

基于点扩散函数工程的计算显微成像研究进展

刘鑫¹, 匡翠方^{1,2}, 刘旭^{1,2}, 郝翔^{1*}

¹浙江大学光电科学与工程学院现代光学仪器国家重点实验室, 浙江 杭州 310027;

²之江实验室智能感知研究中心, 浙江 杭州 311100

摘要 点扩散函数(PSF)是衡量显微镜成像性能的关键参数,传统显微成像技术中,PSF 越接近理想的艾里斑,表明系统的成像性能越好。随着计算显微成像技术的发展,显微镜在各个方面性能均得到了极大的提升,特别是对显微镜 PSF 的主动操控,能显著提高其成像分辨率和速度等性能。因此,从原理和方法上介绍了基于 PSF 工程的计算显微成像研究进展,并分析了该技术面临的主要问题与挑战,最后对该技术未来的发展方向进行了展望。

关键词 成像系统; 计算成像; 点扩散函数; 衍射理论; 编码孔径

中图分类号 O436

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202158.1811008

Research Progress of Computational Microscopy Imaging Based on Point Spread Function Engineering

Liu Xin¹, Kuang Cuifang^{1,2}, Liu Xu^{1,2}, Hao Xiang^{1*}

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

²Research Center for Intelligent Sensing, Zhejiang Laboratory, Hangzhou, Zhejiang 311100, China

Abstract The point spread function (PSF) is a key parameter to evaluate the performance of microscopes. In conventional microscopes, the closer the distance between PSF and the ideal Airy disk, the better the imaging performance of the system. With the development of computational microscopy imaging technology, the performance of microscopes has been greatly improved in many aspects. Especially, the active manipulation of the PSF of the microscope can significantly improve the performance of the imaging resolution and speed, etc. In this review, the research progress in computational microscopy imaging based on PSF engineering is summarized in terms of principles and methods. Moreover, the problems and challenges are analyzed, and its prospect is also given.

Key words imaging systems; computational imaging; point spread function; diffraction theory; coded aperture

OCIS codes 110.1758; 260.1960; 170.1630

1 引言

显微镜在人类对微观世界的探索中起着极其重要的作用,光学显微镜作为显微镜中重要的一员,具有成像速度快、无侵入式、样品制备简单、三维(3D)成像等优点,在生命科学、材料科学等方面得到了广

泛应用。光的衍射使光学显微镜存在衍射受限问题,即能观察到的样品细节尺度是有限的。Abbe^[1]在 1873 年给出了光的衍射与显微镜成像分辨率之间的关系,认为显微镜的分辨能力与照明光波长的二分之一成正比,与物镜的数值孔径(NA)成反比。

收稿日期: 2021-05-28; 修回日期: 2021-06-19; 录用日期: 2021-06-26

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划培育项目(92050115)、国家重点研发计划(2018YFA0701400)、浙江省自然科学基金重点项目(LZ21F050003)

通信作者: *haox@zju.edu.cn

显微镜衍射极限的最直接体现就是系统的点扩散函数(PSF),也被称作系统的冲激响应^[2],PSF 可以作为间接度量显微镜性能的重要参数。1835 年, Airy^[3]用完整的理论解释了平行光束通过圆形光孔后由于光的衍射产生的艾里斑(Airy disk)。显微镜在实际成像中,受系统噪声、光束质量、像差等不利因素的影响,PSF 的形状会发生变化、能量也会分散,导致成像分辨率和对比度下降。因此,对于传统显微镜,人们总是希望系统的 PSF 接近理想的艾里斑,但这也在一定程度上限制了显微镜的分辨率。随着科学技术的飞速发展,半波长左右分辨率的传统光学显微镜已经无法满足人们对纳米世界的探索。因此,突破衍射极限,开发更高分辨率,甚至纳米量级分辨率的光学显微镜具有重要意义。而提升显微镜分辨率最直接的方式就是缩小系统的 PSF,如缩短光的波长或提高系统的数值孔径。直接提高像方折射率的固态浸没透镜^[4]、使用双对置镜头架构提升系统数值孔径的 4Pi 显微镜^[5]受材料限制,系统的稳定性较差,且显微镜分辨率的提升有限。此外,受激辐射光淬灭(STED)显微镜^[6-7]和单分子定位显微镜(SMLM)^[8-10]理论上可将显微镜系统的有效 PSF 尺寸无限压缩,极大提高系统的分辨率,这种超分辨光学显微镜对生命科学的研究做出了巨大贡献,也因此获得了 2014 年的诺贝尔化学奖^[11]。STED 和 SMLM 技术都离不开对系统 PSF 进行人

为操控(PSF 工程),且随着计算显微成像技术的兴起,PSF 工程在显微镜中扮演着越来越重要的角色。相比传统显微镜,基于 PSF 工程的计算显微成像技术能提供样品更多维度(如深度、光谱)的信息,同时还可以提升成像质量(如空间分辨率、对比度、信噪比)。此外,该技术在三维成像、时间分辨率提升等方面也表现出色。

本文详细阐述了基于 PSF 工程的计算显微成像技术,首先,概括了计算显微成像的原理,重点介绍了显微镜中调控 PSF 的原理及方法。然后,给出了 PSF 工程在 SMLM 中的应用及发展现状,并着重介绍了 PSF 工程在三维定位、多色成像及高分子密度成像方面的应用。最后,论述了 PSF 工程在点扫描计算显微成像中的应用及发展现状,并对基于 PSF 工程的计算显微成像技术进行了展望。

2 基于点扩散函数的计算显微成像原理

2.1 成像模型

显微镜的分辨率与 PSF 的尺寸直接相关,其标准形状如图 1 所示。显微镜系统的 PSF 在横向上呈圆对称分布,在轴向上关于光轴和焦平面对称,且其轴向尺寸略大于横向尺寸。因此,用传统显微镜对样品进行成像时,横向分辨率往往高于轴向分辨率。

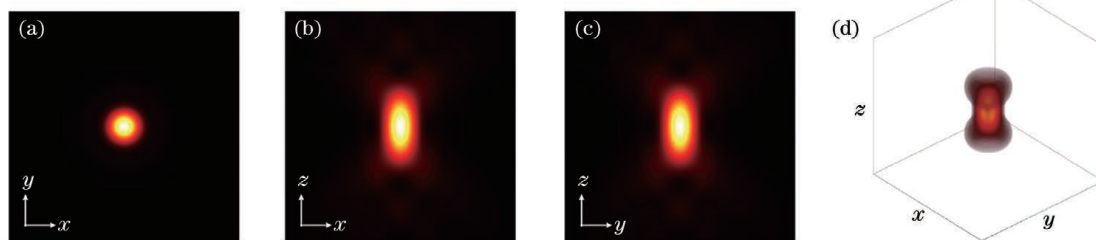


图 1 显微镜的标准 PSF 模型。(a)焦平面(xy)上的 PSF;(b)轴向(xz)上的 PSF;(c)轴向(yz)上的 PSF;(d)PSF 的三维分布

Fig. 1 Standard PSF model of the microscope. (a) PSF on the focal plane (xy); (b) PSF on the axial plane (xz);

(c) PSF on the axial plane (yz); (d) three-dimensional distribution of the PSF

荧光显微镜一般为非相干成像系统,其获取的图像可以简单表示为系统 PSF 与样品空间分布的卷积^[2],如图 2(a)所示。传统显微镜的 PSF 尺寸直接影响着成像分辨率,PSF 的尺寸越小,成像分辨率越高;反之,成像分辨率越低。且传统显微镜对 PSF 尺寸的压缩十分有限,而基于 PSF 工程的计算显微成像先通过人为调控系统的 PSF,将得到的初始图像视为 PSF 与样品的卷积,然后通过算法从初始图像中恢复出高质量的图像,如图 2(b)所示。在

基于 PSF 工程的计算显微成像中,图像恢复算法起着决定性作用。

2.2 Richards-Wolf 矢量衍射理论

基于 PSF 工程的计算显微成像通过调控系统的 PSF 提升显微镜的性能,因此,对显微镜的 PSF 进行数值模拟对探索 PSF 的调控方法及计算显微成像技术的发展具有重要意义。目前,光学显微镜按照照明方式可分为宽场显微镜和点扫描显微镜两大类。其中,宽场显微镜的激发光在整个视场范围内

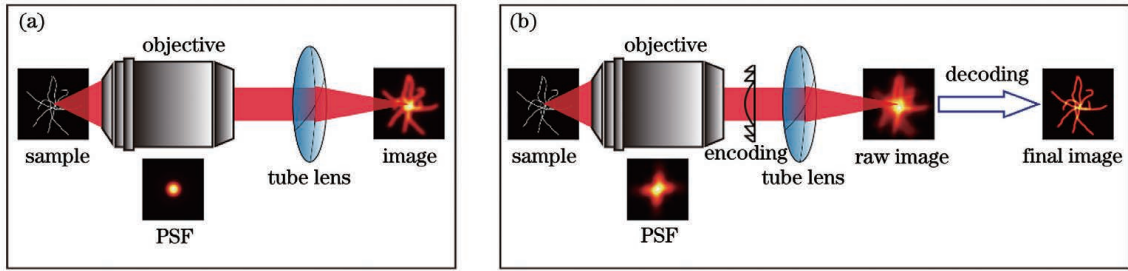


图 2 显微成像的原理。(a)传统显微成像;(b)基于 PSF 工程的计算显微成像

Fig. 2 Principle of the microscopic imaging. (a) Traditional microscopic imaging; (b) computational microscopy imaging based on PSF engineering

是均匀的,即成像时整个视场内的荧光分子都会受到激发。而点扫描显微镜的激发光经过物镜聚焦,在整个视场范围内每次只有一个 PSF 区域的荧光分子能被激发。

在高分辨率显微镜中,一般用高数值孔径的显

微物镜,计算系统的 PSF 时,光的矢量(偏振)性质不容忽略,特别是对于相干光的激发光。显微物镜的聚焦模型如图 3 所示,准直光束沿光轴(z)方向传播,经显微物镜的入瞳(x_p, y_p)面入射,再经显微物镜偏转,并在样品端进行干涉叠加,形成 PSF。

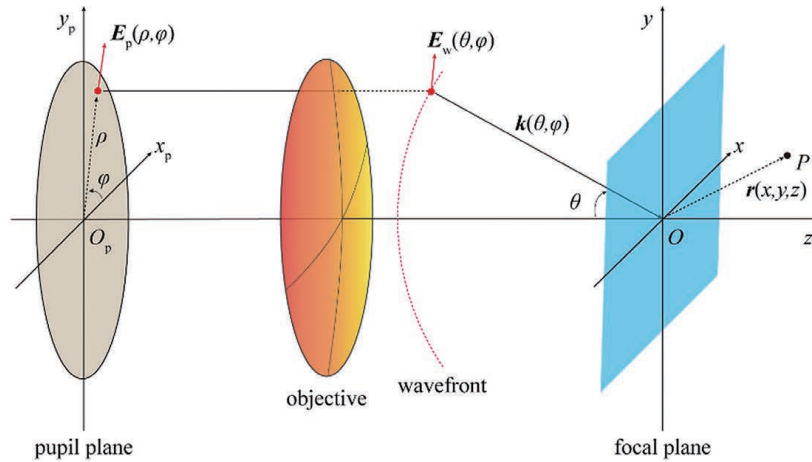


图 3 高数值孔径显微物镜的聚焦模型

Fig. 3 Focusing model of the high numerical aperture microscope objective

高数值孔径物镜焦点附近的光场分布可用 Richards 等^[12]建立的矢量衍射积分表示为

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}) = -\frac{iC}{\lambda} \iint_{\Omega} \mathbf{E}_w(\theta, \varphi) \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}) d\Omega, \quad (1)$$

式中, \mathbf{r} 为像空间中任意一点 P 的位置矢量, $\mathbf{E}_w(\theta, \varphi)$ 为物镜出瞳波前上的光场分布, C 为一常数, λ 为光的波长, Ω 为整个聚焦空间, \mathbf{k} 为光在聚焦空间中的波矢, 且 $|\mathbf{k}| = 2\pi n/\lambda$, n 为聚焦空间(浸没液)的折射率。 $\mathbf{E}_w(\theta, \varphi)$ 与入瞳面上光场分布 $\mathbf{E}_p(\rho, \varphi)$ 的关系可表示为

$$\mathbf{E}_w(\theta, \varphi) = A(\theta) \cdot \mathbf{V}(\theta, \varphi) \cdot \mathbf{E}_p(\rho, \varphi), \quad (2)$$

式中, θ 为光波矢与光轴间的夹角, 其最大值 $\theta_{\max} = \arcsin(NA/n)$, φ 为入瞳面上的方位角。 ρ 为入瞳面上的归一化径向坐标, 对于满足正弦条件的物镜, $\rho = n \sin \theta / NA$ 。 $A(\theta)$ 为保证入射光与出射光波前能量守恒而引入的切趾函数, 在正弦条件下, $A(\theta) = \sqrt{\cos \theta}$ 。 对不同条件的物镜, ρ 和 θ 的关系不同, 切趾函数也不相同^[13]。 如对于满足 Herschel 条件的物镜, $\rho = n \sin(\theta/2) / NA$, 切趾函数为常数 1。 $\mathbf{V}(\theta, \varphi)$ 为光的偏振态从入瞳到出瞳的坐标变换矩阵, 可表示为^[14]

$$\mathbf{V}(\theta, \varphi) = \begin{bmatrix} 1 + (\cos \theta - 1) \cos^2 \varphi & (\cos \theta - 1) \cos \varphi \sin \varphi & -\sin \theta \cos \varphi \\ (\cos \theta - 1) \cos \varphi \sin \varphi & 1 + (\cos \theta - 1) \sin^2 \varphi & -\sin \theta \sin \varphi \\ \sin \theta \cos \varphi & \sin \theta \sin \varphi & \cos \theta \end{bmatrix}. \quad (3)$$

$E_p(\rho, \varphi)$ 也被称为光瞳函数, 可表示为

$$\mathbf{E}_p(\rho, \varphi) = A_p(\rho, \varphi) \cdot \exp [i\phi_p(\rho, \varphi)] \begin{bmatrix} p_x(\rho, \varphi) \\ p_y(\rho, \varphi) \\ 0 \end{bmatrix}, \quad (4)$$

式中, $A_p(\rho, \varphi)$ 和 $\phi_p(\rho, \varphi)$ 分别为入瞳面上的振幅

分布与相位分布, $\begin{bmatrix} p_x(\rho, \varphi) \\ p_y(\rho, \varphi) \\ 0 \end{bmatrix}$ 为入射光偏振态的琼斯矢量。当显微镜的光瞳函数确定时, 系统的 PSF

可表示为

$$h(\mathbf{r}) = |\mathbf{E}(\mathbf{r})|^2. \quad (5)$$

需要注意的是, 上述理论仅考虑了聚焦空间折射率相同的情况, 即浸没液、盖玻片的折射率一致, 且光束的焦平面恰好在盖玻片与样品的分界面上。对于显微镜来说, 有时浸没液与盖玻片的折射率不同, 且往往会聚焦至样品深处。因此, Török 等^[15] 将 Richards-Wolf 衍射理论推广到聚焦空间为分层介质的情况, 进一步完善了显微镜中的 PSF 计算理论。光在分层介质中的聚焦模型如图 4 所示, 光在分层介质中传播时会发生折射和反射(忽略吸收与散射), 使透射的能量随光传播深度的增加逐层衰减, 同时相位也会发生变化。光在分层介质中聚焦时, 系统等效光瞳函数的振幅分布可由菲涅耳方程^[16] 导出, 其相位分布可表示为

$$\phi_p(\theta, \varphi) = \sum_j^{N-1} h_j (n_{j+1} \cos \theta_{j+1} - n_j \cos \theta_j), \quad (6)$$

式中, h_j 为第 j 层介质和第 $j+1$ 层介质分界面与坐标原点的距离, n_j 为第 j 层介质的折射率, θ_j 为光在第 j 层介质中的会聚角。推导出系统的等效光瞳函数后, 可通过矢量衍射积分计算出分层介质的 PSF。

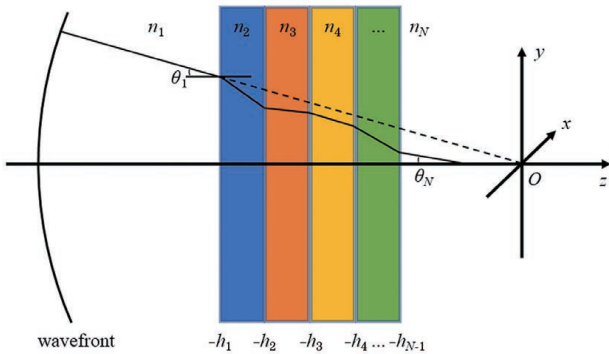


图 4 分层介质中的聚焦模型

Fig. 4 Focusing model in stratified mediums

2.3 矢量衍射积分快速算法

Richards-Wolf 矢量衍射理论的提出极大推动

了高数值孔径物镜聚焦场的数值模拟在显微成像、光镊、激光加工等方面的应用^[5,7,17]。但最初的衍射理论采用逐点积分方式计算, 计算效率较低。为了解决该问题, Leutenegger 等^[18] 将矢量衍射积分改写为空间频率的二维傅里叶变换, 快速傅里叶变换算法和啁啾 z 变换的结合, 极大提高了 PSF 的计算效率。但计算 PSF 的三维分布时, 该方法只能通过在不同轴向位置逐层计算二维傅里叶变换实现。

为了解决三维 PSF 计算效率低的问题, Lin 等^[19] 将矢量衍射积分改写为三维傅里叶变换, 通过单次傅里叶变换就能得到三维 PSF 分布。但傅里叶变换要求对空间频率进行均匀采样, 即三维傅里叶变换需要在 k_x, k_y, k_z 三个空间频率方向上进行均匀采样。而在实际物理模型中, 空间频率 $k_z = \sqrt{k^2 - (k_x^2 + k_y^2)}$ 为非线性约束条件, 对 k_x, k_y 进行均匀采样的同时, 无法对 k_z 进行均匀采样。对 k_z 强制进行均匀采样会导致离焦平面上 PSF 的计算误差较大。由于三维傅里叶变换是对整个三维矩阵进行傅里叶变换, 当光瞳函数或需要计算的 PSF 像素分辨率较高时, 内存消耗十分严重。但在计算离焦距离不大的 PSF 且像素分辨率不是很高时, 三维傅里叶变换算法比二维傅里叶变换算法的计算速度要快得多。

随着需要计算 PSF 的场景不断增加, 有时需要计算的 PSF 强度分布并不局限在与坐标轴平行的二维平面 (xy, xz 平面)。当计算一个相对于坐标轴倾斜的平面 PSF 强度分布时, 可先计算一个包含该平面的三维 PSF 强度分布, 再通过切片与插值方式将该倾斜平面的数据提取出来。为了解决该问题, Cai 等^[20] 对二维傅里叶变换算法进行了改进, 对空间频率的坐标进行变换, 使其能计算任意平面上的 PSF 强度分布, 极大提高了 PSF 计算的灵活性。由于光瞳函数是定义在 x_p, y_p 平面上的函数, 因此该算法对空间频率坐标进行变换时, 计算结果有一定误差; 且该算法在空间频率中的采样间隔存在约束, 计算离轴平面 PSF 的误差较大。

2.4 探测路 PSF 的计算模型

相比传统显微镜激发路采用的激光, 探测路样品发出的荧光为非相干光, 考虑到荧光发射的时间平均效应并忽略其极性, 可通过标量衍射理论计算探测路的 PSF^[2,21], 可表示为

$$h_{\text{det}}(\mathbf{r}) = \left| \iint_{\Omega} A(\mathbf{k}_{\text{det}}) \exp [i\mathbf{k}_{\text{det}} \cdot \mathbf{r} + \phi(\mathbf{k}_{\text{det}})] d\Omega \right|^2, \quad (7)$$

式中, k_{det} 为荧光的波矢, $A(k_{det})$ 和 $\phi(k_{det})$ 分别为探测路光瞳函数的振幅分布与相位分布。当荧光的极性能忽略时, 可将荧光分子看作偶极子, 再计算其在像空间的 PSF^[22]。

2.5 光瞳函数的调控方式

显微镜的 PSF 由光瞳函数唯一确定, 因此在显微镜中一般通过调制光瞳函数(振幅、相位与偏振)实现对 PSF 的调控。受限于空间光调制器件的性能, 相比振幅和偏振, 对光的相位进行精确操控更容易实现。具有相位调制功能的器件中, 相位板需要经过机械、光刻等方式在材料上加工出微图案, 从而实现精确的相位调制, 只能用于对光的静态相位调控^[23-24], 但其具有体积小、质量轻、价格相对便宜、衍射效率高、对偏振不敏感等优点。空间光调制器(SLM)通过电压像素化精确控制光瞳函数的相位, 具有灵活的可编程性, 被广泛用于光的动态相位调制^[25-29], 但 SLM 的体积一般较大、价格相对昂贵、衍射效率较低, 且对偏振敏感。由于显微物镜的入瞳面一般在其内部, 对系统的光瞳函数进行调制时, 空间光调制器件一般被放置于光路中与显微物镜入瞳面共轭的位置。

3 单分子定位显微成像技术

SMLM 技术在荧光显微成像中起着重要作用, 单分子定位技术用特殊的荧光探针标记样品, 从而使图像每一帧中被激发光子呈少量稀疏分布, 使衍射极限内只有单个荧光分子发光。首先, 对样品中的荧光分子进行多次稀疏随机开关, 获得一系列图像。然后, 通过单分子定位算法测量出每个荧光分子的中心位置。最后, 叠加所有荧光分子的位置, 计算出一张超衍射极限的显微图像。SMLM 的定位精度可表示为

$$\sigma = s / \sqrt{\nu}, \quad (8)$$

式中, s 为高斯型 PSF 分布的标准差, 与 PSF 的半峰全宽成正比, ν 为单个荧光分子发射的光子数。可以发现, PSF 的尺寸越小, 光子数越多, 单分子的定位精度就越高。由于传统 PSF 在焦平面上上下呈对称分布, 且随着离焦距离的增加, 二维 PSF 的尺寸会迅速扩展, 光强也急剧衰减, 因此, 传统的单分子定位技术很难用于三维定位。可用于三维单分子定位的主流方法包括基于双平面^[30-31]和 PSF^[21, 32-35]的方法, 其中, 基于 PSF 的方法占据着主要地位。SMLM 本质上属于宽场显微镜, 在成像时只需考虑探测路的 PSF。要实现单分子三维定位, 最直接的思路就是让探测路 PSF 的形状在焦平面上上下不对称, 且其在 xy 平面上的能量分布尽量集中, 同时, 能量衰减随轴向深度的增加不能太快。

光学重构显微镜(STORM)^[36]作为 SMLM 中重要的一员, 最初只能用于二维定位。Huang 等^[32]利用带像散的 PSF 实现了三维 STORM 成像, 即 3D STORM 系统, 其结构如图 5(a) 所示。在该系统中, 一个柱面透镜被插入与显微物镜入瞳面共轭的位置, 使系统光瞳函数的相位分布产生像散, 此时, 系统的 PSF 不再是理想的高斯分布。带有像散的 PSF 使其在离焦平面的强度呈椭圆分布, xy 平面上的像散 PSF 可用二维椭圆高斯函数拟合为

$$G(x, y) = h \exp \left[-2 \frac{(x - x_0)^2}{w_x^2} - 2 \frac{(y - y_0)^2}{w_y^2} \right] + b, \quad (9)$$

式中, h 为高斯函数的峰值强度, b 为背景强度, (x_0, y_0) 为 PSF 的中心位置, w_x, w_y 为 PSF 在 x, y 方向上的宽度。对不同离焦平面的 PSF 进行二维高斯拟合, 就能得到单分子在 xy 平面(横向)上的中心位置及 PSF 的椭圆度。PSF 的横向尺寸

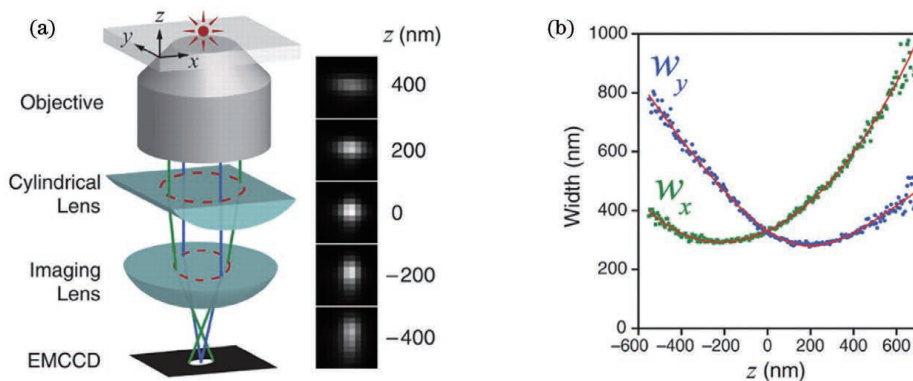


图 5 3D STORM 的示意图。(a) 光学系统; (b) 不同轴向深度上的 PSF 尺寸^[32]

Fig. 5 Schematic diagram of 3D STORM. (a) Optical system; (b) PSF size at different axial depths^[32]

$w_{x,y}$ 为轴向位置 z 的函数,可表示为

$$w_{x,y}(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z-c}{d}\right)^2 + A\left(\frac{z-c}{d}\right)^3 + B\left(\frac{z-c}{d}\right)^4}, \quad (10)$$

式中, w_0 为 PSF 在焦平面上的宽度, c 、 d 、 A 、 B 为拟合参数。完成 PSF 的轴向位置标定后,可通过二维 PSF 的形状获得荧光分子的轴向位置,如图 5(b) 所示,从而实现三维单分子定位。

Pavani 等^[33] 利用双螺旋 PSF 实现了三维单分子定位成像,用 SLM 对荧光进行相位调制,其原理如图 6(a) 所示。荧光由显微物镜收集,经成像透镜 (IL)、透镜 L1 后入射到 SLM 上。SLM 位于探测路透镜 L2 的傅里叶面(显微物镜入瞳面的共轭面),其加载有通过不同高斯拉盖尔 (GL) 模式叠加产生的相位图^[37-39], 荧光经过 SLM 相位调制后在探测器 (Andor iXon EMCCD) 上聚焦成双螺旋状的 PSF。其中,透镜 L1 与 L2 的焦距均为 f 。由于 SLM 只能调制单一偏振方向上的光,而荧光可被看作是自然光,如果仅用一个 SLM 进行调制,则大部分能量会在探测器上聚焦为一个零级光斑,从而影

响成像质量。因此,该系统在 SLM 与 L2 之间插入一个偏振片 (P), 仅让被 SLM 调制过的荧光通过。图 6(b) 和图 6(c) 分别为双螺旋 PSF 两主瓣连线的角度与不同轴向深度的关系和实验中双螺旋 PSF 随轴向深度的变化情况。因此,可通过主瓣连线的中心确定单分子在 xy 平面上的位置,并结合主瓣连线的角度获得荧光单分子的轴向位置信息,从而实现单分子的三维定位。

SMLM 的定位精度与探测器接收到的荧光光子数相关,但采用 SLM 对荧光进行相位调制时,只有极少部分的荧光能被调制,这表明在成像时会丢弃大量的光子,从而影响单分子定位的精度。为了充分利用样品发出的荧光,Grover 等^[40] 利用灰度光刻将产生双螺旋 PSF 的相位记录在相位板上,其荧光利用效率为 SLM 调制方法的 2 倍,从而提升了定位精度。最初用于产生双螺旋 PSF 的相位只能通过 GL 模式叠加的方式生成,且需要通过迭代算法对其进行优化^[37]。Prasad^[41] 结合菲涅耳波带和涡旋相位,实现了主瓣数量和主瓣到中心距离均可调的多螺旋 PSF,并推导了光瞳函数的相位解析式,极大提升了螺旋 PSF 的灵活性。Berlich 等^[42] 生成了高阶螺旋 PSF,减小了像差对 PSF 的影响。

艾里光束^[43-44] 作为一种无衍射光束,其能量在相当长的轴向距离上比较集中,且会发生弯曲。基于该特点,Jia 等^[34] 利用改进的三次相位分布对艾里光束进行整形,荧光通过 SLM 的调制产生了在轴向上弯曲的 PSF,从而实现了单分子的三维定位。该方法将荧光分为两个通道,经过 SLM 对两个不同区域进行相位调制,在探测器上得到两个通道的 PSF,这两个通道上的图像没有旁瓣,可通过简单的高斯拟合确定单分子在 xy 平面上的位置,但该方法仍存在荧光利用效率低的问题。Zhou 等^[45] 在与物镜入瞳面共轭的位置插入一个三次相位板,生成了艾里光束 PSF,通过提取艾里光束在不同轴向深度的强度特性并结合反卷积算法实现了高速血流量的测量。

克拉美-罗下界 (CRLB) 是一个度量 SMLM 定位精度的关键统计学参数,CRLB 越小,表明系统的定位精度就越高^[46-47]。为了在给定条件(如显微镜的放大率、噪声水平、像素大小、荧光信号强度)下获得一个最优的 PSF,使其三维定位精度能达到最高,Shechtman 等^[21] 以 CRLB 为优化目标,设计了优化函数

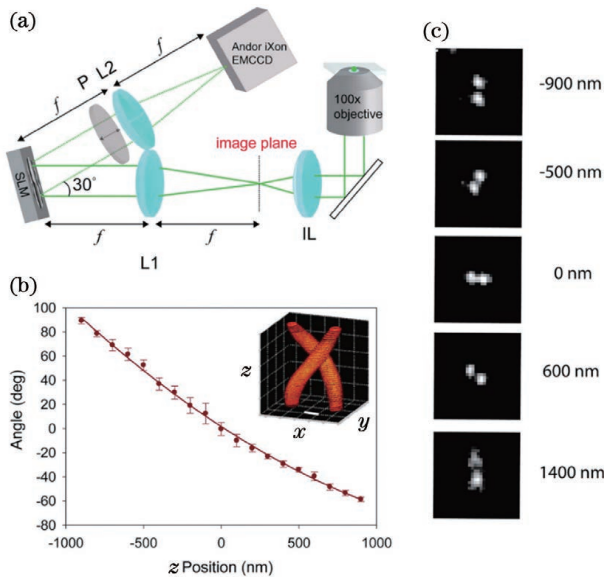


图 6 双螺旋 PSF 成像系统的示意图。(a) 成像系统的探测路;(b) 不同轴向深度上 PSF 两主瓣的角度;(c) 不同轴向深度上的荧光颗粒图像^[33]

Fig. 6 Schematic diagram of double helix PSF imaging system. (a) Detection path of the imaging system; (b) angles of the two main lobes of the PSF at different axial depths; (c) fluorescent particle images at different axial depths^[33]

$$\min_{\phi_p(x_p, y_p)} \sum_{i=\hat{x}, \hat{y}, \hat{z}} \sum_{z \in Z} \sqrt{X_i^{\text{CRLB}}(z)}, \quad (11)$$

式中, $\hat{x}, \hat{y}, \hat{z}$ 为不同的三个方向, Z 为成像的轴向范围, 对前 55 项泽尼克多项式^[16]组成的光瞳函数相位分布进行优化求解, 设计出了鞍点形 PSF。相比其他单分子三维定位的 PSF, 鞍点形 PSF 的形

状更复杂, 荧光分子的深度信息被编码到 PSF 复杂的形状中后, 不再是简单的几何结构变化。Shechtman 等^[48]利用该方法分别优化了用于 $6 \mu\text{m}$ 和 $20 \mu\text{m}$ 深度范围内单分子追踪的四足形 PSF, 结果如图 7 所示。

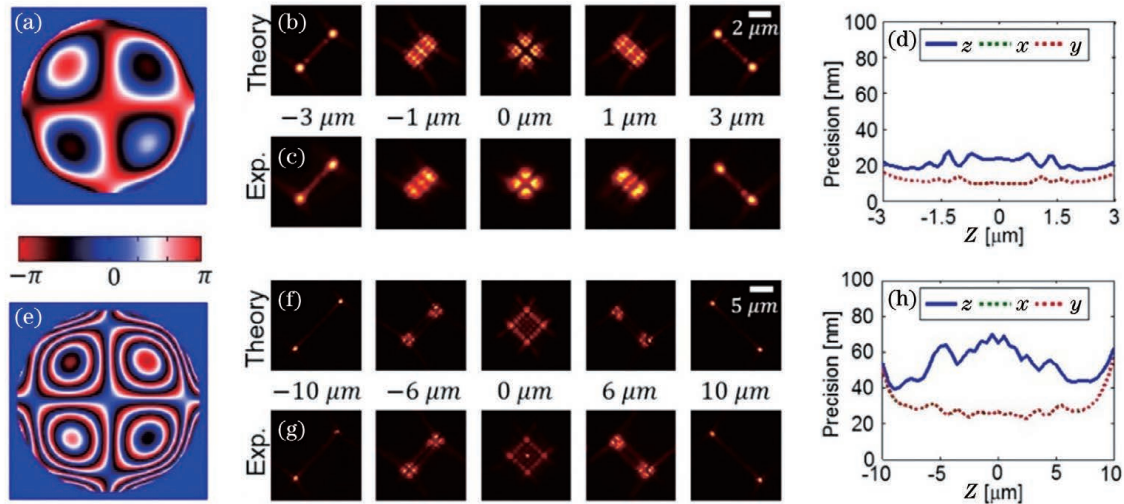


图 7 四足形 PSF 的深度单分子定位成像。(a)用于 $6 \mu\text{m}$ 深度成像的相位图;(b)不同深度下的模拟 PSF($6 \mu\text{m}$);(c)不同深度下的实验 PSF($6 \mu\text{m}$);(d)不同深度下的三维定位精度($6 \mu\text{m}$);(e)用于 $20 \mu\text{m}$ 深度成像的相位图;(f)不同深度下的模拟 PSF($20 \mu\text{m}$);(g)不同深度下的实验 PSF($20 \mu\text{m}$);(h)不同深度下的三维定位精度($20 \mu\text{m}$)^[48]

Fig. 7 Deep single-molecule localization imaging of quadruped PSF. (a) Phase image for $6 \mu\text{m}$ depth imaging; (b) simulated PSF at different depths ($6 \mu\text{m}$); (c) experimental PSF at different depths ($6 \mu\text{m}$); (d) three-dimensional positioning accuracy at different depths ($6 \mu\text{m}$); (e) phase image for $20 \mu\text{m}$ depth imaging; (f) simulated PSF at different depths ($20 \mu\text{m}$); (g) experimental PSF at different depths ($20 \mu\text{m}$); (h) three-dimensional positioning accuracy at different depths ($20 \mu\text{m}$)^[48]

在传统多色单分子定位成像中, 一般需要按顺序采集单色图像或用多个相机、分视场成像, 系统复杂度高、成像时间长。SLM 作为一种相位调制器件, 对不同波长的光具有不同的相位响应, 可表示为

$$\phi_p(x_p, y_p, \lambda) = f[g(x_p, y_p), \lambda], \quad (12)$$

式中, g 为 SLM 上的像素灰度值, ϕ_p 为 SLM 产生的相位调制值。可以发现, 不同波长的光经过同一 SLM 调制后会产生不同的相移, 不同波长聚焦成的 PSF 也有一定差异。Shechtman 等^[49]在四足形 PSF 的基础上, 利用 SLM 对不同波长光的相位-灰度响应特性, 设计出了用于生成双色四足形 PSF 的相位图。当红色荧光和绿色荧光通过同一 SLM 调制后, 可在不同的空间位置生成不同形状的四足形 PSF, 从而实现多色单分子定位成像, 大大降低了多色成像 SMLM 光学系统的复杂度。

随着人工智能和深度学习的迅速发展, PSF 工

程的应用在众多领域中都成为了热门研究方向。Hershko 等^[50]将深度学习用于多色单分子成像的 PSF 设计中, 其结构如图 8 所示。将 SLM 相位图的优化过程与单分子图像颜色识别过程融入神经网络中, 用 SLM 对荧光进行调制, 从而实现 4 色单分子图像中的颜色识别。

SMLM 要求在每帧图像中点亮的荧光分子必须是稀疏的, 如果单分子之间发生重叠, 算法很难精确定位单个分子的位置。目前, 人们已经提出了多种用于高分子密度的单分子定位算法^[51-54]。Nehme 等^[55]将深度学习用于 PSF 设计和高密度单分子定位的联合优化, 在高荧光分子密度条件下实现了 $4 \mu\text{m}$ 深度下的单分子成像。Ikoma 等^[56]利用神经网络, 将多通道 PSF 设计与单分子定位联合优化, 即端到端优化, 也被称为 Neuron PSF 工程, 在仿真中实现了 $10 \mu\text{m}$ 深度下的稀疏单分子定位成像。

一般来说, SMLM 技术需要收集相当多的荧光

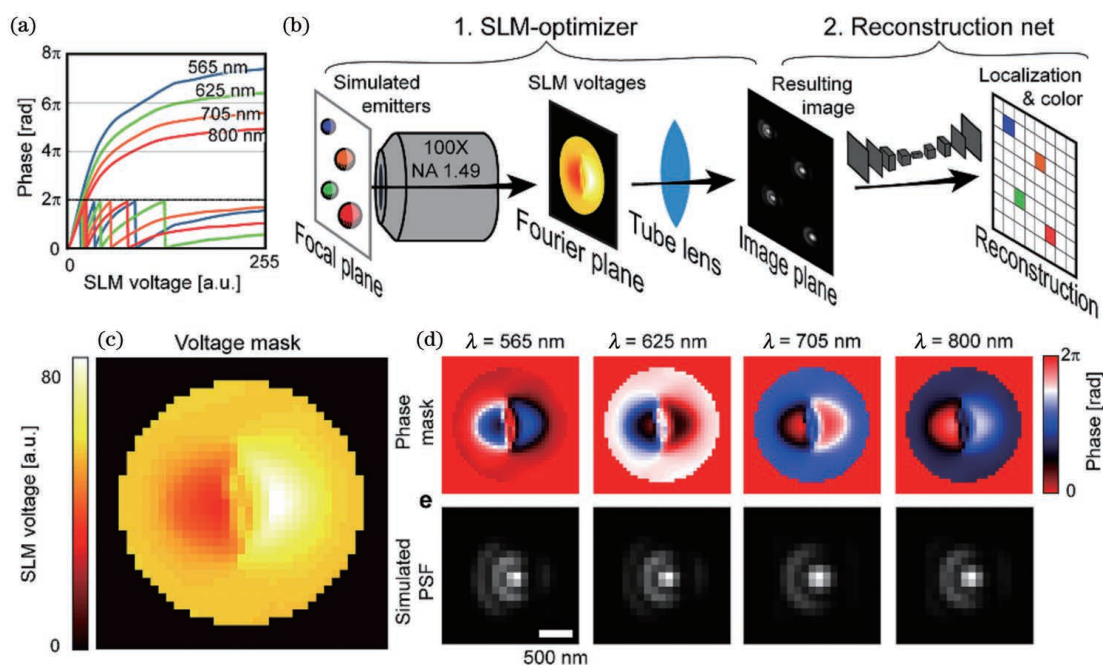


图 8 基于深度学习的 PSF 设计。(a)不同波长对应的相位响应;(b)PSF 设计的流程;(c)用于颜色分类的 SLM 灰度图;(d)SLM 灰度图对应不同波长的相位响应;(e)不同波长生成的 PSF^[50]

Fig. 8 PSF design based on deep learning. (a) Phase response corresponding to different wavelengths; (b) PSF design process; (c) SLM gray scale image for color classification; (d) phase response of SLM gray scale image corresponding to different wavelengths; (e) PSF generated by different wavelengths^[50]

光子数,因此,Balzarotti 等^[35]提出了最小光子通量(MINFLUX)定位显微技术。该方法在激发光路中插

入涡旋相位板,使激发光在样品上形成空心 PSF,如图 9 所示。其中,涡旋相位板的相位分布可表示为

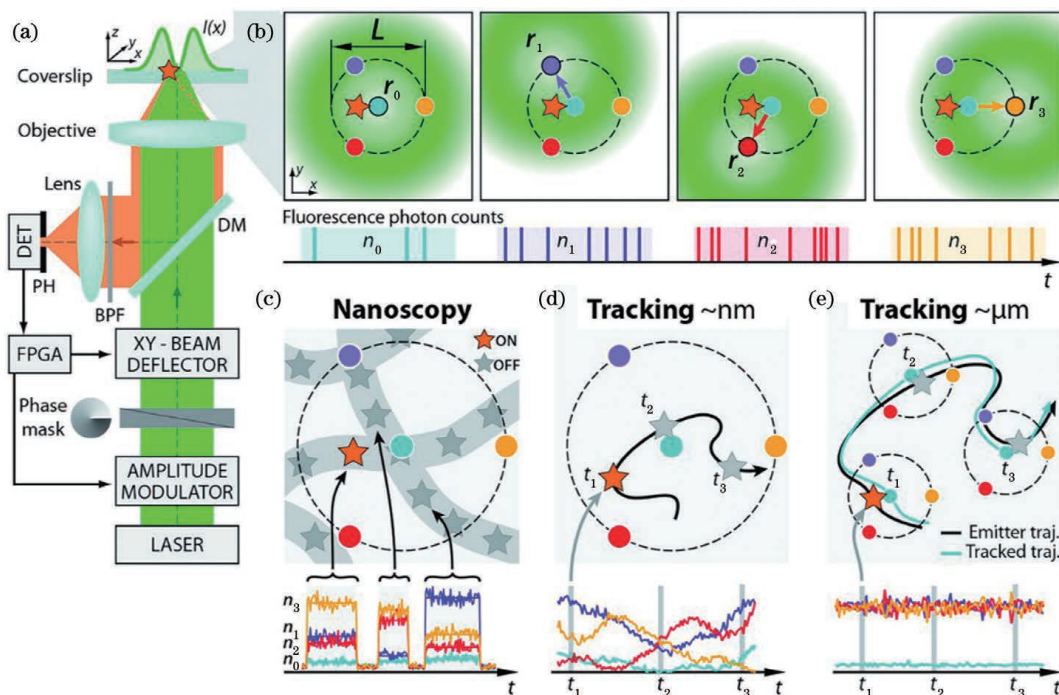


图 9 MINFLUX 系统的原理。(a)系统原理;(b)空心 PSF 的移动;(c)纳米显微成像;(d)纳米范围内的单分子追踪;(e)微米范围内的单分子追踪^[35]

Fig. 9 Principle of the MINFLUX system. (a) System principle; (b) movement of hollow PSF; (c) nano microscopy imaging; (d) single molecule tracking in the nanometer range; (e) single molecule tracking in the micrometer range^[35]

$$\phi_p(\rho, \varphi) = \varphi, \quad (13)$$

式中, φ 为显微镜入瞳面上的角向坐标。图 9(a) 中的荧光由探测器 (DET) 接收, 并将荧光信号反馈给现场可编程门阵列 (FPGA), 再通过 FPGA 控制光束偏转器 (XY-BEAM DEFLECTOR) 和光放大器 (AMPLITUDE MODULATOR), 以控制空心 PSF 的移动和光强大小。其中, PH 为针孔, BPF 为荧光带通滤光片, DM 为二色镜。图 9(b) 中, L 为荧光信号的探测范围, r_1, r_2, r_3 和 r_4 为空心 PSF 移动的位置, n_1, n_2, n_3 和 n_4 为空心 PSF 在 4 个位置时探测器收集的光子数, t_1, t_2 和 t_3 为荧光分子位于不同位置的时间。当荧光分子处于 PSF 中心位置时, 无荧光发出。当荧光分子与激发光 PSF 的中心有微小位移发生时, 才会发出荧光, 且荧光强度与荧光分子和激发光 PSF 中心的距离有关。由于激发光 PSF 的中心位置是已知的, 因此, 可通过荧光强度判断荧光分子的位置, 且位移越小, 所需要的光子数就越少^[57]。MINFLUX 能成功分辨出间隔小于 6 nm 的脱氧核糖核酸 (DNA) 折纸结构, 且能够实现高时空分辨率的单分子追踪。

Gwosch 等^[58] 采用 MINFLUX 技术实现了三维多色成像, 该系统在 xy 平面空心 PSF 的基础上叠加了一个由 $0 \sim \pi$ 相位板调制生成的轴向空心 PSF, 从而生成三维方向上的空心 PSF。其中, $0 \sim \pi$

相位板的相位分布可表示为

$$\phi_p(\rho, \varphi) = \begin{cases} 0, & r_0 < \rho < 1 \\ \pi, & 0 < \rho \leq r_0 \end{cases}, \quad (14)$$

式中, r_0 为 π 相位分布所占圆环的半径。

4 点扫描计算显微成像

相比传统的宽场显微镜, 共聚焦显微镜^[59] 作为点扫描显微镜中的代表, 可在提高系统分辨率的同时提供光切片能力, 但其分辨率仍未能突破衍射极限。Kuang 等^[60] 在传统共聚焦显微镜中对系统光瞳函数的相位进行调制, 提出了荧光辐射微分 (FED) 显微成像技术, 在低光强下打破了衍射极限, 其原理如图 10 所示。该技术在成像中先后采用两种不同的 PSF 对样品进行激发, 首先, 采用未加相位调制的实心 PSF 激发样品, 得到一张常规的共聚焦图像。然后, 在激发光波长不变的情况下, 采用经涡旋相位调制的空心 PSF 对样品进行激发, 得到一张负共聚焦的图像。最后, 用常规共聚焦图像减去带权重因子的负共聚焦图像, 可表示为

$$I_{\text{FED}} = I_c - r \cdot I_n, \quad (15)$$

式中, I_{FED} 为 FED 图像, I_c 为共聚焦图像, I_n 为负共聚焦图像, r 为相减系数。(15) 式可缩小系统的等效 PSF, 从而达到突破衍射极限的成像效果。

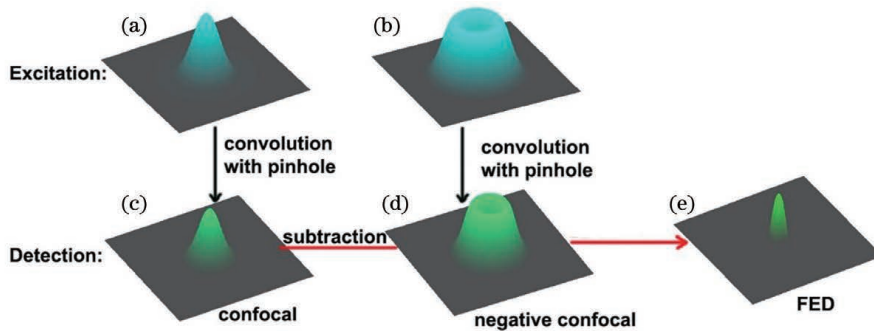


图 10 FED 的原理图。(a) 共聚焦激发光 PSF; (b) 负激发光 PSF; (c) 共聚焦的成像 PSF; (d) 负共聚焦的成像 PSF; (e) FED 成像的 PSF^[60]

Fig. 10 Schematic diagram of the FED. (a) PSF of the confocal excitation; (b) PSF of the negative excitation; (c) PSF of the confocal imaging; (d) PSF of the negative confocal imaging; (e) PSF of the FED imaging^[60]

You 等^[61] 将镜面辅助的 4Pi 架构引入 FED 显微镜中, 其结构如图 11 所示。该方法在横向采用两个空心光斑干涉, 形成二维方向上的负激发 PSF; 在轴向上使用实心光斑干涉, 形成轴向上的负激发 PSF, 并提出了各向同性 FED 技术。其中, 用于生成实心双焦点的光瞳函数相位分布可表示为

$$\Delta\varphi_0 = \frac{\pi}{2} \text{sgn}[\sin(kz_0 \cos \theta)], \quad (16)$$

式中, k 为波数, z_0 为双焦点之间的半距离, θ 为聚焦光束与光轴间的夹角。若要生成空心双焦点, 则光瞳函数的相位分布需满足

$$\phi_p = \Delta\varphi_0 + \varphi. \quad (17)$$

You 等^[62] 使用涡旋相位板产生横向上的负激发 PSF, 再与 $0 \sim \pi$ 相位板生成的轴向负激发 PSF 叠加, 结果如图 12 所示。Zhao 等^[63] 采用 SLM 调

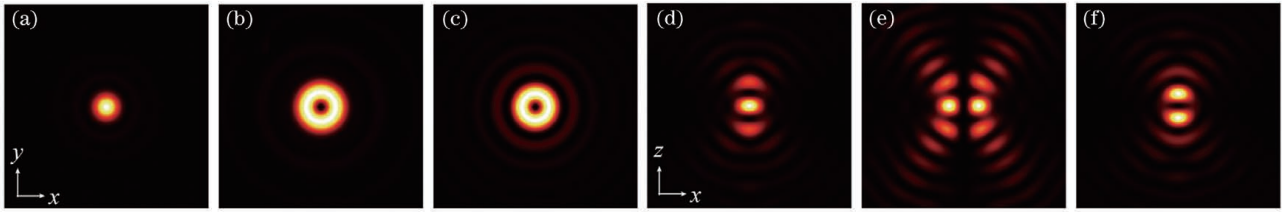


图 11 各向同性 FED 的 PSF。(a)共聚焦激发光的横向(xy)PSF;(b)横向负激发光的横向(xy)PSF;(c)轴向负激发光的横向(xy)PSF;(d)共聚焦激发光的轴向(xz)PSF;(e)横向负激发光的轴向(xz)PSF;(f)轴向负激发光的轴向(xz)PSF^[61]

Fig. 11 PSF for isotropic FED. (a) Lateral (xy) PSF of confocal excitation light; (b) lateral (xy) PSF of lateral negative excitation light; (c) lateral (xy) PSF of axial negative excitation light; (d) axial (xz) PSF of confocal excitation light; (e) axial (xz) PSF of lateral negative excitation light; (f) axial (xz) PSF of axial negative excitation light^[61]

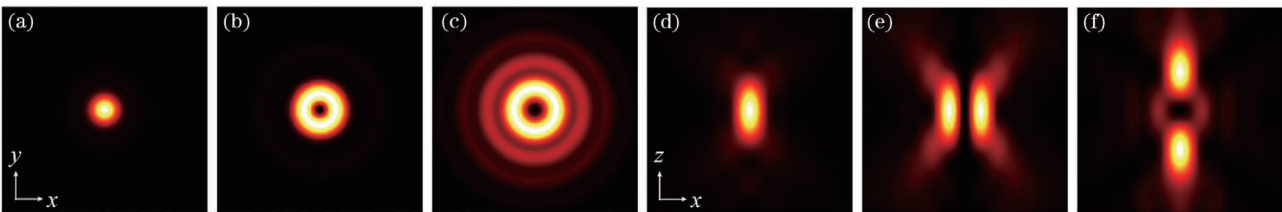


图 12 三维 FED 的 PSF。(a)共聚焦激发光的横向(xy)PSF;(b)横向负激发光的横向(xy)PSF;(c)轴向负激发光的横向(xy)PSF;(d)共聚焦激发光的轴向(xz)PSF;(e)横向负激发光的轴向(xz)PSF;(f)轴向负激发光的轴向(xz)PSF^[62]

Fig. 12 PSF of three-dimensional FED. (a) Lateral (xy) PSF of confocal excitation light; (b) lateral (xy) PSF of lateral negative excitation light; (c) lateral (xy) PSF of axial negative excitation light; (d) axial (xz) PSF of confocal excitation light; (e) axial (xz) PSF of lateral negative excitation light; (f) axial (xz) PSF of axial negative excitation light^[62]

制的方式,灵活切换光瞳函数的 0 相位、涡旋相位和 $0 \sim \pi$ 相位的分布,并在实验上验证了三维 FED 成像的可行性。

除了用相位调制方式产生空心光斑作为负激发 PSF 外,Rong 等^[64]采用偏振调制方式在传统共聚焦显微镜中引入圆柱形偏振光,实现了二维 FED 成像。在未加相位调制下,利用切向偏振光聚焦生成

了空心的负激发 PSF,如图 13(a)~图 13(c)所示;利用径向偏振光聚焦生成共聚焦激发 PSF,如图 13(d)~图 13(f)所示。其中,切向偏振光的琼斯矩阵可表示为

$$\begin{bmatrix} p_x(\rho, \varphi) \\ p_y(\rho, \varphi) \\ 0 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -\sin \varphi \\ \cos \varphi \\ 0 \end{bmatrix}, \quad (18)$$

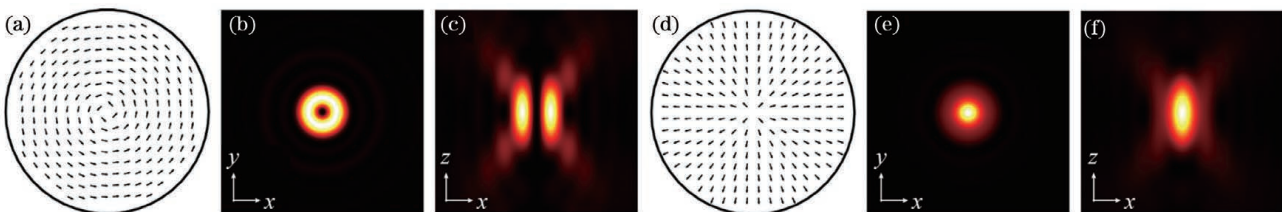


图 13 圆柱偏振光 FED。(a)切向偏振光;(b)负激发光的横向(xy)PSF;(c)负激发光的轴向(xz)PSF;(d)径向偏振光;(e)共聚焦激发光的横向(xy)PSF;(f)共聚焦激发光的轴向(xz)PSF^[64]

Fig. 13 Cylindrical polarized light FED. (a) Tangentially polarized light; (b) lateral (xy) PSF of negative excitation light; (c) axial (xz) PSF of negative excitation light; (d) radially polarized light; (e) lateral (xy) PSF of confocal excitation light; (f) axial (xz) PSF of confocal excitation light^[64]

径向偏振光的琼斯矩阵可表示为

$$\begin{bmatrix} p_x(\rho, \varphi) \\ p_y(\rho, \varphi) \\ 0 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos \varphi \\ \sin \varphi \\ 0 \end{bmatrix}. \quad (19)$$

由于切向偏振光生成的空心 PSF 内径比传统涡旋相位板调制生成的空心 PSF 内径更小,且径向偏振光生成的共聚焦激发 PSF 的边缘尺寸更大,因此,两种 PSF 相减后可得到比传统 FED 更少的负值,从而提高了成像质量。

Zhao 等^[65]提出了饱和吸收竞争(SAC)显微成像技术,其原理如图 14 所示。该技术将激发光分为两路,一路采用涡旋相位板(VPP)生成空心 PSF,另一路不经过调制生成实心 PSF,并用声光调制器(AOM)对光强进行调制,基于荧光的饱和效应缩小系统的等效 PSF,从而突破衍射极限。其中,WP 为波片, PBS 为偏振分束器, M 为反射镜, PMT 为光电倍增管, OL 为显微物镜。SAC 技术最大的优点就是在成像时不用受限于特定的荧光染料,但在信号提取时,对锁相放大器的性能要求较高,否则会丢失很多有用信号,从而降低图像的信噪比。Li 等^[66]提出了脉冲 SAC 技术,相比连续的 SAC 提高了成像信噪比,但在用脉冲光作为激发光时,需在两路光中引入时间延迟,增加了系统的复杂度。

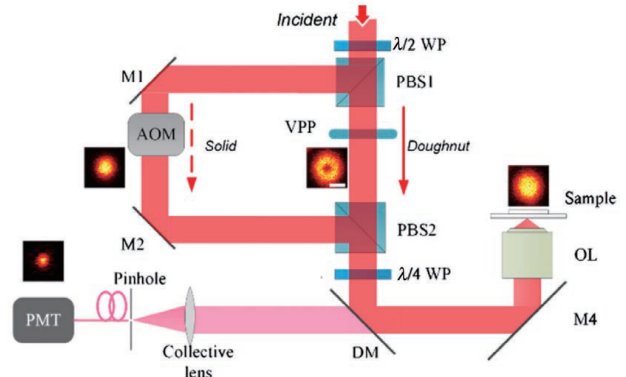


图 14 SAC 的原理图^[65]

Fig. 14 Schematic diagram of the SAC^[65]

Zhao 等^[67]基于荧光饱和效应提出了一种非线性焦斑调制显微(NFOMM)技术,该技术对激发光的 PSF 进行调控,重新分配 PSF 的空间频率,从而使系统保留来自样品的高频分量,基本原理如图 15(a)所示。其中, $[E_x, E_y, E_z]^T$ 为入射光波,符号 M 表示逐元素相乘, $[p_x, p_y, p_z]^T$ 为对入射光施加的偏振调制琼斯矩阵, $e^{i\Delta\alpha(x,y)}$ 为对入射光施加的相位调制,OBJ 为显微物镜,SP 为样品平面。激发光的光瞳函数经过偏振与相位调控,在样品面聚焦为不同形状的 PSF。在传统的点扫描显微镜中,激发光的 PSF 为高斯型,如图 15(b)的左列所示,图 15(b)的中列和右列分别为 NFOMM 中使用

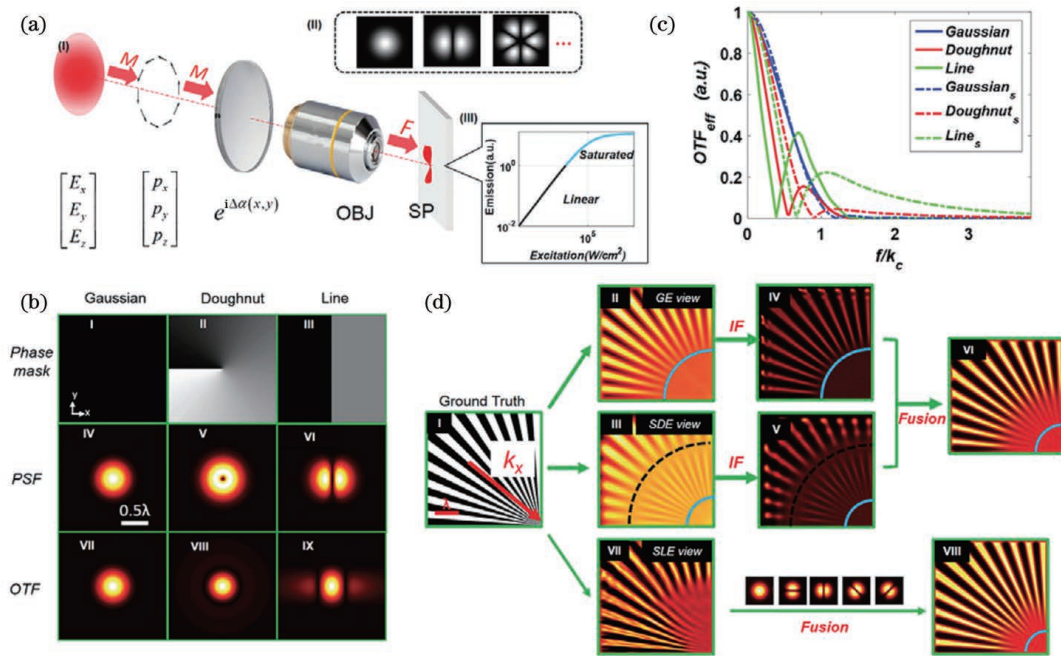


图 15 NFOMM 的原理。(a)原理图;(b)相位板及系统的有效 PSF 和 OTF;(c)OTF 曲线;(d)仿真成像结果^[67]

Fig. 15 Principle of the NFOMM. (a) Schematic diagram; (b) effective PSF and OTF of phase plate and system; (c) OTF curve; (d) simulated imaging structure^[67]

的甜甜圈 PSF 和线形 PSF。当激发光的功率增加时,从三种激发光 PSF 对应的光学传递函数(OTF)中可以发现,饱和甜甜圈(SDE)PSF 具有多于饱和高斯(GE)PSF 的高频分量,而 y 方向的饱和线形(SLE)PSF 则涵盖了更多沿 x 方向的高频分量。图 15(c)为沿 x 方向系统有效 OTF 的归一化曲线,通过移频算法^[68-69]重建的超分辨图像如图 15(d)所示。

5 结 论

在基于 PSF 工程的计算显微成像技术中,探测器获得的原始图像与样品的实际图像不需要相似,在获取样品的隐藏信息(如深度、光谱)方面具有巨大潜力,其成像自由度也超出了人眼能够直接看到的信息。生成特殊 PSF 的方法大多都是基于已有的物理模型,如采用涡旋相位板或切向偏振光产生空心的 PSF。这类方法虽能稳定生成目标的 PSF,但其包含的信息量十分有限,难以用于复杂的成像场景。采用优化算法设计的 PSF 能在一定程度上解决复杂场景下的成像需要。但基于 PSF 工程的计算显微成像技术大多依赖 PSF 的先验信息,而显微镜中像差会严重影响系统的 PSF,使人为调控产生的 PSF 在实验中偏离理论值,因此,对显微镜的像差进行补偿具有重要意义。同时,PSF 工程依赖于对系统光瞳函数的调制,且已有的光调制器件性能有限,很难直接对光瞳函数的全矢量(偏振、振幅和相位)进行调制。虽然可通过间接调控的方式来实现^[70],但系统装置比较复杂,且稳定性较差,因此,如何简单直接地调制系统的光瞳函数,对于提高 PSF 工程的自由度具有重要意义。

目前,深度学习已经成功解决了显微镜中的各种难题,如去噪、聚类、体成像^[71],但这些应用大多属于图像处理范畴。通过深度学习设计用于特定目标场景下的最佳成像系统或 PSF,是目前相关领域的重点研究课题。如为高分子密度的单分子三维定位显微成像设计最佳的 PSF,并将深度或颜色信息编码到 PSF 中、用于光学摄影中的图像深度估计^[72]或景深延拓^[73]。将 PSF 工程与深度学习相结合,会在计算显微成像领域和其他相关领域大放光彩,并进一步增加人类通过成像系统所能感知的信息量。

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] Goodman J W. Introduction to Fourier optics [M]. Colorado: Roberts and Company Publishers, 2005.
- [3] Airy G B. On the diffraction of an object-glass with circular aperture[J]. Transactions of the Cambridge Philosophical Society, 1835, 5: 283.
- [4] Mansfield S M, Kino G S. Solid immersion microscope[J]. Applied Physics Letters, 1990, 57(24): 2615-2616.
- [5] Hell S, Stelzer E H K. Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope [J]. Journal of the Optical Society of America A, 1992, 9(12): 2159-2166.
- [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] Blom H, Widengren J. Stimulated emission depletion microscopy[J]. Chemical Reviews, 2017, 117(11): 7377-7427.
- [8] Dickson R M, Cubitt A B, Tsien R Y, et al. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein[J]. Nature, 1997, 388(6640): 355-358.
- [9] Betzig E. Proposed method for molecular optical imaging [J]. Optics Letters, 1995, 20(3): 237-239.
- [10] 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.
- [11] Möckl L, Lamb D C, Bräuchle C. Super-resolved fluorescence microscopy: Nobel Prize in chemistry 2014 for Eric Betzig, Stefan Hell, and William E. Moerner [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2014, 53(51): 13972-13977.
- [12] Richards B, Wolf E. Electromagnetic diffraction in optical systems, II. structure of the image field in an aplanatic system [J]. Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences, 1959, 253(1274): 358-379.
- [13] Gu M. Advanced optical imaging theory [M]. Heidelberg: Springer, 2000.
- [14] Hao X, Kuang C F, Wang T T, et al. Effects of polarization on the de-excitation dark focal spot in STED microscopy[J]. Journal of Optics, 2010, 12(11): 115707.
- [15] Török P, Varga P. Electromagnetic diffraction of light focused through a stratified medium [J]. Applied Optics, 1997, 36(11): 2305-2312.
- [16] Born M, Wolf E, Bhatia A B, et al. Principles of optics[M]. 7th ed. Cambridge: Cambridge

- University Press, 1999.
- [17] Ashkin A, Dziedzic J M, Bjorkholm J E, et al. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles[J]. *Optics Letters*, 1986, 11(5): 288-290.
- [18] Leutenegger M, Rao R, Leitgeb R A, et al. Fast focus field calculations[J]. *Optics Express*, 2006, 14(23): 11277-11291.
- [19] Lin J, Rodriguez-Herrera O G, Kenny F, et al. Fast vectorial calculation of the volumetric focused field distribution by using a three-dimensional Fourier transform[J]. *Optics Express*, 2012, 20(2): 1060-1069.
- [20] Cai Y N, Wang Z J, Liang Y S, et al. Direct calculation of tightly focused field in an arbitrary plane[J]. *Optics Communications*, 2019, 450: 329-334.
- [21] Shechtman Y, Sahl S J, Backer A S, et al. Optimal point spread function design for 3D imaging [J]. *Physical Review Letters*, 2014, 113(13): 133902.
- [22] Hanser B M, Gustafsson M G L, Agard D A, et al. Phase-retrieved pupil functions in wide-field fluorescence microscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 2004, 216(1): 32-48.
- [23] Weiss L E, Shalev Ezra Y, Goldberg S, et al. Three-dimensional localization microscopy in live flowing cells[J]. *Nature Nanotechnology*, 2020, 15(6): 500-506.
- [24] Gahlmann A, Ptacin J L, Grover G, et al. Quantitative multicolor subdiffraction imaging of bacterial protein ultrastructures in three dimensions [J]. *Nano Letters*, 2013, 13(3): 987-993.
- [25] Cai Y N, Yan S H, Wang Z J, et al. Rapid tilted-plane Gerchberg-Saxton algorithm for holographic optical tweezers[J]. *Optics Express*, 2020, 28(9): 12729-12739.
- [26] Di Leonardo R, Ianni F, Ruocco G. Computer generation of optimal holograms for optical trap arrays [J]. *Optics Express*, 2007, 15(4): 1913-1922.
- [27] Meyer L, Wildanger D, Medda R, et al. Dual-color STED microscopy at 30-nm focal-plane resolution [J]. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 2008, 4(8): 1095-1100.
- [28] Itoh H, Matsumoto N, Inoue T. Spherical aberration correction suitable for a wavefront controller [J]. *Optics Express*, 2009, 17(16): 14367-14373.
- [29] Lamprecht B, Satzinger V, Schmidt V, et al. Spatial light modulator based laser microfabrication of volume optics inside solar modules [J]. *Optics Express*, 2018, 26(6): A227-A239.
- [30] Juette M F, Gould T J, Lessard M D, et al. Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples [J]. *Nature Methods*, 2008, 5(6): 527-529.
- [31] Ram S, Prabhat P, Chao J, et al. High accuracy 3D quantum dot tracking with multifocal plane microscopy for the study of fast intracellular dynamics in live cells[J]. *Biophysical Journal*, 2008, 95(12): 6025-6043.
- [32] 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.
- [33] Pavani S R P, Thompson M A, Biteen J S, et al. Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(9): 2995-2999.
- [34] Jia S, Vaughan J C, Zhuang X W. Isotropic three-dimensional super-resolution imaging with a self-bending point spread function[J]. *Nature Photonics*, 2014, 8(4): 302-306.
- [35] 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.
- [36] 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.
- [37] Pavani S R P, Piestun R. High-efficiency rotating point spread functions[J]. *Optics Express*, 2008, 16(5): 3484-3489.
- [38] Piestun R, Schechner Y Y, Shamir J. Propagation-invariant wave fields with finite energy[J]. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision*, 2000, 17(2): 294-303.
- [39] Greengard A, Schechner Y Y, Piestun R. Depth from diffracted rotation[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(2): 181-183.
- [40] Grover G, Quirin S, Fiedler C, et al. Photon efficient double-helix PSF microscopy with application to 3D photo-activation localization imaging [J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, 2(11): 3010-3020.
- [41] Prasad S. Rotating point spread function via pupil-phase engineering[J]. *Optics Letters*, 2013, 38(4): 585-587.
- [42] Berlich R, Stallinga S. High-order-helix point spread functions for monocular three-dimensional imaging

- with superior aberration robustness [J]. *Optics Express*, 2018, 26(4): 4873-4891.
- [43] Siviloglou G, Broky J, Dogariu A, et al. Observation of accelerating Airy beams [J]. *Physical Review Letters*, 2007, 99(21): 213901.
- [44] Siviloglou G A, Christodoulides D N. Accelerating finite energy Airy beams [J]. *Optics Letters*, 2007, 32(8): 979-981.
- [45] Zhou Y Z, Zickus V, Zammit P, et al. High-speed extended-volume blood flow measurement using engineered point-spread function [J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(12): 6444-6454.
- [46] Abraham A V, Ram S, Chao J, et al. Quantitative study of single molecule location estimation techniques [J]. *Optics Express*, 2009, 17(26): 23352-23373.
- [47] Smith C S, Joseph N, Rieger B, et al. Fast, single-molecule localization that achieves theoretically minimum uncertainty [J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 373-375.
- [48] Shechtman Y, Weiss L E, Backer A S, et al. Precise three-dimensional scan-free multiple-particle tracking over large axial ranges with tetrapod point spread functions [J]. *Nano Letters*, 2015, 15(6): 4194-4199.
- [49] Shechtman Y, Weiss L E, Backer A S, et al. Multicolour localization microscopy by point-spread-function engineering [J]. *Nature Photonics*, 2016, 10: 590-594.
- [50] Hershko E, Weiss L E, Michaeli T, et al. Multicolor localization microscopy and point-spread-function engineering by deep learning [J]. *Optics Express*, 2019, 27(5): 6158-6183.
- [51] Qu X H, Wu D, Mets L, et al. Nanometer-localized multiple single-molecule fluorescence microscopy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(31): 11298-11303.
- [52] Dertinger T, Colyer R, Iyer G, et al. Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(52): 22287-22292.
- [53] Holden S J, Uphoff S, Kapanidis A N. DAOSTORM: an algorithm for high-density super-resolution microscopy [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(4): 279-280.
- [54] Huang F, Schwartz S L, Byars J M, et al. Simultaneous multiple-emitter fitting for single molecule super-resolution imaging [J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, 2(5): 1377-1393.
- [55] Nehme E, Freedman D, Gordon R, et al. DeepSTORM3D: dense 3D localization microscopy and PSF design by deep learning [J]. *Nature Methods*, 2020, 17(7): 734-740.
- [56] Ikoma H, Peng Y F, Broxton M, et al. Snapshot multi-PSF 3D single-molecule localization microscopy using deep learning [C] // *Computational Optical Sensing and Imaging 2020*, June 22-26, 2020, Washington, DC, United States. Washington, DC: OSA, 2020: CW3B.3.
- [57] Li Y Z, Li C K, Hao X, et al. Review and prospect for single molecule localization microscopy [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2020, 57(24): 240002.
李雨竹, 李传康, 郝翔, 等. 基于单分子定位成像技术的研究及展望 [J]. *激光与光电子学进展*, 2020, 57(24): 240002.
- [58] Gwosch K C, Pape J K, Balzarotti F, et al. MINFLUX nanoscopy delivers 3D multicolor nanometer resolution in cells [J]. *Nature Methods*, 2020, 17(2): 217-224.
- [59] Wilson T. Resolution and optical sectioning in the confocal microscope [J]. *Journal of Microscopy*, 2011, 244(2): 113-121.
- [60] Kuang C, Li S, Liu W, et al. Breaking the diffraction barrier using fluorescence emission difference microscopy [J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 1441.
- [61] You S T, Kuang C F, Rong Z H, et al. Isotropic superresolution imaging for fluorescence emission difference microscopy [J]. *Applied Optics*, 2014, 53(33): 7838-7844.
- [62] You S T, Kuang C F, Li S, et al. Three-dimensional super-resolution imaging for fluorescence emission difference microscopy [J]. *AIP Advances*, 2015, 5(8): 084901.
- [63] Zhao G Y, Rong Z H, Kuang C F, et al. 3D fluorescence emission difference microscopy based on spatial light modulator [J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2016, 9(3): 1641003.
- [64] Rong Z H, Kuang C F, Fang Y, et al. Super-resolution microscopy based on fluorescence emission difference of cylindrical vector beams [J]. *Optics Communications*, 2015, 354: 71-78.
- [65] Zhao G Y, Kabir M M, Toussaint K C, et al. Saturated absorption competition microscopy [J]. *Optica*, 2017, 4(6): 633-636.
- [66] Li C K, Li Y H, Han Y B, et al. Pulsed saturated absorption competition microscopy on nonbleaching nanoparticles [J]. *ACS Photonics*, 2020, 7(7): 1788-1798.

- [67] Zhao G Y, Zheng C, Kuang C F, et al. Nonlinear focal modulation microscopy [J]. *Physical Review Letters*, 2018, 120(19): 193901.
- [68] Hao X, Yang Q, Kuang C F, et al. Optical super-resolution imaging based on frequency shift[J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(1): 0111001.
郝翔, 杨青, 匡翠方, 等. 光学移频超分辨成像技术进展[J]. *光学学报*, 2021, 41(1): 0111001.
- [69] Chen Y C, Li C K, Hao X, et al. Progress of point scanning super-resolution microscopy based on frequency shifting [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2020, 57(18): 180001.
陈宇宸, 李传康, 郝翔, 等. 点扫描移频超分辨显微成像进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2020, 57(18): 180001.
- [70] Han W, Yang Y F, Cheng W, et al. Vectorial optical field generator for the creation of arbitrarily complex fields [J]. *Optics Express*, 2013, 21(18): 20692-20706.
- [71] Belthangady C, Royer L A. Applications, promises, and pitfalls of deep learning for fluorescence image reconstruction[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(12): 1215-1225.
- [72] Ikoma H, Nguyen C M, Metzler C A, et al. Depth from defocus with learned optics for imaging and occlusion-aware depth estimation [C] // 2021 IEEE International Conference on Computational Photography (ICCP), May 23-25, 2021, Haifa, Israel. New York: IEEE, 2021: 1-12.
- [73] Sitzmann V, Diamond S, Peng Y F, et al. End-to-end optimization of optics and image processing for achromatic extended depth of field and super-resolution imaging [J]. *ACM Transactions on Graphics*, 2018, 37(4): 1-13.