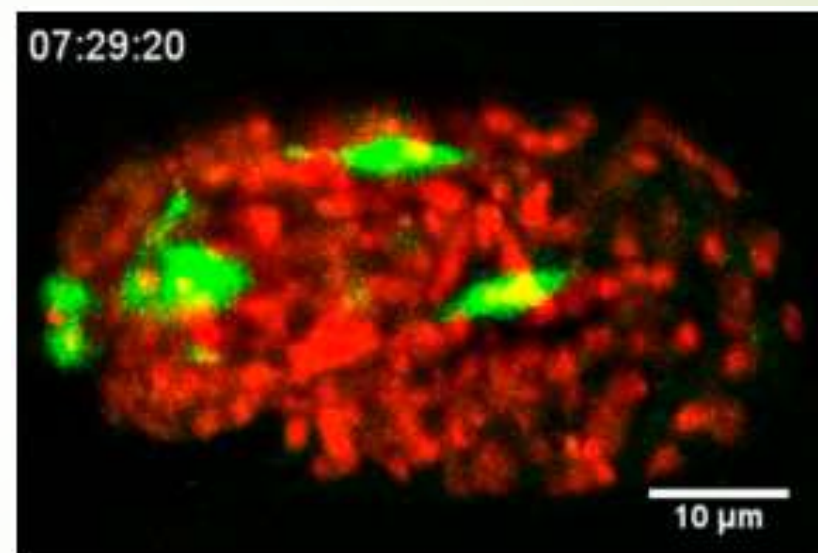


比例尺: 10um

结果图



单色成像



双色成像



LSFM各项参数

我们从以下几个方面归纳了LSFM的参数

1. 分辨率
2. 瑞利长度
3. 穿透深度
4. 扫描速度
5. 软件使用情况

横向分辨率

分辨率方面，可以根据是否结合超分辨显微技术将显微镜分为两类。

在不使用超分辨显微技术的情况下，横向分辨率由探测光路的性质决定（照明光波长，数值孔径NA等）。通常，其横向分辨率为300nm左右。此时，光片荧光显微镜的横向分辨率与宽场荧光显微镜相同。

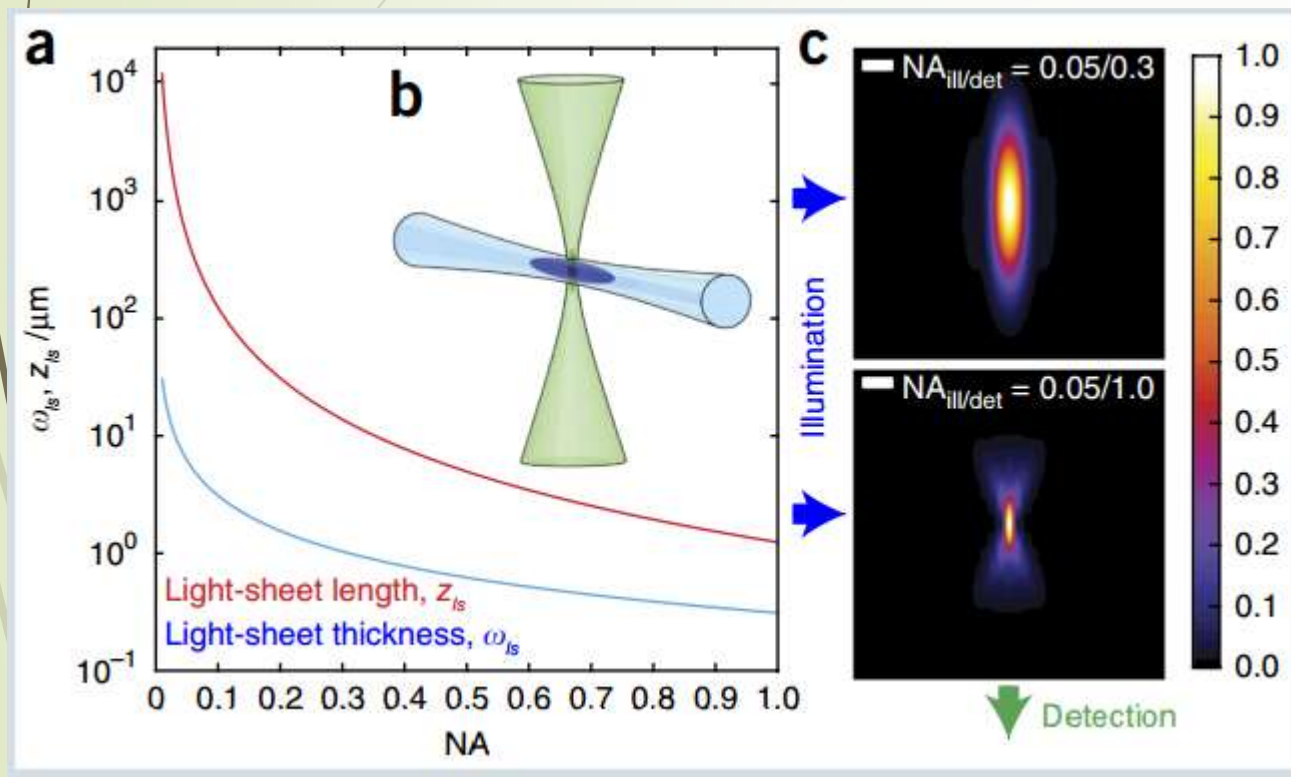
当结合了超分辨显微技术后，分辨率突破衍射极限，此时横向分辨率可达30-60nm。

轴向分辨率（光片厚度）

轴向分辨率由照明光路的性质决定。光片荧光显微镜的轴向分辨率通过测量光片厚度来得到。

一般情况下，测量光片荧光显微镜的光片厚度时，将光片通过荧光溶液或者一排荧光珠，使用相机接受荧光信号，从而得到光片的厚度随传播距离的改变情况。

光片厚度与视场大小的制约关系



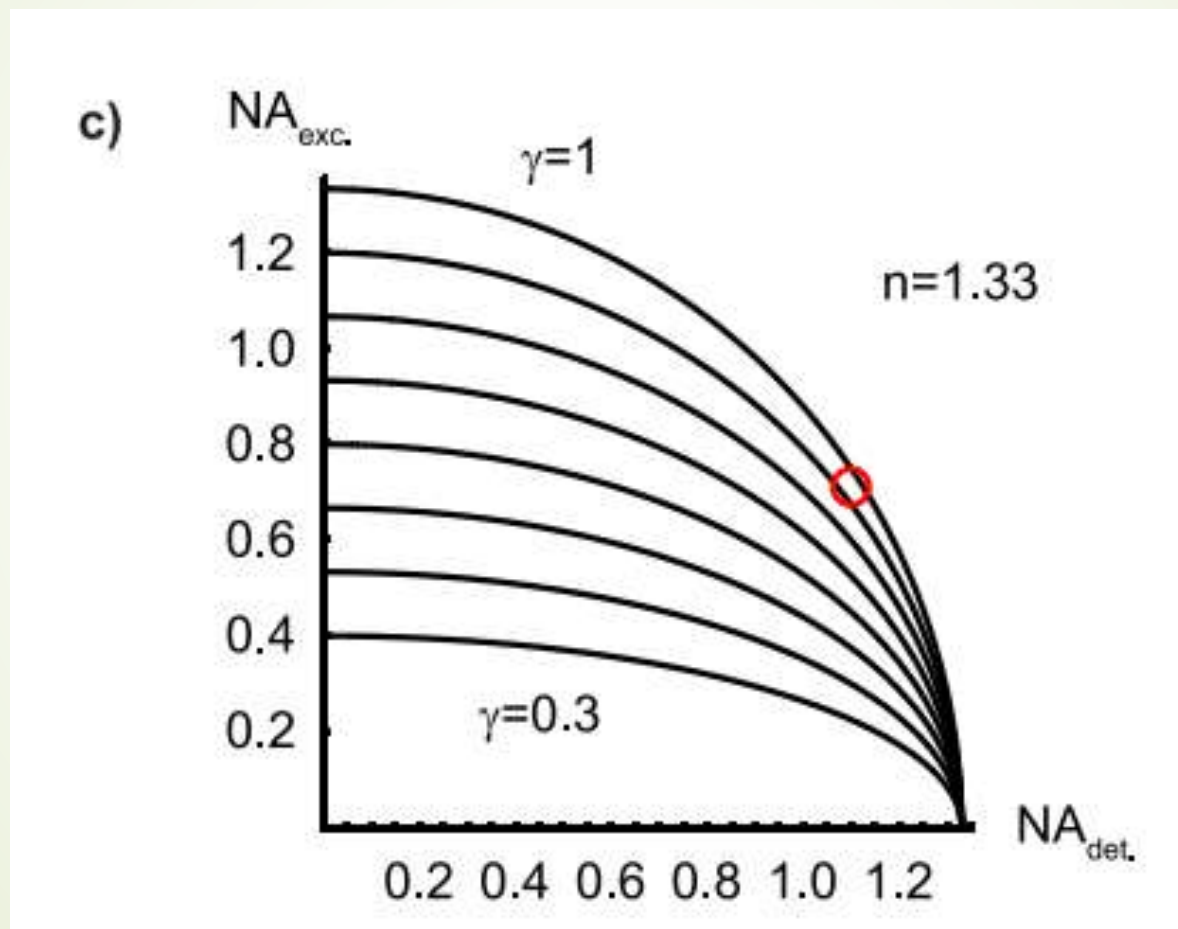
通常，光片厚度小于束腰处光片厚度的 $\sqrt{2}$ 倍的位置被认为是可用视场。

同时，衍射决定了一个紧密聚焦（高NA）的高斯光片迅速在远离焦点处时迅速发散，使得视场减小。

$$z_{ls} = \frac{2\lambda}{\pi NA^2}$$

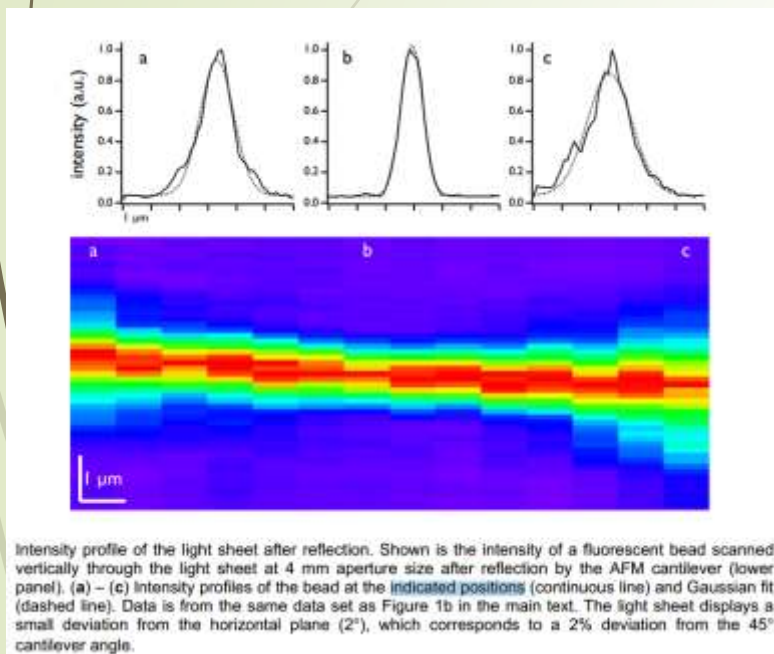
$$\omega_{ls} = \frac{2\lambda}{\pi NA}$$

物镜间NA的相互制约关系

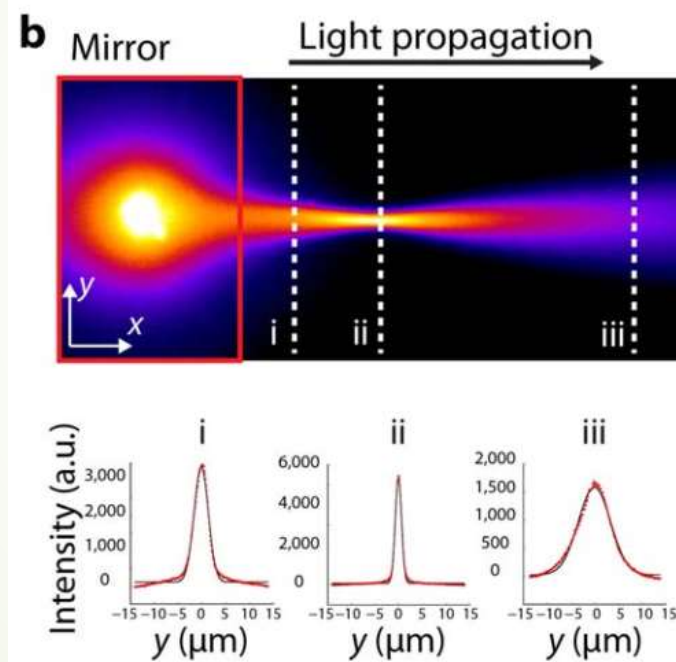


r 是一个与两物镜间所成角大小相关的量

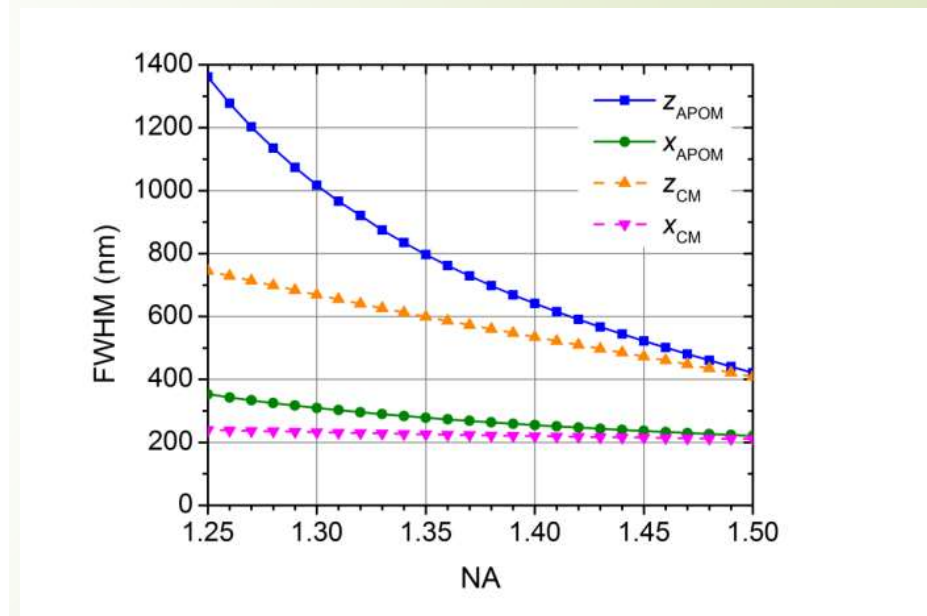
轴向分辨率



RLSM



soSPIM



APOM

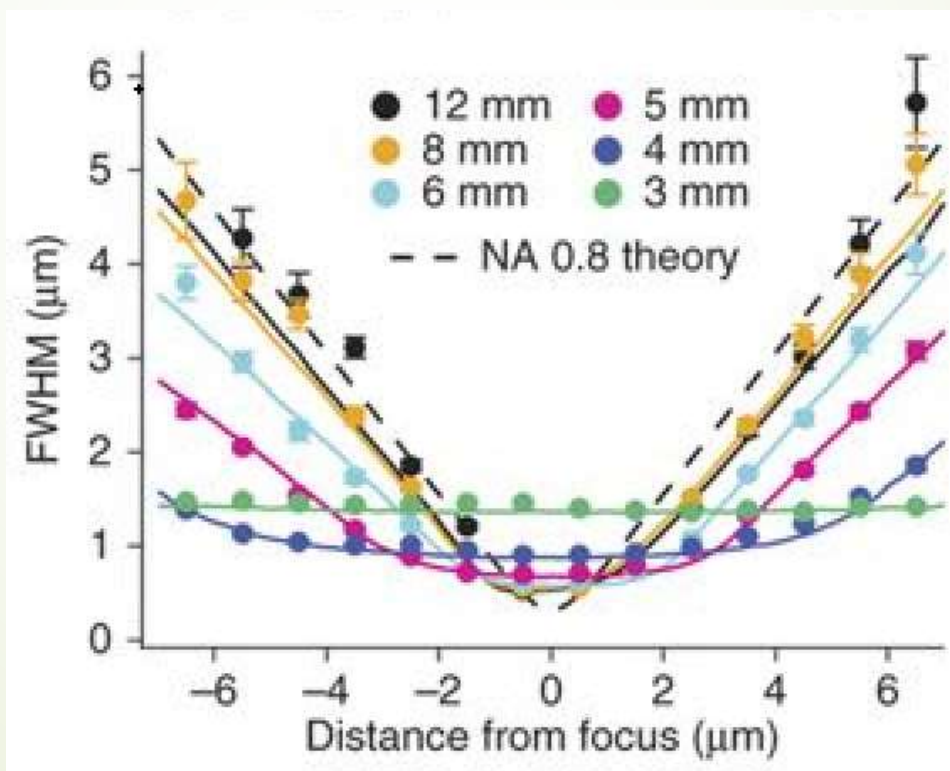
轴向分辨率

当使用普通的正交结构时，由于物镜的数值孔径受到限制，光片厚度一般大于等于 $1\mu\text{m}$ （对应的轴向分辨率大于等于 500nm ）。

当两物镜非正交放置时，或使用贝塞尔光束时，光片厚度可以小于 $1\mu\text{m}$ 。使用贝塞尔光束是光片厚度可达 $600\mu\text{m}$ 。

瑞利长度

瑞利长度是指光片厚度保持在一定大小之内部分的长度，光片厚度与瑞利长度相互制约。目前所有的瑞丽长度均能满足单细胞探测的要求。





扫描速度

目前普通的LSFM的扫描速度均能满足要求。DSLM的扫描速度可以达到每秒200帧。

当结合超分辨显微技术时，扫描速度大大下降。但具体速度未知。

软件使用情况

综合已知的论文,

- **LabView**: 操纵位移台、相机等设备进行扫描、成像。
- **MetaMorph**: 显微镜自动化并进行成像分析。
- **Matlab**: 进行图像处理。
- **PSFj**: 对所成图像进行分析。
- **C#**: 用户界面, 高级控制层。
- **C++**: 低层硬件通信



谢谢！