

# 基于交替下降条件梯度的低光子数荧光寿命分析

张潇, 林丹樱\*, 牛敬敬, 刘雄波, 张娇, 于斌, 张炜, 屈军乐\*\*

深圳大学物理与光电工程学院光电子器件与系统(教育部/广东省)重点实验室, 广东 深圳 518060

**摘要** 发展适用于低光子数应用环境的荧光寿命分析方法对快速荧光寿命显微成像(FLIM)方法的发展和應用都具有重要意义。受高密度单分子定位显微成像中压缩感知算法的启发,将荧光寿命分析看成一个稀疏逆问题,提出了一种基于交替下降条件梯度(ADCG)的荧光寿命分析新方法,并通过对模拟数据和实验数据进行分析,验证了ADCG-FLIM算法即使在低光子数情形下依然能够较好地分析荧光寿命,从而有利于活细胞快速 FLIM 技术的发展和應用。

**关键词** 生物光学; 荧光寿命显微成像; 时间相关单光子计数; 低光子数; 荧光寿命分析; 交替下降条件梯度

**中图分类号** O436

**文献标志码** A

**doi:** 10.3788/CJL202047.0207022

## Low Photon Count Fluorescence Lifetime Analysis Based on Alternating Descent Conditional Gradient Method

Zhang Xiao, Lin Danying\*, Niu Jingjing, Liu Xiongbo, Zhang Jiao,  
Yu Bin, Zhang Wei, Qu Junle\*\*

*Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, College of Physics and Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China*

**Abstract** The development of fluorescence lifetime analysis method suitable for low photon count is of great significance for the development and application of fast fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). In this paper, we consider the fluorescence lifetime analysis, inspired by the compression sensing algorithm in high-density single molecule localization microscopy, as a sparse inverse problem, and we propose an alternating descent conditional gradient (ADCG) based method for fluorescence lifetime analysis. Through the analysis of simulation data and experimental data, we demonstrate that the ADCG-FLIM algorithm can be appropriately implemented to analyze fluorescence lifetime even in the case of low photon count, thereby benefiting the development and application of live cell fast FLIM.

**Key words** biotechnology; fluorescence lifetime imaging microscopy; time correlated single-photon counting; low photon count; fluorescence lifetime analysis; alternating descent conditional gradient method

**OCIS codes** 170.6920; 170.2520; 180.2520; 200.3050

## 1 引 言

荧光寿命显微成像(FLIM)通过探测样品中荧光分子的寿命分布和变化,来研究细胞微环境以及细胞中蛋白质分子间的相互作用等,在生物医学研究中得到了广泛应用<sup>[1]</sup>。荧光寿命是荧光分

子受到极短的脉冲激光激发后,发射荧光强度指数衰减到初始强度的  $1/e$  时所需的时间。荧光寿命与激发光强度、探针浓度、光漂白等无关,只在荧光分子与其他分子发生相互作用或周围微环境(如 pH 值、黏度等)发生改变时才会发生变化;因此,对荧光寿命进行测量就可以灵敏地反映这些

**收稿日期:** 2019-10-31; **修回日期:** 2019-11-25; **录用日期:** 2019-12-02

**基金项目:** 国家重点研发计划(2017YFA0700500)、国家自然科学基金(61775144,61975131,61525503)、广东省高等学校科技创新及团队项目(2015KJHZ002,2016KCXTD007,2014A030312008)、深圳市基础研究项目(JCYJ20170818144012025, JCYJ20170818141701667)

\* **E-mail:** dylin@szu.edu.cn; \*\* **E-mail:** jlqu@szu.edu.cn

过程,并可实现定量测量。FLIM中检测荧光寿命的方法有多种,其中时间相关单光子计数(TCSPC)<sup>[2]</sup>是目前应用最广泛的一种。TCSPC通过高重复频率脉冲反复激发荧光分子,使每一个周期至多只发射一个荧光光子,然后利用高灵敏度探测器和高精度计数电路探测每个到达的光子,并记录其相对于激发脉冲的到达时间,从而得到反映样品荧光衰减特征的数据集。但由于激励源和探测器等均存在响应时间,探测到的荧光衰减信号并不是呈单纯的指数衰减,而是指数衰减与仪器响应函数(IRF)的卷积,因而荧光寿命分析的主要任务,就是从测量得到的衰减数据中获取荧光分子的寿命。目前已有多种算法被用于荧光寿命数据的分析,如最小二乘(LS)拟合<sup>[3]</sup>、最大似然估计(MLE)<sup>[4]</sup>、相量法<sup>[5]</sup>、贝叶斯估计<sup>[6]</sup>等。其中,LS和MLE是最常用的分析方法。这两种方法在大样本(即采集了大量光子)情况下均能准确地获得荧光分子的寿命,但在低光子数情况下,由于样本量的缺失,分析时经常会带来较大误差。随着FLIM应用于活细胞实时监测需求的提高,发展适用于低光子数条件下的荧光寿命分析方法成为快速FLIM发展的关键之一。受高密度单分子定位显微成像中压缩感知算法的启发,本文提出了一种基于交替下降条件梯度(ADCG)的荧光寿命分析新方法,即ADCG-FLIM算法,通过对模拟数据和实验数据进行分析,得到了该算法即使在低光子数条件下依然能够较好地分析荧光寿命的结论,这一结论可促进快速FLIM技术的发展。

## 2 基本原理

### 2.1 TCSPC-FLIM 探测模型

TCSPC-FLIM的基本原理是采用高重复频率的脉冲激光激发荧光分子发射单个光子,TCSPC记录从脉冲激发到光子到达探测器的时间,然后形成不同时间到达的光子数的统计直方图。把TCSPC的每一次激发探测记为一次事件,由于激励源和探测器等均存在响应时间,因此TCSPC实际探测到的时间是每次事件的仪器响应时间与光子发射时间之和。尽管每次事件的仪器响应时间都不同,但在统计意义上仪器响应时间近似为高斯分布,可用仪器响应函数 $X_{\text{IRF}}(t)$ 表示( $t$ 为光子到达时间)。因此,TCSPC记录的光子数随时间的统计分布 $f(t)$ 可表示为荧光光子数的衰减曲线 $g(t)$ 与 $X_{\text{IRF}}(t)$ 的卷积,即

$$f(t | \tau) = g(t | \tau) * X_{\text{IRF}}(t) + b(t), \quad (1)$$

式中: $b(t)$ 为背景信号; $\tau$ 为荧光寿命。记 $\mu_{\text{IRF}}$ 为仪器响应函数的期望, $\sigma_{\text{IRF}}$ 为其标准差,则 $X_{\text{IRF}}(t)$ 的表达式为

$$X_{\text{IRF}}(t) = \exp[-(\mu_{\text{IRF}} - t)^2 / \sigma_{\text{IRF}}^2], \quad (2)$$

记 $T$ 为脉冲激发周期, $N$ 为时间通道数,则荧光光子数衰减曲线 $g(t)$ 的具体表达式为<sup>[7]</sup>

$$g(t | \tau) = \exp(-t/\tau) \left\{ \frac{\exp[T/(N\tau)] - 1}{1 - \exp(-T/\tau)} \right\}. \quad (3)$$

TCSPC-FLIM中荧光寿命分析的任务就是在真实荧光寿命未知的情况下,根据带噪声的观测数据和上述模型来估计荧光寿命 $\tau$ ,因此精确地估计荧光寿命对FLIM成像及其应用至关重要。目前常用的荧光寿命分析方法有LS-FLIM、MLE-FLIM等算法。

### 2.2 荧光寿命分析算法

#### 2.2.1 LS-FLIM 算法

LS用于荧光寿命分析的原理最为直观,即最小化观测数据 $y_i$ 和模型 $f(t | \tau)$ 之间的残差,使模型的输出尽可能地接近观测的数据。其残差,也就是损失函数 $l_1$ 为

$$l_1 = \sum_i \frac{[f(t | \tau) - y_i]^2}{\max(y_i, 1)}, \quad (4)$$

式中: $i$ 为荧光衰减曲线的时间通道; $y_i$ 为该时间通道的光子数。

若利用最小二乘原理令损失函数最小,此时得到的寿命 $\tau_*$ 即为所求的荧光寿命

$$\tau_* = \underset{\tau}{\operatorname{argmin}} l_1. \quad (5)$$

#### 2.2.2 MLE-FLIM 算法

MLE用于分析荧光寿命的基本原理是基于探测到的数据对应真实模型的输出概率最大。由于探测器的光子数统计服从泊松分布,因此探测到某一时间通道 $t_i$ 的观测值 $y_i$ 的概率为

$$p(y_i | \tau) = \frac{f(t_i | \tau)^{y_i} \exp[-f(t_i | \tau)]}{y_i!}. \quad (6)$$

基于总概率最大的最大似然模型为

$$p(\mathbf{y} | \tau) = \prod_i p(y_i | \tau) = \prod_i \frac{f(t_i | \tau)^{y_i} \exp[-f(t_i | \tau)]}{y_i!}, \quad (7)$$

式中: $\mathbf{y} = (y_1, y_2, \dots, y_N)$ 为探测到的信号序列。为了避免数值下溢,(7)式通常取其的对数形式,于是损失函数 $l_2$ 为

$$l_2 = -\ln P(\mathbf{y} | \tau) =$$

$$\sum_i \{f(t_i) - y_i \ln[f(t_i) + \beta]\} + c, \quad (8)$$

式中:  $c$  为常数项。(8)式中的  $\beta$  是为了保证取对数的值大于零而加入到公式中的, 这里取  $\beta = \exp(-9)$ 。(8)式有很多种数值求解方法, 但常用的是 Levenberg-Marquardt 算法<sup>[8]</sup>, 比起其他的求解方法, 其对初值的选择不敏感, 收敛快, 更加稳定和通用。

### 2.3 ADCG-FLIM 算法

如前所述, 荧光寿命分析的任务是要尽可能地 从带有噪声和仪器响应函数的探测信号中恢复出真实的寿命信息, 这其实就是一个逆问题。如果探测信号背后的真实信息是稀疏的, 那么这个问题就是稀疏逆问题。荧光寿命分析可以看成是一个稀疏逆问题, 这是因为荧光寿命探测的过程可看成是如下过程: 将一个对应寿命为  $\tau_i$  的真实信息看作一个激励源  $w_{\tau_i} \delta_{\tau_i}$  ( $w_{\tau_i}$  为对应寿命信息  $\tau_i$  的光子数), 脉冲激光的激发产生了随时间而变的荧光信号衰减并被 TCSPC 采样以时间通道记录, 从而得到该激励源的响应; 若有多个寿命信息同时存在(通常称为多个寿命“组分”), 此时荧光信号的衰减应为多个衰减过程的叠加, 则 TCSPC 采样的总衰减信号也等于单个寿命组分的衰减信号之和, 且光子数满足均匀性, 即

$$f(w_{\tau_1} \delta_{\tau_1} + w_{\tau_2} \delta_{\tau_2}) = w_{\tau_1} f(\delta_{\tau_1}) + w_{\tau_2} f(\delta_{\tau_2}). \quad (9)$$

考虑到荧光分子的衰减性质是不随时间而改变的, 因此荧光寿命的探测过程可以看作是一个线性时不变系统,  $f$  可表示成矩阵形式  $\Phi \mu$ 。其中:  $\mu$  代表真实的光子数和寿命信息(即  $\mu = \sum_i w_i \delta_{\tau_i}$ );  $\Phi$  为观测矩阵, 描述荧光寿命的探测过程。

因此, 考虑到噪声之后, 荧光寿命分析的任务就变成了从带有噪声  $b$  的探测信号  $y$  和构建的观测矩阵  $\Phi$  中恢复出真实寿命信息  $\mu_{\text{true}}$ , 即

$$y = \Phi \mu_{\text{true}} + b. \quad (10)$$

在上述寿命探测模型中, 一般荧光分子的寿命组分是极少的(常见的有单组分、双组分等), 即  $\mu_{\text{true}}$  是稀疏的。这是一个很重要的先验知识, 正是基于这个原因, 荧光寿命分析可以看成是一个稀疏逆问题。

源的稀疏性在实际的逆问题中是个非常重要且普遍的特性, 比如在随机光学重建显微(STORM)等单分子定位超分辨成像技术中<sup>[9]</sup>, 为了突破衍射极限, 常采用使荧光分子稀疏发光的策略, 通过对每

次探测得到的稀疏分子图像进行单分子定位来重构超分辨图像。针对这种成像技术, 目前已发展了多种定位算法, 其中基于 ADCG 的单分子定位算法 ADCG-STORM<sup>[10]</sup> 和 TVSTORM<sup>[11]</sup> 的效果较好。ADCG-STORM 在二维单分子高密度定位算法竞赛中<sup>[12]</sup> 名列第一。ADCG-STORM 通过改进条件梯度下降<sup>[13]</sup> 算法实现了二维单分子的定位, TVSTORM 则利用 ADCG-STORM 算法框架实现了三维单分子的定位。

受到超分辨算法 ADCG-STORM 和 TVSTORM 的启发, 本文提出了荧光寿命分析的新算法 ADCG-FLIM, 将寿命分析的优化问题简化为

$$\min l(\Phi \mu, y), \text{ subject to } \mu \geq 0, \mu(\Theta) \leq \rho, \quad (11)$$

式中:  $\Theta$  为寿命的空间;  $\mu(\Theta) \leq \rho$  保证了解的稀疏性, 相当于 L1 范数;  $\rho$  是平衡模型与数据保真度、稀疏解的参数,  $\rho$  越小, 对解的稀疏性的约束越强。

由于探测器对光子的采集满足泊松分布, 荧光寿命的损失函数选择最大似然模型

$$l(\Phi \mu, y) = \sum_i \{(\Phi \mu)_i - y_i \ln[(\Phi \mu)_i + \beta]\} + C, \quad (12)$$

式中:  $C$  是与寿命无关的常数项。

这意味着损失函数  $l(\Phi \mu, y)$  不是一个关于  $\mu$  的凸函数, 可能存在许多局部最优。ADCG 在经典条件梯度下降算法的基础上增加了在参数空间的非凸局部搜索, 全局条件梯度和非凸局部搜索的交替, 既利用了非凸规划算法的快速的局部收敛性, 又保留了与凸优化相关的稳定性和全局收敛性。因此, 本文将 ADCG 算法用于解决上述荧光寿命分析的优化问题, 发展了适用于荧光寿命数据分析的 ADCG-FLIM 算法, 其具体流程如图 1 所示。

ADCG-FLIM 结合基追踪、匹配追踪、非凸优化技术, 设计了寿命  $\tau$  和光子数  $w$  坐标交替下降, 其中子程序 nonconvex optimization 利用构建的荧光寿命衰减模型的梯度信息进一步减小损失函数, 更新寿命的支撑集。常用的基于一阶收敛的梯度下降的收敛速度不如二阶收敛的牛顿法, 但求解二阶海森矩阵的计算量非常大, 通过近似构造海森矩阵的拟牛顿法(L-BFGS-B)可以克服这一缺点<sup>[14]</sup>, 因此这里在子程序 nonconvex optimization 内部使用的是 L-BFGS-B 优化算法。

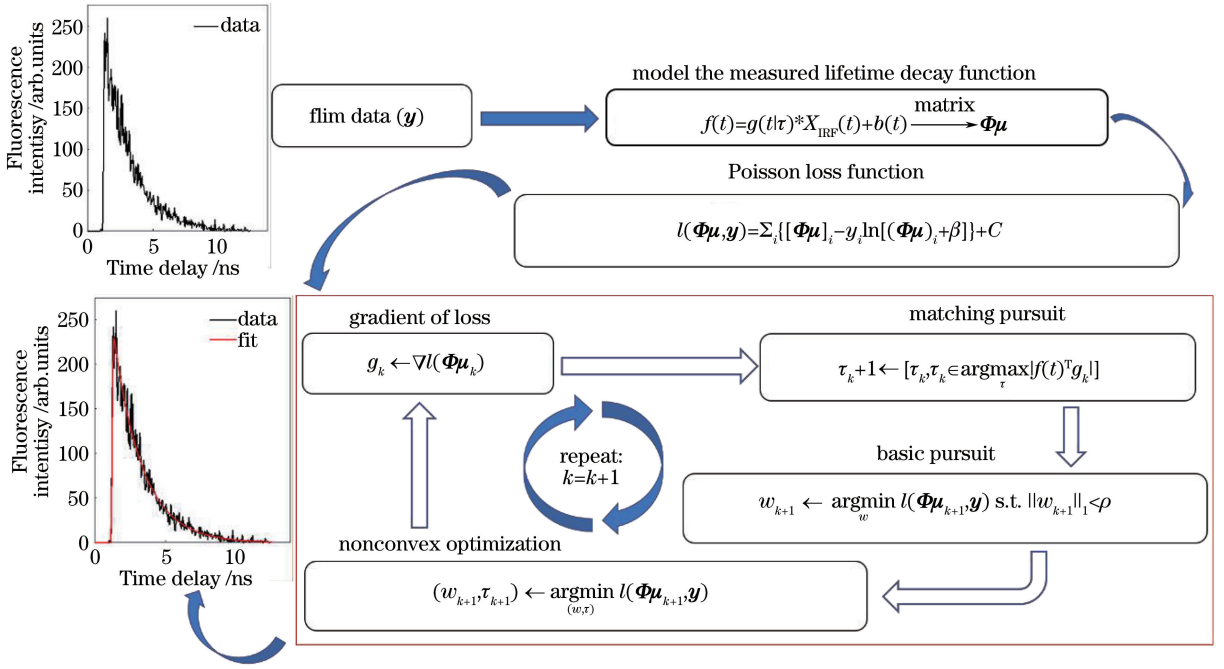


图 1 ADCG-FLIM 算法流程图

Fig. 1 Workflow of our ADCG-FLIM algorithm

### 3 模拟仿真及实验结果

为了验证算法的性能,本文利用 Laine<sup>[15]</sup> 的荧光寿命模拟程序生成了 TCSPC-FLIM 模拟数据,并将本文提出的荧光寿命分析方法 ADCG-FLIM 与 PicoQuant 公司开发的基于 LS 的 FluoFit 算法<sup>[16]</sup>、牛津大学放射肿瘤研究所开发的 FLIMLib 曲线拟合库<sup>[17]</sup>中的 MLE-FLIM 算法进行对比。为了方便地进行定量分析,把利用算法处理模拟数据得出的荧光寿命值称为估计值,用估计值的平均值偏离真实数据的误差来表征算法分析的准确性,用估计值分布的标准差来表征算法分析的精度。此外,本文还将 ADCG-FLIM 算法应用于实际采集的 TCSPC 实验数据,并将其得到的结果与采用 LS-

FLIM 算法的商业软件的处理结果进行对比。

#### 3.1 模拟数据分析

为了使模拟数据尽可能接近真实数据,设定模拟的寿命为 2 ns,仪器响应函数的标准差为 0.05 ns,并且考虑了泊松噪声和占信号总光子数为 10% 的背景噪声;然后在不同的光子数(25~200)下分别模拟得到 1000 组 TCSPC-FLIM 寿命衰减数据,并分别用 LS-FLIM、MLE-FLIM 和 ADCG-FLIM 算法对寿命衰减数据进行分析,结果如图 2 所示。可以看出,光子数对 ADCG-FLIM 算法寿命估计准确性的影响不大,即估计值的平均值偏离真实数据的误差均较小,且随光子数的变化不明显,同时估计精度(即估计值分布的标准差)比 LS-FLIM、MLE-FLIM 算法高 20% 左右。具体地,由图 2(b)可知,ADCG-FLIM 在光子数

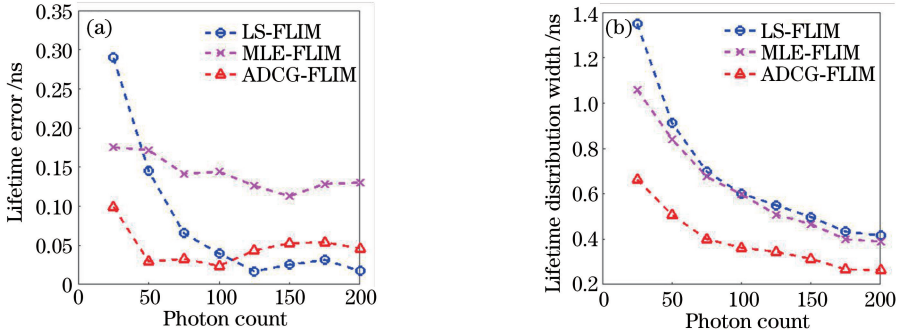


图 2 寿命估计值的统计结果随光子数的变化。(a) 寿命估计值的平均误差;(b) 寿命估计值的标准差

Fig. 2 Statistical results of estimated lifetime versus photon counts. (a) Average error of estimated lifetime;

(b) distribution width of estimated lifetime

为 50 时的分析精度,与 LS-FLIM 和 MLE-FLIM 在光子数为 150 时的精度相当。

为了测试算法对噪声的敏感性,生成了带有泊松噪声、寿命为 2 ns、光子数为 50 并带有不同水平

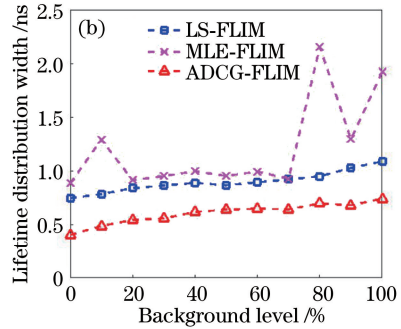
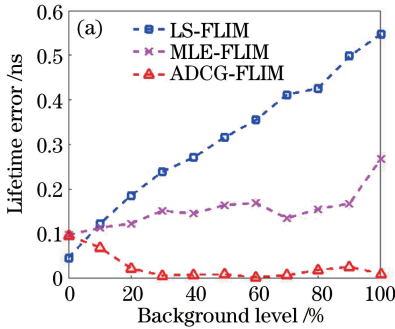


图 3 不同背景噪声水平下寿命估计值的统计结果。(a)寿命估计值的平均误差;(b)寿命估计值的分布标准差  
Fig. 3 Statistical results of estimated lifetime versus background level. (a) Average error of estimated lifetime; (b) distribution width of estimated lifetime

从图 3(a)中可以看出,随着背景信号增强,不同算法逐渐表现出显著的差异。随着背景噪声的增强,LS-FLIM 算法对寿命分析的准确性显著降低,即寿命估计值已远远偏离真实值。理论上,分析精度应随着噪声水平的提高而单调递减,与此规律不同,MLE-FLIM 的分析精度随噪声水平变化出现了两个随机跳跃点,如图 3(b)所示,这说明选择的 MLE-FLIM 算法无法响应极低光子数的数据。换句话说,这两种方法均无法适应低光子数、高背景噪声的情形。而

ADCG-FLIM 算法,即使是在较高水平的背景噪声下仍保持了较高的寿命估计准确性和精度。

除了寿命,图 4 也对算法估计出的光子数(即  $w_r$ )随背景噪声水平的变化情况进行了展示。图 4 (a)是光子数估计值相对于实际光子数的平均误差,图 4(b)是光子数估计值分布的标准差与实际光子数的比值。综合图 3 和图 4 可以看出,ADCG-FLIM 在不同的噪声水平下均能够得到更接近真实情况的分布。

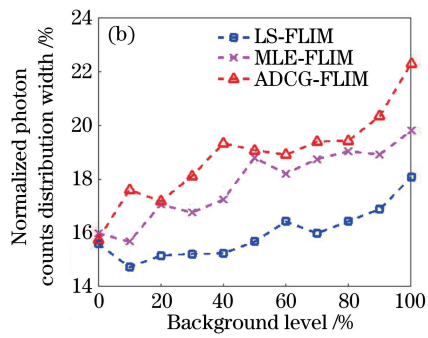
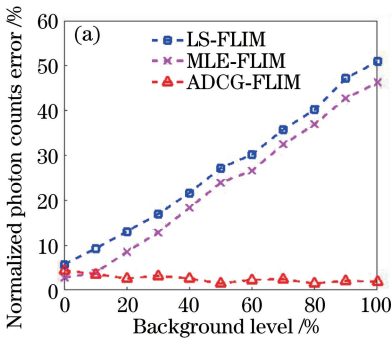


图 4 不同背景噪声水平下光子数估计值的统计结果。(a)光子数估计值的平均误差;  
(b)光子数估计值的分布标准差与实际光子数之比

Fig. 4 Statistical results of estimated photon counts versus background level. (a) Average error of estimated photon counts; (b) ratio of normalized photon counts distribution width to true photon counts

### 3.2 实验数据分析

本文选用铃兰根茎标准样片(Leica)作为样品,利用商业 TCSPC-FLIM 设备(DCS-120)采集样品的荧光衰减数据,然后分别利用 LS-FLIM 算法和本文提出的 ADCG-FLIM 算法对衰减数据进行分析,其中 LS-FLIM 分析使用的是系统自带的 SPCImage 软件的内置算法<sup>[18]</sup>。

针对采集时间很短得到的低光子数情形,LS-FLIM 和 ADCG-FLIM 算法的处理效果如图 4 所示,该组数据中的样品有信号的像素点的平均光子数为 45,标准差为 20。

图 5(a)中的上图是采用 LS-FLIM 处理得到的荧光寿命图像和各像素荧光寿命的统计分布,其中大量显示为红色的像素的寿命都为 0,说明这些像

素点的光子数较少,以至于 LS-FLIM 算法无法得到其寿命;下图是寿命非 0 的像素的荧光寿命的统计分布,可以看到能够分析得到寿命的像素点并不多。图 5(b)为的 ADCG-FLIM 的处理结果,从寿命图像和统计分布曲线中均可以看到,在平均光子数仅为 45 的情况下,通过大部分像素都能够分析得到样品的荧光寿命。对比分析图 5(a)和图 5(b)的寿

命图像和统计分布曲线还可以看出,在能够分析得到荧光寿命值的数据中,采用 LS-FLIM 分析得到的荧光寿命在 1.5~2.0 ns 之间的像素数要略多于采用 ADCG-FLIM 分析得到的,直观地反映出在低光子数情形下,LS-FLIM 即使能够分析得到寿命值,也可能存在较大误差,这实际上是由 LS 算法本身在拟合小样本数据时的缺点决定的。

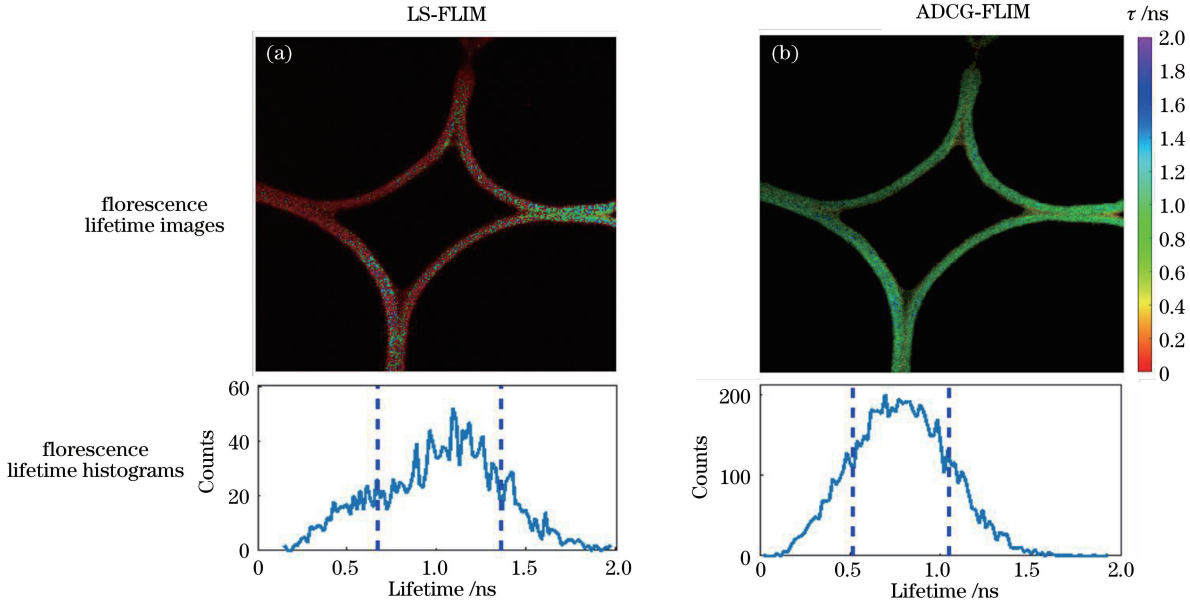


图 5 采用不同算法对平均光子数 45 的实验数据进行寿命分析的结果。(a) LS-FLIM; (b) ADCG-FLIM  
 Fig. 5 Lifetime analysis results of experimental data with average photon counts 45 using different algorithms. (a) LS-FLIM; (b) ADCG-FLIM

为了更直观地进行对比,将采集时间延长,平均光子数提高到原来的近 10 倍(430,标准差为 250),并用系统自带的 LS-FLIM 算法进行分析,得到如图 6 所示的结果。可以看到,该结果与 ADCG-FLIM 算法在平均光子数仅为 45 时得到的结果较为接近。这反过来说明了 ADCG-FLIM 算法确实能够在很大程度上降低荧光寿命分析对采集光子数的要求,从而在相同的条件下大幅缩短采集时间,间接提高了 TCSPC-FLIM 的成像速度,并减少了对样品的光照时间,使其更加适用于活细胞样品的实时监测。此外,在采集时间基本不变,或者减少幅度不大的前提下,降低对光子数的要求也有助于降低激发光功率,这对于活细胞长时间 FLIM 成像也是非常有利的。

## 4 结 论

TCSPC-FLIM 技术已在生物医学领域得到了广泛应用,并取得了许多有意义的研究成果,但随着基于 FLIM 的活细胞样品实时监测需求的增加,快

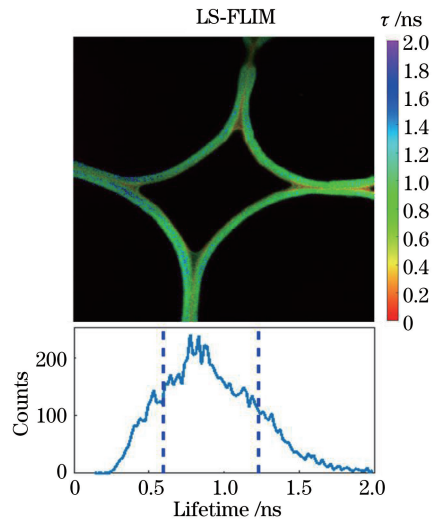


图 6 实验数据平均光子数增加至 430 时 LS-FLIM 的寿命分析结果

速 FLIM 成像成为 FLIM 技术领域的研究热点之一。传统的 LS-FLIM 等算法对 TCSPC-FLIM 采

集的光子数要求较高,而光子数取决于样本接受的激发时间和测量时间,因此发展适用于低光子数情形的荧光寿命分析方法在快速 FLIM 的发展和应用中都具有重要意义。本文提出了一种基于 ADCG 的荧光寿命分析新方法,即 ADCG-FLIM 算法,并基于模拟数据对 ADCG-FLIM 算法与传统的 LS-FLIM、MLE-FLIM 算法的分析性能进行了比较,证明了在低光子数情形下,ADCG-FLIM 算法分析寿命的准确性和精度相比传统算法都得到了大幅提升,尤其是在高噪声水平情况下,差异更加显著。对实际实验数据的处理结果说明利用 ADCG-FLIM 算法在相同条件下可将采集光子数的要求大幅降低,在平均光子数仅为 45 的情况下,也可以很好地得到样品的荧光寿命,从而可通过大幅减少采集时间来间接提高 TCSPC-FLIM 的成像速度,并减少样品的光照时间,使其更加适用于活细胞样品的实时监测,也可以通过降低激发光功率,使其更适合于活细胞的长时间成像。

## 参 考 文 献

- [1] Liu X B, Lin D Y, Wu Q Q, et al. Recent progress of fluorescence lifetime imaging microscopy technology and its application [J]. *Acta Physica Sinica*, 2018, 67(17): 178701.  
刘雄波, 林丹樱, 吴茜茜, 等. 荧光寿命显微成像技术及应用的最新研究进展 [J]. *物理学报*, 2018, 67(17): 178701.
- [2] Collier B B, McShane M J. Dynamic windowing algorithm for the fast and accurate determination of luminescence lifetimes [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(11): 4725-4731.
- [3] Hall P, Selinger B. Better estimates of exponential decay parameters [J]. *The Journal of Physical Chemistry*, 1981, 85(20): 2941-2946.
- [4] Bajzer Ž, Therneau T M, Sharp J C, et al. Maximum likelihood method for the analysis of time-resolved fluorescence decay curves [J]. *European Biophysics Journal*, 1991, 20(5): 247-262.
- [5] Stringari C, Cinquin A, Cinquin O, et al. Phasor approach to fluorescence lifetime microscopy distinguishes different metabolic states of germ cells in a live tissue [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(33): 13582-13587.
- [6] Rowley M I, Barber P R, Coolen A C C, et al. Bayesian analysis of fluorescence lifetime imaging data [J]. *Proceedings of SPIE*, 2011, 7903: 790325.
- [7] Zander C, Sauer M, Drexhage K H, et al. Detection and characterization of single molecules in aqueous solution [J]. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, 1996, 63(5): 517-523.
- [8] Laurence T A, Chromy B A. Efficient maximum likelihood estimator fitting of histograms [J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 338-339.
- [9] 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.
- [10] Boyd N, Schiebinger G, Recht B. The alternating descent conditional gradient method for sparse inverse problems [J]. *SIAM Journal on Optimization*, 2017, 27(2): 616-639.
- [11] Huang J Q, Sun M Z, Ma J J, et al. Super-resolution image reconstruction for high-density three-dimensional single-molecule microscopy [J]. *IEEE Transactions on Computational Imaging*, 2017, 3(4): 763-773.
- [12] Biomedical Imaging Group. Single-molecule localization microscopy • software benchmarking [EB/OL]. (2018-11-03) [2019-10-30]. <http://bigwww.epfl.ch/smlm>.
- [13] Harchaoui Z, Juditsky A, Nemirovski A. Conditional gradient algorithms for norm-regularized smooth convex optimization [J]. *Mathematical Programming*, 2015, 152(1/2): 75-112.
- [14] Byrd R H, Lu P H, Nocedal J, et al. A limited memory algorithm for bound constrained optimization [J]. *SIAM Journal on Scientific Computing*, 1995, 16(5): 1190-1208.
- [15] Laine R F. TCSPC-image-simulation [EB/OL]. [2019-10-30]. <https://github.com/Romain-Laine/TCSPC-image-simulation>.
- [16] PicoQuant. Global fluorescence decay data analysis software [EB/OL]. [2019-10-30]. <https://www.picoquant.com/products/category/software/fluofit-global-fluorescence-decay-data-analysis-software>.
- [17] FLIMLib. An exponential curve fitting library used for Fluorescent Lifetime Imaging (FLIM) [EB/OL]. [2019-10-30]. <https://flimlib.github.io>.
- [18] Becker W, Hickl G. The bh TCSPC handbook [EB/OL]. [2019-10-20]. <https://www.becker-hickl.com/literature/handbooks/the-bh-tcspc-handbook/>.