

# 高速超分辨结构光照明显微的关键技术及应用

赵天宇<sup>2,3</sup>, 汪召军<sup>1</sup>, 冯坤<sup>1</sup>, 梁言生<sup>1</sup>, 何旻儒<sup>2,3</sup>, 云雪<sup>1</sup>, 雷铭<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>西安交通大学物理学院, 陕西 西安 710049;

<sup>2</sup>中国科学院西安光学精密机械研究所瞬态光学与光子技术国家重点实验室, 陕西 西安 710119;

<sup>3</sup>中国科学院大学, 北京 100049

**摘要** 光学显微成像技术无论是在临床诊疗还是在基础科学研究上都发挥着重要的作用。伴随着新型荧光探针、光学控制、探测器件的不断发展,超分辨光学显微技术突破了传统光学衍射极限的限制,为现代生物医学研究提供了新的工具。在超分辨显微成像技术中,结构光照明显微镜(SIM)通过空间编码的结构光照明样品,将样品部分超出衍射极限的高频信息调制到低频中,从而通过光学系统实现超分辨成像。SIM具有成像速度快,光漂白和光毒性弱以及对荧光染料的非特异性需求等优点,被广泛应用于活细胞超分辨光学显微成像。本文回顾了SIM技术的重要原理与技术进步,重点介绍了SIM硬件设计与图像重构算法中关键的实验要点与技术难点,列举了现阶段SIM在生物成像中的部分应用,探讨了SIM未来的发展方向。期望本文能为SIM的设计和使用者提供一定的指导。

**关键词** 显微; 荧光显微镜; 超分辨显微镜; 结构光照明显微镜; 硬件设计方法; 图像重建算法

中图分类号 0436

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP57.240001

## High-Speed Structured Illumination Microscopy and Its Applications

Zhao Tianyu<sup>2,3</sup>, Wang Zhaojun<sup>1</sup>, Feng Kun<sup>1</sup>, Liang Yansheng<sup>1</sup>, He Minru<sup>2,3</sup>, Yun Xue<sup>1</sup>,  
Lei Ming<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>School of Physics, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China;

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Transient Optics and Photonics, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Xi'an, Shaanxi 710119, China;

<sup>3</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract** Optical microscopy performs an increasingly important role in clinical diagnosis and basic scientific research. With the development of novel fluorescence probes, light controllers, and detectors, super-resolution optical microscopy breaks through the diffraction limit and provides new tools for modern biomedical research. Among these techniques, structured illumination microscope (SIM) achieves super-resolution by using spatially coded structured illumination which down modulates spatial frequencies beyond the cutoff into the pass band of the microscope. SIM shows lower photo bleaching and phototoxicity, higher imaging speed, and no special requirements for fluorescent probes, which has significant advantages in application to live-cell biomedical research. In this paper, the important principles and technological progress during the development of SIM are firstly reviewed. Then we focus on the key experimental techniques and difficulties in hardware design and image reconstruction of SIM. Finally, the several applications in biological imaging are listed. It is expected that this review can provide guidance for designing and using SIM.

**Key words** microscopy; fluorescence microscopy; super-resolution microscopy; structured illumination microscopy; hardware design; image reconstruction algorithm

**OCIS codes** 180.2520; 170.2520; 110.0180; 100.6640

收稿日期: 2020-10-10; 修回日期: 2020-10-15; 录用日期: 2020-10-20

基金项目: 国家自然科学基金(62005208, 61905189)、中国博士后科学基金(2019M663656, 2020M673365)、国家重点研发计划(2017YFC0110100)

\* E-mail: ming.lei@mail.xjtu.edu.cn

# 1 引言

自17世纪荷兰人列文虎克发明光学显微镜以来,光学显微镜已广泛应用于生物、医学、地理等学科的研究中,成为观察生命过程、物质结构的常用手段。人们在不断追求更高光学分辨率的过程中,发现光学系统分辨率会受到光衍射效应的限制<sup>[1]</sup>。1893年德国科学家 Ernst Abbe 指出分辨率极限可以由  $\lambda/(2NA)$  计算,其中  $\lambda$  为波长,  $NA$  为显微物镜的数值孔径。受制造工艺的限制,目前的显微物镜的  $NA$  最大为 1.5 左右,所以通常认为在可见光范围内分辨率极限约为 200 nm<sup>[2]</sup>。衍射极限决定了普通光学显微镜无法进一步探究细胞内分子结构、定位及其相互作用。虽然近场光学扫描显微镜<sup>[3]</sup>、电子显微镜<sup>[4]</sup>和原子力显微镜<sup>[5]</sup>等手段能实现更高分辨率的观测,但它们需要对样品进行特殊处理,无法像传统光学显微镜一样实现动态观察和非侵入式活体成像。

超分辨光学成像技术是近几十年来发展最快、受关注度最高的光学成像技术之一。这类技术突破了光学衍射极限,将光学显微镜的空间分辨率提高到了几个纳米,已逐渐成为学者们研究微观结构和过程的强大工具<sup>[6-7]</sup>。目前主流的超分辨光学成像技术大体包括三类。

1) 基于单分子定位的显微成像技术 (SMLM)<sup>[8-14]</sup>。该技术利用极弱的激发光照明样品,随机激发少量的荧光分子,由于不存在周围荧光分子的干扰,人们可以十分精确地定位到这些荧光分子的中心位置,定位精度可达几个纳米,然后对成千上万幅这样的原始图片进行合成,得到高分辨率图片。这一技术虽然有着较高的空间分辨率,但时间分辨率较低,得到一幅超分辨图像往往需要较长的时间,因此难以用来观察生物体内的动态生命过程。

2) 基于光学系统点扩展函数调制的受激发射损耗显微成像技术 (STED)<sup>[15-17]</sup>。STED 在使用一束光激发荧光物质的同时,使用另外一束空心环形光使第一束光斑周边荧光物质通过受激发射损耗过程淬灭,从而得到小于衍射极限的荧光光斑。STED 通常可获得约 20 nm 的空间分辨率,但需要很高的激光功率,这带来严重的光毒性与光损伤,制约了其在活细胞方面的应用。

3) 基于空间调制照明的结构光照明显微成像 (SIM) 技术<sup>[18-20]</sup>。该技术采用空间编码的结构光场

代替均匀光场照明样品,再通过计算得到超衍射极限分辨率图像。SIM 的空间分辨率为 100 nm 左右,且具有更低的激发光强、成像速度快、不需要特殊荧光染料等优点,十分适合对活体样品进行高时空分辨率成像。

除了上述三类超分辨光学成像技术之外,新型的最小光子流量技术综合了三类成像技术的特点,将定位精度提高到了前所未有的 1 nm<sup>[21]</sup>,但其系统复杂,成像视场非常小。另外,飞速发展的计算机深度学习技术<sup>[22]</sup>、图像处理算法<sup>[23]</sup>以及新型荧光探针的发现<sup>[24-26]</sup>都为超分辨成像技术带来了新的突破。

在现有的超分辨光学成像技术中, SIM 具有最快的成像速度和极低的激发光功率密度,并且与传统的荧光分子兼容,因而在活体细胞及其结构的动态行为观测中备受青睐。图 1 描绘了 20 年来 SIM 技术的发展路线图。最初在 1997 年,结构光照明被引入到光学显微成像中,用于实现光学切片,改善了显微镜的轴向成像质量<sup>[27]</sup>。1999 年, Heintzmann<sup>[28]</sup> 首先意识到可以通过结构光照明将物体的高频信息编码到低频中,通过后续计算重构得到高分辨图像,从而提升显微系统的横向分辨率。该研究给出了相关的理论推导和实验设想,并将其命名为横向调制激发显微镜 (LMEM)。2000 年 Gustafsson<sup>[29]</sup> 提出了经典的二维 SIM 技术,在理论上系统分析了 SIM 技术实现超分辨的原理,并在实验上得到了约 115 nm 的超衍射极限分辨率图像。自此, SIM 技术受到了广大专家学者的关注,一系列相关技术改进和应用相继产生<sup>[29-43]</sup>。2005 年 Gustafsson<sup>[30]</sup> 在线性 SIM 的基础上提出了非线性 SIM,利用荧光饱和和激发产生含有高阶频率分量的结构光场,进一步提升了超分辨能力,在实验上实现了约 49 nm 的分辨率。2008 年 Schermelleh 等<sup>[30]</sup> 将二维 SIM 扩展至三维空间,将光轴方向的分辨率提升至 300 nm。为了进一步提高图像采集速度,2009 年 Kner 等<sup>[33]</sup> 利用空间光调制器和相位延迟器快速产生结构光并对其进行了调制,重构图像的帧率达到 11 frame · s<sup>-1</sup>。2010 年 Müller 和 Enderlein<sup>[34]</sup> 将 SIM 原理应用于共聚焦显微镜中,将共聚焦显微镜的横向分辨率提升到 150 nm。2014 年 Förster 等<sup>[38]</sup> 利用分段偏振片优化结构光条纹对比度,简化了偏振控制装置。2015 年 Li 等<sup>[39]</sup> 利用超高数值孔径物镜和非线性 SIM 技术提升了 SIM 的分辨率,观察到大量动态的细胞器活动。2016 年 Müller 等<sup>[40]</sup> 制作了开源插件

fair SIM 并将其发布于 ImageJ 软件平台,其用户友好的交互界面大大降低了 SIM 的使用门槛。2017 年 Demmerle 等<sup>[41]</sup>从实验角度分析了 SIM 的技术要点,总结了常见伪影的产生机理和解决方法。

2018 年 Huang 等<sup>[42]</sup>利用海森矩阵指导超分辨图像的重建,实现了  $188 \text{ frame} \cdot \text{s}^{-1}$  的高速超分辨成像。2019 年北京大學席鵬课题组利用 SIM 在实现超分辨成像的同时,进一步提取到荧光分子的偏振信息。

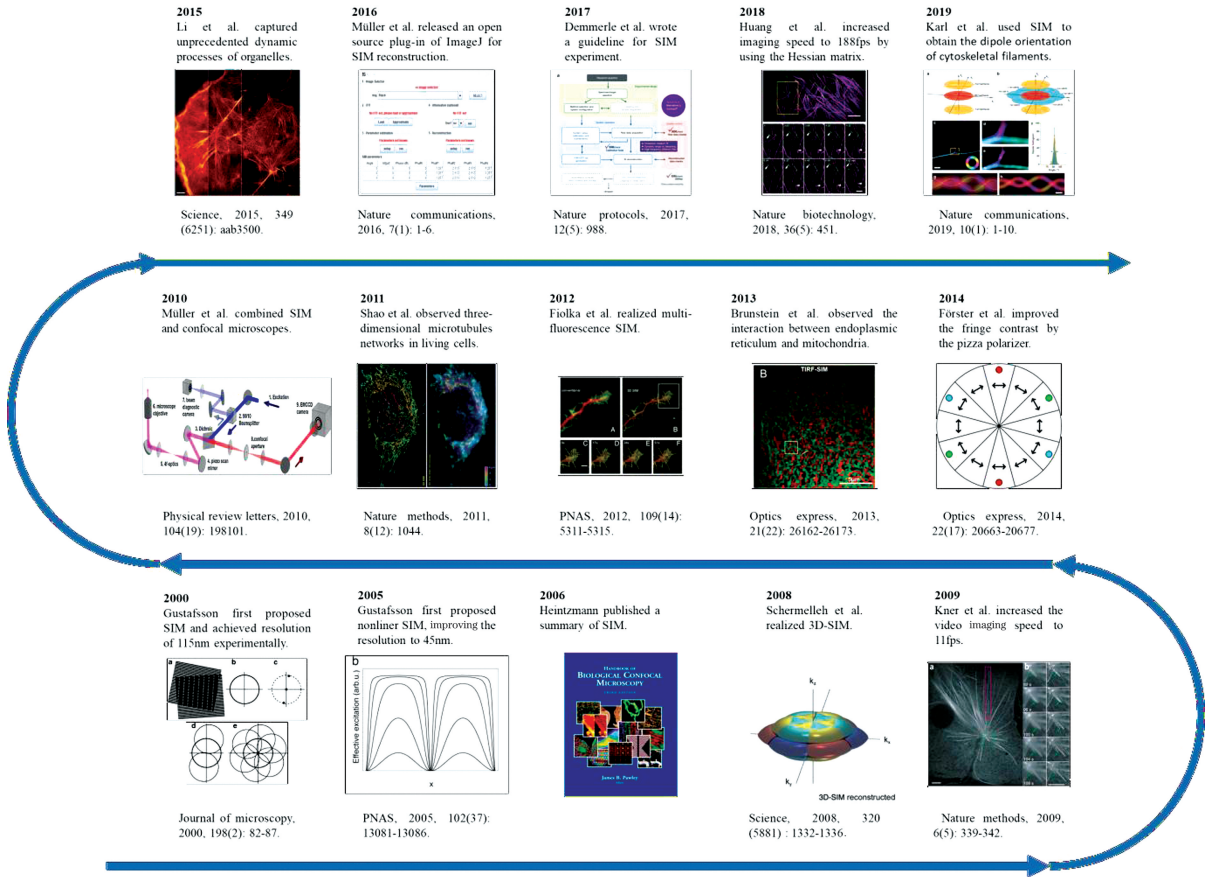


图 1 SIM 的重大理论和实验突破路线图<sup>[29-43]</sup>

Fig. 1 Roadmap of significant theoretical and technical breakthroughs of SIM<sup>[29-43]</sup>

SIM 技术的不断改进,极大地推动了生命科学领域和生物医学领域的发展。本文的主要内容分为三个部分,首先详细分析了当下最常用的二维激光干涉式线性超分辨 SIM 的基本原理、实现方法,重点介绍了高速 SIM 实验的技术要点,包括条纹光场的产生、光束的偏振控制和系统各个器件间的同步时序。其次分析了 SIM 图像重构过程中的难点,包括重构参数的测定、图像反卷积和噪声的处理,以及超分辨图像实时显示中数据流的控制。最后简要介绍了 SIM 在活细胞探测中的部分应用,讨论了 SIM 的发展方向。希望通过对 SIM 技术的硬件设计和图像重构等方面的综述,帮助研究者们了解 SIM 技术的基本原理、发展历程和关键技术要点,为研究人员提供一个自行设计 SIM 系统的攻略。

## 2 超分辨结构光照明显微的理论基础

SIM 技术的基本原理如图 2 所示,两个高频条纹叠加时会因莫尔效应产生低频条纹,这种新产生的低频条纹同时包含两种高频条纹的信息。从频

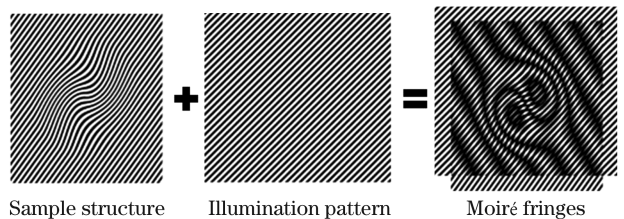


图 2 莫尔条纹的产生。待测物和结构光叠加时会因拍频产生新的条纹<sup>[30]</sup>

Fig. 2 Generation of Moiré fringes. If sample structure is multiplied by structural light, beat pattern (Moiré fringes) will appear

域角度分析,在传统光学显微系统中,显微物镜的空间分辨率取决于它能采集到的最大空间频率  $f_0$ 。当样品细节部分对应的高频信息  $f > f_0$  时,这部分信息将无法被光学系统收集,导致系统空间分辨率的降低。如果使用空间频率为  $f_1$  的结构光照明样品,将产生空间频率为  $|f - f_1| < f_0$  的莫尔条纹,通过解析莫尔条纹中包含的样品高频信息,可以计算并重构出带有样品细节的超分辨率图像<sup>[44]</sup>。

$$\tilde{D}(k) = I_0 \left[ \tilde{S}(k) + \frac{m}{2} \tilde{S}(k+p) e^{-i\varphi} + \frac{m}{2} \tilde{S}(k-p) e^{i\varphi} \right] \cdot \tilde{H}(k), \quad (3)$$

式中:  $\tilde{S}(k)$  为样品频谱;  $\tilde{H}(k)$  为成像系统的光学传递函数(OTF)。可见,成像系统收集到的图像频谱  $\tilde{D}(k)$  中包含超出截止频率的高频信息  $\tilde{S}(k+p)$  和  $\tilde{S}(k-p)$ 。假设成像系统 OTF 的截止频率为  $k_0$ ,则可探测到的空间频谱范围为  $[-k_0, k_0]$ ,经结构光照明后收集到的频谱范围将扩展至  $[-k_0 - p, k_0 + p]$ 。但是结构光的空间频率  $p$  也受限于光学系统,即  $p \leq k_0$ ,所以 SIM 可收集到的最大频谱范围为  $[-2k_0, 2k_0]$ ,对应 2 倍空间分辨率的提升<sup>[45]</sup>。

为了复原样品的真实频谱分布,需要将各频谱分量  $\tilde{S}(k)$ 、 $\tilde{S}(k-p)$  和  $\tilde{S}(k+p)$  进行分离,再将其分别还原至原有位置,结合反卷积运算,最终得到超分辨率图像。由于(3)式中包含三个未知的频谱分量,至少需要构建 3 个独立方程,常用的做法是引入三步相移  $\varphi_1$ 、 $\varphi_2$  和  $\varphi_3$  并对其分别进行拍摄,得到

$$\begin{bmatrix} \tilde{D}_1(k) \\ \tilde{D}_2(k) \\ \tilde{D}_3(k) \end{bmatrix} = I_0 \tilde{H}(k) \begin{bmatrix} 1 & \frac{m}{2} e^{-i\varphi_1} & \frac{m}{2} e^{i\varphi_1} \\ 1 & \frac{m}{2} e^{-i\varphi_2} & \frac{m}{2} e^{i\varphi_2} \\ 1 & \frac{m}{2} e^{-i\varphi_3} & \frac{m}{2} e^{i\varphi_3} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \tilde{S}(k) \\ \tilde{S}(k+p) \\ \tilde{S}(k-p) \end{bmatrix}. \quad (4)$$

通过解方程组得到  $\tilde{S}(k)$ 、 $\tilde{S}(k-p)$  和  $\tilde{S}(k+p)$ 。通过频谱平移和反卷积,即可完成频谱拼接。由于单一频率方向的结构光仅能扩展对应方向的空间频谱,所以还需要通过旋转结构光条纹方向,得到各向同性的二维超分辨率图像<sup>[46]</sup>。接下来本文将从 SIM 的硬件设计和 SIM 的图像重构算法两方面进行详细介绍。

在 SIM 成像过程中,假设样品荧光分子的分布为  $S(r)$ ,激发光为  $I(r)$ ,则相机收集到的图像  $D(r)$  为荧光与光学系统点扩展函数  $H(r)$  的卷积:

$$D(r) = [I(r) \cdot S(r)] \otimes H(r). \quad (1)$$

当激发光强度分布满足余弦函数时,有

$$I(r) = [1 + m \cdot \cos(2\pi p \cdot r + \varphi)] \cdot I_0, \quad (2)$$

式中:  $I_0$ 、 $m$ 、 $p$  和  $\varphi$  分别表示平均强度、调制度、空间频率和相位。将(2)式代入(1)式并进行傅里叶变换,即可得到结构光图像的频谱:

### 3 超分辨率结构光照明显微系统的硬件设计

本节重点围绕 SIM 硬件设计中几个关键技术要点展开讨论,分析 SIM 的条纹光场产生、光束偏振控制和系统同步时序三个方面的技术难点与解决方案,该研究为研究者设计搭建 SIM 系统提供指导。

图 3 所示为当下最常见的二维激光干涉式线性 SIM 的基本光路图。经过准直扩束的激光束通过偏振分光棱镜(PBS)和半波片(HWP)垂直入射至空间光调制器(SLM)。在 SLM 上加载光栅图案后,入射光束发生衍射并经原路返回,再次通过半波片并由偏振分光棱镜反射进入后续光路。这里需要注意的是,偏振分光棱镜、半波片和 SLM 共同作用,等效于入射激光照射一个  $0-\pi$  相位型衍射光栅<sup>[47]</sup>。衍射光进入透镜 1,使用空间滤波器阻挡其他级次的衍射光,只保留  $\pm 1$  级衍射光,  $\pm 1$  级衍射

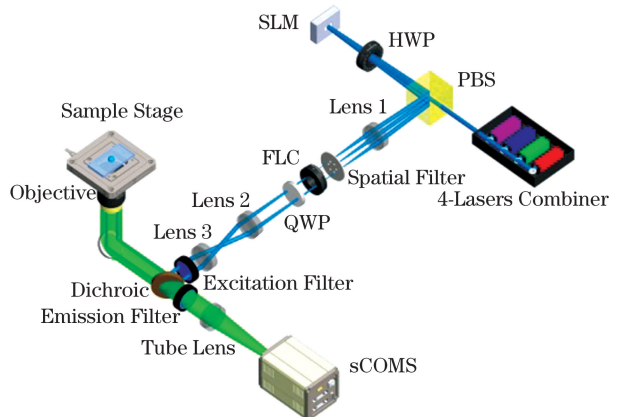


图 3 干涉式 SIM 光路图

Fig. 3 Optical path of laser interference SIM

光通过透镜 2 和透镜 3 组成的共焦系统进入显微物镜。两束衍射光在物镜的焦平面附近形成干涉条纹并激发样品,产生的荧光信号通过同一物镜收集,经由二向色镜反射进入筒镜,最终被相机收集。

### 3.1 条纹光场的产生和相移控制

如何产生条纹结构光场是 SIM 实验装置的核心,目前常用的方法大体分为两类:投影式和干涉式<sup>[47]</sup>。投影式通常使用非相干光源,利用微缩系统将光栅结构直接投影到样品上,从而产生条纹结构光。投影式系统具有可用波长范围大、不会产生激光散斑等优点,但其条纹调制受物镜调制传递函数的影响,很难进行高调制度条纹的加载,因而更适合用于较大条纹周期的光切片显微成像<sup>[48-50]</sup>。干涉式 SIM 利用双光束干涉的原理产生条纹结构光,使用激光照明光栅结构,收集衍射产生的±1 级衍射光,衍射光在样品上干涉产生干涉条纹<sup>[51-52]</sup>。条纹光场的产生和相移控制直接关系到超分辨图像的质量,是干涉式 SIM 技术的核心,其产生器件的选择尤其重要。为了产生两束相干光,1999 年 Heintzmann 和 Cremer<sup>[28]</sup>使用传统的透射式相位型光栅,同时为了产生不同相位与方向的干涉条纹,需要使用机械平台旋转平移光栅,此时切换速度较低,同时机械振动还会导致系统不稳定。随着液晶技术的不断发展,Fiolka 等<sup>[53]</sup>将 SLM 应用到 SIM 技术中,实现了光栅方向和相位的快速稳定切换。由于 SLM 需要模拟的光栅为二值元件,每个像素不需要精细的相位变化,2009 年 Kner 等<sup>[33]</sup>提出了基于铁电液晶空间光调制器(FC-SLM)的 SIM 技术。FC-SLM 调制速度可达 4.5 kHz,可以满足高速成像的需求。本文主要关注利用 FC-SLM 产生双光束及对照明条纹的相移控制。

和常见的显示器一样,SLM 液晶面板是由许多像素化的方块组成,当光栅进行旋转平移时,每个栅格都会不可避免地产生锯齿状边缘。这种锯齿状边缘会引起额外的衍射级次,产生不需要的杂散光,造成能量损失<sup>[54-55]</sup>。为了优化每个光栅的像素分布,Lu-Walther 等<sup>[56]</sup>提出了一种查找光栅组的方法,实现了对光栅常数、方向、相移和衍射效率的定量计算,算法流程如图 4 所示。条纹光场的产生是 SIM 系统中至关重要的一步,但很少有文献涉及,本文拟对此开展较详细的介绍。

为了产生所需的光栅图样,第 1 步需要定义像素化的光栅。如图 5(a)所示,SLM 上像素化光栅结构的最小单元可以由两个向量表示,即  $\mathbf{V}_a =$

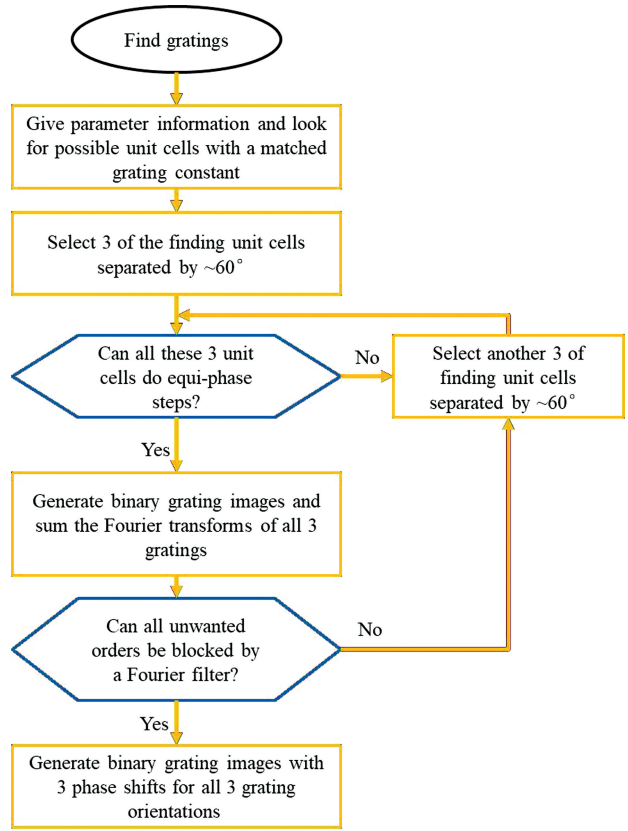


图 4 迭代法查找 SLM 加载光栅图样的流程图<sup>[56]</sup>  
Fig. 4 Schematic diagram of iterative method for searching grating patterns displayed on SLM<sup>[56]</sup>

$(a_x, a_y), \mathbf{V}_a = (b_x, b_y)$ , 则光栅方向  $\theta_a$  为

$$\tan \theta_a = \frac{a_y}{a_x}. \quad (5)$$

光栅常数  $P$  为

$$P = \sqrt{b_x^2 + b_y^2} \sin(\theta_a - \theta_b), \quad (6)$$

式中:  $\tan \theta_b = \frac{b_y}{b_x}$ 。

对于某个给定的光栅常数  $P$ ,在一定误差( $\epsilon < \epsilon_0$ )范围内,可以找到大量满足条件的  $a_x, a_y, b_x$  和  $b_y$ ,每一组  $a_x, a_y, b_x$  和  $b_y$  代表一个光栅单元。挑选光栅方向相差  $120^\circ$  的 3 组光栅,作为可能的光栅组。第 2 步,验证这些光栅能否产生等间距(如  $2/3\pi$ )的相位差。引入相位阶梯矢量  $\mathbf{S} = (S_x, S_y)$ ,  $S_x$  和  $S_y$  分别为光栅移动单位相位差时, $x, y$  方向上移动的像素数,可以表示为

$$\begin{cases} S_x = \frac{\left| \text{lcm}(a_y, b_y) \left( \frac{a_x}{a_y} - \frac{b_x}{b_y} \right) \right|}{n_1}, \\ S_y = \frac{\left| \text{lcm}(a_x, b_x) \left( \frac{a_y}{a_x} - \frac{b_y}{b_x} \right) \right|}{n_2}, \end{cases} \quad (7)$$

式中:  $\text{lcm}$  为求最小公倍数的函数<sup>[56]</sup>。由于液晶面板为像素化的点阵, 满足  $S_x$  和  $S_y$  为正整数的  $n_1$  和  $n_2$  即为  $x$  和  $y$  方向可能进行等距相移的次数。为了重构 SIM 图像, 每个方向至少进行三次相移, 即  $n_1 \geq 3$  且  $n_2 \geq 3$ 。第 3 步, 填充整个液晶面板, 得到可供 SLM 加载的光栅图样。每一个像素的值  $\text{Value}(\mathbf{r})$  由正弦函数确定:

$$\text{Value}(\mathbf{r}) = \sin(\mathbf{K} \cdot \mathbf{r} + \varphi), \quad (8)$$

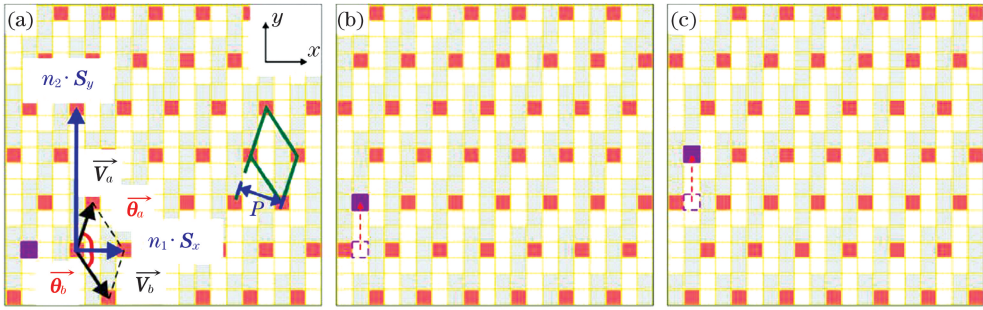


图 5 光栅查找算法<sup>[56]</sup>。(a)像素化的光栅。白色和灰色分别表示 SLM 像素的开和关, 红色为最小光栅单元起始点; (b)(c)两次  $2/3\pi$  相移时光栅(以紫色点为例)沿  $y$  方向移动的示意图

Fig. 5 Grating searching algorithm<sup>[56]</sup>. (a) Pixelated grating. White and gray represent on state and off state, respectively, and lattice points are pixels marked in red; (b)(c) grating with two steps of  $2\pi/3$  phase shift in  $y$  direction. Lattice point as a reference is marked in violet

### 3.2 偏振控制

SIM 受重构算法的限制。条纹对比度影响重构参数的测定准确度与高频信息的信噪比, 进而影响最终的重构图像质量, 所以高条纹对比度是获得高品质图像的必要条件<sup>[57-58]</sup>。干涉条纹对比度受光偏振态影响较大, 只有在线偏振入射光的偏振方向与条纹方向呈特定角度时, 条纹对比度才能达到最高。此外, 为保证结构光照明显微系统 OTF 的各向同性, 需要旋转条纹光场, 通常以三个条纹方向相互成  $60^\circ$  的条纹光场照明样品。为了保证三个

式中:  $\mathbf{K} = \mathbf{K}_x + \mathbf{K}_y = \left(\frac{2\pi}{P} \sin \theta_a\right) \mathbf{x} + \left(\frac{2\pi}{P} \cos \theta_a\right) \mathbf{y}$ ;  
 $\varphi$  为考虑相移之后的光栅相位。然后对  $\text{Value}(\mathbf{r})$  进行二值化, 即当  $\text{Value}(\mathbf{r})$  为正时, 设定 SLM 像素值为 1, 其余为 0。第 4 步, 通过对光栅进行傅里叶变换, 计算得到光栅各级次的衍射效率,  $\pm 1$  级衍射效率最高的光栅即为所需要的光栅, 最终将其加载至 SLM 上。

方向都能实现较高的条纹对比度, 还需要随着条纹方向的旋转而同步改变光束的偏振方向<sup>[59-60]</sup>。

目前常用的偏振控制方法有两种。第一种是 Förster 等提出的 pizza 偏振片法。这种方法首先将线偏振光束通过一个  $1/4$  波片变为圆偏振光, 再使其通过一种特殊加工的 pizza 偏振片。这种偏振片包含 12 个小扇形偏振片, 每个小偏振片的偏振方向都垂直于半径方向, 然后用光学胶将偏振片粘合固定[图 6(a)]。这种方法原理简单, 操作容易, 不需要额外的控制和同步装置, 但偏振片会损失一半的

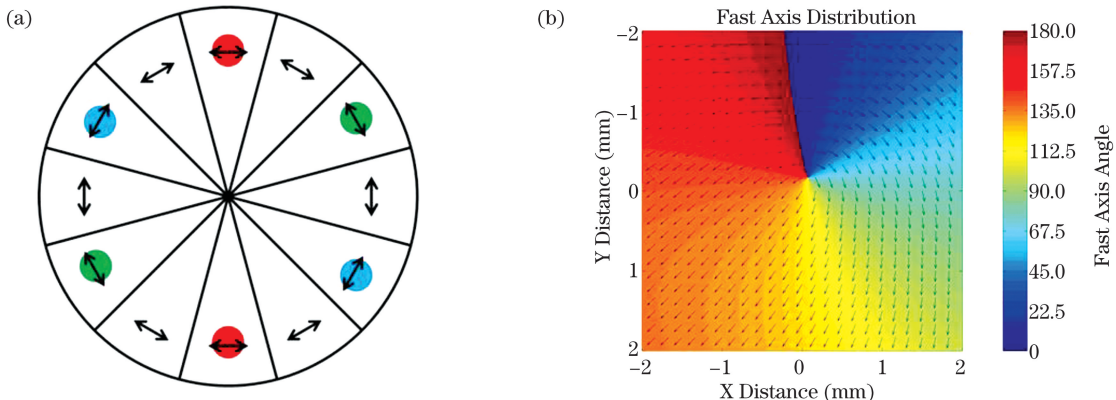


图 6 Pizza 偏振片和零级涡旋半波片。(a) Pizza 偏振片<sup>[38]</sup>; (b) 零级涡旋半波片<sup>[61]</sup>

Fig. 6 Pizza polarizer and zero-order vortex half-wave retarder. (a) Pizza polarizer<sup>[38]</sup>; (b) zero-order vortex half-wave retarder<sup>[61]</sup>

光功率。赵天宇等<sup>[61]</sup>对这一方法进行了改进,使用零级涡旋半波片替代  $1/4$  波片和 pizza 偏振片,大大提高了能量利用率[图 6(b)]。但受工艺限制,零级涡旋半波片很难做成宽带波片,这限制了其在多荧光标记领域的应用。

由于单一无源器件很难精确满足 SIM 所需的复杂偏振情况,Wicker<sup>[54]</sup>提出使用有源器件(即相位延迟器)进行偏振控制<sup>[54]</sup>。铁电液晶相位延迟器(FLC)可以利用电压控制液晶分子的长轴取向,从而改变光束不同偏振分量的相位延迟,进而改变光束的偏振态。FLC 液晶分子长轴取向为  $0^\circ$  和  $45^\circ$ ,分别对应“关”和“开”两种状态,相位延迟由 Wicker 特殊设计并定制为固定的  $1/3$  波长。如图 7 所示,偏振控制模块共使用两个 FLC 和一个  $1/4$  波片。图中红色为光束的偏振方向,蓝色为 FLC 和波片的快轴取向。当入射光为竖直偏振时,两个 FLC 均为“关”状态,满足产生竖直方向条纹的要求(图 7 中第一行)。若要产生  $60^\circ$  方向的条纹,需将一个 FLC 切换为“开”;若要产生  $-60^\circ$  方向的条纹,需将两个 FLC 均切换为“开”。最初这种 FLC 需要定制,只能实现固定的相位延迟,无法进行灵活调整。随着技术的进步,商用液晶相位延迟器可以实现小于  $500 \mu\text{s}$  的任意相位延迟切换,文献<sup>[36]</sup>中使用一个液晶相位延迟器配合  $1/4$  波片即可实现任意的偏振控制。相位延迟器法虽然需要额外的控制器与同步装置,操作复杂并且成本较高,但其适用于需要多种照明波长的情况,具有连续调节偏振方向、精度高、适用范围广的优点,同时也可用于补偿后续光路带来的偏振损失。

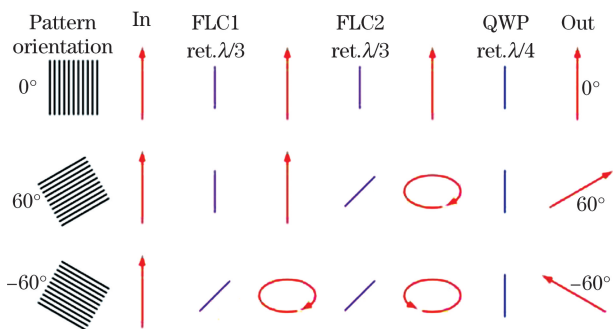


图 7 FLC 偏振控制原理<sup>[54]</sup>

Fig. 7 Principle of polarization control by using FLC<sup>[54]</sup>

### 3.3 系统同步与控制

生命科学的研究对 SIM 的成像速度提出了更高的要求。SIM 成像速度最初只有秒量级,随着硬件的不断改进,SIM 成像速度越来越快。例如:

2018 年中国科学院生物物理所的李栋课题组利用交叉重建方法减少了原始图像的采集数量,在分辨率为  $512 \text{ pixel} \times 128 \text{ pixel}$  的条件下得到了帧频为  $266 \text{ frame} \cdot \text{s}^{-1}$  的 SIM 超分辨成像<sup>[62]</sup>;2018 年北京陈良怡课题组利用 Hessian 算法实现了分辨率为  $256 \text{ pixel} \times 72 \text{ pixel}$ 、帧频为  $188 \text{ frame} \cdot \text{s}^{-1}$  的 SIM 超分辨成像<sup>[42]</sup>。而毫秒级的成像速度需要对系统各个器件如空间光调制器、相机和光源等进行微秒级的精确同步控制。

这里以本课题组自行搭建的 SIM 系统为例,使用 sCMOS 相机(ORCA-flash4.0,滨松公司,日本)作为图像采集装置,以声光可调谐滤波器(AOTF)(AOTFnC, AA Opto Electronic 公司,法国)控制激光开关,以 FC-SLM (QXGA-3DM, Forth Dimension Displays 公司,英国)产生结构光,介绍了 SIM 系统的同步控制时序。

SIM 原始图像的采集频率主要受限于 SLM 的控制时序。在最高速成像模式下,SLM 每帧耗时  $589 \mu\text{s}$ ,其中包括  $389 \mu\text{s}$  的切换时间和  $200 \mu\text{s}$  的显示时间。值得注意的是,FC-SLM 每个像素包含“开”、“关”两种状态,为了避免铁电液晶分子的损伤,每加载一幅图都需要随后加载同样时长的反向图案。这里加载  $100 \mu\text{s}$  正图案和  $100 \mu\text{s}$  负图案,像素取反并不影响双光束的产生<sup>[56]</sup>。如图 8 所示,sCMOS 作为时钟信号源,分别控制 AOTF 和 SLM。当 sCMOS 开始处理某一帧图像时,需为 SLM 提供上升沿触发信号。这一信号为了配合 sCMOS 快门完全开启,需要延迟  $206 \mu\text{s}$ 。SLM 接收到上升沿信号后,启动新的一帧图像加载,加载过程用时  $276 \mu\text{s}$ 。当 SLM 图像加载完成时,sCMOS 快门完全开启,为 AOTF 提供触发信号,使激光通过系统照明样品。 $200 \mu\text{s}$  后系统完成一帧图像的拍摄,sCMOS 自动读出上一帧的数据并将其保存至磁盘,并重启快门。AOTF 关闭,停止照明样品,SLM 重置液晶面板并准备加载下一帧图像。

为了得到系统的最终成像速度,需要分别计算时序中每一步的耗时。相机快门开启速度和读出速度一致,为每两行  $9.65 \mu\text{s}$ 。这里设置图像大小为  $100 \text{ pixel} \times 512 \text{ pixel}$ ,则快门开启时间为  $482 \mu\text{s}$ ,激光器开启时长即样品曝光时长为  $200 \mu\text{s}$ ,总计采集一帧图像耗时  $682 \mu\text{s}$ ,则 SIM 采集原始图像的帧频为  $1400 \text{ frame} \cdot \text{s}^{-1}$ 。由于计算一幅超分辨图像需要采集 9 幅原始图像,因此系统采集超分辨图像的帧频为  $160 \text{ frame} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

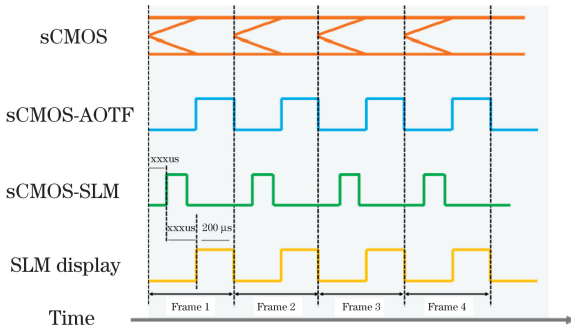


图 8 SIM 时序图

Fig. 8 Timing sequence of SIM

## 4 超分辨结构光照明显微技术的图像重构算法

本节将详细介绍超分辨结构光照明显微技术的图像重构算法。SIM 通过改变照明光的空间结构,使记录的图像含有更多高频信息,再利用特定的算法将信息分离出来,进而重构出超分辨图像。然而频谱分离和反卷积过程中会遇到如原始图像信噪比低、参数测定不准确等问题,如何减小这些问题带来的伪影一直是 SIM 研究的重点。

### 4.1 参数测定

为了求解(4)式中的各个频谱分量,需要先确定  $I_0$ 、 $m$  和  $\varphi$  等未知参数的值,其中  $I_0$  是常数因子,只影响亮度而不会影响图像信息及像质。结构光条纹调制度  $m$  只存在于高频部分,影响高频分量的整体强度。调制度  $m$  很容易通过实验测得,并可以通过后续处理对其进行修正。频谱分离中最重要的参数为初相位  $\varphi$ ,其作为各频谱系数的组成部分,直接影响频谱分离结果。同时由于初相位  $\varphi$  位

于指数项,估算不准确会造成重构图像中严重的伪影。目前常用的初相位估计方法有三种。2009 年 Shroff 等<sup>[63]</sup>提出的峰值相位法(POP)是最快速、简便的初相位估计方法。该方法通过测量结构光照明图像频谱在  $\pm 1$  级峰值( $k = \pm p$ )处的相位值,将其近似为对应结构光的初相位。这一近似成立需要满足多个条件,包括生物频谱的高频分量衰减足够快、结构光调制度足够高和采集图像频谱峰值  $k = \pm p$  处信噪比足够高等。然而实际生物实验中存在荧光标记信号较弱、曝光时间较短等问题,使得原始图像的信噪比较低,导致初相位求解不精确,最终造成重构图像存在伪影。所以虽然 POP 算法快速、简单,但对样品荧光要求较高,不利于实际使用。2013 年 Wicker 等<sup>[64]</sup>通过求解原始图像频谱的自相关,发现在  $\pm 1$  级峰值位置  $k = \pm p$  处的幅角相位也可作为结构光照明条纹的初相位估计,提出了目前最常用的自相关重构方法(ACR)。相较于之前的 POP 算法,ACR 成立的近似条件较为宽松,且降低了噪声对结果的影响。另外,ACR 在计算过程中可以通过求解复线性回归得到调制度  $m$ ,这提高了重构算法对  $m$  的估计精度,为后续维纳滤波参数的确定提供依据<sup>[42]</sup>,但其缺点在于仍然需要足够高的结构光调制度。对于投影产生结构光或强荧光背景等导致调制度降低的情况,ACR 的估计误差较大。2016 年 Zhou 等<sup>[65]</sup>发现可以利用 3 幅原始结构光图像之间的相互关系,得到初相位的精确值(IRT)。这里以三幅结构光图像的相位差均为  $2\pi/3$  的情况为例,由(1)式和(2)式可知,三幅采集到的图像可分别表示为

$$\begin{cases} D_1(r) = \{I_0[1 + m \cos(2\pi pr + \varphi_0)]S(r)\} \otimes H(r) \\ D_2(r) = \{I_0[1 + m \cos(2\pi pr + \varphi_0 + 2\pi/3)]S(r)\} \otimes H(r) \\ D_3(r) = \{I_0[1 + m \cos(2\pi pr + \varphi_0 - 2\pi/3)]S(r)\} \otimes H(r) \end{cases} \quad (9)$$

构建一幅新的重组图像:

$$\begin{aligned} D_{2\pi/3}(r) &= D_1(r) + D_2(r)\exp(-i2\pi/3) + D_3(r)\exp(i2\pi/3) = \\ &= (3mI_0/2)\exp(-i\varphi_0)[S(r)\exp(-i2\pi pr)] \otimes H(r) \end{aligned} \quad (10)$$

将重组图像进行傅里叶变换,得到其频谱为

$$\tilde{D}_{2\pi/3}(k) = (3mI_0/2)\exp(i\varphi_0)\tilde{S}(k-p)\tilde{H}(k), \quad (11)$$

取其在  $k = p$  处的复数值,则有

$$\tilde{D}_{2\pi/3}(p) = (3mI_0/2)\tilde{S}(0)\tilde{H}(p)\exp(i\varphi_0). \quad (12)$$

由于样品的频谱  $\tilde{S}(0)$  和系统光学传递函数  $\tilde{H}(p)$  均为实数,则  $\tilde{D}_{2\pi/3}(p)$  的幅角即为初相位



$\varphi_0$ , 即

$$\varphi_0 = \arg [\tilde{D}_{2\pi/3}(p)]. \quad (13)$$

这一算法需要三幅原始图像间的相位差,但由于结构光条纹是人为产生的,三幅原始图像间的相位差已知且精度很高,这就大大提高了初相位的估

计精度,使得该算法特别适用于弱荧光成像。图 9 为三种初相位估计方法的结果对比,样品为不同荧光染料标记的牛肺动脉上皮细胞,可以看到 POP 和 ACR 均产生不同程度的残余条纹而 IRT 没有产生类似的条纹。

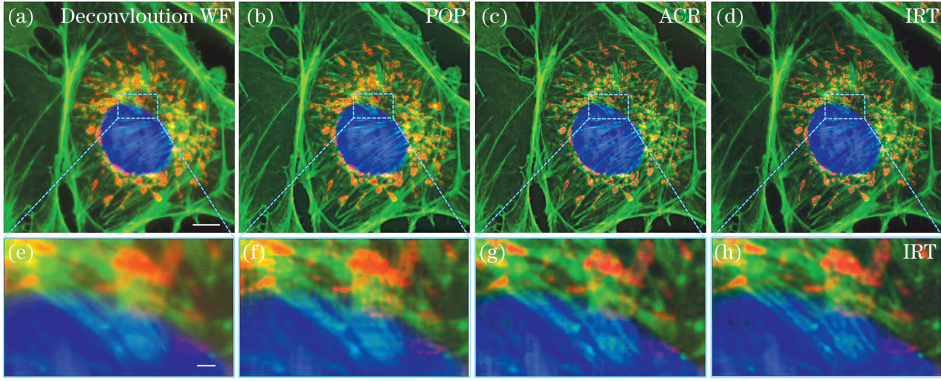


图 9 三种初相位估计方法的结果对比<sup>[65]</sup>。(a)普通宽场反卷积的结果;(b)~(d)三种初相位估计算法的超分辨重图像;(e)~(h)局部放大结果。标尺:(a)~(d)为  $5 \mu\text{m}$ ;(e)~(h)为  $500 \text{ nm}$

Fig. 9 Results of three initial phase estimation methods. (a) Deconvolution wide-field image; (b)~(d) super-resolution image reconstructed by three phase estimation algorithms; (e)~(h) magnified views. Scale bar: (a)~(d)  $5 \mu\text{m}$ ; (e)~(h)  $500 \text{ nm}$

## 4.2 反卷积和噪声处理

在光学显微领域,反卷积通常指用于反转在光学显微镜中由于衍射引发成像模糊的过程,从而创建更清晰的图像。造成成像结果模糊的阿贝衍射极限在数学上可以描述为系统点扩展函数和样品的卷积,即  $D(r) = S(r) \otimes H(r)$ , 而反卷积即为这

一过程的逆过程<sup>[66]</sup>。反卷积几乎可以应用在所有荧光显微镜得到的数字图像,一直是提高荧光显微镜图像质量最流行的方法之一,自 20 世纪 50 年代以来,许多反卷积算法不断被开发出来<sup>[67-69]</sup>。SIM 中反卷积最常采用的方法是维纳滤波法,可表示为<sup>[70]</sup>

$$\begin{cases} \tilde{S}_{\text{sr}}(k) = \frac{\tilde{O}(k)\tilde{H}^*(k) + \tilde{O}(k+p)\tilde{H}^*(k+p) + \tilde{O}(k-p)\tilde{H}^*(k-p)}{|\tilde{H}(k)|^2 + |\tilde{H}(k+p)|^2 + |\tilde{H}(k-p)|^2 + \omega^2}, \\ \tilde{O}(k) = \tilde{S}(k)\tilde{H}(k) \end{cases}, \quad (14)$$

式中: $\omega$  为维纳滤波参数。然而对 SIM 系统而言,使用传统的维纳滤波方法不能很好地适应超分辨重构后复杂的频谱情况。虽然 Müller 等<sup>[40]</sup>在 fair SIM 中提出的改进维纳滤波方法引入切趾法去除环状伪影,但由于 SIM 的频谱拼接带来高频频谱强度低、频谱均匀性差等问题,需要根据经验调整维纳滤波和切趾参数,因此所得结果不稳定。对此,人们改用不需要固定参数的 RL(Richardson-Lucy)反卷积,并对原始图像和重构图像分别进行反卷积操作,这样可改善离焦背景和频谱均匀性对重构结果的影响<sup>[71]</sup>。

带来伪影的另一个原因是原始图像的低信噪

比。在追求更快的成像速度以及更弱的光漂白效应和光损伤效应的过程中,人们不断缩短成像曝光时间并降低激发光强,这导致了较低的图像信噪比,影响重构参数的判定,带来额外的伪影,进而扰乱科学家们对样品结构的解读。为了处理图像噪声问题,人们将目光转移到数字图像处理领域。Chu 等<sup>[72]</sup>将 TV(total variation)约束方法引入 SIM 重构,虽然该方法有效地降低了噪声对重构图像质量的影响,但存在过度校正边缘信息导致阶梯状伪影的现象。2018 年北京陈良怡课题组借鉴人眼区分信号和噪声的机制,首次提出将“生物样本在多维时空上连续,而噪声是完全随机分布”的先

验知识用于构建海森矩阵,指导 SIM 图像重建<sup>[42]</sup>。

海森矩阵的构建基于两个先验知识。首先, SIM 系统的横向分辨率约为 90 nm,则重构图像上的样品结构空间尺寸都应在 90 nm 以上,小于这一尺寸的结构将被认为是噪声。其次假设样品运动速度小于拍摄速度,样品运动距离小于 100 nm,则重构图像上的样品结构在时间上也应为连续的。这样可以在传统反卷积之后进一步优化图像,以去除随机噪声和伪影。根据以上先验知识构建最优化问题:

$$\begin{cases} \operatorname{argmin}_f \left[ \frac{\mu}{2} \|f - g\|_2^2 + R_{\text{Hessian}}(f) \right], \\ R_{\text{Hessian}}(f) = \int_{\Omega} \left\| \begin{matrix} f_{xx} & f_{xy} & \sqrt{\sigma} f_{xt} \\ f_{yx} & f_{yy} & \sqrt{\sigma} f_{yt} \\ \sqrt{\sigma} f_{tx} & \sqrt{\sigma} f_{ty} & \sqrt{\sigma} f_{tt} \end{matrix} \right\|_1 \end{cases} \quad (15)$$

式中: $f$  为优化后的重构图像; $g$  为重构图像经过维纳反卷积后的结果; $\Omega$  为图像全体像素; $\sigma$  用来表征样品在时间轴  $t$  上的连续性; $f_{xx}$ 、 $f_{xy}$ 、 $f_{xt}$ 、 $f_{yy}$ 、 $f_{yt}$  和  $f_{tt}$  为  $f$  在相应方向上的二阶偏导数。通过 Split-Bregman 方法迭代求解最优化问题,即可得到优化结果。图 10 为海森重构与 Wiener、fair SIM、RA Wiener、TV SIM 和 RL SIM 方法的对比。可以看到,传统处理方法得到的微丝结构断续,微丝结构周围出现伪影,而海森重构仍能保持图像结构的连续。

### 4.3 超分辨图像的实时显示

SIM 的图像采集速度是目前所有超分辨技术中最快的,但是超分辨图像的重构需要不断进行空域-频域转换以及使用迭代算法查找参数,计算开销巨大。相比于数十 ms 的图像采集速度,数分钟的图像重建时间过长<sup>[73]</sup>。所以通常需要将 SIM 的图像采集和图像重建过程分离开,先将数据进行完整采集,再用特定的程序或软件对采集数据进行处理,这就导致传统 SIM 在寻找感兴趣的样品区域或调整实验参数时无法对样品进行实时超分辨观测,给实际拍摄带来巨大困难。例如,在观察一些细胞器的动态过程如线粒体内脊的融合分离现象时,传统 SIM 无法像普通宽场显微镜一样进行实时观察,导致使用者需要花费大量时间进行来回切换照明拍摄和后处理等步骤。为此,Markwirth 等<sup>[74]</sup>通过引入 GPU 加速技术,利用 GPU 更擅长对图像和图形进行运算的特点,用不同处理器进行数据采集和图像重构,将重构时间压缩到 20 ms,实现了 SIM 超

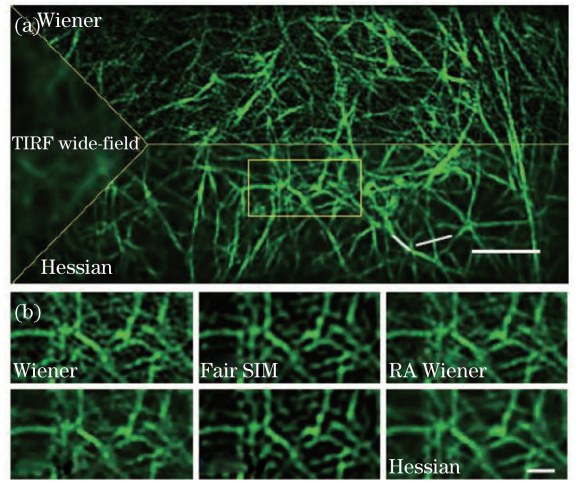


图 10 密集肌动蛋白骨架结构的海森重构结果<sup>[42]</sup>。(a)宽场结果、传统维纳滤波结果和海森重构结果对比,标尺为 2  $\mu\text{m}$ ; (b)不同反卷积方法结果的局部放大图,标尺为 500 nm

Fig. 10 Densely packed cellular actin skeleton structures obtained by Hessian reconstruction<sup>[42]</sup>. (a) Wide-field image, traditional Wiener filtering result, and Hessian deconvolution result. Scale bar: 2  $\mu\text{m}$ ; (b) magnified images reconstructed by different deconvolution methods. Scale bar: 500 nm

分辨结果的实时显示。

为了实时显示重建结果,需要提高软件的数据传输和处理速度,实现连续重建和显示两个功能。连续重建工作由一个多线程、网络化和模块化的软件框架组成。图 11 展示了从相机产生原始图像到得到超分辨图像的数据流过程,该处理流程分为两部分。图 11 左侧的相机计算机(Camera PC)用来采集数据,右侧的重构计算机(Reconstruction PC)用来重构并显示结果,二者用千兆比特网线连接以保证大量数据的快速传输。原始图像由相机采集后,经专用的 camera link 数据线和数据采集卡传入相机计算机。相机的驱动程序解码数据后将数据传送到 micro-manager 的 fair SIM 插件中,在添加图像标签信息(如通道数、序号和时间标签等)后按照传输控制协议进行编码并通过网线传给重构计算机。重构计算机接收数据后,首先将数据按 SIM 重构序列排好并保存原始文件至 SSD(solid state disk)中。将数据通过 JNI(Java native interface)传入英伟达图形处理器,并根据需要选择是否重新估算重构参数。最后将计算结果显示到屏幕并保存至 SSD。值得注意的是,多台计算机分散执行采集与重建可以带来三个好处:1)有利于兼容已有的商



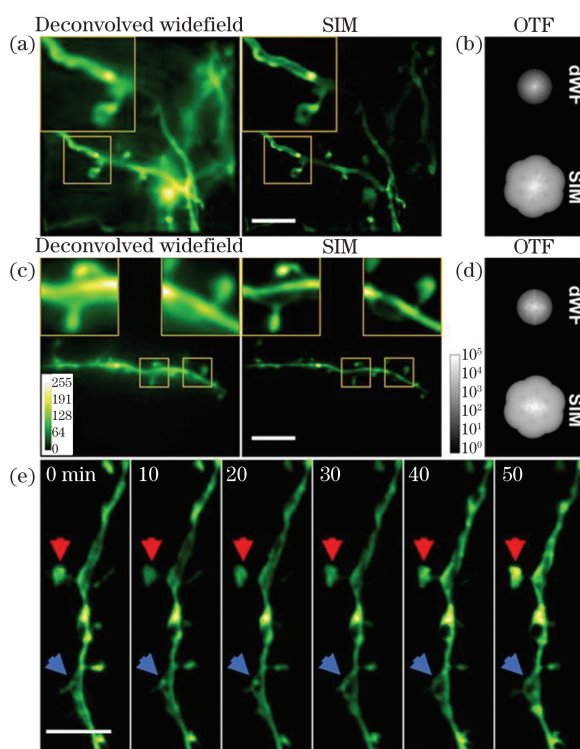


图 12 对鼠脑神经元形态功能的研究<sup>[75]</sup>。(a)以 ChR2-GFP 标记细胞膜,得到的宽场和 SIM 实验结果,标尺:  $5 \mu\text{m}$ ; (b)图 12(a)中宽场和 SIM 实验结果的 OTF 对比; (c)对细胞质进行标记的宽场和 SIM 实验结果,标尺:  $5 \mu\text{m}$ ; (d)图 12(c)中宽场和 SIM 的 OTF 对比; (e)按照时间先后顺序排列的 SIM 结果,展示了神经树突结构的动态变化,标尺:  $4 \mu\text{m}$ 。

Fig. 12 Research on morphological function of mouse brain neurons<sup>[75]</sup>. (a) Deconvolved widefield and SIM images of cell membrane labeled as ChR2-GFP. Scale bar:  $5 \mu\text{m}$ ; (b) OTFs of SIM and deconvolved widefield images in Fig. 12 (a); (c) deconvolved widefield and SIM images of labeled cytoplasm. Scale bar:  $5 \mu\text{m}$ ; (d) OTFs of SIM and deconvolved widefield images in Fig. 12(c); (e) time-lapse SIM images showing structural dynamics of dendrite in brain of mouse. Scale bar:  $4 \mu\text{m}$ 。

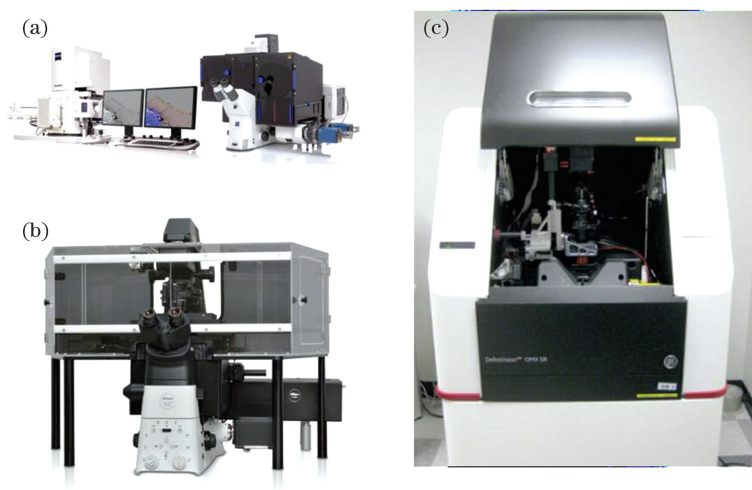


图 13 商用 SIM 产品<sup>[83-85]</sup>。(a)德国蔡司公司 Elyra 7; (b)日本尼康株式会社 N-SIM; (c)美国通用电器公司 GE DeltaVision OMX。

Fig. 13 Commercial SIM products<sup>[83-85]</sup>. (a) Elyra 7 from Zeiss, Germany; (b) N-SIM from Nikon, Japan; (c) GE DeltaVision OMX from General Electric, America

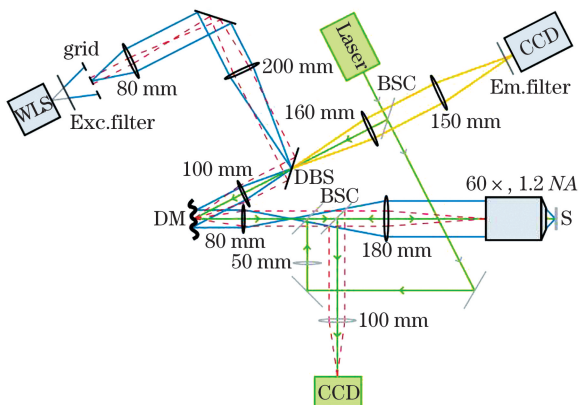
表 1 商用 SIM 产品部分参数对比

Table 1 Partial parameters of commercial SIM products

Product	Elyra	N-SIM	GE DeltaVision OMX
Illumination modality	Lattice-SIM, SMLM (single molecule localization microscopy)	3D-SIM, 2D-SIM, TIRF-SIM	3D-SIM, 2D-SIM, TIRF-SIM
Stage travel $x \times y \times z$ /(mm $\times$ mm $\times$ mm)	130 $\times$ 100 $\times$ 0.1	57 $\times$ 35 $\times$ 10	25 $\times$ 50 $\times$ 25
Camera parameters	512 pixel $\times$ 512 pixel, pixel size of 16 $\mu$ m; 1280 pixel $\times$ 1280 pixel, pixel size of 6.5 $\mu$ m; 15 bit dynamic range	2048 pixel $\times$ 2048 pixel, pixel size of 6.5 $\mu$ m, 16 bit dynamic range	2040 pixel $\times$ 2040 pixel, pixel size of 6.5 $\mu$ m, 16 bit dynamic range
Objective parameters	100 $\times$ , NA 1.46; 100 $\times$ , NA 1.57; 60 $\times$ , NA 1.46	100 $\times$ , NA 1.49; 60 $\times$ , NA 1.27; 40 $\times$ , NA 0.95	60 $\times$ , NA 1.42
Laser wavelength /nm	405, 488, 561, 642	405, 445, 488, 514, 561, 640	405, 488, 561, 640
Resolution	Lateral: 120 nm; axial: 300 nm	Lateral: 115 nm; axial: 269 nm	Lateral: 110 nm; axial: 300 nm

## 5.2 SIM 与其他技术的结合与未来展望

SIM 还可以和其他技术进行关联以实现更多的功能和应用。自适应光学技术可对经由生物组织传播产生的波前畸变进行实时探测和精确校正,被广泛应用于生物显微成像领域<sup>[86]</sup>。在 SIM 技术中,结构光质量直接影响超分辨重建结果,像差的存在会使结构光照明的质量下降。2008 年 Booth 小组采用无波前探测器的优化算法,将变形镜置于去/回程的共同光路中,实现了对小鼠肠样品的自适应光学校正(图 14)<sup>[87]</sup>。2017 年 Zheng 等<sup>[88]</sup>在双光子 SIM 中加入自适应光学技术,对果蝇幼虫脑部实现了近 250  $\mu$ m 的超大深度超分辨成像。

图 14 使用变形镜在 SIM 中校正波前畸变<sup>[87]</sup>Fig. 14 SIM with aberration correction by deformable mirror<sup>[87]</sup>

除此之外,Zhanghao 等<sup>[43]</sup>将 SIM 和偏振探测技术相结合,在得到细胞肌动蛋白超分辨图像信息的同时,提取出样品的极性信息,进而分析相应细胞结构的分子排列(图 15)。Chang 等<sup>[89-90]</sup>结合光片显微镜的轴向层切能力和 SIM 的横向超分辨能力,得到高时空分辨率的三维图像。这一技术相比传统的三维 SIM,可以得到更大的切片深度和更快的成像速度。这些方法扩展了 SIM 系统的功能,为 SIM 的发展提供了新思路。

SIM 作为一类超分辨显微成像技术,突破了传统光学成像中的衍射极限,成为研究活细胞结构的利器。然而,科学的进步是永无止境的,未来,更高分辨率的成像结果和更快的成像速度仍然是 SIM 追求的主要目标。

首先,相较于其他超分辨显微成像技术几十纳米到几个纳米的分辨率,SIM 仅 100 nm 左右的分辨率仍显不足。虽然 Gustafsson 提出可以利用非线性效应进一步提升 SIM 的分辨率,但付出的代价是更高的激光功率或使用特定的荧光标记物<sup>[30]</sup>。其次,由于 SIM 的图像重构本质上是一个病态反问题的求解过程,所以一直以来图像重构过程中容易出现重构伪影<sup>[91]</sup>。尽管许多科学家努力探究 SIM 重构伪影的来源以及如何从原理上消除伪影,但目前 SIM 尤其是商用 SIM 的重构伪影仍然严重。如何提升 SIM 系统的准确性和稳定性将会是未来一

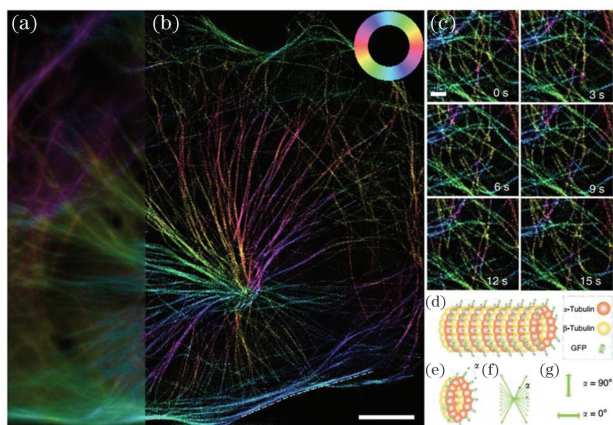


图 15 SIM 结合偏振信息确定蛋白质分子取向<sup>[43]</sup>。U2OS 细胞微管蛋白的 (a) 宽场和 (b) SIM 结果对比, 彩色为偏振方向, 标尺:  $10\ \mu\text{m}$ ; (c) SIM 时间序列展示了微管运动的过程, 标尺:  $1\ \mu\text{m}$ ; (d)–(g) 根据偏振信息建立的模型确定了  $\alpha$ -tubulin 分子取向

Fig. 15 Orientation of protein molecule determined by polarized information and SIM<sup>[43]</sup>. (a) Wide-field and (b) SIM images of microtubulin of U2OS cell. Scale bar:  $10\ \mu\text{m}$ ; (c) time-lapse SIM images showing the dynamic process. Scale bar:  $1\ \mu\text{m}$ ; (d)–(g) orientations of  $\alpha$ -tubulin determined by model based on polarized information

段时间研究 SIM 的重点。通常 SIM 需要利用 9 幅原始图像重构 1 幅超分辨图像, 然而这些原始图像中包含了大量的冗余信息, 虽然早在 2003 年 Heintzmann<sup>[92]</sup>就提出了通过抑制冗余信息来减少原始图像数量的思想, 但重构结果受噪声影响严重, 一直没有好的实验结果<sup>[93]</sup>。目前大多数的高速 SIM 技术都受限于实验硬件的性能, 如果能从原理上提升 SIM 的成像速度, 将会给 SIM 技术带来新的飞跃。

另一方面, 其他学科的进步也会给 SIM 带来新的机遇。荧光显微成像受到荧光蛋白分子性质的制约, 存在光漂白和光毒性问题, 影响生物活细胞的长时间动态观察。新型荧光探针的开发将有利于人们观察到更长时间尺度的细胞生物学活动<sup>[94]</sup>。此外, 深度学习和人工智能有望带给 SIM 更多可能。作为一个新兴的研究方向, 人工智能技术发展迅速。如果能建立原始图像和 SIM 图像之间的输入输出关系, 就可以大大节省图像采集时间和图像重构时间, 同时也可绕过 SIM 难以解决的噪声和重构伪影等问题。这将直接提升传统荧光显微镜的分辨率<sup>[95]</sup>。

光学显微一直是探索微观世界不可或缺的工具。SIM 凭借着低光功率、高时间分辨率和不限荧光染料等优势, 具有很大的应用前景和发展潜能。SIM 技术的不断进步将会在生命科学领域和生物医学领域产生越来越多的贡献。

## 参 考 文 献

- [1] Born M, Wolf E. Principles of optics (7th edition) [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2007: 382-391.
- [2] Abbe E. Contributions to the theory of the microscope and that microscopic perception[J]. Arch Anat Microscop Morphol Expér, 1873, 9: 413-468.
- [3] Berthelot J, Aćimović S S, Juan M L, et al. Three-dimensional manipulation with scanning near-field optical nanotweezers [J]. Nature Nanotechnology, 2014, 9(4): 295-299.
- [4] Reimer L. Transmission electron microscopy: physics of image formation and microanalysis [M]. New York: Springer Press, 2013: 1-2.
- [5] Morita S, Giessibl F J, Meyer E, et al. Noncontact atomic force microscopy [M]. Cham: Springer International Publishing, 2015.
- [6] Huang B, Bates M, Zhuang X W. Super-resolution fluorescence microscopy [J]. Annual Review of Biochemistry, 2009, 78(1): 993-1016.
- [7] Schermelleh L, Heintzmann R, Leonhardt H. A guide to super-resolution fluorescence microscopy [J]. Journal of Cell Biology, 2010, 190(2): 165-175.
- [8] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. Science, 2006, 313 (5793): 1642-1645.
- [9] Hess S T, Girirajan T P K, Mason M D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy [J]. Biophysical Journal, 2006, 91(11): 4258-4272.
- [10] Shroff H, Galbraith C G, Galbraith J A, et al. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics [J]. Nature Methods, 2008, 5(5): 417-423.
- [11] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. Nature Methods, 2006, 3 (10): 793-796.
- [12] Bates M, Huang B, Dempsey G T, et al. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes [J]. Science, 2007, 317 (5845):

- 1749-1753.
- [13] Huang B, Wang W, Bates M, et al. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy[J]. *Science*, 2008, 319(5864): 810-813.
- [14] Sengupta P, van Engelenburg S B, Lippincott-Schwartz J. Superresolution imaging of biological systems using photoactivated localization microscopy [J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(6): 3189-3202.
- [15] 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.
- [16] Klar T A, Jakobs S, Dyba M, et al. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission[J]. *PNAS*, 2000, 97(15): 8206-8210.
- [17] Arroyo-Camejo S, Adam M P, Besbes M, et al. Stimulated emission depletion microscopy resolves individual nitrogen vacancy centers in diamond nanocrystals[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(12): 10912-10919.
- [18] Li M Q, Li Y N, Liu W H, et al. Structured illumination microscopy using digital micro-mirror device and coherent light source[J]. *Applied Physics Letters*, 2020, 116: 233702.
- [19] Gustafsson M G L, Agard D A, Sedat J W. Doubling the lateral resolution of wide-field fluorescence microscopy using structured illumination [J]. *Proceedings of SPIE*, 2000, 3919: 141-150.
- [20] Hirano Y, Matsuda A, Hiraoka Y. Recent advancements in structured-illumination microscopy toward live-cell imaging[J]. *Microscopy*, 2015, 64(4): 237-249.
- [21] Balzarotti F, Eilers Y, Gwosch K C, et al. Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes[J]. *Science*, 2017, 355(6325): 606-612.
- [22] Ouyang W, Aristov A, Lelek M, et al. Deep learning massively accelerates super-resolution localization microscopy [J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(5): 460-468.
- [23] Zhang Y W, Lang S, Wang H W, et al. Super-resolution algorithm based on Richardson-Lucy deconvolution for three-dimensional structured illumination microscopy[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2019, 36(2): 173-178.
- [24] Christiansen E M, Yang S J, Ando D M, et al. In silico labeling: predicting fluorescent labels in unlabeled images[J]. *Cell*, 2018, 173(3): 792-803.
- [25] Chen F, Tillberg P W, Boyden E S. Expansion microscopy[J]. *Science*, 2015, 347(6221): 543-548.
- [26] Zhang X, Chen X Z, Zeng Z P, et al. Development of a reversibly switchable fluorescent protein for super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI) [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(3): 2659-2667.
- [27] Neil M A A, Juškaitis R, Wilson T. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope [J]. *Optics Letters*, 1997, 22(24): 1905-1907.
- [28] Heintzmann R, Cremer C G. Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating[J]. *Proceedings of SPIE*, 1999, 3568: 185-196.
- [29] Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. SHORT COMMUNICATION [J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 198(2): 82-87.
- [30] Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution[J]. *PNAS*, 2005, 102(37): 13081-13086.
- [31] James B P. *Handbook of biological confocal microscopy*[M]. New York: Springer Science & Business Media, 2006: 1-17.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] Müller C B, Enderlein J. Image scanning microscopy [J]. *Physical Review Letters*, 2010, 104(19): 198101.
- [35] 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.
- [36] Fiolka R, Shao L, Rego E H, et al. Time-lapse two-color 3D imaging of live cells with doubled resolution using structured illumination[J]. *PNAS*, 2012, 109(14): 5311-5315.
- [37] Brunstein M, Wicker K, Hérault K, et al. Full-field dual-color 100-nm super-resolution imaging reveals

- organization and dynamics of mitochondrial and ER networks[J]. *Optics Express*, 2013, 21(22): 26162-26173.
- [38] Förster R, Lu-Walther H W, Jost A, et al. Simple structured illumination microscope setup with high acquisition speed by using a spatial light modulator [J]. *Optics Express*, 2014, 22(17): 20663-20677.
- [39] Li D, Shao L, Chen B C, et al. Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics [J]. *Science*, 2015, 349(6251): aab3500.
- [40] Müller M, Mönkemöller V, Hennig S, et al. Open-source image reconstruction of super-resolution structured illumination microscopy data in ImageJ [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10980.
- [41] Demmerle J, Innocent C, North A J, et al. Strategic and practical guidelines for successful structured illumination microscopy[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(5): 988-1010.
- [42] 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.
- [43] Zhanghao K, Chen X Y, Liu W H, et al. Super-resolution imaging of fluorescent dipoles via polarized structured illumination microscopy [J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4694.
- [44] Masters B R. *Structured illumination microscopy [M]//Springer Series in Optical Sciences*. Cham: Springer International Publishing, 2020: 233-260.
- [45] Shroff S A, Fienup J R, Williams D R. Lateral superresolution using a posteriori phase shift estimation for a moving object: experimental results [J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2010, 27(8): 1770-1782.
- [46] Richter V, Piper M, Wagner M, et al. Increasing resolution in live cell microscopy by structured illumination (SIM) [J]. *Applied Sciences*, 2019, 9(6): 1188-1210.
- [47] Lal A, Shan C Y, Xi P. Structured illumination microscopy image reconstruction algorithm[J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2016, 22(4): 50-63.
- [48] Qian J, Dang S P, Zhou X, et al. Fast structured illumination three-dimensional color microscopic imaging method based on Hilbert-transform[J]. *Acta Physica Sinica*, 2020, 69(12): 128701.
- 千佳, 党诗沛, 周兴, 等. 基于希尔伯特变换的结构光照明快速三维彩色显微成像方法[J]. *物理学报*, 2020, 69(12): 128701.
- [49] Dan D, Lei M, Yao B L, et al. DMD-based LED-illumination super-resolution and optical sectioning microscopy[J]. *scientific Reports*, 2013, 3: 1116.
- [50] Qian J, Dang S P, Wang Z J, et al. Large-scale 3D imaging of insects with natural color [J]. *Optics Express*, 2019, 27(4): 4845-4857.
- [51] Chen Y H, Cao R Z, Liu W J, et al. Widefield and total internal reflection fluorescent structured illumination microscopy with scanning galvo mirrors [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2018, 23(4): 1-9.
- [52] Liu W J, Liu Q L, Zhang Z M, et al. Three-dimensional super-resolution imaging of live whole cells using galvanometer-based structured illumination microscopy[J]. *Optics Express*, 2019, 27(5): 7237-7248.
- [53] Fiolka R, Beck M, Stemmer A. Structured illumination in total internal reflection fluorescence microscopy using a spatial light modulator[J]. *Optics Letters*, 2008, 33(14): 16291631.
- [54] Wicker K. Non-iterative determination of pattern phase in structured illumination microscopy using auto-correlations in Fourier space [J]. *Optics Express*, 2013, 21(21): 24692-24701.
- [55] Chang B J, Chou L J, Chang Y C, et al. Isotropic image in structured illumination microscopy patterned with a spatial light modulator[J]. *Optics Express*, 2009, 17(17): 14710-14721.
- [56] Lu-Walther H W, Kielhorn M, Förster R, et al. FastSIM: a practical implementation of fast structured illumination microscopy[J]. *Methods and Applications in Fluorescence*, 2015, 3(1): 014001.
- [57] Descloux A, Müller M, Navikas V, et al. High-speed multiplane structured illumination microscopy of living cells using an image-splitting prism [J]. *Nanophotonics*, 2019, 9(1): 143-148.
- [58] Suzuki T, Kajimoto S, Kitamura N, et al. A millisecond structured illumination microscope for super-resolution live cell imaging [J]. *Applied Physics Express*, 2020, 13(4): 045002.
- [59] Martínez-García A, Moreno I, Sánchez-López M M, et al. Operational modes of a ferroelectric LCoS modulator for displaying binary polarization, amplitude, and phase diffraction gratings [J]. *Applied Optics*, 2009, 48(15): 2903-2914.
- [60] O'Holleran K, Shaw M. Polarization effects on



- contrast in structured illumination microscopy [J]. *Optics Letters*, 2012, 37(22): 4603-4605.
- [61] Zhao T Y, Zhou X, Dan D, et al. Polarization control methods in structured illumination microscopy [J]. *Acta Physica Sinica*, 2017, 66(14): 148704.  
赵天宇, 周兴, 但旦, 等. 结构光照明显微中的偏振控制[J]. *物理学报*, 2017, 66(14): 148704.
- [62] 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.
- [63] Shroff S A, Fienup J R, Williams D R. Phase-shift estimation in sinusoidally illuminated images for lateral superresolution [J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2009, 26(2): 413-424.
- [64] Wicker K, Mandula O, Best G, et al. Phase optimisation for structured illumination microscopy [J]. *Optics Express*, 2013, 21(2): 2032-2049.
- [65] Zhou X, Lei M, Dan D, et al. Image recombination transform algorithm for superresolution structured illumination microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2016, 21(9): 096009.
- [66] Chakrova N, Rieger B, Stallinga S. Deconvolution methods for structured illumination microscopy [J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2016, 33(7): B12-B20.
- [67] 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.
- [68] Sarder P, Nehorai A. Deconvolution methods for 3-D fluorescence microscopy images [J]. *IEEE Signal Processing Magazine*, 2006, 23(3): 32-45.
- [69] Wallace W, Schaefer L H, Swedlow J R. A workingperson's guide to deconvolution in light microscopy [J]. *BioTechniques*, 2001, 31(5): 1076-1097.
- [70] 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.
- [71] 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: 37149-37150.
- [72] 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.
- [73] Song L Y, Lu-Walther H W, Förster R, et al. Fast structured illumination microscopy using rolling shutter cameras [J]. *Measurement Science and Technology*, 2016, 27(5): 055401.
- [74] 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.
- [75] Turcotte R, Liang Y J, Tanimoto M, et al. Dynamic super-resolution structured illumination imaging in the living brain [J]. *PNAS*, 2019, 116(19): 9586-9591.
- [76] Vavrdová T, Šamajová O, Křenek P, et al. Multicolour three dimensional structured illumination microscopy of immunolabeled plant microtubules and associated proteins [J]. *Plant Methods*, 2019, 15: 22-33.
- [77] Kashiwagi Y, Higashi T, Obashi K, et al. Computational geometry analysis of dendritic spines by structured illumination microscopy [J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1285.
- [78] Phillips J K, Sherman S A, Cotton K Y, et al. Characterization of neurite dystrophy after trauma by high speed structured illumination microscopy and lattice light sheet microscopy [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2019, 312: 154-161.
- [79] Fumagalli S, Fiordaliso F, Perego C, et al. The phagocytic state of brain myeloid cells after ischemia revealed by superresolution structured illumination microscopy [J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2019, 16: 9.
- [80] Bonin K, Smelser A, Salvador Moreno N, et al. Structured illumination reveals reduced chromatin cohesion in cells with DNA damage [J]. *Biophysical Journal*, 2019, 116(3): 283-290.
- [81] Chen Q X, Shao X T, Hao M G, et al. Quantitative analysis of interactive behavior of mitochondria and lysosomes using structured illumination microscopy [J]. *Biomaterials*, 2020, 250: 120059.
- [82] Shao X T, Chen Q X, Ling P X, et al. Drug screening and discovery strategies at nanoscale morphology using structured illumination microscopy [J]. *Biophysical Journal*, 2019, 116(3): 267a.
- [83] ZEISS. Elyra 7 with lattice SIM [EB/OL]. (2019-07-24) [2020-08-04]. <https://www.zeiss.com/>

- microscopy/us/products/elyra-7-with-lattice-sim-for-fast-and-gentle-3d-superresolution-microscopy. html # downloads.
- [84] Nikon. N-SIM S[EB/OL]. (2020-01-22) [2020-08-04]. <https://www.nikon.com/products/microscope-solutions/lineup/s-resolution/nsim/>.
- [85] GE. Super resolution microscopy[EB/OL]. (2020-02-29) [2020-08-04]. <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/solutions/cellular-analysis/products-and-technology/microscopy/super-resolution>.
- [86] Zhang C H, Zhao Z W, Chen L Y, et al. Application of adaptive optics in biological fluorescent microscopy [J]. *Scientia Sinica (Physica, Mechanica & Astronomica)*, 2017, 47(8): 26-39.  
张财华, 赵志伟, 陈良怡, 等. 自适应光学在生物荧光显微成像技术中的应用[J]. *中国科学:物理学 力学 天文学*, 2017, 47(8): 26-39.
- [87] Débarre D, Botcherby E J, Booth M J, et al. Adaptive optics for structured illumination microscopy [J]. *Optics Express*, 2008, 16(13): 9290-9305.
- [88] Zheng W, Wu Y C, Winter P, et al. Adaptive optics improves multiphoton super-resolution imaging [J]. *Nature Methods*, 2017, 14(9): 869-872.
- [89] Chang B J, Tang W C, Liu Y T, et al. Two-beam interference lattice lightsheet for structured illumination microscopy [J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2020, 53(4): 044005.
- [90] Liu Y, Dale S, Ball R, et al. Imaging neural events in zebrafish larvae with linear structured illumination light sheet fluorescence microscopy [J]. *Neurophotonics*, 2019, 6(1): 015009.
- [91] Schaefer L H, Schuster D, Schaffer J. Structured illumination microscopy: artefact analysis and reduction utilizing a parameter optimization approach [J]. *Journal of Microscopy*, 2004, 216(2): 165-174.
- [92] Heintzmann R. Saturated patterned excitation microscopy with two-dimensional excitation patterns [J]. *Micron*, 2003, 34(6/7): 283-291.
- [93] Meng F F, Du L P, Yang A P, et al. Low-loss metal-dielectric waveguide mode enabled structured illumination microscopy with  $0.18\lambda_0$  resolution [J]. *Optics Express*, 2019, 27(6): 9250-9257.
- [94] Dang D, Zhang H, Xu Y, et al. Super-resolution visualization of self-assembling helical fibers using aggregation-induced emission luminogens in stimulated emission depletion nanoscopy [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(10): 11863-11873.
- [95] Wang H D, Rivenson Y, Jin Y Y, et al. Deep learning enables cross-modality super-resolution in fluorescence microscopy [J]. *Nature Methods*, 2019, 16(1): 103-110.