
高对比度、高分辨率的无标记C波段紫外显微镜

作者：writer 来源：科学网

本文原地址：<https://www.iikx.com/news/progress/23043.html>

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

高对比度、高分辨率的无标记C波段紫外显

微镜。近日，来自挪威北极大学物理与技术系的Florian

Ströhl教授及其合作者在卓越计划领军期刊《Light: Science Applications》发表了题为Label-free superior contrast with c-band ultra-violet extinction microscopy的原创研究。此外，瑞典斯德哥尔摩卡罗琳斯卡研究所也为本工作提供了协助。该团队提出了一种可以提供高对比度、高分辨率无标记的C波段紫外线显微镜，通过一系列倾斜照明以及差分相位对比度(DPC)照明，该显微镜实现了比其他方法提高7到300倍的高对比度。

研究背景

细胞的高分辨率明场显微镜本质上受到低图像对比度的限制，因此，细胞内接近但高于分辨率极限的微结构通常不会被观测到。为了实现高分辨率的细胞结构观察，研究者们通常使用本征对比度方法。与穿过较低折射率介质的光相比，穿过具有较高折射率的细胞的光会具有一定相位差。这种差异在明场显微镜中几乎不明显，但可以使用相位对比或差分干涉对比显微镜(DIC)等技术转换为可见强度差异。该技术在薄生物标本的可视化方面非常成功，但其仅提供定性描述，无法实现定量测量，相机记录的强度值并不直接对应于物理量。

因此，无标记定量测量需要更先进的方法，如全息层析成像、光学相干层析成像或定量相位显微镜(QPM)。这些技术依赖于参考光束，通过干涉测量将微小的差异映射到探测光束，因此系统较为复杂。其中，QPM可以获取相位的实部和虚部，而通常在生物成像中一般无法获取虚相，这是因为用于获取虚相的消光系数(实际上是样品对光的吸收)对图像对比度几乎没有贡献。这适用于可见光区域，但在较短的波长下会发生变化。

C波段紫外(UVC)光为200-280

nm，在生物物质中，UVC光比可见光具有更大的吸收(主要是由于核酸和蛋白质分别在260 nm和280 nm处具有吸收峰值)、特异性以及更低的穿透深度。在明场显微镜中，UVC的高吸收将反映为更高的图像对比度。这提供了一种使用UVC光获得高对比度定量消光系数图的新途径，并可以作为定量相位图的补充测量。对于UVC显微镜，已有的研究主要利用组织或常见染料斑点的自发荧光特性作为提高对比度的手段，或者使用UVC光的选择性吸收来获得互补的样本信息。UVC中的定量相位成像使用干涉仪系统或强度传输方程，由于这两种方法都依赖于(准)相干照明，因此它们仅可以获得使用非相干光产生的最大分辨率的一半。另一方面，两者都受到UVC波段缺乏可用的像差校正光学器件的影响，这也会显著降低图像质量。此外，深紫外的色差远大于可见光波段，即使是典型窄带宽UVC-

LED的光也会像全范围可见光LED一样强烈地散射，从而限制图像的质量。

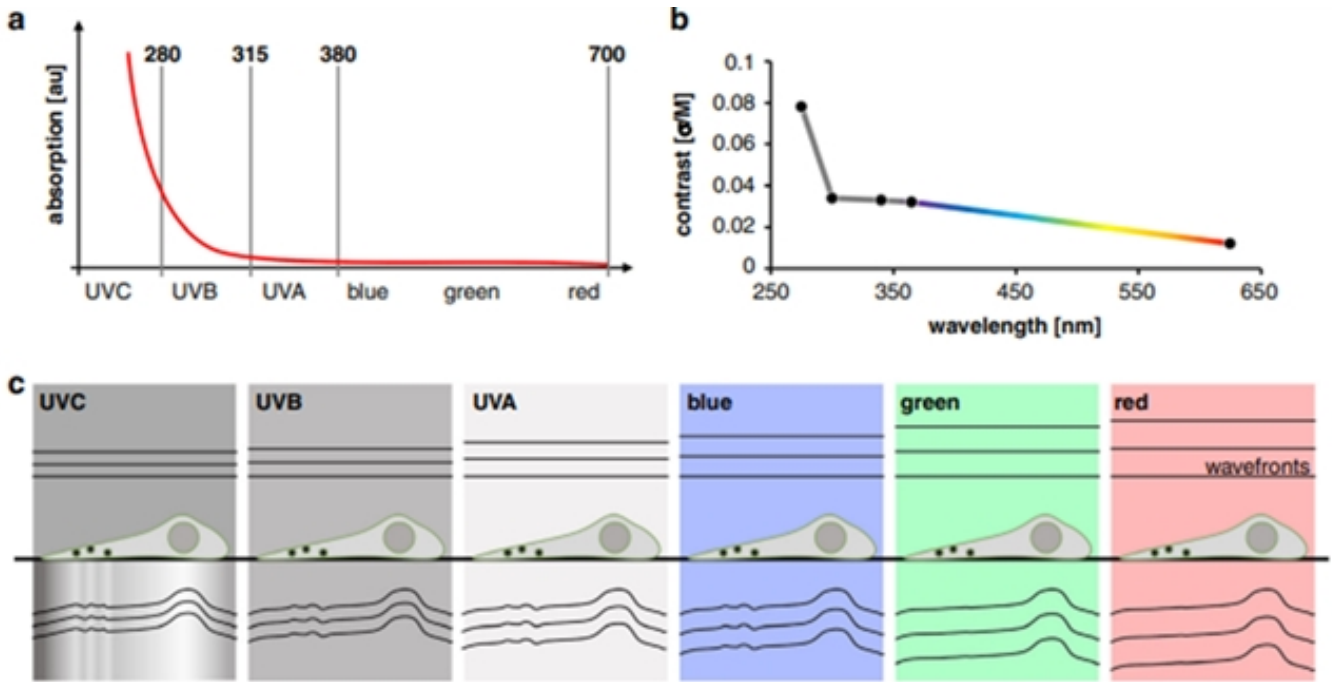


图1. 在肝细胞上测量的不同波长下的吸收和对比度差异。

创新研究

研究人员通常会利用样品的折射率来获得生物细胞的高对比度图像。由于细胞样品引起的散射或吸收，被介质包围的细胞的折射率对比度会使透射光波的相位和强度发生变化。大多数细胞在可见波长下是透明的，这意味着它们的复折射率的虚分量(也被称为消光系数 k)接近于零。

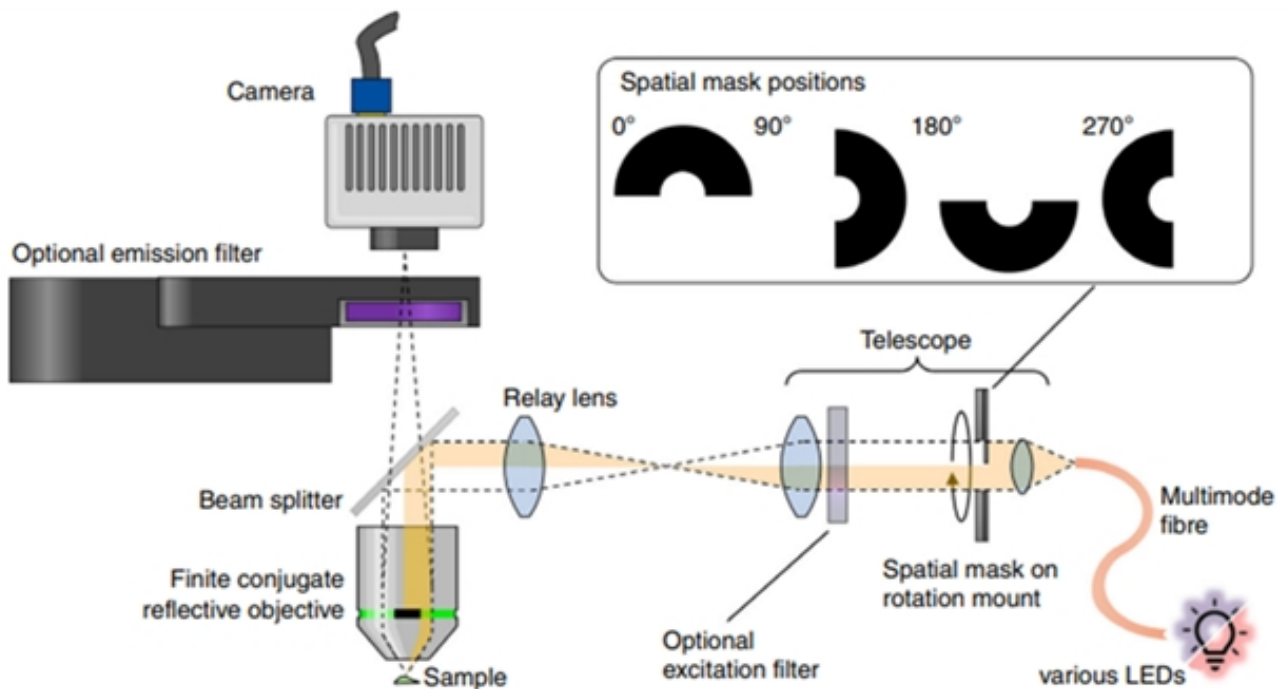


图2. 定量UVC显微镜：使用收集窄带LED光的多模光纤照明。光纤的端面通过透镜连接到图像平面。从样品反射的光由有限共轭卡塞格伦型物镜(NA=0.65)通过分束器记录到紫外敏感相机上。

Florian Ströhl教授基于细胞等样品在C波段紫外光(UVC)下具有远高于可见光下消光系数这一特点，提出了一种基于强度的非相干计算定量相位显微镜系统(QPM)，该系统可以在UVC波段下完美无色差地工作，最终实现高分辨率、高对比度的无标记定量显微镜。

具体而言，与可见波长和UVA差分干涉对比显微镜或全断层扫描相比，研究人员利用差分相位对比照明(DPC)的方式将图像的对比度提高了7~300倍，在分辨率接近200 nm时，对比度是相同分辨率的明场显微镜的10倍以上。

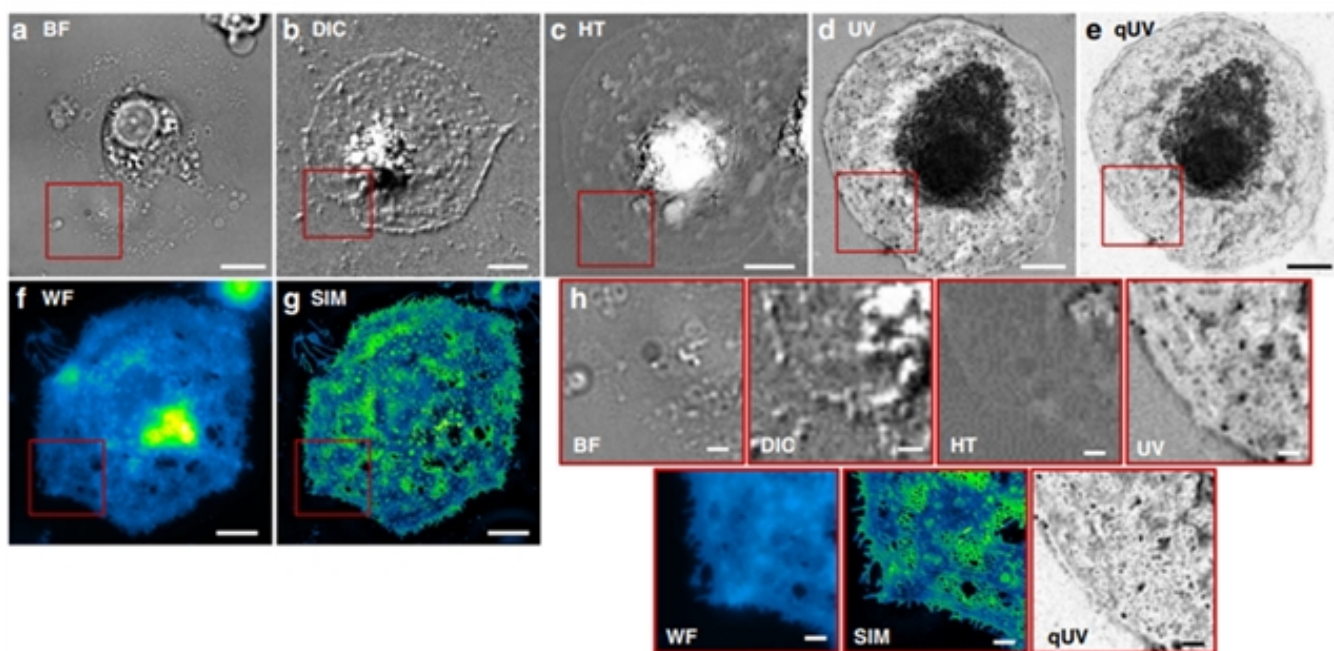


图3. LSEC显微照片。(a–c)使用可见光明场(BF)、差分干涉对比度(DIC)、定量全息层析成像(HT)，使用紫外线显微镜(d, e)对固定LSEC进行无标记成像，显示(d)原始紫外线强度图像或(e)定量紫外线消光。(f, g)使用宽场(WF)和超分辨率结构照明显微镜(SIM)对膜标记的LSEC进行荧光成像。h相似区域的2.5倍放大图。比例尺在(a–g)中为5 μm ，在(i)中为1 μm 。

此外，为了验证所提出的系统的多功能性，研究人员还在形态特化的哺乳动物(大鼠)肝窦内皮细胞(LSEC)上进行了成像实验，定量DPC显微镜的相位检索算法量化了肝窦内皮细胞内的消光系数分布，并在分辨率低至为215 nm的条件下成功观察到了LSEC上的窗孔，证明了消光系数成像的定量特征。在此之前，这些孔从未在无标记的远场光学显微镜中观察到，而是需要电子或荧光超分辨率显微镜来观察。紫外线显微镜能够利用蛋白质和氨基酸的固有荧光作为正交成像模式，从而进行具有自发荧光和差异相位对比度的相关无标记成像。

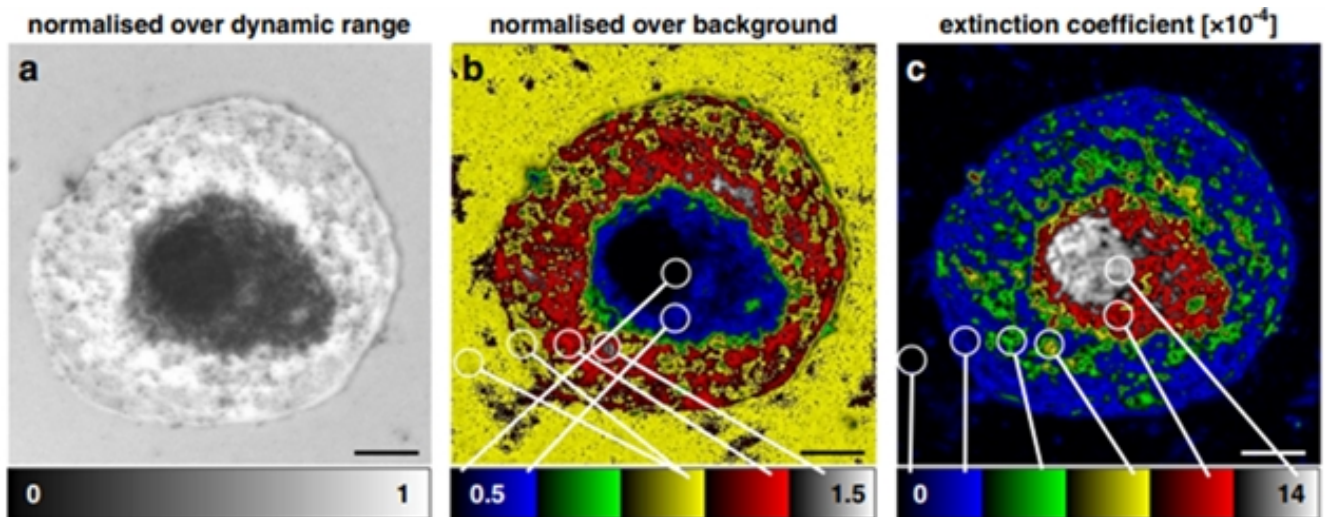


图4. LSEC的消光系数测量。(a)在相机的动态范围上归一化的LSEC原始强度图像。(b)对平坦场校正的强度图像的背景进行归一化。(c)相同LSEC的消光系数图。经过DPC处理后，复相可以获得定量消光系数。样品现在显示出从非吸收背景到强吸收核的线性增加值。(b)和(c)中的白色圆圈区域显示了不同细胞区室(背景、边缘、质膜/筛网、细胞体、细胞核)的斑块，分别说明了这两种模式的定性或定量。比例尺为5 μm 。

相关成果以Label-free superior contrast with c-band ultra-violet extinction microscopy为题发布于Light Science Applications。

相关论文信息：<https://www.nature.com/articles/s41377-023-01105-6>

(来源：LightScienceApplications微信公众号)

特别声明：本文转载仅仅是出于传播信息的需要，并不意味着代表本网站观点或证实其内容的真实性;如其他媒体、网站或个人从本网站转载使用，须保留本网站注明的“来源”，并自负版权等法律责任;作者如果不希望被转载或者联系转载稿费事宜，请与我们联系。

作者：Florian Strohl 来源：《光：科学与应用》

更多 科学进展 请访问 <https://www.iikx.com/news/progress/>

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，[爱科学iikx.com](http://www.iikx.com)转发