

活体光学投影断层成像系统与应用

郭进¹ 刘侠¹ 董迪² 朱守平³ 杨鑫² 田捷^{2,3}

摘要 光学投影断层成像 (Optical projection tomography, OPT) 技术可以对 1~10 mm 尺度的低散射生物样本进行激发成像, 具有微米级的空间分辨率、无辐射、成本低等特点, 为小尺寸生物样本的高分辨率三维成像提供了一种新的手段. OPT 最早通过对离体生物组织如小鼠胚胎、小鼠器官等成像, 进行药物疗效评估、基因表达等研究, 但是离体成像不能动态、完整地反映生物组织的变化, 因此活体成像技术逐渐成为 OPT 领域的研究热点. 本文详细介绍了我们自主研发的活体 OPT 系统, 该成像系统以准直激光器为光源单元, 高精密切移和旋转电控平台为样本定位单元, 低温电子倍增 (Electron multiplying, EM) CCD 探测器为采集单元, 实现了针对果蝇蛹等小模式动物的活体三维成像. 该系统的空间分辨率优于 10 μm , 成像视野 1~10 mm, 扫描时间小于 2 min, 重建时间小于 5 s. 最后, 本文通过果蝇蛹的三维活体成像实验展示该系统的操作流程、成像结果和初步的生物应用.

关键词 光学投影断层成像, 活体成像, 绿色荧光蛋白, 果蝇蛹, 显微成像

引用格式 郭进, 刘侠, 董迪, 朱守平, 杨鑫, 田捷. 活体光学投影断层成像系统与应用. 自动化学报, 2013, 39(12): 2043–2050

DOI 10.3724/SP.J.1004.2013.02043

A Novel In-vivo Optical Projection Tomography System and Its Application

GUO Jin¹ LIU Xia¹ DONG Di² ZHU Shou-Ping³ YANG Xin² TIAN Jie^{2,3}

Abstract Optical projection tomography (OPT) is a low-cost and high-resolution imaging technology which can provide three-dimensional (3D) images for samples from 1 to 10 mm. OPT has been greatly applied to drug efficacy evaluation or gene expression through imaging low scattering ex-vivo biological tissues, such as small animal extremities, animal embryos, etc. However, ex-vivo imaging cannot record dynamic change in biological tissues. Therefore, in-vivo application of OPT is promising. Our group has developed a novel OPT system for in-vivo imaging of small insects. The system consists of a continuous wave (CW) laser, three translation stages, a rotation stage, and a low-temperature electron multiplying (EM) CCD camera. The spatial resolution of our system is less than 10 μm with an imaging field between 1 mm and 10 mm. An imaging experiment costs less than 2 min containing a 5 s 3D reconstruction. Besides the system introduction, this paper also demonstrates the system operation processes and preliminary biological applications. Experimental results show that 3D in-vivo imaging of drosophila melanogaster pupae and other insects are easy to implement by using our system.

Key words Optical projection tomography (OPT), in-vivo imaging, green fluorescent protein, drosophila melanogaster pupae, microscopic imaging

Citation Guo Jin, Liu Xia, Dong Di, Zhu Shou-Ping, Yang Xin, Tian Jie. A novel in-vivo optical projection tomography system and its application. *Acta Automatica Sinica*, 2013, 39(12): 2043–2050

收稿日期 2012-12-25 录用日期 2013-06-06

Manuscript received December 25, 2012; accepted June 6, 2013

国家自然科学基金 (61172167, 81101084), 中国科学院科研装备研制项目 (YZ201164), 中国科学院外籍青年科学家计划 (2010Y2GA03), 黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划 (1155G12), 北京市自然科学基金重点项目 (4111004), 中国科学院“外国专家特聘研究员计划” (2012T1G0036), 黑龙江省自然科学基金项目 (F201311), 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (12531119) 资助

Supported by National Natural Science Foundation of China (61172167, 81101084), Instrument Developing Project of the Chinese Academy of Sciences (YZ201164), Fellowship for Young International Scientists of Chinese Academy of Sciences (2010Y2GA03), Supporting Foundation for University Key Youth Teacher of Heilongjiang Province of China (1155G12), Natural Science Foundation of Beijing (4111004), Visiting Professorship for Senior International Scientists of Chinese Academy of Sciences (2012T1G0036), Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (F201311), and the Foundation of Heilongjiang Educational Committee (12531119)

本文责任编辑 张长水

Recommended by Associate Editor ZHANG Chang-Shui

1. 哈尔滨理工大学自动化学院 哈尔滨 150080 2. 中国科学院自动

在生物医学研究领域, 除了从细胞水平开展实验获取相关的生物学信息外, 越来越多的研究人员趋向于选择一个完整的生物系统, 期望在组织水平获得个体生物学行为的信息^[1]. 然而, 对于不同尺度的生物, 所需求的影像技术也不一样. 对于大鼠、小鼠等尺寸在几个厘米的小动物, micro-MRI、micro-CT、micro-PET 等影像设备可以满足成像要求^[2–4]. 对于亚毫米量级上的生物, 共聚焦成像、光学相干层析成像等显微光学成像可以予以支

化研究所中国科学院分子影像重点实验室 北京 100190 3. 西安电子科技大学生命科学技术学院 西安 710126

1. School of Automation, Harbin University of Science and Technology, Harbin 150080 2. Key Laboratory of Molecular Imaging, Institute of Automation, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190 3. School of Life Sciences and Technology, Xidian University, Xi'an 710126

持^[5-6], 这些成像技术的空间分辨率可达到微米级甚至亚微米级, 但由于成像深度有限, 不能用于毫米级成像. 因此, 成像深度在 1~10 mm 范围, 并且具有高空间分辨率的成像技术和系统相对匮乏.

2002 年, 英国医学研究理事会人类遗传所的 Sharpe 等在 *Science* 上撰文, 提出了一种新的成像模态——光学投影断层成像 (Optical projection tomography, OPT), 用于研究胚胎发育过程中基因和蛋白质表达^[7]. 该技术具有微米级的空间分辨率, 成像深度可达几个毫米, 其成像原理与 CT 相似. OPT 成像技术可以满足毫米级样本尺寸的高分辨率成像, 为生命科学研究提供了新的技术手段. OPT 一经提出, 在生命科学研究中的重要应用价值受到了广泛关注. 美国杜克大学^[8]、哈佛医学院麻省总医院^[9]、西班牙巴塞罗那基因组调控中心^[10]、希腊克里特电子结构与激光研究所^[11]、意大利米兰理工大学^[12]、英国帝国理工大学^[13] 和美国华盛顿大学人类光子实验室^[14] 等众多著名的研究机构都陆续开展了 OPT 成像设备和成像技术的研究. 美国杜克大学的 OPT 系统主要用于放射剂量检测^[8]; 美国哈佛医学院麻省总医院的 OPT 成像设备^[9], 其利用可见光 LED 灯作为光源, 可以完成离体生物组织 (如小鼠肺部、心脏等) 的解剖结构成像和激发功能成像, 同时也展开了活体成像的研究^[15]; 2009 年, 西班牙巴塞罗那基因组调控中心开发出了一套针对活体组织的 OPT 成像系统^[10], 其可以对体外培养的活体组织进行连续成像, 如小鼠的体外肢芽; 希腊克里特电子结构与激光研究所研发的一套针对线虫和果蝇的活体 OPT 三维成像设备^[11], 使用甘油浸泡果蝇, 果蝇至少可以活三个小时, 从而可实现活体成像; 意大利米兰理工大学研发的离体 OPT 设备^[12], 主要研究小鼠肺部细胞转移、神经干细胞对脊髓损伤; 英国帝国理工大学研发的 OPT 成像系统^[13], 可对整个斑马鱼胚胎进行离体激发成像; 美国华盛顿大学人类光子学实验室研发的高光学放大倍数的 OPT 显微成像系统^[14], 用于观察单个癌细胞, 但是该系统视野过小, 不能针对 1~10 mm 生物进行整体成像.

综上所述, 目前国际上已经开始研究活体 OPT 成像系统, 国内在活体 OPT 成像方面的研究较少, 针对这一现状, 我中心研发了一套活体 OPT 成像系统, 其可实现活体、快速、稳定和高分辨率成像. 系统采用高灵敏的电子倍增 (Electron multiplying, EM) CCD 探测器、高精度旋转台保证 OPT 数据的快速、精确获取, 自主设计的样本夹持器通过自定心使样本旋转轴竖直并处于旋转台的中心. 同时利用图形处理器 (Graphics processing unit, GPU) 的并行技术加速 OPT 三维重建速度, 对生物实验过程

进行快速反馈. 本文将围绕该活体 OPT 系统详细介绍其硬件组成、软件系统和生物实验.

1 活体光学投影断层成像系统

相对于其他 OPT 系统, 本系统专门针对活体样本进行动态成像设计, 通过以下三方面来保障活体成像. 首先, 自主设计的样本固定装置能保护生物组织免受器械的损伤; 其次, 采用高灵敏 EMCCD 探测器并配套研发了数据采集软件, 实现数据快速采集, 缩短了实验时间, 提高生物体的存活率; 最后, 利用 GPU 并行技术加速三维重建, 便于实验过程中根据三维成像结果快速调整实验参数, 缩短实验时间. 在软件算法方面, 本系统集成自动旋转中心计算方法^[16], 消除旋转中心偏移造成的伪影; 快速三维重建技术, 缩短成像时间.

1.1 硬件系统

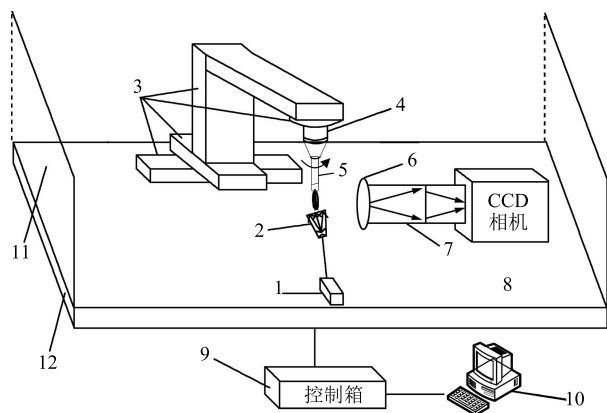
本套 OPT 系统的预期分辨率达到 10 μm , 样本尺寸 1~10 mm. 该目标对整个系统硬件的精度, 特别是移动和旋转定位的精度提出了很高的要求, 因此我们在设计、选型、加工、组装、调试过程中都保证达到所要求的精度. 图 1 所示为活体 OPT 成像系统的结构示意图和实物图, 图 1(a) 为结构示意图, 图中各编号分别表示: 1: 激光器; 2: 激光扩束器; 3: 机械运动装置; 4: 自定心样本夹持器; 5: 毛细玻璃管; 6: 窄带滤波器; 7: 显微装置; 8: EMCCD 探测器; 9: 控制箱; 10: 工作站; 11: 暗箱; 12: 光学平台. 图 1(b) 为硬件系统实物图.

系统固定在密闭暗箱中的光学平台上, 可以借助荧光标记进行激发式特异性成像. 该 OPT 系统包括光源模块、样本定位模块、信号采集模块和设备外围模块四部分. 其中, 光源模块提供照射样本的激发光; 样本定位模块用于调整样本位置以及带动样本旋转; 信号采集模块实现荧光信号的放大和采集; 设备外围模块实现系统各部件集中控制、数据自动采集和存储, 为系统提供避光、抗干扰、抗抖动的实验环境.

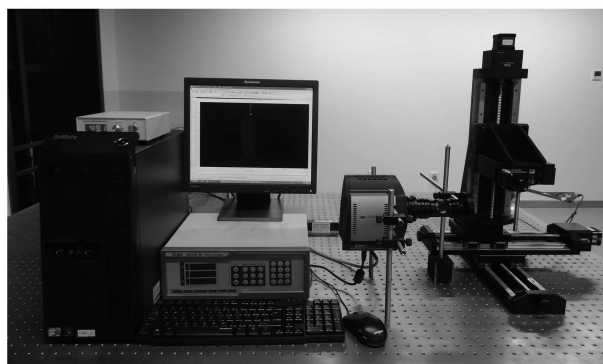
1.1.1 光源模块组成及功能

光源模块由半导体激光器、光纤和扩束器组成, 为 OPT 系统提供激发光.

激发光用于激发样本中的荧光染料或荧光蛋白发射出波长更长的荧光信号, 后续的 EMCCD 探测器进行数据采集. 通过对采集到的荧光信号进行三维重建, 观察荧光染料或荧光蛋白在样本中的分布信息, 实现特异性成像. 光源是本模块的核心, 光源的光束应具有准直性、可靠性、稳定性、工作效率高、噪声小, 以便长时间采集高质量数据. 功率连续可调, 以适应不同强度的染料和不同程度的荧光蛋



(a) OPT 系统结构示意图
(a) Schematic drawing of OPT setup



(b) OPT 系统硬件实物图
(b) Physical map of OPT setup

图 1 活体 OPT 成像硬件系统

Fig. 1 In-vivo OPT imaging setup

白表达. 波长选择根据开展研究的对象而定, 本文中研究对象为表达 GFP 的果蝇蛹, 所以选择波长为 488 nm. 半导体激光器 (DL-488-050, CrystaLaser, USA) 具有连续准直的输出, 其波长为 488 nm; 输出功率连续可调, 最大功率为 50 mW; 光谱线宽为 1 nm; 光束直径为 1.1 mm. 激光器产生的光信号通过光纤导入扩束器, 其将输入的激发光扩展至直径为 20 mm 的均匀准直光束, 以覆盖扫描样本. 系统中, 激光的光束方向与 EMCCD 探测器的主光轴方向以垂直的方式对样本进行照射.

1.1.2 样本定位模块组成及功能

样本定位模块由机械运动装置、样本夹持器和毛细玻璃管组成, 用于 OPT 系统调整样本位置以及带动样本旋转.

机械运动装置是该模块的核心, 装置引入上下、左右、前后和旋转四维自由度, 由平移台、高精度旋转台和连接装置组成. 装置内部各部件由连接块连接, 每一维自由度连接过程中均需用水准仪调平. 平移台用于调节样本的空间位置, 使其在显微

装置的焦平面附近, 探测器能够捕捉到清晰的样本图像. 为实现集中控制和数据采集自动化, 机械运动装置均采用电控型. 由于调整好样本位置后, 锁定平移台, 仅有旋转台运动, 因此, 平移台要求定位稳定性高. 平移台 (PSA200-11-x, Zolix, China) 具有精密电控性. 其行程为 200 mm; 分辨率 $2.5 \mu\text{m}$; 重复定位精度小于 $3 \mu\text{m}$. 旋转台的作用是带动样本旋转, 使探测器能采集多个角度的样本图像. 旋转精度是成像的关键, 预期系统的分辨率为 $10 \mu\text{m}$, 则由旋转台旋转运动带来的误差应当小于 $10 \mu\text{m}$, 即 $R_{\text{Max}}(\text{样本尺寸}) \cdot \theta < 10 \mu\text{m}$, 其中, $R_{\text{Max}}(\text{样本尺寸})$ 为试验中最大样本尺寸的半径; θ 为旋转台精度. $\theta < \frac{10 \mu\text{m}}{5 \text{mm}}$, 即 $\theta < 412.5 \text{ arc sec}$. 为了使得重建图像质量更好, 旋转台的精度越高越好. 因此采用定位稳定性高、分辨率高、重复定位精度高的旋转台, 以确保所采集到的二维图像是等角度的二维图像. 高精度旋转台 (ANT95-360-R, AEROTECH, USA) 具有定位稳定度 0.005 arc sec ; 分辨率 0.01 arc sec ; 单向重复定位精度 0.5 arc sec ; 径向运动误差 $1 \mu\text{m}$. 所有机械运动装置通过控制线连接至控制箱, 再由串口连接至工作站, 以实现统一控制. 通过控制软件控制平移台的移动距离、移动速度和加速度, 并控制旋转台的步进角和旋转角度.

样本夹持器由自行设计并加工制成, 由卡盘体、活动卡爪和卡爪驱动组成. 卡盘体固定在旋转台上, 四个活动卡爪在卡爪驱动作用下同步锁紧, 达到自动锁定毛细玻璃管并使其处于转台旋转轴处. 毛细玻璃管用于固定样本, 在固定样本时有两种方式, 当样本为果蝇蛹等体型较大样本时采用吸附方式 (粘在毛细玻璃管的一端) 固定样本; 当样本为线虫等体型较小样本时采用封装方式 (将整个样本封闭在毛细玻璃管中) 固定样本.

1.1.3 信号采集模块组成及功能

信号采集模块由 EMCCD 探测器、显微装置和窄带滤波器组成, 对光信号进行放大并采集.

探测器是该模块的核心, 用于捕捉光信号. 由于激发产生的光信号比较微弱, 因此需选择灵敏度高、量子效率高的 CCD 探测器. 为快速采集高质量的二维图像, 选择读出速率快, 能够深度制冷, 且具有电子倍增功能的 EMCCD. 探测器 (iXon + DU888, Andor, UK) 具有有效像素 1024×1024 ; 像素尺寸 $13 \mu\text{m} \times 13 \mu\text{m}$; 成像区域 $13.3 \text{ mm} \times 13.3 \text{ mm}$; 半导体深度制冷, 最低温度可降至 $-95 \text{ }^\circ\text{C}$; 具有线性、定量的电子倍增增益; 在波长为 $480 \text{ nm} \sim 700 \text{ nm}$ 范围内的量子效率为 90% 以上, 最高达到 92.5%; 最大读出速率为 10 MHz; 帧速为 8.9 帧/秒.

由于样本尺寸较小, 为了获取到更多样本信息,

需采用显微装置. 该装置能够与探测器完全匹配, 并且为适应不同尺寸样本成像, 该装置放大倍数需连续可调. 为充分利用探测器的成像区域, 显微装置的放大倍数应该满足: $\frac{\text{Min(成像区域长度)}}{\text{Max(样本尺寸)}} < \text{放大倍数} < \frac{\text{Max(成像区域长度)}}{\text{Min(样本尺寸)}}$, 即 $\frac{13.3}{10} < \text{放大倍数} < \frac{13.3}{1}$. 显微装置 (TD-III, PVD, China) 具有主机变倍范围: 0.7X ~ 4.5X, 显微物镜可选配 0.5X、1.5X、2X, 摄像目镜可选配: 0.5X、1X、2X. 整个放大装置的放大倍数范围为: $0.7 \times 0.5 \times 0.5 \sim 4.5 \times 2 \times 2$, 即 0.175X ~ 18X, 满足实验需要.

在数据采集过程中, 光信号通过窄带滤波片滤去激发光和杂散光, 仅采集荧光发射信号. 针对不同发射光特性, 可选择不同的滤波片, 使系统能同机采集多种光谱信号. 窄带滤波器需易于更换滤波片, 且稳定性好. 窄带滤波器 (7MML335, 7-Star, China) 具有易更换滤波片, 固定方便、快捷等特性.

显微装置与 EMCCD 探测器之间通过 C 接口连接, 探测器的控制信号和视频信号通过信号线连接至控制箱, 以实现数据采集和集中控制.

至此, 信号采集模块搭建完成, 通过分辨率板测试该系统的二维图像的分辨率如图 2 所示. 图中为 1 毫米等分成 240 线, 由图可以分辨开两条线, 由此显示该系统的二维图像分辨率优于 4.17 μm .

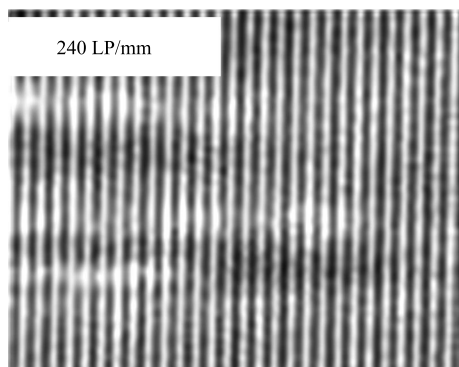


图 2 二维图像分辨率测试

Fig. 2 Resolution test of 2D image

1.1.4 设备外围模块组成及功能

设备外围模块由工作站、暗箱、光学平台以及各个设备的支撑结构构成. 通过开发的控制软件实现各电控部件的集中控制以及数据自动采集并存储. 光学平台用于成像设备固定, 暗箱提供了一个相对独立的避光、抗干扰实验环境.

1.2 系统软件

在活体光学投影断层成像系统中, 为使系统各部件协调运转、数据自动采集并存储, 我们开发了 OPT 系统控制软件. 由控制软件获取的二维图像,

通过成像软件重建出三维图像. 最后由后处理软件 3DMed^[17] 对三维重建体进行数据分析.

1.2.1 控制软件

系统中, 被控部件较多、分布较散, 且控制精度要求高, 所以手动控制远不能满足系统要求. 实验中数据采集量较大, 若通过手动采集, 则样本运动以及机械运动误差给实验结果带来的影响非常大, 且效率低. 因此, 我们开发了配套控制软件, 实现各部件集中控制、数据自动采集并存储.

为了操作方便、快捷, 通过多次调试, 软件把一些常用设置固定为默认值, 缩短了参数设置过程. 探测器仅需设置积分时间、制冷温度和 EM 值三个必须项. 微弱信号通过较长的积分时间可以采集到清晰的图像, 但是积分时间过长产生的运动伪影较明显, 所以针对产生信号强度不同的样本设置不同的积分时间. 适当的制冷温度和 EM 值能有效降低暗电流产生的噪声. 平移台仅需设置平移位移. 旋转台需设置步进角和旋转角度. 不同实验精度对旋转台的步进角大小要求不同. 数据采集, 确保探测器采集到等角度图像, 控制软件实时采集转台反馈信号, 当转台旋转到指定位置后反馈信号给控制软件, 控制软件发送信号给探测器, 开始采集图像, 图像采集完成后, 控制软件再控制转台旋转, 如此类推, 直到采集完成. 通过数据自动采集并存储, 提高了实验效率.

1.2.2 成像软件

通过控制软件采集到的二维图像, 如果直接进行数据重建, 由于机械误差导致的旋转中心与探测器中心线偏差, 会使得重建图像模糊, 严重时会使重建结果失去意义. 因此, 需通过先计算出样本的旋转中心位置, 然后在重建过程中进行校正, 才能够得到高质量的三维图像. 本成像软件中采用了一种由粗到细的旋转中心定位方法, 该方法结合 X 射线计算机断层成像领域中的基于质心轨迹的旋转中心计算方法^[18] 和基于重建图像均方差的旋转中心定位方法, 能针对散射较弱的样本, 实现自动、快速、精确的旋转中心定位^[16]. 该方法包括两步: 第一步先选出样本较清晰的一幅正弦图, 在该正弦图上计算每个角度质心的位置, 所有角度质心位置的平均值即为样本旋转中心位置, 但是由于物体存在散射, 这一步仅能得到一个粗旋转中心值, 精度较差; 第二步将粗旋转中心值附近的区域设置为旋转中心搜索区间, 在此区间中, 对选出的正弦图进行多次重建, 其中像素灰度均方差最大的重建图像对应的旋转中心值即为精确的旋转中心位置^[16]. 通过实验验证, 散射较弱时, 该方法计算旋转中心的精度达到 1/4 像素, 能够满足高精度三维图像重建的需要.

计算出旋转中心位置后, 成像软件自动进行三维重建. 重建过程采用常用的滤波反投影 (Filtered back projection, FBP) 技术^[19-20], 主要包括滤波和反投影两步操作. 重建过程通过公式: $f(x, y) = \frac{1}{2} \int_0^{2\pi} d\theta \int_{-\infty}^{+\infty} |v| G(v, \theta) e^{i2\pi vt} dv |_{t=x \cos \theta + y \sin \theta}$ 实现, 该式表明, 变换到频域的二维图像通过斜坡函数滤波后, 再反变换到时域进行 360° 的反投影. 公式中各参数的意义如图 3 所示, $f(x, y)$ 表示重建图像中坐标 (x, y) 处的像素值, 在激发成像中表示样本内的荧光分布, 在透射成像中表示样本内对光线的吸收系数分布; θ 表示投影角度; $G(v, \theta)$ 表示二维图像经过傅里叶变换后在频域中的函数值; $|v|$ 表示斜坡滤波函数.

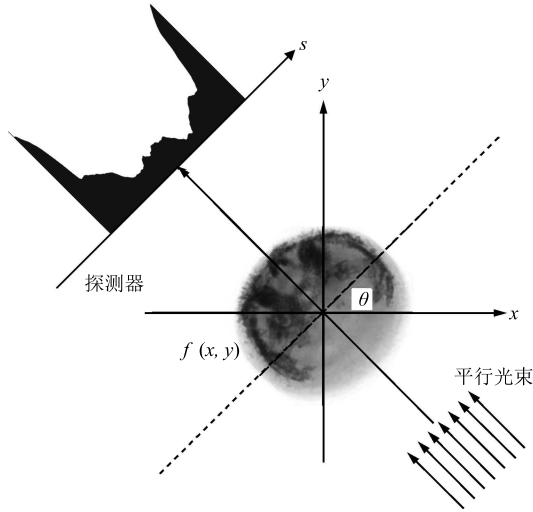


图 3 重建原理示意图

Fig. 3 Schematic of reconstruction

然而, OPT 成像过程中所产生的投影数据和三维重建数据都较大, 造成 OPT 三维重建速度较慢. 因此, 在重建过程中采用了 GPU 进行加速, 重建流程如图 4 所示, 首先 CPU 开辟内存区域, 并将样本投影数据、暗场图像等载入内存, 并完成暗场校正, 即将正弦图减去其所对应的暗场数据, 抑制探测器暗电流和环境光的影响. 然后 CPU 提取一幅正弦图并将其从内存拷贝至显存, 并使用 CUDA 自带的快速傅里叶变换库 CUFFT 对正弦图数据进行一维快速傅里叶变换, 得到频域数据, 并对频域数据利用斜坡函数进行并行滤波. 对滤波后的频域数据进行快速傅里叶反变换得到滤波后的正弦图. 接着, 对滤波后的时域正弦图数据进行 360° 的反投影, 即得到该正弦图对应断层重建图像, 将该层重建图像从显存拷贝至内存中. 依次重复上述操作, 直到重建出所有的正弦图, 最后将所有断层数据写入磁盘, 得到三维重建结果.

通过实验, 本成像软件对 360 幅 512×512 大

小的二维图像重建成 $512 \times 512 \times 512$ 大小的三维图像, 重建部分 (不包括硬盘读写部分) 仅需要 3.44 秒.

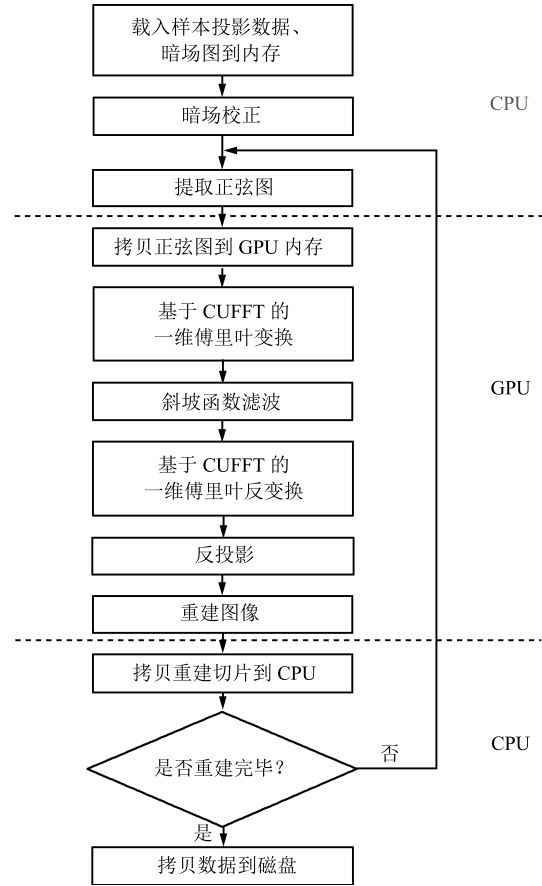


图 4 GPU 加速原理

Fig. 4 Schematic of GPU accelerate

重建出三维体数据后, 通过图像处理软件 3DMed 进行图像分析, 3DMed 是一款功能强大的图像分析处理软件, 由本团队开发, 通过 <http://www.mitk.net/> 可以免费下载.

2 光学投影断层成像系统活体实验操作流程

为了测试优化本系统, 先后开展了 60 多次实验. 实验流程如图 5 所示. 在样本制备部分, 由于果蝇易培养、繁殖快、个体小, 适合利用 OPT 成像系统进行观察. 因此, 系统采用果蝇蛹作为实验对象, 同时本部分将完成样本的清洗和固定操作. 数据获取主要完成系统检测及参数设定、样本位置调整和数据采集操作. 数据处理部分完成旋转中心校正、三维重建和数据分析. 下面将以表达绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 的果蝇为例, 详细描述进行激发 OPT 成像观察唾液腺的实验操作流程.

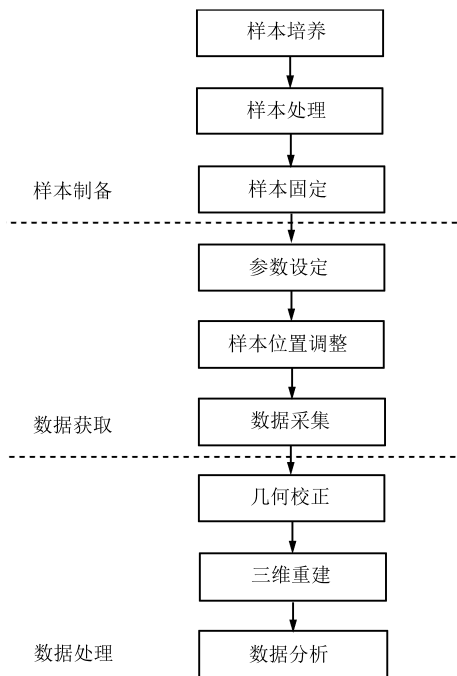


图 5 实验流程图
Fig. 5 Experimental flow chart

2.1 生物样本制备

野生型的果蝇都不表达 GFP, 不能用于 GFP 激发成像. 但是, 通过 UAS-GFP 和 act-Gal4 两个品种的果蝇杂交, 产生后代中有一半表达绿色荧光蛋白, 能实现激发成像^[21].
图 6(a) 为培养果蝇的培养管, 培养管放置于恒温恒湿箱中, 温度为 15℃, 相对湿度为 50%, 为防止果蝇感染霉菌, 培养箱每周消毒两次. 在该环境培养出来的果蝇蛹代谢慢、虫体大、唾液腺发育好, 适合果蝇蛹唾液腺观察实验.

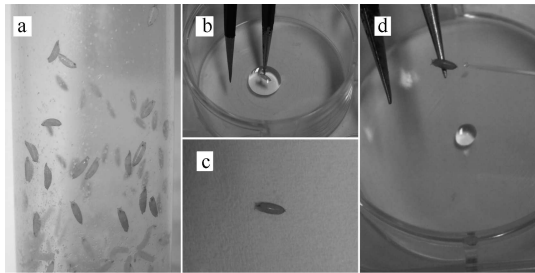


图 6 果蝇蛹实验样本制备
Fig. 6 Prepare the sample of drosophila melanogaster pupae for experiment

选出新羽化的成虫 UAS-GFP 雄性和 act-Gal4 雌性杂交. 选取成虫的时间在羽化后不超过 8 小时, 此时, 果蝇还未交配. 挑选的果蝇放置在新的培养

管中培养, 并做好标记. 果蝇交配六至七天后, 幼虫开始化蛹. 在果蝇三龄虫阶段是最好观察唾液腺的时候, 但由于此时果蝇幼虫不能固定, 所以不适合实验. 一般, 选取刚刚化蛹完成的果蝇蛹作为实验样本, 此时唾液腺还很明显. 选取的果蝇蛹先用纯净水洗去粘在果蝇蛹身体表面的食物, 以免影响实验观察, 如图 6(b) 所示. 清洗完的果蝇蛹应放置于无菌吸水纸上, 进行干燥, 如图 6(c) 所示. 虽然果蝇蛹的外形已经固定, 但其体内代谢还在进行, 唾液腺运动导致的伪影, 对实验结果影响很大^[22]. 为了使活体果蝇蛹观察实验有较好的效果, 在固定果蝇蛹的玻璃管中放置浸有气体麻醉剂的棉花. 通过气体麻醉剂, 使果蝇蛹代谢暂时减缓, 便于实验进行. 由于果蝇蛹代谢只是暂时减缓, 此时, 快速数据采集显得至关重要. 通过胶粘剂将果蝇蛹粘在内径为 0.5 mm 的硼硅酸盐玻璃管管口处, 如图 6(d) 所示. 调整果蝇蛹的位置, 使其正好竖直于玻璃管. 至此, 活体果蝇蛹观察实验样本制备完毕.

2.2 实验数据获取

将制备完毕的已表达 GFP 的样本固定于样本夹持器上. 绿色荧光蛋白在波长 395 nm 处出现一个最大吸收峰, 在 475 nm 处出现一个小的吸收峰^[23], 但是紫外波段的激发光对活体果蝇蛹有损伤. 因此, 本实验采用波长较长的 488 nm 激光器作为激发光源. 样本激发出的荧光在 509 nm 处最强, 在 540 nm 处是第二峰值, 由于滤波片存在一定的滤波带宽, 选择的滤波片的中心波长应离激发光波长较远, 故本实验选择中心波长为 540 nm 的窄带滤波片.
在实验进行之前, 首先, 检查所有设备的连接及整个系统的运行状况. 其次, 调节激光光束位置, 使其完全覆盖样本. 设定 EMCCD 参数, 积分时间为 0.2 s, 制冷温度为 -85℃, 增益值设定为 5; 激光器激发功率为 30.0 mW; 显微装置放大倍数约 4.0 倍; 旋转台步进角为 1°/步, 旋转角度为 360°. 然后, 利用控制软件将 CCD 探测器设置为视频拍照模式, 用于调整样本位置的实时显示. 手动调节显微装置的放大倍数, 使样本尽可能充满探测器成像区域, 然后调节样本的水平位置, 使样本前半部分 (靠近探测器方向) 在探测器聚焦范围内, 以便样本旋转 360°, 每个角度都有一个较清晰的二维图像^[7]. 最后, 数据采集并存储, 得到 360 幅二维荧光图像.

2.3 实验数据处理

利用成像软件自动计算采集得到的 360 幅二维荧光图像的旋转中心^[16], 然后进行三维重建, 最后用 3DMed 进行显示及数据分析. 图 7(a) 为活体果蝇蛹二维图像; 图 7(b)、7(c) 和 7(d) 分别为该重建三维体的横切面、冠状面和矢状面, 图中可以清晰

看到绿色荧光蛋白高表达区域, 即图中高亮区域. 图 7(e) 为该果蝇蛹的三维完全体绘制的可视化效果图^[24-25], 图中可以清晰分辨出唾液腺形状, 通过放大、缩小和任意面切割可以更清晰地看到唾液腺的尺寸及位置. 图 7(f) 为完全体绘制在与图 7(b) 同一断层处的图像. 由图可以看出, 内部同一断层处, 通过完全体绘制可以得到较灰度图像更完整的信息.

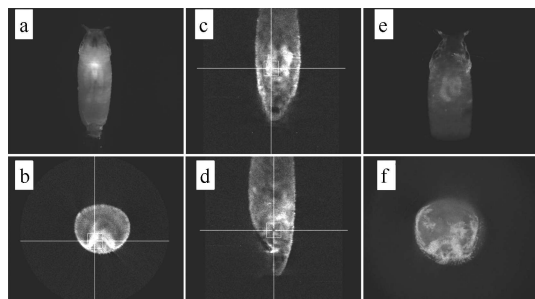


图 7 活体果蝇实验结果分析

Fig. 7 Experimental result analyze of drosophila melanogaster pupae

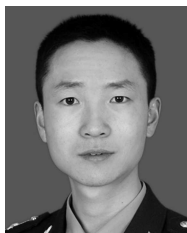
3 总结

光学投影断层成像技术是高精度显微成像, 各个部件的精度和实验的细节都影响着整个系统的最终成像质量. 本文通过大量实验总结两点在实验中遇到并解决的问题. 采集的二维图像重建后出现锥状环形伪影, 几乎不能辨别所重建物体. 这种情况极可能是由于旋转台未调平或毛细玻璃管微弯导致样本在探测器上投影倾斜, 可以通过样本定位模块的调平, 或减少毛细玻璃管裸露在夹持器外的长度, 解决上述问题. 二维图像中有不明暗点, 重建体出现环状噪声, 这种情况极可能是探测器成像区域存在坏点或污点, 或者是显微、滤波装置上的镜片存在污点, 可以通过坏点补偿或清洁污点进行解决. 光学投影断层成像领域比较新, 本课题组的下一步研究方向包括: 1) 四维活体成像; 2) 运动伪影校正; 3) 散射校正等.

References

- 1 Megason S G, Fraser S E. Imaging in systems biology. *Cell*, 2007, **130**(5): 784–795
- 2 Kobayashi H, Kawamoto S, Brechbiel M W, Jo S K, Hu X Z, Yang T X, Diwan B A, Waldmann T A, Schnermann J, Choyke P L, Star R A. Micro-MRI methods to detect renal cysts in mice. *Kidney International*, 2004, **65**(4): 1511–1516
- 3 Dong D, Tian J, Dai Y K, Yan G R, Yang F, Wu P. Unified reconstruction framework for multi-modal medical imaging. *Journal of X-Ray Science and Technology*, 2011, **19**(1): 111–126
- 4 Jan M L, Chuang K S, Chen G W, Ni Y C, Chen S, Chang C H, et al. A three-dimensional registration method for automated fusion of micro PET-CT-SPECT whole-body images. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 2005, **24**(7): 886–893
- 5 Robles F E, Wilson C, Grant G, Wax A. Molecular imaging true-colour spectroscopic optical coherence tomography. *Nature Photonics*, 2011, **5**(12): 744–747
- 6 Parrozzani R, Lazzarini D, Dario A, Midena E. In vivo confocal microscopy of ocular surface squamous neoplasia. *Eye*, 2011, **25**(4): 455–460
- 7 Sharpe J, Ahlgren U, Perry P, Hill B, Ross A, Hecksher-Sorensen J, Baldock R, Davidson D. Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies. *Science*, 2002, **296**(5567): 541–545
- 8 Thomas A, Newton J, Oldham M. A method to correct for stray light in telecentric optical — CT imaging of radiochromic dosimeters. *Physics in Medicine and Biology*, 2011, **56**(14): 4433–4451
- 9 Doran S J, Koerkamp K K, Bero M A, Jenneson P, Morton E J, Gilboy W B. A CCD-based optical CT scanner for high-resolution 3D imaging of radiation dose distributions: equipment specifications, optical simulations and preliminary results. *Physics in Medicine and Biology*, 2001, **46**(12): 3191–3213
- 10 Boot M J, Westerberg C H, Sanz-Ezquerro J, Cotterell J, Schweitzer R, Torres M, Sharpe J. In vitro whole-organ imaging: 4D quantification of growing mouse limb buds. *Nature Methods*, 2008, **5**(7): 609–612
- 11 Rieckher M, Birk U J, Meyer H, Ripoll J, Tavernarakis N. Microscopic optical projection tomography in vivo. *PLoS One*, 2011, **6**(4): e18963
- 12 Bassi A, Fieramonti L, D'Andrea C, Mione M, Valentini G. In vivo label-free three-dimensional imaging of zebrafish vasculature with optical projection tomography. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, **16**(10): 100502
- 13 Chen L L, McGinty J, Taylor H B, Bugeon L, Lamb J R, Dallman M J, French P M. Incorporation of an experimentally determined MTF for spatial frequency filtering and deconvolution during optical projection tomography reconstruction. *Optics Express*, 2012, **20**(7): 7323–7337
- 14 Fauver M, Seibel E J, Rahn J R, Meyer M G, Patten F W, Neumann T, Nelson A. Three-dimensional imaging of single isolated cell nuclei using optical projection tomography. *Optics Express*, 2005, **13**(11): 4210–4223
- 15 Vinegoni C, Pitsouli C, Razansky D, Perrimon N, Ntziachristos V. In vivo imaging of drosophila melanogaster pupae with mesoscopic fluorescence tomography. *Nature Methods*, 2008, **5**(1): 45–47
- 16 Dong D, Zhu S P, Qin C H, Kumar V, Stein J V, Oehler S, Savakis C, Tian J, Ripoll J. Automated recovery of the center of rotation in optical projection tomography in the presence of scattering. *IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics*, 2013, **17**(1): 198–204
- 17 Tian J, Xue J, Dai Y K, Chen J, Zheng J. A novel software platform for medical image processing and analyzing. *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine*, 2008, **12**(6): 800–812

- 18 Azevedo S G, Schneberk D J, Fitch J P, Martz H E. Calculation of the rotational centers in computed tomography sinograms. *IEEE Transactions on Nuclear Science*, 1990, **37**(4): 1525–1540
- 19 Wang Y, Wang R K. Imaging using parallel integrals in optical projection tomography. *Physics in Medicine and Biology*, 2006, **51**(23): 6023–6032
- 20 Kak A C, Slaney M. *Principles of Computerized Tomographic Imaging*. Philadelphia: Society for Industrial and Applied Mathematics, 2001
- 21 Sun B H, Xu P Z, Salvaterra P M. Dynamic visualization of nervous system in live drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, **96**(18): 10438–10443
- 22 Zhu S P, Dong D, Birk U J, Rieckher M, Tavernarakis N, Qu X C, Liang J, Tian J, Ripoll J. Automated motion correction for in vivo optical projection tomography. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 2012, **31**(7): 1358–1371
- 23 Tsien R Y. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 1998, **67**(1): 509–544
- 24 Yang F, Li Q D, Xiang D H, Cao Y, Tian J. A versatile optical model for hybrid rendering of volume data. *IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics*, 2012, **18**(6): 925–937
- 25 Xiang D H, Tian J, Yang F, Yang Q, Zhang X, Li Q D, Liu X. Skeleton cuts — an efficient segmentation method for volume rendering. *IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics*, 2011, **17**(9): 1295–1306



郭 进 哈尔滨理工大学自动化学院硕士研究生。2009 年获得哈尔滨理工大学自动化学院学士学位。主要研究方向为模式识别与智能系统。

E-mail: guojin@fingerpass.net.cn

(**GUO Jin** Master student at the School of Automation, Harbin University of Science and Technology. He received his bachelor degree from Harbin University of Science and Technology in 2009. His research interest covers pattern recognition and intelligent systems.)



刘 侠 哈尔滨理工大学自动化学院教授。2006 年获得哈尔滨工程大学自动化学院博士学位。主要研究方向为模式识别与智能系统。本文通信作者。

E-mail: liuxia@hrbust.edu.cn

(**LIU Xia** Professor at the School of Automation, Harbin University of Science and Technology. He received his

Ph.D. degree from Harbin Engineering University in 2006.

His research interest covers pattern recognition and intelligent systems. Corresponding author of this paper.)



董 迪 中国科学院自动化研究所助理研究员。2013 年获得中国科学院自动化研究所博士学位。主要研究方向为多模态分子影像, CT 成像。

E-mail: di.dong@ia.ac.cn

(**DONG Di** Assistant researcher at the Institute of Automation, Chinese Academy of Sciences. He received his

Ph.D. degree from Chinese Academy of Sciences in 2013. His research interest covers multi-modality molecular imaging and computed tomography imaging.)



朱守平 西安电子科技大学生命科学技术学院副教授。2010 年获得中国科学院自动化研究所博士学位。主要研究方向为 CT 成像, 多模态分子影像。

E-mail: zhushouping@life.xidian.edu.cn

(**ZHU Shou-Ping** Associate professor at the School of Life Science and Technology, Xidian University. He received his Ph.D. degree from Chinese Academy of Sciences in 2010. His research interest covers computed tomography imaging and multi-modality molecular imaging.)



杨 鑫 中国科学院自动化研究所研究员。2000 年获得天津大学精密仪器与光电工程学院博士学位。主要研究方向为模式识别, 图像处理和分子影像。

E-mail: xin.yang@ia.ac.cn

(**YANG Xin** Professor at the Institute of Automation, Chinese Academy of Sciences. She received her Ph.D. degree from Tianjin University in 2000. Her research interest covers pattern recognition, image processing, and molecular imaging.)



田 捷 中国科学院自动化研究所研究员。1992 年获得中国科学院自动化研究所博士学位。主要研究方向为模式识别, 医学图像处理和分子影像。

E-mail: tian@ieee.org

(**TIAN Jie** Professor at the Institute of Automation, Chinese Academy of Sciences. He received his Ph.D. degree from Chinese Academy of Sciences in 1992. His research interest covers pattern recognition, medical image processing, and molecular imaging.)