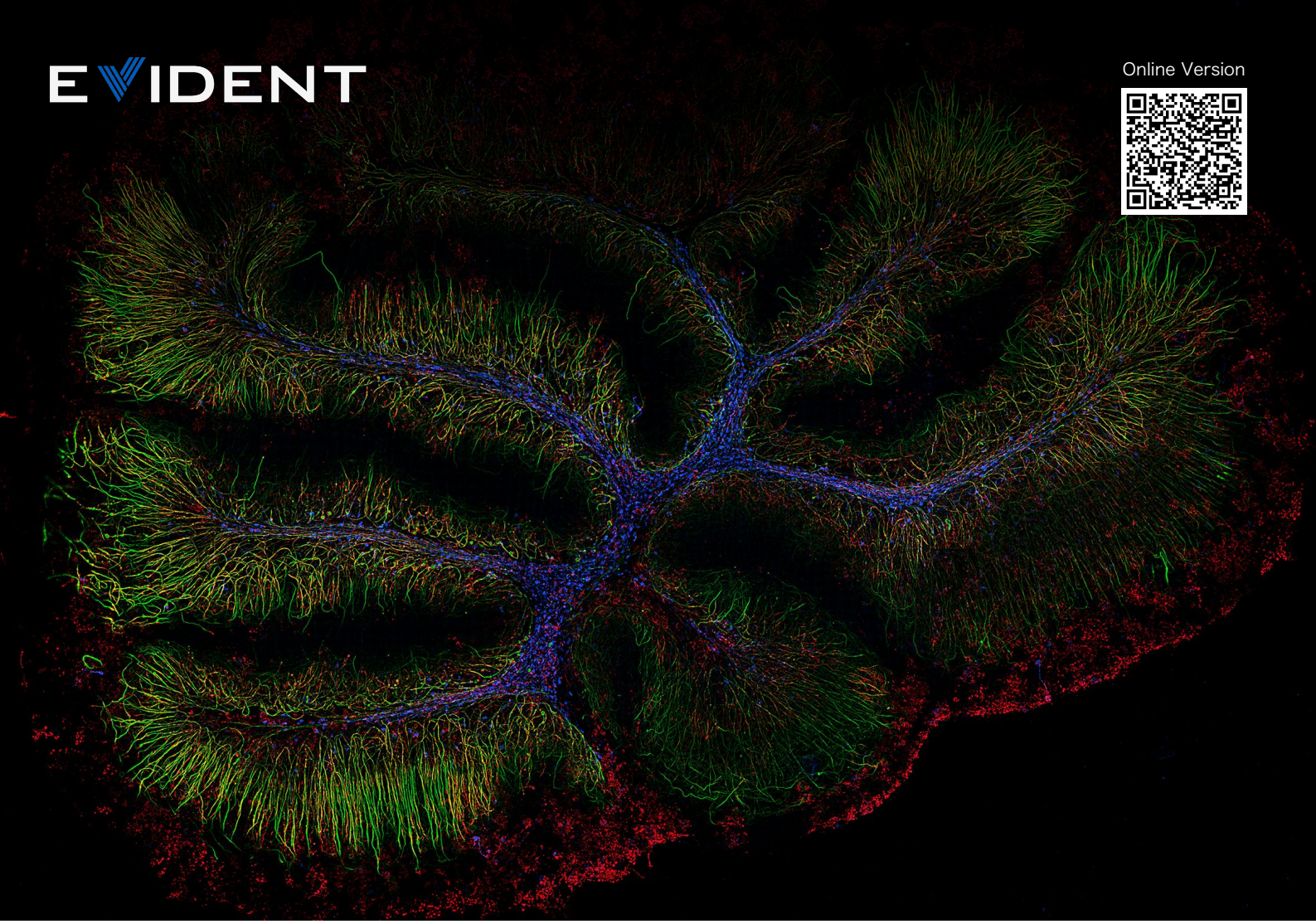
EVIDENT

Online Version



白书

2025年9月26日

用于较厚样品清晰成像的VS-SILA光学切片方法

玻片扫描仪因其结构紧凑、用途广泛而深受研究人员的青睐。 其强大的应用之一是与宽市场（WF）荧光显微镜相结合，检测较薄样本中的荧光。 而对于较厚样本的应用，其有一种强大的成像解决方案，那就是散斑照明采集或VS-SILA。 与我们的SLIDEVIEW VS200研究用玻片扫描系统配套使用后，VS-SILA成像可为数字载玻片图像提供快速光学切片。 这种方法可去除较厚样品中的失焦光线，从而大大提高对比度。

宽视场荧光显微镜的局限性

宽视场荧光显微镜是一种用特定（激发）波长的光照射样品相对较大区域的成像技术。 荧光活性分子分布在样品体积内，并通过一种叫“荧光染色”的过程结合到特定区域。 这些分子吸收激发波长，随后发出波长较长的光，而这些光会被相机检测到。

相机收集到的发射信号来自整个样品体积中激发光照射到的所有分子，其中激发光的功率足够高。 因此，焦平面上精细的荧光染色结构会因失焦光线的存在而变得模糊。 解决这一问题的方法是采用光学切片方法，这种方法可产生清晰、轮廓鲜明的图像。

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

介绍用于快速光学切片的SPARQ技术

VS-SILA成像采用SPARQ技术（由Bliq Photonics开发），该技术结合了HiLo算法[1]和散斑扰频器，可实现快速光学切片。这项技术能够去除宽视场图像中的失焦光线，实现与共聚焦显微镜类似的性能。[1-3]

这项技术意味着采集了两个样品图像：一个是均匀照明图像，而另一个是由随机激光散斑在样品上产生的空间结构照明图像。获得这两个图像后，通过计算将两者合并，可生成一幅清晰的图像。两种成像状态之间的转换是通过散斑扰频器实现的，如图1所示。

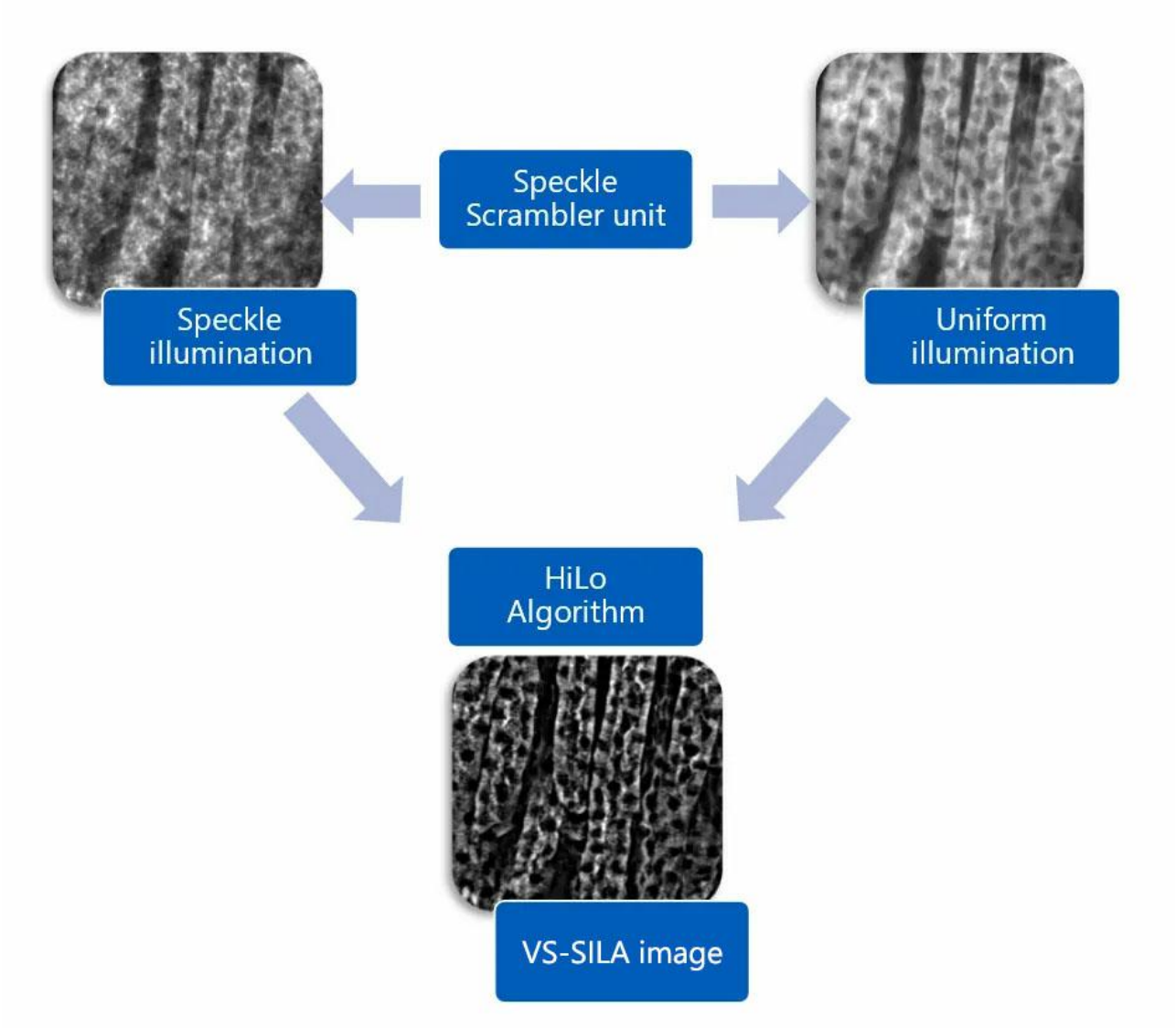


图1. 采集VS-SILA图像。

1. 均匀照明

均匀照明图像包含来自聚焦和失焦物体的信号。当图像内容失焦时，它会变得模糊，因此只包含低空间频率成分。对均匀图像应用简单的高通滤波器可以滤除失焦的内容，使均匀的高频图像实现聚焦。然而，高通滤波器也会有抑制焦平面上低频元素的不良影响。

为了恢复焦平面上样品的低频内容，需要采集并处理高频结构照明（由散斑产生）。这样就可以恢复低频信号，并分辨出仅来自相关平面的信号。

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

2. 散斑照明

散斑是介质不规则处漫反射或散射事件产生的随机波动，是激光等相干光源的特征。 这些反射或散射事件的干涉产生了投射在样品上的颗粒状随机图案。[4]

斑点照明对样品进行高频空间调制。这种照明方式的一个重要特点是，调制对比度仅限于显微镜系统的焦平面。因此，通过测量图像调制的局部对比度，可以确定物体在多大程度上处于聚焦状态或包含聚焦贡献。

3. 合并两个图像

使用高通滤波器从均匀照明图像中提取焦平面的高频率。 从散斑照明图像中，通过局部对比度测量来确定物体的对焦程度或包含对焦贡献的程度。通过在局部对比度测量图像上应用低通滤波器，可获得低频聚焦信号。

因此，通过适当调整高通和低通滤波器，从散斑照明图像中获取的低频聚焦内容可以补充从均匀照明图像中获得的高频聚焦内容。 将高频和低频图像内容合并后，就能得到包含成像系统频率带宽内所有频率成分的全分辨率聚焦图像（图2）。[1-3]

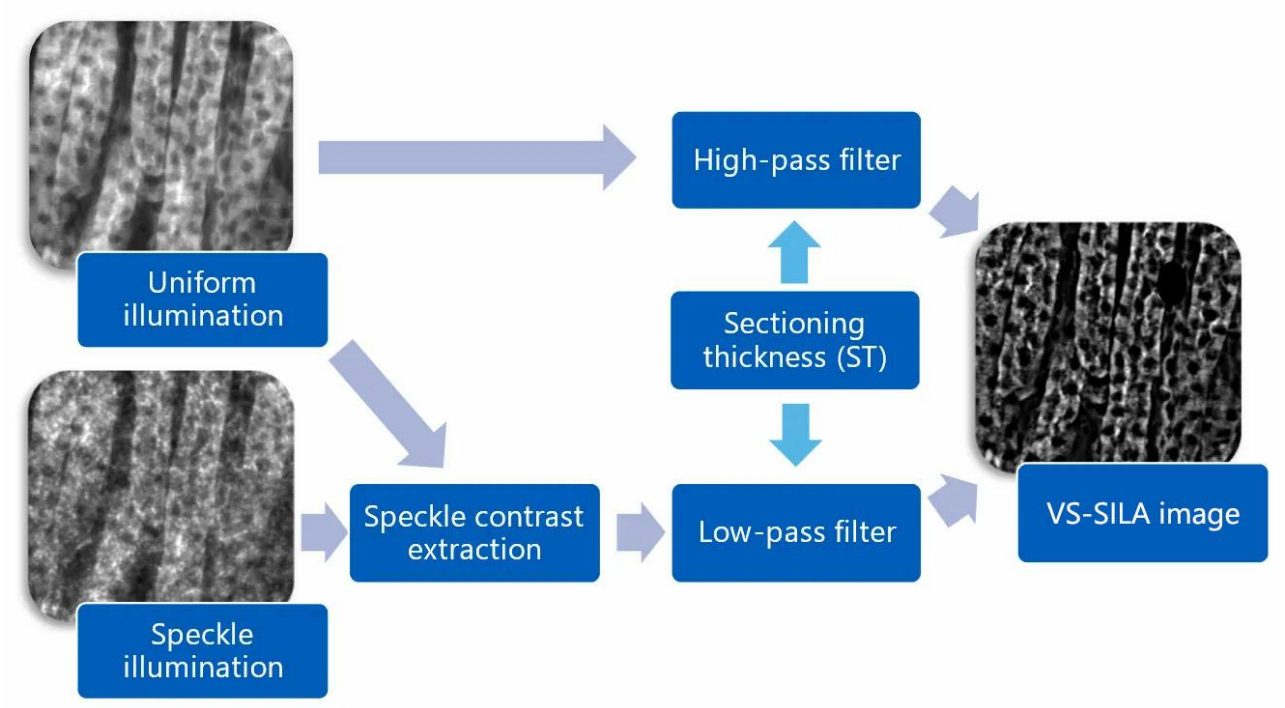


图2. VS-SILA处理示意图。

值得注意的是，还可以通过更改名为“切片厚度（ST）”参数的设置来调整光学切片的程度。 增加ST参数类似于增加共聚焦显微镜针孔的大小。

提高ST值可以使VS-SILA图像处理过程中散斑对比度的贡献范围更广（即更大的信号量）。 整体强度增加，信噪比（SNR）也相应改变。 然而，正如针孔模拟中的信号增益是由于焦平面外的收集所致，ST的增加将导致VS-SILA图像的光学切面减小。

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

使用VS-SILA光学切片法的实验结果示例

用WF和VS-SILA成像技术照射小鼠肾脏的16 µm冷冻切片（FluoCells制备载玻片#3，F24630）。 ST参数设置为2（VS200扫描仪、UPLSAPO40XS物镜、1.25 NA、300 µm WD、Hamamatsu ORCA-Fusion相机）。 考虑到样品厚度，该参数被选为合理照明参数。 由于散斑具有固有的随机性，因此ST参数太小可能会导致生成的VS-SILA图像出现颗粒感。[5]

采集时使用的激发波长为488 nm。 使用多波段分色镜（用于DAPI、FITC、Cy3和Cy5）和单发射滤光片（用于异硫氰酸荧光素（FITC））。 相机的曝光时间设定为60 ms。 图3a显示的是WF图像，图3b显示的是通过VS-SILA成像扫描的同一区域，ST设置为2，Z位置相同。 整个样品的对比度都有所提高。 聚焦1-4区域，我们可以看到VS-SILA图像明显比WF方法显示出更多细节。

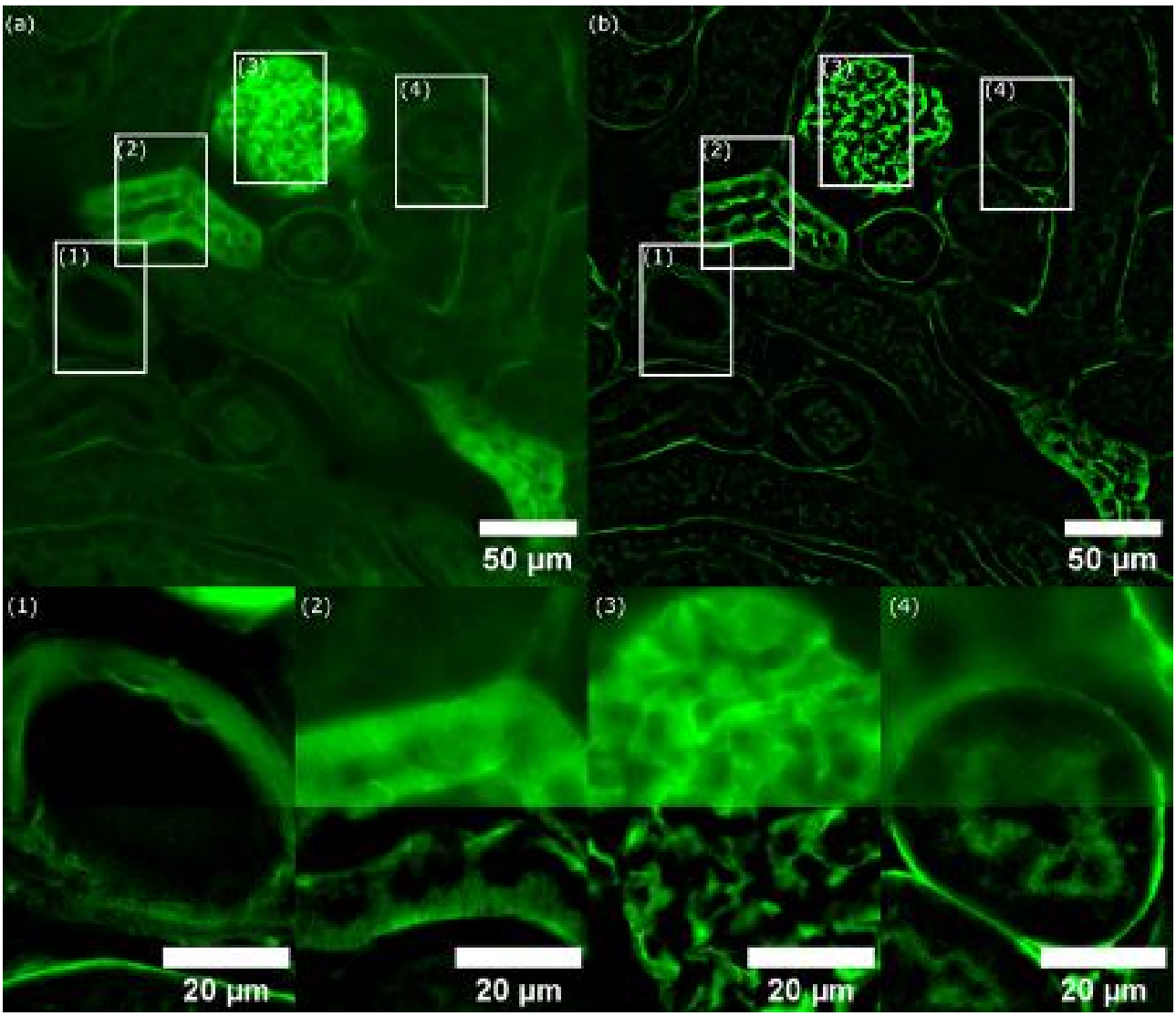


图3. (a) 用Alexa Fluor 488小麦胚芽凝集素（W-11261）染色的小鼠肾脏的WF图像。 白色矩形标出比较结构的四个感兴趣区域（ROI 1-4）。 (b) ST参数为2、对应6.803 µm的VS-SILA光学切片图像。 插图显示放大的ROI（1-4）与WF和VS-SILA成像的合并通道（上半部分： WF，下半部分 VS-SILA）。 我们可以看到，VS-SILA成像的图像对比度得到了极大改善。 相比之下，WF图像中的一些结构几乎不明显。 请注意，为了展示解析出的详细结构，详细的ROI以不同的强度比例显示。

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

VS-SILA成像系统的光学设计

VS-SILA光学切片装置是在宽视场载玻片扫描仪（我们的VS200系统）的基础上改进而成的，用激光二极管产生的相干光源取代了常规的荧光光源，而该光源会与单模光纤耦合。 单模耦合激光光源通过散斑扰频器装置进行投射，该装置会在样品平面上产生散斑以实现结构照明，并去除散斑以实现均匀照明。 通过准确地控制激光照明和扰频器装置，可计算出单个VS-SILA图像并将其拼接在一起，形成光学切片的全玻片图像。

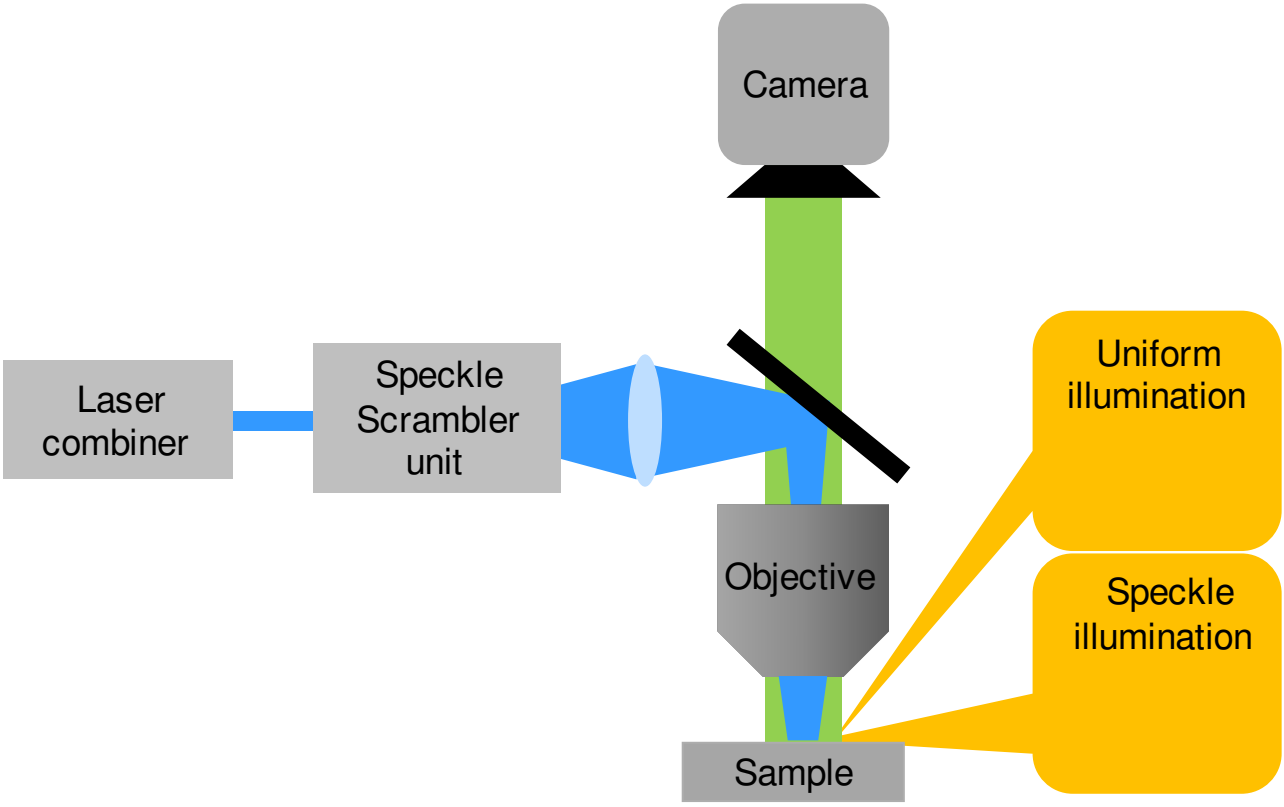


图4. VS-SILA结构示意图，包含一个相干光源、一个产生均匀或散斑照明的散斑扰频器、一个包含将光引入样品并收集发射光的物镜的光路，以及一个作为光检测器的相机。

质量测量

1. 扫描时间

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

	Widefield		SILA		
Objective	Total frames	Scan time	Total frames	Scan time	Increase of scan time [%]
4X UPLFLN	16	6 sec.	32	8 sec.	33
10X UPLXAPO	100	30 sec.	200	41 sec.	36
20X UPLXAPO	324	1 min., 17 sec.	648	1 min., 57 sec.	51
40X UPLXAPO	1296	4 min., 48 sec.	2592	7 min., 22 sec.	53
40XS UPLSAPO	1156	5 min., 29 sec.	2312	8 min., 50 sec.	61

表1. 由ORCA-Fusion相机（Hamamatsu Photonics）采集的WF和VS-SILA图像的记录扫描时间值，4个通道（DAPI、FITC、CY3、CY5），曝光50 ms，扫描区域5 mm × 5 mm。 扫描时间的增加是根据每个放大倍率单独计算的。

2. 分辨率

VS-SILA图像的光学分辨率与WF图像相同。高NA物镜的理论分辨率在横向上模拟为0.2 µm，在轴向上模拟为0.45 µm。 通过油浸物镜（UPLXAPO100XO，1.45 NA）对含有荧光珠（TetraSpeck微球，0.1 µm，荧光蓝/绿/橙/暗红）、发射波长为520 nm的样品进行测量，得出点扩散函数（PSF）的实验值。WF图像的半峰全宽（FWHM）横向为0.22 µm，轴向为0.47 µm。 我们证实，理论计算值与在非常小的珠子上测量到的PSF一致。

3. 光学切片功能

VS-SILA成像的优势在于其光学切片功能。 在图5a-d中，我们可以看到图3中不同ST参数下的小鼠肾脏亚区示例，图5e-h中为相应的正交视图。整个样品以39个图像的Z叠加方式采集，Z间距设置为0.34 µm。 如图5i所示，随着ST的减小，我们可以看到结构与背景之间的对比度增加。我们也可以更轻松地识别出详细的结构。

为了证明这一点，我们在每个ST参数和WF图像的完全相同点绘制了一个Z截面X方向的线轮廓图。比较归一化的线轮廓图可以清楚地看出，与典型的WF系统相比，VS-SILA成像的细节更为突出。 与背景强度相比，结构对应的强度峰更高，并且会随着ST参数的减小而变窄。

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

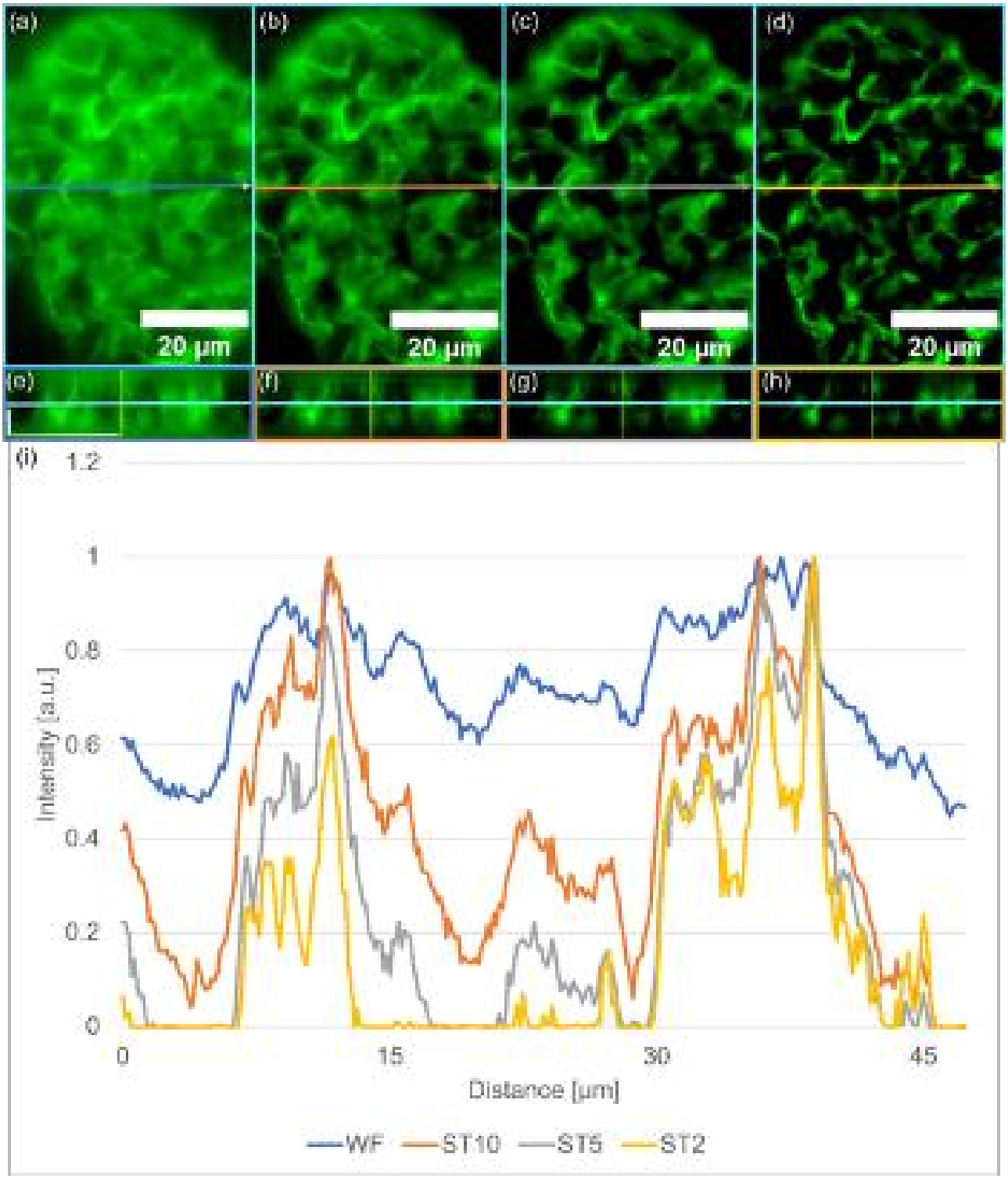
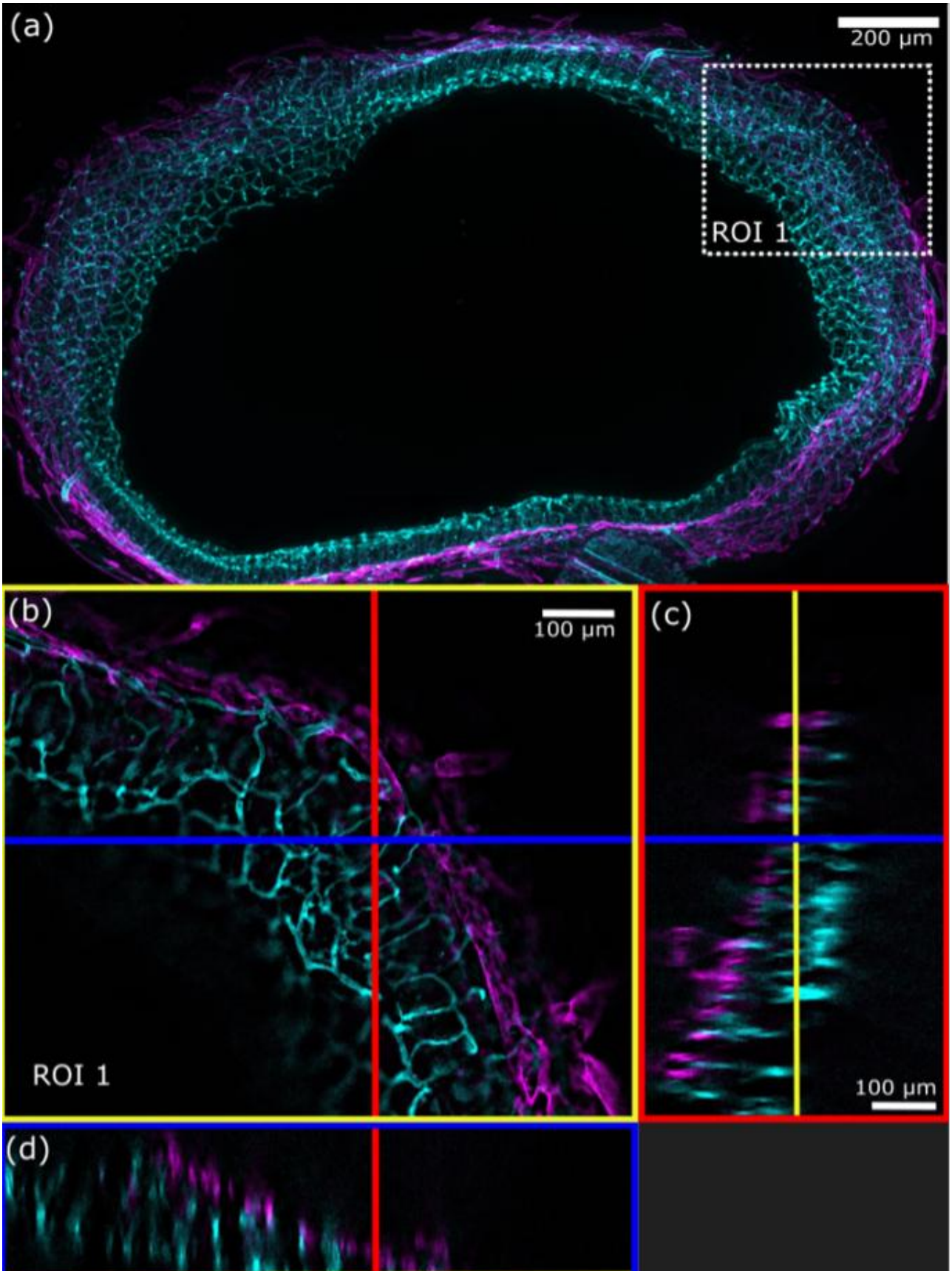


图5. 与宽视场成像相比，使用VS-SILA照明的光学切片效果改善。(a) WF照明，(b) 使用ST10的VS-SILA照明，(c) 使用ST5的VS-SILA照明，以及 (d) 使用ST2的VS-SILA照明。每个图像上都有一个箭头，表示X方向（e-h）正交视平面的线轮廓测量和位置。 每个具有不同ST参数的VS-SILA图像和每个WF图像都以Z叠加图像的形式采集，包括X方向的正交视图。蓝线表示a-d中所示的同一Z平面。水平刻度尺对应20 µm，垂直刻度尺对应5 µm，并且适用于所有子图。(i) 记录的线型轮廓已在a-b中标出，然后比较蓝色的WF、橙色的使用ST10的VS-SILA、灰色的使用ST5的VS-SILA和黄色的使用ST2的VS-SILA。所有图均归一化为1。 当ST参数减小时，我们看到对比度增加。

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

4. 景深

VS-SILA光学切片方法可对厚度超过几百微米的样品进行成像。 特别是当样品透明时，VS-SILA成像的穿透深度仅受物镜工作距离的限制。如果样品不透明，光线就会被样品结构散射，从而影响对更深层细胞的观察。[6]



Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

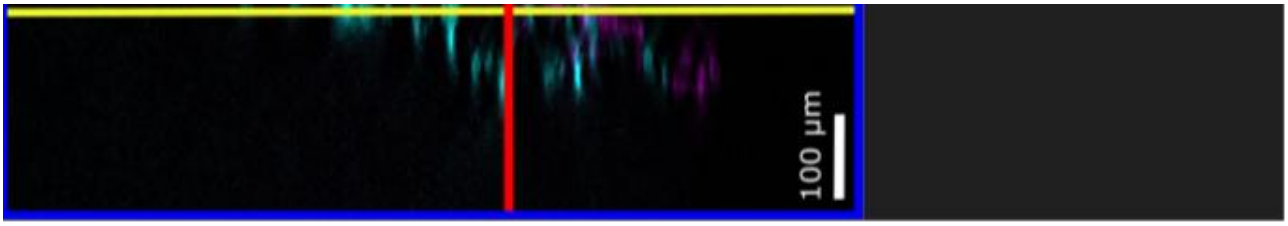


图6. a) 小鼠肠道VS-SILA（ST = 2）图像的最大强度投影（MPI，188个平面，Z间距 = 2.36 µm）显示血管（青色）和淋巴管（洋红色）。b) 白色虚线方块表示(a)中放大的ROI 1，其中蓝线表示XZ正交视图的位置，红线表示 YZ正交视图的位置。c) 蓝色矩形显示了YZ方向的正交视图。d) 红色矩形显示了XZ方向的正交视图。黄色线条表示(b)中所示的Z平面。（由RapiClear 1.52处理的FluoTissue 450 µm小鼠肠道切片，Sun Jin实验室）。

5. 可重复性

通过VS-SILA图像处理，可以从均匀图像和散斑图像计算出光学切片图像。理想情况下，散斑结构会被完全滤除，在最终的VS-SILA图像中无法观察到。但实际情况并非如此。散斑照明本身会使信号强度产生轻微变化。例如，在一个图像中，散斑可能会照亮一个样品细节，而在另一个图像中则可能不会。这种现象解释了在最终图像中观察到的残留强度变化。根据定义，这种变化是随机的，而这既是一种技术的优势（光学切片和穿透深度），也是技术的局限（信号强度变化）。

为了研究信号强度变化，我们记录了四种不同ST参数（见图8a）的10次扫描序列（见图7）。对每个样品任意选择90个包含结构的ROI计算变异系数（CV），以量化整个扫描序列中的强度变化：

$$CV = 100 * \frac{std_{stack}(I_{mean,ROI})}{mean_{stack}(I_{mean,ROI})},$$

这里所说的$I_{mean,ROI}$是单次扫描中一个ROI的平均荧光强度。而stdstack和meanstack分别是整个10次扫描序列中$I_{mean,ROI,}$的标准偏差和平均值。图7c显示了25个ROI及其在这10次扫描中的平均荧光强度曲线的示例。

针对含有结构的区域计算出的三个不同样品的CV值随ST函数的变化而降低（图8b）；当我们设定一个较大的切片参数值时，散斑图像上的空间滤波效果会减弱，导致VS-SILA图像上的强度变化减小。在3种不同结构上测量90个检测ROI的VS-SILA图像的变异系数平均为3.7±1.4%。相比之下，WF模式的信号强度变化约为0.3%，而且是系统固有的。

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

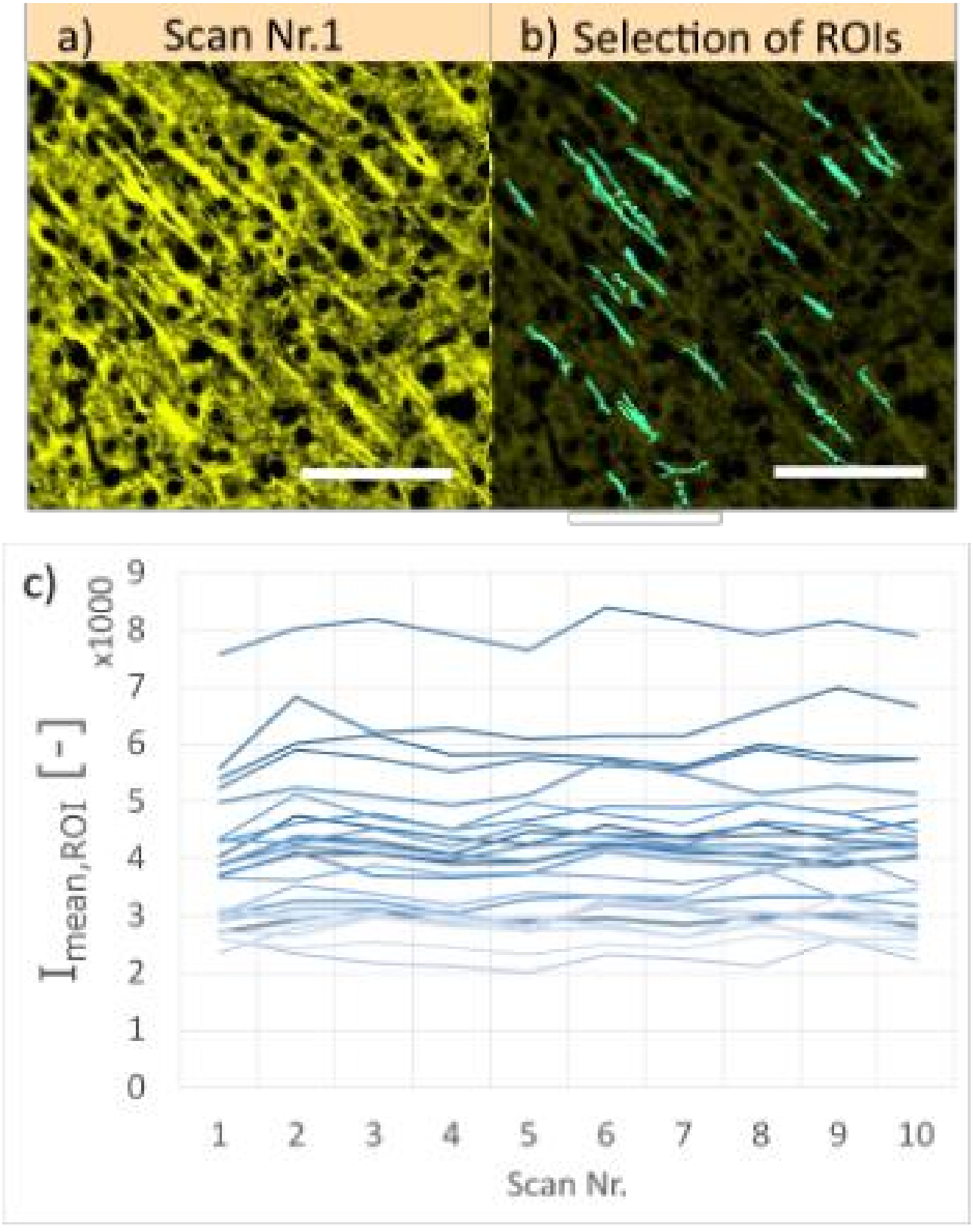


图 7. a) ST值为10、放大倍数为40倍的VS-SILA成像采集的小鼠大脑样品（Cy3 染色，厚度为 100 µm）示例。每个区域在相同的焦平面和区域扫描了10次。b) 青色感兴趣区域（ROI）显示了我们测量平均荧光强度（Imean,ROI）时所选择的结构。比例尺对应50 µm。c) 前文所示为所选ROI的平均强度曲线。 每行对应一个ROI。 请注意，为了更好地进行解释，只显示了包含25个ROI的一小部分图像。

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

与其他光学切片技术的比较

在下图中，我们将VS-SILA成像与普通宽视场显微镜、去模糊算法、解卷积和共聚焦激光扫描显微镜进行了比较。与使用去模糊算法的普通WF成像相比，VS-SILA成像在光学切片和对比度方面有很大改进。与解卷积技术相比，VS-SILA技术提高了图像质量。此外，VS-SILA的即时光学切片功能还能缩短通常与捕捉大型全玻片切片图像相关的冗长处理时间。

与共聚焦显微镜相比，VS-SILA技术的图像质量非常接近。正如预期的那样，宽视场显微镜会受到背景荧光的影响。尽管样品具有散射特性，但共聚焦显微镜和VS-SILA显微镜都能产生对比度更高的光学切片图像，并能揭示细胞组织的微妙细节。必须进一步比较VS-SILA和共聚焦显微镜，以比较图像细节和强度分布的空间变化。不过，VS-SILA技术的性能足以进行定性评估和共定位研究。VS-SILA可作为快速扫描设备，筛选大量样品。然后，可以将具有感兴趣结构的样品拿到共聚焦显微镜上进行定量成像。

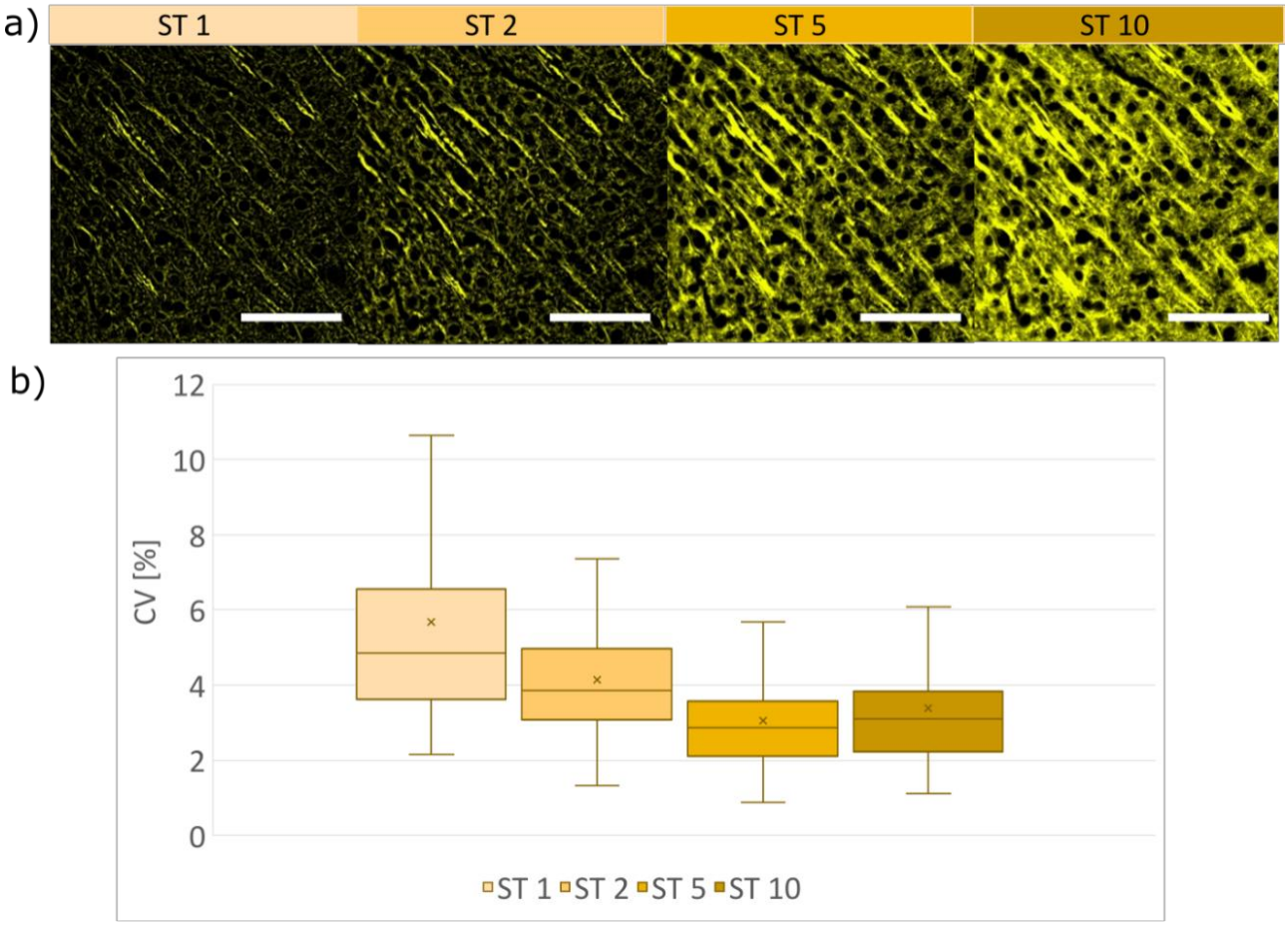


图9.地中海圆头涡虫（Schmidtea Mediterranea）的图像（20倍物镜）。三种技术的比较：a) WF图像，b) 使用去模糊算法的WF图像，c) ST参数为5的VS-SILA图像。蓝色：DAPI；绿色：内肠细胞；红色：外肠细胞。样品由德国哥廷根马克斯·普朗克多学科科学研究所组织动力学和再生部的Amrutha Palavalli提供。比例尺为500 µm，适用于所有子图。

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

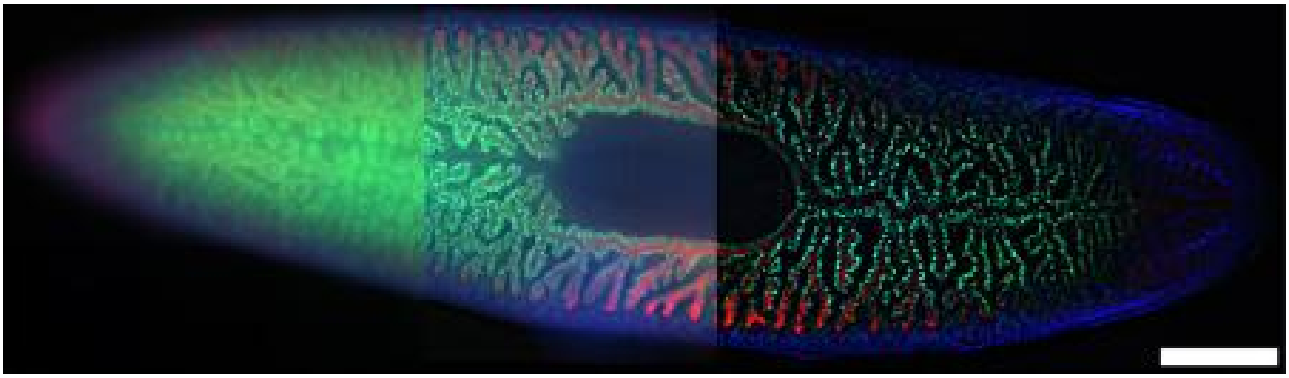


图10. 用MAP2染色的厚小鼠大脑图像（20倍物镜）。 三种技术的比较： a) 采用景深扩展图像（EFI）投影的WF图像；b) 采用景深扩展图像（EFI）投影并应用解卷积的WF图像；c) 采用景深扩展图像（EFI）投影并使用ST参数2的VS-SILA图像。比例尺为50 µm。

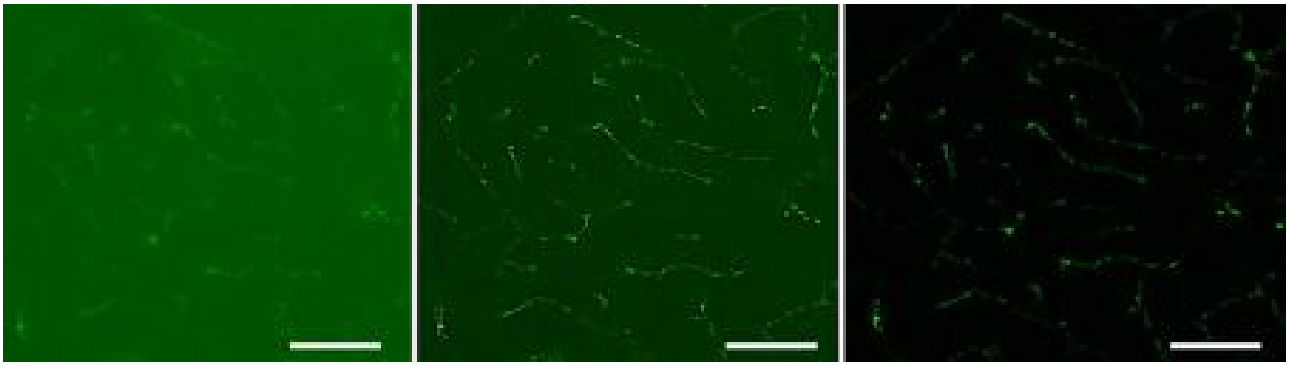


图11. 用胶质纤维酸性蛋白（GFAP）标记的小鼠大脑样品图像，显示了神经元（20倍物镜）。 三种技术的比较： a) 使用FLUOVIEW显微镜采集的共聚焦图像；b) 经过额外解卷积处理的相同共聚焦图像；c) ST参数为2的VS-SILA图像。 比例尺为50 µm，适用于所有子图。

结语

用于VS200扫描仪的VS-SILA光学切片设备使我们能够为较厚的样品获得对比度更高的图像。 与WF显微镜相比，使用40X空气物镜时，扫描时间平均增加53%。 我们所能达到的光学深度仅受光学装置工作距离的限制，这是因为我们在扫描厚度达500 μm的超厚样品时证实了这一点。 VS-SILA的轴向分辨率与WF成像相同，但光学切片大大增强，并可通过切片厚度参数进行控制。

当我们设定给一个较大的ST参数值时，散斑图像上的空间滤波效果会减弱，导致VS-SILA图像上的强度变化减小，在我们的示例中测得的平均强度变化为3.7±1.4%。可以通过增加ST参数来限制ST参数为1时产生的较高强度变化。 需要对荧光强度进行定量分析时，应考虑这一调整。

该系统可使我们快速获得与共聚焦显微镜或应用解卷积技术相当的图像。我们相信，这项技术可用于较厚样本的快速载玻片扫描，有利于获得清晰、高对比度的图像，并能清晰聚焦细节。

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

参考文献

1. Lim, D., Ford, T., Chu, K.K., and Mertz, J. 2011. "Optically Sectioned In Vivo Imaging with Speckle Illumination HiLo Microscopy." *Journal of Biomedical Optics.* 16, 016014.
2. Lim, D., Chu, K.K., and Mertz, J. 2008. "Widefield Fluorescence Sectioning with Hybrid Speckle and Uniform-Illumination Microscopy." *Optical Letters.* 33, 1819-1821.
3. Mertz, J. and Kim, J. 2010. "Scanning Light-Sheet Microscopy in the Whole Mouse Brain with HiLo Background Rejection." *J. Biomed. Opt.* 15, 016027.
4. 4. Goodman, J. W. 2007. "Speckle Phenomena in Optics: Theory and Applications." *Roberts and Company Publishers*.
5. Schniete, J., Franssen, A., Dempster, J. et al. 2018. "Fast Optical Sectioning for Widefield Fluorescence Mesoscopy with the Mesolens based on HiLo Microscopy." Sci Rep, 8, 16259.
6. Richardson, D. S. and Lichtman, J. W. 2015. "Clarifying Tissue Clearing." *Cell.* 162.2: 246-257.

作者

Anna Zelená, Evident欧洲技术中心应用专家

Wei Juan Wong, Evident欧洲技术中心产品经理

Gabriel Maranon, Bliq Photonics产品专家

Alicja Gąsecka, Bliq Photonics研发和生产总监

Mariêve Picard, Bliq Photonics销售和市场总监

Jeck Borne, Bliq Photonics系统工程师

向Evident欧洲技术中心的整个VS200团队致谢。

相关产品



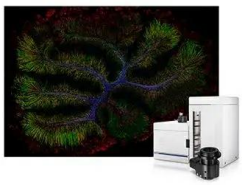
通用载玻片扫描仪

VS200

将高质量的多重成像、明场中精确的色彩再现、厚样本的光学清晰度以及最广泛的成像模式集于一台载玻片扫描仪中，SLIDEVIEW™ VS200 系统使研究人员能够从每个样本中获取更有意义的数据——无需复杂操作、人工干预或多台设备。 VS200 系统旨在为用户和工作流程提供一致、可重复的结果，帮助您从载玻片中挖掘更多洞见，同时支持可扩展的成像需求。

学习更多内容 ▸ https://www.olympus-lifescience.com/solutions-based-systems/research-slide-scanner/

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.



VS-SILA

VS-SILA（散斑照明）光学层切设备，通过去除非焦信息，获得高对比度，清晰的图片，特别对于较厚的样品有很好的成像效果。图像是在扫描过程中计算出来的，不需要进行后处理，因此该设备对采集速度的影响很小。

学习更多内容 ▸ https://www.olympus-lifescience.com/solutions-based-systems/vs200/sila/

Copyright 2026 EVIDENT, All rights reserved.

Evident Corporation is certified to ISO 9001, and ISO 14001.

All specifications are subject to change without notice. All brands are trademarks or registered trademarks of their respective owners and third party entities. Evident and the Evident logo are trademarks of Evident Corporation or its subsidiaries.