

基于时域迭代小波变换的单分子定位图像背景去噪

吴天琦^{1,2}, 肖文^{1,2}, 李仁剑^{1,2}, 徐以智^{1,2}, 胡学娟^{2,3}, 陈玲玲^{1,2,3*}

¹深圳技术大学健康与环境工程学院, 广东 深圳 518118;

²深圳大学物理与光电工程学院, 广东 深圳 518060;

³广东省普通高校先进光学精密制造技术重点实验室, 广东 深圳 518118

摘要 单分子定位显微成像技术采集的图像中包含大量噪声及样本复杂的背景信息,而现有定位重组计算中常用的去噪算法难以去除结构性噪声,从而影响了超分辨图像的重建效果。本文构建了基于时域迭代小波变换(TDIWT)的背景噪声去除算法,该算法可针对不同信噪比的单分子数据集自适应选取合适的分解层数和迭代次数进行批量去噪处理。在模拟数据验证中,所提算法相比空域小波和时间极值发射极恢复算法在结构相似性指数、峰值信噪比上分别高出 226%、50.8%和 58.5%、16.6%。此外,利用自行搭建的 easySTORM 系统采集的实验数据和单分子显微成像测试网站提供的实验数据进行了不同算法的背景去噪比较,结果发现,TDIWT 处理后重建的超分辨图像可使受噪声影响断裂的微管蛋白呈现为连续状态,验证了其优秀的结构性荧光噪声去除效果。TDIWT 算法为单分子显微成像重建过程中结构性背景噪声的去除提供了新的自适应批量处理方案。

关键词 图像处理;单分子定位显微成像;超分辨成像;时域迭代小波变换;背景去噪

中图分类号 O436

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202148.1307001

1 引言

超分辨显微成像技术具有能突破光学衍射极限的特性,可对细胞内的超精细结构进行光学成像,已成为生命科学领域重要的研究手段之一。其中的单分子定位显微成像(SMLM)技术利用荧光单分子闪烁进行图像的采集和重建^[1-2],相较于受激发散损耗显微成像技术^[3]具有复杂度和成本低、分辨率高等优势,具有进一步推广应用的潜力。SMLM 的成像效果不仅与其成像系统参数、样本标记和荧光分子的闪烁条件等息息相关,也直接受限于其采取的定位重建和数据处理方法。

自 SMLM 技术提出以来,涌现出了大量的定位处理算法和软件,如 FALCON^[4]、DAOSTORM^[5]、Peak Fit^[6]、ThunderSTORM^[7]、WindSTORM^[8]等。SMLM 通过激光调制来控制荧光分子的激活和失活,在一定时间内激活样本给

定区域中的部分稀疏荧光分子,采集处于激活状态的荧光分子的图像,最后对其进行单分子定位重组得到超分辨图像,因此其采集的图像中会包含大量噪声(如散粒噪声),尤其是部分样本较强的背景信息带来的结构性荧光噪声(存在于上万张采集的图像中),会严重影响超分辨图像的重建质量。为了提高重建超分辨图像的准确度,所有定位重组算法均包含数据预处理步骤,以期充分实现对荧光闪烁信号与背景信号的信噪分离。常用的去噪算法包括传统的空间滤波,如 DAOSTORM 和 quickPALM 中使用的高斯滤波^[5,9],其计算速度快,可在一定程度上抑制高斯噪声,但难以去除结构性背景噪声。Hoogendoorn 等^[10]于 2014 年提出的在时间轴上采用中值滤波的算法虽然提高了对结构性背景噪声的分离效果,但却会抑制荧光的闪烁强度和尺寸,严重高估了荧光发射体,从而降低了分离的信号的信噪比。Ma 等^[11]在 2019 年提出了基于时间极值的发

收稿日期: 2020-11-30; 修回日期: 2021-01-06; 录用日期: 2021-01-20

基金项目: 广东省普通高校特色创新类项目(2018KTSCX349)、深圳市科技计划基础研究项目(JCYJ20190813102005655)、深圳市科技计划基础研究项目(JCYJ20180301170959233)

通信作者: *chenlingling@sztu.edu.cn

射极恢复算法,该算法利用图像序列的像素极值将荧光发射体从背景信号中分离出来并集成到 WindSTORM 中,较好地解决了中值滤波中荧光发射体的高估问题,但是仍然较难去除结构性背景噪声。

小波变换通过突变信号和缓慢变化背景信号之间的频率差异进行滤波分离,在信号检测与消噪^[12-13]、图像压缩^[14]、光谱分析^[15]等领域具有广泛应用。在超分辨成像领域,空域小波算法已被引入来增强信噪分离效果,如:2014年,Ovesný等^[7]在 ThunderSTORM 算法中引入空域小波阈值法进行滤波;同年,Min等^[4]在 FALCON 成像算法中采用空域小波迭代法进行了背景估计。上述方法虽然均有效提升了信噪分离效果,但由于单分子数据集中的荧光闪烁信号相较结构性荧光背景噪声在时间尺度上出现和消失的速度更快,因此传统的空域小波算法难以对随时间变换的不同信号进行有效分离,从而影响了最后的重建效果(尤其是在结构性背景噪声强度与荧光闪烁信号相当的情形下)。

为了解决上述问题,本文构建了基于时域迭代小波变换(TDIWT)的背景噪声去除算法,针对不同信噪比单分子数据集自适应选取合适的分解层数和迭代次数进行分类批量处理,实现了信噪分离效果优化和计算耗时的均衡。在具有不同信噪比模拟数据集的验证下,TDIWT 算法相比传统算法对信噪比的分离更加彻底。模拟数据结果表明:在高信噪比下,TDIWT 算法比空域小波算法在结构相似性指数和峰值信噪比上分别高出 29.9%和 33.3%;在中信噪比下,分别高出 68.5%和 34%;在低信噪比下,分别高出 226%和 50.8%。本文利用实验室自主搭建的 easySTORM 系统采集的细胞微管蛋白单分子数据集和单分子显微成像软件测试网站提供的微管蛋白 Tubulin ConjAL647 数据集进行降噪处理和定位重组验证,结果发现,TDIWT 算法去除了传统算法难以处理的结构性荧光噪点,从而使重建出的微管蛋白呈现连续状态。本文构建的 TDIWT 算法为单分子定位超分辨成像提供了一个全新的图像预处理去噪方案,特别适用于含有较强结构性背景荧光噪声的单分子数据集的定位重组。

2 TDIWT 算法及模拟仿

2.1 TDIWT 算法

根据单分子定位数据集的荧光闪烁信号在时间

轴上峰值强度高、变化快,以及结构性荧光噪声(无论强度大小)在时间轴上都存在变化缓慢的特点,TDIWT 算法的堆栈序列可以表示为

$$f(x, y, t) = a_s(x, y, t) + b_g(x, y, t), \quad (1)$$

式中: $f(x, y, t)$ 是整个图像的序列信息; $a_s(x, y, t)$ 代表随时间变化较快的闪烁荧光信号; $b_g(x, y, t)$ 代表随时间变化较慢的背景噪声,包括其中的细胞组织的结构性荧光噪声和相机采集过程中的偏置噪声、读出噪声等。从堆栈序列像素点的时间轴上提取强度信息,然后通过小波分解得到低频近似系数,再进行拟合重建背景,公式为^[16]

$$f = \sum_{k \in \mathbb{Z}} a_k^{j-1} \phi(2^{j-1}x - k) + \sum_{k \in \mathbb{Z}} b_k^{j-1} \varphi(2^{j-1}x - k), \quad (2)$$

式中: f 为待分解信号; a 为近似系数; b 为细节系数; j 为尺度分解层数; ϕ 为尺度函数; φ 为小波函数。随后将预估高于拟合背景的值作为新的被分解信号进行迭代,重复小波分解,重建迭代过程。增加迭代过程可以避免直接进行小波重组产生的频域重叠^[17]。

本文构建的 TDIWT 算法包括自适应批量分类预处理和小波变换去噪两部分,算法流程如图 1 所示:对于读取的数据集,在预处理过程中根据信噪比(SNR)的不同自适应选取小波参数,以达到分离效果和计算耗时的最佳平衡;参数确定后,将每个像素点的强度值在时间上的分布作为一个子集进行迭代小波计算,分离出信号和背景噪声,最后将各个像素子集分离的信号和噪声进行集成,得到分离的信号和背景。小波算法的主要步骤包括:①对堆栈中的像素点按照时间轴提取强度信号;②对信号进行小波分解提取近似系数 A_k ,使用近似系数进行小波重构,进而拟合背景曲线;③预估高于背景曲线的重构信号,并再次用小波分解该信号;④重复②③过程,直至得到背景拟合数据;⑤根据像素尺寸范围输出分离的信号和背景图像堆栈。图 1 为 TDIWT 算法流程图,其中 i 和 j 为像素坐标变量, L 和 W 为图像像素纵横坐标范围。

2.2 模拟数据集仿真

本文中的数据仿真与计算处理均在惠普 Z840 工作站上进行,CPU 为 Intel[®]-Xeon[®] E5-2643v4,内存为 256 G,GPU 为 NVIDIA Quadro P5000。单分子定位模拟数据集包括信号和噪声两部分:利用开源软件 ImageJ 插件中的 ThunderSTORM 模拟数据生成器选项生成模拟荧光闪烁点信号,其中像

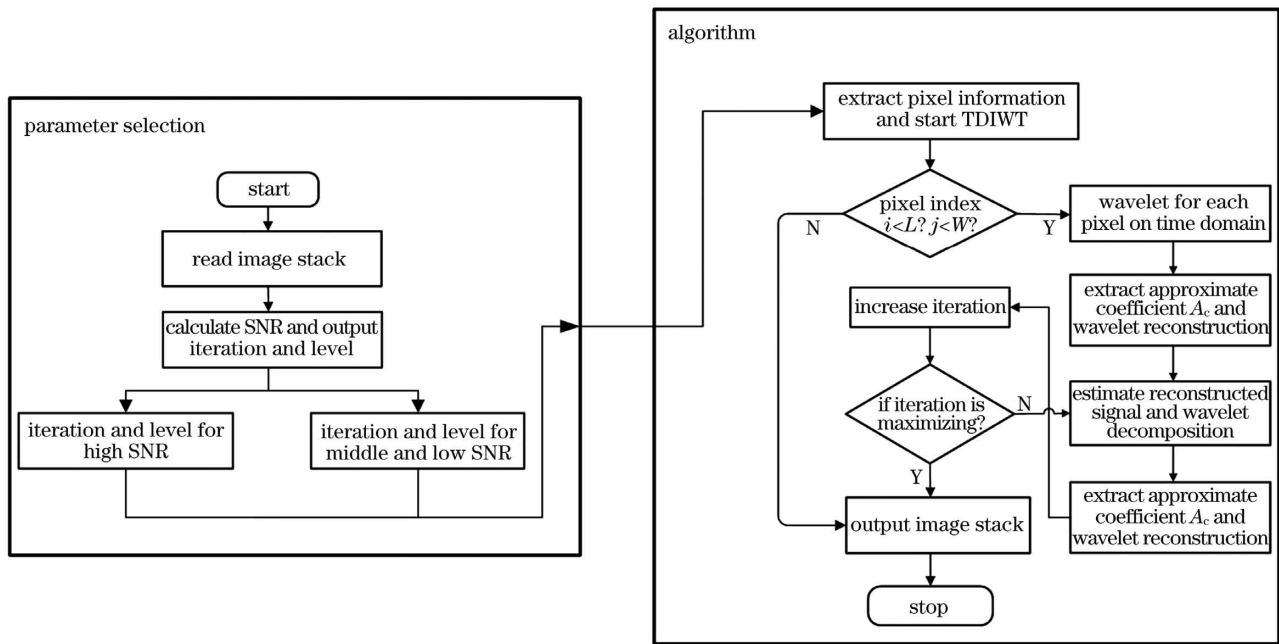


图 1 TDIWT 算法流程图

Fig.1 Flow chart of time-domain iterative wavelet transform algorithm

素大小设置为 100 nm,模数转换率设置为 0.67,量子效率为 95%,模拟采集图像的尺寸为 128 pixel × 128 pixel,图像堆栈帧数设置为 400,荧光分子辐射体模型为高斯模型,半峰全宽为 200~350 nm,辐射光子数为 3000,密度为 0.2 μm⁻²;模拟噪声包含相机自带的偏置噪声、系统产生的散粒噪声,以及细胞组织内部条纹状和环状非均匀结构性背景噪声。信噪比的计算公式为^[18]

$$\alpha_{\text{SNR}} = \frac{I_0}{\sqrt{\sigma_{\text{bg}}^2 + \sigma_{I_0}^2}}, \quad (3)$$

式中: I_0 是高于背景的最大信号强度; σ_{bg} 是背景强度的均方差; σ_{I_0} 是信号强度的均方差。最后可以得到混合图像的不同信噪比的模拟仿真数据集,包括高信噪比(SNR10)、中信噪比(SNR6)、低信噪比(SNR2)三类仿真数据集。

为了便于将 TDIWT 算法与现有单分子定位计算中使用的常见去噪算法进行对比,本文选取了基于时间极值发射极的恢复算法(EVER)^[11]、高斯去噪(GF)^[9]、空域小波背景估计算法(BEWT)^[4]、中值滤波(MF)^[19]和滚球滤波(RB)^[20]算法。同时,本文引入峰值信噪比(PSNR)和结构相似性指数(SSIM)对去噪后的信号图像进行定量分析。PSNR采用图像的均方差对降噪后的信号进行质量评估,即

$$\alpha_{\text{PSNR}} = 10 \lg \left(\frac{f_{\text{MAX}}^2}{f_{\text{MSE}}} \right), \quad (4)$$

其中,

$$f_{\text{MSE}} = \frac{1}{mn} \sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{n-1} [I(i, j) - K(i, j)]^2, \quad (5)$$

式中: f_{MAX} 代表最大像素值; f_{MSE} 代表均方差; m 和 n 分别为图像像素横纵坐标的最大值。SSIM 值通过结构、亮度和对比度这三个方面的相似性来体现图像信息的感知变化^[21],其计算公式为

$$f_{\text{SSIM}}(x, y) = [l(x, y)]^\alpha \cdot [c(x, y)]^\beta \cdot [s(x, y)]^\gamma, \quad (6)$$

式中: $l(x, y)$ 代表亮度; $c(x, y)$ 代表对比度; $s(x, y)$ 代表结构; α 、 β 、 γ 分别表示亮度、对比度和结构的相关重要程度,一般都设置为 1。

本文中高信噪比与中低信噪比下的分解层数与迭代次数已根据模拟数据进行评估,评估指标主要是 SSIM 值和计算耗时。如图 2 所示,随着分解层数和迭代次数的增加,SSIM 值存在一个快速增长的区间,但当 SSIM 达到阈值后,随着分解层数和迭代次数继续增大,SSIM 的变化趋缓,但其计算耗时仍成倍增加。综合考虑后,在高信噪比和中低信噪比下选择分解层数、迭代次数为 4、2 和 5、2,以达到分离效果和计算耗时的最佳平衡。

利用各算法去噪后的实际图像的分离效果如图 3(b)~(f) 所示,其对比量化结果如图 4 所示。图 3 和图 4 的对比结果表明,TDIWT 在不同信噪比下的实际信噪分离视觉效果以及 SSIM、PSNR 量化判断都优于目前的常见算法。图 4(a)~(c) 显

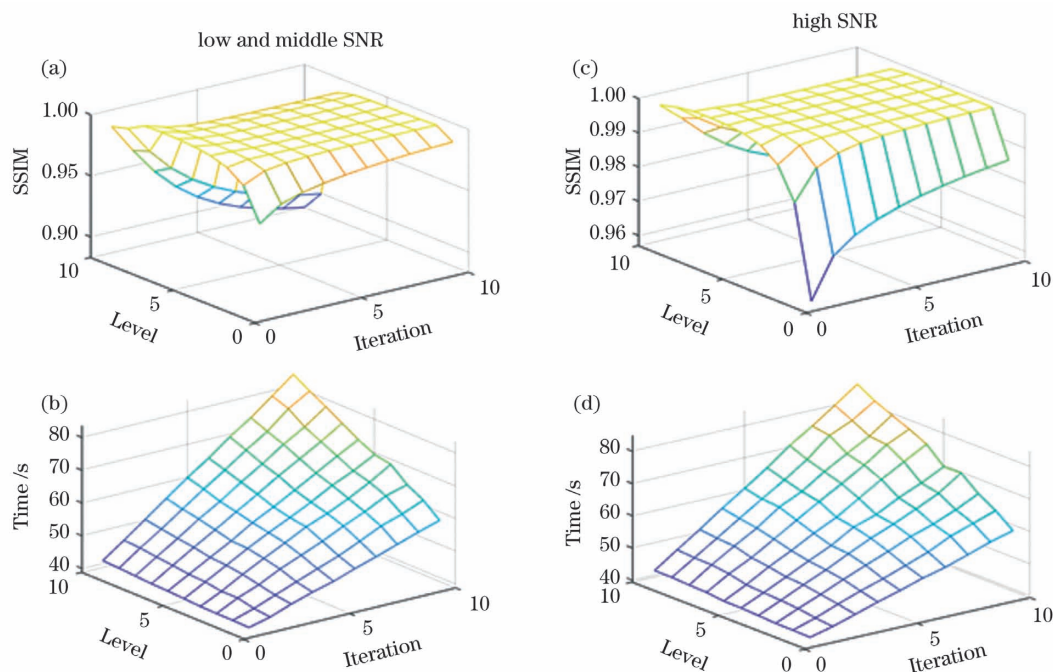


图 2 不同信噪比下 SSIM 值和耗时随分解层数和迭代次数的变化图。(a)~(b) 中低信噪比下；(c)~(d) 高信噪比下

Fig. 2 Diagrams of SSIM and time consumption changing with levels and iterations under different SNR datasets.

(a)~(b) Under low and middle SNR datasets; (c)~(d) under high SNR datasets

示,尽管随着信噪比降低,各算法下的 SSIM 和 PSNR 都会整体下降,但时域滤波(如 TDIWT、EVER)比空域滤波(如 BEWT)在 SSIM 值和 PSNR 上要更高,尤其是在低信噪比下优势更突出:在高信噪比下,TDIWT 比空域小波算法在 SSIM 和 PSNR 上分别高出 29.9% 和 33.3%,在中信噪比下分别高出 68.5% 和 34%,在低信噪比下分别高出 226% 和 50.8%。这是因为与荧光闪烁信号相比,较强的结构背景噪声在时域上的变化是缓慢的,而在空域上二者都属于突变的阶跃型信号,难以被空域滤波区分,验证了时域滤波对结构性背景噪声的去除要比空域滤波更加有效。尽管 BEWT 算法对空间阶跃性突变信号具有良好的分离能力,但其对缓变结构性信号的分离效果较差,导致分离出的信号图中包含了完整条形及环形结构的背景信息;GF 和 MF 算法均属于平滑滤波,虽然可以去除部分结构性背景噪声,但同时荧光闪烁信号也被削弱。与传统的空间滤波相比,基于时间滤波的 EVER 算法虽然滤除了大部分结构性背景噪声,但是依然残留了少部分结构性背景噪声。从 SSIM 和 PSNR 的量化数值上看,TDIWT 在高、中信噪比数据中分别比同为时域滤波的 EVER 高出 1.6%、8.7% 和 11.8%、16.9%,表明 TDIWT 算法对结构性背景噪声的分离效果更好。值得注意的是,在低信噪比情

况下,TDIWT 比 EVER 算法在 SSIM 和 PSNR 量化指标上分别高出 58.5% 和 16.6%。这表明在低信噪比情况下,EVER 算法对信号的提取能力会大幅衰减(相较于高信噪比下的 SSIM 值约降低 41%),但 TDIWT 仍能保持较强的信噪分离能力(约衰减 8.5%)。

在含有较高结构性背景噪声的环境中,选取结构性噪声附近的单个闪烁信号,采用不同的算法进行信噪分离,然后将分离的信号进行归一化强度计算,并将分离信号与原始仿真信号进行对比,如图 3(g) 所示。可以发现,TDIWT 分离的信号与原始仿真信号最为接近,而其余算法分离出的信号仍不同程度地含有部分噪声和背景信息,都明显偏离了原始仿真信号。综合对比后发现,TDIWT 算法由于对每个像素点在时域上的强度值进行小波分解迭代,更易将随时间快速变换的闪烁点信号与缓慢变化的背景信号分离开,因此相比其他常见算法对荧光闪烁信号与结构性背景噪声的分离具有更大优势。这一优势在低信噪比和结构性背景噪声更强的情况下尤为突出,与其他算法在低信噪比情况下出现信噪分离能力的快速衰减不同,TDIWT 算法在低信噪比情况下仍能保持优良的信噪分离能力。

由于各算法实现特点(如迭代/非迭代)的差异,

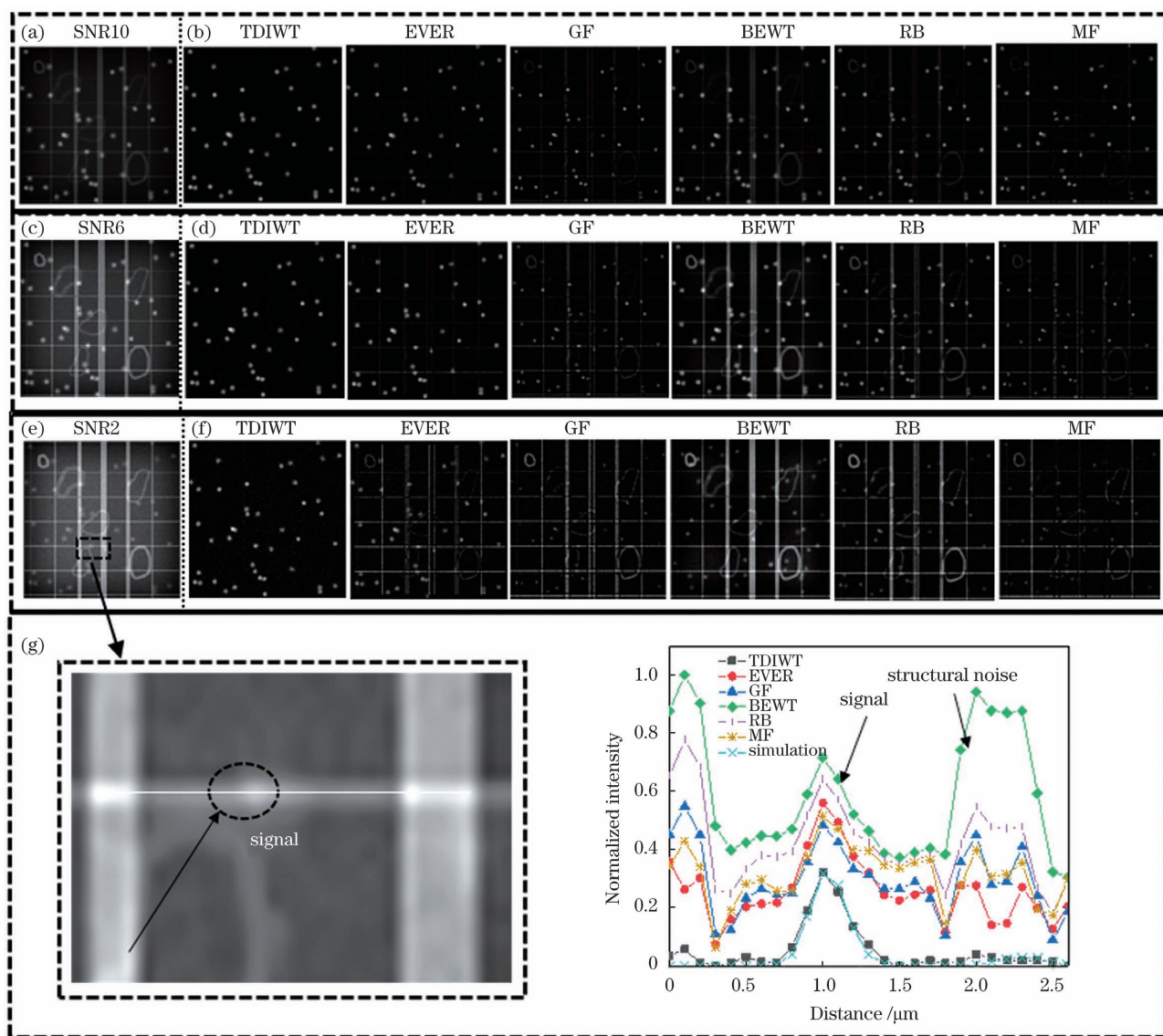


图 3 不同信噪比模拟数据集及不同算法的分离效果。(a)高信噪比 SNR10 模拟数据集;(b)高信噪比下不同算法分离的信号图;(c)中信噪比 SNR6 模拟数据集;(d)中信噪比下不同算法分离的信号图;(e)低信噪比 SNR2 模拟数据集;(f)低信噪比下不同算法分离的信号图;(g)单个闪烁信号的归一化强度

Fig. 3 Different simulated SNR datasets and separated signals after processing with different algorithms. (a) Simulated SNR10 dataset; (b) separated signals with different algorithms for SNR10 dataset; (c) simulated SNR6 dataset; (d) separated signals with different algorithms for SNR6 dataset; (e) simulated SNR2 dataset; (f) separated signals with different algorithms for SNR2 dataset; (g) normalized intensity of single fluorescence signal

本文也考察了各个算法在不同信噪比数据集上处理的平均计算耗时,如图 4(d)所示。TDIWT 算法的平均计算耗时约为 BEWT 的 48%,约为 GF 的 117.8% 和 EVER 的 321%。以上算法统一在 MATLAB2018 平台上实现,其耗时的主要差异来源于迭代和非迭代的计算本性。由于本文选取的 MF 和 RB 是基于 Java 平台开发的以插件形式集成到 ImageJ 开源软件中的算法,其已完成优化,因此耗时较短。

综上,在高中低三种信噪比环境模拟数据集中,TDIWT 算法对结构性背景噪声的分离效果要优于其他算法,尤其是在低信噪比和结构性背景强的情形下优势更加明显。虽然其耗时由于迭代计算而高于 EVER,略高于 GF,但其在低信噪比下分离后量化的 SSIM 值是 EVER 和 GF 的 158% 和 180%,所以 TDIWT 为含有较强结构性背景荧光噪声的单分子数据集的定位重组算法提供了一个更稳定的信噪分离方案。

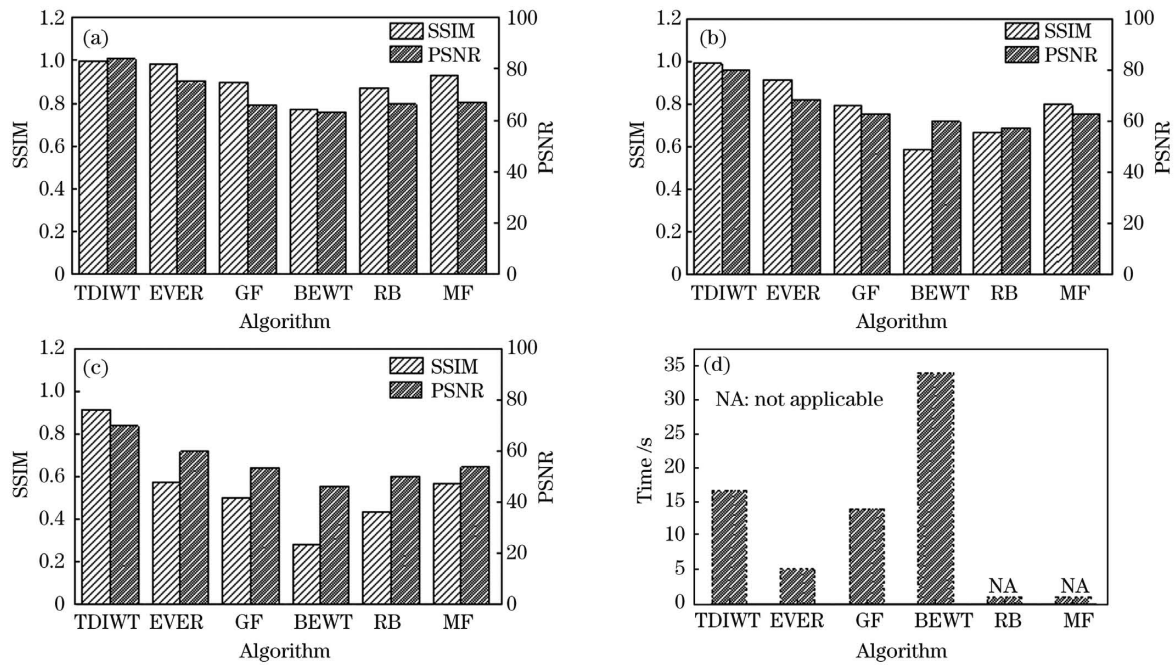


图 4 高中低信噪比数据集下不同算法的 SSIM 与 PSNR 的对比及各算法的耗时对比。(a) 高信噪比 SNR10 下不同算法的 SSIM 与 PSNR 柱状图; (b) 中低信噪比 SNR6 下不同算法的 SSIM 与 PSNR 柱状图; (c) 低信噪比 SNR2 下不同算法的 SSIM 与 PSNR 柱状图; (d) 不同算法的耗时

Fig. 4 Comparison of SSIM and PSNR under different algorithms in simulated datasets with high, middle and low SNRs and time consumption of different algorithms. (a) Comparison of SSIM and PSNR under different algorithms in SNR10 datasets; (b) comparison of SSIM and PSNR under different algorithms in SNR6 datasets; (c) comparison of SSIM and PSNR under different algorithms in SNR2 datasets; (d) time consumption of different algorithms

3 实际实验数据的验证

本文基于单分子显微成像软件测试网站^[22]上的微管蛋白数据集 Tubulin ConjAL647 对 TDIWT、EVER、GF、BEWT、RB 和 MF 算法进行了初步实际数据验证,其中前处理去噪后的超分辨率重组均统一使用单分子定位算法 WindSTORM PLUS^[23]。图 5(a)~(f)分别给出了使用 TDIWT、EVER、GF、BEWT、RB 和 MF 降噪处理后的超分辨率重组图像,其中虚线框图中展示了放大的微管蛋白细节。对比图 5(a)~(f)可以发现,经传统算法 (EVER、GF、BEWT、RB 和 MF) 处理后,结构性荧光噪声[如图 5(g)中的圆形虚线框图所示]会被当成荧光闪烁点进行单分子定位重组,从而使原本处于连续状态的微管蛋白呈断开状。相比较而言,由于 TDIWT 算法可以将结构性荧光噪声识别出来并加以去除,其超分辨率重组图像中可显示出微管蛋白的连续状态,验证了其对于含有较强结构性背景荧光噪声的单分子数据集进行信噪分离的优越性。

此外,本课题组基于实验室自主搭建的

easySTORM 成像系统^[23]进行了单分子数据集的采集和处理,成像系统示意图如图 6 所示。样本为 Alexa Fluor647 染色的微管蛋白组织,采集相机为 sCMOS (Photometrics Prime BSI, 像元尺寸为 $6.5 \mu\text{m}$, 量子效率为 95%), 物镜采用 60 倍油镜 (Olympus UPlanFLN 60x/1.25 Oil Iris), 激光功率约为 $1 \text{ kW}/\text{cm}^2$, 曝光时间为 30 ms, 采样频率为 33.3 Hz, 采集帧数为 5000 帧, 采集时间为 160 s 左右。分别采用 TDIWT、EVER、GF、BEWT、RB 和 MF 算法进行前期的降噪处理, 后期的定位重组采用 WindSTORM PLUS 算法, 整个图像的重建区域为 $256 \text{ pixel} \times 256 \text{ pixel}$ 。重组后的图像如图 7 所示, 可以看出: 明场中模糊不清的微管轮廓经 TDIWT 处理并重建后呈现出了更细微的微管结构; 同时, 虚线框内显示 TDIWT 算法去除了结构性背景噪声, EVER、BEWT、RB、MF 算法处理后重建的图像中仍然残留着结构性背景, 而 GF 算法虽然也去除了结构性噪声, 但其在去噪过程中连同部分信号也一起去除了, 且经 GF 算法处理后的荧光信号数量最少。

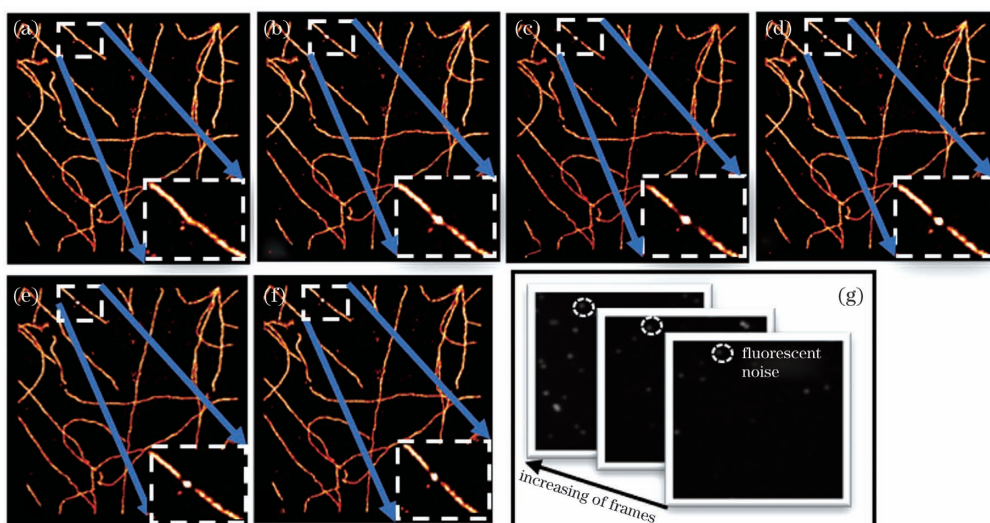


图 5 Tubulin ConjAL647 的超分辨重组图像。(a)~(f) 分别对应 TDIWT、EVER、GF、BEWT、RB、MF 处理后的重建图；
(g) 原始数据集

Fig. 5 Reconstructed super-resolved images of Tubulin ConjAL647. (a)–(f) Images reconstructed with TDIWT, EVER, GF, BEWT, RB, and MF algorithms, respectively; (g) raw dataset

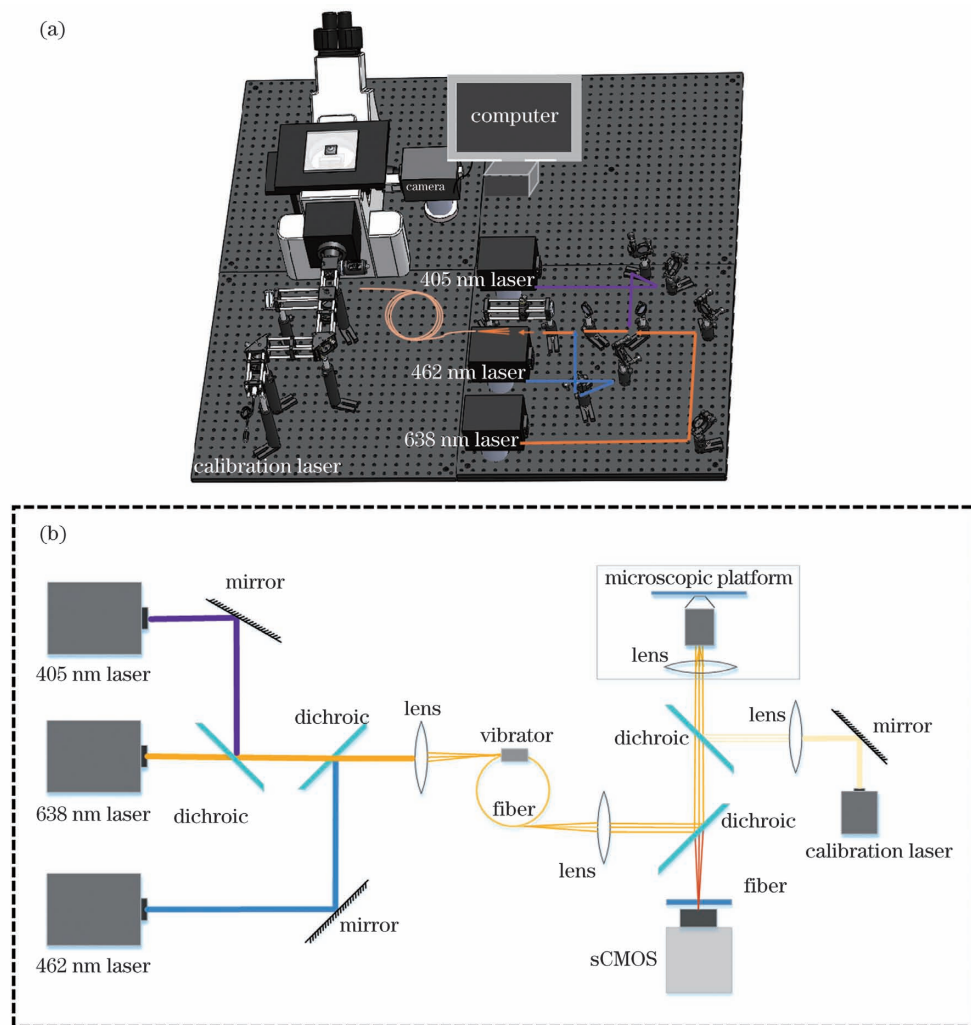


图 6 easySTORM 实际装置三维图和示意图。(a) 三维图；(b) 示意图

Fig. 6 Three-dimensional experimental device diagram of easySTORM. (a) Three-dimensional diagram; (b) schematic

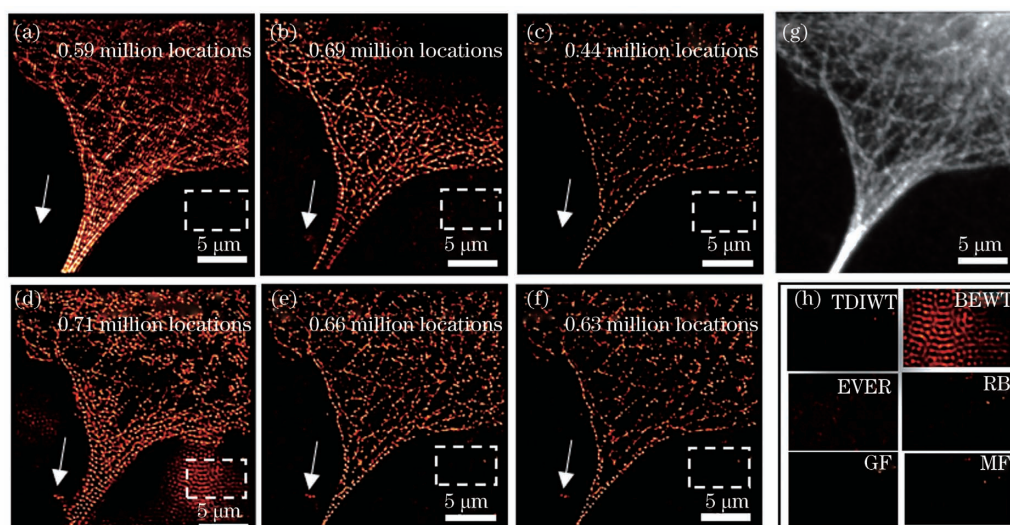


图 7 不同算法处理后的超分辨重建图。(a)~(f)经 TDIWT、EVER、GF、BEWT、RB、MF 处理后的超分辨重建图；(g)明场荧光图；(h)虚线框中的结构性噪声

Fig. 7 Super-resolved images reconstructed with different algorithms. (a)–(f) Super-resolved images reconstructed with TDIWT, EVER, GF, BEWT, RB, and MF pre-processing; (g) bright-field fluorescence image; (h) structural noise in dashed box

4 结 论

本文构建了基于时域迭代小波的背景噪声去除算法 TDIWT, 该算法能够自适应选择合适的分解层数和迭代次数对不同信噪比的单分子定位数据集进行批量的信噪分离计算。本文所提算法将随时间快速变换的闪烁点信号与缓慢变化的背景信号分离, 解决了超分辨重组的去噪算法难以去除结构性荧光噪声的问题。在高中低三种信噪比条件下的模拟数据集仿真验证中, TDIWT 显示出了相比传统降噪算法更好的分离信号与结构性背景噪声的能力。利用单分子定位显微网站提供的实验数据以及自行搭建的 easySTORM 系统采集的微管蛋白实验数据进行超分辨重组, 结果表明, TDIWT 算法可以去除传统算法难以去除的结构荧光噪点, 重建出了被结构荧光噪点干扰的连续微管蛋白结构。同时, 可以相信, 该算法的应用对成像采集数据的光学频率并不敏感, 可以广泛应用在不同波段采集的单分子数据集上。本文构建的时域迭代小波算法为单分子重建过程中去除结构性荧光背景噪声提供了新的解决方案, 尤其适用于含有较强结构性背景荧光噪声的单分子数据集, 可以降低噪声对信号重组的干扰, 更加准确地提取出信号, 从而提升定位的精度和准确度。后续可以引入 GPU 并行计算, 以进一步提高计算速度, 同时还可以与其他去噪算法进行混合滤波, 实现多重去噪分离, 进一步提高定位精度。

参 考 文 献

- [1] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313 (5793): 1642-1645.
- [2] Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. *Nature Methods*, 2006, 3 (10): 793-795.
- [3] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy [J]. *Optics Letters*, 1994, 19(11): 780-782.
- [4] Min J, Vonesch C, Kirshner H, et al. FALCON: fast and unbiased reconstruction of high-density super-resolution microscopy data [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 4577.
- [5] Holden S J, Uphoff S, Kapanidis A N. DAOSTORM: an algorithm for high-density super-resolution microscopy [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(4): 279-280.
- [6] Brede N, Lakadamyali M. GraspJ: an open source, real-time analysis package for super-resolution imaging [J]. *Optical Nanoscopy*, 2012, 1(1): 1-7.
- [7] Ovesný M, Křížek P, Borkovec J, et al. ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30 (16): 2389-2390.
- [8] Ma H, Xu J, Liu Y. WindSTORM: robust online

- image processing for high-throughput nanoscopy[J]. *Science Advances*, 2019, 5(4): eaaw0683.
- [9] Henriques R, Lelek M, Fornasiero E F, et al. QuickPALM: 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ [J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 339-340.
- [10] Hoogendoorn E, Crosby K C, Leyton-Puig D, et al. The fidelity of stochastic single-molecule super-resolution reconstructions critically depends upon robust background estimation[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 3854.
- [11] Ma H Q, Jiang W, Xu J Q, et al. Enhanced super-resolution microscopy by extreme value-based emitter recovery [EB/OL]. (2018-04-05) [2020-11-25]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/295261v1.article-metrics>.
- [12] Lin H, Guo S X, Zhao W, et al. Wavelet transform for evaluation of semiconductor laser reliability [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2004, 31(9): 1050-1054. 林虎, 郭树旭, 赵蔚, 等. 小波变换用于半导体激光器可靠性分析 [J]. *中国激光*, 2004, 31(9): 1050-1054.
- [13] Zhang C X, Chen M H, Wang F, et al. Optical coherence tomography image denoising algorithm based on wavelet transform and fractional integral [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2019, 56(18): 181008. 张晨曦, 陈明惠, 王帆, 等. 小波变换和分数阶积分结合的 OCT 图像去噪算法 [J]. *激光与光电子学进展*, 2019, 56(18): 181008.
- [14] Li Y S, Wu C K, Chen J, et al. Spectral satellite image compression based on wavelet transform [J]. *Acta Optica Sinica*, 2001, 21(6): 691-695. 李云松, 吴成柯, 陈军, 等. 基于小波的干涉多光谱卫星图像压缩方法 [J]. *光学学报*, 2001, 21(6): 691-695.
- [15] Meng X, Liu L, Jiang S, et al. Detection and revision of interference spectral signals based on wavelet transforms [J]. *Acta Optica Sinica*, 2019, 39(9): 0930007. 孟鑫, 刘磊, 江升, 等. 基于小波变换的干涉光谱信号检测与校正方法 [J]. *光学学报*, 2019, 39(9): 0930007.
- [16] Boggess A, Narcowich F J. A first course in wavelets with Fourier analysis [M]. Rui G S, Kang J, Transl. 2th ed. Beijing: Publishing House of Electronics Industry, 2010: 182-183. Boggess A, Narcowich F J. 小波与傅里叶分析基础 [M]. 芮国胜, 康健, 译. 2 版. 北京: 电子工业出版社, 2010: 182-183.
- [17] Galloway C M, le Ru E C, Etchegoin P G. An iterative algorithm for background removal in spectroscopy by wavelet transforms [J]. *Applied Spectroscopy*, 2009, 63(12): 1370-1376.
- [18] Kubitscheck U, Kückmann O, Kues T, et al. Imaging and tracking of single GFP molecules in solution [J]. *Biophysical Journal*, 2000, 78(4): 2170-2179.
- [19] Huang T, Yang G, Tang G. A fast two-dimensional median filtering algorithm [J]. *IEEE Transactions on Acoustics, Speech, and Signal Processing*, 1979, 27(1): 13-18.
- [20] Sternberg S R. Biomedical image processing [J]. *Computer*, 1983, 16(1): 22-34.
- [21] 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.
- [22] Single-molecule localization microscopy • software benchmarking [EB/OL]. [2020-11-25]. <http://bigwww.epfl.ch/smlm/index.html>.
- [23] Xiao W, Wu T Q, Li R J, et al. WindSTORM PLUS algorithm with parallel computing optimization [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(6): 0607001. 肖文, 吴天琦, 李仁剑, 等. 基于并行计算优化的 WindSTORM PLUS 算法 [J]. *中国激光*, 2020, 47(6): 0607001.

Single-Molecule Localization Image Background Denoising Based on Time-Domain Iterative Wavelet Transform

Wu Tianqi^{1,2}, Xiao Wen^{1,2}, Li Renjian^{1,2}, Xu Yizhi^{1,2}, Hu Xuejuan^{2,3}, Chen Lingling^{1,2,3*}

¹ College of Health Science and Environmental Engineering, Shenzhen Technology University, Shenzhen, Guangdong 518118, China;

² College of Physics and Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China;

³ Key Laboratory of Advanced Optical Precision Manufacturing Technology of Guangdong Provincial Higher Education Institute, Shenzhen, Guangdong 518118, China

Abstract

Objective Although the acquisition of single-molecule localization microscopy (SMLM) includes various noises and background information, completely removal of structural noise is difficult for current denoising algorithms (e. g. , the spatial wavelet algorithm and the extreme value-based emitter recovery algorithm) employed in the preprocessing of the reconstruction, thus decreasing the quality of reconstructed super-resolution images. To address this challenge, we develop a new background denoising algorithm based on the time-domain iterative wavelet transform (TDIWT), which can process a batch of SMLM datasets with different signal-to-noise ratios (SNRs) by adaptively selecting the appropriate levels and iterations. This algorithm can provide a new approach for adaptive batching SMLM data structural background.

Methods This denoising algorithm based on TDIWT includes two main parts. First, the appropriate level and iteration parameters of TDIWT are adaptively selected for different datasets to balance the time consumption and signal-noise separation effects by calculating the SNR of the dataset. Consequently, time-varied values of each pixel are calculated using TDIWT with selected parameters to separate the signal and background structural noise. The main steps of TDIWT calculation are described by (1) extracting the intensity of the signal from each pixel in a stack in the time domain; (2) acquiring the approximate coefficient via wavelet decomposition and then using it for wavelet reconstruction to fit the background curve; (3) estimating the reconstructed signal that is higher than the background curve and employing wavelet decomposition again; (4) repeating the process until the background fitting data is acquired; (5) outputting separated signal and background image according to the image size (Fig. 1).

Results and Discussions The simulated results demonstrate that the separation of signal and background using the TDIWT algorithm is more efficient than that using the other denoising algorithms (i. e. , extreme value-based emitter recovery, Gaussian filter, background estimation based wavelet transform, median filter, and rolling filter) by evaluating the direct visualization and the quantitative parameters including structural similarity index measure (SSIM) and peak signal-to-noise ratio (PSNR), as shown in Figs. 3 and 4. The SSIM and PSNR of the TDIWT algorithm are 29.9%, 68.5%, 226%, and 33.3%, 34%, 50.8% higher than that of the spatial wavelet algorithm (i. e. , background estimation based wavelet transform) using SNR10, SNR6, and SNR2 datasets, respectively. This can be explained by the fact that the intensity of the signal varies rapidly, but the background structural noise varies gradually in the time domain. This advantage of the TDIWT algorithm is more noticeable under the low SNR with a strong structural background. The normalized intensity of signal near strong structural noise is calculated, as shown in Fig. 3, illustrating that the separated signal using the TDIWT algorithm is the closest to the simulated signal compared with the other algorithms and demonstrating the improved accuracy of signal extraction. In addition, the experimental data acquired using our easySTORM system and the real reference data from an open single-molecule localization website are employed to further evaluate the developed algorithms. The reconstructed tubulin images show a continuous state using the TDIWT algorithm and a discontinuous state using the other algorithms from the same dataset with strong structural noise, as shown in Fig. 5. Figure 7 also demonstrates that the TDIWT algorithm could more effectively remove the structural noise.

Conclusions In this study, we have developed a new denoising algorithm based on a time-domain iterative wavelet algorithm, which can process a batch of SMLM datasets with different SNRs by adaptively selecting the appropriate levels and iterations. This algorithm can provide an accurate signal extraction from the noisy background, thus

improving super-resolution image reconstruction. Under the simulation datasets, the results have demonstrated that the structural similarity index and peak SNR of processed datasets using the TDIWT algorithm are increased by 226%, 50.8%, and 58.5%, 16.6% compared with that using the spatial wavelet and time extremum emitter recovery algorithm, respectively. In addition, the experimental data acquired using our easySTORM system and the data from the open single-molecule localization website have been employed to evaluate the algorithms. The reconstructed tubulin images have shown a continuous state using the TDIWT algorithm and a discontinuous state using the other algorithms from the same dataset, verifying the superiority of the algorithm. This denoising algorithm based on TDIWT can provide a new approach for adaptive batching SMLM data structural background.

Key words imaging processing; single-molecule localization imaging; super-resolution imaging; time-domain iterative wavelet transform; background denoising

OCIS codes 100.2960; 100.7410; 170.3880; 180.2520