

技术与方法

基于LSM 900的快速超分辨成像参数优化策略

尹伟* 刘双双 赵倩冰

(浙江大学医学院公共技术平台, 杭州 310058)

摘要 针对蔡司快速超高分辨激光共聚焦显微镜(LSM 900 with Airyscan2)的成像性能优化问题, 该研究系统探究了激光功率、探测器增益、像素驻留时间、平均采样次数及Airyscan成像模式选择等关键参数对分辨率、信噪比(SNR)及成像速度的协同影响。通过设计多组对比实验, 量化了不同参数组合下的成像性能指标, 提出了一套兼顾高分辨率、高信噪比与快速成像的优化策略。结果显示, 在Airyscan SR模式下, 通过平衡激光功率(0.1%~50%)、探测器增益(550~850 V)及像素驻留时间(0.5~4.0 μ s)、平均采样次数(0~8次), 可实现xy方向分辨率 ≤ 120 nm。该研究为超分辨成像参数优化提供了可操作的参数优化框架, 对生物学超分辨成像研究具有重要参考价值。

关键词 LSM 900; 超分辨成像; 参数优化; 分辨率; 信噪比

Optimization Strategy for Fast Super-Resolution Imaging Parameters
Based on LSM 900

YIN Wei*, LIU Shuangshuang, ZHAO Qianbing

(Core Facilities, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

Abstract To optimize the imaging performance of the ZEISS fast super-resolution laser scanning confocal microscope (LSM 900 with Airyscan2), this study systematically investigated the synergistic effects of key parameters—including laser power, detector gain, pixel dwell time, average sampling times, and Airyscan imaging mode selection—on resolution, SNR (signal-to-noise ratio), and imaging speed. Through comparative experiments, imaging performance metrics under different parameter combinations were quantified, and an optimization strategy balancing high resolution, high SNR, and rapid imaging was proposed. Results demonstrate that in Airyscan SR mode, by balancing laser power (0.1%–50%), detector gain (550–850 V), pixel dwell time (0.5–4.0 μ s), and number of averages (0–8), an xy-plane resolution ≤ 120 nm can be achieved. This study provides an actionable parameter optimization framework for super-resolution imaging, and offers critical insights for biomedical super-resolution imaging research.

Keywords LSM 900; super-resolution imaging; parameter optimization; resolution; signal-to-noise ratio

收稿日期: 2025-03-05

接受日期: 2025-04-30

浙江大学实验技术项目(批准号: SYBJS202321)和浙江省教育厅一般科研项目(批准号: Y202351321)资助的课题

*通信作者。Tel: 0571-88206270, E-mail: yinwei5651@zju.edu.cn

Received: March 5, 2025

Accepted: April 30, 2025

This work was supported by the Zhejiang University Experimental Technology Project (Grant No. SYBJS202321) and the Routine Research Project of Zhejiang Provincial Department of Education (Grant No. Y202351321)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88206270, E-mail: yinwei5651@zju.edu.cn

超分辨显微技术通过突破光学衍射极限,已成为荧光成像领域的重要工具,广泛应用于细胞亚结构解析、分子定位及动态观察等研究中^[1-2]。近年来,Airyscan技术在多色标记样本成像^[3]、活细胞成像^[4]、亚细胞定位成像^[5]等方面取得了显著进展。蔡司快速超高分辨激光共聚焦显微镜(LSM 900 with Airyscan2)作为一款先进的快速超分辨显微镜,凭借其高分辨率、高通量、非侵入、低毒性等突出特性,受到众多研究人员的青睐。其搭载了Airyscan2超高分辨率模块,与普通共聚焦显微镜相比,在分辨率上有显著提高,xy方向的分辨率不超过120 nm,z方向分辨率不超过350 nm。使用Airyscan joint DCV模式时,分辨率能进一步提升至 $xy \leq 90$ nm, $z \leq 270$ nm。除此之外,其成像速度在快速高分辨率成像模式下能达到18.9 幅/s(512像素 $\times$ 512像素,16位)^[6]。

Airyscan技术是一种基于阵列探测和信号重建的超分辨成像技术^[7]。它把完整艾里斑成像于蜂窝状排列的六角形探测器阵列上,达成了分辨率与光效率的平衡。Airyscan检测器依靠32个高灵敏度的GaAsp阵列检测器,单个检测器为0.2 AU且能够独立成像,整个检测器相当于可收集1.2 AU信号,在获取高频信息时能采集更多信号,随后把所有探测器元件的信号重新安排到正确位置,进而生成一幅具备高信噪比和高分辨率的图像。将分辨率提升2倍的同时,使信噪比提升了4~8倍,大幅度提升了成像清晰度^[8-9]。Airyscan Multiplex模式也支持快速超分辨率成像,利用不同的检测单元并列采集信号,高分辨率成像的同时满足高速度和高信噪比,极大提升了实验效率,极其适合活细胞超分辨率快速成像。

在实际成像过程中,分辨率、信噪比(signal-to-noise ratio, SNR)和成像速度之间存在复杂的权衡关系,高分辨率的实现往往需要高激光功率和较长的像素驻留时间,这不仅容易引发光毒性,还会导致成像速度下降;而快速扫描虽然能够提升效率,却可能牺牲信噪比。在减少光漂白和光毒性方面,已有诸多研究成果。研究人员深入分析不同成像参数对荧光成像中光漂白和光毒性的影响,为优化线粒体等成像参数提供依据^[10-12]。已有研究针对共聚焦显微镜和光片显微镜下的透明组织和较厚样本进行3D成像研究,给出适用于这类特殊样本在不同显微镜下的成像参数优化建议^[13]。尽管上述研究从不同角度对成像参数优化进行了探索,但目前

大多数研究仅聚焦于单一参数的优化,缺乏对这些参数进行系统性平衡的有效策略。本文基于LSM 900快速超分辨显微镜,通过多参数对比实验,旨在提出适用于不同样本类型的优化方案,为超分辨成像的精准化与高效化提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂 人肝癌活细胞Hep3B和绿色荧光斑马鱼样品分别由浙江大学医学院古莹研究员、韩佩东研究员课题组提供。Cos7细胞株及所用固定细胞标准片购自宁波纳微成像生物科技有限公司。

DMEM培养基(Dulbecco's modified eagle medium)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、5%正常山羊血清(normal goat serum, NGS)购自美国Gibco公司。磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、4%多聚甲醛溶液(4% paraformaldehyde solution, PFA)、Triton X-100、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自杭州柏迈行科技有限公司。荧光淬灭封片剂、抗 α -微管蛋白抗体、Alexa 647荧光标记的二抗、兔线粒体外膜蛋白TOM20一抗、兔二抗、Hoechst 33258等购自宁波纳微成像生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器 蔡司快速超高分辨激光共聚焦显微镜(LSM 900 with Airyscan2)购自德国Carl Zeiss公司。

1.2 方法

1.2.1 LSM 900样品制备染料的选择 LSM 900快速超高分辨激光共聚焦显微镜配备4个经典激光器,在开展多重标记实验时,为有效规避染料间的串色现象,应采用不同种属来源的抗体实施染色操作,优先挑选稳定性佳、抗淬灭能力强的染料。具体的染料选择可参考表1。

1.2.2 对快速超分辨显微镜观察样品的要求 LSM 900快速超高分辨激光共聚焦显微镜具备一大显著优势,相对于STORM和STED超分辨显微镜而言,其对样品制备的要求相对宽松,适用于共聚焦观察的各类样本。在盖玻片的选用上,通常要求其厚度为0.17 mm,从优化成像效果的角度出发,优先推荐使用共聚焦专用盖玻片。在封片环节,为有效防止荧光淬灭,保证成像质量,建议采用抗荧光淬灭的固体封片剂^[14]。

对于活细胞、较厚的组织切片,或者形状不规则的组织块,为更好地满足观察条件,可使用共聚

表1 染料选择表
Table 1 Dye selection table

激光波长 Laser wavelength	适用染料/蛋白 Compatible dyes/proteins
405 nm	DAPI, Hoechst, Alexa-405 etc.
488 nm	GFP, FITC, Alexa-488 etc.
561 nm	RFP, Rhodamine, Alexa-546, Cy3 etc.
640 nm	Alexa-647, Cy5 etc.

焦专用培养皿进行观察。此外,该显微镜的观察对象丰富多样,涵盖了细胞悬液、微生物、生物大分子、细胞器、类器官、纳米材料等。由于这些样品的特性各不相同,需依据各自的特点进行针对性处理,或者选用工作距离更长的多介质物镜成像,以满足显微镜成像观察的条件,从而获取高质量的观察结果。

1.2.3 细胞样品制备 在细胞培养至适当密度后,使用4% PFA溶液室温固定细胞,固定时间为15 min。固定后,用PBS洗涤细胞3次,每次5 min。随后,使用含0.1% Triton X-100的PBS对细胞进行透化处理10 min。为减少非特异性结合,使用含有5% NGS的PBS溶液对细胞进行阻断处理,室温孵育时间为30 min。阻断处理可以有效减少背景荧光,提高成像质量。细胞经过阻断处理后,分别使用以下荧光标记物进行染色。微管(microtubule): 使用小鼠 α -微管蛋白一抗(NW-tubulin-M, 1:200稀释)和鼠二抗(NWSM561, 1:100稀释)进行免疫染色,561 nm激光激发,一抗、二抗室温孵育时间均为60 min。线粒体(mitochondria): 使用兔线粒体外膜蛋白TOM20一抗(NW-TOM20-R, 1:200稀释)和兔二抗(NWSR488, 1:200稀释)进行免疫染色,488 nm激光激发,一抗、二抗孵育时间均为60 min。F-actin(细胞骨架): 直接使用Alexa Fluor 647结合的鬼笔环肽标记F-actin(NW-Actin 647, 1:100稀释),647 nm激光激发,室温孵育时间为60 min。细胞核(nucleus): 使用Hoechst 33258(紫外光激发)标记细胞核,405 nm激光激发,室温孵育时间为10 min。在染色过程中,每一步染色后均用PBS洗涤细胞3次,每次5 min,以去除未结合的荧光标记物。染色完成后,使用抗荧光淬灭封片剂(如普洛朗™黄金抗淬灭封片剂)对样本进行封片处理。封片后,样本在黑暗中室温下干燥过夜,4 °C避光保存,直至成像。

1.2.4 扫描分辨率、信噪比、成像速度的平衡 在使用LSM 900快速超高分辨激光共聚焦显微镜时,

通过合理设置参数来平衡扫描分辨率、信噪比、成像速度,以及在亮度、光损伤和成像信噪比之间找到平衡,对于提升成像质量至关重要。

扫描分辨率: 光学分辨率决定了能够分辨的最小细节,扫描分辨率的提升通常需要更小的针孔直径和更慢的扫描速度。然而,这会降低光信号的强度,从而影响信噪比。使用LSM 900的Airyscan2技术,可以通过多视图联合反卷积(joint deconvolution, jDCV)进一步提高分辨率^[15],但需要更多的计算资源和时间。在对亚细胞结构进行高分辨率成像时,若将扫描分辨率设置过高,扫描时间延长,细胞的生理活动可能会影响成像效果,且噪声会随着曝光时间增加而增多。因此,需要根据样品特性和研究目的,在扫描分辨率、信噪比、成像速度三者之间找到平衡。如对于快速动态过程的观察,需要更注重成像速度,适当降低对扫描分辨率的要求。

信噪比: 提升信噪比可以通过增加激光功率、降低检测器电压、减慢扫描速度或增加平均采样次数来实现。例如,适当增加激光强度并降低检测器电压值可以在保证亮度的同时提升信噪比。

成像速度: 成像速度的提升可以通过增加扫描速度和减少平均采样次数来实现,但这通常会降低信噪比。使用LSM 900 with Airyscan2的Multiplex模式可以在不降低分辨率的情况下提高成像速度。Multiplex模式可以根据实验需要选择SR-2Y、SR-4Y、CO-2Y等不同模式。

1.2.5 激光功率和检测器增益参数优化 提高成像信噪比可通过优化多个参数实现,如激光功率、检测器增益等。

激光功率(laser power): 适当增加激光功率可以提高信号强度,但激光功率过高则会引入更多背景噪声和光漂白,一般建议在可接受的光漂白范围内选择合适功率。

检测器增益(master gain): 适当增加检测器增益

可以提高信号强度,但过高的增益会引入噪声。为进行充分说明,我们进行了相关实验和参数设置,并对不同样本类型(活体斑马鱼、固定样本等)提出优化建议。

实验设计: 实验1旨在研究增益对图像质量的影响,特别是在不同增益值下SNR的变化。通过调整增益值来观察图像的清晰度、噪声水平以及信号强度的变化。利用LSM 900快速超高分辨激光共聚焦显微镜,对活体斑马鱼脊部组织及固定细胞爬片的放大细节进行了图像采集。每张图采用了不同的检测器增益设置(A: 550 V; B: 600 V; C: 600 V; D: 700 V),对图像中的特定区域进行放大,观察细节变化。并通过profile曲线计算SNR(图1和图2)。

实验设计: 实验2旨在研究激光强度、增益和长时间成像对活体斑马鱼脊部成像质量的影响。实验设置为时间序列采集,采集张数均为200。通过调整激光强度(45%、20%、4%)、增益(540 V、550 V、650 V)和时间序列(取第1、50、100、150、200张共5个时间点)来观察图像的信号强度、噪声水平、漂白程度和稳定性(图3)。

1.2.6 像素驻留时间参数优化 像素驻留时间(pixel time)代表每个像素点的曝光时间,决定成像速度。减慢扫描速度或者延长像素驻留时间可以增加信号的采集时间,从而提高信噪比。为进行充分验证,实验展示了在相同激光功率和增益条件下,不同像素驻留时间对荧光显微镜成像信噪比和成像速度的影响。

实验设计: 实验3旨在研究像素驻留时间对人肝癌活细胞和固定细胞样品成像质量的影响,特别是在不同像素驻留时间下SNR的变化。通过调整像素时间(0.5 μ s、1 μ s、2 μ s、4 μ s)来观察图像的清晰度、噪声水平以及信号强度的变化。对图像中的特定区域进行放大,观察细节变化。通过profile曲线计算SNR。

1.2.7 平均采样次数参数优化 平均采样次数(average)是对同一区域进行多次成像并取平均采样次数,用于提高信噪比。增加平均采样次数可以减少随机噪声的影响,但会延长成像时间。实验展示了在相同激光功率、增益和像素时间条件下,通过增加平均采样次数来提升荧光显微镜成像信噪比的效果。

实验设计: 实验4旨在研究平均采样次数(aver-

age)对活细胞和固定样本成像质量的影响,特别是在不同平均采样次数下信噪比(SNR)的变化。保持激光功率、增益和像素驻留时间相同,实验通过调整平均采样次数(none、2、4、8)来观察图像的清晰度、噪声水平以及信号强度的变化,通过信噪比和图像局部放大图评估。

1.2.8 亮度: 光损伤和成像信噪比的平衡 亮度主要受激光功率和探测器增益影响^[16]。提高亮度能获得更清晰图像,但过高的激光功率会对样品产生光损伤,尤其是对活细胞成像时,光损伤可能改变细胞的生理状态,影响实验结果。因此,要在保证成像信噪比满足需求的前提下,尽可能降低激光功率,以减少光损伤。可通过预实验来确定最佳的亮度设置,找到光损伤和成像信噪比之间的平衡点。

1.2.9 成像模式选择 选择不同的成像模式,对于成像质量至关重要。本实验对比了LSM 900快速超高分辨激光共聚焦显微镜的三种成像模式(普通激光共聚焦、Airyscan SR、Airyscan jDCV)的成像性能,评估了超分辨技术对微管、线粒体和F-actin等的成像效果差异。

实验设计: 实验5旨在比较不同成像模式对样本的成像效果。成像模式对比: 基于LSM 900,分别采用普通激光共聚焦(confocal)、Airyscan SR和Airyscan jDCV三种模式进行成像。实验测量不同模式下的信噪比(SNR),观察细胞结构的细节和清晰度,并评估每种模式的成像表现。

实验设计: 实验6旨在验证LSM 900显微镜在Airyscan SR模式和Airyscan jDCV模式下的分辨率。通过测量固定细胞的xy方向及z方向分辨率来评估显微镜的成像能力。普通共聚焦是点扫描模式,受衍射极限限制,分辨率约为200 nm。Airyscan SR多像素阵列检测,通过算法提升分辨率至120 nm。Airyscan jDCV: 结合反卷积与信号分离,进一步提升信噪比和分辨率至90 nm。

物镜: 使用同一颗高数值孔径,适合高分辨率成像的Plan-Apochromat 63 $\times$ /1.40 Oil DIC M27物镜进行拍摄,在confocal模式下,帧尺寸设置为1 596像素 $\times$ 1 596像素;在超分辨SR成像和jDCV模式下,帧尺寸设置为1 536像素 $\times$ 1 536像素;其余拍摄所用激光功率和探测器增益等成像参数相同(增益为740 V, 568 nm和488 nm激光器功率为0.7%, 405 nm激光器功率为5%, 像素驻留时间设置为0.66 μ s)。

2 结果

2.1 检测器增益参数对比实验结果

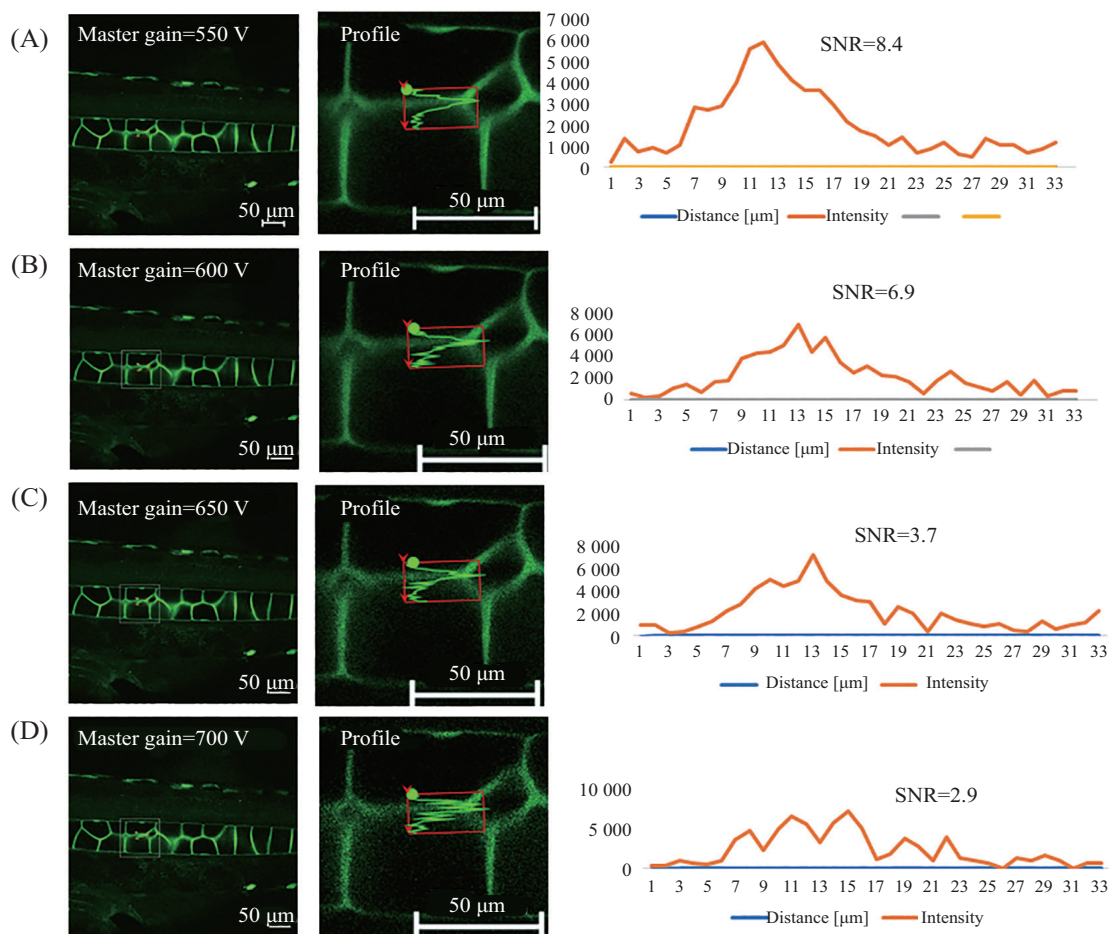
实验1中,图1显示了斑马鱼活体样本在不同检测器增益参数设置下的图像质量变化。实验结果显示,随着增益的增加,信噪比逐渐下降,图像质量也随之降低。这表明增益的增加会引入更多的噪声,从而影响图像的清晰度和细节表现。SNR在增益为550 V时达到最高值,随着增益的增加,SNR逐渐下降。在增益为700 V时,SNR降至最低,说明增益与信噪比之间存在负相关关系。

图2显示了固定细胞爬片样本在不同检测器增益参数设置下的图像质量变化,趋势同图1。信噪比(SNR)在增益为550 V时达到最高值,随着增益的增加,SNR逐渐下降。在增益为700 V时,SNR降至最低。

本实验为优化图像采集参数提供了重要参考。在实际应用中,选择适当的增益值可以平衡图像清晰度和噪声水平。例如,在需要高清晰度的场景中,建议选择较低的增益值,而在需要提高信号强度的场景中,可以适当增加增益,但需注意噪声的增加。

2.2 激光功率和检测器增益参数优化方案

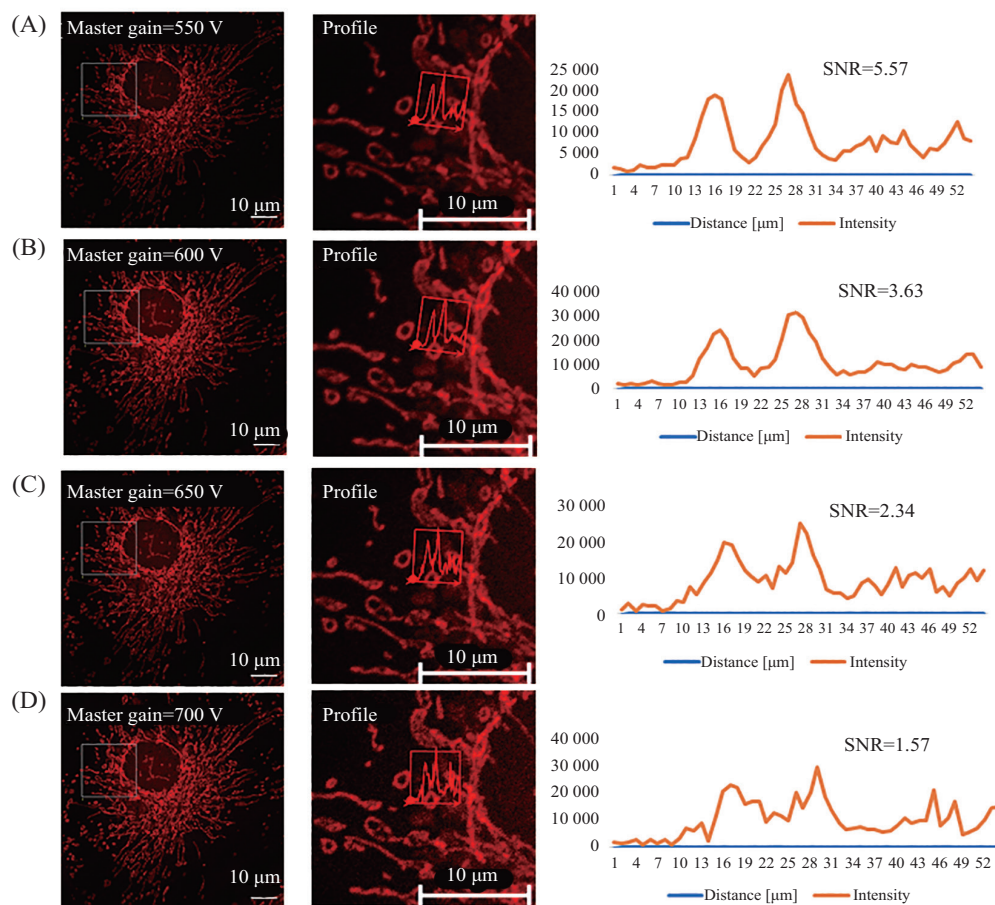
实验2结果如图3显示,激光强度、增益和时间序列观察点对信号强度和图像质量有显著影响。高激光强度和高增益通常能提供更高的初始信号强度,但也可能导致光毒性增加。低激光强度和低增益可能导致信号强度不足,但可以减少光毒性。当激光强度较高时,信号强度随时间推移逐渐下降,这表明光漂白效应较为显著;而当激光强度较低时,信号稳定性相对较好,光漂白现象也随之减少。采用高激光功率与低检测器电压,可提高信号强度并减



A~D: 左侧图分别代表不同的检测器增益值, 分别为550 V (A)、600 V (B)、650 V (C)、700 V (D); 中间图代表荧光强度峰值; 右侧图代表信噪比(SNR)。A~D: left panels respectively represent detector gain values of 550 V (A), 600 V (B), 650 V (C), 700 V (D); center panels represent fluorescence intensity profiles; right panels represent SNR (signal-to-noise ratio).

图1 活体样本检测器增益参数优化

Fig.1 Optimization of gain parameters for live samples



A~D: 左侧图分别代表不同的检测器增益值, 分别为550 V (A)、600 V (B)、650 V (C)、700 V (D); 中间图代表荧光强度峰值; 右侧图代表信噪比(SNR)。A-D: left panels respectively represent detector gain values of 550 V (A), 600 V (B), 650 V (C), 700 V (D); center panels represent fluorescence intensity profiles; right panels represent SNR (signal-to-noise ratio).

图2 固定样本检测器增益参数优化

Fig.2 Optimization of detector gain parameters for fixed samples

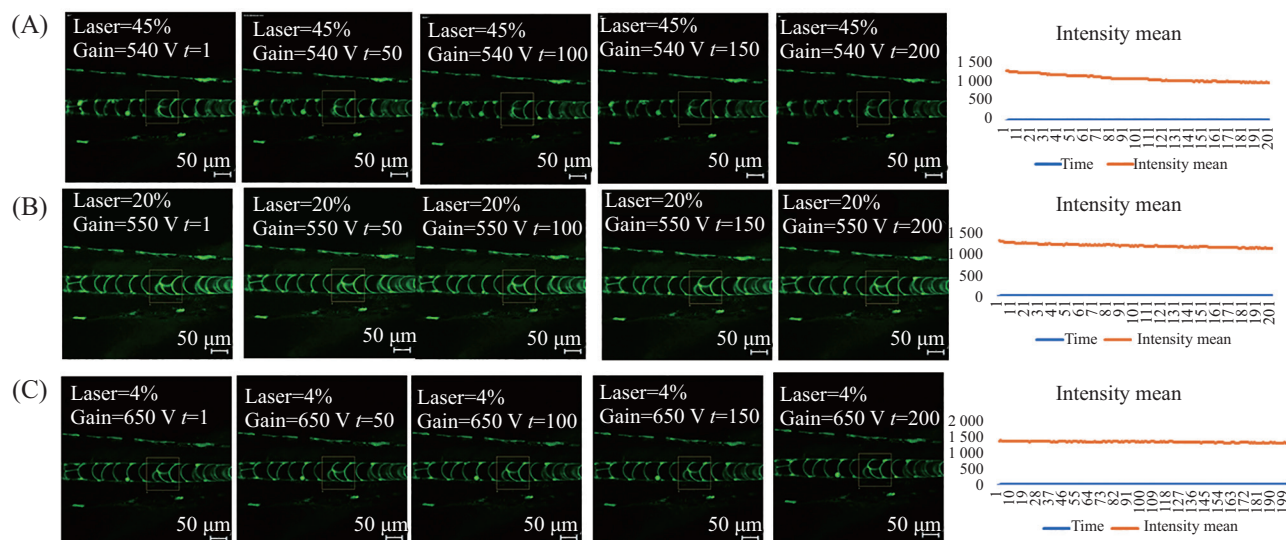
少噪声。采用低激光功率与高检测器电压, 能减少光漂白对样本的损伤。高激光功率结合低增益可显著提升信噪比, 但可能加速光漂白。低激光功率结合高增益能有效减少光漂白, 但需权衡信号强度可能降低的风险。

参数优化建议: 对于信号较弱的样本(如固定细胞), 可适当提高激光功率以增强信号。在实际拍摄过程中, 我们还要考虑不同类型样本在成像时对激光功率和检测器电压值的需求: 固定样品等通常需要更高的信噪比, 可以使用高激光功率和低检测器电压值。肿瘤细胞、常规细胞系等需要平衡信噪比和样本保护, 可以使用中等激光功率和中等检测器电压值。类器官、活体成像等需要更低的漂白和光损伤, 应使用低激光功率和高检测器电压值。生殖细胞、T细胞、干细胞等这些活细胞对光损伤非常敏感^[17-19], 因此应使用最低的激光功率和最高的检

测器电压值以保护细胞。

2.3 像素驻留时间参数优化实验结果

在成像信噪比方面, 随着像素时间的增加, 理论上信噪比会提高, 因为每个像素点接收到的光子数增加。实验3结果如图4和图5所示, 无论是活细胞(图4)还是固定样本(图5), 随着像素时间的增加, 信噪比逐渐提高, 图像质量也随之改善。这表明较长的像素时间可以有效减少噪声, 提高图像的清晰度和细节表现。SNR在像素时间为0.5 μ s时最低, 随着像素时间的增加, SNR逐渐提高。在4 μ s时, SNR达到最高值。表明像素时间与信噪比之间存在正相关关系。然而, 过长的像素时间可能导致光漂白或光毒性, 因此需要找到平衡点。在成像速度方面, 像素时间越短, 成像速度越快。因此, 从A到D, 成像速度逐渐减慢, 帧成像时间(frame time)的值分别为: 1.27 s、2.53 s、5.06 s、10.13 s。在图像质量方面, 尽管像素时间增加, 图像信噪比提

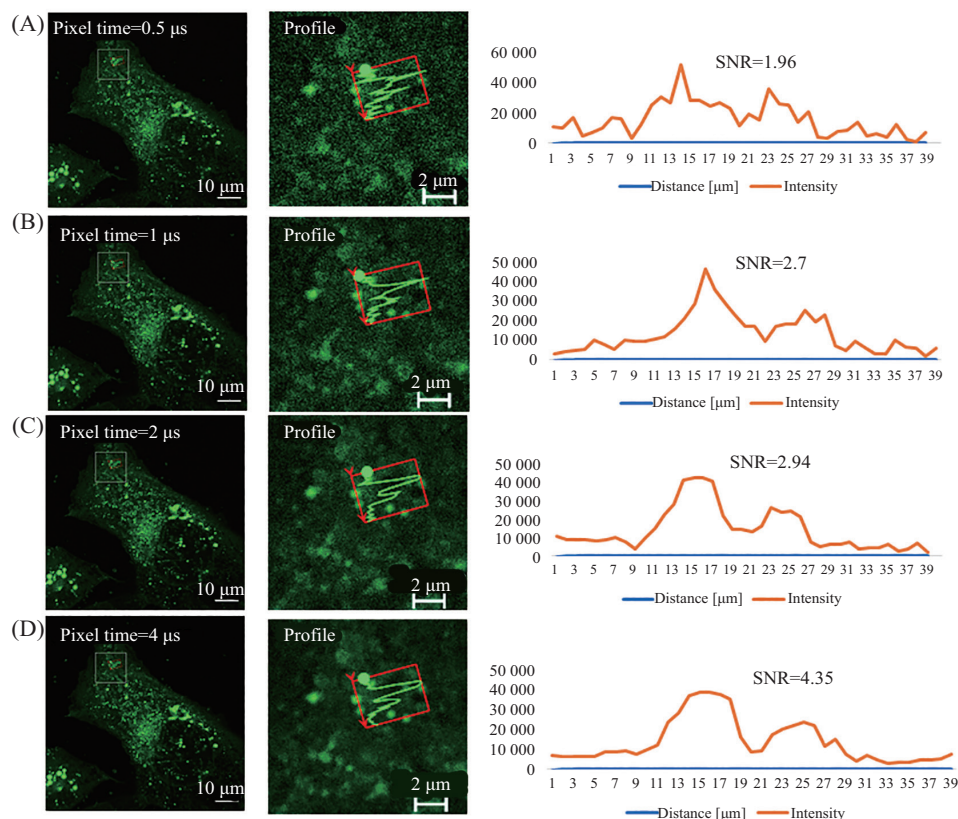


A~C: 左侧图代表不同的激光功率和检测器增益值条件, 分别为Laser=45%, Gain=540 V (A); Laser=20%, Gain=550 V (B); Laser=4%, Gain=650 V (C); 取5个不同时间点的图($t=1, 50, 100, 150, 200$); 右侧图代表平均荧光强度变化。

A~C: left panels respectively represent images under distinct parameter conditions, Laser=45%, Gain=540 V (A); Laser=20%, Gain=550 V (B); Laser=4%, Gain=650 V (C); images acquired at five time points ($t=1, 50, 100, 150, 200$); right panels represent mean fluorescence intensity dynamics.

图3 激光功率和检测器增益参数优化方案

Fig.3 Optimization strategy for laser power and detector gain parameters

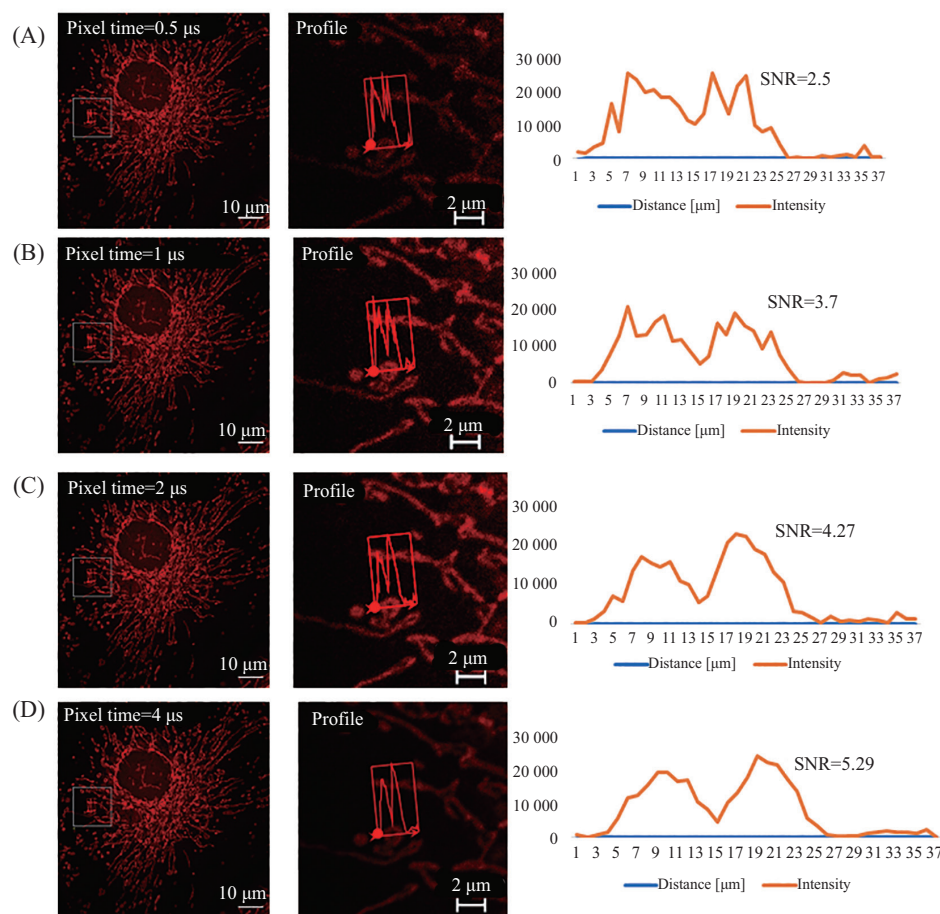


A~D: 左侧图代表不同的像素驻留时间值, 分别为0.5 μ s (A)、1 μ s (B)、2 μ s (C)、4 μ s (D); 中间图代表荧光强度峰值, 右侧图代表信噪比(SNR)。

A~D: left panels represent pixel dwell time settings of 0.5 μ s (A), 1 μ s (B), 2 μ s (C), 4 μ s (D); center panels represent fluorescence intensity profiles; right panels represent SNR (signal-to-noise ratio).

图4 活细胞像素驻留时间参数优化

Fig.4 Optimization of pixel time parameters for live cells



A~D: 左侧图代表不同的像素驻留时间值, 分别为0.5 μs (A)、1 μs (B)、2 μs (C)、4 μs (D); 中间图代表荧光强度峰值, 右侧图代表信噪比(SNR)。

A~D: left panels represent pixel dwell time settings of 0.5 μs (A), 1 μs (B), 2 μs (C), 4 μs (D); center panels represent fluorescence intensity profiles; right panels represent SNR (signal-to-noise ratio).

图5 固定样本像素驻留时间参数优化

Fig.5 Optimization of pixel time parameters for fixed samples

高, 但过长的像素时间可能对活细胞造成损伤。因此, 需要在信噪比和成像速度之间找到最佳平衡点。

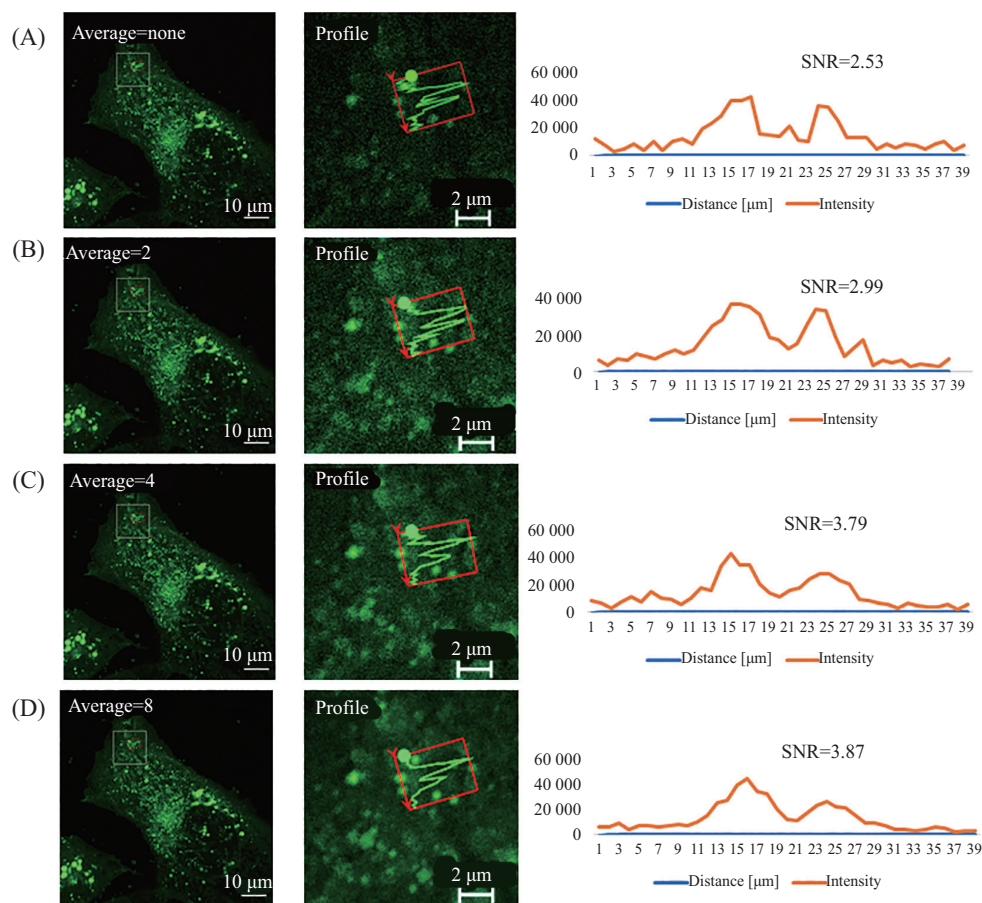
像素驻留时间参数优化建议: 通过合理设置像素时间, 可以在提高成像信噪比的同时, 控制成像速度。这对于需要高质量图像但又不能牺牲成像速度的实验(如活细胞成像)尤为重要。此外, 这种参数调整策略有助于减少光损伤、保护样本, 特别是对光敏感的生物样本成像。活细胞快速成像需要更短的像素时间以实现更快的成像速度, 但信噪比可能较低。大视野拼图实验适合中间值, 需要平衡像素时间和信噪比, 以实现高质量的图像拼接。 z 轴三维层切成像需要较高的信噪比以实现清晰的层析成像, 像素时间较长。常规二维成像需要较高的信噪比, 因此像素时间较长。

2.4 平均采样次数参数优化实验结果

实验4结果展示了不同平均采样次数下的图像

质量变化, 如图6和图7所示。在成像信噪比方面, 随着平均采样次数的增加, 信噪比显著提高。无论是活细胞(图6)还是固定样本(图7), 变化趋势一致。在平均采样次数为none时SNR最低, 在平均采样次数为8时, SNR达到最高值。这是因为多次成像并取平均值可以减少随机噪声的影响, 从而提高图像质量。这表明平均采样次数与信噪比之间存在正相关关系, 但过高的平均采样次数可能导致成像速度变慢。随着平均采样次数的增加, 成像速度降低, 由A到D, frame time的值分别为: 1.27 s、2.53 s、5.06 s、10.13 s。因为需要对同一区域进行多次成像, 增加了总的成像时间。在图像质量方面, 从A到D, 图像的清晰度和对比度逐渐提高, 显示出更好的细节和更少的噪声。

参数优化建议: 通过增加平均采样次数可以有效提高成像的信噪比, 但代价是降低成像速度。



A~D: 左侧图代表不同的平均采样次数值, 分别为none (A)、2 (B)、4 (C)、8 (D); 中间图代表荧光强度峰值; 右侧图代表信噪比(SNR)。

A-D: left panels represent average counts settings of none (A), 2 (B), 4 (C), 8 (D); center panels represent fluorescence intensity profiles; right panels represent SNR (signal-to-noise ratio).

图6 活细胞平均次数参数优化

Fig.6 Optimization of average number of samples parameters for live cells

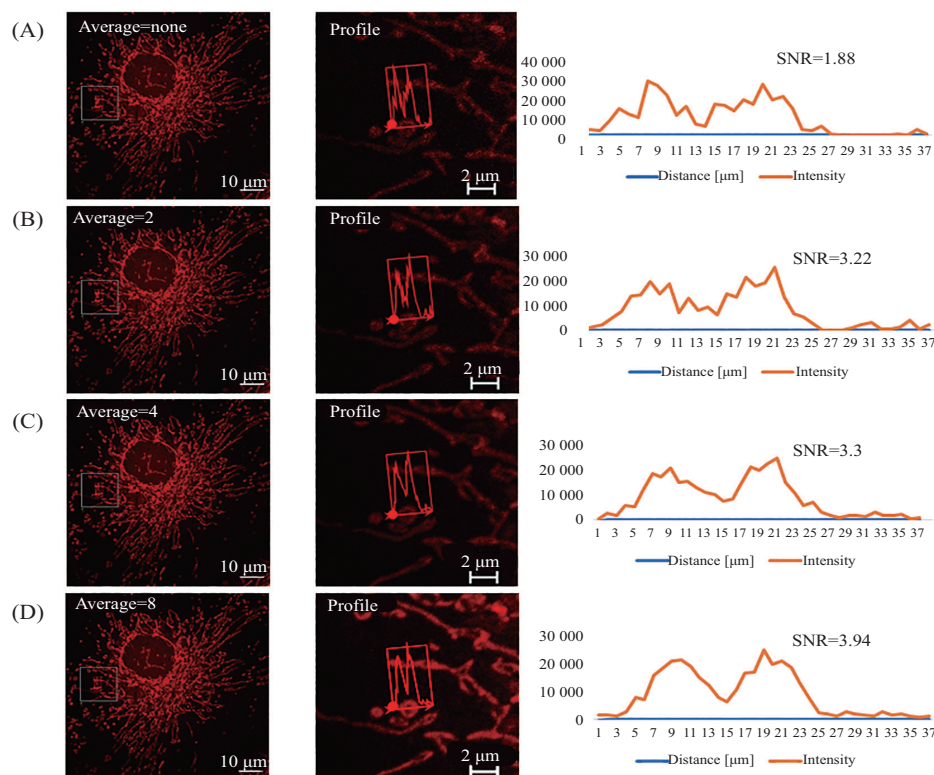
这种参数调整策略适用于对图像质量要求较高但对成像速度要求不高的应用场景, 如常规二维成像和 z 轴三维层切成像。对于活细胞快速成像, 需要较短的像素时间, 不做平均或做两次平均, 以实现快速成像。对于拼图实验, 需要平衡像素时间和平均采样次数, 以实现高质量的图像拼接。对于 z 轴三维层切成像, 需要较高的信噪比, 因此可能需要较长的像素时间和较高的平均采样次数。对于常规二维成像, 需要较高的信噪比, 因此可能需要较长的像素时间和较高的平均次数。

2.5 不同成像模式比较实验结果

实验5结果展示了不同成像模式下的图像质量(图8)。在分辨率方面, 普通共聚焦: 微管呈现模糊边缘, 线粒体结构较粗糙。Airyscan SR: 微管分支清晰可见, 线粒体内部嵴结构部分可辨。Airyscan jDCV: 微管单丝分离明显, 线粒体膜结构分辨率最高。

在信噪比(SNR)方面, 普通共聚焦信噪比最低, 图像细节较为模糊, 背景噪声较高, 弱信号(如微管末端)易被淹没。Airyscan SR: 信噪比提升, 图像清晰度和细节表现优于共聚焦, 弱信号(线粒体边缘)清晰。Airyscan jDCV模式: 信噪比最高, 图像清晰度和细节表现最佳, 信号分离进一步优化, 背景几乎无噪声, 弱信号保留完整。

实验6结果如图9显示, Airyscan jDCV模式在 xy 方向和 z 方向上均提供了更高的分辨率, 相较于SR模式, 其 xy 方向分辨率提升了约30 nm。这表明jDCV模式在超分辨率成像中具有显著优势。在Airyscan SR模式下, 通过平衡激光功率(0.1%~50.0%)、探测器增益(550~850 V)及像素驻留时间(0.5~4 μ s), 可实现 xy 方向分辨率 ≤ 120 nm, Airyscan jDCV模式下, 分辨率可达90 nm。超分辨模式(SR和jDCV)显著提升分辨率(约1.7倍于普通共聚焦)和信噪比, 尤其在亚

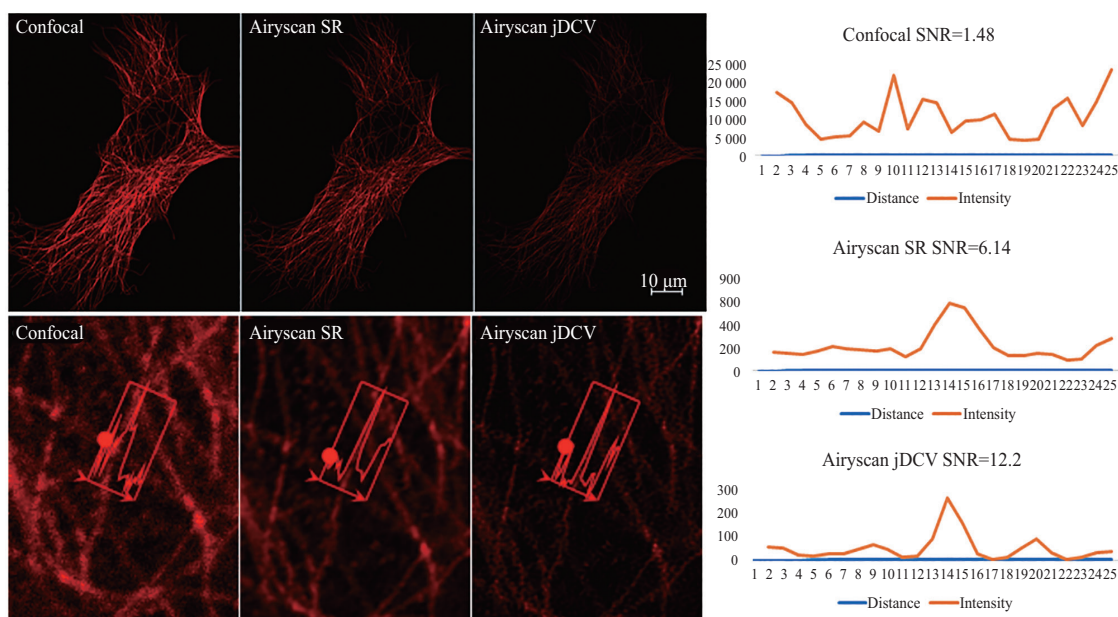


A~D: 左侧图代表不同的平均采样次数值, 分别为none (A)、2 (B)、4 (C)、8 (D); 中间图代表荧光强度峰值; 右侧图代表信噪比(SNR)。

A-D: left panels represent average counts settings of none (A), 2 (B), 4 (C), 8 (D); center panels represent fluorescence intensity profiles; right panels represent SNR (signal-to-noise ratio).

图7 固定样本平均采样次数参数优化

Fig.7 Optimization of average counts parameters for fixed samples



左侧图: 分别用confocal、SR和jDCV三种模式成像, 并计算荧光强度峰值; 右侧图: 信噪比(SNR)。

Left panel: imaging performed in confocal, SR, and jDCV modes, respectively, with calculation of the peak fluorescence intensity; right panel: the SNR (signal-to-noise ratio).

图8 不同成像模式比较

Fig.8 Comparison of different imaging modes

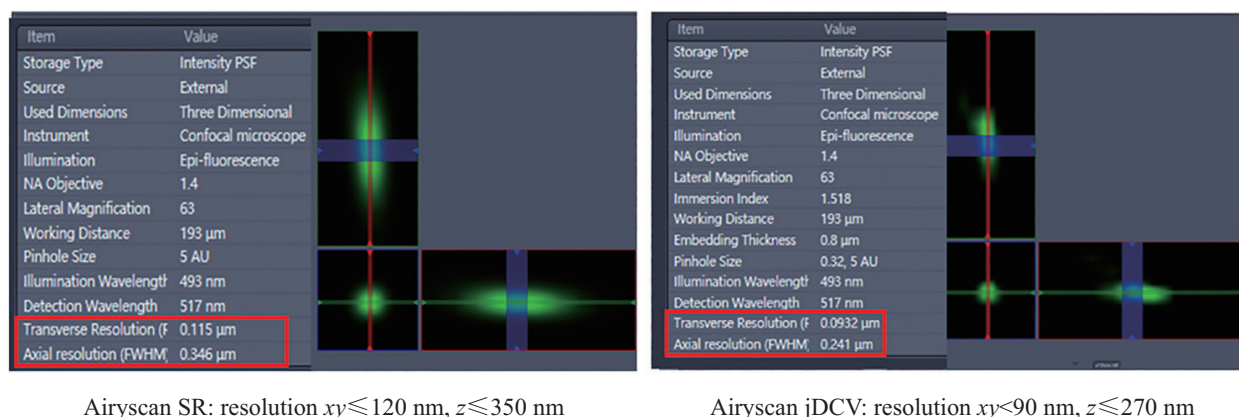


图9 Airyscan的SR及jDCV两种模式分辨率比较

Fig.9 Comparison of resolution between Airyscan SR and Airyscan jDCV modes

细胞结构(微管、线粒体嵴)成像中优势明显。jDCV模式通过反卷积和信号分离,进一步优化了信噪比和结构分离度,适用于复杂样本,如密集的F-actin网络等。

3 讨论

本研究系统探究了激光功率、探测器增益、扫描速度、像素驻留时间等重要成像参数的平衡策略,及共聚焦、Airyscan成像、jDCV等不同模式选择对分辨率和信噪比的影响,并得出结论:同样亮度的情况下, gain值越低信噪比越高。像素驻留时间越长,成像信噪比越高。高激光功率结合低增益可显著提升信噪比,平均采样次数和像素驻留时间与信噪比之间存在正相关关系。Airyscan SR成像及jDCV模式在超分辨成像中具有显著优势,信噪比较传统共聚焦提升4~8倍,分辨率提升1.7倍以上。实际应用时,需根据样品类型,合理设置参数以平衡扫描分辨率、信噪比、成像速度。LSM 900通过集成多通道荧光、三维成像、动态追踪等功能,成为生物医学研究的核心工具。其在活细胞成像、分子动力学研究、病理分析等领域的应用,显著推动了细胞生物学、神经科学及癌症研究的进展。LSM 900的Airyscan技术通过硬件与算法协同优化,显著提升了超分辨成像的实用性与效率。

本研究提出的参数框架为不同样本类型(如固定细胞、活细胞、斑马鱼等)提供了定制化方案,尤其适用于光敏感活细胞的长时间观测。结合反卷积算法, jDCV模式在亚细胞器互作研究中展现出独特优势^[20-21]。Airyscan超分辨技术通过对光学系统的优

化,能够突破传统激光共聚焦成像的分辨率极限,提供更清晰的细胞结构图像,尤其适用于弱信号的采集^[22]。它不仅能够提高图像分辨率和信噪比,还能够实现快速成像,为揭示生命活动的微观机制和本质提供了强大的工具,具有广泛的应用前景。jDCV模式在SR模式的基础上进一步提高了分辨率。在细胞生物学研究中,这种高分辨率成像技术有助于更深入地研究细胞内的分子机制和相互作用,例如细胞骨架的动态变化、线粒体的功能和分布等。在药物研发和疾病诊断方面,高分辨率成像可以帮助检测细胞的病理变化,例如癌细胞的形态和结构异常。

虽然Airyscan超分辨技术能够提高分辨率,但可能会受到样本制备、标记效率和成像时间等因素的影响。Airyscan SR/jDCV对样本固定质量要求更高,若样本轻微漂移或固定不佳,可能引入伪影。jDCV模式需更长的数据处理时间,可能限制实时成像应用。可对jDCV算法进行优化,缩短数据处理时间。未来的研究可以进一步优化成像参数,提高成像速度,并探索与其他技术(如荧光寿命成像)^[23-24]的结合,以获取更全面的细胞信息。

浙江大学医学院公共技术平台的LSM 900实行开放共享,使用率高,从2023年9月引进至今使用机时高达4 349小时;服务医学院、药学院、生命科学研究院、转化医学研究院、化学工程与生物工程学院、附属医院、一带一路国际医学院等校内外百余个课题组,已成为校内外相关领域热门使用超分辨仪器之一^[25]。本研究为超分辨成像参数优化提供了系统性方法论。此外,结合深度学习或自适应光学技术,有望进一步突破现有成像极限。

参考文献 (References)

- [1] HUGHES R, CHEN X, HUNTER K D, et al. Bone marrow osteoprogenitors are depleted whereas osteoblasts are expanded independent of the osteogenic vasculature in response to zoledronic acid [J]. *FASEB J*, 2019, 33(11): 12768-79.
- [2] BARLOW A M, MOSTA O-GUIDOLIN L B, OSEI E T, et al. Super resolution measurement of collagen fibers in biological samples: validation of a commercial solution for multiphoton microscopy [J]. *PLoS One*, 2020, 15(2): 1-15.
- [3] HUFF J. The Airyscan detector from ZEISS: confocal imaging with improved signal-to-noise ratio and super-resolution [J]. *Nat Methods*, 2015, doi: 10.1038/nmeth.f.388.
- [4] KOLOSSOV V L, SIVAGURU M, HUFF J, et al. Airyscan super-resolution microscopy of mitochondrial morphology and dynamics in living tumor cell [J]. *Microsc Res Tech*, 2018(81): 115-28.
- [5] DEROUBAIX A, MOAHLA B, PENNY C. Monitoring of intracellular localization of hepatitis B virus P22 protein using laser scanning confocal microscopy and airyscan [J]. *Microsc Res Tech*, 2020(83): 499-506.
- [6] HARMER J, BELBELAZI A, CARR M, et al. Airyscan super-resolution microscopy to study trypanosomatid cell biology [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2116: 449-61.
- [7] WU X, HAMMER J A. Zeiss airyscan: optimizing usage for fast, gentle, super-resolution imaging [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2304: 111-30.
- [8] HUFF J, BERGTER A, BIRKENBEIL J, et al. The new 2D superresolution mode for ZEISS Airyscan [J]. *Nat Methods*, 2017, doi: 10.1038/nmeth.f.404.
- [9] HUFF J, BERGTER A, LUEBBERS B. Multiplex mode for the lsm 9 series with airyscan 2: fast and gentle confocal super-resolution in large volumes [J]. *Nat Methods*, 2019, 10: 1-4.
- [10] LEE C H, WALLACE D C, BURKE P J. Photobleaching and phototoxicity of mitochondria in live cell fluorescent super-resolution microscopy [J]. *Mitochondrial Commun*, 2024, 2: 38-47.
- [11] ICHA J, WEBER M, WATERS J C, et al. Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it [J]. *Bioessays*, 2017, doi: 10.1002/bies.201700003.
- [12] KIEPAS A, VOORAND E, MUBAID F, et al. Optimizing live-cell fluorescence imaging conditions to minimize phototoxicity [J]. *J Cell Sci*, 2020, 133(4): jcs242834.
- [13] WHITE S L, LAM A T, BUCK H D. 3D imaging for cleared tissues and thicker samples on confocal and light-sheet microscopes [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2593: 143-61.
- [14] ELLIOTT A D. Confocal microscopy: principles and modern practices [J]. *Curr Protoc Cytom*, 2020, 92(1): 68.
- [15] BIRK U J. Super-resolution microscopy. a practical guide [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2018, doi: info:doi/10.1002/anie.201804434.
- [16] STRACK R. Smart rotation for better SPIM [J]. *Nat Methods*, 2020, 17(3): 252.
- [17] HATANO Y, YONEZAWA N, TOKORO M, et al. Chromosome counting at meiosis and mitosis of mouse oocytes and embryos using super-resolution live cell imaging and CRISPR/dCas9-mediated live-FISH [J]. *Methods Mol Biol*, 2025, 2872: 21-35.
- [18] PINKARD H, BAGHDASSARIAN H, MUJAL A, et al. Learned adaptive multiphoton illumination microscopy for large-scale immune response imaging [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1916.
- [19] BIN IMTIAZ M K, JESSBERGER S. Isolation of adult mouse hippocampal neural stem cells for fluorescence loss in photobleaching assays [J]. *STAR Protoc*, 2021, 2(3): 100695.
- [20] SCIPIONI L, LANZANÓ L, DIASPRO A, et al. Comprehensive correlation analysis for super-resolution dynamic fingerprinting of cellular compartments using the zeiss airyscan detector [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 5120.
- [21] HENNIG S, MANSTEIN D J. Improvement of image resolution by combining enhanced confocal microscopy and quantum dot triexciton imaging [J]. *FEBS Open Bio*, 2021, 11(12): 3324-30.
- [22] LU Y, ZHENG Y, COYAUD T, et al. Palmitoylation of NOD1 and NOD2 is required for bacterial sensing [J]. *Science*, 2019, 366(6464): 460-7.
- [23] BOLAND M A, COHEN E A K, FLAXMAN S R, et al. Improving axial resolution in structured illumination microscopy using deep learning [J]. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, 2021, 379(2199): 20200298.
- [24] ZHANG Q, HU Q, BERLAGE C, et al. Adaptive optics for optical microscopy [J]. *Biomed Opt Express*, 2023, 14(4): 1732-56.
- [25] HE J, CAO Y, ZHU Q, et al. Renal macrophages monitor and remove particles from urine to prevent tubule obstruction [J]. *Immunity*, 2024, 57(1): 106-23.