

# 取得高质显微镜图像的关键 - 惠更斯 Huygens STED 去卷积入门



**采图前** 注意采像频率，像素的大小要符合显微镜系统的采像频率，参考 <https://svi.nl/NyquistCalculator> 求出最理想的像素大小！付合这个条件图像是成功去卷积的关键，去卷积才能充分地提高图像的分辨率与信噪比，把显微镜硬件的分辨率发挥至最高

## Nyquist rate and PSF calculator

### Results

This is the parameter list used in this calculation:

Parameter	Value
Microscope type	STED
Numerical aperture	1.3
Excitation wavelength	488
Emission wavelength	520
Number of excitation photons	1
Lens immersion refractive index	1.515
Backprojected pinhole radius	250
STED Depletion wavelength	676
STED 3x percentage	0
STED Saturation factor	30
Specimen medium refractive index	1.45

The optical axis lays along z. Your Nyquist sampling is:

x: 18 nm  
y: 18 nm  
z: 175 nm

- Set your zooms and scanning steps so that each pixel covers a x-y area of 18 nm × 18 nm (or smaller)
- Calibrate and set your z-stepper so that it takes steps of 175 nm when acquiring a 3D stack (or smaller)

把 XY 像素大小跟据您系统算出来的 Nyquist sampling 而作出最接近的调整；三维图像的 Z 距离亦是同理作调整。



**采图时** 优先调整显微镜系统的 XYZ 采像频率，再考虑信噪比和其他条件



**采像后** 使用惠更斯 Huygens 去卷积

- 打开图像的途径
  - 徕卡用户可以由 Leica LAS X 输出 Export 到 Huygens 或
  - 直接在 Huygens 打开图像 File - Open 或使用
  - Huygens Image Feeder (Edit - Preferences - Directories - Enable ImageFeeder) 或
  - drag & drop (Huygens 2017)
- 检查参数，右击图像，选择参数编辑器 Parameter editor，参数必须是正确的，击 Set all verified - Accept
- A 右击图像选择最准确的 Deconvolution Wizard - Enter wizard (到步骤 4) 或
- B 右击图像使用惠更斯一键快速去卷积 Deconvolution express **NEW!** (到步骤 13)
- 使用 Deconvolution Wizard 用右箭头使用 Huygens 理论点扩散函数 Point Spread Function (PSF) 作去卷积
- 用户可选择对图像作剪裁与否；如果选择剪裁，可选 Launch the Cropper 用户主动裁剪，或用 Auto crop 自动裁剪图像中空白部分，把图像的空白体积减低，加快去卷积速度，但亦避免过度裁去信号
- Stabilization 可选 Auto stabilize，如果已经在去卷积前以 Object stabilizer 处理过的话，这一步可用右箭头跳过
- 可选择通道 Select channel，例如其中一个通道不必进行去卷积处理可跳过
- 测量信号 Inspecting the image histogram，击 Compute，注意过度暴光的像素 clipped voxels
- 背景的测量 Background estimation，可选自动 Auto 或主动 Manual 测量并输入背景的参数，击 Accept
- STED 图像一般信噪比低，用户可选择 GMLE\* 或 CMLE 算法进行去卷积处理
- 进行去卷积 Deconvolving the image，建议先使用默认参数检查结果与原始图像的分别，如果原图信噪比偏低，这个视窗的 signal to noise ratio SNR 可主动由用户调低（例如：由默认 SNR 20 大幅减低到 SNR 10 或更低）。原则上，信噪比调得越高，图像越清晰，但条件是原始图像的信噪比需与这个设定配合，用户透过 Wizard 的微调整，寻找最佳去卷积条件
- 完成一个通道后，新通道重复以上步骤 7-11；以上去卷积条件可保存成 Deconvolution template 重复使用或用于批量处理器 Batch Processor
- 当去卷积完成后，用户可以选择把图像导回徕卡 LAS X 或利用惠更斯的 Twin Slicer 作原图与去卷积结果的比较

\* GMLE 是为信噪比非常低的图像而设计，其他计算方法，参考 <https://svi.nl/RestorationMethod>



惠更斯 Huygens 去卷积例子：

惠更斯去卷积能对 STED 图像作出修复与优化，使 STED 图像在分辨率上与信噪比达到最大的提升。

图像来源：Oliver Kobler, Ulrich Thomas and Werner Zuschratter, CNI, Leibniz Institute Magdeburg, Germany

