

基于量子关联的超分辨荧光显微技术研究进展

李文文^{1,2}, 王中阳^{1*}

¹ 中国科学院上海高等研究院基础交叉研究中心, 上海 201210;

² 中国科学院大学微电子学院, 北京 100049

摘要 超分辨荧光显微技术一直是研究热点, 各种超分辨荧光成像技术的出现打破了光学衍射极限, 将空间分辨率提高到纳米尺度。但随着时间、空间分辨率要求的不断提高, 目前超分辨荧光显微技术仍然面临着空间分辨率、时间分辨率和视场存在三角制约关系及探测灵敏度较低的问题。随着近年来基于量子关联的新型成像机制的发展, 基于荧光量子特性与量子关联成像的超分辨荧光显微镜应运而生, 新成像模式及新物理量的引入不仅增加了信息量也提高了图像信息获取的效率, 为超分辨荧光显微技术的研究提供了新思路。介绍了目前超分辨荧光显微镜的技术原理、优缺点与面临的主要技术问题, 以及基于量子关联的新型超分辨荧光显微镜, 并探讨了未来超分辨荧光显微镜的发展方向, 以期为该领域的科学研究提供参考。

关键词 成像系统; 荧光显微镜; 超分辨显微镜; 量子关联; 探测灵敏度; 时间分辨率

中图分类号 O436

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202158.1011012

Research Progress of Super-Resolution Fluorescence Microscopy Based on Quantum Correlation

Li Wenwen^{1,2}, Wang Zhongyang^{1*}

¹ Center for Fundamental Interdisciplinary Research, Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China;

² School of Microelectronics, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract Super-resolution fluorescence microscopy has always been a hot research field. The emergence of various super-resolution fluorescence imaging techniques has broken the optical diffraction limit and improved the spatial resolution to nanoscale. However, for higher requirements on temporal and spatial resolution, the current super-resolution fluorescence microscopes still face two problems of the triangular constraint relation of spatial resolution, temporal resolution and field of view, and low detection sensitivity. However, with the recent development of the new imaging mechanism based on quantum correlation, the super-resolution fluorescence microscopes based on fluorescence quantum property and quantum correlation imaging have been developed. The introduction of new imaging modes and new physical quantities not only increases the amount of information but also improves the efficiency of image information acquisition. A new research route for the development of super-resolution fluorescence microscopy is provide. This review introduces the technological principle, advantages and disadvantages of the current super-resolution fluorescence microscopes as well as the main technical problems faced by them. Some new super-resolution fluorescence microscopes based on quantum correlation are introduced and the future development direction of super-resolution fluorescence microscopy is discussed. It is expected that this review can provide some references for the researches in this field.

Key words imaging systems; fluorescence microscope; super-resolution microscope; quantum correlation; detection sensitivity; temporal resolution

收稿日期: 2021-04-03; 修回日期: 2021-04-16; 录用日期: 2021-04-023

* E-mail: wangzy@sari.ac.cn

1 引言

荧光显微成像技术具有无损、非接触、高特异性、高灵敏和高活体友好等突出优势,能够提供功能信息动态成像,成为生物活体和活细胞成像的首选。1873 年,Abbe 等^[1]最早提出了衍射极限,远场光学显微镜可达到的分辨率被限制在可见光波长的一半左右(200~300 nm)。然而,亚细胞结构内的各种细胞器及蛋白的空间尺寸通常在衍射极限以下,光学衍射极限的存在极大阻碍了光学显微镜在纳米尺度以下生命活动研究方面的应用。

目前,各种超分辨光学成像技术^[2-5]不断涌现,打破了光学衍射极限,将光学分辨率提高到纳米尺度。超分辨荧光显微成像技术主要分为三大类:第一类是受激辐射损耗(STED)技术^[6]、衍生的基态损耗(GSD)^[7]及可逆转换线性跃迁成像(RESOLFT)技术^[8];第二类是结构光照明显微(SIM)技术^[9];第三类是光激活定位超分辨成像(PALM)技术^[10]和随机光学重构超分辨成像(STORM)技术^[11]。此外,融合 STED 和 STORM 技术发展起来的最小光子流(MINIFLUX)技术以及基于干涉定位成像技术的新型单分子干涉定位显微(ROSE)技术,将分辨率提高到 1 nm^[12-13],这为纳米尺度的细胞器观察提供了强而有力的工具。

超分辨荧光显微镜使得光学成像技术的空间分辨率有了很大提升。然而,细胞内生命活动的观察对超分辨荧光显微镜提出了更小、更快、更广的要求:需要实现细胞内各种细胞器空间尺寸(从纳米到微米)的分辨,具备分辨细胞内细胞器生命活动和相互作用的动态时间尺度,可大范围观察不同细胞器和不同细胞之间的作用。

本文对超分辨荧光显微领域的相关研究和进展进行了论述,阐述了目前超分辨荧光显微技术在追求空间分辨率和时间分辨率过程中面临的挑战,并介绍了一些解决方案和思路。首先简述了目前超分辨荧光显微镜的技术原理,并分析了面临的主要技术问题(第 2 节);随后从提高探测灵敏度和改变成像模式的角度,介绍了基于量子关联的新型超分辨荧光显微镜的进展,包括基于荧光反聚束特性的超分辨荧光显微镜(第 3 节)和基于关联成像的超分辨荧光显微镜(第 4 节);最后对未来超分辨荧光显微镜的发展趋势进行了展望。

2 目前超分辨荧光显微镜面临的主要技术问题

本节简要回顾了三种广泛使用的超分辨率显微技术突破衍射极限的原理以及它们的优缺点,并分析了当前面临的两大关键技术难点。

2.1 突破光学衍射极限

2.1.1 空间分辨率

对于传统荧光显微镜,探测的像 I 可以由物体 f 与点扩散函数(PSF) h 的卷积^[5,14]获得:

$$I(x') = \int h(x' - Mx)f(x)dx, \quad (1)$$

式中: x 和 x' 分别是物面和探测面上的坐标; M 是成像系统的放大倍率。当 $f(x)$ 是脉冲函数时,探测到的像是物面上的一个点源通过透镜放大光学系统在像面上形成的光斑,即点扩散函数 $h(x') = I(x')$ 。通常 PSF 的半峰全宽(FWHM)可以近似为显微镜最小空间分辨率 $\Delta x = \lambda/2NA$ (阿贝衍射极限^[1]),其中 λ 是光源发射波长, NA 是物镜的数值孔径。

2.1.2 STED 技术

STED 技术不同于宽场均匀照亮样品的方式,它是通过基于荧光共聚焦显微镜的点扫描方式对样品成像。其中,共聚焦显微镜采用一个衍射受限的光点照亮样品,这个区域内激发的信号经过成像系统放大和小孔滤波后被一个点探测器收集,最后通过点扫描获得完整的图像^[15]。因此,探测的像 $I(x')$ 为

$$I(x') = \int h_1(x' - Mx)f(x)h_2(x' - Mx)dx, \quad (2)$$

式中: h_1 和 h_2 为探测的点扩散函数。可以明显看出,由于 h_1h_2 的作用,最终像的有效 PSF 变窄,因此共聚焦显微镜的成像分辨率相比传统显微镜提高了 $\sqrt{2}$ 倍。然而,对于这种点对点的点扫描方式,虽然能在小视场情况下采用高速电光扫描进行快速实时成像,但大视场和时间分辨率是一对天然的矛盾。

STED 技术在共焦焦点扫描成像的基础上,采用激发光束(实心光束)和抑制光束(空心光束)两束激光共同照明荧光样品,在环形光下实心光斑外围的荧光分子的受激辐射损耗抑制了荧光发射,仅有中心区域(远小于衍射极限)的荧光通过显微光学系统和小孔滤波后聚集到点探测器上,从而通过点扫

描样品实现超分辨成像,如图 1 所示。空间分辨率取决于环形光与实心光强的比值^[16],表示为

$$\Delta x_{\text{STED}} = \frac{\Delta x}{\sqrt{1 + C_0 \frac{I_0}{I_1}}}, \quad (3)$$

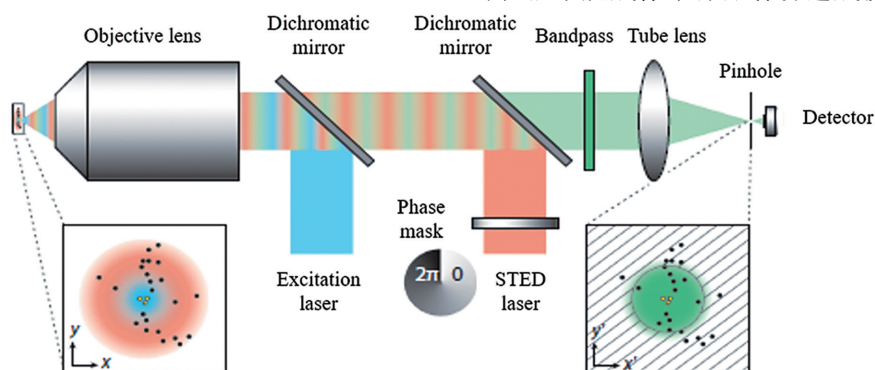


图 1 STED 技术原理图^[5]

Fig. 1 Principle diagram of STED technology^[5]

2.1.3 STORM 技术

STORM 技术在宽场成像模式下利用荧光随机开关的性质实现了超分辨成像^[11]。根据染料分子的不同,可以利用不同波长激光(激发光与开关光)激发或单波长的直接激发(dSTORM),实现荧光分子在荧光态和暗态之间的转换,使得每次只有少量荧光染料分子被随机地激发;再通过单分子拟合 PSF,对荧光分子的中心点进行定位,循环该过程,进而定位出所有的荧光分子,如图 2 所示。根据单个荧光分子 PSF 的高斯统计模型,可求得定位精度,即 STORM 的分辨率^[17]为

$$\Delta x_{\text{STORM}} = \frac{\sigma_h}{\sqrt{N'}}, \quad (4)$$

式中: σ_h 为 PSF 的标准差; N' 为探测到的光子数。

式中: C_0 为常数; I_0 为环形光光强; I_1 为实心光的光强。由(3)式可以看出,STED 的高空间分辨率依赖于高损耗光强 I_0 ,一般能达到 50~70 nm。但所需的峰值功率密度在 $10^7 \sim 10^9 \text{ W}/\mu\text{m}^2$ 量级,这使得在活细胞成像中样品容易造成损害,导致光毒性。

根据(4)式可知,随着光子数的不断增加,STORM 技术可以实现很高的空间分辨率,通常在 20 nm 左右。但由于单帧图像采样只确定点扩散函数内一个荧光点的位置,单帧激发的荧光染料分子的密度很低,为 $0.5 \sim 0.8 \mu\text{m}^{-2}$,因此重构一张超分辨像通常需要采样几千帧到上万帧的图像,时间分辨率很低。为了解决这一问题,研究人员采用最新的压缩感知^[18]和深度学习^[19]重构算法,将荧光分子的定位密度提高到 $8 \mu\text{m}^{-2}$,从而采样帧数降低到几百帧至几千帧。但由于较长的计算时间,实现一张超分辨图像仍需要几秒钟到几分钟的时间,无法满足细胞内部亚秒和秒量级动态行为的观察要求,且长的采样时间会导致荧光的光漂白与光毒性。

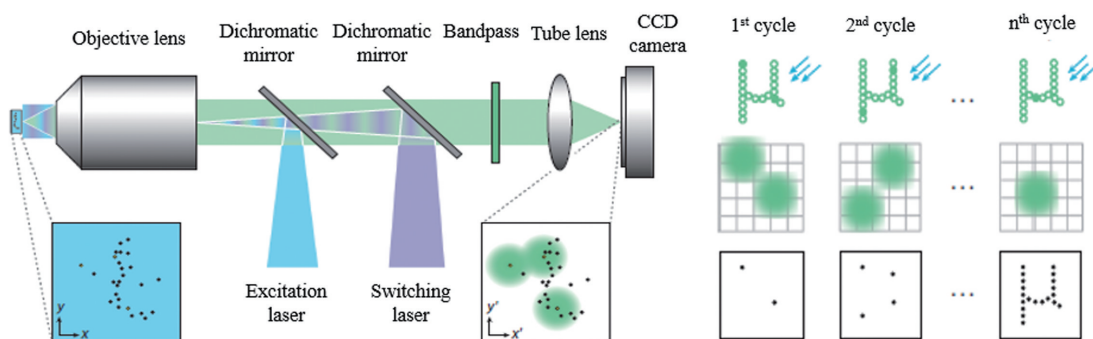


图 2 STORM 技术原理图^[5]。(a) STORM 成像原理图;(b) STORM 成像过程图

Fig. 2 Principle diagram of STORM technology^[5]. (a) Principle diagram of STORM imaging; (b) process image of STORM imaging

2.1.4 SIM 技术

SIM 技术在宽场荧光显微镜成像模式下,采用

结构光照明来增加频率信息,从而实现超分辨成像^[9],如图 3 所示。结构光的光强正比于 $1 +$

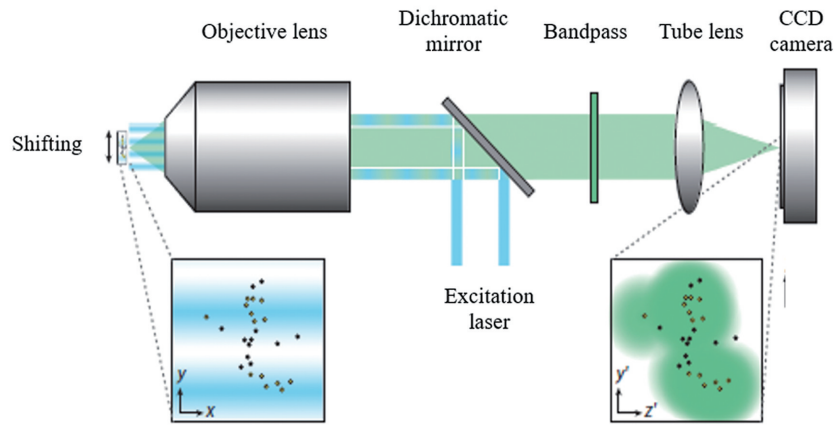


图 3 SIM 技术原理图^[5]

Fig. 3 Principle diagram of SIM technology^[5]

$\cos(\langle p, \mathbf{x} \rangle + \varphi) = 1 + [\exp(i\langle p, \mathbf{x} \rangle + i\varphi) + \exp(-i\langle p, \mathbf{x} \rangle - i\varphi)]$, 其中 p 是结构光的空间频率, φ 是相位, $\langle \cdot \rangle$ 表示系综平均。则成像关系为

$$I(\mathbf{x}') = \int [1 + \cos(\langle p, \mathbf{x} \rangle + \varphi)] f(\mathbf{x}) h(\mathbf{x}' - M\mathbf{x}) d\mathbf{x} \quad (5)$$

可以从空间频率信息来理解其超分辨的能力, 通过对(5)式进行傅里叶变换, 可得

$$\mathcal{F}(I)(k/M) = \mathcal{F}(h)(k/M) \left[\frac{1}{2} \exp(i\varphi) \mathcal{F}(f)(k - p) + \mathcal{F}(f)(k) + \frac{1}{2} \exp(-i\varphi) \mathcal{F}(f)(k + p) \right], \quad (6)$$

式中: $\mathcal{F}(\cdot)$ 为傅里叶变换; k 为物体的空间频率信息。由(6)式可知, 结构光照明使得成像系统收集到的物体频谱信息除了包含原本的频谱 $\mathcal{F}(f)(k)$ 外, 还包含 p 偏移导致的超出截止频率的高频信息部分。因此频谱范围可以拓展至 $[-k_0 - p, k_0 + p]$ (k_0 为成像系统的截止频率)。但是结构光的空间频率 p 也受限于光学系统, 即 $p \leq k_0$ 。因此, 增加的最大频谱范围为 $[-2k_0, 2k_0]$, 即成像分辨率提高了 2 倍。但频率信息增加的受限导致空间分辨率在 100 nm 左右。虽然 SIM 技术受空间分辨率的限制, 但在时间分辨率、视场和光照强度三个指标上具有一定优势, 其在活细胞成像上得到了广泛的应用。

2.2 目前面临的两大技术问题

超分辨荧光成像技术利用荧光的光物理特性(受激辐射损耗或随机开关)以及调制照明(点扫描或结构光照明)方式, 空间分辨率有了很大的提升, 但由于采用的是传统的成像方式, 即基于衍射受限 PSF 的点对点的成像模式, 该技术在空间分辨率、时间分辨率和视场上仍然受到限制。STED 技术中点对点的点扫描成像方式限制了视场和时间分辨

率; STORM 技术中单帧图像采样只确定 PSF 内一个荧光点的位置, 点对点的成像方式限制了 STORM 成像的时间分辨率。SIM 技术虽然通过空间频率调制增加了频谱信息, 但频谱信息增加的受限导致空间分辨率被限制在 100 nm 左右。成像过程是一个图像信息的获取过程, 点对点的成像方式等同于低效率的单一信道编码的信息传递方式, 这种成像方式造成荧光超分辨图像信息存在大量冗余, 如荧光点被采样了多次, 动态过程中邻近时刻图像之间存在局部关联性或重复性等。因此传统的点对点成像方式导致空间分辨率、时间分辨率和视场存在三角制约关系, 从而降低了图像信息获取的效率。

此外, 超分辨荧光显微镜需要一定的光子剂量来实现高质量的成像, 这会造成活细胞成像中样品受损, 导致光漂白和光毒性^[20], 而低光子剂量就需要高的探测灵敏度。目前, 宽场成像显微镜主要采用电子倍增型数字探测器(EMCCD)或科研级数字探测器(sCMOS)等高灵敏度的探测器, 虽然量子效率可以高于 95%, 但仍然存在的散粒噪声和热噪声降低了探测灵敏度。

3 基于荧光量子特性的超分辨荧光显微镜的发展

为了解决超分辨成像面临的空间分辨率、时间分辨率和视场存在三角制约关系及探测灵敏度较低的问题,需要成像系统能够挖掘并利用尽可能多的信息。对于传统的显微成像方法,激发和荧光探测过程都是经典的,因此实现超分辨成像的方法也就局限在利用荧光的光物理性质和光强测量上。量子信息和量子光学的发展为我们提供了成熟的非经典光源和量子探测技术。在成像过程中利用非经典光源和量子关联方式,就可以获得更多的图像信息。本节首先简述利用非经典光源来提高成像空间分辨率与探测灵敏度的方法,然后介绍荧光的量子特性以及基于荧光反聚束特性的超分辨荧光显微镜。

3.1 利用量子特性突破经典成像的局限

根据量子光学,所有表示为相干态的统计混合态的光源可以被定义为经典光源,密度算符^[21-24]可表示为

$$\hat{\rho} = \iint d^2\beta P(\beta) |\beta\rangle\langle\beta|, P(\beta) \geq 0, \quad (7)$$

式中:相干态 $|\beta\rangle = \exp(|\beta|^2/2) \sum_{n=0}^{\infty} (\beta^n / \sqrt{n!}) |n\rangle$,其中 n 是光子数, β 是相干态的本征值; $P(\beta)$ 是相干态的概率分布。根据(7)式可知,经典光源的光场涨落概率分布 $P(n)$ 服从泊松(或超泊松)分布,即光子数的方差 $\langle\Delta^2\hat{n}\rangle$ 等于(或大于)均值 $\langle\hat{n}\rangle$ 。相反,非经典光源则服从亚泊松分布^[9],即 $\langle\Delta^2\hat{n}\rangle < \langle\hat{n}\rangle$ 。因此,根据光场的统计性质,可以将光源具体分为三类。

1) 泊松光:相干光场,最常见的是连续的激光,其量子态为相干态,根据(7)式可求得光子服从泊松分布 $P(n) = |\langle\hat{n}|\beta\rangle|^2 = \exp(-\langle\hat{n}\rangle) \langle\hat{n}\rangle^n / n!$ 。

2) 超泊松光:热光场,如白炽灯、自然光,其量子态为相干态的混合态,光子数分布为玻色-爱因斯坦分布,服从超泊松分布 $P(n) = \langle\hat{n}\rangle^n / (1 + \langle\hat{n}\rangle)^{n+1}$ 。

3) 亚泊松光:非经典光场,如 Fock 态、纠缠态、压缩态以及反聚束单光子源等。

非经典光源为光学高精度测量提供了很多方案,在量子光刻、量子关联成像、远程探测和测距等领域都表现出了一定的优势,对基础物理学、生物医学等领域都产生了一定的影响。现有研究表明,利用光源的量子特性及量子关联测量所获得的额外信息,可以突破许多经典成像的局限^[24-25],例如空间分

辨率极限^[26-28]和探测灵敏度极限^[29-33]。

3.1.1 空间分辨率极限

目前,超分辨荧光显微镜主要是基于经典光源,利用光的波动性而非量子特性。2004 年, Muthukrishnan 等^[34]提出了基于多光子态干涉的量子显微镜的概念,发现 N_1 个多模原子阵列的二阶干涉测量可实现亚衍射极限的分辨率,与经典光学不同的是,这里的二阶干涉现象是由光子与光子之间的关联引起的。2009 年, Giovannetti 等^[27]理论证明了利用适当的光源和 N_1 光子复合探测可以实现两种分辨率的提高:一个是基于经典过程,统计物体上同一点发出的 N_1 个光子平均到达的位置,可以实现经典理论下的量子极限(标准量子极限),即分辨率为 $1/\sqrt{N_1}$;另一个是基于量子过程,利用纠缠 N_1 光子态的 N_1 阶关联测量,可超越量子极限,实现衍射极限的 $1/N_1$ 增强,即海森堡极限。但由于理论模型中的光源和探测所需的多光子吸收材料等很难实现,这类量子成像在实验上还没有得到验证。

3.1.2 探测灵敏度极限

探测灵敏度是光学成像仪器很重要的评价指标,影响探测灵敏度的噪声主要有两类:热噪声和散粒噪声。热噪声是热对电荷载流子的激励产生的,而散粒噪声是光电子或光生载流子的随机产生引起的,在绝对零度时,热噪声可被忽略,散粒噪声依然存在,这是由量子力学测不准原理决定的。在经典成像理论中,探测灵敏度的下限被定义为相干态的泊松统计达到极限时散粒噪声的标准差,即散粒噪声极限(SNL, U_{SNL}), $U_{\text{SNL}} \sim \langle N_p \rangle^{-1/2}$,其中 $\langle N_p \rangle$ 是探测的平均光子数^[24,35-36]。对于其他经典光场(如热光),方差更大(超泊松统计)。

目前已有研究表明,利用非经典光子关联测量,可以突破基于经典光的量子散粒噪声极限,实现亚散粒噪声极限测量(sub-SNL)^[29-33];在吸收宽场成像显微镜上,实验验证了探测灵敏度能够降低至量子散粒噪声水平的 80%。该方法利用参量下转换获得的纠缠双光束,一束用来照射物体,另一束用作噪声,再结合差分方法从成像中移除噪声,提高了探测灵敏度^[31]。还有研究报道,探测灵敏度可以降低至量子散粒噪声水平的 50% 以下^[32]。

因此,利用量子态性质实现的量子成像可以克服许多经典成像的局限,但大多数研究还在理论验证阶段,主要是由于成像所要求的量子光源在实验上很难获得。下面将介绍实验上可获得的并具有一

量子特性的荧光光源,以及基于量子特性的超分辨荧光显微成像。

3.2 荧光的量子特性

单光子源是同一时刻只产生一个光子的光源,主要表现为反聚束特性,是一个典型的非经典光源。理论上单个可以发光的二能级系统就是一个单光子源,因为单个能级只能在荧光寿命期间从激发态跃迁到基态并发出一个光子。该系统是荧光的基本发光单元^[37-40],例如单个离子^[41]、单个原子^[42]、单个量子点^[43-46]、单个分子^[46-50]以及单个缺陷^[51-52],都是实验上可以实现单光子源的候选者。

评判单光子源性能的指标之一是单光子性,可通过 HBT (Hanbury-Brown and Twiss) 干涉实验来评判^[53]。实验如图 4(a) 所示,通过分光镜将荧光分为两路,用两个探测器探测不同延时的复合计数以获得光子的二阶关联函数:

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle \hat{a}^+ \hat{a}^+(\tau) \hat{a}(\tau) \hat{a} \rangle}{\langle \hat{a}^+ \hat{a} \rangle^2}, \quad (8)$$

式中: $g^{(2)}(\tau)$ 表示在 τ 时间间隔内探测到光子的概率; \hat{a}^+ 和 \hat{a} 分别表示光子产生算符与湮灭算符。由于单光子源在同一时刻不会出现两个光子,因此零延时的二阶关联函数 $g^{(2)}(0) < 1/2$ 时可以认为是单光子源,理想情况下等于 0;对于相干光,有 $g^{(2)}(0) = 1$;对于热光,有 $g^{(2)}(0) > 1$,理想情况下等于 2。由于测量误差与探测器暗计数干扰,实验上测量的 $g^{(2)}(0)$ 通常比真实值大。实验上已证明了一些常用在荧光显微成像中的染料分子和量子点的单光子性,如金刚石氮空穴(Nitrogen Vacancy, NV)色心的单光子性为 0.16 ^[52],CdSe/CdS/ZnS胶

体量子点的单光子性为 0.08 ^[45],三萘嵌二苯酰亚胺(Terrylenediimide, TDI)的单光子性为 0.4 ^[50],罗丹明 B(Rhodamine B)的单光子性为 0.46 ^[46]。

第二个评判单光子源的实验是 Hong-Ou-Mandel (HOM) 干涉^[54],用于测量光子的全同性,即单光子源不同时间发出的两个光子或两个相同单光子源发出的两个光子的不可区分性。实验同样使用分光镜将两束荧光分为两路,用两个探测器探测不同延时的复合计数以测量二阶关联函数,如图 4(b) 所示。只有当光子(或者更准确地说,光子的路径)无法区分时,量子干涉才会发生,光子总是从束器的同一边出去,没有任何复合计数,此时 $g^{(2)}(0)$ 处产生凹陷。如果两个光子可以被识别并区分,则干涉现象消失。在实验上,通过分别测量光子的全同(平行偏振) $g_{\parallel}^{(2)}(0)$ 和非全同(正交偏振) $g_{\perp}^{(2)}(0)$,获得 HOM 干涉对比度 $V = 1 - g_{\parallel}^{(2)}(0)/g_{\perp}^{(2)}(0)$,并将其作为光子全同性的评判指标。理想的 HOM 干涉要求光子满足傅里叶限制条件 $\tau_c = \tau_{sp}$ (τ_c 是光子相干时间, τ_{sp} 是自发辐射寿命时间)^[55],但由于环境和温度的影响,单光子源出现退相干和光谱扩散,进而出现均匀和非均匀展宽^[56-58],因此该条件很难满足,干涉对比度低。实验常在低温条件下选择量子点或单个分子的零声子线(ZPL)来实现双光子干涉测量^[50]。

此外,评价单光子源的指标还有量子产率和收集效率,以及按需产生的确定性单光子。对于理想的单光子源,单脉冲激发下有且仅有一个光子产生。实验上会将单光子源置于纳米结构的光学微腔中以提高单光子的产生率和收集效率。

3.3 基于反聚束的超分辨荧光显微镜

基于荧光量子特性的超分辨显微镜是近几年的研究热点。由于实际单光子源还不能完全预测、确定和不可区分,上述基于非经典光源的超分辨量子成像还处于理论验证阶段。目前基于荧光量子特性的量子成像和超分辨荧光显微镜主要是利用荧光的单光子性,即反聚束特性。其超分辨成像原理^[59]如下。

考虑到离散的具有量子力学性质的荧光分子和光子,成像面上探测到的 N 个不同位置的光源的光强信息可写为: $\langle \mathbf{I}(\mathbf{r}, t) \rangle = I' \sum_{i=1}^N \mathbf{h}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i)$ 其中 $\mathbf{h}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i)$ 为成像系统的 PSF, \mathbf{r} 和 \mathbf{r}_i 分别表示探测位置与光源中心位置, i 为光源的序号, I' 为光源中心处的光强。则一阶强度关联函数 $\mathbf{G}^{(1)}(\mathbf{r})$ 的平方

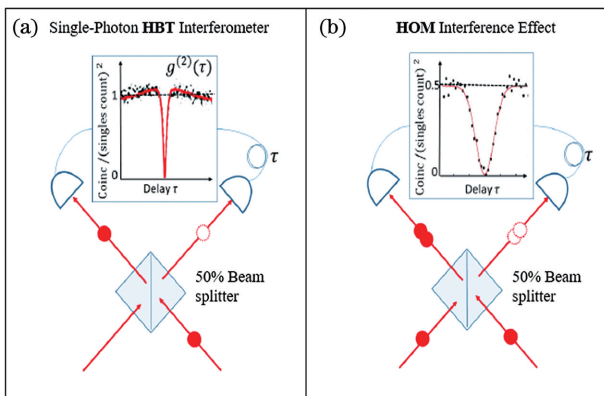


图 4 评判单光子源的实验原理图^[24]。(a) HBT 干涉实验;(b) HOM 干涉实验

Fig. 4 Experimental principle diagram of single photon source judgement^[24]. (a) HBT interference experiment; (b) HOM interference experiment

(光强平方)为非相干光源自生光强的平方与光源交叉项的共同作用:

$$[\mathbf{G}^{(1)}(\mathbf{r})]^2 = \langle \mathbf{I}(\mathbf{r}, t) \rangle^2 = I'^2 \sum_{i,j=1}^N \mathbf{h}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i) \mathbf{h}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_j) = I'^2 \sum_{i=1}^N \mathbf{h}^2(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i) + I'^2 \sum_{i \neq j}^N \mathbf{h}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i) \mathbf{h}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_j), \quad (9)$$

式中: j 为光源的序号。其中,光源交叉项影响着成像分辨率。交叉项可利用反聚束特性,即测量光子间的二阶关联函数来获得:

$$\mathbf{G}^{(2)}(\mathbf{r}) = I'^2 \sum_{i \neq j}^N \mathbf{h}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i) \mathbf{h}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_j). \quad (10)$$

超分辨成像的实现就是通过减去有害的交叉项,从而获得狭窄的 PSF,实现 $\sqrt{2}$ 倍分辨率的提高:

$$\Delta \mathbf{G}^{(2)}(\mathbf{r}) = [\mathbf{G}^{(1)}(\mathbf{r})]^2 - \mathbf{G}^{(2)}(\mathbf{r}) = I'^2 \sum_{i=1}^N \mathbf{h}^2(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i). \quad (11)$$

同理, k' 阶的关联函数的测量亦可实现 $\sqrt{k'}$ 倍的分辨率的提高。因此,利用光子间的关联获得额外信息,结合强度信息,可实现超分辨图像的重构。技术原理如图 5 所示。

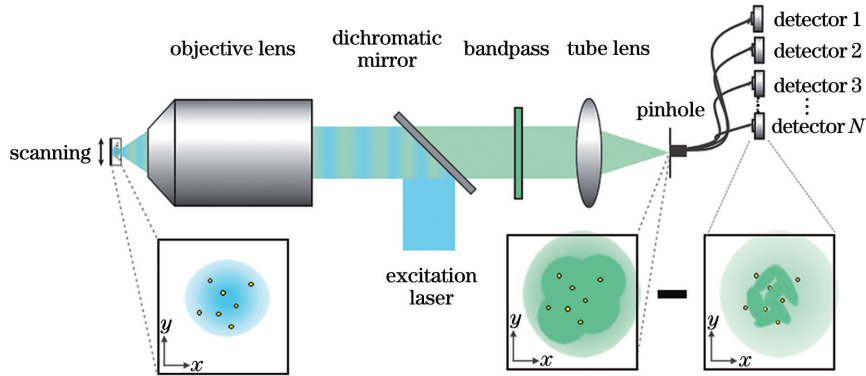


图 5 基于反聚束的超分辨荧光显微镜原理图

Fig. 5 Principle diagram of super-resolution fluorescence microscopy based on antibunching

实验证明,基于反聚束的超分辨荧光显微技术既可应用于宽场成像显微镜中,也可用于共聚焦显微镜中。研究者用该方法对两个相邻的金刚石 NV 色心进行共聚焦扫描成像,通过同时记录单个光子和双光子复合信号,实现相距 (8.5 ± 2.4) nm 的 NV 色心的分辨^[52],如图 6(a) 所示。2014 年, Monticone 等^[60] 利用共聚焦系统连接三个单光子探测器,对金刚石 NV 色心进行了扫描成像,通过测量每个成像位置上光子到达时间的二阶和三阶自关联函数,从而实现 $\sqrt{2}$ 倍和 $\sqrt{3}$ 倍分辨率的提高,验证了高阶超分辨成像能力。在宽场成像中,2013 年, Schwartz 等^[61] 利用 EMCCD 和 1 kHz 脉冲激光器,对 CdSe/CdS/ZnS 胶体量子点进行宽场成像,通过对 EMCCD 上相邻 2 个像素或 3 个像素探测到的光子进行空间互关联测量,实现了 1.26 倍或 1.5 倍分辨率的提高,如图 6(b) 所示。2017 年,研究者通过光纤束相机(每根光纤连接一个单光子探测器)对单个量子点进行定位追踪,利用零延时的光子二阶关

联,测得 $g^{(2)}(0) = 1 - 1/n'$ (n' 为发射器的个数),再结合单分子定位算法,在提高定位精度的同时减少了所需的光子数。实验证明,实现 20 nm 的定位精度仅需 1500 个光子^[62]。

此外,基于反聚束的超分辨荧光显微技术还可以与现有的超分辨荧光显微技术结合,例如,将高阶关联函数与结构照明的 SIM 技术相结合,可以将分辨率提高 $k + \sqrt{k}$ 倍^[63];也可与 STORM 技术结合,将 STORM 的定位密度提高到 $125 / \mu\text{m}^2$,相比 STORM,定位密度提高了两个数量级^[64]。2017 年,研究者将光子相关测量与图像扫描显微镜相结合,发展了量子图像扫描显微镜(Q-ISM)^[65]。扫描显微镜可以在不降低信号水平的情况下产生鲁棒的分辨率增强,而额外的量子信息可以将图像扫描显微镜的分辨率提高一倍,超过衍射极限的四倍。该团队最终实现了荧光量子点染色生物样品的超分辨光学成像。

荧光反聚束特性已被证明可超越光学显微镜分

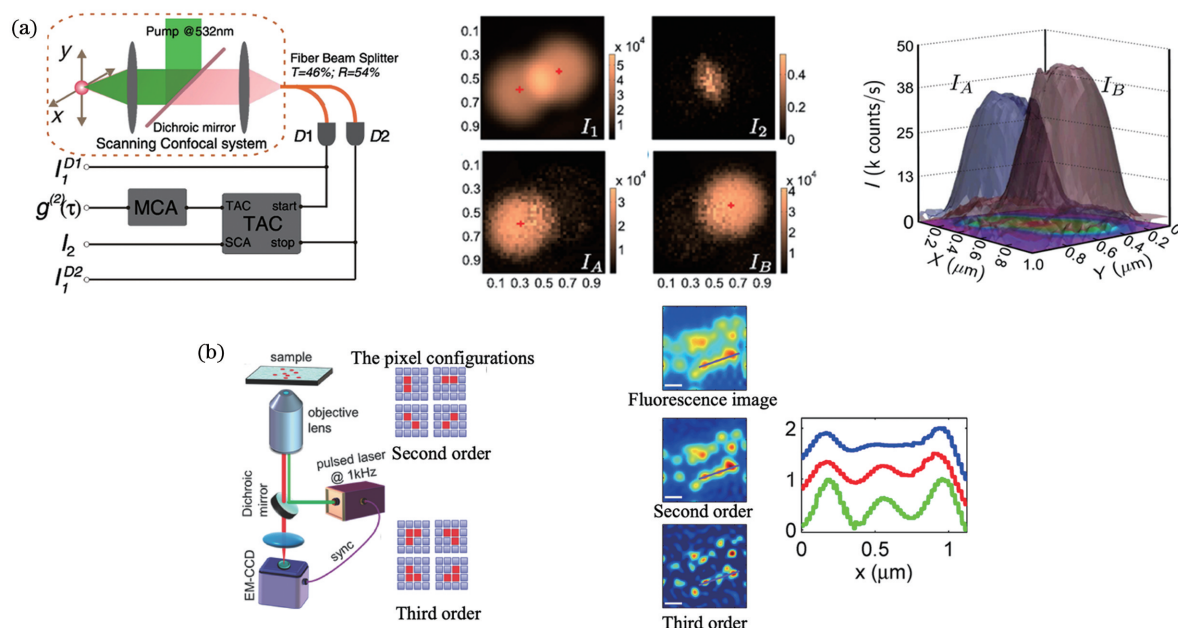


图 6 基于反聚束的超分辨荧光显微镜分别在共聚焦显微镜和宽场显微镜上的应用。(a)共聚焦显微镜^[52];(b)宽场显微镜^[61]

Fig. 6 Application of super-resolution fluorescence microscopy based on antibunching in confocal microscopy and wide field microscopy, respectively. (a) Confocal microscopy^[52];(b) wide-field microscopy^[61]

分辨率的经典限制。虽然一些方法已经被应用到原理证明实验中,但实现生物样本的成像仍然具有挑战性,主要是由于常用于生物样品标记的单个荧光分子或量子点的光量子态相干的脆弱性以及低的量子产率与收集效率,需要较长的测量时间才能获得荧光的量子信息。此外,制备大面阵、高灵敏和低噪声的单光子相机的技术难度也限制了基于反聚束的超分辨荧光显微技术的发展及应用。

4 基于稀疏约束鬼成像(GISC)的超分辨荧光显微镜

在充分发掘并提取荧光量子信息的同时,为了减弱空间、时间和视场的三角制约关系,还需要引入新的成像方式来提高图像信息的获取效率。鬼成像(GI)是近年来兴起的一种新型成像机制,利用光场涨落关联特性实现目标的非局域成像,具有高灵敏度、超分辨成像以及高维信息解耦等优势。将鬼成像与压缩感知结合,利用随机采样和压缩同时进行的特点,不仅可以降低图像采样率,还可以进一步提高图像分辨率和信噪比,在较短的采样时间下实现较高质量图像的重构。本节介绍 GISC 的发展历程和基于 GISC 技术的超分辨荧光显微镜。

4.1 GISC 的发展

鬼成像即强度关联成像,通过测试光路和参考

光路传输光子对的符合计数测量,实现未知物体的非局域成像^[66-69]。GI 最初是基于量子纠缠光的成像,1995 年,研究者利用频率下转换产生的纠缠双光子态进行了量子关联成像,首次实现了 GI,当时 GI 被认为是一种量子效应^[70]。2004 年,研究者证明经典热光的强度-涨落相关性可以用于 GI^[71-72]。因此,GI 被证明是基于纠缠双光子态和热光的强度涨落关联性的成像^[68-69]。其中,热光 GI 可以根据光源的不同分为赝热光 GI 和真热光 GI。研究者通过检测空心阴极灯(相干时间为 0.2 ns)的光场时间涨落,验证了真热光 GI,并通过参考臂和测试臂上的光场强度在时域上的二阶关联,恢复了图像信息^[73-74]。然而,该方案要求探测器的时间分辨率接近或小于光场的相干时间,但通常真热光(例如日光)的相干时间约为飞秒量级,这对于广泛应用于真热光 GI 的探测器是一个很大的挑战。此外,传统 GI 需要用单像素(桶)探测器在时域内进行多次采样来实现,这增加了成像的时间。因此,为了实现真热光 GI 并缩短鬼成像的成像时间,实现单次采样 GI,研究者提出了 GISC 相机的设想^[75-76]。成像装置图如图 7(a)所示,物体平面上每个点的强度通过空间随机相位调制器后被随机扩散成散斑,然后由探测器平面上的高空间分辨率探测器记录下来。在传统 GI 中,桶探测器在时域内独立采集物体的强

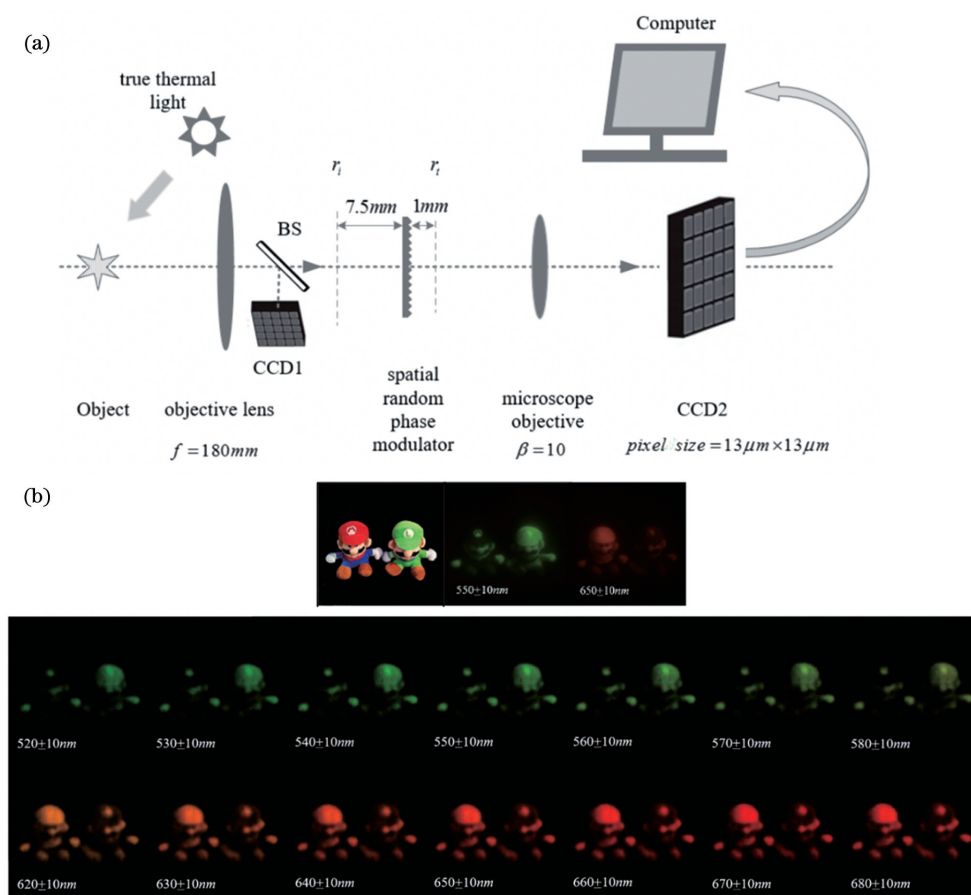


图 7 GISC 相机实验装置与结果图^[75]。(a)GISC 相机实验装置图;(b)光谱图像重构结果

Fig. 7 Experimental setup and results of GISC camera^[75]. (a) Experimental setup of GISC camera; (b) reconstruction results of spectral images

度信息,而 GISC 相机在空间域中独立采集物体的强度信息。具体来说,在 GISC 相机中,高空间分辨率检测器上每个像素采集到的光强均携带了整个物体信息,每个像素在空间域上是独立的,相当于桶检测器在时域内对信号进行采样。因此,将时间域的系综平均转换为空间域的系综平均,不仅降低了探测器时间分辨率的要求,还可通过单次采样实现真热光 GI。

与 GI 时域采样不同的是,GISC 相机在成像前需要进行标定,即在物体的整个平面上移动一个点源,并连续记录探测器平面上的散斑。GISC 相机的标定过程相当于参考臂上光场强度的采样过程,可获得随机测量矩阵 \mathbf{A} 。实际成像过程则相当于测试臂上光场强度的采样过程,通过探测器对目标物体散斑图像的单次采样,GISC 相机就可以通过预先确定的参考臂和测试臂的光场强度的二阶空间关联来恢复物体图像。GISC 技术还将鬼成像和压缩感知(CS)技术结合。Candès 等^[77-79]在数学上已证明压缩感知技术利用随机测量并结合信号的稀疏性

和非相干性,可实现超分辨图像重构。而 GI 提取成像信息的方法是基于“全局随机”测量和光场涨落,满足 CS 对随机测量的要求,即有限等距性质(RIP)条件^[77-78],因此 GI 和 CS 的结合是光学成像技术与现代信息理论的结合。研究者将这种成像方法成功应用于 GISC 激光雷达^[80]和 X 射线衍射成像^[81]中,实现了图像获取效率和成像分辨率的提高。

此外,GISC 技术将光场的高维空间信息编码到可探测的二维平面上,通过单次曝光直接获取高维光场的图像信息。如图 7(b)所示,GISC 相机在无分辨率损失的情况下,通过单次曝光获取了目标的空间和光谱三维信息,并且光谱分辨率达到 10 nm,体现了 GISC 高维信息的高效获取能力。这一特性也为突破光学成像系统的空间分辨率衍射极限提供了新的研究思路。尽管 GISC 相机在光场高维空间中的分辨率仍然是衍射受限的,但可以利用光场高维空间在其他维度的可辨识度来打破经典瑞利准则,从而实现空间分辨率的极大提升。研究者通过将物体的光场高维信息编码成二维平面上的散

斑图像,在一次成像中获得了物体的高维信息,并利用其中的光谱信息实现了横向空间分辨率的提升。从理论和实验两方面证明了空间分辨率可以超过衍射极限 5~6 倍,体现了 GISC 在超分辨成像和高效获取图像信息方面的巨大优势^[82]。

4.2 基于 GISC 的超分辨荧光显微镜 (GISC-Nanoscropy)

荧光标记的生物成像具有天然的稀疏性和荧光非相干性。因此,研究者将 GISC 相机应用到宽场

荧光显微镜中,发展了基于 GISC 的超分辨荧光显微镜^[83]。通过在荧光收集端加入随机相位调制器,对荧光信号进行调制以获得荧光的散斑场。在实际成像前先定标,获得不同位置荧光信号的散斑场 $I_r(x')$ 并将其作为参考路径,在实际成像过程中获得样品的散斑场 $I_t(x')$ 并将其作为实际测试路径,通过参考路径和测试路径之间的二阶强度关联函数,可获得荧光面上荧光光源的相对强度分布。二阶关联函数可表示为

$$\Delta G^{(2)}(x') = \langle I_r(x') I_t(x') \rangle \propto \left\{ \{f(x') \otimes h(x')\} \otimes \exp \left\{ -2[2\pi\omega(n_1 - 1)/\lambda]^2 \left\{ 1 - \exp \left[-\left(\frac{z_2 x'}{(z_1 + z_2)\zeta} \right)^2 \right] \right\} \right\} \right\}, \quad (12)$$

式中: z_1 为焦平面和随机相位调制器之间的距离; z_2 为随机相位调制器与探测器前透镜的距离; ω 和 ζ 分别为空间随机相位调制器的高度

标准差和横向相关长度; n_1 为折射率; λ 为波长。技术原理如图 8 所示,实验装置如图 9(a) 所示。

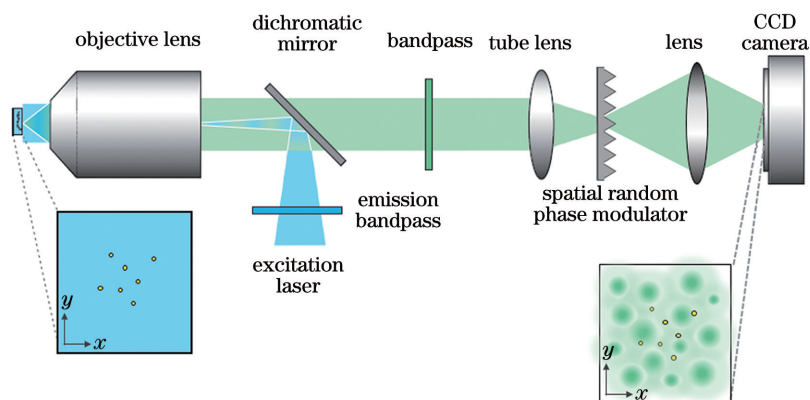


图 8 GISC-Nanoscropy 技术原理图

Fig. 8 Principle diagram of GISC-Nanoscropy technology

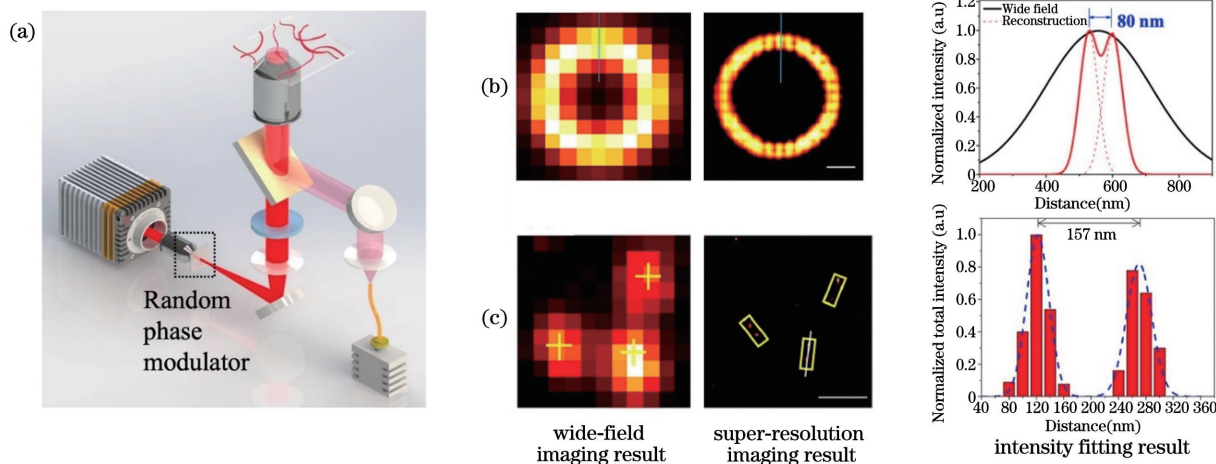


图 9 GISC-Nanoscropy 实验装置与结果图^[83]。(a) GISC-Nanoscropy 实验装置图; (b) 间距为 80 nm 的圆环的超分辨成像; (c) 间距为 160 nm 的 DNA 纳米标尺的超分辨成像

Fig. 9 Experimental setup and results of GISC-Nanoscropy^[83]. (a) Experimental setup of GISC-Nanoscropy; (b) super-resolution imaging of ring with 80 nm spacing; (c) super-resolution imaging of DNA nanometer ruler with 160 nm spacing

为了验证 GISC-Nanoscopy 的超分辨成像能力,如图 9(b)所示,仿真生成了间距为 80 nm 的环,通过实验采集的散斑场模拟了散斑图像。通过压缩感知重构可知,相比于宽场成像,GISC-Nanoscopy 可实现 80 nm 的分辨率。实验实现了间距为 160 nm 的 DNA 荧光标尺的超分辨定位,定位误差小于 30 nm,如图 9(c)所示。

此外,基于 GISC 的超分辨荧光显微技术还与 STORM 技术结合发展成 GISC-STORM 技术,可以对高密度的荧光分子进行高精度的定位。如图 10(a)所示,通过仿真模拟不同密度下的荧光分子,验证不同信噪比下 GISC-STORM 在定位密度和定位精度上的优势。可以看出,当信噪比大于 40 dB(对应实验上的信噪比)时,GISC-STORM 定位的分子密度可以达到 $143 \mu\text{m}^{-2}$,相比基于单分子拟合定位的 ThunderSTORM($0.5 \sim 0.8 \mu\text{m}^{-2}$)^[84],

定位密度提高了两个数量级以上,相比基于压缩感知的 CS-STORM ($8.8 \mu\text{m}^{-2}$)^[18],定位密度提高了一个数量级以上;并且定位精度没有随着定位密度的升高而明显降低,仍小于 25 nm,即使在低信噪比下,定位误差也不会超过 55 nm。单帧定位密度的提高意味着采样帧数的减少,通过比较 GISC-STORM、CS-STORM 和 ThunderSTORM 重构相同 60 nm 间距的圆环所需的采样帧数,验证了 GISC-STORM 快速成像的能力。如图 10(b)所示,GISC-STORM 只需要采集 10 frame 就能分辨 60 nm 间距的圆环,而 ThunderSTORM 需要 4000 frame,CS-STORM 需要 500 frame。可见 GISC-STORM 的成像速度较 STORM 的成像速度提高了 1~2 个数量级。目前基于 GISC 超分辨荧光显微成像的仿真和实验已初步验证了 GISC 的超分辨成像能力及高效的图像信息获取能力。

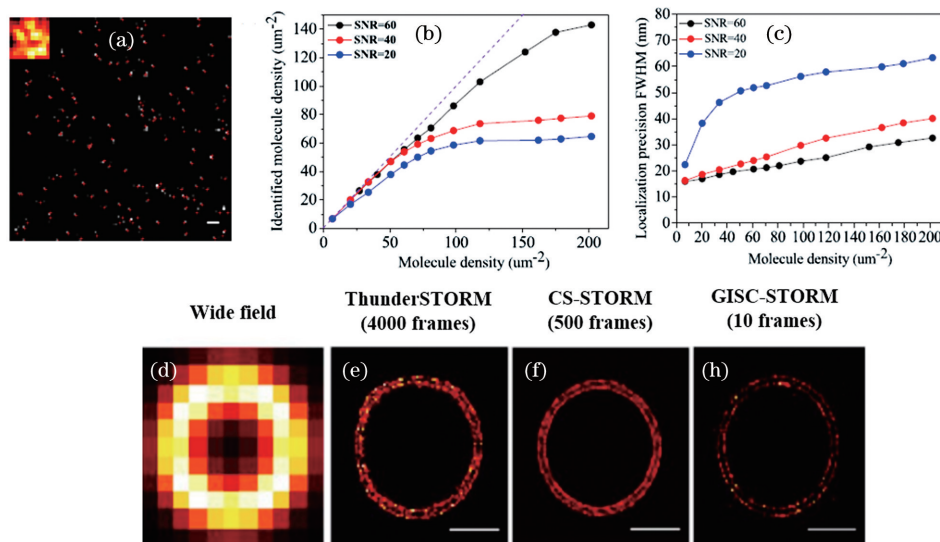


图 10 GISC-STORM 的结果图^[83]。(a) $50.7 \mu\text{m}^{-2}$ 密度下荧光分子的原始位置与重构位置的比较;(b) 不同信噪比下识别分子密度的能力;(c) 不同信噪比和不同密度下分子的定位精度;(d) 60 nm 间距圆环的衍射受限宽场图像;(e)~(h) ThunderSTORM、CS-STORM 和 GISC-STORM 重构 60 nm 间距圆环所需的采样帧数

Fig. 10 Results of GISC-STORM^[83]. (a) Comparison between original position and reconstructed position of simulated fluorescent molecules at density of $50.7 \mu\text{m}^{-2}$; (b) ability to identify molecular densities at different SNRs; (c) localization precision of molecules at different SNRs and densities; (d) diffraction-limited wide field image of ring with 60 nm spacing; (e)–(h) sampling frames of ThunderSTORM, CS-STORM and GISC-STORM for resolving ring with 60 nm spacing

这种基于 GISC 的超分辨荧光显微技术具有点到面成像的特点,像面上每个像元采集到的信息均包含整个物体的信息,大幅减少了冗余信息的获取,从而提高了采样效率。因此,相比于传统的超分辨荧光显微镜点到点单一信道编码的图像信息获取方式,GISC 点到面多信道编码的图像获取方式具有更高的图像信息获取效率,可以大幅减弱空间分辨

率、时间分辨率和视场的三角制约关系。因此,GISC-Nanoscopy 具有高速、宽场、荧光染料适用性更强的特点,有望在活细胞动态成像中得到广泛应用。

5 超分辨荧光显微镜的展望

目前,超分辨荧光显微镜由于技术原理的限制,

面临着时间、空间分辨率与视场存在三角制约关系与探测灵敏度低的问题。为了解决这两大问题,需要不断发掘并利用新维度信息提高图像信息的获取效率。随着荧光分子和量子点量子特性的深入研究,基于荧光反聚束的超分辨荧光显微镜通过引入荧光的量子特性及量子过程,增加了图像获取的信息量;基于 GISC 的超分辨荧光显微镜由于采用点到面多信道编码的图像获取方式,具有更高的图像信息获取效率,三角制约关系得到很大程度的减弱。

目前,基于量子关联的超分辨荧光显微技术还处于发展的初期阶段,主要受到脆弱荧光量子态和低探测灵敏度的限制。1)脆弱荧光量子态:目前在荧光显微成像中常用的荧光光源,如量子点和染料分子,通常在低温下才表现出良好的量子特性。而在室温下,只有极少数的量子点、有机分子和 NV 色心表现出单光子性,光子全同性依然受到环境和温度的影响。此外,低的量子产率与收集效率导致量子关联成像需要较长的测量时间来获得荧光的量子信息,从而降低了成像效率。因此,高性能的单光子源制备是目前主要的技术难点,也是量子领域主要研究方向之一。2)低探测灵敏度:量子关联成像要求探测灵敏度达到单光子水平,目前采用的主要是单光子探测器点扫描的方式。已经有商用的单光子相机和小面阵的单光子探测器应用于单光子成像和量子关联成像中,但制备大面阵、高灵敏和低噪声的单光子相机仍是当前的技术瓶颈。高性能荧光光源和高灵敏度探测器的制备均是当前的研究热点,这两个技术的不断发展将会促进量子关联成像以及基于量子关联的超分辨荧光显微技术的发展。已经初步证明量子关联成像可以克服许多经典成像的局限,例如在横向空间分辨率上实现衍射极限的增强及在探测灵敏度方面实现亚散粒噪声极限测量,其有助于解决目前超分辨荧光显微技术面临的技术难题,是未来超分辨荧光显微技术的主要发展方向。

5.1 基于量子关联的超分辨荧光显微镜的技术展望

基于荧光量子关联的 GISC 超分辨荧光显微镜将是未来的发展方向,通过结合 GISC 技术与荧光量子特性,充分发掘荧光的空间涨落和时间涨落信息,可进一步提高图像信息的获取效率和探测灵敏度。随着用于生物标记并具有高量子性能的荧光分子和量子点研究的深入以及单光子探测器探测灵敏度的不断提升,未来有望实现基于量子关联的超分辨荧光显微镜。目前的量子关联成像主要是基于双光子干涉理论模型,未来将建立多光子相干统计模

型,发展基于多光子干涉的 GISC 技术,开发新型量子计数关联图像重构算法,使超分辨成像的图像信息获取效率趋近于成像信道的香农极限,荧光的探测灵敏度达到或低于量子散粒噪声极限,进而使超分辨荧光显微成像技术的信息获取效率和探测灵敏度达到信息论和量子理论的上限。

5.2 基于量子关联的超分辨荧光显微镜的应用展望

基于量子关联的超分辨荧光显微镜在保证宽视场成像的同时,可大幅度提高空间分辨率和时间分辨率,且由于探测灵敏度的提高,光照功率降低,光毒性减少。未来有望实现具有纳米级空间分辨率和毫秒级时间分辨率并兼顾大视场和低光照功率的新一代荧光显微镜,其可以应用于活细胞动态成像中,为生物医学核心科学问题的解决提供强大的研究工具,这对生命科学和医学科学的发展具有重大的意义。

参 考 文 献

- [1] Abbe E. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung [J]. Archiv Für Mikroskopische Anatomie, 1873, 9(1): 413-468.
- [2] Turkowyd B, Virant D, Endesfelder U. From single molecules to life: microscopy at the nanoscale [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016, 408(25): 6885-6911.
- [3] Sigal Y M, Zhou R B, Zhuang X W. Visualizing and discovering cellular structures with super-resolution microscopy [J]. Science, 2018, 361(6405): 880-887.
- [4] Hell S W, Sahl S J, Bates M, et al. The 2015 super-resolution microscopy roadmap [J]. Journal of Physics D: Applied Physics, 2015, 48(44): 443001.
- [5] Aspelmeyer T, Egner A, Munk A. Modern statistical challenges in high-resolution fluorescence microscopy [J]. Annual Review of Statistics and Its Application, 2015, 2(1): 163-202.
- [6] 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.
- [7] Hell S W, Kroug M. Ground-state-depletion fluorescence microscopy: a concept for breaking the diffraction resolution limit [J]. Applied Physics B, 1995, 60(5): 495-497.
- [8] Hofmann M, Eggeling C, Jakobs S, et al. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins [J]. PNAS, 2005, 102(49): 17565-17569.
- [9] Gustafsson M G. Surpassing the lateral resolution

- limit by a factor of two using structured illumination microscopy [J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 198 (Pt 2): 82-87.
- [10] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313 (5793): 1642-1645.
- [11] Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. *Nature Methods*, 2006, 3 (10): 793-795.
- [12] 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.
- [13] Gu L S, Li Y Y, Zhang S W, et al. Molecular resolution imaging by repetitive optical selective exposure [J]. *Nature Methods*, 2019, 16(11): 1114-1118.
- [14] Min G. Principles of three-dimensional imaging in confocal microscopes [M]. Singapore: World Scientific, 1996: 15-45.
- [15] Minsky M. Microscopy apparatus: US3013467 [P]. 1961-12-19.
- [16] Harke B, Keller J, Ullal C K, et al. Resolution scaling in STED microscopy [J]. *Optics Express*, 2008, 16(6): 4154-4162.
- [17] Thompson R E, Larson D R, Webb W W. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes [J]. *Biophysical Journal*, 2002, 82 (5): 2775-2783.
- [18] Zhu L, Zhang W, Elnatan D, et al. Faster STORM using compressed sensing [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 721-723.
- [19] Nehme E, Weiss L E, Michaeli T, et al. Deep-STORM: super-resolution single-molecule microscopy by deep learning [J]. *Optica*, 2018, 5 (4): 458-464.
- [20] Cole R. Live-cell imaging [J]. *Cell Adhesion & Migration*, 2014, 8(5): 452-459.
- [21] Mandel J, Wolf E. Optical coherence and quantum optics [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1995: 430-803.
- [22] Nayak K P, le Kien F, Morinaga M, et al. Antibunching and bunching of photons in resonance fluorescence from a few atoms into guided modes of an optical nanofiber [J]. *Physical Review A*, 2009, 79(2): 021801.
- [23] Messin G, Hermier J P, Giacobino E, et al. Bunching and antibunching in the fluorescence of semiconductor nanocrystals [J]. *Optics Letters*, 2001, 26(23): 1891-1893.
- [24] Berchera I R, Degiovanni I P. Quantum imaging with sub-Poissonian light: challenges and perspectives in optical metrology [J]. *Metrologia*, 2019, 56 (2): 024001.
- [25] Genovese M. Real applications of quantum imaging [J]. *Journal of Optics*, 2016, 18(7): 073002.
- [26] Thiel C, Bastin T, von Zanthier J, et al. Sub-Rayleigh quantum imaging using single-photon sources [J]. *Physical Review A*, 2009, 80: 013820.
- [27] Giovannetti V, Lloyd S, Maccone L, et al. Publisher's note: sub-Rayleigh-diffraction-bound quantum imaging [J]. *Physical Review A*, 2009, 79 (3): 039901.
- [28] Thiel C, Bastin T, Martin J, et al. Quantum imaging with incoherent photons [J]. *Physical Review Letters*, 2007, 99(13): 133603.
- [29] Taylor M A, Janousek J, Daria V, et al. Biological measurement beyond the quantum limit [C] // International Quantum Electronics Conference 2013, May 12-16, 2013, Munich Germany. Washington, D.C.: OSA, 2013: IA_5_1.
- [30] Brida G, Genovese M, Berchera I R. Experimental realization of sub-shot-noise quantum imaging [J]. *Nature Photonics*, 2010, 4(4): 227-230.
- [31] Samantaray N, Ruo-Berchera I, Meda A, et al. Realization of the first sub-shot-noise wide field microscope [J]. *Light, Science & Applications*, 2017, 6(7): e17005.
- [32] Losero E, Ruo-Berchera I, Meda A, et al. Unbiased estimation of an optical loss at the ultimate quantum limit with twin-beams [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 7431.
- [33] Brambilla E, Caspani L, Jedrkiewicz O, et al. High-sensitivity imaging with multi-mode twinbeams [J]. *Physical Review A*, 2008, 77(5): 053807.
- [34] Muthukrishnan A, Scully M O, Zubairy M S. Quantum microscopy using photon correlations [J]. *Journal of Optics B: Quantum and Semiclassical Optics*, 2004, 6(6): S575-S582.
- [35] Giovannetti V, Lloyd S, Maccone L. Advances in quantum metrology [J]. *Nature Photonics*, 2011, 5 (4): 222-229.
- [36] Demkowicz-Dobrzański R, Jarzyna M, Kołodyński J. Quantum limits in optical interferometry [J]. *Progress in Optics*, 2015, 60: 345-435.
- [37] Lounis B, Orrit M. Single-photon sources [J]. *Reports on Progress in Physics*, 2005, 68(5): 1129-1179.
- [38] Scheel S. Single-photon sources-an introduction [J]. *Journal of Modern Optics*, 2009, 56(2/3): 141-160.

- [39] Polyakov S V, Migdall A L. Quantum radiometry [J]. *Journal of Modern Optics*, 2009, 56(9): 1045-1052.
- [40] Duan Z C, Li J P, He Y M. Single-photon source and its application on quantum information[J]. *Low Temperature Physical Letters*, 2018, 40(5): 1-16. 段兆晨, 李金朋, 何玉明. 单光子源及在量子信息领域的应用[J]. *低温物理学报*, 2018, 40(5): 1-16.
- [41] Häffner H, Roos C F, Blatt R. Quantum computing with trapped ions[J]. *Physics Reports*, 2008, 469(4): 155-203.
- [42] Bloch I. Quantum coherence and entanglement with ultracold atoms in optical lattices[J]. *Nature*, 2008, 453(7198): 1016-1022.
- [43] Michler P, Imamoglu A, Mason M D, et al. Quantum correlation among photons from a single quantum dot at room temperature[J]. *Nature*, 2000, 406(6799): 968-970.
- [44] Brokmann X, Giacobino E, Dahan M, et al. Highly efficient triggered emission of single photons by colloidal CdSe/ZnS nanocrystals[J]. *Applied Physics Letters*, 2004, 85(5): 712-714.
- [45] Lubin G, Tenne R, Antolovic I M, et al. Quantum correlation measurement with single photon avalanche diode arrays[J]. *Optics Express*, 2019, 27(23): 32863-32882.
- [46] Bao N T T, Trung D V, Phuong D T. Measuring anti-bunching effect from single dye molecules and single quantum dots[J]. *Communications in Physics*, 2016, 26(1): 67-73.
- [47] Basché T, Moerner W E, Orrit M, et al. Photon antibunching in the fluorescence of a single dye molecule trapped in a solid [J]. *Physical Review Letters*, 1992, 69(10): 1516-1519.
- [48] Lounis B, Moerner W E. Single photons on demand from a single molecule at room temperature [J]. *Nature*, 2000, 407(6803): 491-493.
- [49] Lukishova S G, Schmid A W, McNamara A J, et al. Room temperature single-photon source: single-dye molecule fluorescence in liquid crystal host[J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2003, 9(6): 1512-1518.
- [50] Kiraz A, Ehrl M, Hellerer T, et al. Observation of two-photon interference using the zero-phonon-line emission of a single molecule[J]. *Journal of Physics: Conference Series*, 2006, 36: 67-71.
- [51] Kurtsiefer C, Mayer S, Zarda P, et al. Stable solid-state source of single photons [J]. *Physical Review Letters*, 2000, 85(2): 290-293.
- [52] Cui J M, Sun F W, Chen X D, et al. Quantum statistical imaging of particles without restriction of the diffraction limit [J]. *Physical Review Letters*, 2013, 110(15): 153901.
- [53] Brown R H, Twiss R Q. A test of a new type of stellar interferometer on Sirius [J]. *Nature*, 1956, 178(4541): 1046-1048.
- [54] Hong C K, Ou Z Y, Mandel L. Measurement of subpicosecond time intervals between two photons by interference[J]. *Physical Review Letters*, 1987, 59(18): 2044-2046.
- [55] Rezaei M, Wrachtrup J, Gerhardt I. Coherence properties of molecular single photons for quantum networks[J]. *Physical Review X*, 2018, 8(3): 031026.
- [56] Kubo R. Stochastic theory of line shape[M]//Rice S, Hixon F P, Franck J, et al. *Advances in chemical physics*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2007: 101-127.
- [57] Kambs B, Becher C. Limitations on the indistinguishability of photons from remote solid state sources[J]. *New Journal of Physics*, 2018, 20(11): 115003.
- [58] Schimpf C, Reindl M, Klenovský P, et al. Resolving the temporal evolution of line broadening in single quantum emitters [J]. *Optics Express*, 2019, 27(24): 35290-35307.
- [59] Classen A, von Zanthier J, Agarwal G S. Analysis of super-resolution via 3D structured illumination intensity correlation microscopy[J]. *Optics Express*, 2018, 26(21): 27492-27503.
- [60] Monticone D G, Katamadze K, Traina P, et al. Beating the Abbe diffraction limit in confocal microscopy via nonclassical photon statistics [J]. *Physical Review Letters*, 2014, 113(14): 143602.
- [61] Schwartz O, Levitt J M, Tenne R, et al. Superresolution microscopy with quantum emitters [J]. *Nano Letters*, 2013, 13(12): 5832-5836.
- [62] Israel Y, Tenne R, Oron D, et al. Quantum correlation enhanced super-resolution localization microscopy enabled by a fibre bundle camera [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14786.
- [63] Classen A, von Zanthier J, Scully M O, et al. Superresolution via structured illumination quantum correlation microscopy[J]. *Optica*, 2017, 4(6): 580-587.
- [64] Aßmann M. Quantum-optimally enhanced STORM (QUEST) for multi-emitter localization[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 7829.
- [65] Tenne R, Rossman U, Rephael B, et al. Super-resolution enhancement by quantum image scanning microscopy[J]. *Nature Photonics*, 2019, 13: 116-122.

- [66] Wu Z W, Qiu X D, Chen L X. Current status and prospect for correlated imaging technique[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2020, 57(6): 060001.
吴自文, 邱晓东, 陈理想. 关联成像技术研究现状及展望[J]. *激光与光电子学进展*, 2020, 57(6): 060001.
- [67] Kolobov M I. *Quantum imaging* [M]. New York: Springer, 2007.
- [68] Shapiro J H, Boyd R W. The physics of ghost imaging[J]. *Quantum Information Processing*, 2012, 11(4): 949-993.
- [69] Shih Y H. The physics of ghost imaging: nonlocal interference or local intensity fluctuation correlation? [J]. *Quantum Information Processing*, 2012, 11(4): 995-1001.
- [70] Strekalov D V, Sergienko A V, Klyshko D N, et al. Observation of two-photon "ghost" interference and diffraction [J]. *Physical Review Letters*, 1995, 74(18): 3600-3603.
- [71] Cheng J, Han S S. Incoherent coincidence imaging and its applicability in X-ray diffraction[J]. *Physical Review Letters*, 2004, 92(9): 093903.
- [72] Gatti A, Brambilla E, Bache M, et al. Ghost imaging with thermal light: comparing entanglement and classical correlation[J]. *Physical Review Letters*, 2004, 93(9): 093602.
- [73] Zhang D, Zhai Y H, Wu L A, et al. Correlated two-photon imaging with true thermal light [J]. *Optics Letters*, 2005, 30(18): 2354-2356.
- [74] Liu X F, Chen X H, Yao X R, et al. Lensless ghost imaging with sunlight [J]. *Optics Letters*, 2014, 39(8): 2314-2317.
- [75] Liu Z T, Tan S Y, Wu J R, et al. Spectral camera based on ghost imaging via sparsity constraints [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 25718.
- [76] Han S S, Yu H, Shen X, et al. A review of ghost imaging via sparsity constraints [J]. *Applied Sciences*, 2018, 8(8): 1379-1397.
- [77] Candes E J, Wakin M B. An introduction to compressive sampling [J]. *IEEE Signal Processing Magazine*, 2008, 25(2): 21-30.
- [78] Candès E, Romberg J. Sparsity and incoherence in compressive sampling [J]. *Inverse Problems*, 2007, 23(3): 969-985.
- [79] Candès E J, Fernandez-Granda C. Towards a mathematical theory of super-resolution [J]. *Communications on Pure and Applied Mathematics*, 2014, 67(6): 906-956.
- [80] Zhao C Q, Gong W L, Chen M L, et al. Ghost imaging lidar via sparsity constraints [J]. *Applied Physics Letters*, 2012, 101(14): 141123.
- [81] Yu H, Lu R, Han S, et al. Fourier-transform ghost imaging with hard X rays [J]. *Physical Review Letters*, 2016, 117(11): 113901.
- [82] Tong Z S, Liu Z T, Wang J, et al. Spatial resolution limit of ghost imaging camera via sparsity constraints [EB/OL]. (2020-03-31) [2021-04-01]. <https://arxiv.org/abs/2004.00135>.
- [83] Li W W, Tong Z S, Xiao K, et al. Single-frame wide-field nanoscopy based on ghost imaging via sparsity constraints [J]. *Optica*, 2019, 6(12): 1515-1523.
- [84] Ovesný M, Křížek P, Borkovec J, et al. ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(16): 2389-2390.