

# 基于随机脉冲编码的超分辨显微成像算法研究

谢创亮<sup>1</sup> 观嘉宁<sup>1</sup> 白玉磊<sup>1</sup> 杨其宇<sup>1</sup> 叶双莉<sup>2</sup> 周延周<sup>1</sup>

<sup>1</sup>广东工业大学自动化学院, 广东 广州 510006

<sup>2</sup>武汉大学印刷与包装系, 湖北 武汉 430072

**摘要** 由于衍射极限的限制,传统的光学显微镜无法获得纳米级别的分辨率。为了突破衍射极限,提出一种基于随机脉冲编码和分时复用的显微成像新方法。可以较高效地对点扩展函数模糊图像进行编码解码,重构出原图像。阐述了该方法的数学原理,并在不同稀疏度编码和不同图像帧数下,进行了仿真分析,结果表明,采用稀疏编码和 1000 帧左右图像,可以获得被测样品的超分辨率图像。该方法能够突破衍射极限,是一种适合活体细胞研究的有效方法。

**关键词** 成像系统; 显微成像; 超分辨; 随机脉冲; 编码解码

**中图分类号** TH74 **文献标识码** A

**doi:** 10.3788/LOP53.071101

## Research on the Super-Resolution Microscopy Imaging Based on Random Pulse Coding

Xie Chuangliang<sup>1</sup> Guan Jianing<sup>1</sup> Bai Yulei<sup>1</sup> Yang Qiyu<sup>1</sup> Ye Shuangli<sup>2</sup> Zhou Yanzhou<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Automation, Guangdong University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China

<sup>2</sup> School of Printing and Packaging, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072, China

**Abstract** Due to the limitation of diffraction limit, the conventional optical microscopes are unable to obtain resolution of nanometer scale. In order to break through the diffraction limit, a new method of microscopic imaging based on random pulse coding and time-sharing multiplexing is presented. It can code and decode the indistinct image of point spread function efficiently, and reconstruct the original image. The mathematical principle of the proposed method is expounded, and the simulation analysis in the different sparseness of coding and different image frames is carried on. The results show that the super-resolution image of the tested sample is obtained using the sparse coding and about 1000 frames image. The proposed method can break through the diffraction limit, and it is effective and suitable for the study of living cells.

**Key words** imaging systems; microscopy imaging; super-resolution; random pulse; coding and decoding

**OCIS codes** 110.0180; 100.6640; 320.5550; 110.7348

## 1 引言

现代生物学的发展对微观结构研究提出了越来越高的分辨率要求, 希望从分子水平揭示生命过程的物理本质。然而, 受光学衍射极限的限制<sup>[1]</sup>, 传统光学显微镜的横向分辨率一般只能达到 200 nm, 纵向分辨率达到 500 nm<sup>[2]</sup>, 无法研究亚细胞结构及其内部物质的相互作用。尽管电子显微镜<sup>[3]</sup>可以达到纳米级别的分辨率, 但其只针对非活性离体细胞样品, 限制了其在生物领域的广泛应用。因此, 如何突破传统光学显微镜的衍射极限, 对活体细胞进行纳米级别显微成像, 成为光学显微成像技术迫切需要解决的问题。

**收稿日期:** 2015-12-17; **收到修改稿日期:** 2016-02-02; **网络出版日期:** 2016-06-24

**基金项目:** 广东省自然科学基金(2014A030313519)、广州市科技计划项目(2014J4100203)

**作者简介:** 谢创亮(1994—), 男, 本科生, 主要从事功能显微成像等方面的研究。E-mail: 1404016249@qq.com

**导师简介:** 周延周(1964—), 男, 博士, 教授, 主要从事功能显微成像等方面的研究。

E-mail: optics.zhouyanzhou@qq.com(通信联系人)

近年来,随着计算机和光学器件的不断发展,相继出现了能够突破传统光学显微镜衍射极限的超分辨显微成像技术<sup>[4]</sup>,克服了电子显微镜不能对活性离体细胞样品进行观测的缺点,实现了1~100 nm分辨率的显微成像。其核心思想是通过建立时间带宽信息从而换取高空间分辨图像,具体表现为由时间序列的低空间分辨图像得到一幅高空间分辨图像。其中流行的技术有4Pi显微镜<sup>[5]</sup>、受激发射损耗显微镜<sup>[6]</sup>(STED)、随机光学重建显微镜或者光活化定位显微镜<sup>[7-8]</sup>(STORM, PALM)、结构光照明显微镜(SIM)<sup>[9]</sup>,这些方法能够突破衍射极限,得到纳米分辨率的超分辨图像<sup>[10-11]</sup>,促进了光学显微成像技术的发展。

本文提出能够实现纳米等级的超分辨显微成像技术,优点是只需要使用普通宽场显微镜,利用随机脉冲编码,通过计算机实现解码,可以提高样品的分辨率。

## 2 理 论

### 2.1 光学系统

光学系统如图1所示,由光源发射蓝光,经凸透镜 $L_1$ 准直后,通过470 nm低通滤光片 $O_1$ ,经分光镜透射,通过编码器,编码器是由随机分布的稀疏纳米粒子组成。样品的发射光经过分光镜反射后,样品发射光和蓝光激发光通过470 nm高通滤光片 $O_2$ ,滤除蓝光激发光,得到含有样品发射光的信息,样品发射光透过凸透镜 $L_2$ ,聚焦在电荷耦合器件(CCD)的像平面上并成像。改变编码,CCD相机采集一帧图。数据存储在计算机上,由计算机进行解调计算。

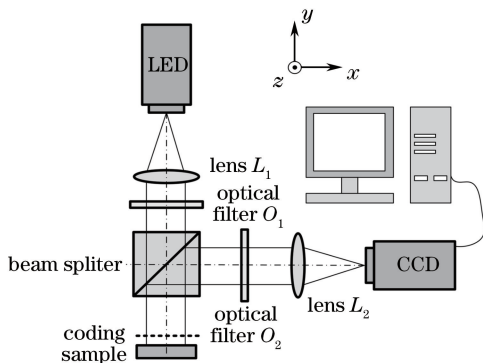


图1 光学系统构成图

Fig. 1 Schematic diagram of optical system

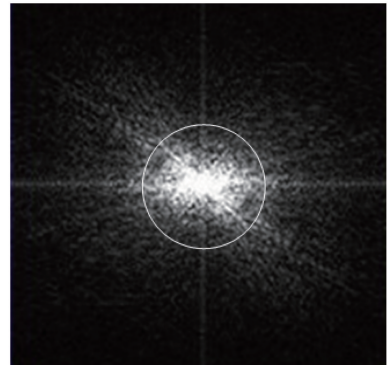


图2 幅频图

Fig. 2 Amplitude spectrum

### 2.2 点扩展函数

光学系统对点光源成像,为点扩展函数(PSF),PSF是光学系统的脉冲响应函数。具有不同形状的物体,经过光学系统在相机上形成图像相当于原图像与点扩展函数卷积后的模糊图像<sup>[12]</sup>。由傅里叶变换可知,空间图像在频谱图上表示为一系列分布的点,离中心越近的点表示低频信息;离中心越远的点表示高频信息。而点扩展函数就像一个低通滤波器,如图2所示,在频谱图上可以表述为一个以原点为圆心的圆,因此传统的光学系统只能探测到圆内的低频信息,而不能探测到圆外有样本细节的高频信息。

为了仿真的方便性,使用简化的点扩展函数模型

$$p(r, \theta) = 2 \cdot J_1(N_{NA} \cdot k_0 \cdot r) / N_{NA} \cdot k_0 \cdot r, \quad (1)$$

式中 $J_1$ 为一阶贝塞尔函数, $K_0 = 2\pi/\lambda$ 为波数, $\lambda$ 为激发光的波长, $N_{NA}$ 为数值孔径,

图像极径 $r = \sqrt{x^2 + y^2}$ , $x$ 为图像的横坐标, $y$ 为图像的纵坐标。

### 2.3 理论编码、解码和图像恢复

设 $s(x, y)$ 为源图像, $p(x, y)$ 为光学系统的点扩展函数, $f(x, y, t)$ 为时变的编码图像,原图像经过编码,通过透镜后,衍射受限图像为

$$o_1(x, y, t) = [s(x, y) \cdot f(x, y, t)] \otimes p(x, y), \quad (2)$$

为了还原图像 $s(x, y)$ ,需要一个解码图像 $f'(x, y, t)$ 。编码和解码满足

$$\int_0^t f(x', y', t) \cdot f'(x, y, t) dt = \delta(x - x', y - y') + c, \quad (3)$$

式中  $c$  为常数,  $\delta(x, y)$  为二维单位脉冲函数。

对 CCD 相机采集的衍射受限图像进行时变解码:

$$o_2(x, y, t) = \{ [s(x, y) \cdot f(x, y, t)] \otimes p(x, y) \} \cdot f'(x, y, t), \quad (4)$$

对时变解码后图像进行重构图像

$$\begin{aligned} o(x, y) &= \int_0^t o_2(x, y, t) dt = \\ &= \int_0^t \left[ \iint s(x', y') \cdot p(x - x', y - y') \cdot f(x', y', t) dx' dy' \right] \cdot f'(x, y, t) dt = \\ &= \iint s(x', y') \cdot p(x - x', y - y') \cdot [\delta(x - x', y - y') + c] dx' dy' = \\ &= p(0, 0) \cdot s(x, y) + c \cdot [s(x, y) \otimes p(x, y)], \end{aligned} \quad (5)$$

式中  $p(0, 0)$  为点扩展函数中心点的值,  $o(x, y)$  即为原图像  $s(x, y)$  的超分辨重构图像。可以看出, 重构图像为原图像乘以常数  $p(0, 0)$  加上模糊图像背景, 可得到超分辨图像。

### 3 数字仿真实验

#### 3.1 仿真原图像和点扩展函数

图 3 为原始高分辨图像的二维仿真图, 原始图像的尺寸为  $800 \text{ pixel} \times 800 \text{ pixel}$ , 假定  $1 \text{ pixel}$  的实际尺寸为  $1 \text{ nm}$ , 所有小圆和小圆环的直径均为  $60 \text{ pixel}$ ; 三环相贯中, 内环内边直径为  $130 \text{ pixel}$ , 外边直径为  $140 \text{ pixel}$ ; 中环内边直径为  $165 \text{ pixel}$ , 外边直径为  $175 \text{ pixel}$ ; 外环内边直径为  $190 \text{ pixel}$ , 外边为  $200 \text{ pixel}$ ; 两相贯圆环相交中, 内环内边为  $110 \text{ pixel}$ , 外边为  $120 \text{ pixel}$ ; 外环内边为  $140 \text{ pixel}$ , 外边为  $150 \text{ pixel}$ 。

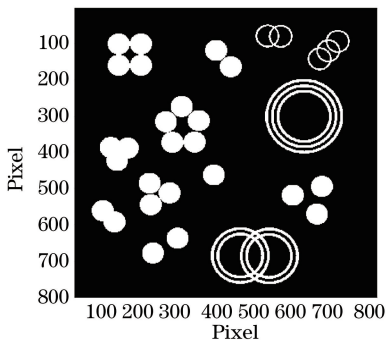


图 3 原始高分辨图像

Fig. 3 Original high-resolution image

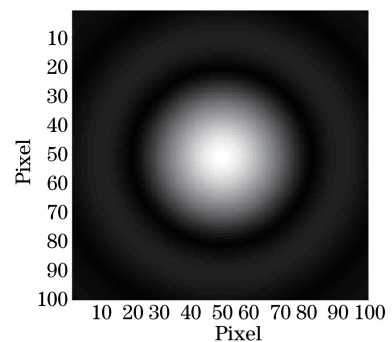


图 4 二维点扩展函数图

Fig. 4 Point spread function of two-dimensional image

图 4 为点扩展函数的二维仿真图, 仿真图的尺寸为  $100 \text{ pixel} \times 100 \text{ pixel}$ , 从图中可以看出点扩展函数的特点, 离中心越近, 强度越大, 离中心越远, 强度越小。它将所有小于  $50 \text{ nm}$  的图像全部模糊化, 无法分辨其形状。

#### 3.2 被点扩展函数模糊的图像

由于原始图像大小为  $800 \text{ pixel} \times 800 \text{ pixel}$ , 点扩展函数的二维仿真图为  $100 \text{ pixel} \times 100 \text{ pixel}$ , 所以原图像与点扩展函数的卷积图像大小为  $900 \text{ pixel} \times 900 \text{ pixel}$ , 如图 5 所示。从图中可以看出, 相对于原始高分辨图像, 与点扩展函数卷积后, 图像的所有圆点和圆环都变大了, 边界也变模糊了。根据线性叠加原理, 附近的圆点或光环的光强叠加, 造成本来可以分辨出来的圆点或圆环不能被分辨出来。图上的圆点和圆环分布呈现一团光斑。可以看到, 图中本来两两外切的部分围成的空隙已被小圆的裙边覆盖, 部分过于靠近的小圆对已经变成一个光斑, 即使间距足够大的小圆对可以被分辨出来, 但它们的精确位置已经无法确定。另外, 同心三圆环已经被模糊成一个圆环。从图中还可以看到, 模糊的三圆环内部还有一个小圆环, 这不是三圆环的内环, 而是点扩展函数旁瓣的影响。而图像中的相交小圆环, 由于点扩展函数的作用, 模糊得几乎消失。两相贯圆环相交处, 只剩下模糊的两个圆环相交。

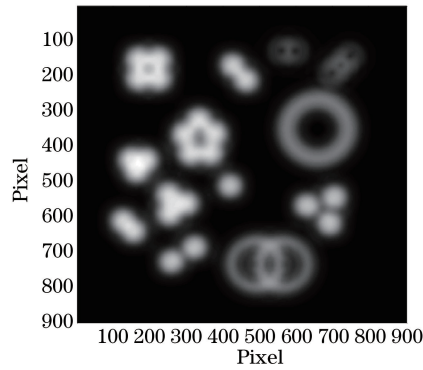


图5 原图像与点扩展函数的卷积图像

Fig. 5 Convolution image of the original image and the point spread function

### 3.3 稀疏随机脉冲编码分布和解码分布的产生

图6为用于解码的稀疏度为1%随机脉冲的分布图。从图中可以看出,脉冲分布是随机的、稀疏的、没有任何规律,而且幅值较高,各个脉冲幅值都相等。需要注意的是,用于编码的随机脉冲分布和用于解码随机脉冲的分布类似,但幅值较低,并且每一张图像的编码和解码一一对应。这样随机脉冲可以将样本的高频信息进行编码,移到可探测的低频区域,同时用对应解码,将高频信息移回原来的位置。

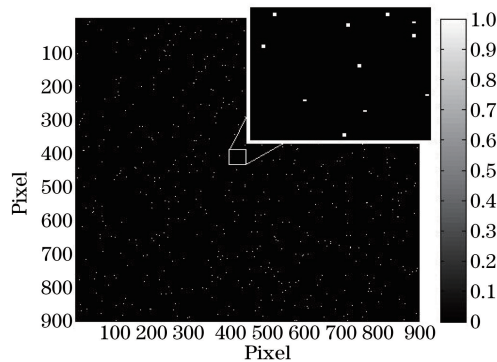


图6 用于解码的稀疏度为1%的随机脉冲分布图

Fig. 6 Random pulse distribution image for decoding and the sparseness is 1%

### 3.4 重构后的超分辨图像

经过编码解码重构后发现,重构后的超分辨图像的清晰度受编码解码随机脉冲分布的稀疏度和编码解码的次数影响,且受随机脉冲分布的稀疏度影响较大。

图7为编码解码稀疏度为1%时,编码解码次数不同的一组图像,其中,图7(a)为经过编码解码1000次

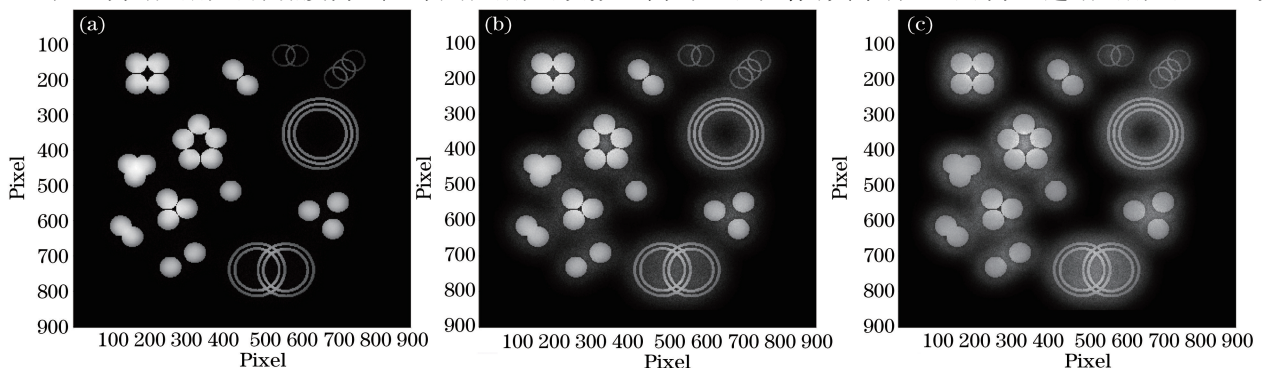


图7 超分辨率图像,脉冲分布稀疏度为1%。(a)编码解码次数为1000次;

(b)编码解码次数为10000次;(c)编码解码次数为20000次

Fig. 7 Super-resolution image and the sparseness of pulse distribution is 1%. (a) Count of coding and decoding is 1000; (b) count of coding and decoding is 10000; (c) count of coding and decoding is 20000



重构后的超分辨图像,与图 5 的卷积图像相比,图像的分辨率增强了,本来不能分辨的圆点和圆环可以分辨出来了,但是背景和样本之间的对比度变低了。而且,从图 7(a)~(c)可以看出来,随着编码解码次数的增加,图像逐渐模糊。

图 8 为编码解码次数为 1000 次,编码解码的随机脉冲分布稀疏度不同时的一组图像,图 8(b)中,稀疏度为 5% 的超分辨图像,即使能分辨出图像,也比较模糊,而稀疏度为 10% 的图像,已经模糊不清,图像上的圆和圆环完全无法辨认出来。

从图 7 和图 8 的对比可以看出,编码解码的次数不能太多,且编码解码的随机脉冲分布的稀疏度不能太大,稀疏度的增加对重构后的超分辨图像影响比较大,所以一般取编码解码的随机脉冲分布的稀疏度为 1%,进行编码解码。

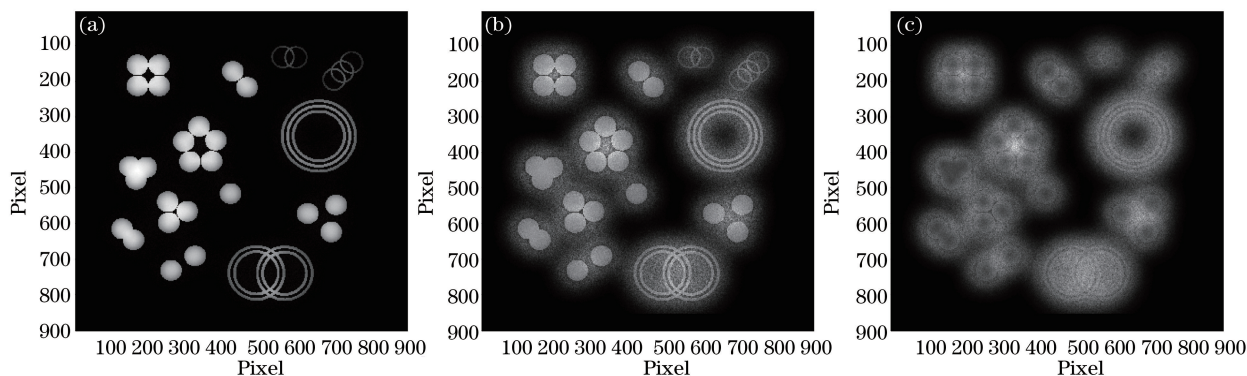


图 8 超分辨图像,编码解码次数为 1000 次。(a)脉冲分布稀疏度为 1%;  
(b)脉冲分布稀疏度为 5%;(c)脉冲分布稀疏度为 10%

Fig. 8 Super-resolution image and the count of coding and decoding is 1000. (a) Sparseness of pulse distribution is 1%; (b) sparseness of pulse distribution is 5%; (c) sparseness of pulse distribution is 10%

## 4 结果分析

图 9 中,截取图像中三个同心圆环的直径进行分析,可以看出,原始图像与点扩展函数卷积后,点扩展函数将小于 50 nm 的图像模糊,呈现出两个峰值,三个圆环不能被分辨出来,而通过随机脉冲编码解码仿真后得到的超分辨图像,能将间隔为 10 nm 的三个圆环,从模糊图像中还原,且其峰值比原图像有所下降。

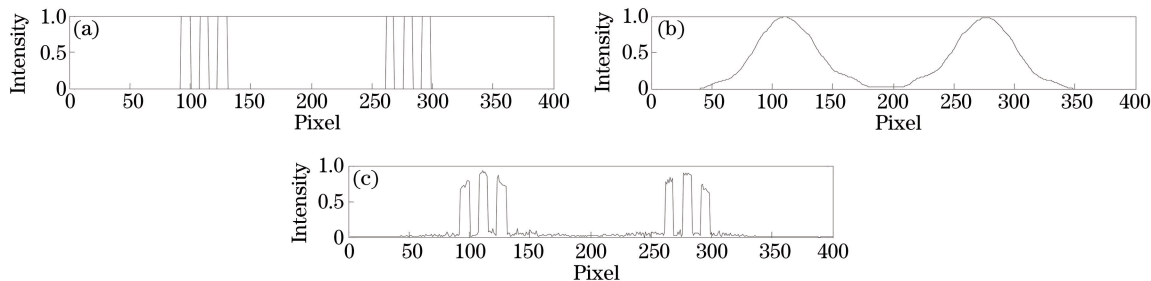


图 9 仿真结果的分析。(a)原始图像;(b)离焦图像;(c)超分辨图像

Fig. 9 Analysis of the simulation results. (a) Original image; (b) out of focus image; (c) super-resolution image

## 5 结 论

提出了基于随机脉冲编码的分时复用新方法,通过对图像进行编码解码处理,可以获取衍射受限下无法得到的高频信息,该方法的主要优点有:1) 利用传统的光学显微镜原理,实现宽场观察、获得高频信息、提高图像的空间分辨率;2) 随机脉冲编码是稀疏纳米粒子,由于纳米粒子的运动为布朗运动,没有先验假设,所以不需要复杂的硬件,后期数字处理方便;3) 只需蓝光激发,样品受损或者特性变化的程度小,适合活体细

胞的研究。

该方法和纳米粒子的尺寸有关,一般可以选择尺寸小的纳米粒子。使用传统的衍射受限的物镜,导致纳米粒子图像分布模糊。为了确定中心,可以将纳米粒子尺寸减小,但这样又要求一个更加稀疏的纳米粒子分布。因此仿真后需要进一步研究纳米粒子尺寸对超分辨图像的影响。

### 参 考 文 献

- 1 Abbe E. Beitrage zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung[J]. Archiv Für Mikroskopische Anatomie, 1970, 9(1): 413-418.
- 2 Pawley J B, Masters B R. Handbook of biological confocal microscopy[J]. Optical Engineering, 1996, 35(9): 2765-2766.
- 3 Yao Junen. The present situation and prospect of electron microscope[J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 1998, 17(6): 767-776.  
姚骏恩. 电子显微镜的现状与展望[J]. 电子显微学报, 1998, 17(6): 767-776.
- 4 Chi K R. Super-resolution microscopy: Break the limit[J]. Nature Methods, 2009, 6: 15-18.
- 5 Hell S W, Stelzer E H K. Fundamental improvement of resolution with a 4 Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation[J]. Optics Communications, 1992, 93(5-6): 277-282.
- 6 Hell S W. Toward fluorescence nanoscopy[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21: 1347-1355.
- 7 Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. Nature Methods, 2006, 3: 793-795.
- 8 Hess S T, Girirajan T P K, Mason M D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photo activation localization microscopy[J]. Biophysical Journal, 2006, 91(11): 4258-4272.
- 9 Wu Meirui, Yang Xibin, Xiong Daxi, *et al.*. Structured illumination fluorescence microscopy: Diffraction-limit breaking principle and application in life science[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2015, 52(1): 010003.  
吴美瑞, 杨西斌, 熊大曦, 等. 结构光照明荧光显微镜突破衍射极限的原理和在生命科学中的应用[J]. 激光与光电子学进展, 2015, 52(1): 010003.
- 10 Garini Y, Vermolen B J, Young I T. From micro to nano: Recent advances in high-resolution microscopy[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2005, 16(1): 3-12.
- 11 Heintzmann R, Ficz G. Breaking the resolution limit in light microscopy[J]. Briefings in Functional Genomics and Proteomics, 2006, 5(4): 289-301.
- 12 Goodman J W. Introduction to Fourier optics[M]. Colorado: Roberts & Company Publishers, 2005.