

超分辨荧光显微镜中的解卷积技术及应用(特邀)

赵唯淞¹, 黄园园¹, 韩镇谦¹, 曲丽颖¹, 李浩宇^{1**}, 陈良怡^{2*}¹哈尔滨工业大学仪器科学与工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150080;²北京大学未来技术学院, 北京 100871

摘要 超分辨荧光显微镜突破了光学衍射极限造成的空间分辨率限制,使得生物学家能够在生命体和细胞具有活性的状态下,对其功能与结构进行高精度动态记录,有望揭示更多重要的生命现象细节。然而,由于超分辨荧光显微技术的成像视场、深度、分辨率、速度等不易兼得,所以解卷积作为一种最有效且直接的求解逆问题的框架,被广泛应用于增强超分辨显微镜的时空分辨率。研究人员聚焦于通过相应算法设计实现高质量显微图像的重建,在一定程度上克服了超分辨荧光显微镜的硬件限制,可以更好地恢复生物信息。本文首先介绍了解卷积方法的基本原理及其发展历程,接着列举了不同解卷积技术在不同模式下的重建原理和效果以及这些技术在生物学上的应用,最后总结了基于深度学习的解卷积方法在超分辨荧光显微镜技术上的最新进展和未来的发展潜力,并对包括傅里叶环相关的定量评估图像重建质量的方法的最新进展进行了阐述。

关键词 显微; 解卷积; 超分辨显微镜; 活细胞成像; 计算成像; 荧光显微镜

中图分类号 O436

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL231214

1 引言

荧光显微镜以其非侵入性和高度特异性等优点在生物医学研究中被广泛使用,但因光学衍射极限的限制,传统荧光显微镜的横向分辨率约为 250 nm,轴向分辨率约为 800 nm^[1],无法分辨亚细胞的精细结构和动态变化^[2]。利用线性或非线性的荧光响应调制,研究人员已经设计出了多种超分辨荧光显微方法,有效地突破了光学衍射极限的限制^[3-6]。2014年,三位科学家凭借其在超分辨荧光显微技术领域取得的显著成就获得了诺贝尔化学奖。之后,超分辨荧光显微技术又经历了长足发展,超分辨显微模式的某一单一参数都得到了质的提升,例如空间分辨率可优于 1 nm^[7],时间分辨率可达到数百赫兹^[8]以上。然而,目前的超分辨荧光显微镜的分辨率、速度、成像深度等不易兼得,虽然可以通过优化显微镜硬件设置在一定程度上进行平衡,但仍然存在无法克服的物理限制。因此,提高显微成像性能的计算成像方法变得尤为重要^[9]。解卷积算法可以突破上述物理限制,更好地恢复生物信息。

本文首先介绍解卷积方法的技术原理和基本发展过程,之后列举解卷积技术在结构光超分辨显微镜(SIM)、图像扫描显微镜(ISM)、受激发射损耗荧光显微镜(STED)、荧光涨落显微镜(SOFI)几种不同模式

荧光显微镜上的具体应用和重建性能,并重点介绍不同情况下的重建原理、生物应用及系统性能,最后展望了基于深度学习的解卷积技术在超分辨荧光显微镜上的应用及其未来的发展潜力,并简单阐述了定量评估重建质量的方法的最新进展。

2 解卷积方法

从信号与系统的角度来看,光学远场显微成像系统是一个典型的线性系统,该系统利用传递函数编码荧光信号,再由光电探测器收集编码后的光学信号。在衍射的影响下,光学远场显微系统的传递函数并不是严格的狄拉克函数,其在空域上可以近似看成是一个具有相应方差的高斯函数,在频域上则可以近似看成是一个低通滤波器。

显微镜最终获得的图像是真实荧光信号卷积显微系统点扩散函数(PSF)的结果,而从采集的显微镜图像中估计真实荧光信号(达到超分辨效果)的命题,是一个典型的病态逆问题。

对于不同的显微镜系统和不同的成像目标,由于复杂而不同的噪声模型及背景情况,一直以来都没有一个通用有效的方法可以用来求解这样的逆问题。

在光学系统的前向成像模型中,目标荧光信号 \mathbf{x}^* 由光学显微镜用相应的 PSF 进行编码,然后由光电传

收稿日期: 2023-09-15; 修回日期: 2023-10-19; 录用日期: 2023-10-25; 网络首发日期: 2023-11-06

基金项目: 国家自然科学基金(62305083, T2222009, 32227802, 81925022)、中国博士后科学基金(2023T160163, 2022M720971)、黑龙江省博士后科学基金(LBH-Z22027)

通信作者: *lychen@pku.edu.cn; **lihaoyu@hit.edu.cn

感器采集编码后的信号。因此,传感器最终获得的图像 \mathbf{y} 的数学表达式为

$$\mathbf{y} = n \{ S[\mathbf{x}^* \otimes h] \}, \quad (1)$$

其中: S 和 n 分别表示采样模型和噪声模型; \mathbf{y} 表示荧光显微镜系统所采集到的最终的输出图像; h 表示显微系统的 PSF。解卷积的目的就是从测量信号 \mathbf{y} 中去掉显微系统 PSF 所产生的“模糊化”的影响,从而解算出真实的荧光信号 \mathbf{x}^* 。但是,在实际成像过程中,由于采样和噪声的混合影响,解卷积过程由一个简单的逆问题变成了一个典型的病态逆问题。因此,研究人员尝试采用不同的优化手段提升图像重建效果^[10]。

2.1 Wiener 解卷积

原理上,可以将解卷积问题假设为一个高斯噪声模型的最大似然估计问题,即

$$\arg \min_{\mathbf{x}} \left\{ \|\mathbf{y} - h\mathbf{x}\|_2^2 \right\}. \quad (2)$$

在解卷积中,最直接的方法是直接滤波,即对式(2)直接求导得到最小值的方法,可表示为

$$\mathcal{F}(\tilde{\mathbf{x}}) = \frac{\mathcal{F}(\mathbf{y})}{\max\{\mathcal{F}(h), \epsilon\}}, \quad (3)$$

式中: \mathcal{F} 代表傅里叶变换; ϵ 代表一个小值常量,是为避免分母为 0 而特别设定的。然而,需要注意的是,这种方法极易放大噪声。因此,Wiener^[11]于 1949 年提出了正则化直接滤波解卷积方法,该方法也被称为“Wiener 解卷积”。具体来说就是:加入 l_2 范数实现正则化,将原来的最大似然估计(MLE)问题转化为最大后验估计(MAP)问题,即

$$\arg \min_{\mathbf{x}} \left\{ \|\mathbf{y} - h\mathbf{x}\|_2^2 + \lambda \|\mathbf{x}\|_2^2 \right\}, \quad (4)$$

式中, λ 是正则化参数。对式(4)直接求极值,可以得到

$$\mathcal{F}(\tilde{\mathbf{x}}) = \frac{\mathcal{F}(h) \cdot \mathcal{F}(\mathbf{y})}{\mathcal{F}(h)^2 + \lambda}, \quad (5)$$

式中: $*$ 代表共轭; $\tilde{\mathbf{x}}$ 为恢复信号。通过加入正则化项, Wiener 解卷积方法得到的求解结果更加稳定,避免了直接滤波方法带来的噪声放大问题,因此得到了非常广泛的应用。

2.2 Landweber(LW)解卷积

1951 年, Landweber^[12] 提出了 LW 迭代算法, 该算法被认为可以很好地缓解直接滤波法带来的噪声放大问题。LW 迭代方法通过梯度下降方法迭代求解式(3)的最优解, 所以该方法非常依赖于计算。值得注意的是, 即使在当时的计算资源十分有限的情况下, 这一解卷积技术一经提出就被广泛关注和应用。1983 年, Agard 与 Sedat^[13] 就在 *Nature* 上发文宣布他们利用 LW 解卷积方法去除了图像中的离焦信号, 更好地观察到了细胞核染色体的三维分布。但是, 之后人们也在应用中也发现了 LW 解卷积的一些问题, 例如对噪声

过于敏感等, 从而使其推广受限, 未能被更广泛地使用。

2.3 Richardson-Lucy(RL)解卷积

1972 年和 1974 年, Richardson^[14] 和 Lucy^[15] 分别基于贝叶斯原理和泊松噪声的最大似然模型独立地提出了解卷积方法, 该方法后被称为“RL 解卷积方法”。Richardson 和 Lucy 分别从不同角度对模型进行推导: Richardson 基于纯贝叶斯学派理论进行推导, 未假设任何噪声模型; 而 Lucy 则部分基于频率学派理论, 利用泊松噪声模型建立最大似然估计模型。无论是基于频率学派理论还是基于纯贝叶斯学派理论, RL 解卷积的最终迭代式是相同的, 都为

$$\tilde{\mathbf{x}}^{n+1} = \tilde{\mathbf{x}}^n \left[\left(\frac{\mathbf{y}}{h \otimes \tilde{\mathbf{x}}^n} \right) \odot h \right], \quad (6)$$

式中: n 代表第 n 次迭代。需要注意的是, 由于 $\tilde{\mathbf{x}}$ 的更新是基于乘法运算进行的, 算法自然地确保了非负性, 这一点与前面直接滤波的 Wiener 解卷积方法有很大的不同。

作为一种最大似然方法, RL 解卷积方法虽然能很好地抑制泊松噪声, 但在多次迭代后会产生结构噪声和伪影。因此, 应该启发式地设置最佳迭代次数, 在收敛之前停止迭代计算。即便如此, RL 解卷积方法凭借其优异的计算效果一直被广泛应用于显微图像的增强上, 是一种经典的解卷积方法。

2.4 Tikhonov-Miller(TM)正则化

以高斯和泊松噪声模型为基础的正则化技术已被广泛用于约束逆问题(解卷积)的求解, 以达到抑制噪声和提升图像质量的目的。最早出现的有 Tikhonov 正则化^[16], 其在模型中加入 l_2 范数实现正则化, 可以起到平滑结果和抑制噪声的作用, 并能有效控制模型的复杂度, 避免计算过程中出现过拟合现象。其缺点是会降低图像的清晰度, 即在一定程度上牺牲了分辨率。另一种应用比较广泛的方法是通过惩罚 \mathbf{x} 的梯度域来增加结果的平滑度, 即 TM 正则化^[17]。其公式为

$$\arg \min_{\mathbf{x}} \left\{ L + \lambda \|\mathbf{C}\mathbf{x}\|_2^2 \right\}, \quad (7)$$

式中: L 代表相应的高斯或泊松似然函数, \mathbf{C} 表示约束算子, 相对较多的选择是梯度算子或者拉普拉斯算子。从实际效果来看, TM 正则相对于简单的 Tikhonov 正则更能起到约束噪声和平滑结果的作用, 但其会导致物体边缘平滑。

除此之外, 人们还提出了图像的熵正则化^[18-19]。其利用图像信息的熵原则上应低于噪声的熵来约束计算迭代过程, 可得到比 TM 正则化更好的结果, 能够在约束噪声的同时尽可能使边缘保持不过度平滑。

2.5 Total variation(TV)正则化

TV 正则化^[20-23]的核心思想是最小化图像的总变差, 即梯度的 l_1 范数, 以此来平衡噪声降低和边缘保留之间的矛盾。其表达式为

$$\arg \min_{\mathbf{x}} \left\{ L + \lambda \|\nabla \mathbf{x}\|_1 \right\}, \quad (8)$$

式中: $\nabla \mathbf{x} = \sqrt{[\mathbf{D}_1 \mathbf{x}]^2 + [\mathbf{D}_2 \mathbf{x}]^2}$ 。不同于 TM 正则化中使用的 l_2 范数, TV 正则化利用 l_1 范数作为约束, 能够相对有效地抑制平滑作用, 保留物体的边缘信息。相比于 Tikhonov 正则化, TV 正则化更加适用于恢复具有大量高频信息的图像。

在实际应用过程中, TV 正则化有许多小的变体方法, 例如平滑 TV (Smoothed TV)^[24], 但这些方法没有本质上的差异。平滑 TV 的表达式为

$$\arg \min_{\mathbf{x}} \left\{ L + \lambda \|\tilde{\nabla} \mathbf{x}\|_1 \right\}, \quad (9)$$

式中: $\tilde{\nabla} \mathbf{x} = \sqrt{[\mathbf{D}_1 \mathbf{x}]^2 + [\mathbf{D}_2 \mathbf{x}]^2 + \epsilon^2}$, 其中 ϵ 是一个小值常量, 是为了防止 TV 正则化在 0 处不可微而特意设定的。另外一种比较流行的变体是 Good's roughness (GR) 方法^[25], 其去除了根式并加入了归一化分母, 其表达式为

$$\arg \min_{\mathbf{x}} \left\{ L + \lambda \left\| \frac{|\nabla \mathbf{x}|^2}{\sqrt{\mathbf{x}^2 + \epsilon^2}} \right\|_1 \right\}. \quad (10)$$

TV 正则化受到青睐归功于它保留图像边缘的能力。然而, 它的缺点是会引入块效应(阶梯伪影)。这是因为 TV 正则化对一阶导数进行最小化, 导致沿图像轮廓的局部对比度过度锐化。在许多情况下, 这可能是一个严重的缺点。有一种可能的解决手段是对图像的高阶导数而非一阶导数进行最小化, 即将高阶 TV 作为正则^[26]。

2.6 Hessian 正则化

在高阶 TV 的基础上, Lefkimmatis 等^[27]利用二阶导 Hessian 矩阵的一阶核范数约束计算重建过程, 即

$$\arg \min_{\mathbf{x}} \left\{ L + \lambda \|\nabla \mathbf{x}\|_* \right\}, \quad (11)$$

式中: $\nabla \mathbf{x} = \mathbf{D}_{11} \mathbf{x} + \mathbf{D}_{22} \mathbf{x} + \mathbf{D}_{12} \mathbf{x} + \mathbf{D}_{21} \mathbf{x}$; $\|\cdot\|_*$ 代表一阶核范数, 是相应矩阵特征值的 l_1 范数, 又名“一阶 Schatten 范数”。该方法的目标函数包括两部分: 一部分是表征观测数据与重建图像之间差异的损失函数; 另一部分是一阶核范数约束, 用于惩罚图像的不光滑性, 从而促进图像的平滑重建。通过对目标函数进行优化, 可以得到一个能够有效平衡图像平滑性和重建质量的解。此外, 为了实现对低信噪比图像的增强, Arigovindan 等^[28]将熵正则应用于图像的二阶导域而非直接应用于原始图像。这样做可以更好地捕捉图像的局部结构信息, 得到更加平滑的重建结果, 极大地提升了低光强实验条件下的图像重建质量。

2.7 压缩感知

压缩感知 (CS)^[29]可以用于恢复受噪声影响的信号, 且无须使用传统的去噪方法, 只要信号是可压缩的或在某个变换域内是绝对稀疏的(矩阵中的非零值个数远远小于零值个数), 就可以用一个与变换基不相关

的观测矩阵将变换所得高维信号投影到一个低维空间上, 然后通过求解一个优化问题就可以从这些少量的投影中高概率重构出原信号。可以证明这样的投影包含了重构信号的足够信息。该方法可以有效降低求解空间的复杂程度, 从而在包含噪声变量与有限采样的图像中有效恢复真实信号。但其依然对噪声敏感, 而且对信号的稀疏度要求较高, 应用较为受限。

2.8 联合约束解卷积方法

TV 约束能够在去噪的前提下保留高频信息, 因而在重建模型中被广泛应用。但是, 在很多情况下, 如果 TV 的约束权重稍大, 就会引入块状伪影。而这也说明单一约束在同时保留平滑功能和边缘特征方面的效果有限。所以, 人们开始考虑引入多重联合约束, 进一步提升重建模型抑制噪声和保留高频信息的能力。

TV- l_1 模型^[30]包含 l_1 数据保真度项和总变分正则化项两部分。TV- l_1 问题可以表述为

$$\arg \min_{\mathbf{x}} \left\{ \|\mathbf{y} - \mathbf{h}\mathbf{x}\|_2^2 + \lambda \|\mathbf{x}\|_1 + \|\nabla \mathbf{x}\|_1 \right\}, \quad (12)$$

式中: \mathbf{x} 是重建图像; \mathbf{y} 是输入图像; λ 是正则化参数。TV 项用于通过最小化图像的梯度来提升图像的稀疏性。这样的约束有助于减少噪声和伪影, 同时保留图像中的边缘和细节。图像的 l_1 范数用于增强图像的稀疏性和图像中的锐利边缘。在实际应用中可以使用交替方向乘子法 (ADMM) 等优化算法获得 TV- l_1 问题的解。

l_1 - l_2 是一种用于回归分析的正则化方法^[31], 它通过 l_1 范数和 l_2 范数的组合对模型进行约束。 l_1 - l_2 问题可以简述为

$$\arg \min_{\mathbf{x}} \left\{ \|\mathbf{y} - \mathbf{h}\mathbf{x}\|_2^2 + \lambda_1 \|\mathbf{x}\|_1 + \lambda_2 \|\mathbf{x}\|_2^2 \right\}. \quad (13)$$

l_1 范数可以帮助实现模型参数的稀疏性, 避免噪声或不相关的特征对模型产生干扰, 而 l_2 范数可以避免模型参数过大导致的过拟合问题。 l_1 - l_2 联合约束结合了二者的优点, 因而提高了模型的稳定性和泛化能力。

2022 年, 赵唯淞等^[8,10]针对稀疏解卷积技术提出了解卷积的目标应从“解码真实信号分布”退到“有效提升分辨率上”, 并总结出了由显微镜 PSF 大小介导的相对稀疏性与时空连续性的概念, 即: 显微图像分辨率的增加等价于图像相对稀疏性的增加; 若图像满足奈奎斯特采样定律, 则系统的 PSF 一定大于 3×3 的尺寸, 且 PSF 内的图像强度应是连续的。这两种先验知识被认为是荧光显微成像的通用先验知识。

这一作用在两个层级上的联合约束先验知识, 在抑制噪声的同时协同提取高频信息, 能够突破现有荧光显微系统光学硬件的限制, 已被证实是泛化的、通用的提升荧光显微图像分辨率的方法。

$$\arg \min_{\mathbf{x}} \left\{ \|\mathbf{y} - \mathbf{h}\mathbf{x}\|_2^2 + \lambda_H \mathbf{R}_H(\mathbf{x}) + \lambda_1 \|\mathbf{x}\|_1 \right\}, \quad (14)$$

式中: 第一项为保真度项, 表示超分辨率重建图像 \mathbf{x} 与输入图像 \mathbf{y} 之间的差异; 第二项为海森时空连续性约束

项;第三项是稀疏性约束项; h 为光学系统的点扩散函数; λ_0 和 λ_1 是平衡图像保真度和稀疏度的权重因子。通过迭代最优化式(14)可以获得分辨率更高、质量更高的超分辨重建图像。

3 解卷积技术的应用

3.1 结构光超分辨显微镜

结构光超分辨显微镜(SIM)基于空间结构光照明原理,在样本上投射结构化的光栅或格子图案,然后通过多次拍摄不同的图像并计算重建高分辨率图像,将宽场荧光显微镜的分辨率提高了1倍。然而,由于SIM重建本质上是一个不适定问题,容易产生重建伪影,而且其分辨率较低,无法实现对亚百纳米尺度的细胞结构进行观测。

2008年,Gustafsson等^[32]提出了正弦干涉结构光超分辨重建技术框架,该框架主要包括参数确定以及频率成分的分离和拼接,最后通过Wiener解卷积(Wiener-SIM)进一步提升重建图像的信噪比。

2014年,研究人员另辟蹊径,在空域中建立模型^[33],将基于频率合并建模的整体最优化(用于分辨率改进)和零差检测(用于光学切片)相结合,形成一个完整的最大后验概率(MAP)迭代解卷积过程。MAP-SIM重建效果如图1(a)所示,其重建伪影相比Wiener-SIM更少。但是,该过程需要更多的重建时间,并且需要对照明条纹进行精确校正。

2016年,Perez等^[34]将RL解卷积应用于2D-SIM中(RL-SIM),并在微管、酵母和哺乳动物细胞等的图像上进行了测试,最终将图像分辨率提高了2.4倍。RL-SIM在重建之前先对原始图像进行RL解卷积,以便恢复空间频率超出衍射极限的照明模式,之后对重建图像进行进一步的RL解卷积,两步解卷积可以消除常见的周期和旁瓣伪影。

2021年,李辉课题组^[35]提出了一种高保真SIM(HiFi-SIM)方法。针对SIM的光学花瓣状光学传递函数(OTF)引起的固有旁瓣伪影,HiFi-SIM通过优化Wiener解卷积并将其加入OTF校准,将SIM的OTF修正为普通的类宽场OTF,达到了减少重建伪影的效果。实验结果如图1(b)所示。可以看出,HiFi-SIM能够有效校正异常频谱,因而不会留下可观察到的旁瓣伪影。

为了解决重建速度和三维OTF轴向缺锥的问题,雷铭课题组^[36]开发了一种联合空间和频率重建SIM的快速重建算法(JSFR-SIM算法),该算法提高了图像重建速度并抑制了厚细胞中的离焦背景。JSFR-SIM算法先通过将传统方法中的OTF补偿和衰减转化为带通预滤波来控制原始图像的有效PSF,然后再进行空间域处理。该算法在不影响重建质量的前提下提高了图像的重建效率:对于512 pixel \times 512 pixel的原始图像,该算法基于GPU加速将重构的执行时间缩

短到了10.2 ms,重构速度比Wiener-SIM快80倍。雷铭课题组对COS-7细胞进行了实时活细胞观测,如图1(c)所示,有效揭示了微管动力学。

2023年,左超课题组^[37]开发了一种基于主成分分析的高效、稳健的SIM参数估计和图像重建方法——PCA-SIM。该方法通过提取模式相量矩阵的第一主分量,有效去除了噪声和其他干扰分量,从而以简单有效的方式精确检索非整数像素波矢量和模式相位。与包括已建立的互相关方法在内的最先进的SIM算法相比,PCA-SIM在估计精度、图像质量、效率和噪声鲁棒性方面表现出了更加优异的性能。基于PCA-SIM,左超课题组在复杂的实验场景中实现了实时SIM重建,图1(d)展示了该方法对直径约为100 nm并且高度动态的MDT小管的运动过程的观测结果。多个仿真和实验结果表明,PCA-SIM是一种在低信噪比、弱激励条件下进行实时、长期、高质量活细胞成像的有前途的方法。

除了可以采用直接修正解卷积算法来提高重建分辨率之外,还可以通过加入正则项来辅助解卷积,从而减少重建伪影,提高重建分辨率^[38-39]。2014年,Chu等^[40]将TV正则化用于SIM重建,提出了TV-SIM。他们首先对中心波段进行预滤波,以降低噪声的影响,之后在将所有波段组合成超分辨图像时采用TV正则化来抑制噪声,实现了两个数量级的光子数的节约。

2018年,陈良怡课题组^[41]利用Hessian时空连续性正则来抑制SIM重建过程中由噪声引起的高频重建伪影。Hessian-SIM能够对快速、精细的动力学过程进行记录,且不会产生运动伪影,其时空分辨率为88 nm和188 Hz。同时,其高灵敏度的特性允许使用亚毫秒激发脉冲,从而允许探针有相应的暗恢复过程,降低了荧光蛋白的光漂白,从而能够对活细胞中的肌动蛋白进行超过1 h的长时程超分辨成像。此外,Hessian-SIM能够清晰地展示线粒体嵴分裂和融合的精微动态过程,如图2(a)所示。

2020年,Yu等^[42]提出了二阶优化正则化结构照明显微镜(sorSIM),其通过引入二阶正则化项来抑制噪声效应,同时通过二阶正则化项中的惩罚因子来增强分辨率和优化抗噪声性能。sorSIM可以将低信噪比结构化照明图像重建为高质量的超分辨率图像,如图2(b)所示,并且可以加速图像重建过程。sorSIM具有噪声抑制能力强、速度快、精度高的优点,可用于低照度下的长期活细胞成像,以减少光漂白和光毒性。

为了进一步提高在给定光子通量下SIM的有效分辨率,2022年,陈良怡课题组联合李浩宇课题组^[8],在不改变现有光学设置条件的前提下,对成像系统与对象建立了更加完备的重建模型,提升了对信息的提取能力。利用联合约束先验知识,即显微镜PSF介导的稀疏性与时空连续性,算法将SIM的分辨率提高了

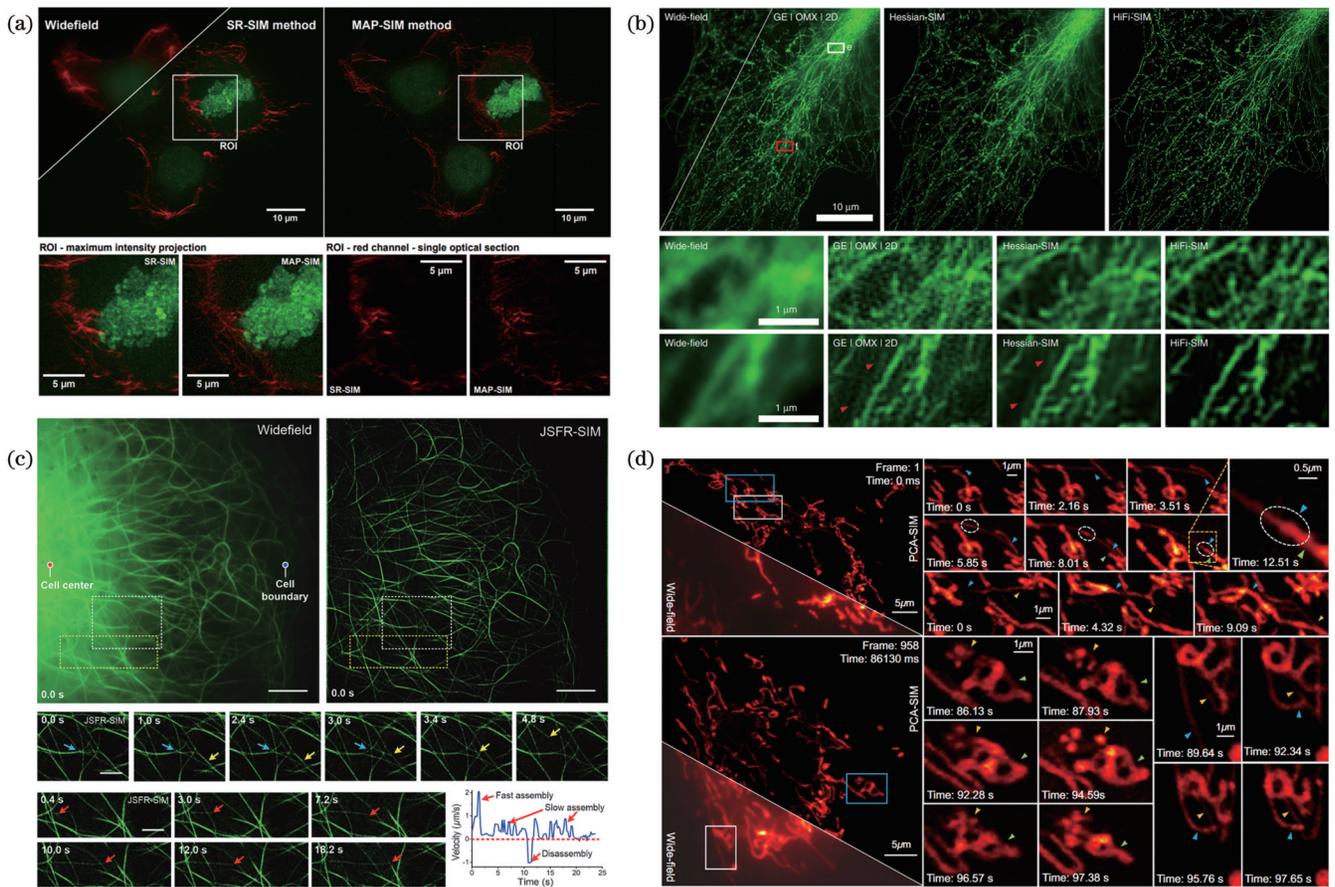


图1 基于解卷积算法的结构光超分辨显微成像结果。(a)MAP-SIM下双色三维超分辨肌动蛋白(品红)与染色质(绿)的图像^[33]; (b)HiFi-SIM重建COS-7细胞中的微管图像^[35]; (c)JSFR-SIM下可视化微管动力学^[36]; (d)PCA-SIM下超分辨重建COS-7线粒体的动态过程^[37]

Fig. 1 Super-resolution imaging results based on deconvolution algorithms in structured illumination microscopy. (a) Dual-color three-dimensional super-resolution images of actin (magenta) and chromatin (green) based on MAP-SIM^[33]; (b) HiFi-SIM reconstruction of microtubules in COS-7 cells^[35]; (c) visualization of microtubule dynamics based on JSFR-SIM^[36]; (d) super-resolution reconstruction of dynamic processes in COS-7 mitochondria based on PCA-SIM^[37]

近两倍。稀疏结构照明显微镜(Sparse-SIM)以高达564 Hz的帧速率实现了约60 nm的分辨率,因而能够解析复杂的结构。图2(c)、(d)展示了Sparse-SIM对活细胞中线粒体内外膜结构的超分辨重建,以及对融合孔道的超快动态成像。此外,如图2(e)所示,Sparse-ExM对膨胀后的内质网样本进行了高质量成像,获得了比SIM成像更高的对比度。

基于TV正则化^[43]和快速迭代收缩阈值优化算法(FISTA)^[44],刘旭与匡翠方课题组^[45]提出了一种三维SIM的重建算法——TV-FISTA-SIM。该算法具有更快的收敛速度,并且在原始图像数据减少且噪声高的情况下,仍然可以恢复高质量的超分辨率图像,如图2(f)所示。该算法有望用于实现活细胞3D-SIM成像。

传统的周期条纹SIM需要复杂的光学对准和相对高的调制深度才能产生精确的照明图案。为了降低对照明图案精确调制的要求,2012年,Sentenac课题组^[46]提出了利用不规则的随机散斑照明样本的非正弦条纹照明方法——散斑SIM。该方法首先通过多次测

量得到照明序列,然后利用联合解卷积同时求解荧光分布与序列照明模式,得到了超分辨效果。

2013年,Min等^[47]将多重稀疏贝叶斯学习(M-SBL)技术应用于散斑SIM重建,实验结果显示该方法将空间分辨率提高了3倍以上。2021年,Sentenac课题组^[48]提出一种新的处理框架,并将基于散斑这类随机结构照明的超分辨显微镜称为随机照明显微镜(RIM)。RIM的工作流程为:首先利用一个Wiener解卷积对每帧图像进行滤波,之后计算滤波后的图像的方差,最后基于系统校准给出一个方差匹配过程,得到最终的超分辨图像。如图3(a)所示,与同一样品的解卷积宽场图像相比,RIM重建图像具有更高的分辨率增益。

SIM的照明模式从最初的宽场发展到全内反射荧光(TIRF)再发展到掠入射照明,使得重建效果发生了一定改变。2009年,Kner等^[49]提出基于TIRF照明的高速SIM技术,并在11 Hz的帧速率下,以100 nm的分辨率展示了活黑腹果蝇S2细胞中微管蛋白和驱动蛋白动力学的TIRF-SIM成像。但是,大多数细胞器

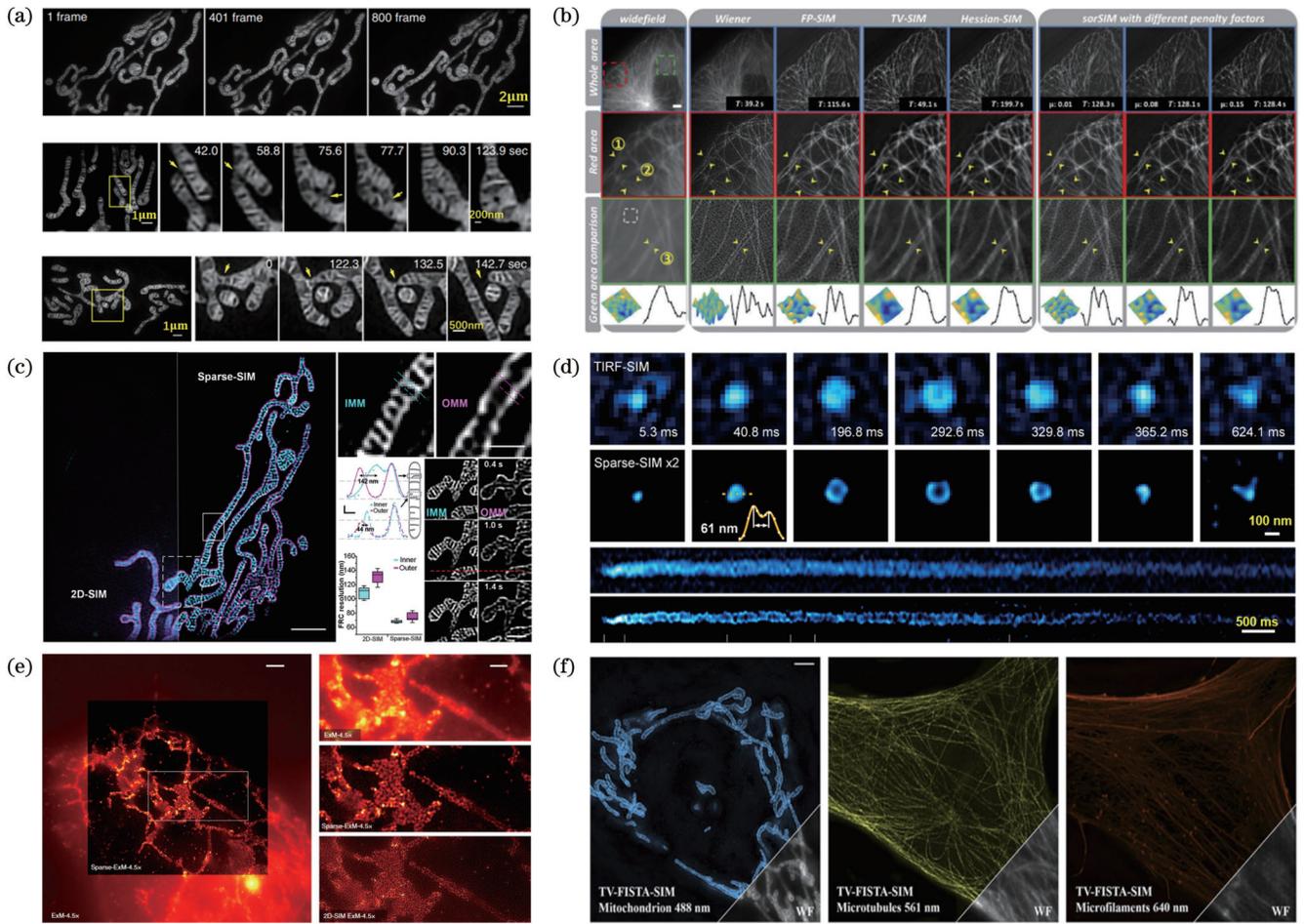


图 2 基于正则化解卷积分算法的结构光超分辨显微成像结果。(a)Hessian-SIM 下活细胞线粒体嵴结构的动力学^[41];(b)sorSIM 重建 Vero 细胞微管染色图像^[42];(c)活 COS-7 线粒体内外膜的 Sparse-SIM 重建^[8];(d)INS-1 细胞融合孔道的 Sparse-SIM 超快成像^[8];(e)Sparse-ExM 的超分辨重建结果^[8];(f)TV-FISTA-SIM 的多色 3D-SIM 重建(从左到右依次为线粒体外膜、微管蛋白以及肌动蛋白成像)^[45]

Fig. 2 Super-resolution imaging results based on regularization deconvolution algorithms in structured illumination microscopy. (a) Dynamics of mitochondrial cristae structure in live cells based on Hessian-SIM^[41]; (b) sorSIM reconstruction of microtubule-stained images in Vero cells^[42]; (c) Sparse-SIM reconstruction of both inner and outer mitochondrial membranes in live COS-7 cells^[8]; (d) super-fast imaging of fusion pores in INS-1 cells based on Sparse-SIM^[8]; (e) super-resolution reconstruction results of Sparse-ExM^[8]; (f) multi-color 3D-SIM reconstruction of TV-FISTA-SIM (from left to right: outer mitochondrial membrane, microtubule protein, and actin imaging)^[45]

的相互作用位于 TIRF 照明范围之外。为了克服这种深度限制,并保留 TIRF 高对比度的特性,李栋课题组^[50]开发了掠入射结构化照明显微镜(GI-SIM)。通过减小传统 TIRF-SIM 中用于掠入射激发的照明角度,多色 GI-SIM 将照明深度温和地扩展到 1 μm。李栋课题组还使用多色 GI-SIM 表征了不同细胞器(如内质网、线粒体等和细胞骨架)之间的快速、动态的相互作用,如图 3(c)所示。

3.2 图像扫描显微镜

图像扫描显微镜(ISM)这一模态系统理论上可将分辨率提升 $\sqrt{2}$ 倍。为使分辨率的提升最大化,对于 ISM 结果,会同周期性 SIM 一样,结合一些解卷积方法进行处理。在普通共焦显微镜中,理论上只要关闭针孔就可以收集到一些超分辨率信息。然而在实验

中,关闭针孔阻挡大量光之后,就会大大降低图像的信噪比。ISM 的工作原理是恢复这些丢失的超分辨率信息,本质上也是解决低信噪比的问题。

2010 年, Enderlein 课题组^[51]利用 CCD 的像元等效无限小针孔,将周围像素按照位置平移回中心,最后采用平均的手段得到了最终的超分辨图像。后续,他们利用一种类似 Wiener 解卷积的傅里叶权重调整法,将最终的分辨率提升了 1 倍左右。

单点扫描策略极大地降低了时间分辨率,所以 Shroff 课题组^[52]在 2012 年提出了多焦点结构光照明显微镜(MSIM)系统。该系统利用数字微镜装置(DMD)与尼普科夫圆盘进行并行扫描,经后处理后,时间分辨率得以提升。如图 4(a)所示,MSIM 重建主要分为 4 步:1)用稀疏的多焦点激励模式激励样本来重建图像,并在每个荧光焦点周围应用数字针

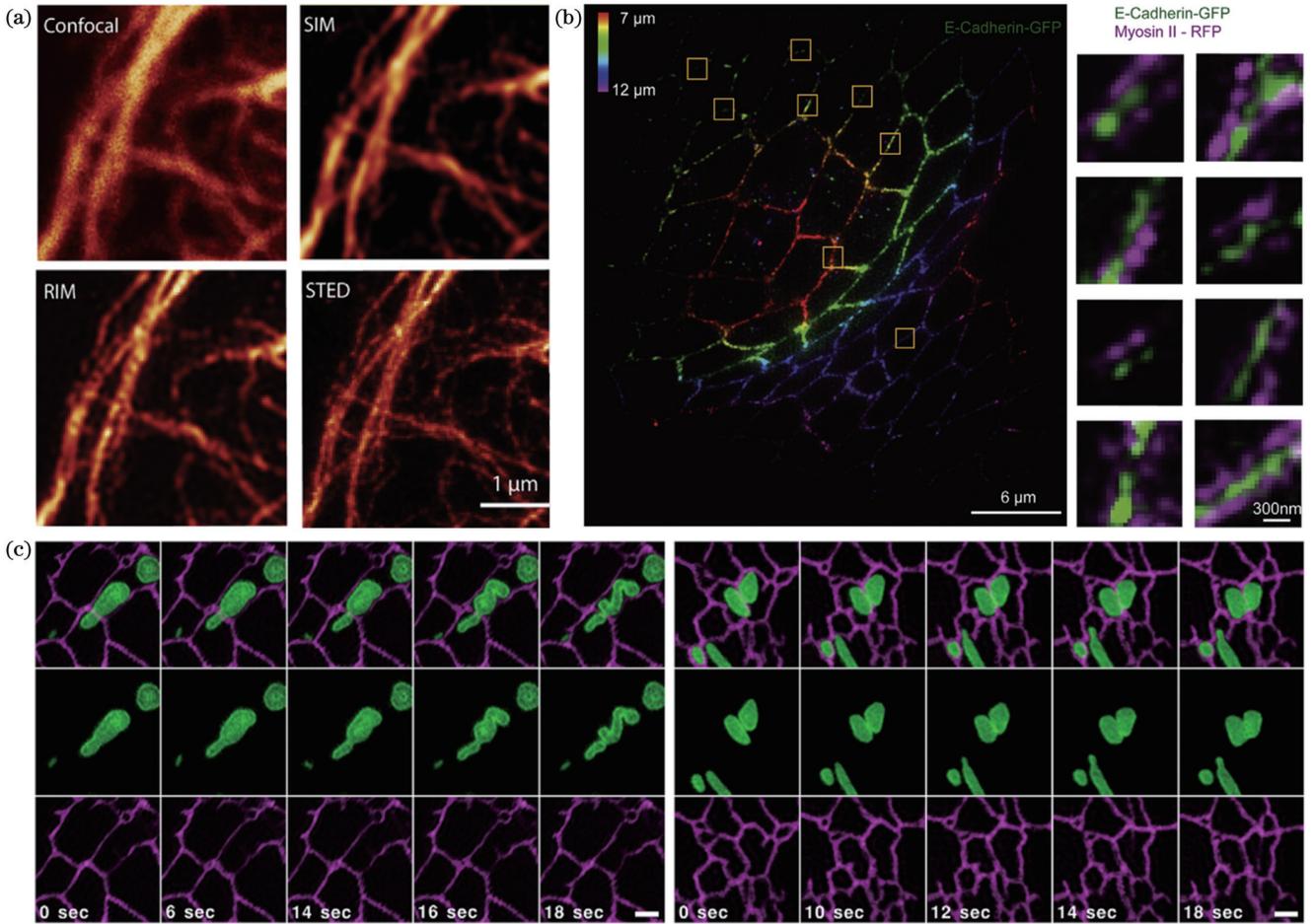


图3 基于解卷积算法的改进结构光超分辨显微成像结果。(a)RIM对固定HUVEC细胞的波形蛋白网络的成像结果^[48];(b)RIM三维成像结果^[48];(c)GI-SIM下内质网(品红)介导的线粒体(绿)的分裂与融合过程^[50]

Fig. 3 Super-resolution imaging results based on deconvolution algorithms in improved structured illumination microscopy. (a) Imaging results of the wave-like protein network in fixed HUVEC cells based on RIM^[48]; (b) three-dimensional imaging results based on RIM^[48]; (c) mitochondrial fission and fusion processes mediated by the endoplasmic reticulum (magenta) based on GI-SIM^[50]

孔;2)对所得到的图像进行2倍缩放;3)累积所有这样的针孔图像和缩放图像的总和;4)对总和图像进行RL解卷积生成MSIM图像。2013年,Enderlein课题组^[53]提出了基于转盘共焦的ISM系统(CSD-ISM系统),如图4(b)所示。CSD-ISM重建过程与MSIM类似,不同之处是其将自动数字定位焦点位置更改成了需要参考图像,并将最后的RL解卷积步骤更换成了傅里叶权重调整法,最终也实现了约2倍的分辨率提升。

2014年,Ingaramo等^[54]开发了基于联合RL解卷积的通用处理框架,该框架可适用于不同的扫描策略,并产生了更鲁棒的效果。2015年,Ströhl等^[55]使用联合RL算法重建多焦点结构照明显微镜获得的图像。结果显示,该方法有效地抑制了离焦光,提高了图像的对比度和分辨率。

2018年,Cogswell课题组^[56]利用最初的ISM实现方式,同时对每个聚焦光斑收集到的图像进行非负最小二乘(NNLS)解卷积运算,将所有采集到的图像累加成了一张超分辨图像。他们用70 nm间距的双点纳

米折纸进行了实验验证,结果显示实现了4倍左右的分辨率提升,如图4(c)所示。为了提升重建精度,2020年,该团队^[57]在解卷积模型中引入了稀疏性约束。他们的详细论证显示:分辨率的提升极大地依赖于样本的稀疏性与实验的信噪比^[58]。

2019年,Tenne等^[59]依据ISM和Q-ISM(Quantum-ISM)图像中测量的光来自相同的发射器,提出了一种联合稀疏解卷积算法(JSR),以此来融合互补的图像,进而获得更好的重建结果。结果显示,其重建结果比单独从任何单个图像中稀疏恢复的效果更好^[60],如图4(d)所示。可将优化问题表述为

$$\min_{\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2} \left\{ \|\mathbf{A}_1 \mathbf{x}_1 - \mathbf{y}_1\|_2^2 + \eta \|\mathbf{A}_2 \mathbf{x}_2 - \mathbf{y}_2\|_2^2 + \lambda \|\mathbf{X}\|_{2,1} \right\}, \quad (15)$$

式中: \mathbf{A}_i 为传感矩阵; \mathbf{x}_i 为未知信号; \mathbf{y}_i 为测量向量;下标*i*=1,2,表示两幅不同的图像;由 $\|\mathbf{X}\|_{2,1} = \sum_i \|\mathbf{x}_i\|_2$ 定义混合范数 $l_{2,1}$,以提升 \mathbf{X} 的行稀疏性;参数 η 用于控制两个图像对数据误差项的相对贡献; λ 是 $l_{2,1}$ 正则化参数。

对于利用联合稀疏解卷积算法从生物样本中收集的量子相关信号来说,采用 10 ms/pixel 的速度足以增强 ISM 重建。与 Q-ISM 图像的采集时间相比,联合稀疏恢复算法在不影响重建质量的前提下,缩短了一个数量级的曝光时间。

对于采用转盘扫描方式、结合光学光子重分配模块实现成像速度大幅提升的转盘共焦扫描结构光超分辨显微镜(SD-SIM)^[61]来说,由于微透镜和

针孔阵列影响了激发和发射效率,仍然存在光子效率和信噪比都比较低的问题。联合约束解卷积模型^[8]可以有效提升低信噪比图像的重建质量。如图 4(e)所示,该模型可以实现在标记的活体 COS-7 细胞上进行四色(溶酶体、线粒体、微管、细胞核)连续长时程成像。从图 4(f)可以看出,对比其他方法,该模型可以更好地提升内质网图像的对比度和分辨率。

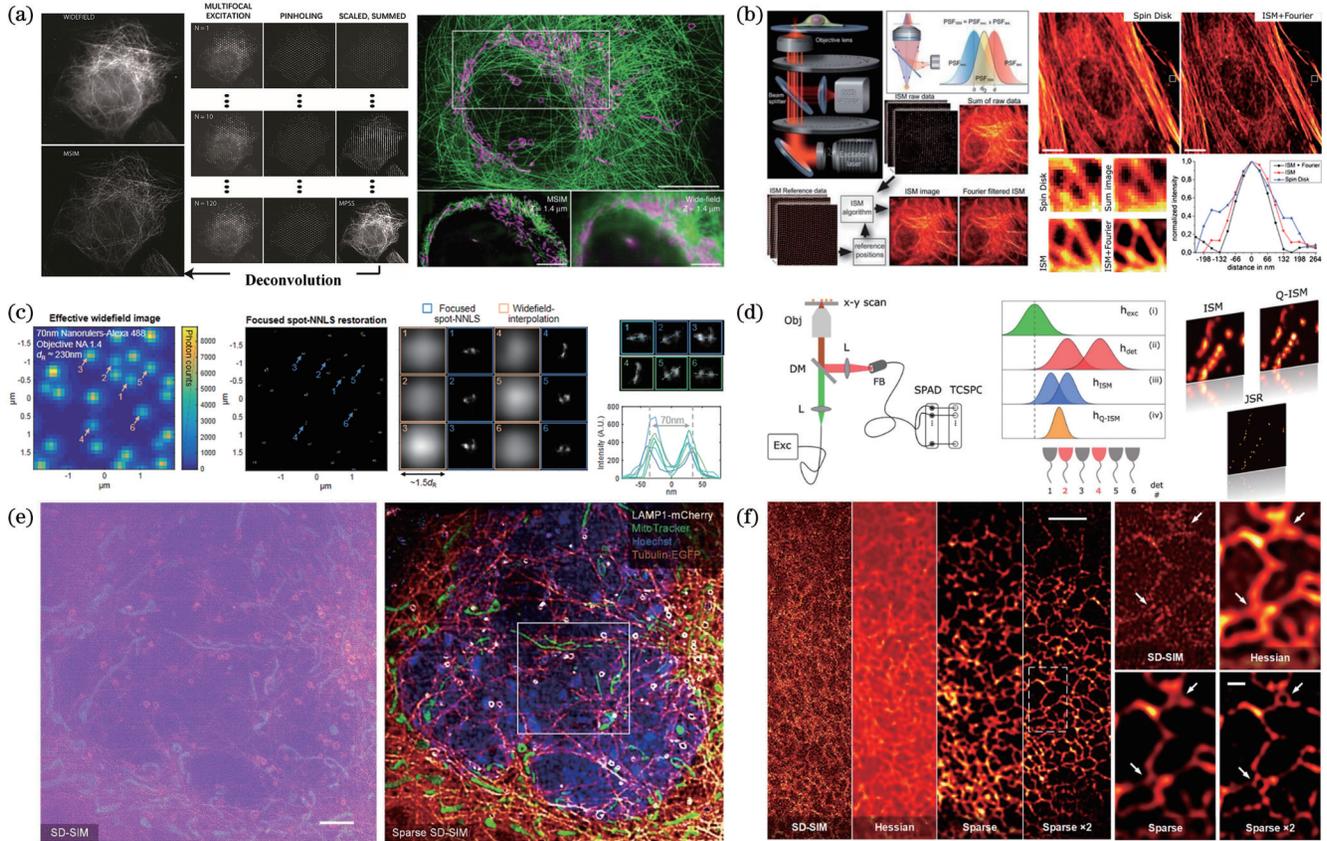


图 4 基于解卷积算法的图像扫描显微成像结果。(a)MSIM 图像重建原理以及微管(绿)与线粒体外膜(品红)的重建^[52];(b)CSD-ISM 图像重建原理及重建结果^[53];(c)NNLS 解卷积应用于 70 nm 分辨率的测试样品^[56];(d)ISM 和 Q-ISM 图像的生成和联合稀疏恢复(JSR)算法重建^[60];(e)四色活细胞的 Sparse SD-SIM 成像结果^[8],四色活细胞分别为溶酶体(黄)、线粒体基质(绿)、细胞核(蓝)、微管蛋白(红);(f)活细胞中内质网的 Sparse SD-SIM 成像结果^[8]

Fig. 4 Imaging results based on deconvolution algorithms in image scanning microscopy. (a) Principle of MSIM image reconstruction and reconstruction of microtubules (green) and mitochondrial outer membrane (magenta)^[52]; (b) principle of CSD-ISM image reconstruction and the resulting reconstruction^[53]; (c) application of NNLS deconvolution to a test sample with 70 nm resolution^[56]; (d) generation of ISM and Q-ISM images and reconstruction using the Joint Sparse Recovery (JSR) algorithm^[60]; (e) Sparse SD-SIM imaging results of a four-color live cell, with lysosomes (yellow), mitochondrial matrix (green), cell nucleus (blue), and microtubule proteins (red)^[8]; (f) Sparse SD-SIM imaging results of the endoplasmic reticulum in live cells^[8]

3.3 受激发射损耗显微镜

基于扫描远场光学技术的受激发射损耗显微镜(STED)以其高分辨率被广泛用于生物成像领域^[62]。STED 使用规则的激发光和环形耗尽光共同激发样品,通过抑制位于激发焦点外部区域的荧光发射实现超分辨率。但是 STED 产生的光毒性较强,无法实现活体细胞的长时程观测。如何进一步提升 STED 分辨率,提高低照度下图像的信噪比仍是研究重点。

2013 年,Zanella 等^[63]使用比例梯度投影(SGP)方

法推导出了更高效的 RL 算法,并将该算法应用于 STED,增强了信噪比与对比度。RL-STED 的重建结果如图 5(a)所示。

2019 年,Testa 课题组^[64]提出智能可逆饱和光学线性荧光跃迁算法——smart RESOLFT。smart RESOLFT 使用 RL 算法进行多图像解卷积来组合图像中的信息,从而提高 RESOLFT 图像的信噪比,最终提高了有效分辨率。smart RESOLFT 的重建结果如图 5(b)所示。

2023 年, Kervrann 课题组^[65]提出了一种非二次稀疏海森正则化算法——SPITFIR(e)算法。该算法对于不同模态的显微镜均通用, 可以从一般的多维噪声和模糊荧光图像中恢复信息, 具有较强的鲁棒性。将 SPITFIR(e) 算法应用于 STED 成像可以提高低照度图像的信噪比。

由于受激发射损耗显微镜是在共焦显微镜的基础上建立的, 所以如果不开启 STED 显微镜的损耗光, 它就会退化成一个普通的共焦显微镜。依据这一特性, 可以利用稀疏解卷积技术处理共焦显微镜 (Sparse-Confocal) 数据^[8], 并可将 STED 显微镜成像结果作为

超分辨真值。从图 5(c) 中可以看出 Sparse-Confocal 可以准确地解析在共焦图像中模糊且聚集在一起的核孔。此外, 不局限于利用 STED 显微数据进行交叉验证, 赵唯淞等^[8]尝试利用稀疏解卷积方法处理 STED 超分辨数据 (Sparse-STED) 进行联合超分辨, 得到了更高的分辨率与对比度, 并且其重构的核孔尺寸也符合真实核孔的尺寸 (约 120 nm)。赵唯淞等^[8]还利用双色数据进行了重建实验, 重建结果如图 5(d) 所示。重建结果显示该方法将 STED 显微数据的分辨率提高了近 1 倍, 进一步验证了该方法的有效性与准确性。

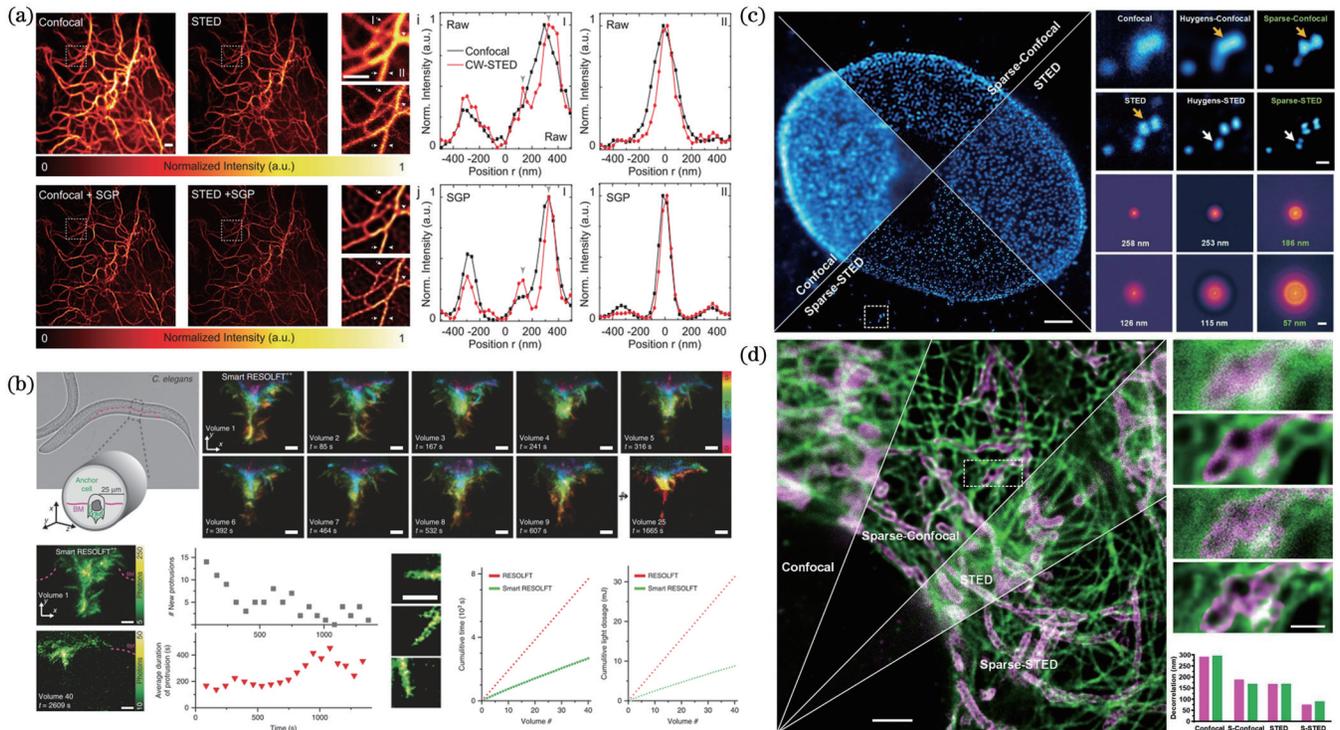


图 5 基于解卷积算法的受激发射损耗显微成像结果。(a) RL-STED 重建结果^[63]; (b) smart RESOLFT 重建结果^[64]; (c) Sparse-STED 重建核孔蛋白图像^[8]; (d) 双色共焦显微镜与受激发射损耗显微镜交叉验证线粒体外膜 (品红) 与微管蛋白 (绿)^[8]

Fig. 5 Stimulated emission depletion microscopy imaging results based on deconvolution algorithms. (a) RL-STED reconstruction results^[63]; (b) smart RESOLFT reconstruction^[64]; (c) Sparse-STED reconstruction of the nuclear pore protein^[8]; (d) cross-validation of dual-color confocal microscopy and stimulated emission depletion microscopy, highlighting the mitochondrial outer membrane (magenta) and microtubule proteins (green)^[8]

3.4 荧光涨落显微镜

基于信号涨落的超分辨显微技术是一种基于分子统计模型的重建方法, 其不需要特殊的实验装置, 只基于荧光信号涨落的统计学特征, 灵活性较强。相较于传统的荧光成像系统, 基于荧光波动的超分辨系统无需额外硬件, 并且与大多数荧光探针兼容。此外, 该系统不仅兼具较快的成像速度和较低的光毒性, 还能显著提升空间分辨率, 在活体亚细胞尺度成像方面具有广阔的应用前景。在统计荧光分子时间信号过程中, 解卷积技术被作为预处理或后处理步骤, 以进一步提高统计信息的利用效率并提升分辨率。同时, 也有一些涨落超分辨技术本身就具备类似解卷积的性质。

作为最早的涨落超分辨技术, 经典荧光波动超分辨技术 (SOFI) 由 Enderlein 课题组^[66]于 2009 年提出。该项技术的三大基础条件如下: 1) 荧光探针必须具有两种或两种以上的发射状态; 2) 不同的发射器必须以一种随机的方式在不同状态之间重复并且相互独立地切换; 3) 采样尺度应小于衍射极限, 以保证频带对扩展出的额外分辨率的支持。SOFI 利用了荧光分子发光强度的自发涨落行为, 采集图像的连续时序序列后计算序列的 n 阶自相关累积量, 从而实现了分辨率的提升。在该技术中, 解卷积作为一种适配性良好的后处理步骤, 可以使分辨率额外提升约 1.4 倍。实验结果如图 6(a) 所示。在此基础上, 该课题组又在 2010 年通

过傅里叶权重调整法来进一步提高 SOFI 成像的分辨率^[67]。该技术对 SOFI 图像进行转换,使 SOFI 底层的 PSF 具有与原始 PSF 相同的函数形式,以补偿 PSF 未完全利用 OTF 频带带来的分辨率损失,将 n 阶 SOFI 的分辨率提升至补偿前的 n 倍。该技术本身可以被视为一种特殊的解卷积。其实验效果如图 6(b) 所示。

虽然使用高阶涨落超分辨技术在理论上可以获得无限的分辨率,但在这一过程中,样品的荧光分布与系统的 PSF 一样会变为原来的 n 次幂,这种非线性响应会使原本较暗的点被完全掩盖,限制了高阶累积量的使用。鉴于此,2012 年, Lasser 课题组^[68]提出了均衡化荧光波动超分辨 (bSOFI) 技术,通过分析多个累积阶数来提取分子参数图,例如分子状态寿命、荧光团的浓度和亮度分布。他们将估计的闪烁统计用于平衡图像对比度,即将亮度和闪烁响应线性化,同时使用 RL 解卷积^[69]消除高阶累积量带来的非线性效应,以获得随累积量阶数线性提高的分辨率。

2012 年, Cox 等^[70]提出了利用荧光分子的涨落和漂白特性进行贝叶斯分析的方法 (Bayesian analysis of

the blinking and bleaching)——3B 方法。该方法的工作流程如下:首先在图像重建过程中把荧光分子的状态分为亮态、闪烁态和漂白态,然后计算贝叶斯概率,以确定荧光分子位置的最大可能,接着通过迭代计算获得最优的荧光分子数量和空间位置分布,最终获得趋向于荧光分子真实空间位置的结果。这一过程的原理与解卷积十分类似。3B 方法的实验结果如图 6(c) 所示。2017 年,徐平勇课题组^[71]提出快速 3B 算法。该算法将 K 均值聚类算法、改进的 3B 分析与有限正向算法结合,与 3B 相比,其计算速度加快了 17 倍。随后,单分子引导贝叶斯定位显微镜 (SIMBA) 技术^[71]作为一种减少 3B 伪影的方法被提出,其实验效果如图 6(d) 所示。在此基础上, Live-SIMBA 于 2020 年被发布^[72],这是一个基于 SIMBA 的 ImageJ 插件。与 3B 相比,其计算速度加快了数千倍;与 SIMBA 相比,其速度提高了 25 倍。

2014 年, Geissbuehler 等^[73]提出了一种同时采集多个焦平面的成像方案。该方案使得 SOFI 分析可以在三维中进行,增加了空间采样并提高了所有维度的

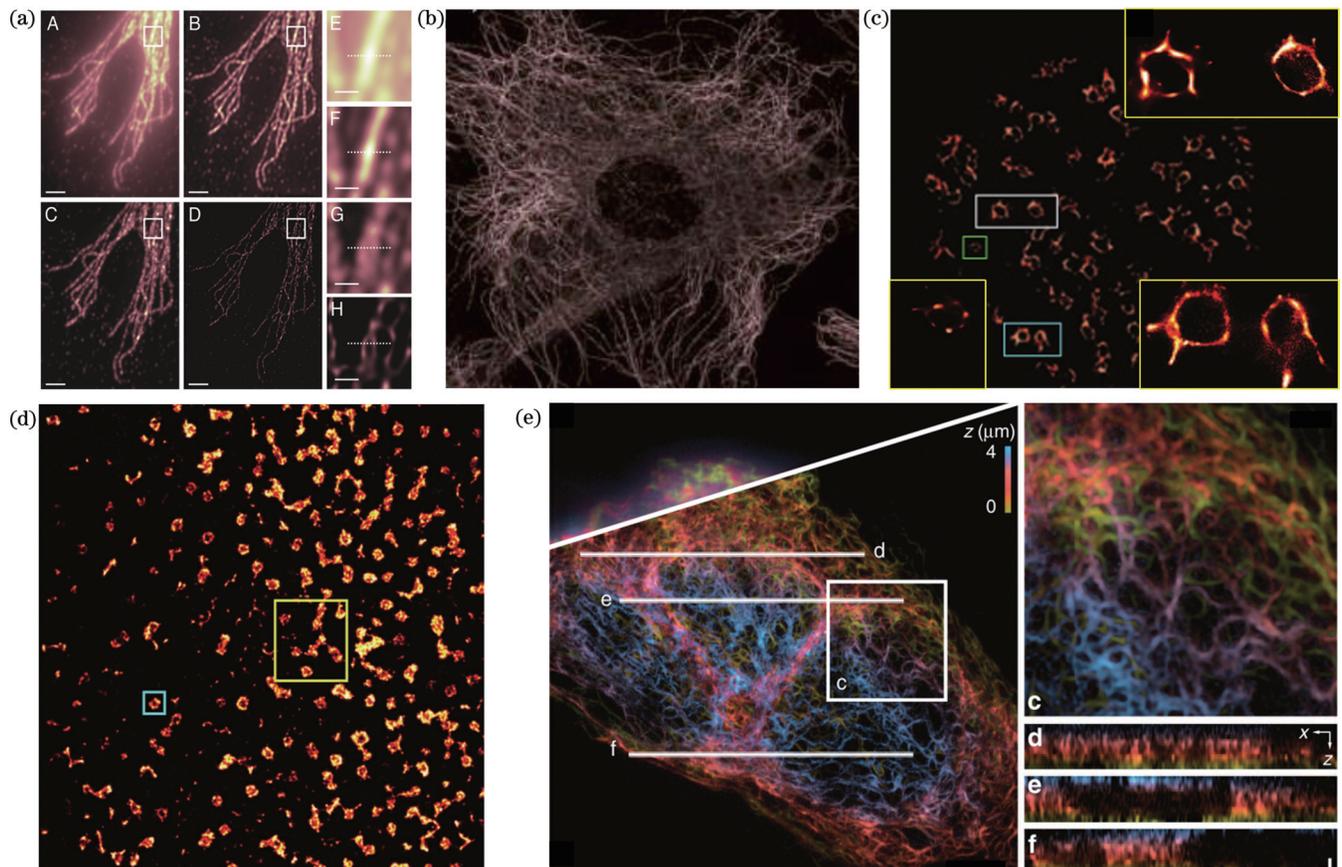


图 6 基于解卷积算法的涨落显微成像结果。(a)经典荧光波动超分辨技术的工作流程^[66]; (b)傅里叶 SOFI 解析成纤维细胞的微管蛋白网络^[67]; (c)固定细胞中黏着斑蛋白的 3B 分析^[70]; (d)活 HeLa 细胞中网格蛋白小窝 (ccp) 的 SIMBA 成像^[71]; (e)表达 vimentin-Dreiklang 的 HeLa 细胞的活细胞多平面三维 SOFI^[73]

Fig. 6 Super-resolution optical fluctuation imaging results based on deconvolution algorithms. (a) Workflow of classical super-resolution optical fluctuation imaging techniques^[66]; (b) Fourier SOFI resolution of the microtubule protein network in fibroblast cells^[67]; (c) 3B analysis of focal adhesion proteins in fixed cells^[70]; (d) SIMBA imaging of grid protein clusters (ccp) in live HeLa cells^[71]; (e) multi-plane three-dimensional SOFI of live HeLa cells expressing vimentin-Dreiklang^[73]

分辨率。与多个深度平面的顺序成像相比,深度采样数值增加的并行多平面采集可以显著缩短采集时间,从而降低了标记物的光漂白。在该技术中,三维解卷积同样被应用于计算累积量之后,用于消除高阶累积量带来的非线性效应,实验效果如图 6(e)所示。

2016年,Hugelier等^[74]在原有解卷积技术的基础上提出了一种惩罚回归方法。这种惩罚对发射器亮度估计绝对值的和施加了限制,通过 l_0 范数惩罚荧光团的数量而非整体亮度。该方法对线粒体的重建效果如图 7(c)所示。2014年,Qin等^[75]提出了变分正则化荧光波动超分辨技术,该技术将剪切波变换^[76]和总广义变分^[77](TGV)结合起来进一步增强 SOFI 重建结果。该技术将 TGV 正则化的特殊解卷积作为后处理步骤,优化了重建图像的质量。

2016年,Henriques 课题组^[78]提出超分辨率径向波动技术(SRRF)。该技术通过求解分析荧光涨落信号的径向梯度变化实现超分辨成像,其应用于宽场照明的效果如图 7(a)所示。2018年,其改进版本——强化超分辨率径向波动技术(eSRRF)被提出^[79]。在 eSRRF 中,重新定义了一些用于估计径向度和时间分析的基本原则,以改进重建图像的质量。通过突出最佳参数范围和采集配置,eSRRF 最大限度地减少了伪影和非线性,相对于底层结构提高了整体图像的保真度。eSRRF 的实验效果如图 7(b)所示。2022年,Torres-García等^[80]基于 SRRF 和单分子解卷积的思想提出了平均位移超分辨技术(MSSR)。MSSR 可以从一个衍射受限的图像中获得超分辨图像,实现约两倍

的分辨率提高。结合时间分析,MSSR 可以作为涨落超分辨方法使用。

2017年,匡翠方与刘旭课题组^[81]提出了结构强化荧光波动超分辨技术,其放弃了以往涨落超分辨技术中的均匀照明,转而在 SOFI 中引入结构化照明^[51,82,83],以强化系统的超分辨能力。同年,超分辨率光学波动成像 2.0(SOFI-2.0)被提出^[84],它可实现活细胞的快速超分辨成像。该工作^[84]讨论了高阶 SOFI 应用所面临的基本挑战,包括像素强度动态范围扩展、相关伪影、PSF 估计和解卷积,并介绍了几种解决这些挑战的方法。SOFI-2.0 的实验效果如图 7(d)所示。

在超分辨率方差成像(VISion)计算方法^[85]的基础上,Wang等^[86]提出了解卷积优化超分辨率协方差成像算法。该算法通过计算每个像素的 n 阶协方差,将分辨率提高了近 $\sqrt{2^n}$ 倍,并通过解卷积将其提高到 2^n 倍。此外,他们还计算了与每个 n 阶协方差像素相关的 $n+1$ 阶标准差,并将计算结果引入解卷积中作为抑制噪声产生的阻尼因子,形成了一种优化的解卷积技术。在该方法中,解卷积技术既被用于消除非线性,也被用于后处理步骤,进一步提升了分辨率。

原则上,自相关累积量可以消除任何与时间不相关的噪声。然而,有限数据集的自相关累积量的统计不确定性可能会极大地影响连续性和同质性。因此,SOFI 通常需要至少数百张原始图像来保存结构的完整性和样本细节。赵唯淞等^[87]于 2023 年提出了自相关两步解卷积(SACD),SACD 将 RL 解卷积^[69]应用于

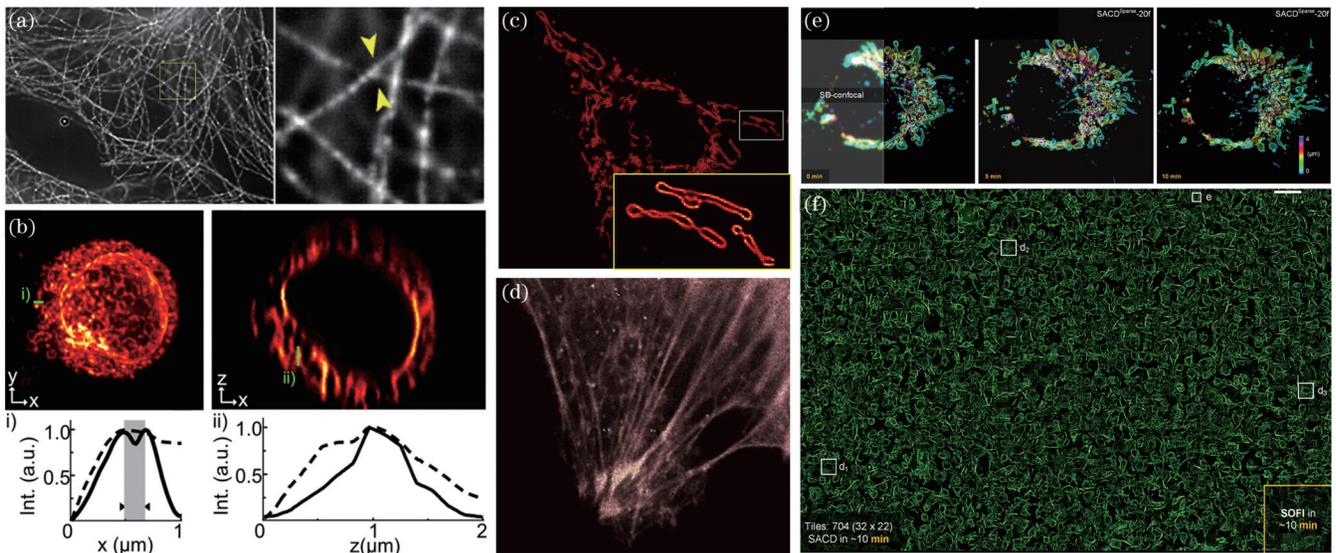


图 7 基于解卷积算法的涨落显微成像结果。(a)SRRF 应用于宽场照明显微镜^[78];(b)利用 eSRRF 配合晶格光片显微镜对活 Jurkat 细胞中的内质网成像^[79];(c)HEK293-T 细胞中的线粒体外膜的稀疏解卷积成像^[74];(d)使用 SOFI2.0 对活细胞中的肌动蛋白成像^[84];(e)活细胞线粒体外膜的 SACD 高分辨率四维成像^[87];(f)SACD 对细胞微管进行高通量成像^[87]

Fig. 7 Super-resolution optical fluctuation imaging results based on deconvolution algorithms. (a) SRRF applied to wide-field illumination microscopy^[78]; (b) imaging of the endoplasmic reticulum in live Jurkat cells using eSRRF combined with lattice light-sheet microscopy^[79]; (c) sparse deconvolution imaging of the mitochondrial outer membrane in HEK293-T cells^[74]; (d) imaging of actin in live cells based on SOFI2.0^[84]; (e) high-resolution four-dimensional imaging of live cell mitochondrial outer membrane based on SACD^[87]; (f) high-throughput imaging of cell microtubules based on SACD^[87]

原始图像序列进行预处理,以在计算自相关累积量之前过滤失焦和细胞质背景,从而提高了有效的开关对比度,减少了噪声引起的随机像素级波动,同时保持了不同帧之间的线性响应。基于此预处理,只使用 20 帧原始图像就可进行后续自相关累积量计算,并进行傅里叶插值。最后,再次使用后处理步骤来解卷积二阶 SOFI 图像,以进一步提升分辨率。通过这一系列处理,SACD 可以实现两倍的横向和轴向分辨率提高,对比传统 SOFI 可实现 50~100 倍的时间分辨率提升,并可实现对活细胞的超分辨四维成像和高通量成像,如图 7(e)~(f)所示。

4 未来展望

4.1 基于深度学习的超分辨成像技术

近年来,随着深度学习的不断发展,其在显微成像领域的应用越来越受到研究人员的关注。在荧光显微镜的图像恢复中,深度学习作为一种替代的数据驱动方法,被用于取代经典的解卷积算法。深度学习在捕捉图像映射的统计复杂性以及实现端到端图像转换方面具有优势,无须手动费力地微调参数,能够更加充分地利用低分辨率图像内在的各种信息,最终恢复出来的高分辨率图像的高频细节信息更加丰富而且视觉效果更好。

另外,将传统的基于模型的算法的可解释性与神经网络强大的学习能力相结合的方法也是一类很有前景的方法,该类方法可以避免繁琐的参数调整,并可提升网络的泛化能力。算法展开^[88]提供了上述框架,使用神经网络层表示传统迭代算法中的每个步骤,通过展开的网络传递输入数据(相当于执行了有限次数的迭代算法)。Li 等^[89]提出了将传统的 RL 迭代与全卷积网络结构相结合的网络——RLN,它提高了网络的可解释性和鲁棒性。Li 等通过视觉观测和定量分析发现,RLN 比其他网络具有更好的解卷积性和泛化性以及更少的伪影,特别是在轴向维度上。RLN 在严重失焦荧光或噪声污染区域上的表现优于 RL 解卷积,并且在大型清除组织数据集上的重建速度比经典的多视图管道快 4~6 倍。

算法展开为构建可解释和高效的深度网络提供了强大的原则框架,但只有在适当训练的情况下,展开网络才能充分发挥其潜力。与流行的传统网络相比,展开网络通常具有定制的结构。此外,展开网络有时会在不同层之间传递共享参数,所以难以训练。因此,为展开网络开发基础良好的端到端训练方案具有重要意义。

4.2 超分辨技术重建质量评估

荧光显微镜空间分辨率的可靠性和量化估计一直被人们重点讨论及研究。傅里叶环相关(FRC)作为一种直接、客观的测量有效图像分辨率或谱信噪比的方法,近些年来在荧光显微镜中得到了广泛应用^[90]。

FRC 的原理是测量傅里叶域中一系列同心环上两个二维信号之间的统计相关性。FRC 可被视为空间频率的函数,其表达式为

$$\text{FRC}_{12}(r_i) = \frac{\sum_{r \in r_i} \mathcal{F}_1(r) \cdot \mathcal{F}_2^*(r)}{\sqrt{\sum_{r \in r_i} \mathcal{F}_1^2(r) \cdot \sum_{r \in r_i} \mathcal{F}_2^2(r)}}, \quad (16)$$

式中: \mathcal{F}_1 和 \mathcal{F}_2 是两个图像的傅里叶变换; r_i 是第*i*个频率环。Koho 等^[91]将 FRC 分辨率测量方法以不同的方式应用到盲图像重建任务中。在频域去噪方法中,FRC 可被用于寻找低通滤波的截止频率点;在解卷积任务中,FRC 测量都被用于直接从图像数据中估计有效 PSF,在每次迭代后更新 PSF,以非常直接的方式在 2D 和 3D 中执行盲线性 Wiener 滤波。对于较大的图像,可能需要将其分成几个较小的块,从而使盲解卷积中的 PSF 适应分辨率的局部变化。

由于在无参考条件下很难直接定量评估超分辨技术的重建质量,因此需要一种通用且可靠的方法来检测这种技术引起的数据误差。李浩宇与陈良怡课题组^[92]根据重建的模型是无偏的这一假设,将滚动傅里叶环相关(rFRC)与改进的分辨率比例误差图(RSM)结合起来,用于检测由各种方法引起的数据误差。该方法通过将图像分成许多小区域来定量评估局部重建质量;对于每个小区域,使用 rFRC 来计算重建图像与原始图像之间的相似度,然后使用 RSM 方法来确定重建图像的相对大小;最后,将 rFRC 和 RSM 方法的结果结合起来,便可得到一个全面、可靠和通用的定量映射,用于评估超分辨技术的重建质量。该方法可以准确地评估各种图像重建方法的性能,无需任何额外的先验知识。

5 结束语

本文首先介绍了几种解卷积方法的技术原理,之后列举了解卷积技术在结构光照明显微镜、图像扫描显微镜、受激发射损耗显微镜、荧光涨落显微镜上的应用。从第 3 节中可以看出,各种模态的荧光显微镜对活细胞成像应用都进行了不同方向的努力。相关超分辨重建技术的长足发展,有效增强了活细胞的超分辨显微成像。稀疏解卷积联合约束是目前最先进的解卷积重建算法,可与不同模态的荧光显微镜结合,实现超高分辨率图像重建。结合算法展开技术对基于深度学习的解卷积方法进行了展望,深度学习算法与显微成像技术结合必然会成为未来活细胞成像领域的发展趋势。之后简要描述了 FRC 图像分辨率测量方法及其应用于图像重建任务的过程,同时介绍了一种量化的在超分辨率尺度上检测计算超分辨技术误差的方法。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 王冠晨, 陈同生. 活细胞中亚细胞器的超分辨结构特征[J]. 中国激光, 2022, 49(20): 2007203.
Wang G C, Chen T S. Super-resolution structural characteristics of subcellular organelles in living cells[J]. Chinese Journal of Lasers, 2022, 49(20): 2007203.
- [3] Vangindertael J, Camacho R, Sempels W, et al. An introduction to optical super-resolution microscopy for the adventurous biologist [J]. Methods and Applications in Fluorescence, 2018, 6(2): 022003.
- [4] Shao L, Kner P, Rego E H, et al. Super-resolution 3D microscopy of live whole cells using structured illumination[J]. Nature Methods, 2011, 8(12): 1044-1046.
- [5] Wildanger D, Medda R, Kastrop L, et al. A compact STED microscope providing 3D nanoscale resolution[J]. Journal of Microscopy, 2009, 236(1): 35-43.
- [6] Markwirth A, Lachetta M, Mönkemöller V, et al. Video-rate multi-color structured illumination microscopy with simultaneous real-time reconstruction[J]. Nature Communications, 2019, 10: 4315.
- [7] Schmidt R, Weihs T, Wurm C A, et al. MINFLUX nanometer-scale 3D imaging and microsecond-range tracking on a common fluorescence microscope[J]. Nature Communications, 2021, 12: 1478.
- [8] Zhao W S, Zhao S Q, Li L J, et al. Sparse deconvolution improves the resolution of live-cell super-resolution fluorescence microscopy[J]. Nature Biotechnology, 2022, 40(4): 606-617.
- [9] 左超, 陈钱. 计算光学成像: 何来, 何处, 何去, 何从? [J]. 红外与激光工程, 2022, 51(2): 20220110.
Zuo C, Chen Q. Computational optical imaging: an overview[J]. Infrared and Laser Engineering, 2022, 51(2): 20220110.
- [10] 赵唯淞. 基于联合约束模型的活细胞超分辨显微成像方法研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2022.
Zhao W S. Study on super-resolution microscopic imaging method of living cells based on joint constraint model[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2022.
- [11] Wiener N. Extrapolation, interpolation, and smoothing of stationary time series, with engineering applications[M]. Cambridge: Technology Press of the Massachusetts Institute of Technology, 1949.
- [12] Landweber L. An iteration formula for Fredholm integral equations of the first kind[J]. American Journal of Mathematics, 1951, 73(3): 615-624.
- [13] Agard D A, Sedat J W. Three-dimensional architecture of a polytene nucleus[J]. Nature, 1983, 302(5910): 676-681.
- [14] Richardson W H. Bayesian-based iterative method of image restoration[J]. Journal of the Optical Society of America, 1972, 62(1): 55-59.
- [15] Lucy L B. An iterative technique for the rectification of observed distributions[J]. The Astronomical Journal, 1974, 79: 745.
- [16] Galatsanos N P, Katsaggelos A K. Methods for choosing the regularization parameter and estimating the noise variance in image restoration and their relation[J]. IEEE Transactions on Image Processing, 1992, 1(3): 322-336.
- [17] van Kempen G M P, van Vliet L J. Background estimation in nonlinear image restoration[J]. Journal of the Optical Society of America A, 2000, 17(3): 425-433.
- [18] de Monvel J B, le Calvez S, Ulfendahl M. Image restoration for confocal microscopy: improving the limits of deconvolution, with application to the visualization of the mammalian hearing organ[J]. Biophysical Journal, 2001, 80(5): 2455-2470.
- [19] de Monvel J B, Scarfone E, le Calvez S, et al. Image-adaptive deconvolution for three-dimensional deep biological imaging[J]. Biophysical Journal, 2003, 85(6): 3991-4001.
- [20] Rudin L I, Osher S, Fatemi E. Nonlinear total variation based noise removal algorithms[J]. Physica D: Nonlinear Phenomena, 1992, 60(1/2/3/4): 259-268.
- [21] Dey N, Blanc-Feraud L, Zimmer C, et al. Richardson-Lucy algorithm with total variation regularization for 3D confocal microscope deconvolution[J]. Microscopy Research and Technique, 2006, 69(4): 260-266.
- [22] Laasmaa M, Vendelin M, Peterson P. Application of regularized Richardson-Lucy algorithm for deconvolution of confocal microscopy images[J]. Journal of Microscopy, 2011, 243(2): 124-140.
- [23] Rodríguez P. Total variation regularization algorithms for images corrupted with different noise models: a review[J]. Journal of Electrical and Computer Engineering, 2013, 2013: 217021.
- [24] Aujol J F. Some first-order algorithms for total variation based image restoration[J]. Journal of Mathematical Imaging and Vision, 2009, 34(3): 307-327.
- [25] Verveer P J, Gemkow M J, Jovin T M. A comparison of image restoration approaches applied to three-dimensional confocal and wide-field fluorescence microscopy[J]. Journal of Microscopy, 1999, 193(1): 50-61.
- [26] Chan T, Marquina A, Mulet P. High-order total variation-based image restoration[J]. SIAM Journal on Scientific Computing, 2000, 22(2): 503-516.
- [27] Lefkimmatis S, Ward J P, Unser M. Hessian Schatten-norm regularization for linear inverse problems[J]. IEEE Transactions on Image Processing, 2013, 22(5): 1873-1888.
- [28] Arigovindan M, Fung J C, Elnatan D, et al. High-resolution restoration of 3D structures from widefield images with extreme low signal-to-noise-ratio[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(43): 17344-17349.
- [29] Candes E J, Tao T. Near-optimal signal recovery from random projections: universal encoding strategies? [J]. IEEE Transactions on Information Theory, 2006, 52(12): 5406-5425.
- [30] Antipa N, Kuo G, Heckel R, et al. DiffuserCam: lensless single-exposure 3D imaging[J]. Optica, 2017, 5(1): 1-9.
- [31] Zou H, Hastie T. Regularization and variable selection via the elastic net[J]. Journal of the Royal Statistical Society Series B: Statistical Methodology, 2005, 67(2): 301-320.
- [32] Gustafsson M G L, Shao L, Carlton P M, et al. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination[J]. Biophysical Journal, 2008, 94(12): 4957-4970.
- [33] Lukeš T, Krížek P, Švindrych Z, et al. Three-dimensional super-resolution structured illumination microscopy with maximum a posteriori probability image estimation[J]. Optics Express, 2014, 22(24): 29805-29817.
- [34] Perez V, Chang B J, Stelzer E H K. Optimal 2D-SIM reconstruction by two filtering steps with Richardson-Lucy deconvolution[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 37149.
- [35] Wen G, Li S M, Wang L B, et al. High-fidelity structured illumination microscopy by point-spread-function engineering[J]. Light: Science & Applications, 2021, 10: 70.
- [36] Wang Z J, Zhao T Y, Hao H W, et al. High-speed image reconstruction for optically sectioned, super-resolution structured illumination microscopy[J]. Advanced Photonics, 2022, 4(2): 026003.
- [37] Qian J M, Cao Y, Bi Y, et al. Structured illumination microscopy based on principal component analysis[J]. eLight, 2023, 3(1): 4.
- [38] 唐于珺, 王林波, 文刚, 等. 结构光照明超分辨成像图像重建算法研究进展[J]. 激光与光电子学进展, 2022, 59(6): 0617009.
Tang Y J, Wang L B, Wen G, et al. Recent advances in structured illumination microscope super-resolution image reconstruction[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2022, 59(6): 0617009.
- [39] 周博, 王昆浩, 陈良怡. 结构光照明显微镜重建算法研究进展 [J]. 中国光学(中英文), 2022(6): 1211-1227.
Zhou B, Wang K H, Chen L Y. Recent progress on the

- reconstruction algorithms of structured illumination microscopy[J]. *Chinese Optics*, 2022(6): 1211-1227.
- [40] Chu K Q, McMillan P J, Smith Z J, et al. Image reconstruction for structured-illumination microscopy with low signal level[J]. *Optics Express*, 2014, 22(7): 8687-8702.
- [41] Huang X S, Fan J C, Li L J, et al. Fast, long-term, super-resolution imaging with Hessian structured illumination microscopy [J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(5): 451-459.
- [42] Yu W, Li Y Y, Jookeen S, et al. Second-order optimized regularized structured illumination microscopy (sorSIM) for high-quality and rapid super resolution image reconstruction with low signal level[J]. *Optics Express*, 2020, 28(11): 16708-16724.
- [43] Kamilov U S. A parallel proximal algorithm for anisotropic total variation minimization[J]. *IEEE Transactions on Image Processing*, 2017, 26(2): 539-548.
- [44] Beck A, Teboulle M. A fast iterative shrinkage-thresholding algorithm for linear inverse problems[J]. *SIAM Journal on Imaging Sciences*, 2009, 2(1): 183-202.
- [45] Cai M X, Zhu H F, Sun Y L, et al. Total variation and spatial iteration-based 3D structured illumination microscopy[J]. *Optics Express*, 2022, 30(5): 7938-7953.
- [46] Mudry E, Belkebir K, Girard J, et al. Structured illumination microscopy using unknown speckle patterns[J]. *Nature Photonics*, 2012, 6(5): 312-315.
- [47] Min J H, Jang J, Keum D, et al. Fluorescent microscopy beyond diffraction limits using speckle illumination and joint support recovery[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 2075.
- [48] Mangeat T, Labouesse S, Allain M, et al. Super-resolved live-cell imaging using random illumination microscopy[J]. *Cell Reports Methods*, 2021, 1(1): 100009.
- [49] Kner P, Chhun B B, Griffis E R, et al. Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 339-342.
- [50] Guo Y T, Li D, Zhang S W, et al. Visualizing intracellular organelle and cytoskeletal interactions at nanoscale resolution on millisecond timescales[J]. *Cell*, 2018, 175(5): 1430-1442.
- [51] Müller C B, Enderlein J. Image scanning microscopy[J]. *Physical Review Letters*, 2010, 104(19): 198101.
- [52] York A G, Parekh S H, Nogare D D, et al. Resolution doubling in live, multicellular organisms via multifocal structured illumination microscopy[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 749-754.
- [53] Schulz O, Pieper C, Clever M, et al. Resolution doubling in fluorescence microscopy with confocal spinning-disk image scanning microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(52): 21000-21005.
- [54] Ingaramo M, York A G, Hoogendoorn E, et al. Richardson-Lucy deconvolution as a general tool for combining images with complementary strengths[J]. *Chemphyschem*, 2014, 15(4): 794-800.
- [55] Ströhl F, Kaminski C F. A joint Richardson-Lucy deconvolution algorithm for the reconstruction of multifocal structured illumination microscopy data[J]. *Methods and Applications in Fluorescence*, 2015, 3(1): 014002.
- [56] Yu J Y, Becker S R, Folberth J, et al. Achieving superresolution with illumination-enhanced sparsity[J]. *Optics Express*, 2018, 26(8): 9850-9865.
- [57] Xing J, Chen S M, Becker S, et al. ζ_1 -regularized maximum likelihood estimation with focused-spot illumination quadruples the diffraction-limited resolution in fluorescence microscopy[J]. *Optics Express*, 2020, 28(26): 39413-39429.
- [58] Yu J Y, Narumanchi V V, Chen S M, et al. Analyzing the super-resolution characteristics of focused-spot illumination approaches [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2020, 25(5): 056501.
- [59] Tenne R, Rossman U, Rephael B, et al. Super-resolution enhancement by quantum image scanning microscopy[J]. *Nature Photonics*, 2019, 13(2): 116-122.
- [60] Rossman U, Tenne R, Solomon O, et al. Rapid quantum image scanning microscopy by joint sparse reconstruction[J]. *Optica*, 2019, 6(10): 1290-1296.
- [61] Hayashi S, Okada Y. Ultrafast superresolution fluorescence imaging with spinning disk confocal microscope optics[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2015, 26(9): 1743-1751.
- [62] 王潇, 涂世杰, 刘鑫, 等. 三维超分辨显微成像技术的研究进展及展望[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(22): 2200001.
- Wang X, Tu S J, Liu X, et al. Advance and prospect for three-dimensional super-resolution microscopy[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(22): 2200001.
- [63] Zanella R, Zanghirati G, Cavicchioli R, et al. Towards real-time image deconvolution: application to confocal and STED microscopy [J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 2523.
- [64] Dreier J, Castello M, Coceano G, et al. Smart scanning for low-illumination and fast RESOLFT nanoscopy *in vivo*[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 556.
- [65] Prigent S, Nguyen H N, Leconte L, et al. SPITFIR(e): a supermaneuverable algorithm for fast denoising and deconvolution of 3D fluorescence microscopy images and videos[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13: 1489.
- [66] 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 of the United States of America*, 2009, 106(52): 22287-22292.
- [67] Dertinger T, Colyer R, Vogel R, et al. Achieving increased resolution and more pixels with superresolution optical fluctuation imaging (SOFI) [J]. *Optics Express*, 2010, 18(18): 18875-18885.
- [68] Geissbuehler S, Bocchio N L, Dellagiocoma C, et al. Mapping molecular statistics with balanced super-resolution optical fluctuation imaging (bSOFI)[J]. *Optical Nanoscopy*, 2012, 1(1): 1-7.
- [69] Lucy L B. An iterative technique for the rectification of observed distributions[J]. *The Astronomical Journal*, 1974, 79: 745-754.
- [70] Cox S, Rosten E, Monypenny J, et al. Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(2): 195-200.
- [71] Xu F, Zhang M S, He W T, et al. Live cell single molecule-guided Bayesian localization super resolution microscopy[J]. *Cell Research*, 2017, 27(5): 713-716.
- [72] Li H J, Xu F, Gao S, et al. Live-SIMBA: an ImageJ plug-in for the universal and accelerated single molecule-guided Bayesian localization super resolution microscopy (SIMBA) method[J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(10): 5842-5859.
- [73] Geissbuehler S, Sharipov A, Godinat A, et al. Live-cell multiplane three-dimensional super-resolution optical fluctuation imaging[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 5830.
- [74] Hugelier S, de Rooi J J, Bernex R, et al. Sparse deconvolution of high-density super-resolution images[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21413.
- [75] Qin J, Yi X Y, Weiss S, et al. Shearlet-TGV based fluorescence microscopy image deconvolution[R]. Los Angeles: University of California, Los Angeles (UCLA), 2014: 14-32.
- [76] Guo K, Kutyniok G, Labate D. Sparse multidimensional representations using anisotropic dilation and shear operators[J]. *Wavelets and Splines*, 2006, 14: 189-201.
- [77] Bredies K, Kunisch K, Pock T. Total generalized variation[J]. *SIAM Journal on Imaging Sciences*, 2010, 3(3): 492-526.
- [78] Gustafsson N, Culley S, Ashdown G, et al. Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12471.
- [79] Laine R F, Heil H S, Coelho S, et al. High-fidelity 3D live-cell nanoscopy through data-driven enhanced super-resolution radial fluctuation[EB/OL]. (2022-09-05)[2023-05-06]. <https://www.>

- [biorxiv.org/content/10.1101/2022.04.07.487490v3](https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.04.07.487490v3).
- [80] Torres-García E, Pinto-Cámara R, Linares A, et al. Extending resolution within a single imaging frame[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 7452.
- [81] Zhao G Y, Zheng C, Kuang C F, et al. Resolution-enhanced SOFI via structured illumination[J]. *Optics Letters*, 2017, 42(19): 3956-3959.
- [82] Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 198(2): 82-87.
- [83] Demmerle J, Wegel E, Schermelleh L, et al. Assessing resolution in super-resolution imaging[J]. *Methods*, 2015, 88: 3-10.
- [84] Yi X Y. Super resolution of Optical Fluctuation Imaging 2.0 (SOFI-2.0): towards fast super resolved imaging of live cells[M]. Los Angeles: University of California, Los Angeles (UCLA), 2017.
- [85] Watanabe T M, Fukui S, Jin T, et al. Real-time nanoscopy by using blinking enhanced quantum dots[J]. *Biophysical Journal*, 2010, 99(7): L50-L52.
- [86] Wang X H, Zhong J P, Wang M Y, et al. Enhanced temporal and spatial resolution in super-resolution covariance imaging algorithm with deconvolution optimization[J]. *Journal of Biophotonics*, 2021, 14(2): e202000292.
- [87] Zhao W S, Zhao S Q, Han Z Q, et al. Enhanced detection of fluorescence fluctuations for high-throughput super-resolution imaging[J]. *Nature Photonics*, 2023, 17(9): 806-813.
- [88] Monga V, Li Y L, Eldar Y C. Algorithm unrolling: interpretable, efficient deep learning for signal and image processing[J]. *IEEE Signal Processing Magazine*, 2021, 38(2): 18-44.
- [89] Li Y, Su Y J, Guo M, et al. Incorporating the image formation process into deep learning improves network performance[J]. *Nature Methods*, 2022, 19(11): 1427-1437.
- [90] 罗喜亮, 周舟, 黄江枫, 等. 三维显微图像的分辨率评估方法及应用[J]. *中国激光*, 2022, 49(5): 0507205.
- [91] Luo X L, Zhou Z, Huang J F, et al. Resolution evaluation method and applications of 3D microscopic images[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(5): 0507205.
- [92] Koho S, Tortarolo G, Castello M, et al. Fourier ring correlation simplifies image restoration in fluorescence microscopy[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3103.
- [92] Zhao W S, Huang X S, Yang J Y, et al. Quantitatively mapping local quality of super-resolution microscopy by rolling Fourier ring correlation[EB/OL]. (2022-12-02)[2023-05-06]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.12.01.518675v1>.

Deconvolution in Super-Resolution Fluorescence Microscopy (Invited)

Zhao Weisong¹, Huang Yuanyuan¹, Han Zhenqian¹, Qu Liying¹, Li Haoyu^{1**}, Chen Liangyi^{2*}

¹*School of Instrument Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150080, Heilongjiang, China;*

²*School of Future Technology, Peking University, Beijing 100871, China*

Abstract

Significance Owing to its non-invasiveness and high specificity, fluorescence microscopy is widely utilized in biomedical research to investigate the structures and functions of biological systems. Limited by the diffraction of light, the resolution of conventional fluorescence microscopy is ~ 250 nanometer (nm) and ~ 800 nm on the lateral and axial axes, respectively, and it cannot resolve nanostructures beyond this limit. To overcome the resolution limit, many super-resolution fluorescence microscopy techniques have been developed, enabling biologists to record the dynamics of the fine structures of organisms and cells in their active states. This offers the potential to elucidate the crucial details of biological phenomena.

Nevertheless, in super-resolution fluorescence microscopy, trade-offs exist between resolution, speed, and imaging depth. Although these trade-offs can be moderated by optimizing the microscopy hardware, certain strict physical limitations cannot be easily overcome. Therefore, enhancing microscopy performance via computational imaging methods is particularly important. For instance, the application of deconvolution algorithms can transcend physical limits without changing the optical hardware, thereby improving the dissection of biological information.

Progress This review introduces the technical principles of various deconvolution methods. Deconvolution techniques are applied to four modes of super-resolution fluorescence microscopy: structured illumination microscopy (SIM), image scanning microscopy (ISM), stimulated emission depletion (STED) microscopy, and super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI). Various modalities have been used for live cell imaging applications. For example, researchers have designed deconvolution algorithms to eliminate the reconstruction artifacts produced during the reconstruction of SIM and to improve its resolution. Additionally, for SOFI, deconvolution techniques can be applied as pre- or post-processing steps to further enhance the efficiency of utilizing statistical information and to improve resolution. The recently developed advanced deconvolution algorithm, sparse deconvolution, is stable and robust to various noise conditions and can effectively improve the three-dimensional resolution two-fold. Furthermore, it can be combined with different variants of fluorescence microscopy to enhance their contrast and resolution *in situ* without any changes. Owing to significant advances in the corresponding super-resolution reconstruction techniques, live-cell super-resolution microscopy has been effectively enhanced.

In the outlook section, considering the unrolling algorithm as an example, this review discusses the prospects of deconvolution

methods based on deep learning. The combination of deep learning algorithms and microscopy imaging techniques may become a future development trend in the field of live-cell super-resolution microscopy. This review briefly describes the Fourier ring correlation (FRC) image resolution measurement method and its application in image reconstruction. Finally, a rolling FRC (rFRC) method is introduced to quantitatively detect the reconstruction uncertainties of super-resolution techniques at the corresponding super-resolution scale.

Conclusions and Prospects Owing to hardware limitations, extensive super-resolution microscopy methods have introduced computational steps to achieve the optimal quality of super-resolution imaging. This review can serve as a bridge between the super-resolution microscopy and computation communities to facilitate the application of novel computational techniques toward improved resolution, accuracy, and image processing.

Key words microscopy; deconvolution; super-resolution microscopy; live-cell imaging; computational imaging; fluorescence microscopy