

## 共路并行荧光辐射差分超分辨显微成像

张智敏<sup>1</sup>, 黄宇然<sup>1</sup>, 刘少聪<sup>1</sup>, 匡翠方<sup>1,2,3\*</sup>, 曹良才<sup>4</sup>, 刘勇<sup>5</sup>, 韩于冰<sup>1</sup>, 郝翔<sup>1</sup>, 刘旭<sup>1</sup><sup>1</sup>浙江大学光电科学与工程学院, 现代光学仪器国家重点实验室, 浙江 杭州 310027;<sup>2</sup>浙江大学宁波研究院, 浙江 宁波 315100;<sup>3</sup>山西大学极端光学协同创新中心, 山西 太原 030006;<sup>4</sup>清华大学精密测试技术及仪器国家重点实验室, 北京 100084;<sup>5</sup>上海电力学院, 上海 200090

**摘要** 本文提出了一种共路并行荧光辐射差分超分辨显微成像方法, 利用单个空间光调制器(SLM)同时产生两个相位灰度图, 对入射激光的水平偏振分量和垂直偏振分量同时进行调制, 使得最终的会聚光场由错开的高斯实心光斑和空心光斑组成。在样品面上, 利用错开的实心光斑和空心光斑同时对样品进行扫描, 与此同时在探测端利用两个探测器同时收集错开光斑所激发的荧光信号, 采用荧光辐射差分(FED)方法对采集的图像进行处理, 就可以实现对样品的快速超分辨成像。与传统的并行荧光辐射差分超分辨显微术相比, 本方法在保留了将成像速度提高一倍的优点的同时克服了非共路并行系统中不同器件引入的噪声、漂移对图像质量的影响, 并简化了光路。实验结果表明所提共路并行荧光辐射差分超分辨显微成像方法具有良好的超衍射极限成像能力。

**关键词** 显微; 荧光显微镜; 快速超分辨成像; 荧光辐射差分技术; 共路并行探测

中图分类号 O436

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202148.1607002

## 1 引言

共聚焦显微镜是生物学、生命科学等领域中观察细胞尺度结构的重要仪器。共聚焦显微镜通过与样品面共轭的针孔对离焦杂散光进行限制, 可以实现接近由衍射成像系统孔径导致的阿贝衍射极限的分辨率。由阿贝衍射极限决定的成像系统的分辨率极限为  $0.61\lambda/NA$ , 其中  $\lambda$  是光波波长,  $NA$  是物镜的数值孔径<sup>[1]</sup>。为突破衍射极限, 研究人员提出并深入研究了多种超分辨显微技术, 如结构光照明显微(SIM)<sup>[2-3]</sup>、荧光波动超分辨显微(SOFI)<sup>[4-5]</sup>、随机光学重构显微(STORM)<sup>[6-7]</sup>等。共聚焦显微成像是一般生物细胞学研究的常用工具, 共聚焦成像系统的分辨率通常在半波长左右<sup>[8]</sup>。目前, 共聚焦显微镜的分辨率仍不足以支持对细胞器、蛋白质等更小尺度样品的观察。

受激辐射损耗显微术(STED)<sup>[9]</sup>在原有共聚焦成像系统<sup>[10]</sup>的基础上加入一束高光强空心损耗光, 利用受激辐射效应实现了对激发焦斑外围荧光的抑制, 使得单次可发光区域小于衍射极限范围, 实现了超越衍射极限的分辨率。然而, 由于损耗光波长选在激发光谱长波拖尾处, 吸收截面小, 因此 STED 需要很高的损耗光强度, 这种高光强会对生物样品产生较大伤害, 引发光毒性、光漂白等问题。

荧光辐射差分显微术(FED)<sup>[11]</sup>是 2012 年由本团队匡翠方老师提出的超分辨成像技术, 该技术同样在共聚焦系统的基础上加入空心光束, 但其波长与实心光束一致且与实心光斑一样对荧光样品进行激发产生荧光, 然后利用差分技术将中心的超分辨荧光信息提取出来; 因此, 该技术需要的空心光束光强远小于 STED 中损耗光形成的空心光束的光强, 避免了高光强带来的问题。虽然

收稿日期: 2021-01-13; 修回日期: 2021-01-29; 录用日期: 2021-03-01

基金项目: 国家自然科学基金(61827825, 61735017)、浙江省自然科学基金重大项目(LD21F050002)、浙江省重点研究计划(2020C011116)

通信作者: \*cfkuang@zju.edu.cn

FED技术无法达到STED技术那样的超高分辨率,但由于其对荧光染料具有普适性且规避了光毒性和光漂白等问题,因此在活细胞生物成像方面具有广阔的应用前景。近年来,人们在FED的基础上提出了饱和荧光辐射差分超分辨显微术(sFED)<sup>[12]</sup>、虚拟荧光辐射差分超分辨显微术(vFED)<sup>[13]</sup>等一系列改进方法。

在最初的FED成像技术中,实心光斑和空心光斑分时对样品进行扫描得到图像,成像速度相对受限。2020年,本团队提出了并行荧光辐射差分超分辨显微术(pFED)<sup>[14]</sup>,该技术利用光束偏转装置在样品面上将实心光斑和空心光斑错开一定的距离,实现了对样品的并行扫描和探测,将成像速度提高了一倍。然而,由于pFED技术中的激发光经过了不同的光路,容易分别受到漂移、噪声等外界干扰,成像质量受到了一定限制;同时,pFED技术由于采用机械手段实现光斑精准错位,因此校准难度仍然较大。

本文提出了一种共路并行荧光辐射差分超分辨显微成像(cpFED)方法,该系统相较于pFED成像系统更为简单,校准难度降低,可以更好地消除漂移、噪声等外界干扰的影响。所提方法利用空间光调制器(SLM)将入射线偏振光的s分量和p分量分别调制在样品面上错开的高斯实心光斑和空心光斑,最后将两个探测器同时得到的信号进行差分,即可实现分辨率的提升。实验结果表明,这一方法具有良好的成像效果。

## 2 原理

传统的FED需要两次分时扫描以获得最终图像:首先使用高斯实心光斑扫描样品,得到实心光斑图像(即共聚焦图像),再使用面包圈形空心光斑扫描样品的同一区域,得到空心光斑图像;二者作差得到FED图像。这一关系可以描述为<sup>[11]</sup>

$$I_{\text{FED}} = I_c - rI_n, \quad (1)$$

式中: $I_c$ 、 $I_n$ 分别表示实心光斑图像、空心光斑图像的归一化强度分布; $I_{\text{FED}}$ 表示FED图像; $r$ 是差值系数。较高的差值系数有助于获得更高的分辨率,但容易造成信噪比的降低和负值畸变的产生。综合成像分辨率和成像质量,本文使用的差值系数值为0.62。一般将相减后出现的负值取为0。

cpFED同时生成错开一定距离的实心光斑和空心光斑进行并行扫描,提取实心光斑图像和空心光斑图像对应的重叠视场进行差分,即可得到最终

的超分辨荧光差分成像结果。为了确保光路系统同时产生错开的实心光斑和空心光斑,本技术采用空间光调制器实现对实心光斑和空心光斑的同时调制,具体方法设计见本文方法部分。其中,利用空间光调制器产生涡旋相位 $\varphi$ 为 $0 \sim 2\pi$ 的灰度图,将最终的会聚光斑调制成空心光斑,调制函数为 $P(\varphi) = \varphi$ ;对于实心光束,在空间光调制器对应位置加载闪耀光栅,产生倾斜光束,再利用空间光调制器与物镜入瞳间的共轭关系在样品面上生成与空心光斑错开的实心光斑。

圆孔衍射极限公式为

$$I(\theta) = I_0 \left[ \frac{2J_1(ka \sin \theta)}{ka \sin \theta} \right]^2, \quad (2)$$

式中: $k$ 为波矢的大小; $a$ 为圆孔半径; $\theta$ 为孔径角; $I_0$ 为中心光强的极大值。三级次级大的相对强度为 $I_2 \approx 0.0016I_0$ ,即当两光斑间距为两个艾里斑时,其旁瓣的影响小于千分之二。因此,成像时,两光斑间距应大于两个艾里斑。

## 3 方法

液晶空间光调制器具有仅能调制偏振方向与液晶分子取向一致的线偏振光的性质。利用这一性质,本团队提出了仅需单个液晶空间光调制器就可实现三维FED成像的方法<sup>[15-16]</sup>。该方法将空间光调制器分为左右两部分,使一束线偏振光中的s偏振分量和p偏振分量在空间光调制器的两部分中分别调制,并在样品面上形成横向和轴向空心光斑;随后,利用空间光调制器将三维FED所需的横向及轴向空心光束合为一路,即生成三维暗斑。本文提出的cpFED技术在激发光路上采用与之相似的设计,并对空间光调制器左右不同的部分产生不同的相位灰度图,从而实现了共路的并行成像,并将成像速度提高了一倍,同时兼顾了成像质量。

图1(a)所示为本文提出的cpFED光路示意图。488 nm光纤激光器发出的激发光经过准直镜及起偏器后成为平行的线偏振光,经由D形镜反射后以较小的人射角到达空间光调制器的左半部分。由于液晶空间光调制器仅可调制一个方向偏振光的性质,因此仅有线偏振光的p分量在此处被调制,而s分量不被调制。空间光调制器的出射光通过反射镜转折光路,回到空间光调制器的右半部分,其间两次经过同一个1/4波片,相当于经过一个1/2波片,偏振方向旋转了90°。此时,原s分量在经过波片后变成p偏振光,从而得以在空间光调制器的右

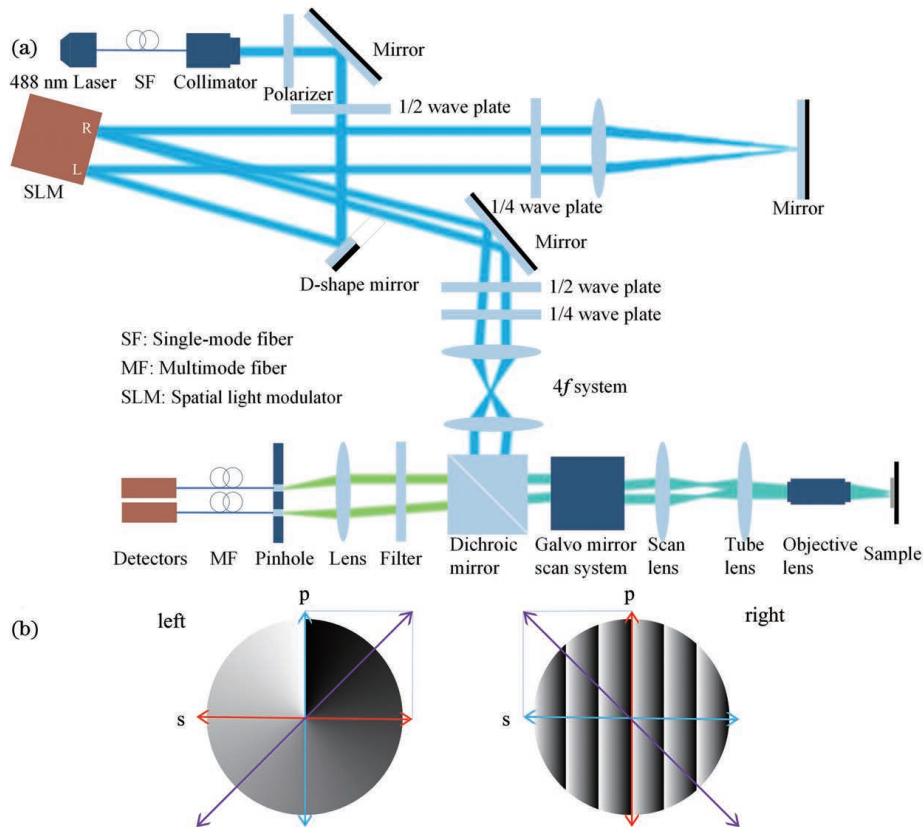


图1 系统原理说明图。(a)cpFED系统光路图,其中,空间光调制器与物镜入瞳共轭,样品面与针孔平面共轭;  
(b)空间光调制器的相位灰度图

Fig. 1 System schematic. (a) System setup strategy for cpFED, where the SLM is conjugated to the entrance pupil of the objective lens and the sample surface is conjugated to the pinhole plane; (b) phase grayscale images of SLM

半部分被调制,而原  $p$  分量不能被进一步调制;两束光分别经过同一  $1/2$  波片和  $1/4$  波片后,再经过用于中继共轭的  $4f$  系统和分光镜进入扫描振镜及显微镜架,在样品面上会聚成两个光斑,实现并行扫描(为了确保空心光斑的质量, $1/2$  波片和  $1/4$  波片主要用于将空心光束调制成圆偏振光)。需要注意的是,空间光调制器需要通过中间成像系统与物镜入瞳共轭,以保证相位调制的准确性。在探测路方面,本团队在针孔面上安装了两个相距  $500\ \mu\text{m}$  的多模光纤,起到针孔的作用。由于针孔面与样品面共轭,样品面上激发的两路荧光信号分别被两多模光纤接收,最终被两个雪崩二极管探测,得到共焦图像和负共焦图像。

空间光调制器上的相位灰度分布如图 1(b) 所示,空间光调制器的左半部分为  $0\sim 2\pi$  的涡旋相位分布灰度图,右边为闪耀光栅灰度分布图。分别对入射光束的  $p$  分量和  $s$  分量进行调制。结合前文,本系统将入射光的  $p$  分量调制成空心光斑,而  $s$  分量则被闪耀光栅调制产生倾斜。由于系统中的空间光调制器与显微物镜的入瞳面共轭,因此  $s$  分量最

终被会聚成偏移的实心光斑。

## 4 结 果

本团队首先使用直径分别为  $200\ \text{nm}$  和  $100\ \text{nm}$  的荧光颗粒样品验证 cpFED 系统的分辨能力。图 2(a)和图 2(b)给出了  $200\ \text{nm}$  颗粒的实心光斑图像和空心光斑图像,二者存在错位,错位的程度可以通过互相关获得,并可用于提取二者对应同一视场的部分。根据互相关结果,实心光斑和空心光斑错位的距离为  $1.20\ \mu\text{m}$ ,而系统的激发光的波长为  $488\ \text{nm}$ ,物镜是放大倍数为 100 倍、数值孔径为 1.49 的复消色差物镜,激发光在样品面上的艾里斑大小为  $400\ \text{nm}$ ,满足了光斑间距大于两个艾里斑大小的要求。对于  $15\ \mu\text{m}\times 15\ \mu\text{m}$  的视场,cpFED 图像的大小是实心光斑图像和空心光斑图像的 91.45%。图 2(d)、(e)、(f)是实心光斑图像、空心光斑图像和 cpFED 图像同一区域的放大图,可见,经过差分处理后,对比度和分辨率均有明显提升。

在 FED 中,系统的成像质量主要取决于空心光斑的质量。由于本系统使用了空间光调制器,因此

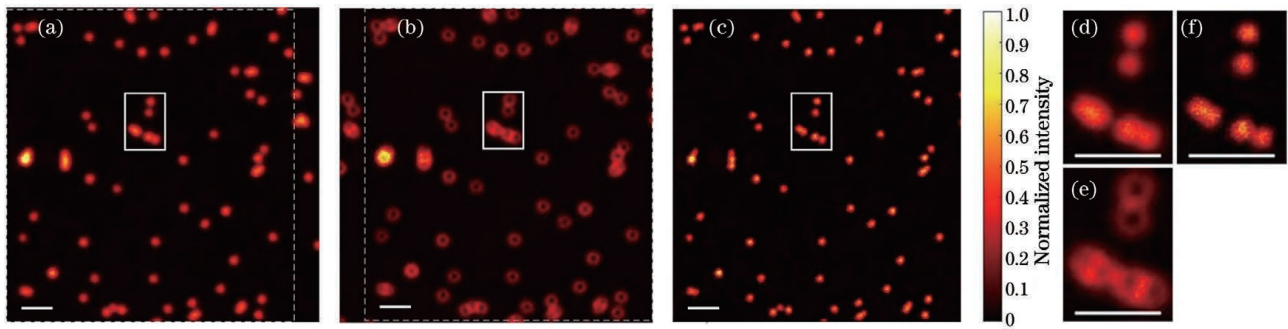


图2 200 nm 颗粒的成像结果。(a)实心光斑(共聚焦)图像;(b)空心光斑图像,(a)(b)虚线框对应同一视场;(c)cpFED 图像,其大小与虚线框部分一致;(d)~(f)分别是(a)~(c)中实线框内的放大图。图中的比例尺代表  $1 \mu\text{m}$

Fig. 2 Imaging of particle with diameter of 200 nm. (a) Solid spot (confocal) image; (b) hollow spot image, where the parts within the dotted box correspond to the same field of view; (c) cpFED image, and its size is the same as the part within the dotted boxes in (a) and (b); (d)–(f) enlarged images in the solid boxes of (a)–(c). The scale bars represent  $1 \mu\text{m}$

在相位图上通过加入包含不同校正系数的部分泽尼克多项式可以实现对系统像差的校正,改善空心光斑的质量;同时,通过像差校正还能保证实心光斑、空心光斑与探测路的针孔更加精确地对准<sup>[17]</sup>。

100 nm 颗粒因其尺度接近 cpFED 的极限分辨率,因而能够更好地检验系统的分辨能力。图3给出了100 nm 颗粒的共聚焦图像和 cpFED 图像的对比。cpFED 图像分辨率的提升不仅通过全视场的整体效果体现,也可以通过图3(c)中所示的沿截线的归一化强度分布得到更精确的验证。在共聚焦图像中根据瑞利判据无法分辨的两相邻纳米颗粒在 cpFED 图像中能够被很好地分辨出来,其半峰全宽达到了 133 nm,验证了 cpFED 系统的超衍射极限成像能力。

生物样品的空间结构通常较纳米颗粒更复杂,荧光强度分布不均匀;因此,本文使用细胞波形蛋白(一抗:抗波形蛋白;二抗:连接 STAR GREEN)进一步验证系统的实际性能,成像结果如图4所示。对比图4(a)所示的共聚焦图像和图4(b)所示的 cpFED 图像可以看出,在微丝紧密排列的区域,后者的分辨率和对比度都有显著提升。此外,由于 cpFED 图像是相减得到的,因此图4(b)相较于图4(a)显示出了更低的背景噪声水平。

## 5 结 论

本文提出了一种共路并行荧光辐射差分超分辨显微成像方法,使用单个空间光调制器将线偏振光的两个分量分别调制为空心光束和倾斜的实心光束,生成错开一定距离的空心光斑和实心光斑,对样品进行并行扫描。相较于传统的 FED 方法以及已有的并行荧光辐射差分超分辨显微成像,cpFED 实

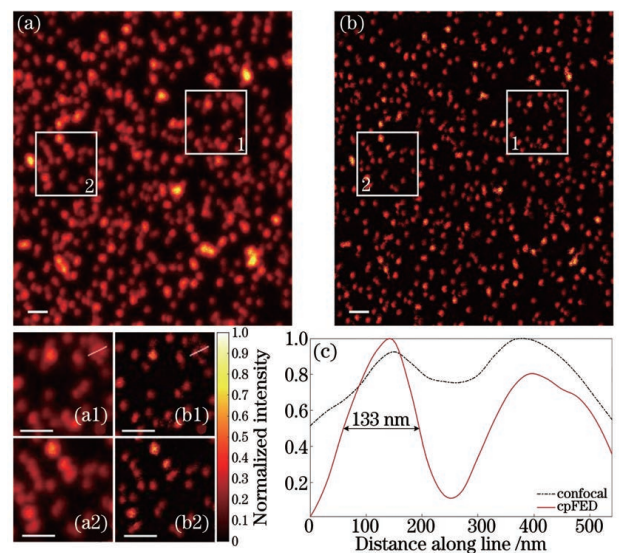


图3 100 nm 颗粒的成像结果。(a)共聚焦图像;(b)cpFED 图像;(c)沿(a1)和(b1)中截线的归一化强度分布;(a1)(a2)分别是(a)中方框1与方框2的放大图;(b1)(b2)分别是(b)中方框1与方框2的放大图。共聚焦图像中无法分辨的相邻颗粒在 cpFED 图像中能够被分辨,其半峰全宽达到了 133 nm。图中的比例尺代表  $1 \mu\text{m}$

Fig. 3 Imaging of particle with diameter of 100 nm. (a) Confocal image; (b) cpFED image; (c) normalized intensity distributions along the section lines in (a1) and (b1); (a1) (a2) enlarged images of the white frames 1 and 2 depicted in (a); (b1) (b2) enlarged images of the white frames 1 and 2 depicted in (b). Adjacent particles that cannot be resolved in the confocal image can be resolved in the cpFED image, and the full width at half maximum reaches 133 nm. The scale bars represent  $1 \mu\text{m}$

现了实心激发光与空心激发光的共路调制,成像速

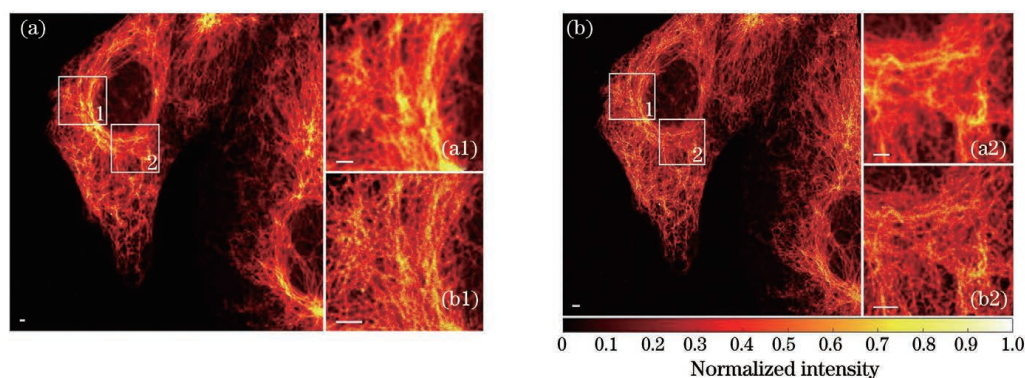


图4 细胞波形蛋白的成像结果。(a)共聚焦图像;(b)cpFED图像;(a1)(a2)分别是(a)中方框1与方框2的放大图;(b1)(b2)分别是(b)中方框1与方框2的放大图。图中的比例尺代表 $1\ \mu\text{m}$

Fig. 4 Vimentin imaging. (a) Confocal image; (b) cpFED image; (a1) (a2) enlarged images of the white frames 1 and 2 depicted in (a); (b1) (b2) enlarged images of the white frames 1 and 2 depicted in (b). The scale bars represent  $1\ \mu\text{m}$

度较传统 FED 方法提高了一倍,而且克服了非共路并行系统中不同器件的噪声、漂移对图像质量的影响,在活细胞超分辨实时成像方面具有广阔的应用前景。同时,本文提出的共路并行系统简化了光路,使得整个系统更易搭建和校准。

### 参 考 文 献

- [1] Abbe E. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung [J]. Archiv Für Mikroskopische Anatomie, 1873, 9(1): 413-468.
- [2] Schermelleh L, Carlton P M, Haase S, et al. Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy [J]. Science, 2008, 320(5881): 1332-1336.
- [3] Zhao T Y, Wang Z J, Feng K, et al. High-speed structured illumination microscopy and its applications [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2020, 57(24): 240001.  
赵天宇, 汪召军, 冯坤, 等. 高速超分辨结构光照明显微的关键技术及应用 [J]. 激光与光电子学进展, 2020, 57(24): 240001.
- [4] Dertinger T, Colyer R, Iyer G, et al. Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI) [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106 (52): 22287-22292.
- [5] Zeng Z P. Fluorescence fluctuation-based super-resolution nanoscopy [J]. Chinese Journal of Lasers, 2018, 45(3): 0307009.  
曾志平. 基于荧光随机涨落的超分辨显微成像 [J]. 中国激光, 2018, 45(3): 0307009.
- [6] 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.
- [7] Pan W H, Chen B L, Zhang J G, et al. Compressed sensing STORM super-resolution imaging reconstruction based on noise correction-principle component analysis preprocessing algorithm [J]. Chinese Journal of Lasers, 2020, 47(2): 0207024.  
潘文慧, 陈秉灵, 张建国, 等. 基于噪声校正主成分分析的压缩感知 STORM 超分辨图像重构 [J]. 中国激光, 2020, 47(2): 0207024.
- [8] Mao Z L, Wang C, Cheng Y. Superresolution far-field fluorescence bio-imaging: breaking the diffraction barrier [J]. Chinese Journal of Lasers, 2008, 35(9): 1283-1307.  
毛峥乐, 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.
- [9] 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.
- [10] Brakenhoff G J, Blom P, Barends P. Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lenses [J]. Journal of Microscopy, 1979, 117(2): 219-232.
- [11] Kuang C, Li S, Liu W, et al. Breaking the diffraction barrier using fluorescence emission difference microscopy [J]. Scientific Reports, 2013, 3: 1441.
- [12] Zhao G Y, Kuang C F, Ding Z H, et al. Resolution enhancement of saturated fluorescence emission difference microscopy [J]. Optics Express, 2016, 24 (20): 23596-23609.
- [13] Ma Y, Kuang C F, Fang Y, et al. Virtual fluorescence emission difference microscopy based on photon reassignment [J]. Optics Letters, 2015, 40 (20): 4627-4630.
- [14] He M F, Han Y B, Gan Y H, et al. Dynamic live-cell super-resolution imaging with parallelized

- fluorescence emission difference microscopy [J]. Optics Communications, 2020, 460: 125087.
- [15] Zhu D Z, Chen Y H, Fang Y, et al. Compact three-dimensional super-resolution system based on fluorescence emission difference microscopy [J]. Optics Communications, 2017, 405: 157-163.
- [16] You S T, Kuang C F, Li S, et al. Three-dimensional super-resolution imaging for fluorescence emission difference microscopy [J]. AIP Advances, 2015, 5 (8): 084901.
- [17] Gould T J, Burke D, Bewersdorf J, et al. Adaptive optics enables 3D STED microscopy in aberrating specimens [J]. Optics Express, 2012, 20 (19): 20998-21009.

## Common-Path Parallel Fluorescence Emission Difference Super-Resolution Microscopy

Zhang Zhimin<sup>1</sup>, Huang Yuran<sup>1</sup>, Liu Shaocong<sup>1</sup>, Kuang Cuifang<sup>1,2,3\*</sup>, Cao Liangcai<sup>4</sup>,  
Liu Yong<sup>5</sup>, Han Yubing<sup>1</sup>, Hao Xiang<sup>1</sup>, Liu Xu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation, College of Optical Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310027, China;

<sup>2</sup> Ningbo Research Institute, Zhejiang University, Ningbo, Zhejiang 315100, China;

<sup>3</sup> Collaborative Innovation Center of Extreme Optics, Shanxi University, Taiyuan, Shanxi 030006, China;

<sup>4</sup> State Key Laboratory of Precision Measurement Technology and Instrument, Department of Precision Instruments, Tsinghua University, Beijing 100084;

<sup>5</sup> Shanghai University of Electric Power, Shanghai 200090

### Abstract

**Objective** Fluorescence emission difference (FED) microscopy is a versatile super-resolution microscopy flexible for all types of fluorescent dyes. However, the limited imaging speed is the main drawback that hinders the application of FED, owing to the double imaging process of positive confocal image using a solid spot scan and negative confocal image using a negative spot scan. Parallel fluorescence microscopy can overcome this limitation owing to its ability to simultaneously capture positive and negative confocal images. However, the complexity of this method's system will increase instability and difficulties in daily maintenance, which also considerably restricts the popularization of the method. In this study, a new imaging method using a spatial light modulator (SLM) named common-path parallel FED (cpFED) microscopy was proposed. Compared with the traditional parallel FED microscopy, the proposed method that uses SLM and common path modulation maintains the advantage of doubling the imaging speed while overcoming the impact of instabilities introduced by different devices in noncommon-path parallel systems and simplifies the light path.

**Methods** A property of SLM is that only linear polarized light can be modulated in a fixed direction, which is the major property of common-path parallel FED microscopy. Using the polarization rotation realized by passing forth and back through a quarter-wave plate, SLM can modulate the s and p polarization components of the emitted light (Fig. 1). Using two-phase grayscale patterns, vortex and tilt-grating modulation patterns, to simultaneously modulate the horizontal and vertical polarization components of the incident laser beam on a single SLM, a staggering Gaussian solid spot and a hollow spot are generated to form the final convergent light field at the focus plane. The solid and hollow spots scan the sample simultaneously, and the fluorescence signal excited by the two spots is measured using two detectors, which will introduce a fixed transverse displacement between two images. Translating the positive confocal image to align with the negative confocal image and combining with the FED algorithm, the fast super-resolution imaging of the sample is realized. Experimental results show that the proposed method exhibits good ultradiffraction-limit imaging capabilities and high imaging speed and the resolution can be increased by approximately two times compared with traditional confocal imaging.

**Results and Discussions** To test the performance of cpFED, the experimental results of 200 nm and 100 nm fluorescent beads were presented herein. The 200 nm fluorescent beads were used to adjust the system and

demonstrate the translation effect between the positive and negative confocal images because of its' high fluorescent quantum efficiency (Fig. 2). The 100 nm fluorescent beads were used to measure and determine the optimum resolution performance of cpFED (Fig. 3). The full width at half maximum of a single bead plotted in Fig. 3(c) reveals that the resolution of cpFED in our system can reach up to 133 nm, indicating that the resolution of cpFED can be increased by approximately two times compared with traditional confocal imaging. Furthermore, a vimentin sample was used to verify the biological application of cpFED. The insects depicted in Fig. 4(a1), (b1), (a2), and (b2) show that the resolution and contrast in cpFED can be significantly promoted, while the noise in cpFED is considerably lower than that in traditional confocal imaging.

**Conclusions** Using SLM, cpFED can realize a small translation between solid and donut spots in a common path and simultaneously capture positive and negative confocal images, thus overcoming the imaging speed limit and promoting the biological application of FED. Compared with pFED, the proposed cpFED simplifies the system structure, reduces the adjustment complexity, and improves the robustness of the system because of the SLM flexibility. Experimental results demonstrate that cpFED achieves a resolution improvement of two times that of traditional confocal imaging while achieving double the imaging speed.

**Key words** microscopy; fluorescence microscopy; fast super-resolution imaging; fluorescence emission difference microscopy; common-path parallel detection

**OCIS codes** 180.2520; 180.1790; 180.5810