

文章编号: 0258-7025(2010)11-2714-05

超分辨成像中荧光分子定位算法性能比较

全廷伟^{1,2} 曾绍群¹ 吕晓华^{1*}

¹ 华中科技大学武汉光电国家实验室(筹)生物医学光子学研究部
Britton Chance 生物医学光子学研究中心, 湖北 武汉 430074
² 湖北第二师范学院数学与计量经济学院, 湖北 武汉 430205

摘要 超分辨成像已成为活细胞结构和功能成像的关键工具, 荧光分子定位是超分辨成像过程中不可缺少的步骤。从超分辨成像角度研究各种荧光分子定位算法性能具有重要的意义。选择 5 种典型的荧光分子定位算法: 质心法、广义质心法、高斯拟合、解线性方程组和极大似然法, 以定位精度和定位时间来评价所选择算法的性能。结果表明, 1) 高斯拟合、极大似然法和广义质心法能高精度对荧光分子定位, 不受荧光分子所在子区域提取的影响; 2) 质心法和解线性方程组法能应用于图像在线分析, 但定位精度较低, 受子区域提取影响较大; 3) 当两个荧光分子位于一个衍射斑时, 采用这 5 种算法的定位精度都会急剧下降。

关键词 荧光显微镜; 超分辨成像; 荧光分子定位; 定位算法

中图分类号 TH742 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20103711.2714

Comparison of Algorithms for Localization of Single Fluorescent Molecule in Super Resolution Imaging

Quan Tingwei^{1,2} Zeng Shaoqun¹ Lü Xiaohua¹

¹ Britton Chance Center for Biomedical Photonics, Wuhan National Laboratory for Optoelectronics, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China
² College of Mathematics and Economics, Hubei University of Education, Wuhan, Hubei 430205, China

Abstract Super resolution imaging technique has become a key tool in imaging the structure and function of living cells. Localization of single fluorescent molecule is an integral part of super resolution imaging. From the point of view of super resolution imaging, a rigorous comparison of the performance of the different algorithms under experimental conditions is necessary. In this paper, five commonly used localization algorithms: centroid method, generalized centroid method, Gaussian fitting, fluoroBancroft method, and maximum likelihood method are investigated, and how well these algorithms work is clarified. The results show: firstly, Gaussian fitting, generalized centroid method and maximum likelihood method are high localization precision method and have been slightly influenced by extracting sub-window. Secondly, centroid method and fluoroBancroft method could be applied in on-time imaging, however, they have low localization precision and are influenced by extracting sub-window. Thirdly, for the five algorithms, the localization precision is abruptly decreased when there are two molecules in a diffraction spot.

Key words fluorescent microscopy; super resolution imaging; localization for single fluorescent molecule; localization algorithm

1 引 言

近年来,超分辨成像技术实现了在分子水平下对活细胞精细结构的观察,成为生物结构和功能成像极其重要的工具^[1~7]。光敏化定位显微镜

(PALM)是一种典型的超分辨成像技术,在 PALM 成像过程中,首先利用一种波长的激光激活少量荧光分子,少到激活分子稀疏分布足以保证每个衍射斑至多只包含一个激活荧光分子的程度。再用另一

收稿日期:2010-07-05; 收到修改稿日期:2010-08-20

基金项目:国家自然科学基金(30927001)及高等学校学科创新引智计划资助课题。

作者简介:全廷伟(1980—),男,博士研究生,主要从事生物医学光子学方面的研究。E-mail:qtw1003@sina.com

* 通信联系人。E-mail:xhly@mail.hust.edu.cn

种波长的激光激发和漂白这些被激活的荧光分子，激发态荧光分子能够发射光子。根据光子的空间分布信息，确定其精确位置。当激活的荧光分子都被定位与漂白之后，再进行下一次激活，直到所有的荧光分子被定位与漂白。一幅超分辨图像由若干荧光分子位置叠加获得^[8~10]。显然，荧光分子定位是超分辨成像过程中不可缺少的一环。另外，荧光分子定位精度 σ 是决定超分辨图像的空间分辨率的一个重要因素，定位算法的优劣对超分辨图像质量有重要的影响。

荧光分子定位不仅是超分辨成像不可缺少的，在其他方面也应用广泛。这导致大量定位荧光分子的方法被提出，包括质心法(CM)^[11~13]、高斯拟合法(GF)^[12,13]和极大似然法(MLM)^[14,15]等，并对这些算法的性能进行了详细比较^[13]。采用仿真手段生成图像，以荧光分子定位精度作为指标，指出质心法和高斯拟合法的优势与不足^[16]。对探测器、图像压缩和各种噪声对荧光分子定位精度影响的分析表明绝大多数算法在合适的实验条件下，均能达到纳米级的定位精度^[17]。这些工作对实际应用采用合适的算法有积极的意义，同时也为进一步设计更好的算法提供了必要的基础。然而，超分辨成像对算法的要求与其他应用存在差异，具体表现在：1) 考虑荧光分子定位精度的同时，需要对定位的速度有一定的要求，毕竟一幅超分辨图像由数十万个荧光分子构成^[3~5]；2) 荧光分子所在子区域的提取是否影响算法的定位效果；3) 分析算法能够对距离多近的两个荧光分子定位有利于提高超分辨成像的时间分辨率^[3,4]，因为每次尽可能多地定位荧光分子将缩短成像时间。对于应用于超分辨成像的新方法，例如广义质心法(GCM)^[17]和解线性方程组法(FBM)^[18]，均能实现实时处理。

本文比较了 5 种常用于超分辨成像的算法：质心法、广义质心法、高斯拟合法、解线性方程组法与极大似然法的性能。在不同水平的信噪比和荧光分子偏移条件下，展示各种算法对荧光分子的定位能力，然后给出两荧光分子的距离与定位精度之间的关系，比较每种算法定位单个荧光分子所需要的平均时间。最后基于每种算法的特点，指出影响它们性能表现的一些原因。

2 方 法

先用荧光分子成像模型和噪声模型产生仿真图像，再分别用 5 种算法对每次产生的仿真图像集进

行处理，其结果作为比较这些算法性能的依据。

2.1 成像模型与噪声模型

在不考虑荧光分子偏振和离焦的情况下^[19,20]，单个荧光分子成像模型能用点扩展函数表示。因点扩展函数与二维高斯函数的相似性^[21]，探测器上像素 (i, j) 处接收的平均光子数(光强)可表示为

$$I_{i,j} = A \exp\left[-\frac{(i-x_0)^2 + (j-y_0)^2}{2\delta^2}\right] + b, \quad (1)$$

式中 (x_0, y_0) 为荧光分子位置， A 和 b 分别为信号的峰值和背景噪声的强度， δ 为高斯函数的核宽度。由于光信号在探测器上的成像过程中，引入散粒噪声，像素 (i, j) 处接收到 q 个光子的概率表示为

$$P_f(i, j) = \frac{\exp(-I_{i,j}) I_{i,j}^q}{q!}, \quad (2)$$

根据(2)式，若 $I_{i,j}$ 已知，可以通过仿真方法得到图像中每个像素里的光子数。仿真模拟基于最基本的光学系统，其参数设置如下：波长为 500 nm，数值孔径为 1.4，系统放大倍数为 100 倍，像素边长为 $7.5 \mu\text{m}$ ， δ 与这些参数的关系可见文献^[21]。信号的信噪比为^[22]

$$R_{\text{SN}} = I_{\text{peak}} / \sqrt{I_{\text{peak}}^2 + 10}, \quad (3)$$

式中 I_{peak} 为光斑的峰值强度，10 为设置的背景噪声强度。

2.2 定位算法

2.2.1 质心法

质心法^[11~13]利用荧光分子成像模型圆对称性质，通过加权平均方法获得荧光分子的位置。若图像用矩阵 \mathbf{I} 表示，荧光分子沿 x, y 轴方向的位置分别为

$$C_x = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n (x_i I_{i,j})}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n (I_{i,j})}, \quad (4)$$

$$C_y = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n (y_i I_{i,j})}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n (I_{i,j})}, \quad (5)$$

式中 x_i 表示像素 (i, j) 在 x 轴方向的坐标， y_i 表示像素 (i, j) 在 y 轴方向的坐标， n 表示提取图像区域的大小。

2.2.2 广义质心法

广义质心法^[17]是对质心法进一步调整，采用迭代不断消除提取区域对定位精度的影响。以前一次质心法确定的荧光分子位置所在的像素为中心，在图像中提取子区域，通过子区域的信号，获得新的荧光分子的位置，再一次提取子区域，如此循环直到荧光分子的位置稳定为止。其具体操作为：1) 提取图像的子区域；通过质心法获得荧光分子的位置

$(x_k, y_k), k = 1, 2, \dots$ 分别为荧光分子在整幅图像中 x 和 y 方向的坐标。2) 计算荧光分子新的位置: 对 (x_k, y_k) 取整运算得到 $([x_k], [y_k])$, $[\cdot]$ 表示取整, 以 $([x_k], [y_k])$ 为中心, 提取长和宽为 n 个像素的图像子区域, 按 (4), (5) 式计算荧光分子在子区域的位置。其中 (x_i, y_i) 为偏移提取子区域中心的坐标。荧光分子新的位置为 $(x_{k+1}, y_{k+1}) = ([x_k] + C_x, [y_k] + C_y)$ 。3) 重复步骤 2) 直到荧光分子的位置趋于稳定或超过迭代步数时停止。最后得到的迭代值为荧光分子位置。

2.2.3 高斯拟合法

高斯拟合法^[12,13] 在弱信号水平下能保持较高的定位精度, 从而成为超分辨成像中应用最广泛的一种方法^[3~5]。在理想状态下, 荧光分子成像模型可用一个二维高斯模型表示

$$I(x, y) = A \exp \left[-\frac{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2}{\delta^2} \right] + b, \quad (6)$$

式中 $I(x, y)$ 为像素 (x, y) 处的理论光强, 调整参数使理论光强逼近观察信号, 即通过 (6) 式拟合提取子区域光强分布得到荧光分子的位置 (x_0, y_0) 。

2.2.4 解线性方程组法

解线性方程组法^[18] 是在知道荧光分子成像模型与背景噪声强度的情况下, 导出一个线性方程组, 通过求解线性方程组获得荧光分子精确位置。若荧光分子的位置为 (x_0, y_0) , (x, y) 处的理论光强也可用 (6) 式表示, 具体推导参见文献[16]。为简化线性方程组的表达, 记 $P_i^2 = 2\delta^2 \ln(\langle I_i \rangle - N_B)$, $\alpha_i =$

$$\frac{1}{2}(x_i^2 + y_i^2 + P_i^2), \mathbf{B} = \begin{pmatrix} x_1 & y_1 & 1 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ x_N & y_N & 1 \end{pmatrix}, \text{其中 } \delta^2 \text{ 由光}$$

学系统确定, N_B 为实际计算的背景噪声强度, (x_i, y_i) 为像素的位置, $\langle I_i \rangle$ 为像素 (x_i, y_i) 处观察的光强, 则荧光分子位置为

$$\begin{pmatrix} x_0 \\ y_0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix} (\mathbf{B}^T \mathbf{B})^{-1} \mathbf{B}^T \begin{pmatrix} \alpha_1 \\ \vdots \\ \alpha_N \end{pmatrix}. \quad (7)$$

2.2.5 极大似然法

极大似然法^[14,15,23] 基于荧光分子的发射模型, 调整参数(包括荧光分子的位置), 使得光强的空间联合分布达到最大。若设像素 (i, j) 处检测到 q 个光子概率为

$$P(I_{i,j} = q) = \frac{I_{i,j}^q \exp(-I_{i,j})}{q!}, \quad (8)$$

可用二维高斯函数逼近, 如(1)式所示。

令 $q_{i,j}$ 表示像素 (i, j) 处检测的光子数。使光强的空间联合分布概率 $\ln[\Pi P(I_{i,j} = q_{i,j})]$ 达到最大。由(1)式所估计的参数均大于 0 可以得到优化问题

$$\min L = \left(\sum_{1 \leq i, j \leq n} I_{i,j} \right) - \sum_{1 \leq i, j \leq n} [q_{i,j} \log(I_{i,j})],$$

$$A > 0, x_0 > 0, y_0 > 0, \delta > 0, b > 0 \quad (9)$$

求解(9)式得到荧光分子的精确位置 (x_0, y_0) 。

3 结果与讨论

从超分辨图像处理角度, 先分析信噪比、荧光分子偏移子区域中心和两荧光分子距离这些因素与定位结果的关系, 然后给出每种算法定位单个荧光分子所需要的平均时间。

3.1 荧光分子偏移与信噪比对定位精度的影响

对于给定的信噪比, 每次产生 200 帧单个荧光分子 $60 \text{ pixel} \times 60 \text{ pixel}$ 图像, 分子的位置在图像中心像素里随机确定^[12], 以平均定位精度来衡量各种算法对荧光分子的定位能力。由图 1(a) 可见, 极大似然法和高斯拟合法定位精度明显优于质心法和线性方程组法, 这一结论与文献[13~18, 23] 相符。其原因在于: 荧光分子可在提取子区域中心像素的任意位置, 而不是在中心像素的正中心, 即质心法的假设存在缺陷, 而高斯拟合法与极大似然法通过迭代方法克服了这一缺陷。解线性方程组法定位效果较差, 主要是在构造线性方程组过程中, 需要对背景噪声和信号进行精确的估计^[18]。即使估计误差很小, 但由于误差需要通过取对数运算, 极大地影响了方程组的结构。由图 1(b) 可见, 当荧光分子偏移提取子区域中心 1 个像素时, 质心法和解线性方程组法的定位精度显著降低, 而其他 3 种方法定位精度依然保持不变。这进一步证实了质心法的定位精度与提取子区域引入的偏差有关。而解线性方程组法, 原理上可以克服这一偏差, 但在实际计算中, 荧光分子偏移子区域的中心意味着处于弱信号的区域进一步增加, 从弱信号中分离噪声和有用信号变得困难, 导致线性方程组的结构失真更严重。广义质心法是用迭代不断调整子区域的选取, 直到荧光分子处于子区域的中心时停止, 因而广义质心法能够有效地消除提取子区域引入的偏差。极大似然法和高斯拟合法的模型考虑了荧光分子偏移子区域的中心像素这一情形, 通过迭代能够精确找到荧光分子的位置。

3.2 荧光分子距离对其定位精度的影响

为了分析荧光分子距离对定位精度的影响, 按

如下方式生成图像,一个荧光分子位于截取子区域中心,另一个荧光分子偏移子区域的中心范围为75~600 nm,而在仿真图像中一个衍射斑的直径为300 nm。位于区域中心荧光分子定位的结果,必然受到另一个荧光分子空间光强分布的影响。其影响程度对于不同算法是不同的。图2中,当 $R_{SN}=3$ 和 $R_{SN}=7$ 时,随着荧光分子的距离增加,定位荧光分子误差均是先增加后减少,特别在高信噪比信号情形下更明显。其次,每种算法所对应定位精度的变化幅度存在明显的差异。极大似然法与高斯拟合法定位精度随着荧光分子间距离的变化非常显著,表明这两种方法分离信号与噪声能力强,能够有效识别信号模式偏移二维高斯函数的情形。相比而言,

质心法与广义质心法在低信噪比水平下,定位精度差异不大,表明它们识别信号与噪声的能力较弱。而对于解线性方程组法,定位精度随着分子间的距离变化都介于质心法和高斯拟合法之间,原因在于解线性方程组法是基于二维高斯函数能够刻画荧光分子成像模型。当信号模式偏移二维高斯函数时,会存在模型误差,所以定位精度变化幅度比质心法大。另外由信号与背景噪声区分导致构造的方程组失真带来的误差,将掩盖模型误差,使得荧光分子定位变化幅度小于高斯拟合法。综上所述,所有算法都无法克服荧光分子距离对其定位的影响。消除这种影响的前提是要知道提取的子区域包含多少个荧光分子成像信息。

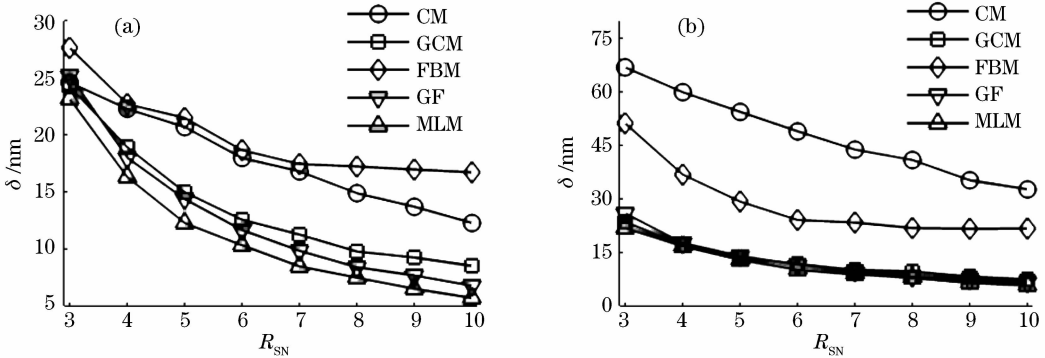


图1 截取子区域中心与荧光分子所在位置重合(a)及相差1个像素(b)时,不同算法的定位精度随 R_{SN} 的变化
Fig. 1 Localization precision versus R_{SN} by using different algorithms which are corresponding to single fluorescent molecule locating in (a) and 1 pixel deviation (b) from the center of extracting sub-window

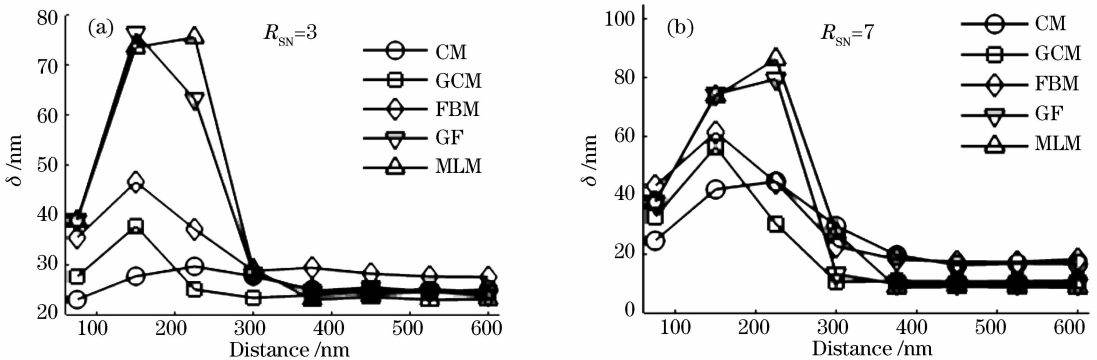


图2 两个荧光分子间的距离对不同算法定位精度的影响

Fig. 2 Localization precision versus distance between the fluorescent molecule pairs by using different algorithms

3.3 算法复杂性

荧光分子定位所耗时间是评价算法优劣的一个重要指标,提高荧光分子定位速度是实时成像的重要选择。如表1所示,除高斯拟合与极大似然法外的3种算法都可以用于荧光分子的实时成像,其中质心法速度最快,因为它只要对子区域的像素的光强进行简单的代数运算。极大似然法定位荧光分子

速度最慢,原因在于在求解非线性优化问题时,每次迭代都需要复杂的运算。追求高精度荧光分子定位速度往往是以牺牲定位时间为代价的。若采用高斯拟合法甚至极大似然法对超分辨进行实时成像,需要采用并行算法对图像进行批处理^[23,24]。表1实验运行环境为 Intel Core 2 Duo GPU@2.20 GHz,使用软件为 Matlab 7.0。

表 1 各种算法定位单个分子所需时间平均值与标准差

Table 1 Mean and standard deviation of time consumption of localization for single fluorescent molecule

Algorithm	CM	GCM	GF	FBM	MLM
Mean /ms	0.05	0.20	3.00	0.40	5.60
Standard deviation /ms	0.05	0.02	0.30	0.15	2.00

4 结 论

在超分辨成像过程中,对各种定位算法进行定量比较。高斯拟合法与极大似然法的定位精度最高,且提取的子区域对算法定位精度的影响不大,但是这两种算法所需的定位时间较长。质心法和解线性方程组法虽能快速定位荧光分子,但精度较差。广义质心法有较高的定位精度,同时不失定位速度优势。其次,以上 5 种算法都无法克服荧光分子间的距离对其定位精度的影响。因而,处理高密度荧光分子定位仍需设计新的算法。

参 考 文 献

- S. W. Hell, J. Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy [J]. *Opt. Lett.*, 1994, **19**(11): 780~782
- M. G. L. Gustafsson. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, **102**(37):13081~13086
- S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, M. D. Mason. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy [J]. *Biophys. J.*, 2006, **91**(11):4258~4272
- E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat *et al.*. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, **313**(5793):1642~1645
- M. Bates, M. J. Rust, B. Huang *et al.*. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy [J]. *Nat. Methods*, 2006, **3**:793~795
- Deng Xiaoqiang, Wang Guiying, Xu Zhizhan. 3-D superresolution pupil filter [J]. *Chinese J. Lasers*, 2001, **A28**(5):459~462
邓小强,王桂英,徐至展. 三维超分辨光瞳滤波器[J]. *中国激光*, 2001, **A28**(5):459~462
- Cheng Ya, Chen Jianfang. Breaking the diffraction limit using silica nanoparticles with exotic nonlinear optical properties [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2009, **46**(8):35~40
程 亚,陈建芳. 利用具有奇异非线性光学特性的纳米粒子突破光学衍射极限[J]. *激光与光电子学进展*, 2009, **46**(8):35~40
- Mao Zhengle, Wang Chen, Chen Ya. Superresolution far-field fluorescence bio-imaging: breaking the diffraction barrier [J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(9):1283~1307
毛峥嵘,王 琛,程 亚. 超分辨远场生物荧光成像—突破光学衍射极限[J]. *中国激光*, 2008, **35**(9):1283~1307
- S. W. Hell. Far-field optical nanoscopy [J]. *Science*, 2007, **316**:1153~1158
- B. Huang, M. Bates, X. Zhuang. Super-resolution fluorescence microscopy [J]. *Annu. Rev. Biochem.*, 2009, **78**(5828):993~1016
- G. M. Lee, A. Ishihara, K. A. Jacobson. Direct observation of Brownian motion of lipids in a membrane [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, **88**(14):6274~6278
- R. E. Thompson, D. R. Larson, W. W. Webb. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes [J]. *Biophys. J.*, 2002, **82**(5):2775~2783
- M. K Cheezum, W. F Walker, W. H Guilford. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles [J]. *Biophys. J.*, 2001, **81**(4):2378~2388
- F. Aguet, De Van D. Ville, M. Unser. A maximum-likelihood formalism for sub-resolution axial localization of fluorescent nanoparticles [J]. *Opt. Express*, 2005, **13**(26):10503~10522
- R. J. Ober, S. Ram, E. S. Ward. Localization accuracy in single-molecule microscopy [J]. *Biophys. J.*, 2004, **86**(2):1185~1200
- B. C. Carter, G. T. Shubeita, S. P. Gross. Tracking single particles: a user-friendly quantitative evaluation [J]. *Phys. Biol.*, 2005, **2**(1):60~72
- A. J. Berglund, M. D. McMahon, J. J. McClell *et al.*. Fast, bias-free algorithm for tracking single particles with variable size and shape [J]. *Opt. Express*, 2008, **16**(18):14064~14075
- S. B. Andersson. Localization of a fluorescent source without numerical fitting [J]. *Opt. Express*, 2008, **16**(23):18715~18724
- Wu Qinghua, Wang Guiying, Xu Zhizhan. Influence of polarization of the incident light on imaging of the RSNOM [J]. *Acta Optica Sinica*, 2003, **23**(5):513~516
武清华,王桂英,徐至展. 入射光的偏振特性对反射式近场光学显微镜成像结果的影响[J]. *光学学报*, 2003, **23**(5):513~516
- Wang Jinyuan, Wang Chen, Liu Li *et al.*. Imaging three-dimensional single molecule orientations by defocused microscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, **27**(5):766~770
王金媛,王 琛,刘 力等. 离焦系统下的单分子三维取向研究[J]. *光学学报*, 2007, **27**(5):766~770
- B. Zhang, J. Zerubia, J. C. Olivo Marin. Gaussian approximations of fluorescence microscopy point-spread function models [J]. *Appl. Opt.*, 2007, **46**(10):1819~1829
- M. Elbaum, P. Diament. SNR in photocounting images of rough objects in partially coherent light [J]. *Appl. Opt.*, 1976, **15**(9):2268~2275
- T. Quan, P. Li, F. Long *et al.*. Ultra-fast, high-precision image analysis for localization-based super resolution microscopy [J]. *Opt. Express*, 2010, **18**(11):11867~11876
- G. Quan, T. Sun, Y. Deng. Fast reconstruction method based on common unified device architecture (CUDA) for micro-CT [J]. *J. Innovative Opt. Health Sci.*, 2010, **3**(1):39~43