

# 基于噪声校正主成分分析的压缩感知 STORM 超分辨图像重构

潘文慧, 陈秉灵, 张建国, 顾振宇, 熊佳, 张丹, 杨志刚\*, 屈军乐\*\*

深圳大学物理与光电工程学院, 生物医学光子学研究中心, 光电子器件与系统广东省/教育部重点实验室, 广东 深圳 518060

**摘要** 随机光学重构显微(STORM)的时间和空间分辨率相互制约,难以实现活细胞的超分辨成像,且超分辨图像的后处理分析与重构算法对图像质量也有非常重要的影响。基于此,针对高密度标记与高采样率所导致的单帧图像中光斑重叠及过多的背景噪声,提出一种用于单分子定位显微成像的新型噪声校正主成分分析(NC-PCA)方法,对单分子定位显微成像采集的图像进行预处理后再进行定位重构,提高了现有定位方法的定位精度,同时还实现了重叠分子的区分定位,从而提高了生物样品的标记密度,改善了超分辨成像的时间分辨率,可为活细胞单分子定位成像提供技术支持。

**关键词** 生物光学; 随机光学重构显微; 主成分分析; 降噪算法; 超分辨光学成像

中图分类号 O439

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202047.0207024

## Compressed Sensing STORM Super-Resolution Image Reconstruction Based on Noise Correction-Principal Component Analysis Preprocessing Algorithm

Pan Wenhui, Chen Bingling, Zhang Jianguo, Gu Zhenyu, Xiong Jia,  
Zhang Dan, Yang Zhigang\*, Qu Junle\*\*

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

**Abstract** The low temporal resolution of stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) limits its ability to observe dynamic events in live cells. Further, the post-processing analysis and reconstruction algorithms have an important effect on super-resolution images. In this study, we report a new noise-correction principal component analysis method for single-molecule localization microscopy against fluorescent spot overlapping and excessive background noise in a single frame of images owing to high-density labeling and high camera-sampling frequency. The proposed method can improve the positioning accuracy of existing localization methods by pre-processing the raw images acquired by the single molecule localization microscopy before reconstruction. In addition, this method can accurately distinguish the overlapping molecules. Therefore, it is suitable for samples exhibiting a high fluorophore density. Thus, the proposed method improves the temporal resolution of super-resolution imaging, providing a powerful technical support for the STORM imaging of live cells.

**Key words** biotechnology; stochastic optical reconstruction microscopy; principal component analysis; denoising algorithm; super-resolution optical imaging

**OCIS codes** 170.3880; 180.2520; 100.2960

收稿日期: 2019-10-18; 修回日期: 2019-11-13; 录用日期: 2019-11-26

基金项目: 国家自然科学基金(61875131,61525503)、广东省教育厅重点项目(2015KGJHZ002,2016KCXTD007)、广东省自然科学基金创新团队项目(2014A030312008)、深圳市基础研究项目(JCYJ20170818100931714, JCYJ20180305125549234, JCYJ20170412105003520)

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

# 1 引 言

超分辨成像技术突破了光的衍射极限,能够在纳米尺度上对细胞内的精细结构进行清晰成像,逐渐成为细胞生物学的有力工具<sup>[1-5]</sup>。其中,随机光学重构显微(STORM)<sup>[6]</sup>先对样品上单个荧光分子进行高精度重复定位,再利用软件对样品图像进行重构分析,可获得超分辨图像。相比其他超分辨显微技术,STORM超分辨成像技术具有显著的优势,其空间分辨率最高,横向分辨率可以达到20 nm,纵向分辨率可以达到50 nm<sup>[7-8]</sup>,且在生物成像中应用广泛,受到了越来越多研究者的关注。

STORM超分辨成像技术本质上是通过牺牲时间分辨率来获得高空间分辨率的,这严重制约了该方法在活细胞动态过程成像方面的应用<sup>[9]</sup>。为了实现活细胞的STORM超分辨成像,一方面可以通过增大分子标记的密度来保证单帧闪烁分子的数量足够多,以大大压缩超分辨重构的图像帧数;另一方面,通过提高EMCCD(electron-multiplying charge-coupled device)的采样率来缩短获取同样帧数图像所需的采样时间<sup>[10]</sup>。然而,高密度分子标记会带来一个严重的问题,那就是单帧闪烁图像内荧光光斑相互严重重叠,导致单分子定位算法完全失效,多个PSF(point spread function)拟合算法的高精度定位也变得十分困难<sup>[11-13]</sup>。另外,EMCCD高速相机的采样率越大,累积的荧光信号就越弱,器件产生的暗电流噪声也就越大<sup>[14]</sup>。信号淹没在噪声中会对图像的对比度造成严重影响,导致定位精度降低,引入系统偏差,进而影响超分辨图像的质量。

通过采用基于压缩感知的分子定位算法(CSSTORM)可以实现高密度标记下重叠光斑的多

分子准确定位<sup>[15]</sup>。但研究发现,在利用CSSTORM处理基于较高采样率获取的闪烁图像时,分子定位的精度会受到严重影响,重构出来的超分辨图像质量也很差。为了提高超分辨图像的质量,本文提出一种基于噪声校正的主成分分析(NC-PCA)算法,在时间轴方向上对原始信号进行降噪,提高原始图像的质量,进而提高CSSTORM分析中的分子定位精度。设计了应用主成分分析算法的噪声校正模型,并利用本文算法分别对模拟与实验数据进行降噪分析。最后与可提高图像对比度的K-因子图像分析预处理方法相结合,对原始数据进行预分析处理<sup>[16]</sup>。

## 2 NC-PCA 算法

主成分分析(PCA)是一种基于矩阵运算的统计分析方法,旨在通过计算相关性和奇异值分解将高维度的数据集投影到低维度子空间,在子空间将特征值低于阈值的变量置为0,只保留少数有效成分的特征值,从而在保持变量特性的同时最大程度地降低噪声<sup>[17]</sup>。主成分分析已被用于生物成像领域<sup>[18-22]</sup>,但尚未有将其用于单分子定位显微成像数据处理的报道。本文提出一种适用于单分子定位成像的具有泊松分布特性的噪声校正主成分分析方法,其工作流程如图1所示。图中, $C$ 为协方差矩阵, $D$ 为对应特征值组成的对角矩阵, $U$ 为包含 $C$ 左特征向量的矩阵, $V$ 为包含 $C$ 右特征向量的矩阵。首先,对闪烁数据图像进行泊松噪声校正,然后对校正后的图像进行主成分分析,在保留图像原有结构信息的前提下,尽可能地抑制图像噪声,提高压缩感知算法的分子定位精度,达到提高重构图像分辨率的目的。在对原始闪烁数据进行降噪的同时,还引入了K-因子算法以锐化图像中闪烁光斑的边缘,这

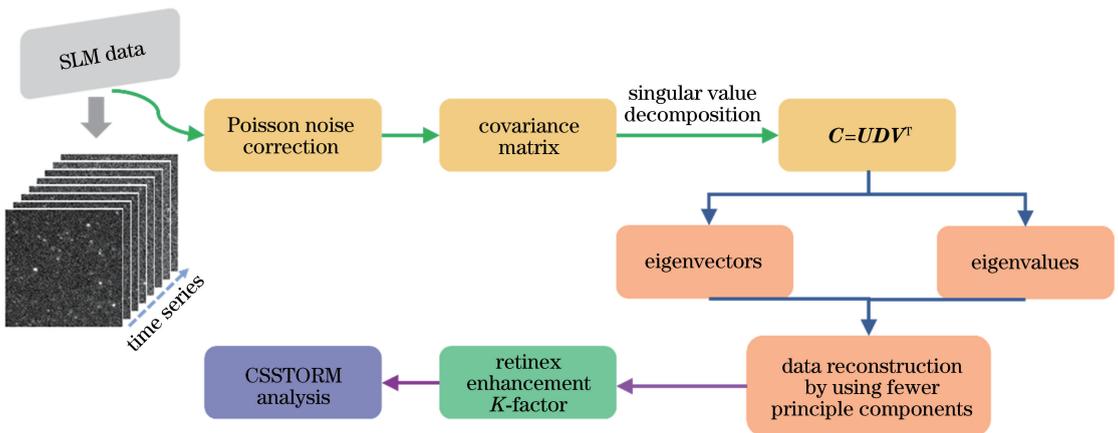


图 1 NC-PCA 算法处理流程图

Fig. 1 Workflow diagram of NC-PCA algorithm

对进一步提高分子定位精度很有帮助<sup>[16]</sup>。

## 2.1 泊松校正的数学模型

在单分子定位显微成像中,噪声主要由光子散粒噪声、背景噪声、读出噪声、暗电流和外来荧光噪声组成<sup>[23]</sup>。所以,位于 $(x_0, y_0)$ 的荧光分子在 $(x, y)$ 处的强度信息为<sup>[24]</sup>

$$I(x, y) = \frac{N'}{2\pi\sigma^2} \exp\left[-\frac{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2}{2\sigma^2}\right] + \eta_B \pm \eta_{\text{shot}}, \quad (1)$$

式中: $N'$ 为单个荧光分子发射的光子数; $\eta_B$ 是方差为 $N_b$ 的服从泊松分布的随机变量; $\sigma$ 为高斯分布的标准偏差; $\eta_{\text{shot}}$ 为服从泊松分布的随机变量,其平均值等于每个像素中总强度的平方根<sup>[23]</sup>。在对闪烁数据图像进行主成分分析之前,需要对图像进行泊松噪声高斯化预处理,具体是将获得的每一帧原始图像的强度都除以该帧图像平均强度的平方根<sup>[25]</sup>。假如 STORM 数据可看作是一个由  $n$  个像素构成的矩阵,那么泊松校正方法为

$$I_{k,i}^p = I_{k,i}^m / \sqrt{\bar{I}_i^m}, \forall k \in [1, \dots, n], \quad (2)$$

式中: $I_{k,i}^m$ 表示在第  $i$  帧检测到的第  $k$  个像素上的原始图像强度,原始数据构成矩阵  $I^m$ ; $\bar{I}_i^m$ 表示第  $i$  帧图像的平均强度; $I_{k,i}^p$ 表示将泊松噪声校正后在第  $i$  帧检测到的第  $k$  个像素上的图像强度。泊松噪声校正方法可保留图像不同强度向量之间的线性关系,利用该方法对校正后的数据集进行主成分分析,就可以在时间序列上最大限度地保留图像的原始信息,简化数据。

## 2.2 主成分分析法

主成分分析可以通过对数据集的协方差矩阵作奇异值分解来实现<sup>[17]</sup>。选取闪烁数据中的  $q$  帧动态视频,则对应的计算协方差矩阵为

$$\mathbf{C} = \begin{pmatrix} C_{1,1} & \cdots & C_{1,q} \\ \vdots & & \vdots \\ C_{q,1} & \cdots & C_{q,q} \end{pmatrix}, \quad C_{i,j} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n (I_{k,i}^p - \bar{I}_i^p) (I_{k,j}^p - \bar{I}_j^p), \quad (3)$$

式中: $I_{k,i}^p$ 和  $I_{k,j}^p$ 分别为经泊松噪声校正后的在第  $i$  和  $j$  帧检测到的第  $k$  像素上的强度值; $\bar{I}_i^p$ 和  $\bar{I}_j^p$ 分别为经泊松校正后在第  $i$  和  $j$  帧检测到的图像的平均强度值。将获得的协方差矩阵进行奇异值分解,提取  $\mathbf{C}$  的特征向量和特征值来分析矩阵,并将其写成三个矩阵的乘积: $\mathbf{C} = \mathbf{U}\mathbf{D}\mathbf{V}^T$ 。这里, $\mathbf{V}^T$  是  $\mathbf{V}$  的转置

矩阵,为包含  $\mathbf{C}$  右特征向量的矩阵, $\mathbf{U}$  为包含  $\mathbf{C}$  左特征向量的矩阵,并且  $\mathbf{D}$  为对应特征值组成的对角矩阵,矩阵  $\mathbf{D}$  内特征值按降序排序。一个特征向量对应一幅子图像,即代表一个主成分。将特征值由大到小重新排列,选取前  $m$  个的特征值,则有  $m$  个子图像( $S_1, S_2, \dots, S_m$ ),第  $p$  个主成分分子图像的第  $k$  个像素的得分为

$$s_{p,k} = \sum_{i=1}^q v_{p,i} \cdot I_{i,k}^p, \quad (4)$$

式中: $v_{p,i}$ 表示第  $p$  个特征向量在第  $i$  帧的值; $I_{i,k}^p$ 表示第  $k$  个像素经过泊松校正后在第  $i$  帧的强度值; $q$ 表示总帧数。由此就组成了  $m$  个子像。在主成分分析中,由于每个特征值的权重都不一样,从大到小重排之后,前  $m$  个特征值为  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_m$ 。计算每个特征值的权重  $w_p = \frac{\lambda_p}{\sum_{i=1}^m \lambda_i}$ ,得到前  $m$  个主成分的

投影矩阵为

$$\mathbf{S}_m = (\omega_1 S_1, \omega_2 S_2, \dots, \omega_p S_p, \dots, \omega_m S_m). \quad (5)$$

通过投影矩阵计算得到降噪之后的图像,可表示为

$$I_{k,i}^n = \mathbf{S}_m^T \cdot \mathbf{V}_m = \sum_{p=1}^m \omega_p \cdot s_{k,p} \cdot v_{p,i}, \quad (6)$$

式中: $\mathbf{V}_m$ 表示由前  $m$  个特征值对应的特征向量组成的矩阵; $I_{k,i}^n$ 表示降噪后在第  $i$  帧的第  $k$  个像素上的图像强度。

## 3 NC-PCA 算法降噪效果

根据前述的主成分分析原理,分别使用模拟数据和实验数据对上述的降噪算法进行检验和评估。在模拟数据中,利用不同数量的主成分进行信号重构,对所获得的降噪效果进行比较,对一系列不同信噪比的模拟图像进行 NC-PCA 降噪分析,然后进行分子定位运算,以定位的均方根误差作为比较的衡量指标。在实验数据中,对通过 STORM 超分辨成像系统采集的荧光分子闪烁图像进行 NC-PCA 处理,比较降噪前后的成像效果。然后将 NC-PCA 降噪算法与可提高图像对比度的  $K$ -因子图像分析预处理方法相结合,对细胞的微管和线粒体外膜的原始数据进行预分析处理,利用 CSSTORM 重构 NC-PCA 预处理前后的图像,得到超分辨图像。

### 3.1 对仿真数据进行降噪处理

为了评估 NC-PCA 降噪算法的性能及其对定位精度的影响,使用蒙特卡罗模拟生成一组闪烁数据,模拟参数设置如下:激发光源  $\lambda = 656 \text{ nm}$ ,  $100 \times$

物镜 ( $NA = 1.45$ ), 对应的模拟像元尺寸为  $160 \text{ nm} \times 160 \text{ nm}$ , 散粒噪声服从泊松分布(其期望值与方差相对应)。通过添加随机样本来引入背景噪声, 这个随机样本服从方差为  $N_b$  的泊松分布, 模拟的每个闪烁分子的位置是随机的, 分子密度、每个分子的发射光子数  $N$  以及背景噪声  $N_b$  等参数可以灵活调整, 所有的模拟都在 MATLAB 上进行。在利用 EMCCD 进行单分子定位显微成像过程中, 噪声模型主要由散粒噪声和背景噪声组成<sup>[23]</sup>, 所以通过添加背景噪声和散粒噪声可获得不同信噪比 ( $\text{SNR}, r_{\text{SNR}}$ ) 的图像, 信噪比的计算式为

$$r_{\text{SNR}} = 10 \lg \sqrt{\frac{\frac{1}{K_0} \sum_{i=1}^{K_0} I_{\text{sig}i}^2}{\frac{1}{K_0} \sum_{i=1}^{K_0} I_{\text{noise}i}^2}}, \quad (7)$$

式中:  $I_{\text{sig}i}$  表示原始图像在第  $i$  个像素处的强度值;

$I_{\text{noise}i}$  表示噪声图像在第  $i$  个像素处的强度值;  $K_0$  表示图像的总像素值。

图 2(a) 所示为无噪声的随机单分子闪烁的模拟图, 每个分子平均发射光子数为 1000, 在此基础上添加泊松噪声, 并且添加方差  $N_b = 10$  的随机样本, 引入背景噪声, 添加噪声后的模拟图为图 2(b), 其信噪比为 1.4 dB。在重建的超分辨图像中, 峰值信噪比 ( $\text{PSNR}, r_{\text{PSNR}}$ ) 是一个衡量图像质量的重要指标, 所以以下实验通过比较图像的 PSNR 来衡量图像质量。PSNR 的计算式为

$$r_{\text{PSNR}} = 20 \lg \left( \frac{X_{\text{MAXI}}}{\sqrt{X_{\text{MSE}}}} \right), \quad (8)$$

式中:  $X_{\text{MSE}} = \frac{1}{K_0} \sum_{i=1}^{K_0} \| I_{\text{sig}i} - I_{\text{noise}i} \|^2$ ;  $X_{\text{MSE}}$  表示图像均方差;  $X_{\text{MAXI}}$  表示图像亮度的最大数值。可得到图 2(b) 的 PSNR 为 25.35 dB。

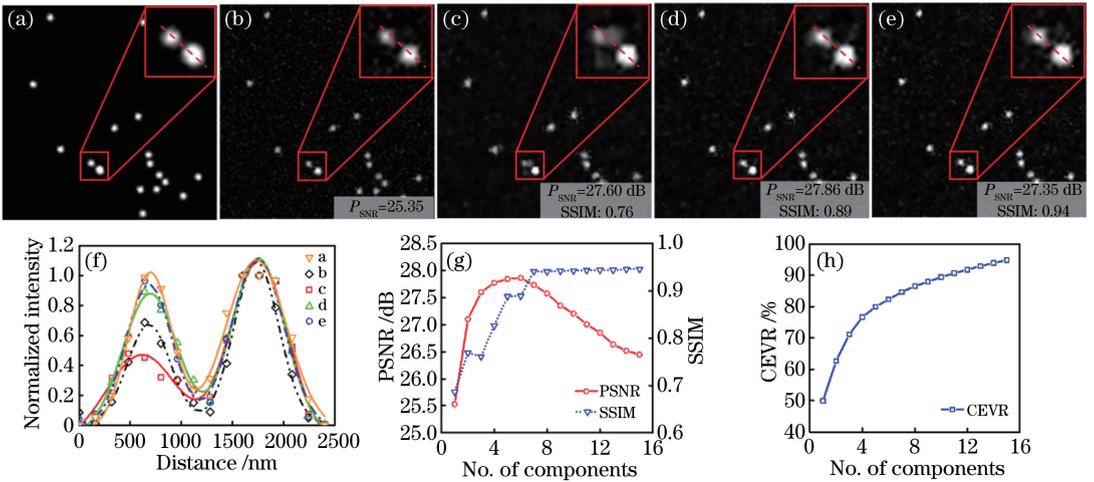


图 2 仿真降噪图像结果。(a) 原始图像; (b) 添加背景噪声和散粒噪声后的图像; (c) 选取 1~3 个主成分时的降噪图像; (d) 选取 1~6 个主成分时的降噪图像; (e) 选取 1~9 个主成分时的降噪图像; (f) 图 2(a)~(e) 中虚线处对应的强度分布曲线; (g) 选取不同主成分的降噪图像的 PSNR 和 SSIM 曲线; (h) 选取不同主成分的降噪图像的 CEVR 曲线

Fig. 2 Image denoising simulation. (a) Original image; (b) image with background noise and shot noise; (c) denoised image obtained by 1-3 principal components; (d) denoised image obtained by 1-6 principal components; (e) denoised image obtained by 1-9 principal components; (f) normalized intensity curves corresponding to dotted lines in Fig. 2(a)-(e); (g) PSNR and SSIM curves for denoised images with different principal component numbers; (h) CEVR for denoised images with different principal component numbers

为了直观地对比降噪图像与原始图像的结构, 计算得到了它们之间的结构性指数 (SSIM)。SSIM 取值范围为  $[0, 1]$ , 值越大表示图像质量越好<sup>[26]</sup>。

NC-PCA 降噪程序中的主要参数为提取的主成分个数。通过调整主成分个数 (1~15) 来对比降噪图像的 PSNR 和 SSIM 参数, 进而比较 NC-PCA 方法的降噪效果。另外, 在主成分分析方法中, 选择提取主成分的个数时还应考虑前  $m$  个特征值的累计

贡献率 (CEVR)。累计贡献率的表达式为

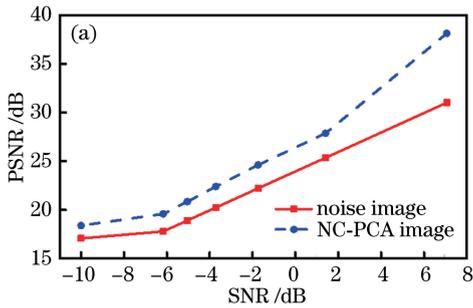
$$X_{\text{CEVR}} = U_m / U, \quad (9)$$

式中:  $U_m$  表示前  $m$  个特征值的总和;  $U$  表示所有特征值的总和。根据经验值, 累计贡献率一般为  $80\% \sim 90\%$ <sup>[17]</sup>。

由图 2 可知, 当提取的主成分为第 1~3 个时, 图像降噪效果较好, PSNR 达到 27.6 dB, 但 SSIM 只有 0.76。与图 2(b) 中放大的荧光分子比较, 图 2

(c) 右上角的荧光分子变得模糊, 可看出发生了明显的结构失真。从沿着图 2(a)~(e) 虚线得到的强度分布图 2(f) 中可观察到: 与噪声图像相比, 提取 1~3 个主成分后的降噪图像的高斯曲线中心发生偏移, 信号强度明显减低; 提取的主成分为第 1~6 个时, SSIM 达到 0.89, 接近 1, 信息保留得较全面。从图 2(f) 中可知, 提取 1~6 个主成分后, 降噪图像的信号强度与噪声图像相比有显著提高, 与原始图像 2(a) 更接近。通过计算得到了选取不同主成分的降噪图像的 PSNR 和累计贡献率曲线, 如图 2(g) 和图 2(h) 所示, 虽然提取 1~6 个主成分的累计贡献率为 82%, 但其 PSNR 最高, 降噪效果最好。当提取的主成分个数增多时, PSNR 逐渐降低, SSIM 逐渐升高, 累计贡献率逐渐增大, 说明保留的主成分越多, 重构的信号与原信息就越一致, 降噪效果就越不明显。

考虑到重构信号既要求完好地保留原有信息的基本特征, 又要求最大程度地抑制噪声, 选择第 1~6 个



主成分进行 NC-PCA 降噪处理, 获得了不同 SNR 下噪声数据的 PSNR 曲线以及经 NC-PCA 降噪后数据的 PSNR 曲线, 如图 3(a) 所示。NC-PCA 图像的 PSNR 要比噪声图像高, 大约高 10% 左右, 说明降噪处理后图像质量得到了明显改善。对原始噪声图像和 NC-PCA 降噪处理的图像进行压缩感知定位, 将定位坐标  $(\hat{x}_i, \hat{y}_i)$  与已知位置  $(x_i, y_i)$  进行比较, 计算它们之间的均方根定位误差  $E_{\text{RMS}}$ 。均方根定位误差的计算公式为

$$E_{\text{RMS}} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [(\hat{x}_i - x_i)^2 + (\hat{y}_i - y_i)^2]}, \quad (10)$$

式中:  $N$  为定位点的个数。

图 3(b) 所示为不同噪声水平下噪声图像和 NC-PCA 图像的均方根定位误差, 与原噪声图像相比, 经 NC-PCA 降噪后的图像的 CSSTORM 分子定位精度更高。

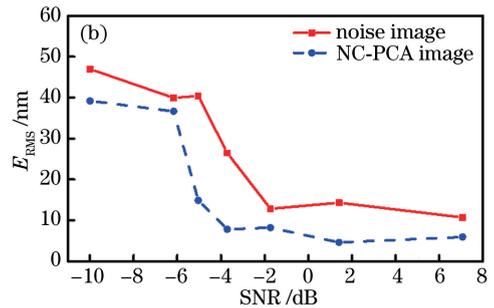


图 3 NC-PCA 算法对不同信噪比图像的影响。(a) NC-PCA 处理前后, 图像的 PSNR 曲线; (b) 图像的 CSSTORM 定位的  $E_{\text{RMS}}$

Fig. 3 Effect of NC-PCA algorithm on images with different SNRs. (a) PSNR curves before and after NC-PCA algorithm processing; (b)  $E_{\text{RMS}}$  of CSSTORM localization of images

### 3.2 对荧光分子进行降噪处理

对于 NC-PCA 算法, 保留的主成分越多, 信息越完整, 但噪声影响也随之增大。本实验在 dSTORM 系统上对荧光分子进行成像, 在时间序列上采集 300 frame 荧光分子闪烁图像, 利用 NC-PCA 算法对采集到的闪烁数据进行降噪处理, 具体降噪结果如图 4 所示。从图 4 可知, STORM 系统采集的原始图像噪声很大, 而 NC-PCA 程序选取 1~3 个主成分得到的图像降噪效果明显, 但有部分信息丢失, 导致图像失真。选取 1~6 个主成分进行降噪分析得到的图像的信息保留完整且降噪效果明显。

### 3.3 对细胞微管数据的降噪处理

在 STORM 超分辨成像中, 高密度探针标记使获得的单帧图像中有更多的闪烁光斑, 同时使用 NC-PCA 算法和  $K$ -因子算法可以有效提高闪烁数据的图像质量, 有助于提高重叠光斑的解离度, 提高

分子定位精度和单帧定位分子的个数, 从而可提高成像时间分辨率。采用压缩感知算法和基于单分子拟合理论的 Insight 3 软件对网上下载的微管样品闪烁图像进行重构<sup>[27]</sup>, 分别对前 200 frame 数据和 500 frame 数据进行如下处理: ①对原始图像进行重构分析, 并计算重构后图像的光子数和分辨率; ②直接利用 Insight 3 软件进行重构分析; ③利用  $K$ -因子算法对图像进行处理<sup>[16]</sup>, 根据之前的报道设置参数重建图像因子  $M=54$ , 较低深度因子  $h=9$ , 对比度深度因子  $k=0.9$ , 对  $K$ -因子算法处理后的图像进行 CSSTORM 重构, 并计算光子数和分辨率; ④对图像进行 NC-PCA 降噪和  $K$ -因子处理, 再通过 CSSTORM 重构, 计算光子数和分辨率。不同算法的处理结果如图 5 所示。

由图 5 可知: 对 200 frame 数据进行 CSSTORM 重构得到的图像 [图 5(c) 第 1~3 列],

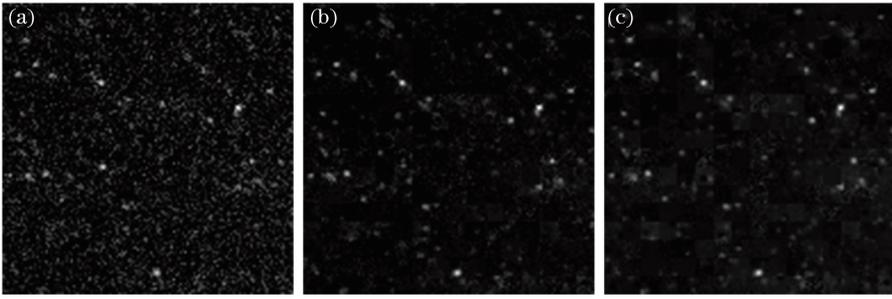


图 4 NC-PCA 算法处理前后探针的光致闪烁图像。(a)原始闪烁图像;

(b) NC-PCA 方法选取 1~6 个主成分得到的降噪图像;(c) NC-PCA 方法选取 1~3 个主成分得到的降噪图像

Fig. 4 Photo scintillation images before and after NC-PCA algorithm processing. (a) Original flashing image; (b) denoised image obtained by NC-PCA processing with 1-6 principal components; (c) denoised image obtained by NC-PCA processing with 1-3 principal components

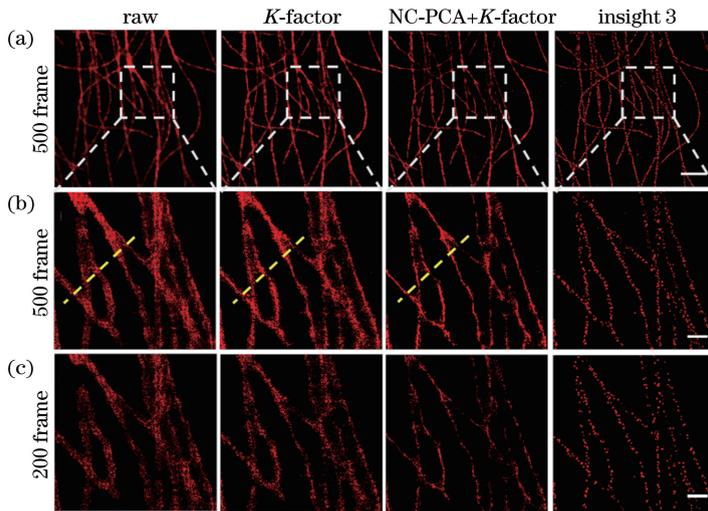


图 5 不同分析算法对不同帧数数据重构处理的超分辨结果比较。(a) 500 frame 数据,比例尺:2 μm;

(b)图 5(a)方框区域的放大图,比例尺:0.5 μm;(c)数据为 200 frame 时,图 5(a)方块区域的放大图,比例尺:0.5 μm

Fig. 5 Comparison of super-resolution results of different algorithms for data reconstruction with different frames.

(a) Reconstructed 500-frame data, scale bar: 2 μm; (b) magnified view of Fig. 5(a), scale bar: 0.5 μm;

(c) magnified view of Fig.5(a) with the data reconstruction using 200 frame, scale bar: 0.5 μm

以及采用 Insight 3 软件处理得到的图像[图 5(c)第 4 列],均存在不连续情况,说明帧数太少无法获得满足奈奎斯特采样定理所需的分子定位信息,得到的微管图像不完整;而对 500 frame 数据进行 CSSTORM 重构可以得到超分辨图像[图 5(b)第 1~3 列],从这些体系中可以获得连续的微管结构。由图 5(b)可看出,经过 NC-PCA 降噪和 K-因子预处理后,图像锐化,微管宽度变细,其与 Insight 3 得到的结果[图 5(b)第 4 列]保持最大的结构一致性。对于图 5(b)中的第 1~3 列图像,沿虚线部分进行光子数和分辨率分析,结果如图 6、7 所示。在经 NC-PCA 降噪和 K-因子预处理后,5 根微管明显标记,并在实验室的 dSTORM 系统上利用 656 nm 的激光激发染料,EMCCD 在 120 Hz 频率下采集荧光

可区分,并且在原始数据或仅经 K-因子预处理得到的图像中,相邻微管之间出现了模糊的噪声峰,如图 6 中的虚线圆圈所示。根据傅里叶环相关(FRC)曲线与给定阈值的交点所指示的空间频率的倒数可以确定空间分辨率,阈值根据经验值设为  $1/7^{[26]}$ 。由图 7 可知,原始图像的分辨率为 66 nm, K-因子算法处理后,重构图像的分辨率为 62 nm,而先经 NC-PCA 降噪再作 K-因子处理后,重构图像的分辨率大大提高,达到 39 nm,与原始图像相比,提高了约 1.7 倍。

### 3.4 对线粒体外膜数据的降噪效果

利用菁染料对 HeLa 细胞中的线粒体进行标分子闪烁图像,帧数为 300,经 CSSTORM 定位重构后得到线粒体外膜的超分辨图像如图 8 所示。在

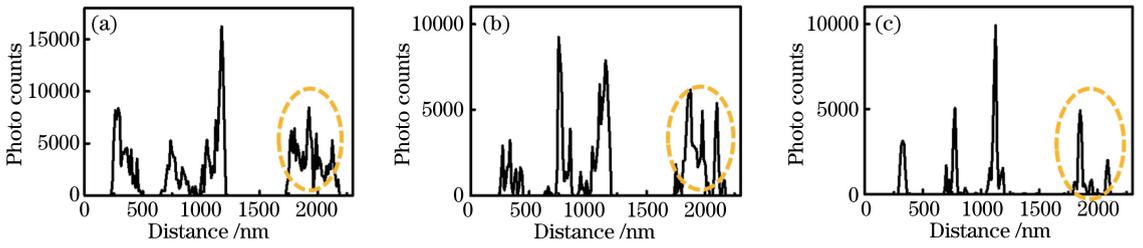


图 6 图 5 虚线处的光子数分布图。(a)图 5(b)第 1 列图像;(b)图 5(b)第 2 列图像;(c)图 5(b)第 3 列图像  
Fig. 6 Photon number distribution along the dashed lines in Fig. 5. (a) First column image in Fig. 5(b); (b) second column image in Fig. 5(b); (c) third column image in Fig. 5(b)

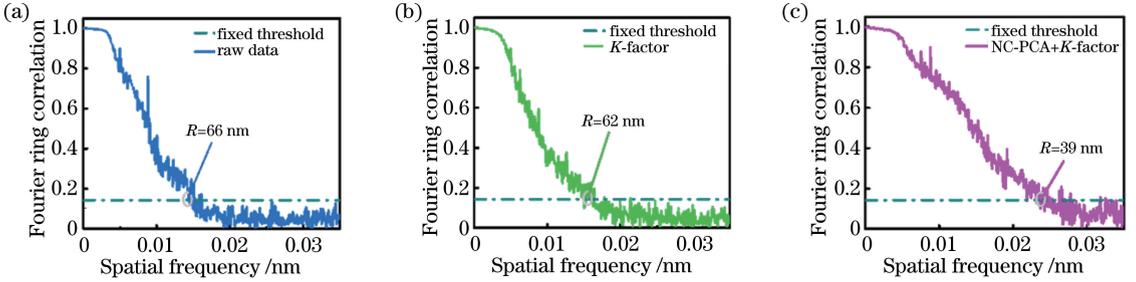


图 7 图 5(a)各方法的 FRC 空间分辨率分析曲线。(a)原始图像;(b)  $K$ -因子预处理;(c) NC-PCA 降噪和  $K$ -因子预处理  
Fig. 7 FRC spatial resolution analysis curves of methods in Fig. 5(a). (a) Raw image; (b)  $K$ -factor preprocessing; (c) NC-PCA noise reduction and  $K$ -factor pre-processing

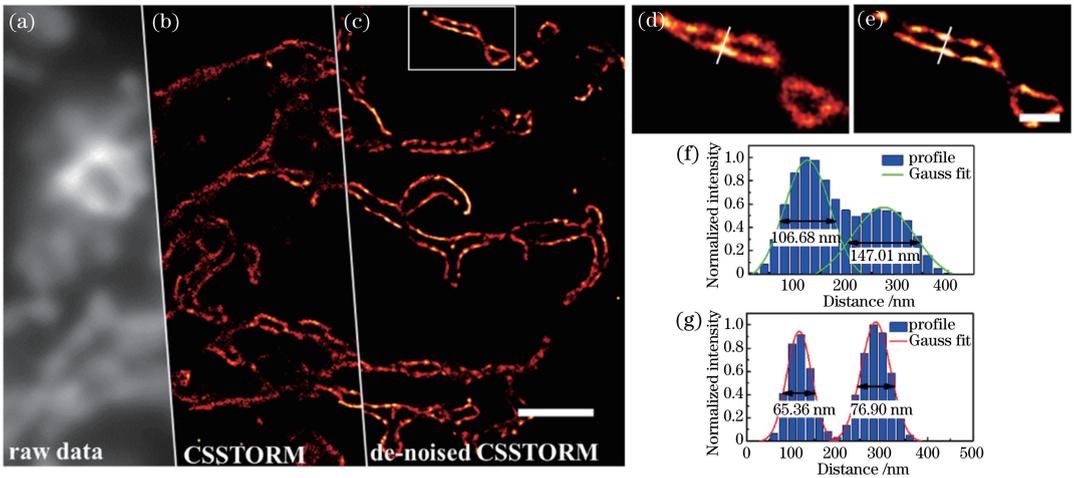


图 8 线粒体外膜的降噪效果图。(a)线粒体外膜宽场图像;(b) CSSTORM 重构获得的图像;(c)经 NC-PCA 降噪和  $K$ -因子预处理后,CSSTORM 重构获得的图像;(d)图 8(c)方形框区域 CSSTORM 重构的放大图像;(e)经 NC-PCA 降噪和  $K$ -因子预处理后,图 8(c)方形框区域 CSSTORM 重构的放大图像;(f)沿图 8(d)中实线得到的横截面强度归一化后的高斯拟合分布图;(g)沿着图 8(e)中实线得到的横截面强度归一化后的高斯拟合分布图。图 8(a)~(c)比例尺:  $2 \mu\text{m}$ ,图 8(d)(e)比例尺:  $500 \text{ nm}$

Fig. 8 Noise reduction effect of outer mitochondrial membrane. (a) Wide-field image of outer mitochondrial membrane; (b) image obtained by CSSTORM reconstruction; (c) image obtained by CSSTORM reconstruction after NC-PCA noise reduction and  $K$ -factor pretreatment; (d) magnified image of the rectangle area in Fig. 8(c) obtained by CSSTORM reconstruction; (e) magnified image of the rectangle area in Fig. 8(c) obtained by CSSTORM reconstruction after NC-PCA noise reduction and  $K$ -factor pretreatment; (f) Gaussian fit distribution of normalized strength at cross section of solid line in Fig. 8(d); (g) Gaussian fit distribution of normalized strength at cross section of solid line in Fig. 8(e). Scale bar of Fig. 8(a)–(c):  $2 \mu\text{m}$ , scale bar of Fig. 8(d) and Fig. 8(e):  $500 \text{ nm}$

宽场成像下,只能看到线粒体的大概轮廓,但是观察不到线粒体的精细结构,如图 8(a)所示。利用 CSSTORM 分别对所采集到的 300 frame 线粒体闪烁图像,以及 NC-PCA+K-因子预处理后的图像进行重构,得到线粒体外膜的超分辨图像,重叠图像如图 8(b)和 8(c)所示。从图 8(c)中实线方框表示的区域放大图[图 8(e)]可见,降噪之后的 CSSTORM 图像比没有经过预处理的 CSSTORM 图像[图 8(d)]更清楚,且外膜轮廓清晰。对图 8(d)和 8(e)白色线处的数据进行高斯拟合,结果如图 8(f)和 8(g)所示,得到半峰全宽分别为 65.36 nm 和 76.90 nm。

## 4 结 论

采用 NC-PCA 降噪算法对单分子定位显微技术所获得的原始图像进行预处理,通过 CSSTORM 重构成像能够对高密度标记的样品图像进行有效的单分子定位,从而能够提高图像的时间分辨率。本文结合模拟数据和实验数据,验证了 NC-PCA 降噪算法对低信噪比图像有明显的降噪效果,且能提高 CSSTORM 方法的定位精度。在细胞实验中,微管的原始数据经 NC-PCA 降噪和 K-因子预处理后,其空间分辨率可达到 39 nm,在相同的帧数下,未经过降噪的 CSSTORM 图像的空间分辨率只有 66 nm。在线粒体实验中,在降噪之后的 CSSTORM 图像中可清晰分辨出线粒体的外膜结构,空间分辨率提高了 41 nm,达到 65 nm 左右。利用 NC-PCA 降噪算法对单分子定位显微技术所采集的图像作预处理,可以提高图像的信噪比,减小背景噪声对定位算法的影响,提高 CSSTORM 算法的定位精度和重构图像的空间分辨率,在基于单分子定位显微的活细胞研究领域有较广阔的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] Yu J. Single-molecule studies in live cells[J]. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2016, 67(1): 565-585.
- [2] Xia T, Li N, Fang X H. Single-molecule fluorescence imaging in living cells [J]. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2013, 64(1): 459-480.
- [3] Thompson M A, Lew M D, Moerner W E. Extending microscopic resolution with single-molecule imaging and active control [J]. *Annual Review of Biophysics*, 2012, 41(1): 321-342.
- [4] Joo C, Balci H, Ishitsuka Y, et al. Advances in single-molecule fluorescence methods for molecular biology[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2008, 77(1): 51-76.
- [5] Zhou X, Dan D, Qian J, et al. Super-resolution reconstruction theory in structured illumination microscopy[J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(3): 0318001.  
周兴, 但旦, 千佳, 等. 结构光照明显微中的超分辨图像重建研究 [J]. *光学学报*, 2017, 37(3): 0318001.
- [6] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-796.
- [7] 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.
- [8] Pan W H, Li W, Qu J H, et al. Research progress on organic fluorescent probes for single molecule localization microscopy [J]. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 2019, 36(3): 269-281.  
潘文慧, 李文, 屈璟涵, 等. 单分子定位超分辨显微成像有机荧光探针的研究进展[J]. *应用化学*, 2019, 36(3): 269-281.
- [9] Gordon M P, Ha T, Selvin P R. Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(17): 6462-6465.
- [10] 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): 499-505.
- [11] Lee A, Tsekouras K, Calderon C, et al. Unraveling the thousand word picture: an introduction to super-resolution data analysis [J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(11): 7276-7330.
- [12] 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.
- [13] Small A, Stahlheber S. Fluorophore localization algorithms for super-resolution microscopy [J]. *Nature Methods*, 2014, 11(3): 267-279.
- [14] Robbins M S, Hadwen B J. The noise performance of electron multiplying charge-coupled devices[J]. *IEEE Transactions on Electron Devices*, 2003, 50(5): 1227-1232.
- [15] Zhu L, Zhang W, Elnatan D, et al. Faster STORM using compressed sensing [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 721-723.
- [16] Ilovitsh T, Meiri A, Ebeling C G, et al. Improved

- localization accuracy in stochastic super-resolution fluorescence microscopy by  $K$ -factor image deshadowing[J]. *Biomedical Optics Express*, 2014, 5(1): 244-258.
- [17] Jolliffe I T. *Principal component analysis* [M]. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 2002.
- [18] Le Marois A, Labouesse S, Suhling K, et al. Noise-Corrected Principal Component Analysis of fluorescence lifetime imaging data [J]. *Journal of Biophotonics*, 2017, 10(9): 1124-1133.
- [19] Liu X, Zhang B, Luo J W, et al. 4-D reconstruction for dynamic fluorescence diffuse optical tomography [J]. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 2012, 31(11): 2120-2132.
- [20] Prats-Montalbán J M, de Juan A, Ferrer A. Multivariate image analysis: a review with applications [J]. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2011, 107(1): 1-23.
- [21] Pedersen F, Bergströme M, Bengtsson E, et al. Principal component analysis of dynamic positron emission tomography images[J]. *European Journal of Nuclear Medicine*, 1994, 21(12): 1285-1292.
- [22] Liu J X, Du B, Deng Y Q, et al. Terahertz-spectral identification of organic compounds based on differential PCA-SVM method[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2019, 46(6): 0614039.
- 刘俊秀, 杜彬, 邓玉强, 等. 基于差分-主成分分析-支持向量机的有机化合物太赫兹吸收光谱识别方法[J]. *中国激光*, 2019, 46(6): 0614039.
- [23] 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.
- [24] Thompson R E, Larson D R, Webb W W. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes[J]. *Biophysical Journal*, 2002, 82(5): 2775-2783.
- [25] O'Connor D V, Phillips D. *Time-correlated single photon counting*[M]. USA: Academic Press, 1984: 1-35.
- [26] Wang Z, Bovik A C, Sheikh H R, et al. Image quality assessment: from error visibility to structural similarity [J]. *IEEE Transactions on Image Processing*, 2004, 13(4): 600-612.
- [27] Collection of reference datasets [DB/OL]. (2018-11-30) [2019-10-17]. <http://bigwww.epfl.ch/smlm/datasets/>.
- [28] Nieuwenhuizen R P J, Lidke K A, Bates M, et al. Measuring image resolution in optical nanoscopy[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(6): 557-562.