

基于 sCMOS 相机的超分辨定位成像技术

桂丹^{1,2,3}, 商明涛^{1,2}, 黄振立^{1,2}

¹华中科技大学-武汉光电国家实验室(筹), Britton Chance 生物医学光子学研究中心, 湖北 武汉 430074;

²华中科技大学工程科学学院, 生物医学光子学教育部重点实验室, 生物医学工程协同创新中心, 湖北 武汉 430074;

³武汉软件工程职业学院电子工程学院, 湖北 武汉 430205

摘要 超分辨定位成像是一种代表性的超分辨成像技术, 弱光探测器是该技术不可或缺的组成部分。和传统的串行输出 EMCCD 相机相比, 并行输出 sCMOS 相机具备成像视场大、成像速度快和读出噪声低等优点, 为超分辨定位成像带来了新的机遇, 可在视频速率成像和大视场成像中取得明显成效。基于 sCMOS 相机的超分辨定位成像技术面临着高速相机带来的海量数据, 需要解决数据传输、存储和计算等多环节的问题。从超分辨成像技术及相机的发展着手, 讨论了基于 sCMOS 相机的超分辨定位成像技术的发展现状以及面临的机遇与挑战。

关键词 生物光学; 超分辨成像; sCMOS 相机; 定位成像; 大视场

中图分类号 TH742

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0207016

Super-Resolution Localization Microscopy with Scientific Complementary Metal Oxide Semiconductor Camera

Gui Dan^{1,2,3}, Shang Mingtao^{1,2}, Huang Zhenli^{1,2}

¹*Britton Chance Center for Biomedical Photonics, Wuhan National Laboratory for Optoelectronics-Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China;*

²*Ministry of Education Key Laboratory for Biomedical Photonics, Collaborative Innovation Center for Biomedical Engineering, School of Engineering Sciences, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China;*

³*School of Electronic Engineering, Wuhan Vocational College of Software and Engineering, Wuhan, Hubei 430205, China*

Abstract Super-resolution localization microscopy (SRLM) is a representative super-resolution imaging technology. Low-light detector is an essential component in SRLM. Compared with traditional electron multiplying charge coupled device (EMCCD) cameras using serial output, scientific complementary metal oxide semiconductor (sCMOS) cameras with parallel output provide simultaneously large field of view, high imaging speed and low read noise, thus bring new opportunities for SRLM, especially on achieving video-rate imaging and large field of view imaging. At the same time, SRLM based on sCMOS camera is also facing several challenges which are mainly originated from the high-speed camera, including but not limited to massive data transmission, storage, and analysis. This paper introduces the principle and development of SRLM, and discusses the current status, opportunities and challenges of SRLM based on sCMOS camera.

Key words biotechnology; super-resolution microscopy; scientific complementary metal oxide semiconductor camera; localization microscopy; large field of view

OCIS codes 180.2520; 100.6640; 100.2960

收稿日期: 2017-10-08; 收到修改稿日期: 2017-11-03

基金项目: 国家自然科学基金(81427801, 61421064)、国家 973 项目(2015CB352003)

作者简介: 桂丹(1982—), 女, 博士研究生, 主要从事超分辨定位成像技术方面的研究。E-mail: gui_dan@163.com

导师简介: 黄振立(1976—), 男, 博士, 教授, 主要从事超分辨定位成像方法技术和仪器方面的研究。

E-mail: leo@hust.edu.cn (通信联系人)

1 引 言

光学显微镜是人类科学史上的伟大发明,是生物学中重要的研究工具^[1]。光学显微镜经历了从简单显微镜到复合显微镜的发展历程。1873年,德国物理学家 Abbe 首先给出了光学显微镜的分辨率极限公式^[2] $d = \lambda / (2NA)$,其中 d 为最小分辨距离, λ 为光线的波长, NA 为物镜的数值孔径。从该公式可以看出,减小入射光的波长或增加物镜的数值孔径,都可以提高光学显微镜的分辨率。20世纪30年代发明的电子显微镜就是通过减小入射光波长来提高空间分辨率的。但是,电子显微镜的制样要求很苛刻,不能用于活体样品的成像,也很难对多种功能结构进行识别^[3]。因此,需要针对生命科学研究的特点发展新型超高分辨光学成像技术。

21世纪初以来,随着荧光成像理论和荧光标记技术的高速发展,诞生了几种新型光学显微成像技术,打破了光学显微镜约 200 nm 的分辨率极限,因此被称为超分辨成像技术。在已经报道的超分辨成像技术中,三种代表性的技术分别为受激发射损耗显微成像(STED)、饱和结构光照明显微成像(SSIM)和超分辨定位成像(SRLM)^[4]。2006年,超分辨成像技术被科学杂志评为年度十大科学进展。2008年,超分辨成像技术又被自然方法杂志评为年度最佳方法。

比较这三种典型超分辨成像技术的原理可以看出,SRLM 系统具有简单、使用方便、分辨率高的特

点,对普通的宽场荧光成像系统(尤其是全内反射荧光显微成像系统)进行改装后就可实现该技术,成本较低。因此,SRLM 已成为超分辨成像领域的重要研究方向^[5-6]。从原理可知,弱光探测器是 SRLM 技术不可或缺的组成部分。2009年发展起来的弱光探测器科研级互补金属氧化物半导体(sCMOS)相机具有高采集速率、大成像视场、高通量数据传输等优势,已成为 SRLM 领域非常有潜力的探测器^[7]。但是,其高数据采集模式带来的海量数据也为数据处理中的传输、存储和计算等环节带来了不同程度的挑战。本文首先介绍 SRLM 的成像原理和系统,然后结合弱光探测器技术,讨论基于 sCMOS 相机的 SRLM 技术的现状、机遇与挑战。

2 超分辨定位成像原理

2.1 成像原理

超分辨定位成像主要包括四个流程^[8-10]: 1) 通过光学或化学等控制手段,将密集标记的荧光分子进行稀疏随机激活; 2) 利用弱光探测器记录稀疏荧光信号; 3) 利用单分子定位算法处理稀疏荧光信号,得到荧光分子的精确空间位置; 4) 将以上过程循环数千甚至数万次,得到大量荧光分子的精确空间位置,并利用图像重建算法将这些空间位置呈现在一幅图中,得到一幅超分辨重建图(如图 1 所示)。从原理可知,在超分辨定位成像中,荧光信号的高效采集和荧光分子的精确定位都非常重要,直接影响到最终的超分辨重建结果。

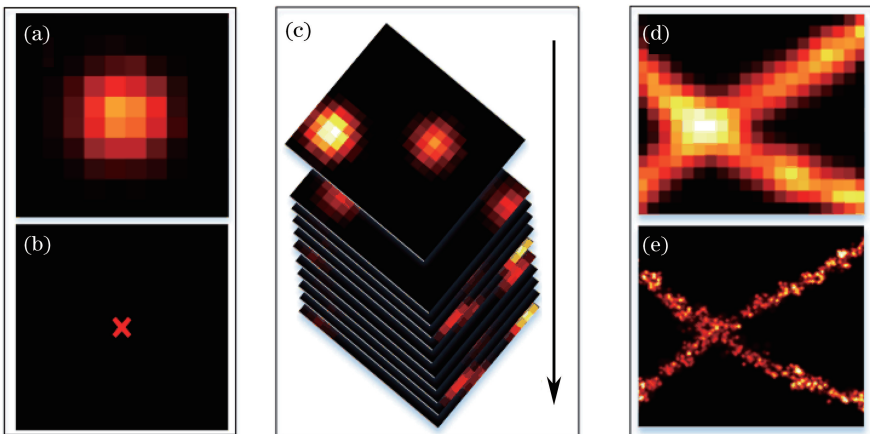


图 1 超分辨定位成像原理。(a)单分子荧光成像形成的艾里斑;(b)经过单分子定位后获取的荧光分子的纳米级位置信息;

(c)空间上密集标记的荧光分子在时间上的分离;(d)利用传统荧光成像方法获得的单分子荧光图;(e)超分辨图像

Fig. 1 Principle of super-resolution localization microscopy. (a) Airy disk from single molecule fluorescence imaging;

(b) localized single molecule position; (c) separation of densely labelled fluorescence molecules into multiple frames;

(d) single molecule fluorescence image from conventional fluorescence microscopy;

(e) image from super-resolution localization microscopy

2.2 数据处理

研究人员希望超分辨定位成像能够对单分子荧光图像进行高速数据采集,并利用单分子定位算法对图像数据进行实时分析。要实现实时超分辨定位成像,需要数据分析的速度高于数据采集的速度,从而使得实验人员能够实时观测成像结果,并能根据结果对成像系统进行优化,提高实验成功率。

单分子定位算法决定了定位的精度和速度,是超分辨成像数据处理中的关键因素。针对不同的生物样品及生物实验过程中需要关注的效果,可采用不同的单分子定位算法。稀疏荧光分子定位的几种典型算法为极大似然法、高斯拟合、质心法、广义质心法和解线性方程组等,这些算法也被统称为稀疏单分子定位算法^[10-11]。高斯拟合、极大似然法和广义质心法对荧光分子的定位精度较高,但定位速度相对较慢,适合对精度要求较高的场合;质心法和线性方程组法的定位精度较低,但定位速度较高,能方便地应用于图像的在线分析。当有两个及以上的荧光分子位于同一个衍射斑时,稀疏单分子定位算法就不再适合了,需要采用高密度定位算法。目前这些高密度定位算法可以处理不同分子密度的情形,但数据的处理速度远小于数据的获取速度^[10-11]。3B算法能处理最高的分子密度,但同时也是耗时最长的算法。

2.3 主要性能指标

超分辨定位成像的空间分辨率取决于荧光分子的定位精度和奈奎斯特采样率^[12]。荧光分子的定位精度不仅决定于单分子定位算法本身的精度,还会随荧光信号强度的增加而提升^[13]。选择发光亮度高的荧光分子,或者提高光学系统的信号收集效率,都可以有效提高超分辨定位成像的空间分辨率。奈奎斯特采样定理表明超分辨定位成像系统的最小分辨距离为荧光分子间距的两倍。在单位面积内检测到足够多的荧光分子,对系统的空间分辨率来说至关重要。一幅最终的超分辨重建图一般需要数千幅甚至数万幅原始图像,其目的就是要达到足够高的荧光分子检出密度。

超分辨定位成像时间分辨率是采集原始图像所需要的总时间。在保证空间分辨率的前提下,超分辨定位成像的时间分辨率可以通过减少单帧原始图的采集时间^[14],或者提高单帧原始图像的荧光分子检测密度来实现^[15]。前者需要采用高速弱光相机,后者则需借助于高密度定位算法。

超分辨定位成像基于宽场成像,在激发功率能

够满足成像要求的前提下,成像视场的大小主要取决于成像所用的弱光探测器的像阵面的大小(有效像素个数)以及单个像素对应的样品尺寸,并不受限于该技术的空间分辨率或时间分辨率^[16]。在超分辨定位成像中,为了达到较好的信号强度和采样率,单个像素通常对应于100 nm左右的样品尺寸^[17]。因此,使用像阵面更大的弱光探测器(如高达2048 pixel×2048 pixel的sCMOS相机),更有助于实现大视场超分辨定位成像,其成像视场可达200 μm×200 μm。

2.4 技术挑战

相比于单色成像,多色成像有利于研究更复杂的生物结构。利用荧光探针标记细胞内的不同区域进行多色超分辨成像,可以分析不同区域标记物的空间结构和相互关系。这对分析细胞内的复杂结构具有重要的指导意义。目前报道的几种多色超分辨定位成像技术,比如基于光谱技术、不同激活光、分光技术等多色超分辨定位成像技术,它们的原理各不相同,各有优劣^[18]。此外,细胞固定也是多色超分辨定位成像的一个比较突出的问题,需要根据不同的研究目标来选择合适的成像方法^[18]。

近年来,高速成像也是科研工作者的研究重点。使用高速弱光探测技术^[14]及高密度定位技术^[15,19]有望实现高速超分辨定位成像。高速弱光相机(如sCMOS相机)在带来高采集速率的同时,也带来了海量数据分析及大数据流的传输、存储等方面的挑战。高密度定位技术严重受限于高密度定位算法的速度。高密度定位算法因其复杂的计算模型,至今仍未找到一种既能满足高定位精度要求,又能提高计算速度的算法。另一方面,对于普通生物样品而言,在成像过程中,几乎普遍存在大部分稀疏发光而小部分高密度发光的情况。因此,发展包含高密度和低密度的混合密度定位算法,有望成为超分辨定位成像领域的研究重点。

除了以上所述的多色成像及高速成像,超分辨成像的另一个重要方向就是三维成像。光学显微成像领域面临着两大挑战,即“看得细”和“看得深”。同时具备“看得细”和“看得深”这两项功能的光学显微成像技术有一定难度。细胞本身是三维结构,将超分辨定位成像技术从早期的二维成像扩展到三维成像,具有非常重要的研究意义。2008年,Huang等^[20]利用单分子荧光的像散特点,在原有的超分辨定位显微镜的荧光探测光路中插入一个柱透镜,使来自于不同轴向位置的单分子荧光信号产生不同程

度的形变而得以分辨,从而实现了三维超分辨定位成像。此后,三维超分辨定位成像受到了研究人员的密切关注^[21-22]。目前超分辨定位成像技术的最大成像深度只有 2 μm 左右,在组织样本中的应用依然是一个挑战^[5]。

3 超分辨定位成像系统

3.1 光 路

相对于其他的超分辨成像技术,超分辨定位成像技术的光路原理相对简单,也更容易实现^[17,23]。目前,超分辨定位成像系统的信号检测光路基本一样,其信号激发光路分为两类,一类是基于分立光学元件的自由空间耦合光路,另一类是基于光纤的耦合光路。与自由空间耦合光路相比,光纤耦合光路的结构更为简单紧凑^[16]。下面以光纤耦合光路为例,简要介绍超分辨定位成像系统的光路。

如图 2 所示,激发光和激活光分别经过电动快门(SH1、SH2)、中性衰减片(ND1、ND2)和反射镜组(M1 和 M2, M3 和 M4)后,再经透镜(L1、L2)聚

焦耦合进光纤合束器的输入端。其中:电动快门和中性衰减片分别用于控制样品端激光的开关和光强;反射镜组用来调节激光光轴的方向,从而将激光高效地耦合进输入光纤,降低损耗。光纤合束器将多路激光耦合后,从输出光纤输出,先后经过透镜 L3 和 L4、L5 和 L6 组成的扩束系统,然后经透镜 L7 和物镜,聚焦到样品端。其中,采用两组扩束系统是便于调节样品端的光斑大小,从而控制成像视场。样品端的荧光分子发出的荧光被同一个物镜收集,先后经过二向色镜(DM)、长通滤色片(F)、筒镜(TL)以及透镜 L8 和 L9 组成的扩束系统后到达探测器。二向色镜和长通滤色片的作用是滤除荧光中的激光和其他杂散光,提高成像信噪比;透镜 L8 和 L9 组成的扩束系统作为一个二级放大光路,可以实现最佳像素尺寸的匹配,以保证合适的采样率。值得一提的是,上述系统中的光纤合束器可以通过改变输入光纤的数量来实现多波长或同波长多路激发光的耦合,从而满足多色成像或大视场成像高功率照明的要求。

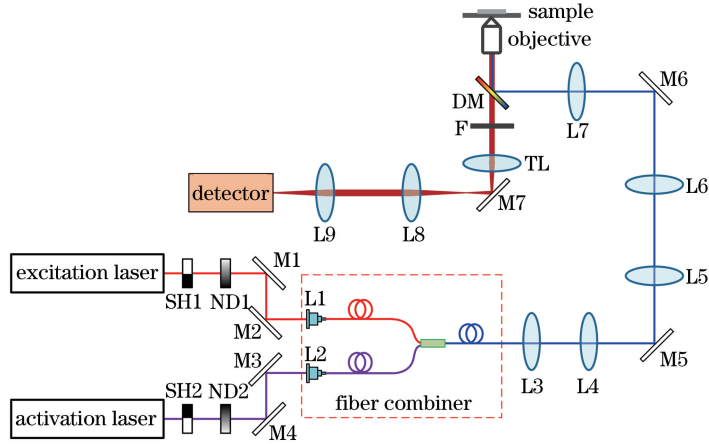


图 2 基于光纤合束器的超分辨定位成像系统

Fig. 2 Optical setup for super-resolution localization microscopy based on fiber combiner

3.2 探测器

超分辨定位成像与其他的基于单分子成像的方法一样,会受到单分子微弱荧光信号的限制。所以,弱光探测器的选择对成像质量至关重要。在弱光成像条件下,相机的读出噪声通常限制了其最佳成像表现。电子倍增电荷耦合装置(EMCCD)相机利用电子倍增技术有效降低了读出噪声,使其能够探测到单分子发出的微弱荧光信号。EMCCD 相机凭借其高量子效率、低噪声和高读出速度的优点,成为大多数研究者的首选。然而,电子倍增过程也会引入额外噪声,并且该噪声将相机的有效量子效率降低为原来的一半^[24]。

近几年发展起来的 sCMOS 相机具有噪声低、读出速度高和像素阵列大等优点,已成为一款被迅速推广的弱光探测器。sCMOS 相机输出数据的方式为并行读出,在高达 560 MHz 的读出速度下仍可以保持 1~2 e 的读出噪声。近几年,已有多篇文献研究了 sCMOS 相机能否用于超分辨定位成像这一课题^[7,24-26]。结果显示,某些商品化 sCMOS 相机不仅可以用于超分辨定位成像,而且在成像信噪比、单分子定位精度等关键指标方面的表现比传统 EMCCD 相机更好。

几款典型弱光探测器的主要参数如表 1 所示。

表 1 几种典型弱光探测器的主要参数

Table 1 Main parameters of several typical low light detectors

Camera	Pixel	Pixel size / μm	Quantum efficiency /%	Full frame rate / (frame $\cdot\text{s}^{-1}$)	Read noise /e	Extra noise factor	Estimated price
iXon 897 (Andor)	512 \times 512	16	95	35	< 1	$\sqrt{2}$	\$ 35000
Neo (Andor)	2560 \times 2160	6.5	57	100	1	1	\$ 20000
Flash 4.0 (Hamamatsu)	2048 \times 2048	6.5	72	100	1.3	1	\$ 20000

3.3 探测器噪声模型以及噪声依赖定位算法

在超分辨定位成像应用中,由于信号水平较弱,弱光探测器的噪声会在很大程度上影响定位精度,从而降低成像分辨率。传统定位算法只考虑了EMCCD和sCMOS共有的噪声:散粒噪声和读出噪声。散粒噪声通常用泊松分布表示,读出噪声通常用高斯分布表示。事实上,每种探测器都有其独特的噪声。其中,EMCCD在电子倍增过程中引入了额外噪声。由于sCMOS每个像素单元是一个独立的探测单元,所以整个像素矩阵对相同信号的响应略有不同,从而引入了像素依赖噪声。在稀疏单分子定位中,为了提高分辨率,研究者们针对不同的探测器应用不同的噪声模型,开发出了不同的定位算法^[27-29]。Chao等^[27-28]研究了EMCCD独有的额外噪声模型,并将其应用到超分辨成像中,分辨率提高了2倍。耶鲁大学的黄方等提出使用预先测量的噪声矩阵来减小sCMOS探测器像素依赖噪声对定位的影响^[26]。对高密度算法而言,由于其算法本身的复杂性,暂时没有考虑不同探测器的噪声。

4 基于sCMOS相机的超分辨定位成像技术

4.1 技术发展简史和现状

sCMOS相机作为并行读出相机,具有像阵面大、速度快的明显优势,有望在不牺牲空间分辨率的前提下,加快成像速度,增大成像视场。但是,sCMOS相机也存在噪声高的问题。所以,基于超分辨成像对弱光探测能力的严苛要求,sCMOS相机能否应用于超分辨定位成像实现高速度、大视场的超分辨成像,还需要进行深入研究。

2010年,Quan等^[24]基于点扩散方程和噪声模型,结合相关文献报道的数值模拟方法,研究了三种具有代表性的弱光探测器CCD、EMCCD和sCMOS在超分辨定位成像中的应用潜力及不足,推测sCMOS可以成为超分辨定位成像的新型探测器。2011年,Huang等^[7]率先将sCMOS探测器应

用于超分辨定位成像实验中,并定量比较了该探测器与常用EMCCD探测器成像性能的差别。结果发现,对于目前常用的荧光蛋白,其单分子荧光信号已远高于探测器的电子噪声,单分子荧光成像的质量主要受限于光子散粒噪声,而不是以前认为的探测器读出噪声。因此,sCMOS完全可以用于超分辨定位显微成像。

2012年,Saurabh等^[26]比较了三款商品化sCMOS相机与两款商品化EMCCD相机在单分子荧光检测中的能力,认为sCMOS相机完全可以胜任单分子检测的任务。随后,Long等^[25]发展了一种基于图像信噪比和定位精度的实验方法,用于定量表征弱光探测器在单分子检测和定位中的成像性能。他们利用该方法比较了三款商品化探测器的成像表现,结果表明,在常见的单分子信号范围内,商品化的sCMOS比EMCCD的成像性能更佳。此后,越来越多的研究人员将sCMOS相机应用于超分辨定位成像领域^[29-30]。

4.2 视频速率超分辨定位成像

相机成像视场的大小和最大读出帧率之间存在权衡关系,即成像视场越小,读出帧率越高。2013年,Huang等^[29]通过缩小成像视场至13 $\mu\text{m}\times$ 13 μm (即相机的像素阵列约为128 pixel \times 128 pixel),将sCMOS的读出帧率提高到1600 frame/s。他们将高速图像获取与高密度定位算法相结合实现了视频速率超分辨定位成像,每秒可以提供32帧超分辨图像。此外,他们还发展了针对sCMOS相机的高斯拟合定位算法,该算法对sCMOS相机的像素依赖噪声进行了修正,可以得到精确的单分子定位结果。

4.3 大视场超分辨定位成像

要实现大视场超分辨定位成像,除了需要具有大面积探测阵列的探测器,还需要满足大视场成像的照明需求,即均匀照明和照明强度的需求。一般的超分辨定位成像的照明光斑多为高斯分布或接近于高斯分布,这就意味着视场中间区域的光强较强,而边缘区域的光强较弱,从而导致视场中不同成像

区域的成像质量不一致,进而影响到最终的超分辨率重建图像的质量。此外,在超分辨率定位成像中,为了获得较高的信噪比,样品端的功率密度一般要求在 $1\sim 10\text{ kW/cm}^2$ 。在样品端功率密度为 5 kW/cm^2 的前提下,如果要实现 $200\text{ }\mu\text{m}\times 200\text{ }\mu\text{m}$ 的成像视场,就需要样品端的激光功率高达 2 W ,如此高功率的激光器在市场上很难找到。因此,要想实现大视场超分辨率定位成像,必须要解决均匀照明和样品端激光功率的问题。

2016年,Douglass等^[31]利用微透镜阵列对超分辨率光学系统进行了改进,利用功率为 2 W 、波长为 642 nm 的高功率激光器最终实现了 $100\text{ }\mu\text{m}\times 100\text{ }\mu\text{m}$ 的大视场超分辨率定位成像。但是,由于该系统的成像视场受限于单个激光的功率,因而难以进一步提高。

2017年,Zhao等^[16]提出了基于光纤合束器的大视场超分辨率定位成像技术。该技术利用光纤合束器耦合多路同波长的激发光,解决了大视场成像样品端激光功率不足的问题;同时,通过电机振动将输出光纤进行高频振动,结合方形多模光纤的使用实现了整个成像视场的均匀照明。另外,方形多模光纤可以输出方形照明光,充分利用了sCMOS相机的方形探测阵列,最终实现了成像视场高达 $220\text{ }\mu\text{m}\times 220\text{ }\mu\text{m}$ 的超分辨率定位成像。

4.4 机遇与挑战

4.4.1 数据传输

高速成像探测器将会产生巨大的数据流和海量数据,对数据的传输、存储及分析都提出了很大挑战。而高密度分子定位需要使用复杂的分析模型,更进一步加重了数据分析的负担。

超分辨率定位成像技术在进行稀疏分子成像时,每一幅超分辨率图都需要成千上万幅原始图像中的分子累积起来才能重建,所以在数据的传输过程中,大量原始图像的传输就是一个需要解决的难题。对于动态细胞研究,成像时间相当长。就算是采用串行输出结构的EMCCD探测器进行图像采集,也会产生大量原始数据,而sCMOS相机则将产生近 1 GB/s 的数据流。这些数据需要占据大量的存储空间,对存储提出了更高要求,增加了系统成本。此数据流远超普通计算机中常用数据传输端口USB 3.0(约 300 MB/s)的数据传输速率,也远高于计算机硬盘的存储速率(约 100 MB/s)。因此,sCMOS相机一般需要额外配置Cameralink采集卡以实现数据的实时传输。

根据Cameralink接口标准协议,数据传输模式分为BASE、MEDIUM和FULL三种。对于X、Y、Z三根低压差分数据线,每根传输 28 bit 数据,一共传输 $28\times 3=84\text{ bit}$ 数据。本课题组测试用相机为Flash 4.0 V2相机,采用deca模式进行数据传输,每秒传输数据量为 $85\text{ M}\times 80\text{ bit}$,仅使用 4 bit 控制位来传达帧信息及行信息,为最大数据传输模式。图像的采集方式与平常所见的帧头顺序采集不同,相机从中线开始,分top和bottom。也就是在上部分做加计数,下部分做减计数。因此进行数据存储时也应注意这个问题,才能将整幅图像进行准确重构,否则将会读出乱码。

4.4.2 数据存储

对于近 1 GB/s 的原始图像数据流,需要在后续进行超分辨率定位处理,这将给计算机数据处理带来极大的压力。经过分析,对于稀疏荧光分子样品,每帧原始图内荧光分子所占的区域极少,而且稀疏分布。因此,在超分辨率图像处理步骤中,可先进行子区域提取,即只提取有效荧光点所在的区域,对于背景这样大面积的无用数据不传输。这样将极大地削减数据从相机端传输到计算机端的数据量,有效减轻数据传输压力,即使是普通的传输接口,如USB 3.0亦可满足传输要求。对于计算机端来讲,无需存储大量的原始图像,只需对提取的有效荧光点子区域进行定位。对于稀疏分子定位,这样的数据处理流程可以实现实时成像。

对于稀疏分子超分辨率定位显微成像,数据处理流程可以采用现场可编程门阵列(FPGA)做子区域提取,结合图形加速器(GPU)加速定位的方案来实现,也可以采用多核GPU方式进行数据加速处理。

4.4.3 数据处理

虽然稀疏荧光分子可以实现实时图像处理,但对于复杂的样品,完全做到荧光分子稀疏分布并不容易。而要做到荧光分子的高密度分布,则需要配置大功率激光器,不仅价格昂贵,对实验操作要求也较高,稍有不妥,极易导致样品发生光损伤。对于活细胞研究而言,这种影响不容忽视。

近年来,高密度分子定位算法成为了超分辨率领域众多科研人员研究的重点。增强激活光可以提高单幅原始荧光图中发光分子的密度,减少超分辨率重建图所需的原始图数量。然而,对于高密度分子定位成像而言,虽然减少了总帧数,但在每帧图像中,荧光点分布密度相对较高,也有可能存在重叠的荧光分子。高密度定位成像需要复杂的定位模型才能做到有效定

位,这给计算带来了较大压力,导致计算速度成为制约高密度分子定位成像进一步发展的因素。

5 结束语

基于 sCMOS 相机的超分辨定位成像技术为生物医学研究和活细胞成像领域带来了机遇。采用并行输出接口的 sCMOS 相机具有采集速度快、传输数据量大、成像视场大、读出噪声低等特点。同时,高速成像面临着海量数据存储、大数据流传输及高速数据分析等方面的挑战。对于稀疏荧光分子定位成像,采用不同的处理平台和合理的算法,目前可做到高精度实时图像处理。但是对于高密度定位算法而言,复杂的定位模型导致分析速度缓慢。近几年,科研工作者在改进定位算法和引入不同计算平台进行硬件加速等方面着手,使得高密度定位算法在定位精度和定位速度方面都有明显提升。

基于 sCMOS 相机的超分辨定位成像技术虽然在大视场成像应用方面已经有了初步的实验演示,实现了大视场超分辨定位成像。但是,由于光学系统的不完美或样品本身的不均匀,采集到的原始图像会受到像差的影响而导致分辨率下降。因此,有必要针对性地进一步开发适用于大视场成像的像差校正方法^[32]。

另一方面,sCMOS 相机为超分辨定位成像领域带来了新机会,可以实现视频速率和大视场成像,有望推动生命科学及其他领域的新进展。相信经过研究人员的不懈努力,基于 sCMOS 相机的超分辨定位成像技术将会得到更好的推广和应用。

参 考 文 献

- [1] Stephens D J, Allan V J. Light microscopy techniques for live cell imaging [J]. *Science*, 2003, 300(5616): 82-86.
- [2] Sheppard C J R. Resolution and super-resolution [J]. *Microscopy Research and Technique*, 2017, 80(6): 590-598.
- [3] Hawkes P W, Spence J C H. *Science of microscopy* [M]. New York: Springer, 2007.
- [4] Huang B, Babcock H, Zhuang X W. Breaking the diffraction barrier: Super-resolution imaging of cells [J]. *Cell*, 2010, 143(7): 1047-1058.
- [5] von Diezmann A, Shechtman Y, Moerner W E. Three-dimensional localization of single molecules for super resolution imaging and single-particle tracking [J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(11): 7244-7275.
- [6] Sauer M, Heilemann M. Single-molecule localization

microscopy in eukaryotes [J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(11): 7478-7509.

- [7] Huang Z L, Zhu H Y, Long F, *et al.* Localization-based super-resolution microscopy with an sCMOS camera [J]. *Optics Express*, 2011, 19(20): 19156-19168.
- [8] Yang J, Tian C P, Zhong G S. Stochastic optical reconstruction microscopy imaging technique and application [J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(3): 0318005.
杨洁, 田翠萍, 钟桂生. 随机光学重构显微成像技术及其应用 [J]. *光学学报*, 2017, 37(3): 0318005.
- [9] Huang B, Bates M, Zhuang X W. Super-resolution fluorescence microscopy [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, 78(1): 993-1016.
- [10] Small A, Stahlheber S. Fluorophore localization algorithms for super-resolution microscopy [J]. *Nature Methods*, 2014, 11(3): 267-279.
- [11] Sage D, Kirshner H, Pengo T, *et al.* Quantitative evaluation of software packages for single-molecule localization microscopy [J]. *Nature Methods*, 2015, 12(8): 717-724.
- [12] Shroff H, Galbraith C G, Galbraith J A, *et al.* Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics [J]. *Nature Methods*, 2008, 5(5): 417-423.
- [13] Ober R J, Ram S, Ward E S. Localization accuracy in single-molecule microscopy [J]. *Biophysical Journal*, 2004, 86(2): 1185-1200.
- [14] Jones S A, Shim S H, He J, *et al.* Fast three-dimensional super-resolution imaging of live cells [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(6): 499-508.
- [15] Wang Y N, Quan T W, Zeng S Q, *et al.* PALMER: a method capable of parallel localization of multiple emitters for high-density localization microscopy [J]. *Optics Express*, 2012, 20(14): 16039-16049.
- [16] Zhao Z Y, Xin B, Li L C, *et al.* High-power homogeneous illumination for super-resolution localization microscopy with large field-of-view [J]. *Optics Express*, 2017, 25(12): 13382-13395.
- [17] van de Linde S, Löschberger A, Klein T, *et al.* Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes [J]. *Nature Protocols*, 2011, 6(7): 991-1009.
- [18] Pan L T, Hu F, Zhang X Z, *et al.* Multicolor single-molecule localization super-resolution microscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(3): 0318010.
潘雷霆, 胡芬, 张心正, 等. 多色单分子定位超分辨显微成像术 [J]. *光学学报*, 2017, 37(3): 0318010.
- [19] Zhu L, Zhang W, Elnatan D, *et al.* Faster STORM using compressed sensing [J]. *Nature Methods*,

- 2012, 9(7): 721-723.
- [20] Huang B, Wang W, Bates M, *et al.* Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy[J]. *Science*, 2008, 319(5864): 810-813.
- [21] Pavani S R P, Thompson M A, Biteen J S, *et al.* Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(9): 2995-2999.
- [22] Shtengel G, Galbraith J A, Galbraith C G, *et al.* Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(9): 3125-3130.
- [23] Gould T J, Verkhusha V V, Hess S T. Imaging biological structures with fluorescence photoactivation localization microscopy[J]. *Nature Protocols*, 2009, 4(3): 291-308.
- [24] Quan T W, Zeng S Q, Huang Z L. Localization capability and limitation of electron-multiplying charge-coupled, scientific complementary metal-oxide semiconductor, and charge-coupled devices for superresolution imaging [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, 15(6): 066005.
- [25] Long F, Zeng S Q, Huang Z L. Localization-based super-resolution microscopy with an sCMOS camera part II: Experimental methodology for comparing sCMOS with EMCCD cameras[J]. *Optics Express*, 2012, 20(16): 17741-17759.
- [26] Saurabh S, Maji S, Bruchez M P. Evaluation of sCMOS cameras for detection and localization of single Cy5 molecules [J]. *Optics Express*, 2012, 20(7): 7338-7349.
- [27] Chao J, Ward E S, Ober R J. Fisher information matrix for branching processes with application to electron-multiplying charge-coupled devices [J]. *Multidimensional Systems and Signal Processing*, 2012, 23(3): 349-379.
- [28] Chao J, Ram S, Ward E S, *et al.* Ultrahigh accuracy imaging modality for super-localization microscopy [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(4): 335-338.
- [29] Huang F, Hartwich T M P, Rivera-Molina F E, *et al.* Video-rate nanoscopy using sCMOS camera-specific single-molecule localization algorithms [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(7): 653-658.
- [30] Lin R S, Clowsley A, Baddeley D, *et al.* Single molecule localisation microscopy with sCMOS cameras [J]. *Biophysical Journal*, 2016, 110(3): 161a-162a.
- [31] Douglass K M, Sieben C, Archetti A, *et al.* Super-resolution imaging of multiple cells by optimized flat-field epi-illumination[J]. *Nature Photonics*, 2016, 10(11): 705-708.
- [32] Zhao Z Y, Zhang Z N, Huang Z L. Aberration characterization and correction in super-resolution localization microscopy[J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(3): 0318004.
- 赵泽宇, 张肇宁, 黄振立. 超分辨定位成像中的像差表征和校正[J]. *光学学报*, 2017, 37(3): 0318004.