

双螺旋点扩散函数技术及应用研究进展

曹博^{1,2}, 曹慧群^{3*}, 林丹樱¹, 屈军乐¹, 于斌^{1**}

¹深圳大学物理与光电工程学院生物医学光子学研究中心光电子器件与系统教育部/广东省重点实验室, 广东 深圳 518060;

²深圳大学电子与信息工程学院, 广东 深圳 518060;

³深圳大学化学与环境工程学院, 广东 深圳 518060

摘要 双螺旋点扩散函数(DH-PSF)技术通过对成像系统光瞳面波前相位的调控,将系统的PSF改造为DH-PSF,可实现大深度、高精度的三维纳米尺度成像,被广泛应用于生命科学、材料科学、工业检测等领域。详细阐述了DH-PSF技术的基本原理、DH相位片的设计方法及其运用方法,并在此基础上介绍了该方法在深度估计技术、纳米尺度三维单颗粒示踪、超分辨荧光显微技术、新型激光扫描荧光显微技术等领域的应用研究进展,着重讨论了DH-PSF技术在这些应用实例中的优势,为相关领域的研究提供有益的参考。最后,对DH-PSF技术及其应用的发展方向进行展望。

关键词 荧光显微成像; 超分辨成像; 双螺旋点扩散函数; 单颗粒示踪; 深度估计

中图分类号 O438

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP202259.1800001

Research Progress of Double-Helix Point Spread Function Engineering and Its Application

Cao Bo^{1,2}, Cao Huiqun^{3*}, Lin Danying¹, Qu Junle¹, Yu Bin^{1**}

¹Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, Center for Biomedical Optics and Photonics, College of Physics and Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China;

²College of Electronics and Information Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China;

³College of Chemistry and Environmental Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China

Abstract In double-helix point spread function (DH-PSF) engineering, the PSF of the conventional imaging system is transformed into DH-PSF using a regulation of pupil surface wavefront phase of imaging system to realize large-depth, high-precision nanoscale three-dimensional (3D) imaging. The DH-PSF is widely applied in life-science and material-science research, industrial detection, and other fields. In this study, the basic principle of the DH-PSF and the design and application methods of the DH phase mask are described in detail. Based on these, the applications of the DH-PSF to depth estimation, nanoscale 3D single-particle tracking, super-resolution fluorescence microscopy, and laser scanning fluorescence microscopy are introduced. The advantages of the DH-PSF technology in these application examples are emphasized, providing a useful reference for research in related fields. Finally, the prospects of the development direction of the DH-PSF technology and its application are discussed.

Key words fluorescence microscopy; super-resolution imaging; double-helix point spread function; single particle tracking; depth estimation

1 引言

近年来,光场调控技术蓬勃发展^[1-3],通过对光束的

振幅、相位和偏振态等物理量的时空分布进行调控,获得了具有特殊时空结构的新型光束,如涡旋光束、艾里(Airy)光束、旋转光束(rotating beams)^[4-5]等,拓展了光

收稿日期: 2022-02-15; 修回日期: 2022-03-08; 录用日期: 2022-03-17

基金项目: 国家自然科学基金(61975131,62175166,61835009,62127819,61775144)、中国博士后科学基金(2018M643154)、深圳市基础研究项目(JCYJ20200109105411133,JCYJ20180305125649693)

通信作者: *chq0524@163.com; **yubin@szu.edu.cn

学技术在信息、化学、生命和材料领域的交叉应用,已成为当前光学及相关学科领域的一个前沿研究热点。

在有限能量自成像^[6]和广义传播不变光场^[7]的基础上,2000年,Piestun等^[8]提出了有限能量的传播不变光场的广义自成像条件,即光场传播一段距离后,光场分布除了发生缩放、旋转之外,其余不变。根据广义自成像条件,旋转光束可通过满足一定约束条件下的拉盖尔-高斯(Laguerre-Gauss, LG)光束线性叠加形成。基于此,2006年,Greengard等^[9]通过线性叠加 LG 模式平面上特定直线上的 LG 模式光得到了双螺旋旋转光束。基于 LG 函数的傅里叶变换的不变特性,双螺旋旋转光束函数作为光学传递函数应用到光学成像系统中,光学系统的点扩散函数则变为双螺旋点扩散函数(DH-PSF),这是 DH-PSF 技术研究的开端。在这种情况下,光学系统的 DH-PSF 由两个主瓣组成,旋转方位与目标点的轴向位置直接相关,可以作为高灵敏的深度估计工具。然而,在最初的实验中,经 4-f 光学系统进行的是振幅调制, DH-PSF 的生成效率非常低,只有几个百分数。使用优化算法,通过相位调制产生 LG 光束的叠加,确保了 DH-PSF 主瓣的能量传输效率略高于 50%^[10]。随着技术的发展, DH-PSF 被广

泛应用于深度信息获取、纳米尺度三维单粒子成像和示踪、超分辨荧光显微成像、激光扫描荧光显微等领域^[11-17],促进了生命科学、材料科学、工业检测等领域的发展。

本文首先详细阐述了 DH-PSF 技术的基本原理、DH-PSF 的设计及实现方法,并在此基础上介绍了基于 DH-PSF 的深度估计技术、纳米尺度单颗粒示踪技术、超分辨荧光显微成像技术、激光扫描荧光显微技术等方面的最新研究进展,最后对发展前景进行展望,旨在帮助研究人员了解 DH-PSF 技术,为该领域科学研究提供一定的参考。

2 双螺旋点扩散函数技术

2.1 双螺旋点扩散函数的基本概念

DH-PSF 是一种三维光学响应,如图 1(b)所示,具有两个随系统离焦量变化的连续旋转的主瓣,且始终保持着光强较为集中的状态,不像图 1(a)标准的三维 PSF 随着离焦量的增加而弥散。由于 DH-PSF 的两个主瓣的旋转角度与物体深度信息直接相关,因此通过计算重构, DH-PSF 成像系统可对物体进行高精度的三维成像和定位。

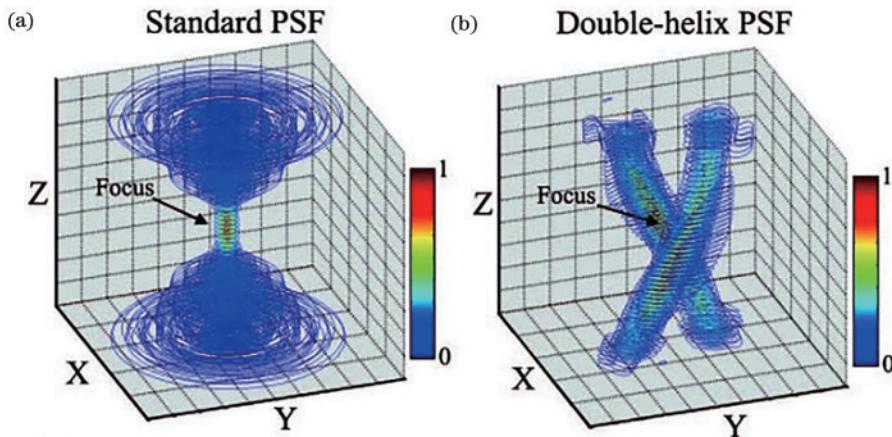


图1 三维强度分布^[15]。(a) Standard PSF; (b) DH-PSF

Fig. 1 3D intensity distribution^[15]. (a) Standard PSF; (b) DH-PSF

在 DH-PSF 技术发展之初, DH-PSF 的产生主要是利用 DH 光束。根据有限能量的传播不变光场的广义自成像条件, DH 光束由位于 LG 模式平面上特定直线上的 LG 模式光的线性叠加^[8]产生。LG 光束模式表示为

$$u_{n,m}(r) = G(\hat{\rho}, \hat{z}) R_{n,m}(\hat{\rho}) \Phi_m(\phi) Z_n(\hat{z}), \quad (1)$$

式中: $r = (\rho, \phi, z)$ 为空间点的柱坐标; $\hat{\rho} = \rho/\omega(\hat{z})$ 是高斯光斑的径向坐标; $\omega(\hat{z}) = \omega_0 [1 + \hat{z}^2]^{1/2}$, ω_0 为束腰半径, 纵向坐标 $\hat{z} = z/z_0$, 瑞利长度 $z_0 = \pi\omega_0^2/\lambda$ 。 $u_{n,m}(r)$ 的组成为

$$G(\hat{\rho}, \hat{z}) = \frac{\omega_0}{\omega(\hat{z})} \exp(-\hat{\rho}^2) \exp(i\hat{\rho}^2 \hat{z}) \exp[-i\psi(\hat{z})], \quad (2)$$

$$R_{n,m}(\hat{\rho}) = (\sqrt{2} \hat{\rho})^{|m|} L_{(n-|m|)/2}^{|m|}(2\hat{\rho}^2), \quad (3)$$

$$\Phi_m(\phi) = \exp(im\phi), \quad (4)$$

$$Z_n(\hat{z}) = \exp[-in\psi(\hat{z})], \quad (5)$$

式中: 古伊相位 $\psi(\hat{z}) = \arctan(\hat{z})$; $L_{(n-|m|)/2}^{|m|}$ 为广义的拉盖尔多项式。整数 n 和 m 应当满足

$$n = |m|, |m| + 2, |m| + 4, |m| + 6, \dots \quad (6)$$

通过对模式数 (m, n) 为 $(1, 1), (3, 5), (5, 9), (7, 13), (9, 17)$ 的 LG 模式进行等权重相干叠加, 形成一个新的光场分布函数, 即 DH 光束。

基于 LG 函数的傅里叶变换的不变特性, DH 光场分布函数作为光学传递函数应用到光学成像系统中, 则光学系统的点扩散函数将变为 DH-PSF。因

此,可以通过在标准成像系统中的频谱面位置引入具有叠加光场复振幅分布的特殊掩模板来实现 DH-PSF。

但上述直接利用 LG 模式叠加产生 DH-PSF 的方法属于复振幅调制,能量利用率低。为了实现高效率 DH-PSF 的产生,可以利用光学系统频谱面的纯相位调制。图 2 表示优化设计的双螺旋相位模板 (DH-PM) 产生 DH-PSF 的光学示意图。

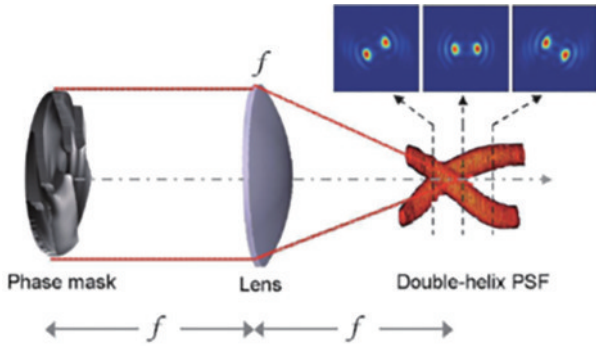


图 2 DH-PSF 系统示意图^[17]

Fig. 2 Schematic of the DH-PSF system^[17]

2.2 DH-PSF 的设计方法

目前,常用的 DH-PSF 设计方法主要分为几类:基于 LG 光束的高效率 DH-PSF 设计方法、基于涡旋奇点的 DH-PSF 设计方法、基于菲涅耳波带法的 DH-PSF 设计方法。

2.2.1 基于 LG 光束的高效率 DH-PSF 设计方法

最初实现 DH-PSF 的主要方法是直接利用 LG 模式相干叠加产生的双螺旋光束复振幅函数作为系统的光学传递函数调制模板,如图 3(a) 所示,属于复振幅调制,实际光能利用率仅为 1.8%。另外,该模板产生的 DH-PSF 的两个主瓣周围有大量的衍射环旁瓣,进一步降低了光强的利用率。

为了解决这一问题,2008 年 Pavani 等^[10]对直接叠加设计方法进行改进,将三维相位恢复迭代优化算法引入到 DH-PSF 模板的设计中。将 LG 模式数分别为 (1, 1), (3, 5), (5, 9), (7, 13), (9, 17) 的 LG 光直接叠加,得到的光场复振幅的相位分布作为传递函数优化的初值,如图 3(b) 所示,通过在 LG 模式域、空间域、傅里叶域引入约束条件进行反复迭代优化。算法中的约束条件设置如下:在傅里叶域,引入纯相位传递函数作为约束条件;在 LG 模式域,将传递函数分解为不同权重的 LG 模式的叠加,且 LG 模式的选择区域扩展到定义精确的 DH-PSF 模式的直线周围的云区域;在空间域,在多个不同离焦面引入与 DH-PSF 分布具有同样位置和宽度的双高斯型振幅作为约束条件。通过上述优化算法获得的纯相位的 DH-PSF 模板如图 3(c) 所示,光能利用率约为 56.8%,相比于 LG 模式直接叠加方法提高 30 倍。Jin 等^[18]在此基础上,将相位片的圆孔改为方孔,空间域的约束条件变为不同 LG 模式叠加的权函数由双高斯函数和二值阶跃函数共同确定,光强利用率提高到 70.3%。

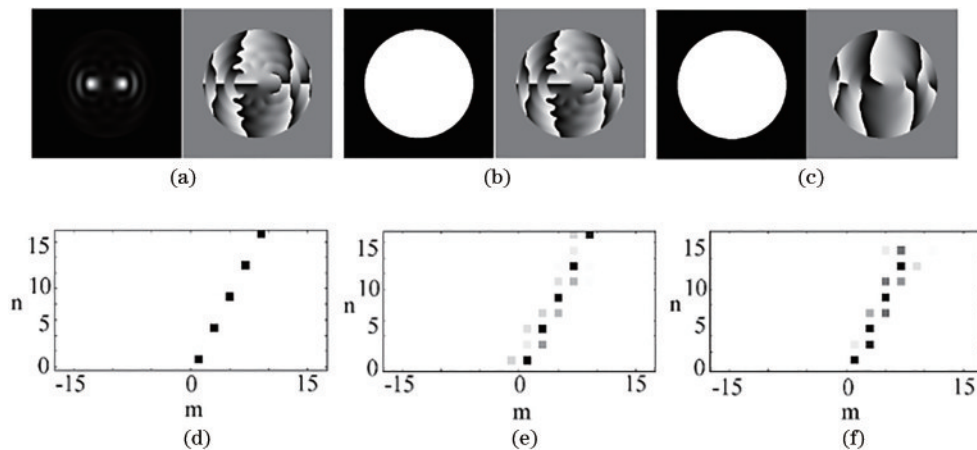


图 3 传递函数^[10]。(a)基于 LG 光叠加的 DH-PSF 分布;(b)高效率 DH-PSF 初始估计分布;(c)高效率 DH-PSF 分布;(d)~(f)对应的 LG 模式云分布

Fig. 3 Transfer function^[10]. (a) DH-PSF using LG model light superposition; (b) high-efficiency DH-PSF initial estimation distribution; (c) high-efficiency DH-PSF distribution; (d)~(f) corresponding LG modal cloud distribution

2.2.2 基于涡旋奇点的 DH-PSF 设计方法

由于迭代优化算法设计 DH-PSF 模板的过程较为复杂。为了简化该方式,2012 年 Grover 等^[19]基于涡旋光的基础理论和传播性质,把 DH-PSF 解析为光瞳平面沿直径方向的涡旋光的叠加,获得了 DH-PSF 的数学解析表达式,表达式为

$$E(x, y) = \text{circ}\left(\frac{\sqrt{x^2 + y^2}}{R}\right) \times$$

$$\exp\left\{i \arg\left\{\prod_{k=-M}^M [(x - x_k) + i(y - y_k)]\right\}\right\}, \quad (7)$$

式中: (x, y) 为相位片的光瞳坐标; (x_k, y_k) 为第 k 个螺旋光的相位奇点的坐标; R 为光瞳半径; N 为涡旋光的

数目,当 N 增加时,光强更加集中在两个旁瓣上; $M=(N-1)/2$ 。 d 为相邻的涡旋奇点的距离,当 d 不变时,随着涡旋光数目 N 的增加,瞳孔相位函数(相位掩模)变化如图 4(a)所示,衍射能量更多地局限在两个旁瓣

内。而 N 不变时,两个旁瓣的相对距离会随着 d 的增加而减小,如图 4(b)所示。相比基于 LG 模式叠加的方法,该方法大幅降低了 DH-PSF 相位片的设计难度。

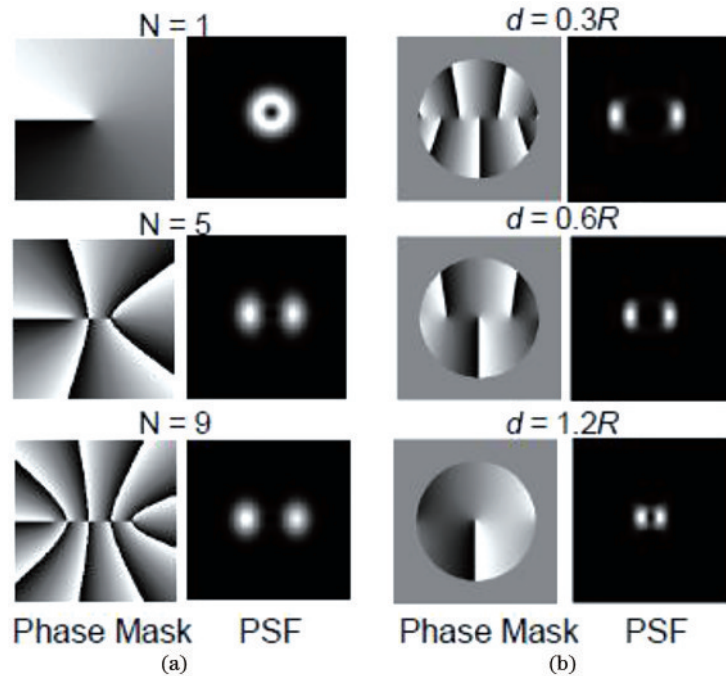


图 4 光瞳内涡旋奇点的数目和分布对 PSF 的影响^[19]。(a)左栏显示了瞳孔相位函数(相位掩模),其中涡旋奇点 N 的数量不断增加,它们之间的间距 d 恒定,右栏显示相应的焦点处 PSF;(b) $N=9$ 时,相位掩模(左)和焦点处 PSF(右)随着间距 d 的增加而产生的变化
Fig. 4 Influence of number and distribution of vortex singularities in the pupil on the PSF^[19]. (a) Left column shows the pupil phase function (phase mask) with an increasing number of vortex singularities N and constant spacing d between them, the corresponding PSF at focal plane are shown in the right column; (b) change of the phase mask (left) and PSF at focus (right) as the spacing d increasing with a constant $N=9$

另外,根据 Fisher 信息理论,显微系统的基本定位精度由显微系统的 PSF、检测到的光子数、物镜数值孔径、背景噪声以及 PSF 采样等参数决定,理论定位精度的极限由 Cramer-Rao 下界(CRLB)来度量,CRLB 越小,表明系统的定位精度就越高^[20]。对于基于 LG 模式叠加的方法,DH-PSF 两个主瓣的能量分布弥散程度较大,随着背景的增加,图像信噪比下降得更快,导致了定位精度的下降。对于基于涡旋奇点的 DH-PSF 设计方法,在定位深度和背景噪声之间进行了平衡优化,CRLB 得到了优化改进,DH-PSF 两个主瓣的能量分布相对集中,图像信噪比较高,因此该方法设计的 DH-PSF 相位片应用于显微系统后,定位精度和效率更高。

2.2.3 基于菲涅耳波带法的 DH-PSF 设计方法

2014 年,Baránek 等^[21]提出了一种基于菲涅耳波带法的 DH-PSF 设计方法。频谱面 DH-PM 的透过率函数可以表示为

$$P_N(\rho, \varphi) = \begin{cases} \exp[i(2n-1)\varphi], & R\sqrt{\frac{n-1}{N}} < \rho < R\sqrt{\frac{n}{N}}, \\ 0, & \rho > R \end{cases} \quad (8)$$

式中: (ρ, φ) 为极坐标; N 为菲涅耳波带的个数, $n=1, 2, 3, \dots, N$; R 为相位片的半径。在相位片的设计过程中,只需要改变 N 这一个参数,其决定着 DH-PSF 两个主瓣之间的间距以及旋转 180° 对应的轴向范围。随着 N 的增加,两个主瓣之间距离不断增大,同时轴向范围也相应扩大,如图 5 所示。该设计方法通过改变菲涅耳波带数 N , 可以很容易地调整 DH-PSF 的成像深度。在此基础上,苏州医工所 Li 等^[22]提出了基于迭代优化的算法,进一步改进了 DH-PM 的性能,光能利用率提高到 82.31%。

2.3 实现 DH-PSF 的调控器件

DH-PSF 的调控器件是实现 DH-PSF 工程技术的关键。常用的 DH-PSF 调控器件主要有 DH-PM、纯相位型空间光调制器(SLM)和几何超构表面(GM)。高衍射效率的 DH-PM 通常可以采用微细加工手段,如无掩模灰阶光刻技术(mask-less gray-scale lithography)、准分子激光或飞秒激光烧蚀等,在融石英基底上制备,这种方式产生的 DH-PM 具有波长选择性,应用不够灵活,但衍射效率高。纯相位型 SLM 是一种仅对入射光波的相位进行动态、灵活调制的器

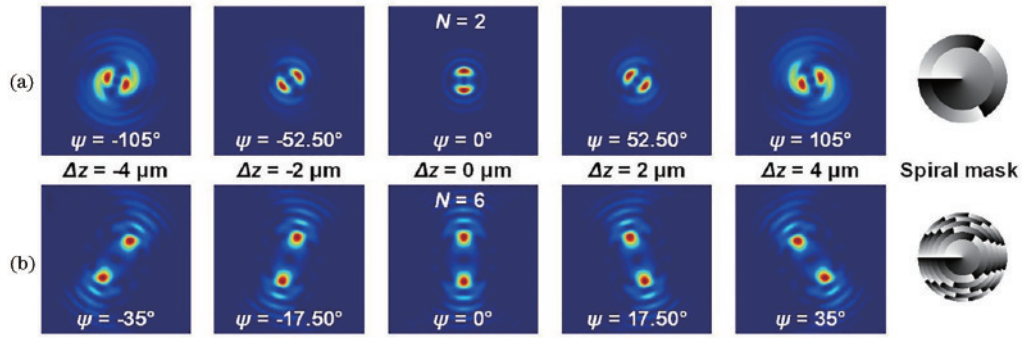


图 5 DH-PSF 旋转与和螺旋相位片中菲涅尔波带数之间的关系^[22]。(a) $N=2$; (b) $N=6$

Fig. 5 Relationship between DH-PSF rotation and total number of the Fresnel zones in the spiral mask^[22]. (a) $N=2$; (b) $N=6$

件,在光场调控等领域获得广泛的应用^[2]。可以利用 SLM 直接产生 DH-PM,具有灵活性高的特点,但 SLM 对光波的偏振和波长有要求,而且衍射效率较低。GM 是波长量级厚度的二维超构材料,天线的二维排列,通过设计超构表面中每个天线单元的形状,可以在亚波长尺度上对局域光场的振幅、相位和偏振进行调控,控制电磁波的传播。GM 提供了一种定向控制的相位调制,它不依赖于特定的天线设计或波长,因此具有宽带特性,并且对制造误差和材料性能变化具有高度鲁棒性,鉴于此,GMs 可以用来实现高效率、宽带的 DH-PM^[23]。

3 DH-PSF 技术的研究进展

3.1 基于 DH-PSF 的深度估计技术

深度测量对增强现实、机器人技术、手势检测和人脸识别等新兴技术来说至关重要。然而,这些应用往往对光学系统有结构紧凑和低功耗的要求,例如,虽然主动照明技术可以实现精确的场景重建,但会增加功耗,并且采用立体的系统时需要扩展形状因子来分离

视点,这就限制了主动照明技术在深度测量领域的应用范围。DH-PSF 技术可以实现被测目标深度信息的获取,并且具有系统简洁的特点,因此研究人员发展了各种基于 DH-PSF 的深度估计技术。

3.1.1 基于标准 PSF 与 DH-PSF 双模的深度信息测量技术

成像系统的景深限制了基于离焦效应的深度估计精度,2006 年 Greengard 等^[9]首次提出了基于 DH-PSF 的深度估计方法,该方法利用准单色光照明,通过图 6(a) DH-PSF 调制的目标图像和图 6(b)标准 PSF 的目标图像,利用深度反卷积算法进行深度信息估计,提高了深度估计的精度。

为了进一步提高效率,2012 年,Quirin 等^[11]提出了一种针对更复杂场景的基于宽带非相干照明的深度估计和成像恢复技术,利用 SLM,基于三次相位(cube phase)调控的景深拓展技术和 DH-PSF 技术,实现了高效率深度估计和成像,重构步骤如图 7 所示。图 8 为一个三维场景的重建结果。该方法的深度估计误差为 $4/10^4$ (平均误差与平均距离的比率)。

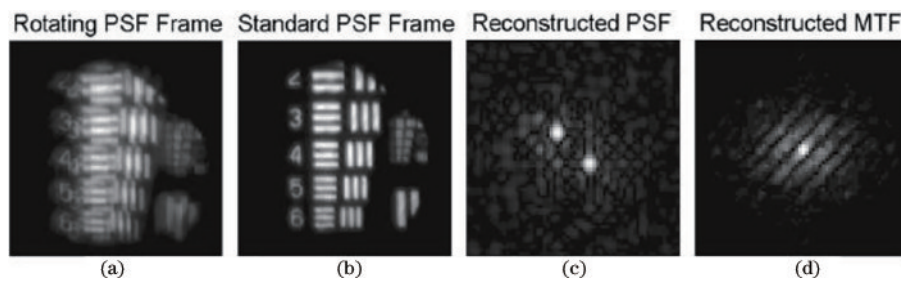


图 6 图像结果^[9]。(a) 旋转 PSF; (b) 标准 PSF; (c) 重建的 PSF; (d) 重建的 MTF

Fig. 6 Image results^[9]. (a) Rotating PSF; (b) standard PSF; (c) reconstructed PSF; (d) reconstructed MTF

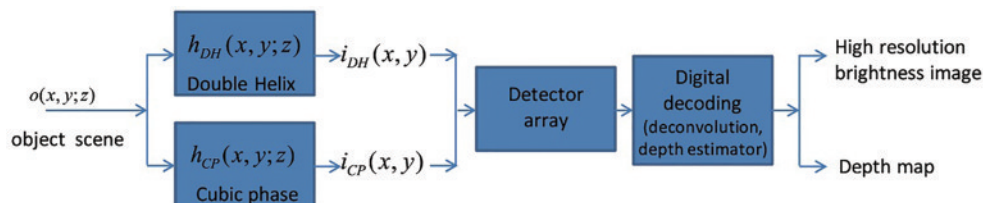


图 7 双通道互补 PSF 工程化的数字光学系统流程^[11]

Fig. 7 Flowchart of the dual-channel complementary PSF engineering digital optical system^[11]

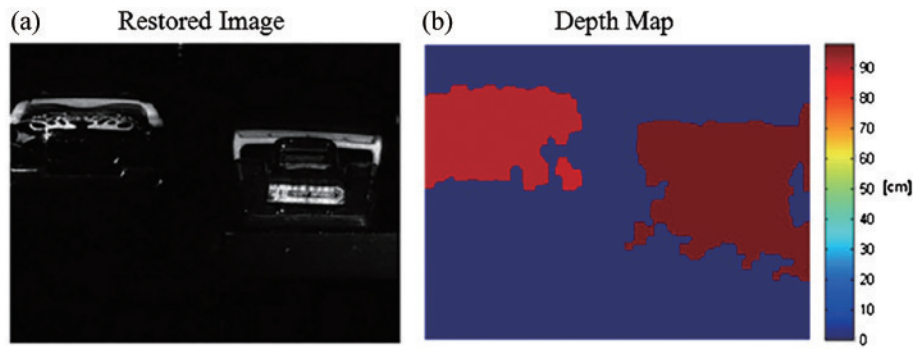


图 8 深度估计和成像恢复技术^[11]。(a)从立方相位通道恢复的场景对象,用于图像分割;(b)分割场景中的对象后,从深度估计通道获取的每辆车的平均轴向距离

Fig. 8 Depth estimation and restored imaging technology^[11]. (a) Scene objects recovered from cubic phase channels for image segmentation; (b) average axial distance of each car taken from the depth estimation channel after segmenting the objects within the scene

3.1.2 基于DH-PSF超透镜的深度估计技术

双模深度信息测量技术中的DH-PSF都是基于光束传输过程中积累的光程差调制,利用计算全息图或SLM来实现的。为了覆盖波前控制所需的 2π 相位差范围,它们依赖于曲面和厚度远大于波长的元件。此外,像素尺寸过大会导致严重的高阶衍射和孪生像问题。除了产生DH-PSF的掩模之外,还需要另外一套包括物镜在内的光学成像系统。因此,基于DH-PSF的整个系统复杂、庞大、笨重,难以集成到芯片级光学系统中。

几何超表面(GM)是天线的二维排列,控制具有亚波长厚度和分辨率的电磁波的传播,提供了一种定向控制的相位调制,它不依赖于特定的天线设计或波长,因此具有宽带特性,并且对制造误差和材料性能变化具有高度鲁棒性,鉴于此,GMs被用来实现高效率、宽带的超透镜。2019年, Jin等^[18]设计了一个等离子体几何超表面,将产生DH-PSF的相位掩模和用于成像的金属透镜相组合,命名为DH-PSF超透镜(DH-metalens),如图9所示,使DH-PSF的传输效率高达70.3%,光学系统集成度超高,比传统相位元件实现的集成度低3个数量级。图10为基于DH超透镜的实验装置及双螺旋定位性能参量表征。此外,DH金属能在宽带可见光波段和非偏振态下工作。在此基础上,该课题组又提出了全介质DH-metalens,实现了1490 nm波段的三维成像^[23],拓展了其应用领域,利用DH-metalens实现了点源的三维成像,为实现集成DH-PSFs的器件奠定了基础。

2020年 Colburn等^[24]利用一个单一的、空间复用的纳米散射孔径来实现高性能深度相机的功能,如图11所示。利用圆柱形纳米散射体后可以任意改变入射波前的相位,对场景中的两个互补光学响应进行被动编码。所设计的光学超表面同时产生聚焦的加速光束和聚焦的双螺旋旋转光束,利用波前传播不变性,通过单个相机快照产生成对的图像。与传统的离焦深

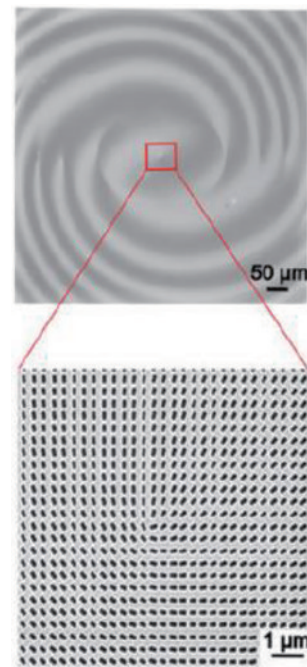


图 9 DH超透镜的显微图像^[18]

Fig. 9 Microscope image of the fabricated DH-metalens^[18]

度测量方法相比,该方法同时提高了景深精度和景深范围,通过对采集到的数据进行软件解码,完全重建目标场景的二维图像和深度图,提供了一种光学被动测距解决方案。

3.1.3 基于DH-PSF的单次快照三维成像技术

在消费电子、生物医学成像、机器视觉和汽车工程的现代应用中,单次拍摄中获取物体深度信息的能力越来越受到关注。2016年, Berlich等^[25]提出了一种基于DH-PSF的三维宽场图像重构方法,使得利用单目相机系统获取三维物体信息成为可能,成像过程如图12所示。当附有DH-PM的成像系统对轴向不同位置的样品进行同时成像时,在探测面上将获得一个模糊的重影图像,通过对这一特殊双螺旋宽场图像进行算法重构,利用倒频谱和维纳滤波分析(如图13所

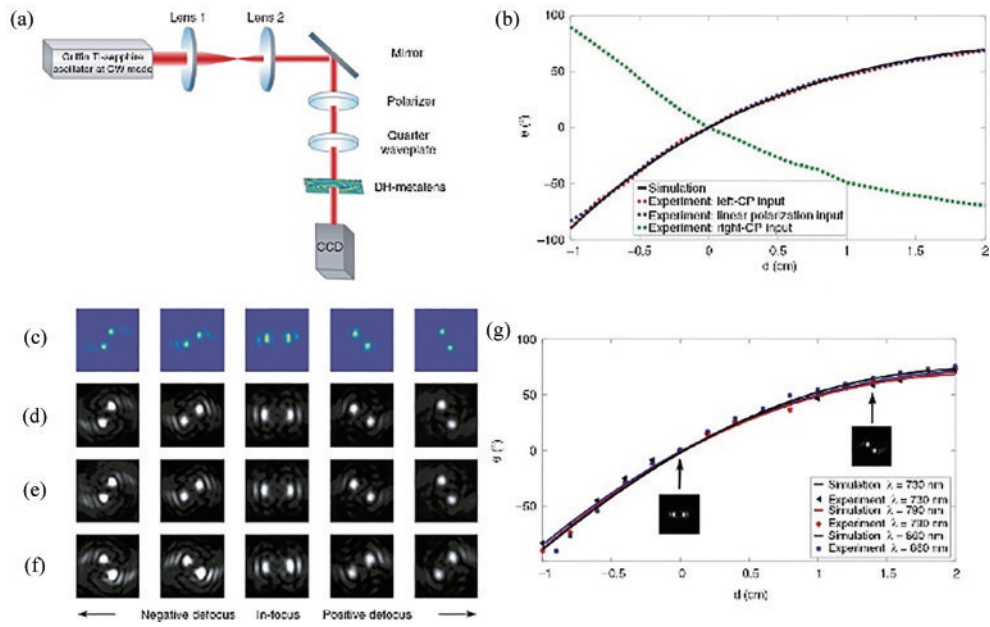


图 10 双螺旋超透镜实验装置和性能表征^[18]。(a) 系统示意图；(b) 理论计算和实验获得的 750 nm 波长下旋转角 (θ) 和成像散焦 (d) 之间的关系曲线；(c)~(f) DH-PSF 图像在不同离焦位置的旋转；(g) 730, 790, 860 nm 波长下 θ 和 d 的关系曲线，插图是波长为 730 nm 的两幅 DH-PSF 图像

Fig. 10 Experimental setup and characterization of the DH-metalens^[18]. (a) Schematic of the experimental setup; (b) theoretically calculated and experimentally obtained relationship curves between the rotation angle (θ) and the imaging defocus (d) at wavelength of 750 nm; (c)~(f) rotation of DH-PSF images at different defocus positions; (g) relationship curves between θ and d at wavelengths of 730, 790, 860 nm, the insets are two DH-PSF images at a wavelength of 730 nm

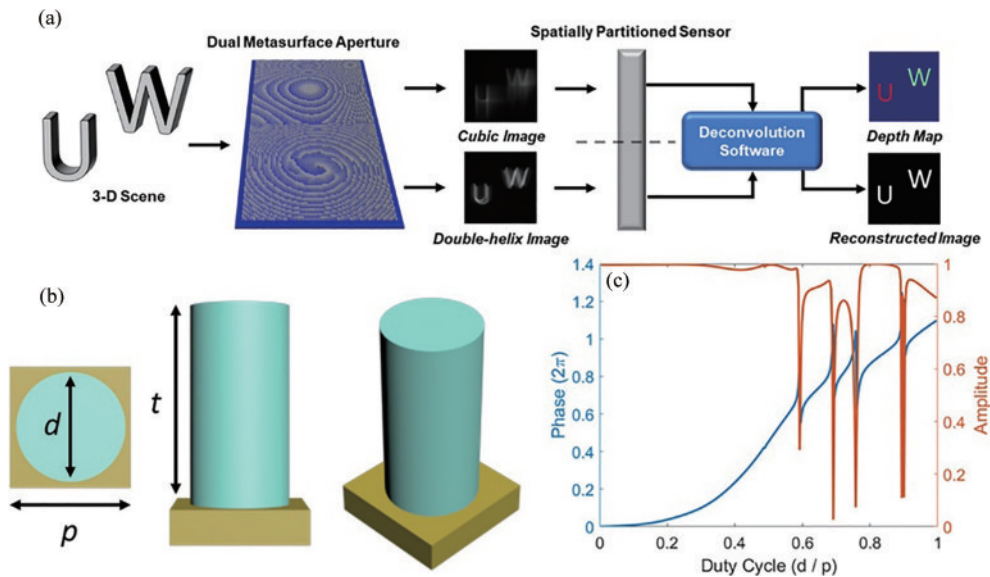


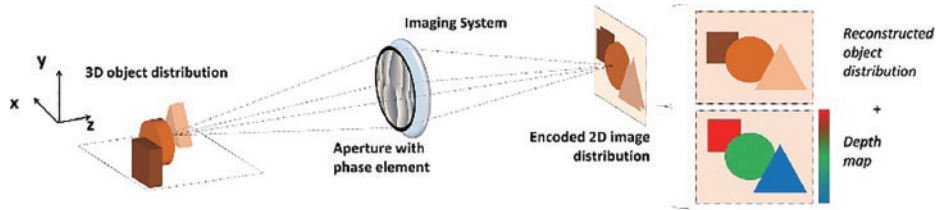
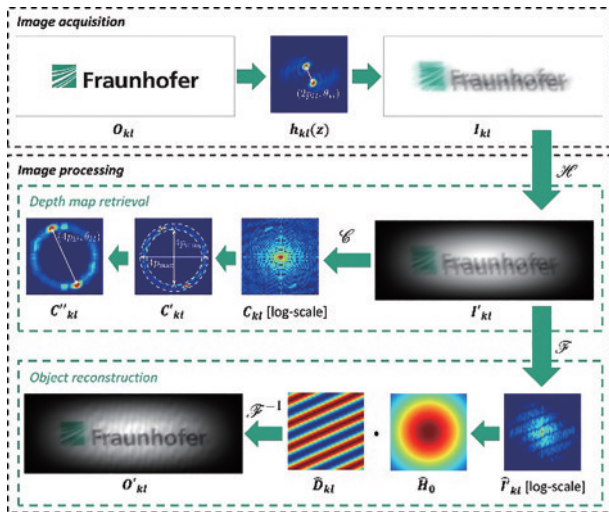
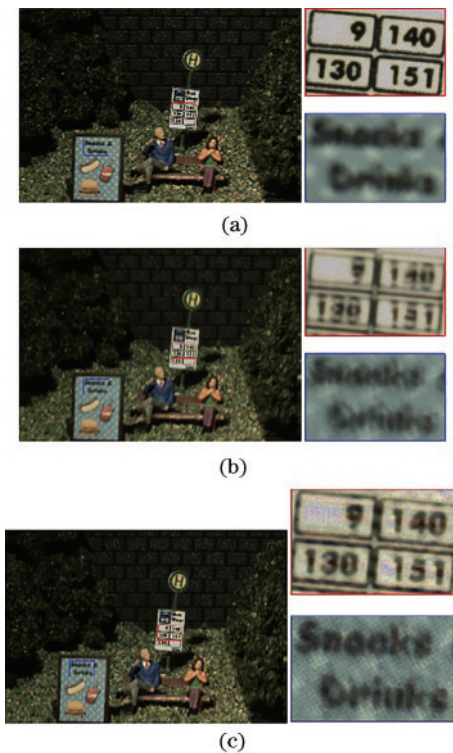
图 11 双孔径超表面深度成像系统设计示意图^[24]

Fig. 11 Design diagram of dual-aperture metasurface depth imaging system^[24]

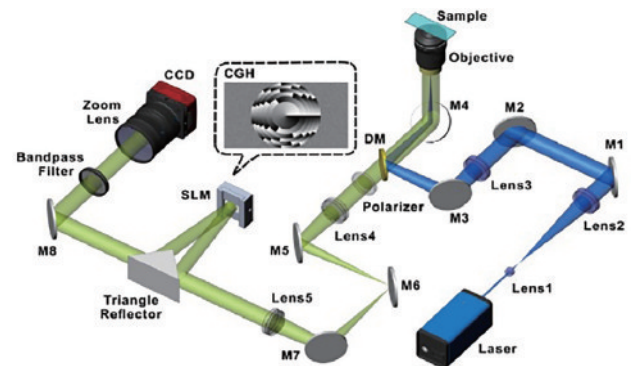
示), 可以将原本离焦的模糊信息恢复出来, 获得样品三维强度信息和对应的深度信息(如图 14 所示)。该系统不需要利用常用的去卷积算法进行大量的迭代优化来重建目标, 因而有可能实现三维视频采集。该方法将在薄玻璃衬底上制作的计算全息图集成到传统的相机装置中, 光学系统紧凑稳健。此外, 光学系统不需要额外设置波长或偏振滤波器, 能够高效获取目标的

RGB 颜色信息。但是, 该技术采用光学参数固定的 DH-PM, 系统的景深和放大倍率不可调, DH-PSF 的旁瓣也限制了重构图像的质量和分辨率, 还有一定的提升空间。

传统的显微系统由于景深有限, 在进行三维成像时一般需要沿轴向逐层扫描样品并采集对应位置的样品图像来获取样品的三维信息。正因如此, 系统的成

图 12 图像获取装置示意图^[25]Fig. 12 Schematic of the image acquisition setup^[25]图 13 图像获取和重构流程^[25]Fig. 13 Flowchart of the image acquisition and reconstruction^[25]图 14 三维目标场景的成像结果^[25]。(a) 正常图像；(b) DH-PSF 编码图像；(c) 解码图Fig. 14 Imaging results of the three-dimensional object scene^[25]. (a) Nominal image; (b) DH-PSF encoded image; (c) decoded image

像速度大大降低,从而限制了它们在动态观测中的应用。基于上述方法,2017年,Wang等^[26]提出了一种基于DH-PSF的单次快照三维荧光显微成像方法,如图15所示。通过优化DH-PSF,校正系统像差,并利用改进的倒频谱和Richardson-Lucy反卷积重构算法,该方法能够利用单次相机采集图像重构样品的三维荧光强度信息和深度信息,成像结果如图16所示,通过对比可以看出,在基于DH-PSF的宽场图像中,原本在离焦位置模糊不清的微丝束结构变得更加锐利和清晰。该方法具有与相机帧频一致的时间分辨率,对研究三维空间内稀疏分布且快速生长的细胞的演变过程具有重要意义。

图 15 单次快照三维荧光显微示意图^[26]Fig. 15 Schematic of the single-shot three-dimensional fluorescence microscope^[26]

基于DH-PSF的单次快照三维成像技术中,采用倒频谱和滤波分析重构,需要对实验采集的图像进行细分,细分子区域和滤波区域窗口的大小影响重构图像分辨率和重构速度。因此,需要发展新的图像重构算法,如结合深度学习,来进一步优化系统的PSF和图重构算法,实现单次快照三维超分辨快速成像。

3.2 基于DH-PSF的纳米尺度三维单颗粒示踪技术

纳米尺度的三维单颗粒示踪(3D SPT)技术^[27]能够在亚细胞水平上更真实地获得颗粒在多维立体空间和时间尺度(x - y - z - t)上运动的相关信息,在研究活细胞内动态过程方面非常重要,其已成为目前生物单分子技术研究的热点。由于能够获得单粒子的纳米尺度三维位置信息,DH-PSF技术在3D SPT技术中获得广泛的应用。

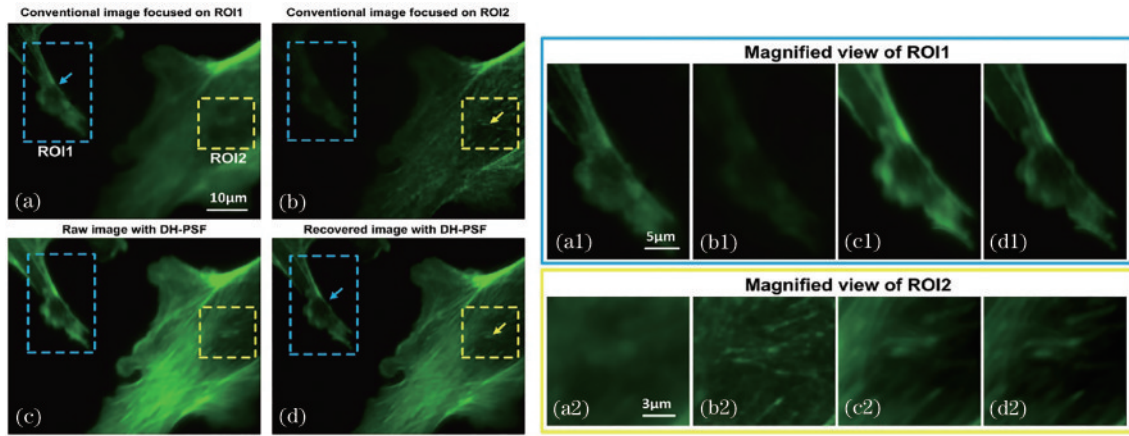


图 16 常规图像和 DH-PSF 得到的扩展景深恢复图像,通过 BPAE 细胞中 F-actin 的观察结果验证 DH-PSF 产生的扩展景深恢复图像^[26]。(a)(b)常规高斯 PSF 捕获的图像,这两幅图像是在不同的深度(相隔 1500 nm)拍摄的;(c)DH-PSF ($N=6$)获取的原始图像;(d)恢复的图 16(c)对象图像;(a1)~(d1)ROI1 区域放大的图像;(a2)~(d2)ROI2 区域放大的图像

Fig. 16 The conventional image and the extended depth-of-field recovered image produced by DH-PSF, the DH-PSF produces the extended depth-of-field recovered image, which is verified by the observation results of F-actin in BPAE cells^[26]. (a)(b) Images captured by using the conventional Gaussian PSF, the two images are captured at different depths (1500 nm apart); (c) raw image acquired by the DH-PSF ($N=6$); (d) recovered object image shown in Fig. 16(c); (a1)–(d1) enlarged images of ROI1 area; (a2)–(d2) enlarged images of ROI2 area

3.2.1 传统的基于 DH-PSF 的 3D SPT

2009 年, Pavani 等^[13]首次利用光子受限的 DH-PSF 实现了荧光微粒的三维示踪。图 17 为荧光粒子的三维示踪装置示意图,该系统利用 SLM 来产生 DH-PSF。图 18 为运动的荧光粒子的三维示踪结果,横向和轴向

的平均定位精度分别达 14 nm 和 37 nm。该系统使用单幅深度编码的 DH-PSF 图像以纳米的精度同时确定多个粒子的三维空间位置,并对运动的粒子进行了示踪,计算了粒子的运动速度。该技术为 DH-PSF 技术在生命科学中的应用打下了坚实的基础。

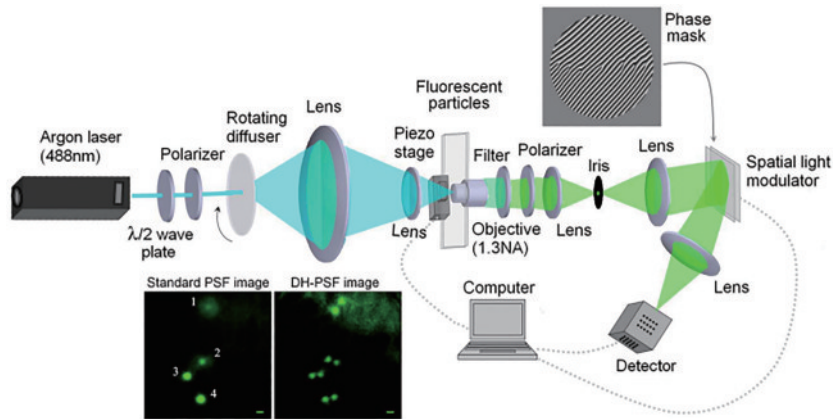


图 17 荧光粒子的三维示踪装置示意图^[13]

Fig. 17 Experimental setup for three dimensional tracking of moving fluorescent particles^[13]

2010 年, Thompson 等^[28]建立了基于 DH-PSF 的宽场荧光显微系统,首次实现了活细胞内标有量子点的结构示踪,三维定位精度达 10 nm,如图 19 所示。

同年, Thompson 等^[29]又使用 DH-PSF 显微成像系统成功实现了对活芽接酵母细胞中单个信使核糖核酸(mRNA)颗粒的三维跟踪, x 和 y 方向的精度为 25 nm, z 方向的精度为 50 nm,如图 20 所示,他们研究了单个 mRNA 蛋白 mRNPs 颗粒的动力学行为。该定量方法可广泛应用于对多种细胞类型中 mRNA 定位和多种其他生物分子动力学的研究。随后,基于 DH-

PSF 的纳米尺度 3D SPT 在细菌细胞类核蛋白相互作用、固液界面处人血清蛋白质的跳跃扩散、周期性多孔纳米结构内的纳米粒子扩散等细胞内动态工程和纳米材料研究中获得了广泛的应用^[30-36]。尽管基于 DH-PSF 的 3D SPT 具有很好的应用效果,但成像深度仅有 2 μm 左右,限制了其在完整细胞中的进一步应用,需要设计新的大深度编码的 PSF。

3.2.2 基于 DH-PSF 复合相位调控的大景深 3D SPT

为了进一步提高 DH-PSF 的成像深度,深圳大学的牛憨笨课题组^[37-38]提出了一种大景深无扫描纳米分

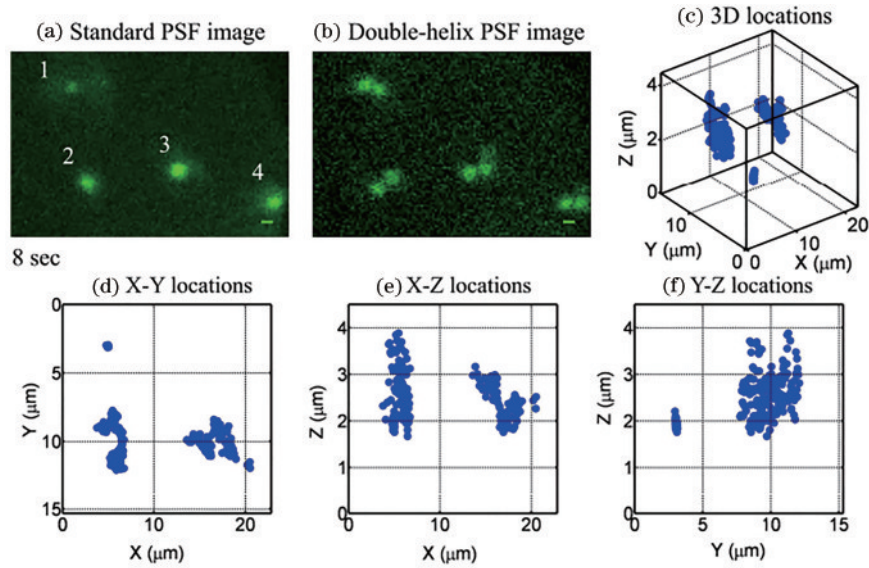


图 18 荧光粒子的三维示踪^[13]。(a)标准 PSF 图像;(b) DH-PSF 图像;(c) 4 个微球的三维定位;(d)~(f)微球的三维位置在 X-Y、X-Z、Y-Z 平面的投影

Fig. 18 Fluorescent microsphere tracking in three dimensions^[13]. (a) Standard PSF image; (b) DH-PSF image; (c) 3D locations of four microspheres; (d)~(f) X-Y, X-Z, and Y-Z projections of the microspheres' 3D locations

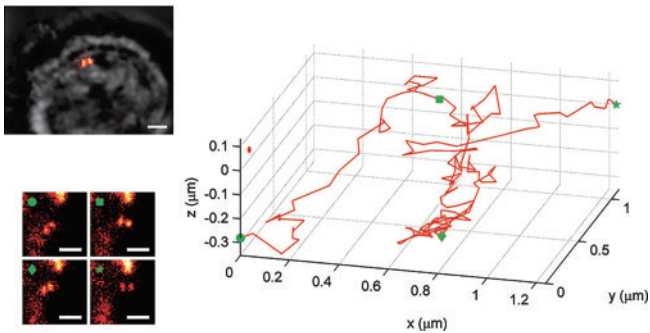


图 19 量子点标记的活细胞内结构的 3D 示踪^[28]

Fig. 19 3D tracking of a quantum dot-labeled structure in a live cell^[28]

辨三维多分子示踪成像方法和系统(DDCM),如图 21 所示,利用具有变形光栅(DG)成像和 DH-PSF 的双功能复合相位片,扩展了 DH-PSF 的成像深度。DDCM 的三维(x , y , z)平均定位精度达 5.3 nm、6.3 nm、17.4 nm,成像深度达 14 μm ,实现了大景深三维运动荧光珠的追踪,如图 22 所示,并以 Raw-264.7 细胞为模型,通过对荧光珠示踪,初步研究了巨噬细胞的吞噬现象。

2021 年,在非涅耳波带法设计 DH-PSF 的基础上,苏州医工所 Li 等^[39-40]提出了旋转 2π 角度的 DH-PSF,即 2π -DH-PSF,并进一步结合离焦相位因子的调控,实现了 720° 旋转角度的 DH-PSF。相比原先的

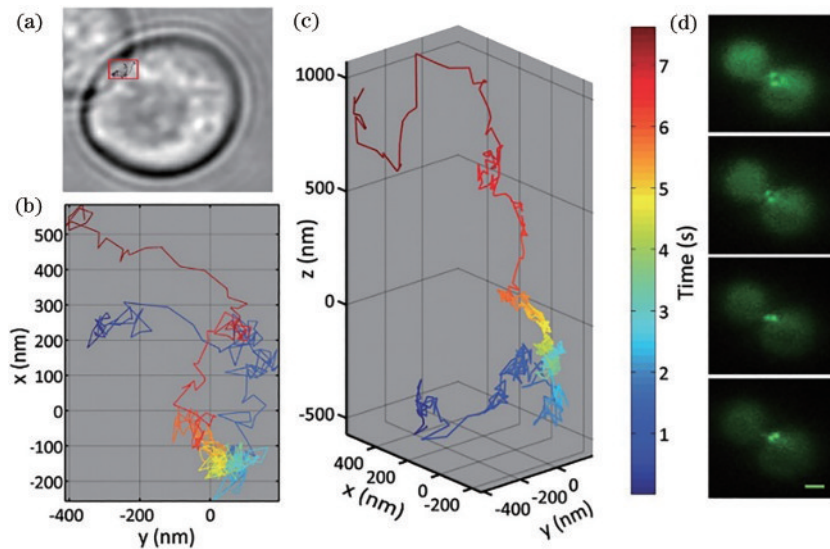
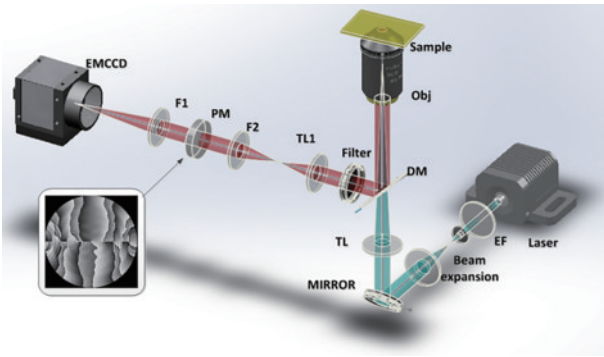


图 20 酵母细胞中单个 mRNP 的三维轨迹^[29]

Fig. 20 3D trajectory of a single mRNP in a yeast cell^[29]

图 21 DDCM 系统示意图^[38]Fig. 21 Schematic of the DDCM system^[38]

DH-PSF, 离焦 2π -DH-PSF 的成像深度扩大 4 倍, 如图 23 所示, 实现了 $20\ \mu\text{m}$ 范围内的粒子示踪。

成像深度和能够示踪的粒子密度是相互矛盾的。虽然大景深 3D SPT 技术提高了 DH-PSF 的定位深度, 但降低了定位密度, 该技术更适合于研究稀疏运动的分子动态过程。为了进一步提高定位密度, 需要发

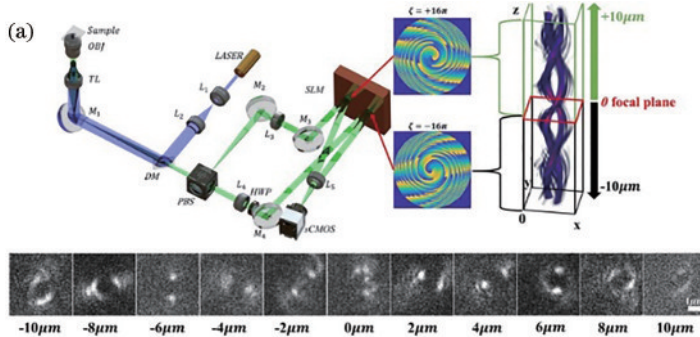


图 23 2π -DH-PSF 系统及其在 3D 追踪中的应用^[40]。(a) 光学设置和两个离焦 2π -DH-PSF 组合的 3D 立体图; (b) 荧光微球在 Hela 细胞中的三维轨迹; (c) 唾液中荧光微球的三维轨迹

Fig. 23 Schematic of 2π -DH-PSF system and its application in 3D trajectory^[40]. (a) Optical setup and 3D stereograms of two defocused 2π -DH-PSF combinations; (b) 3D trajectory of fluorescent microspheres in Hela cells; (c) 3D trajectory of fluorescent microspheres in saliva

3.2.3 基于光片照明的 DH-PSF 显微技术

在对厚样品内荧光分子进行成像示踪时, 背景荧光噪声降低了单分子图像的信噪比, 从而降低了单分子的定位精度。为了抑制背景荧光噪声, 提高信噪比, 深圳大学 Yu 等^[41]将光片荧光显微术 (LSFM) 和 DH-PSF 定位方法相结合, 提出了基于光片照明的 DH-PSF 显微技术, 实现对厚样品中单粒子的三维纳米分辨成像和追踪, 该方法具有图像对比度高、时空分辨率高、背景噪声低和成像深度深等优点。图 24 为三维纳米分辨荧光显微成像系统示意图, 图 25 为该系统对琼脂溶液中的单个荧光珠的示踪成像结果, 从中得到了该荧光珠的三维动态轨迹, 并通过计算均方位移得到了它的扩散系数。通过比较发现实验值与理论值的误差很小, 该系统能够很好地应用于单粒子动态过程成像等问题的研究。

但上述方法采用了激发光路和探测光路相互垂直

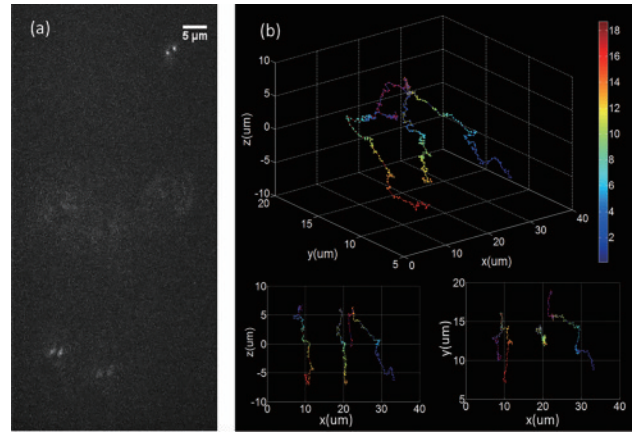
图 22 三个荧光珠的同时三维示踪^[38]

Fig. 22 Simultaneous three-dimensional tracing of three fluorescent beads^[38]

展新的基于 DH-PSF 的高密度分子定位算法, 进一步拓展 3D SPT 技术在活体厚样品动态过程研究中的应用。

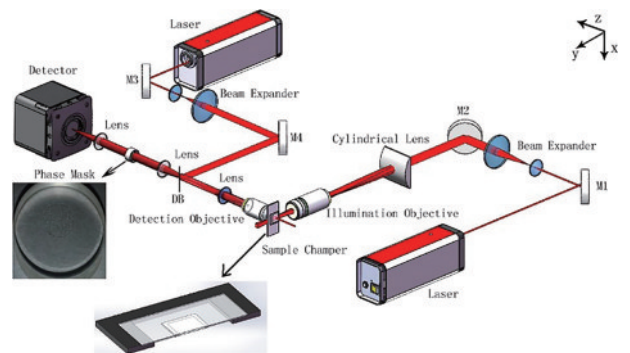
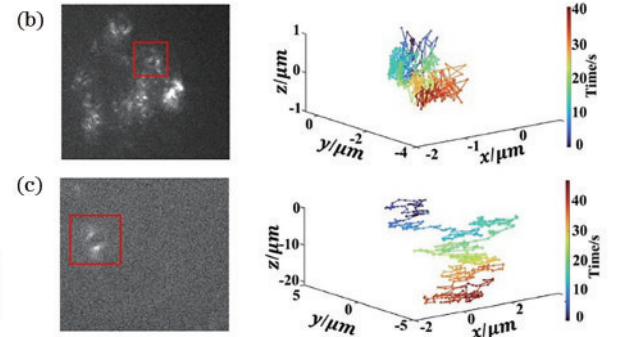
图 24 基于光片照明的 DH-PSF 显微成像系统^[41]

Fig. 24 Schematic of the DH-PSF microscopy using light-sheet illumination^[41]

的设计, 不适合利用高倍物镜, 影响了分子的定位精度。为了解决这些问题, 基于光片照明的这一思想, 2018 年, Gustavsson 等^[42]提出一种具有三维点扩散函数的倾斜

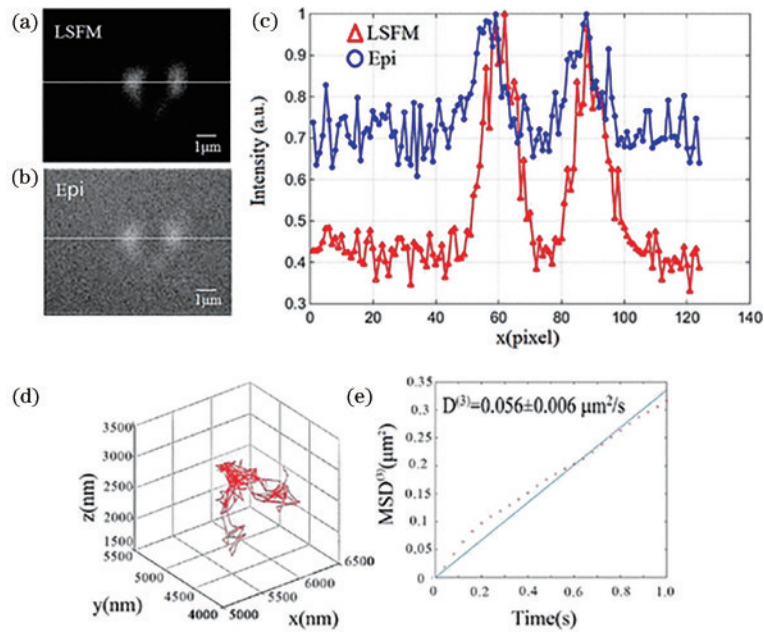


图 25 光片照明激发增强 DH-PSF 显微镜^[41]。(a) 光片荧光显微镜的 DH-PSF; (b) epi 照明显微镜的 DH-PSF; (c) 图 25(a) 和图 25(b) 中两条直线横截面的强度分布; (d) 单个荧光珠的三维轨迹; (e) 单个荧光珠 3D MSD 的线性拟合

Fig. 25 DH-PSF microscopy enhanced by light sheet excitation^[41]. (a) DH-PSF obtained from light sheet fluorescence microscopy; (b) DH-PSF of epi-illumination microscopy; (c) intensity profile of the cross section for the two straight lines in Fig. 25(a) and Fig. 25(b); (d) three-dimensional trajectory of single fluorescent bead; (e) linear fitting of the 3D MSD of single fluorescent bead

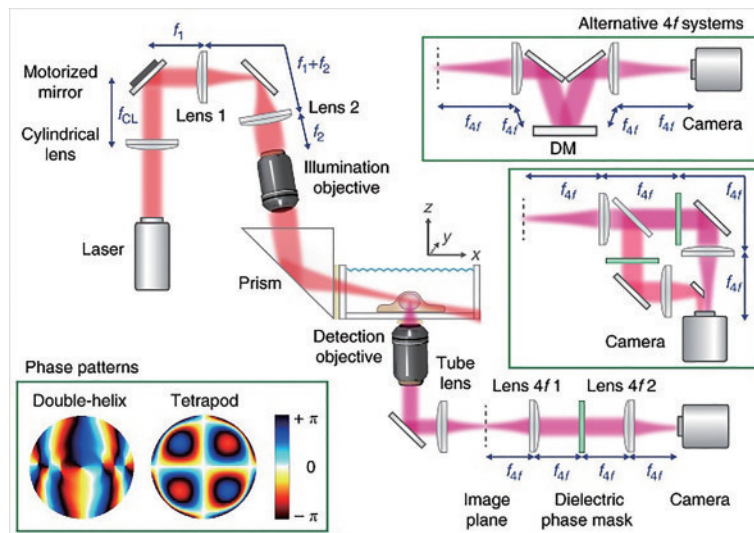


图 26 TILT3D 系统示意图^[42]

Fig. 26 Schematic of the TILT3D system^[42]

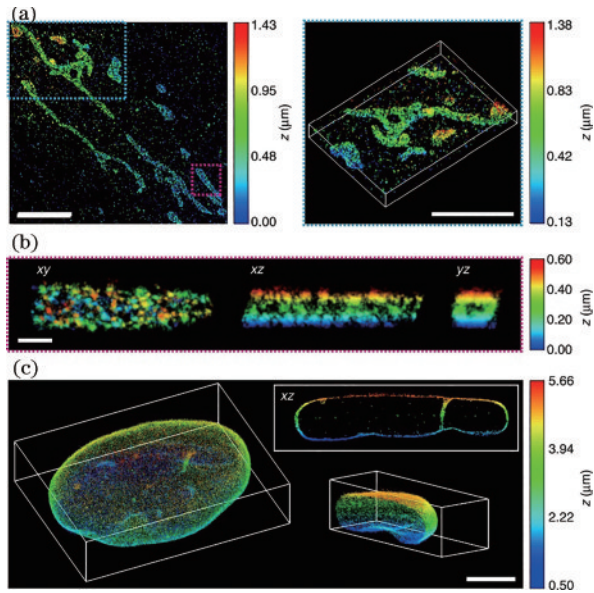
光片显微镜(TILT3D),如图 26 所示,它利用倾斜照明高斯光片,允许照明光切片和成像面延伸到盖玻片。TILT3D 不需要采用两个非常接近的垂直物镜光学结构,因此可以使用高数值孔径(NA)探测物镜进行成像,并无需将物镜浸入样品室,可降低样品污染的风险。因此,TILT3D 用于低背景、单分子的三维超分辨示踪以及厚细胞的三维超分辨率成像。图 27 验证了 TILT3D 在哺乳动物细胞中的三维超分辨率成像,通过 DH-PSF 对线粒体和全核层进行单分子检测。

LSFM 与 DH-PSF 优势互补,二者结合有效解决

了厚样品三维单分子成像和示踪中的背景噪声大和分辨率低的问题,在完整活细胞内动力学过程研究中具有广阔的应用前景。

3.3 基于 DH-PSF 的三维超分辨荧光显微技术

近年来,超分辨荧光显微技术^[43-47]蓬勃发展,如结构光照明显微术(SIM)、受激发射损耗(STED)显微术和基于单分子定位的显微术(SMLM)等,突破了光学衍射极限的限制,达到了纳米量级的空间分辨率,实现了对亚细胞精细结构、动态过程和功能的观察,使得人们能够更精确地理解各种生命过程,极大地推进了

图 27 TILT3D在细胞生物学中的应用^[42]Fig. 27 Applications of TILT3D in cell biology^[42]

生命科学等诸多领域的发展,已经成为生命科学领域中强有力的研究工具。由于DH-PSF能够提供荧光分子在样品空间中的纳米精度三维位置信息,在三维超分辨荧光显微成像领域受到广泛的关注。

3.3.1 基于DH-PSF的三维单分子定位显微技术

光敏定位显微技术(PALM)和随机光学重构显微技术(STORM)是SMLM的主流技术,其实现超分辨成像的基本原理是利用具有开关效应的荧光分子标记样品,通过宽场照明稀疏激发,分时成像,获得单分子荧

光图像;然后对荧光分子进行精确质心定位;最后将不同时刻获得的成千上万个单分子定位信息叠加,最终获得纳米分辨率图像;再结合轴向分辨的辅助手段,如柱面镜像散法、双焦面探测法等,实现横向空间分辨率达20~30 nm、轴向分辨率达40~70 nm的三维成像^[48-49]。

利用DH-PSF对单分子进行三维纳米定位的主要原理是,分子的横向位置通过DH-PSF的两个旁瓣的中点位置来估计,而其轴向位置则根据两个旁瓣中心连线的旋转角度来确定,该方法可以实现高达10~20 nm的轴向分辨。2009年,Pavani等^[16]将DH-PSF工程与PALM相结合,通过探测光路中的4f系统和SLM实现DH-PSF相位工程的引入,如图28(a)所示,将荧光探测系统的PSF调制为DH-PSF。在厚样品成像实验中,单个激发的荧光分子经DH-PM后在探测面形成两个高斯分布的亮斑,不同轴向位置的荧光分子对应不同旋转角度的DH-PSF,从而实现荧光分子的纳米尺度三维定位,如图28(b)和图28(c)所示。最终将所有激发的荧光分子空间坐标叠加,获得在2 μm范围内的高浓度单分子DCDHF-V-PF4-叠氮化物的超分辨三维图像,如图28(d)所示,其在x,y和z方向的定位精度分别为12.8 nm,12.1 nm和19.5 nm,如图29所示。此后,基于DH-PSF的三维SMLM迅速发展^[13, 50-59],在哺乳动物细胞中微管网络、线粒体结构、人类视网膜色素上皮细胞(RPE1)初级纤毛形态结构变化、刺激响应凝胶在固液界面的形变、受体触发T细胞的膜结构、分子偶极子取向等领域获得了广泛的应用,推动了细胞生物学和纳米材料学的发展。

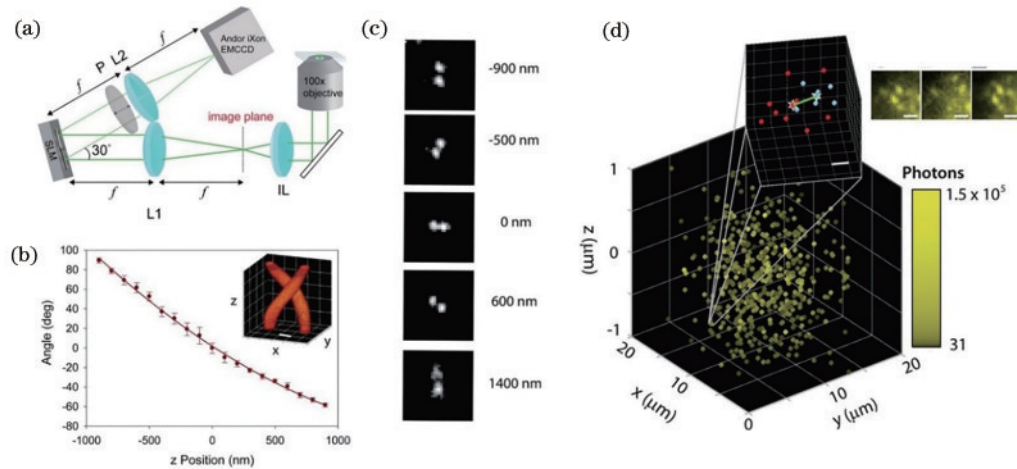
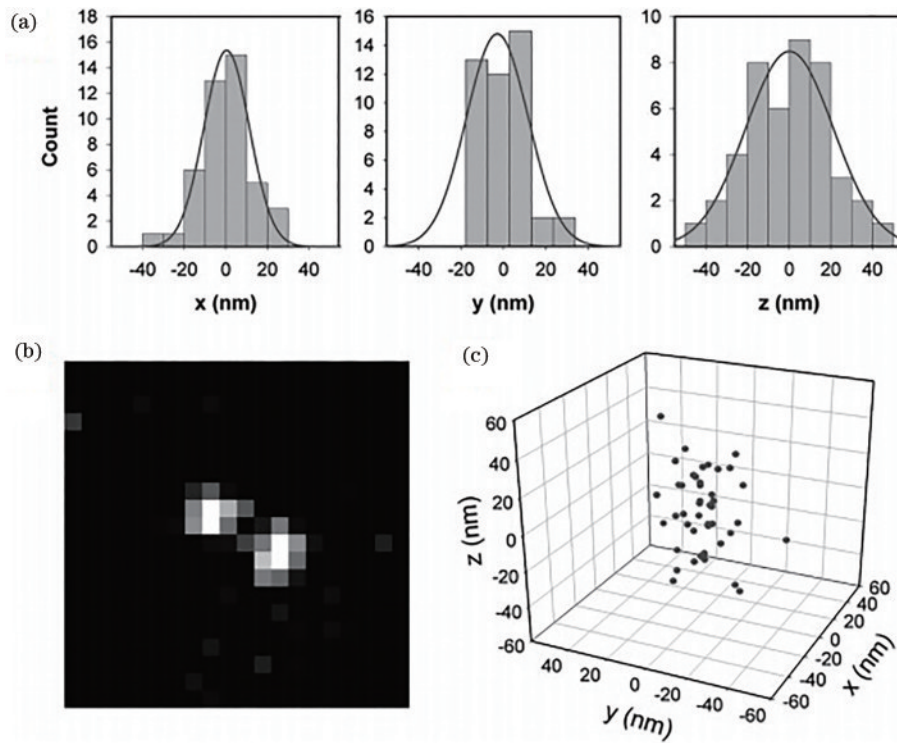


图 28 DH-PSF 成像系统和 3D 超分辨成像^[16]。(a) 单分子 DH-PSF 系统探测光路;(b) DH-PSF 的两个波瓣的角度与轴向位置关系的典型校准曲线;(c) 在不同轴向深度处的荧光珠图像;(d) 厚 PMMA 样品中的高浓度单分子 DCDHF-V-PF4-叠氮化物的图像

Fig. 28 DH-PSF imaging system and 3D super-resolution imaging^[16]. (a) Detection path of the single-molecule DH-PSF setup; (b) typical calibration curve between angle of two lobes and axial position; (c) images of a fluorescent bead at different axial positions; (d) single molecule image of DCDHF-V-PF4-azide with high concentration in a thick PMMA sample

目前,基于DH-PSF的3D SMLM的成像深度大约为2 μm,针对厚样品的成像,仍需要结合轴向扫描技术,而且基于DH-PSF的单分子定位通常采用基于最小二乘或极大似然估计的高斯拟合来精确定位,定

位速度相对较慢,而且不适用于高密度分子,降低了系统的时间分辨率^[60]。目前,对于活体完整细胞的超分辨动态成像,SMLM在成像深度、定位密度、时空分辨率等方面仍面临诸多挑战。虽然,鞍点形PSF和四足

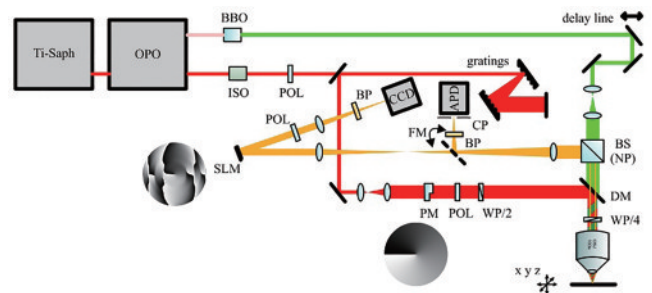
图 29 单分子的三维定位精度^[16]Fig. 29 3D localization of a single molecule^[16]

形 PSF 实现了对活体细胞 $6\sim 20\ \mu\text{m}$ 内的单分子定位成像,但由于其空间扩展远大于传统的 DH-PSF,所能定位的分子密度有限,并不适用于高密度的 SMLM^[61]。近年来,深度学习迅速发展,在超分辨成像领域得到了越来越多的关注^[62]。2020 年,Neher 等^[54]将深度学习用于 PSF 设计和高密度单分子定位的联合优化,实现了 $4\ \mu\text{m}$ 深度下的高荧光分子密度 SMLM 成像。Ikoma 等^[63]利用卷积神经网络(CNN),将多通道 PSF 设计与单分子定位联合优化,模拟结果表明,所设计方法可实现 $10\ \mu\text{m}$ 深度下的高密度单分子定位成像。目前,基于深度学习的 SMLM 尚处于初级研究阶段,在损失函数选择、CNN 架构及 PSF 相位片初值的选取、单分子定位训练集的构建、显微系统的优化等方面还需进一步研究。通过深度学习为高分子密度的 SMLM 设计最佳的 PSF,是目前 SMLM 领域的重要前沿课题,对推动活体厚样品长时程超分辨成像技术的发展具有重要的意义。

3.3.2 DH-PSF 辅助的 STED 显微技术

STED 技术是在共聚焦显微成像技术的基础上发展起来的,除了激发光所在光路以外,还引入新的一路与激发光共轴的甜甜圈型损耗光束,它们共同作用对系统 PSF 进行调制,有效降低 PSF 的宽度,从而实现超分辨成像,横向分辨率为 $20\sim 70\ \text{nm}$,轴向分辨率为 $40\sim 150\ \text{nm}$,时间分辨率为毫秒量级^[64-67]。与其他 SR 相比,STED 显微镜具有三维层析能力强、成像速度快和成像深度大的优势,在活体成像研究中获得广泛应

用,但系统光路复杂,设备昂贵,对系统的稳定性要求很高。然而,STED 的横向分辨率的提高通常比轴向分辨率的提高要好,而且轴向分辨率的提升需要利用“瓶形光束”形状的损耗光,系统更加复杂。2013 年, Laporte 等^[68]将传统的 2D STED 超分辨率成像和 DH-PSF 相结合(DH-STED),实现了三维 STED 成像,如图 30 所示。DH-STED 在保持 STED 横向分辨率的同时,轴向定位精度优于 $25\ \text{nm}$ 。图 31 为 DH-STED 对荧光珠的成像结果。DH-STED 与 3D STED 相比,系统更为简单,轴向分辨率更高,但 DH-STED 无法区分与传统焦深间隔更近的两个横向共定位荧光探针。事实上,DH-STED 能够通过扩展景深对纳米尺度物体进行三维高精度、高深度定位成像,从而通过单次横向扫描提供轴向信息,这在三维 STED 成像中是不可能的。

图 30 DH-PSF 辅助的 STED 显微光路示意图^[68]Fig. 30 Schematic of the DH-PSF-assisted STED microscopic optical path^[68]

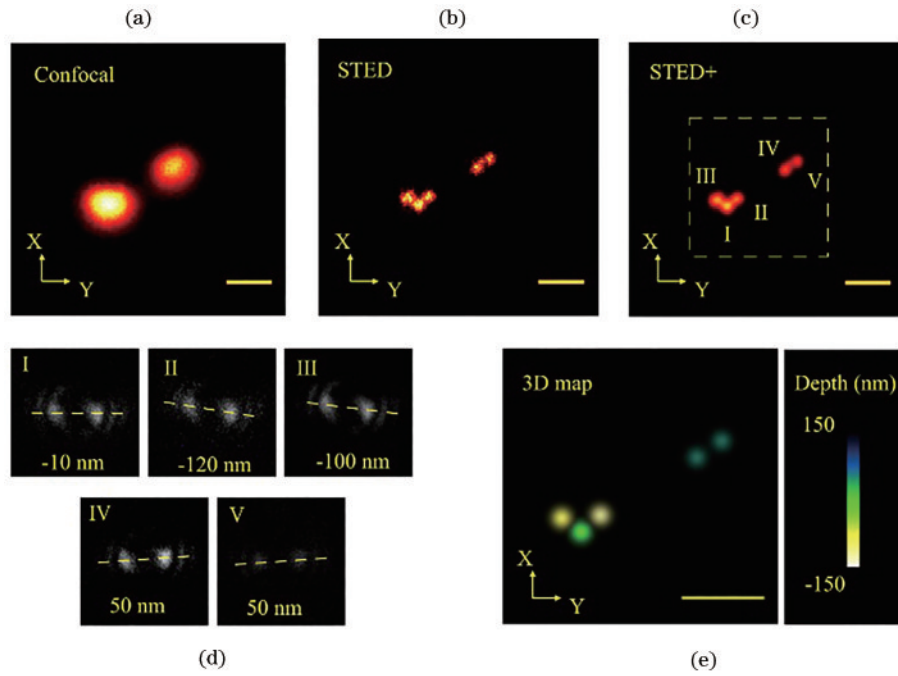


图 31 PDMS 中直径 100 nm 荧光珠的三维成像^[68]。(a)共聚焦图像;(b) STED 图像;(c)解卷积处理的 STED 图像;(d)图 31(c)中 5 个荧光珠对应的 DH 图像;(e)焦面处荧光珠的图像和对应的深度图

Fig. 31 Three dimensional imaging of a group of 100-nm diameter beads immobilized in a PDMS^[68]. (a) Confocal image; (b) corresponding STED image; (c) STED image processed by deconvolution; (d) corresponding DH images recorded at five points in Fig. 31(c); (e) image of fluorescent bead at focal plane and corresponding depth map, scale bar is 500 nm

3.3.3 基于 DH-PSF 的多焦点结构光照明显微技术

多焦点结构光照明显微技术(MSIM)^[69]不仅能够实现两倍于宽场的分辨率提升,而且具有较强的细胞组织穿透能力和层析成像能力,相比于传统的宽场结构光照明显微,更适合应用于厚样品的三维超分辨成像。但是,MSIM 有限的空间分辨率和较慢的三维成像速度仍制约着其在活体细胞纳米分辨动态成像中的应用。2018 年,深圳大学的 Li 等^[70]在 MSIM 的基础上,提出了基于 DH-PSF 工程的多焦点结构光照明显微技术(MSIMH),如图 32 所示,利用数字微镜器件(DMD)的快速横向扫描成像和 DH-PSF 的深度编码,结合像素重定位和解卷积算法,实现一次二维扫描,可

获得样品的三维超分辨图像信息,由于不需要轴向扫描,在保持分辨率提高 2 倍的情况下,三维成像速度相比传统 MSIM 提高 3~10 倍。图 33 为该系统对活体海拉细胞中的线粒体的三维成像。该方法对稀疏标记的荧光样品可以获得相当好的轴向分辨率。

此外,中科院西安光机所姚保利课题组基于 MSIM 与混合 PSF 提出了具有轴向定位能力的混合多焦点结构光照明显微系统(HMSIM)^[71]。系统混合 PSF 由高斯 PSF 和 DH-PSF 组成。图 34 为 HMSIM 的光学系统示意图,在 MSIM 的探测光路中,通过 SLM 加载的 CGH 与偏振片一起来产生混合 PSF,通过偏振片来调节 DH-PSF 和高斯 PSF 的强度比。图 35 为 HMSIM 的图像重构流程,高斯 PSF 用于传统 MSIM 的超分辨图像重构,通过数字针孔滤波、缩放、求和等步骤获得二维超分辨图像;DH-PSF 用于获取深度信息,通过角度算子,利用标定的 DH-PSF 两波瓣的旋转角度的关系获得每个聚焦点的深度信息。每个聚焦点的子图像处理过程如图 36 所示。最终, HMSIM 不仅获得了样品的二维超分辨图像,还能获得样品在景深范围(600 nm)内的深度分布,这种成像方法有望为观察薄层样品的精细三维空间分布提供一种有力的手段。

3.4 基于 DH-PSF 的新型激光扫描荧光显微技术

3.4.1 基于 DH-PSF 的数字重聚焦激光扫描显微技术

激光扫描共聚焦显微(CLSM)技术具有良好的成

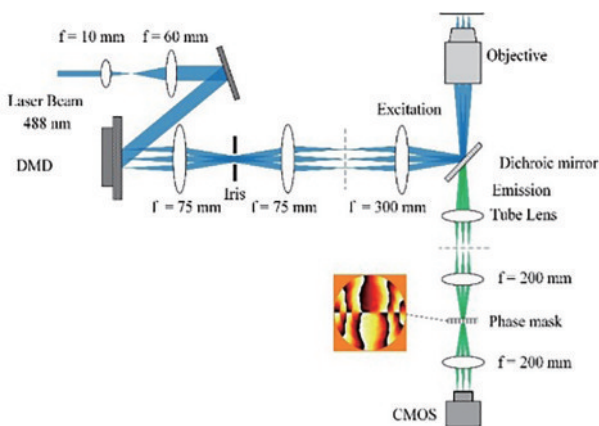


图 32 MSIMH 系统示意图^[70]

Fig. 32 Schematic of MSIMH system^[70]

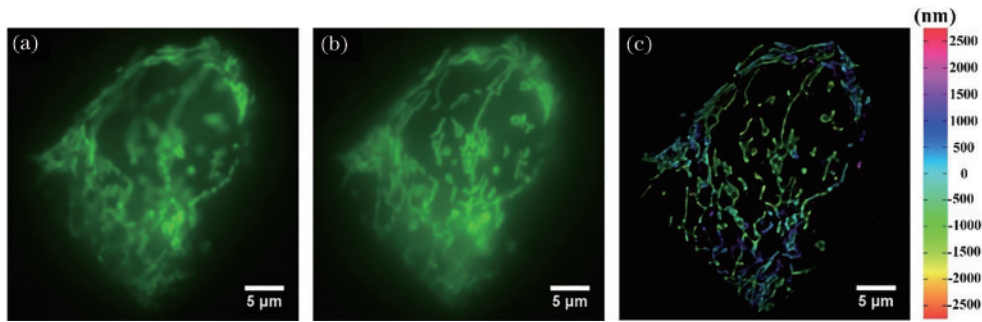


图 33 宽场显微镜和 MSIMH 对活细胞线粒体样品的成像对比^[70]。(a) 样品台的轴向位置为 $z=0$ 时, 线粒体的宽场成像结果; (b) $z=-1000$ nm 时, 线粒体的宽场成像结果; (c) $z=0$ 时, 线粒体的 MSIMH 三维成像结果

Fig. 33 Imaging comparison of mitochondria in living cells by wide-field microscope and MSIMH^[70]. (a) Wide-field image of mitochondria at $z=0$; (b) wide-field image of mitochondria at $z=-1000$ nm; (c) MSIMH 3D imaging of mitochondria at $z=0$

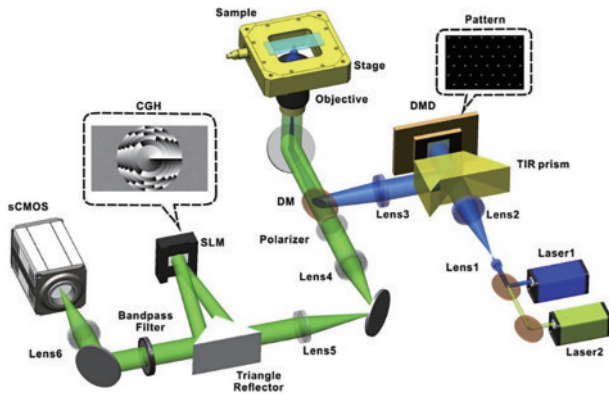


图 34 HMSIM 系统示意图^[71]

Fig. 34 Schematic of HMSIM system^[71]

像分辨率和层析能力, 被广泛应用于生命科学研究。传统的 CLSM 系统利用单个衍射受限的聚焦点对样品进行二维扫描, 并在探测光路中放置针孔来阻挡来自样品离焦位置的荧光信号。虽然选用尺寸极小的针孔可以有效地提高 CLSM 的成像分辨率, 但同时也会阻挡大部分荧光信号, 造成图像信噪比 (SNR) 大幅下降。因此在实际应用中, 针孔尺寸通常选择一个艾里斑的大小, 通过牺牲分辨率来确保系统的最佳 SNR。2015 年, Jesacher 等^[72]将 DH-PSF 工程技术与基于面阵探测器的激光扫描显微相结合, 提出了一种基于螺旋相位工程的数字重聚焦扫描显微 (RESCH) 技术, 如图 37 所示。其在探测光路中引入 DH-PSF 相位片, 将样品发射的高斯荧光点转换成双螺旋的形式;

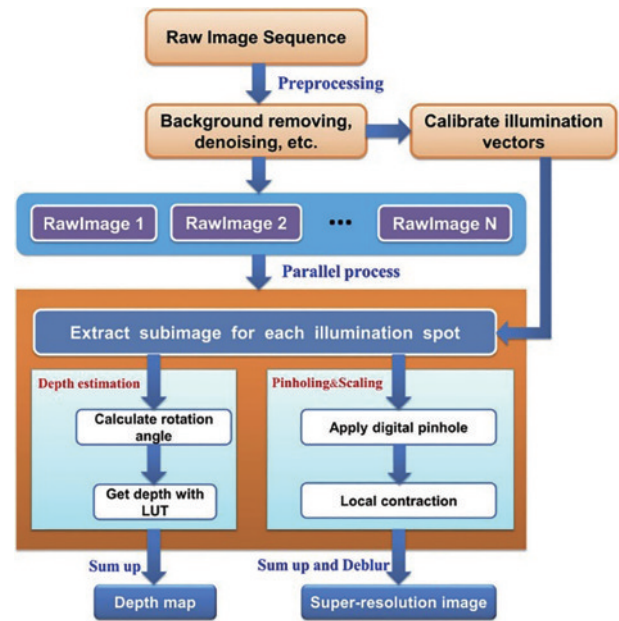


图 35 图像重建流程图^[71]

Fig. 35 Flowchart of the image reconstruction process^[71]

在此基础上, 利用 DH-PSF 的轴向定位特性和数字重聚焦处理方法, 即利用特定旋转角度的虚拟针孔 [如图 37 (b) 所示] 进行滤波。RESCH 能够从单次二维扫描的数据中获得轴向 400 nm 范围内样品不同层的结构信息, 如图 38 所示, 大幅提升了 CLSM 的三维成像速度, 同时保持了 CLSM 的层析能力, 但该方法利用单点激发和样品台的扫描, 成像速度较慢。

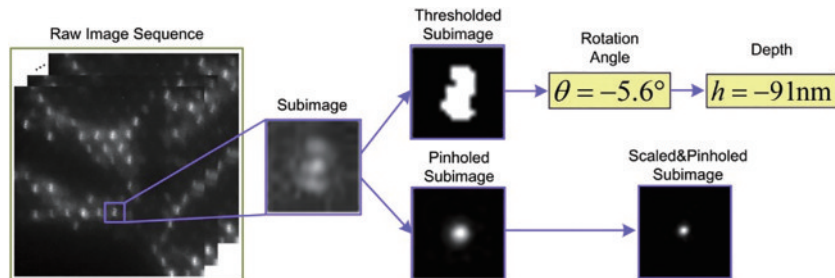


图 36 子图像的处理过程^[71]

Fig. 36 Postprocessing of each rodlike sub-image^[71]

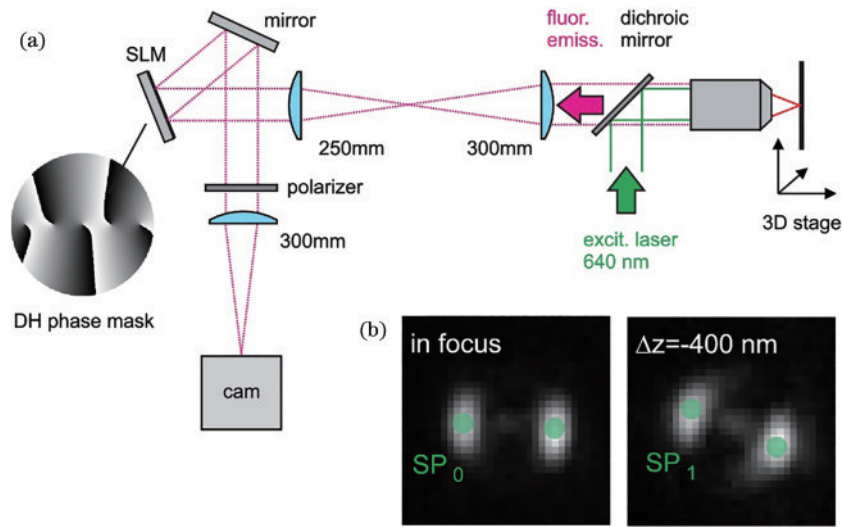


图 37 RESCH 系统图及成像图^[72]。(a) RESCH 的光路设置;(b) 直径为 100 nm 荧光珠的 DH 滤波图像,圆孔为相应离焦处的合成针孔
Fig. 37 Schematic of RESCH system and RESCH fluorescent images^[72]. (a) Sketch of the RESCH optical path; (b) DH-filtered image of a 100-nm diameter fluorescent bead, the circular hole is a synthetic pinhole at the corresponding defocus

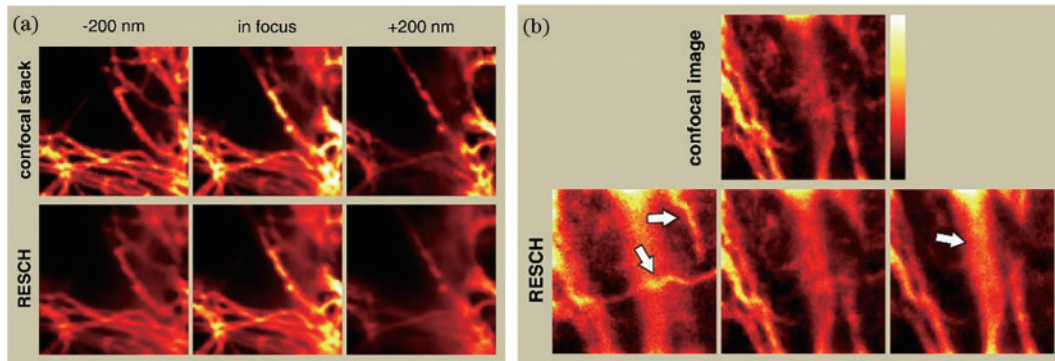


图 38 微管的共聚焦图像和 RESCH 图像^[72]。(a) 第一行为轴向相隔 200 nm 的共聚焦图像,第二行为对应位置处的 RESCH 图像;
(b) 另一个样品的共聚焦图像和 RESCH 图像
Fig. 38 Confocal and RESCH images of microtubules^[72]. (a) The first row is confocal images recorded at axial steps of 200 nm, the second row is RESCH images at corresponding position; (b) confocal image and RESCH images of another sample

2021 年,深圳大学李四维等^[73]提出一种基于多焦点结构光照明的 RESCH(MRESCH),如图 39 所示,该技术将 RESCH 与基于 DMD 的 MSIM 相结合,能够利用 DMD 动态产生多焦点阵,实现对样品的并行激发和数字扫描;然后利用图 40 基于虚拟针孔的数字重聚焦算法,实现了单次二维扫描,获得轴向不同位置的光切片图像序列,大幅提高了 RESCH 系统的成像速度。

3.4.2 选择扫描多焦点多光子显微成像技术

在大量突触和树突部位同时进行高分辨率成像对理解神经元如何接收和整合信号至关重要。然而,针对大量突触和树突位置的功能成像面临重大的技术挑战。2019 年,Xue 等^[74]提出了一种新高分辨、高信噪比的并行化功能成像方法来解决这些问题,命名为选择扫描多焦点多光子显微成像技术(saMMM),如图 41 所示。在激发光路中使用 SLM 进行波前整形,产生具有亚微米分辨的 3D 多焦点阵列并行激发,在探测光路

中使用 DH-PM 扩展系统的景深,可以同时检测整个三维体积内这些激发斑点的荧光,实现了无扫描激发和检测,与已有的随机扫描、贝塞尔光束扫描法相比,信噪比提高了 1 个数量级。

saMMM 可以在一个三维体积中的 100 多个位置监测培养神经元的自发 Ca^{2+} 信号,如图 42 所示。采用 SLM 来灵活地控制激励位置,结合 GL 相位板来延长系统景深,使得单帧图像在 $10 \mu\text{m}$ 厚的体积上收集信号。这种方法在数百微米的视场范围内显著提高了信噪比和体积成像速度,保持了亚微米的空间分辨率。另外,对于鼠脑切片,在 1 到 2 平均自由程(MFP)的成像深度范围内(大约 $50 \mu\text{m}$)组织散射不显著,组织像差和散射几乎不影响 DH-PSF 的焦深和横向尺寸。对于较深的成像(多个 MFP),可以结合自适应光学(AO)校正样品诱导的像差^[75]。因此,只要稍加修改,saMMM 可能适用于组织内体积较大、分辨率较低的研究。saMMM 在三维空间中实现了

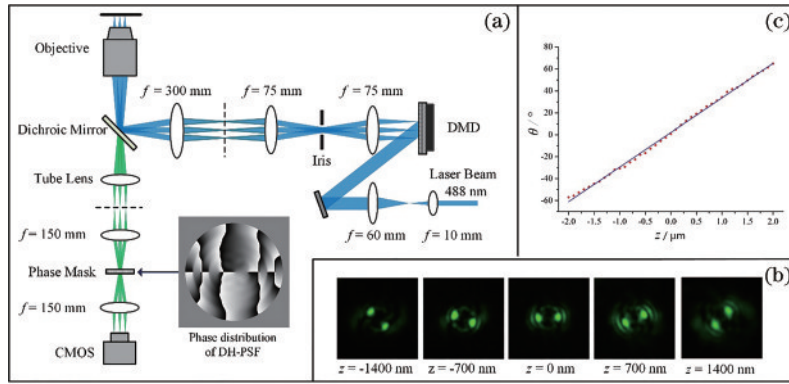


图 39 MRESCH 的示意图和性能图^[73]。(a) MRESCH 的光路；(b) DH-PSF 在不同轴向位置的强度分布；(c) DH-PSF 旋转角度与对应轴向位置的关系曲线

Fig. 39 Schematic diagram and characterization of the MRESCH^[73]. (a) Optical configuration of MRESCH; (b) intensity distribution of the DH-PSF at different positions along z -axis; (c) relationship between the two lobe rotation angles of the DH-PSF and position along z -axis

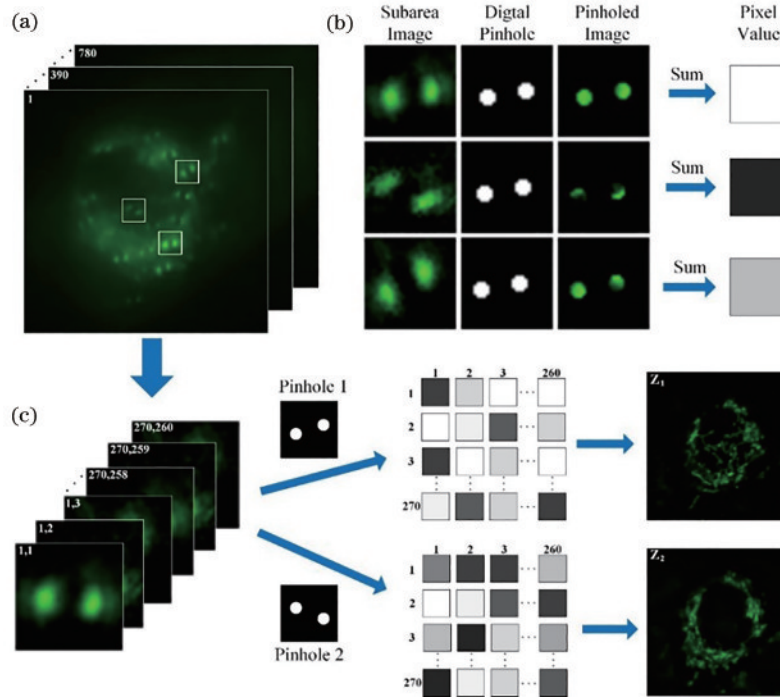


图 40 MRESCH 重构过程示意图^[73]。(a) MRESCH 的原始图像数据；(b) 附上数字针孔后的双螺旋点；(c) MRESCH 的图像重构过程

Fig. 40 Schematic of reconstruction process of MRESCH^[73]. (a) Raw images of MRESCH; (b) double helix point with digital pinhole;

(c) image reconstruction process of MRESCH

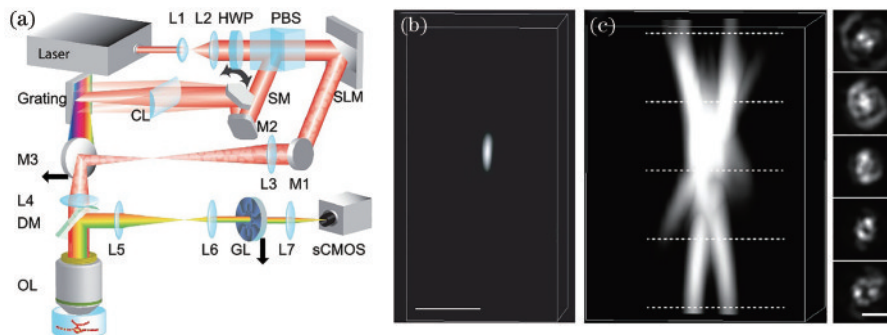


图 41 saMMM 系统示意图与经 GL 相位片调制后的 DH-PSF^[74]

Fig. 41 saMMM setup and DH-PSF modulated through the GL phase plate^[74]

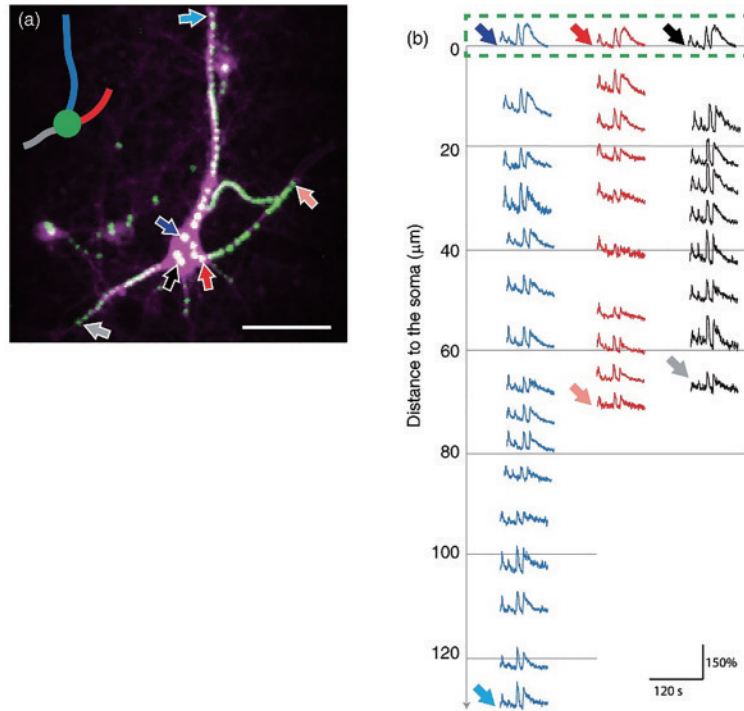


图 42 在表达 jRGECO1 的神经元上 113 个位点的 Ca^{2+} 信号的同时监控^[74]

Fig. 42 Monitoring simultaneously Ca^{2+} dynamics from 113 foci on cultured expressing jRGECO1 neurons^[74]

对荧光的同时激发和检测,大大提高了功能成像的信噪比和成像速度,同时减少了光损伤,有可能应用于高通量三维成像和活体动物整个神经元的局部活动监测。

3.5 DH-PSF 技术在其他光学领域的应用

3.5.1 基于 DH-PSF 的光操纵技术

激光光镊^[76-78]利用高度聚焦光场中的梯度和微粒散射产生的光压对微粒进行钳镊和操控,具有非接触操纵、作用力均匀、操纵精度高等优点,其光学梯度力可以达到亚皮牛量级,操纵对象尺度可从数纳米至几十微米,在生物医学、凝聚态物理等领域获得了

广泛的应用。在过去十年中,光镊与其他技术的结合进一步扩大了光镊在生物学领域的影响。2011年,Conkey等^[79]提出了一种用于高精度三维多粒子跟踪的 DH-PSF 全息光镊系统,如图 43 所示。光镊系统在三维空间中创建和控制多个光学陷阱,而 DH-PSF 在宽视场中进行高精度、三维、多粒子跟踪。该集成系统适用于发射/散射相干光或非相干光的粒子,并且很容易适应现有的全息光镊系统。该系统可实现对多个微操作粒子的同时跟踪,并通过测量施加在粒子上的流体阻力来定量估计光阱中的横向力和轴向力。

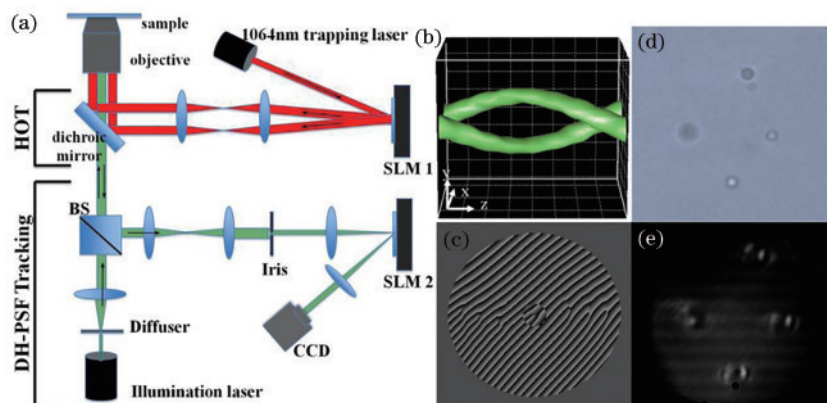


图 43 全息光镊和 DH-PSF 系统示意图及细节图。(a)集成了全息光镊与 DH-PSF 系统的实验装置^[79]; (b) DH-PSF 分布示意图; (c) DH-PSF 相位模板; (d)亮场图像; (e)离轴暗场 DH-PSF 图像

Fig. 43 Schematic of holographic optical tweezer (HOT) and DH-PSF system and detail images. (a) Experimental setup integrated with HOT system and DH-PSF system^[79]; (b) DH-PSF distribution; (c) DH-PSF phase mask; (d) brightfield image; (e) corresponding off-axis darkfield DH-PSF image

基于DH-PSF的光镊系统可用于测量光学阱产生的复杂三维力场,从而使该系统适用于胶体系统、生物材料和各种软物质系统相互作用的定量研究。它还可以与各种三维光学和非线性光学成像方法相结合,如共焦荧光显微镜、相干反斯托克斯拉曼散射显微镜、多光子激发荧光显微镜和多倍频显微成像技术等,从而使光学操纵粒子的空间示踪与复杂软物质、生物系统的三维图像相关联。

3.5.2 基于DH-PSF的螺旋超材料制备技术

螺旋超材料是一种由螺旋结构单元周期性排列而成的人工手性材料,相比于传统利用起偏器和1/4波片组合而成的圆起偏器,具有工作范围宽和手性强等优点。由于结构单元的特殊性,螺旋超材料的加工范围超出了电子束刻蚀(EBL)、聚焦离子束(FIB)刻蚀等传统二维加工方法的加工范围。北京大学李焱课题组^[80-81]提出了基于双螺旋光束的双螺旋微结构的双光子聚合制备技术。图44为单次曝光双光子聚合实验装置示意图。利用双螺旋光束,经过单次曝光就能聚合出无粘连且螺旋圈数高的双螺旋微结构,制备出了周期为4 μm的双螺旋微结构阵列,如图45所示,该技术有望用于螺旋超材料的快速制备。

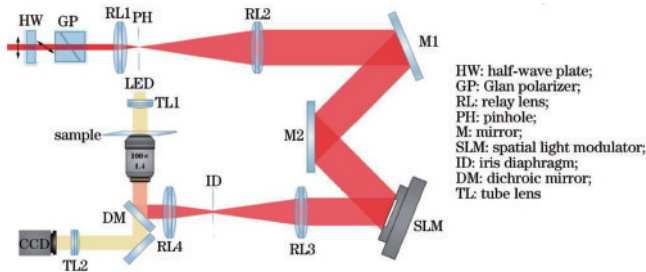


图44 单次曝光双光子聚合实验装置示意图^[81]

Fig. 44 Schematic of experimental setup for two-photon polymerization with single exposure^[81]

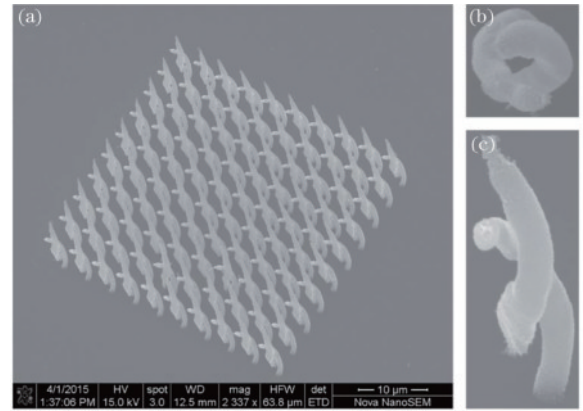


图45 聚合物双螺旋微结构的SEM图^[81]。(a)双螺旋微结构阵列;(b)(c)单个双螺旋微结构的顶视图和侧视图

Fig. 45 SEM images of polymerized double-helix microstructures^[81].
(a) Double-helix microstructure array; (b)(c) top and side views of single double-helix microstructure

上述方法制备的螺旋结构的手性参数不可调。2021年,中国科技大学吴东课题组^[82]提出了一种空间调制的飞秒激光束通过单次曝光制备双螺旋微结构的高效灵活方法。图46为用于制造和检测双螺旋微结构的全息图的实验装置和概念设计示意图,SLM用于调控入射飞秒激光束,产生两个具有不同拓扑荷数的同轴旋涡光束,并通过高NA显微系统在聚合物(SZ2080)样品内部产生干涉,实现双螺旋光场的产生,然后利用双光子聚合产生螺旋微结构。螺旋微结构的横向主瓣和手性依赖于光学涡旋的轨道角动量(OAM)差,微结构的直径可以通过拓扑电荷的大小进一步调整,如图47所示。通过制备的双螺旋微结构,可以观察到巨大的涡旋二色性信号,有力地说明了单次曝光调制光束产生的螺旋微结构在手性光学光谱和手性光学中的应用效果,这种快速制造策略为有效产生螺旋微结构提供了机会。

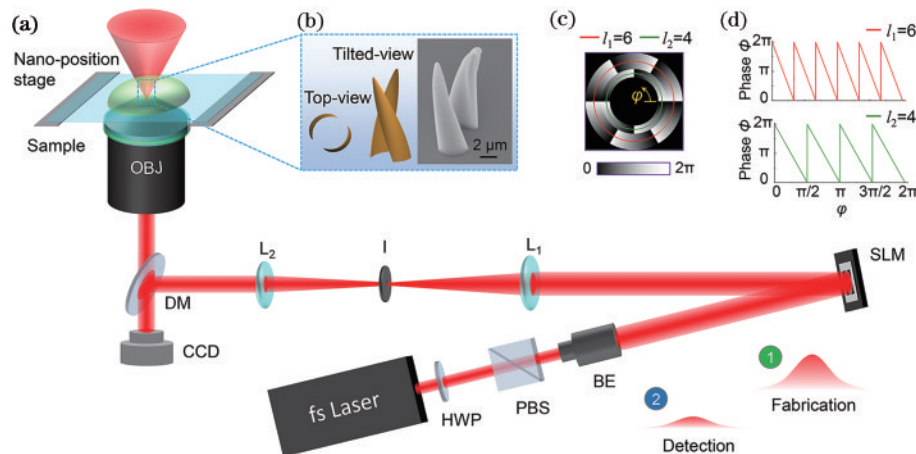
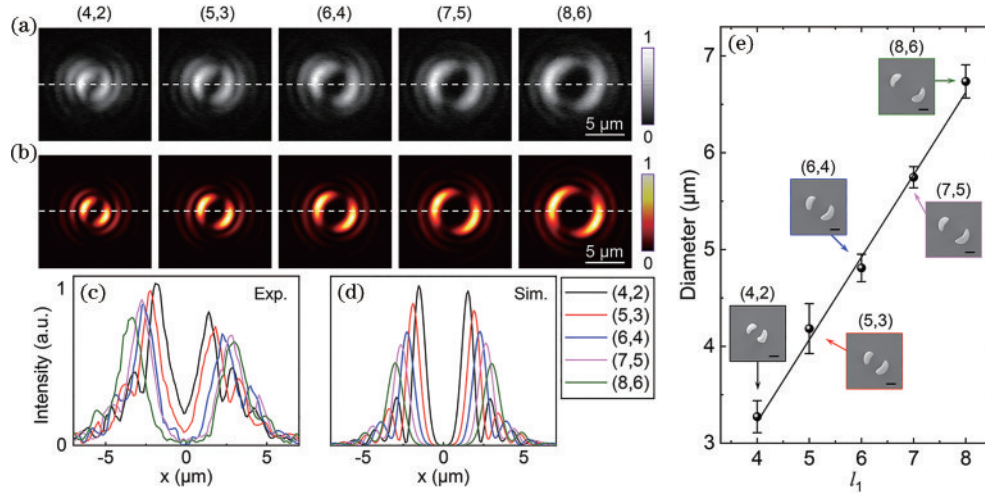


图46 制造和检测双螺旋微观结构的全息图的实验装置和概念设计示意图^[82]

Fig. 46 Experimental setup and conceptual design of the holograms for fabricating and detecting double-helical microstructures^[82]

目前,基于DH-PSF的螺旋超材料的制备技术还处于刚起步阶段,制备技术还有待进一步优化和提

高,如通过阵列双螺旋光束的产生,发展基于阵列光束扫描的技术,提高制备速度;优化相位片的设计,提

图 47 不同拓扑荷数对应的双螺旋微结构的直径^[82]Fig. 47 Diameters of double-helical microstructures to different topological charges^[82]

高能量利用率等。进一步,结合超表面多维光场调控^[83],制备具有多功能螺旋微结构的材料,拓展其实际应用。

4 总结与展望

经过十多年的发展,DH-PSF 工程技术已在超分辨荧光显微、单分子示踪、三维成像、光学微操纵、光学微加工、光学检测等领域得到了广泛的应用,极大促进了这些领域的发展,取得了一系列重要的成果。然而该技术在以下方面还有待进一步的发展。1) DH-PSF 相位片的设计还需要改进,例如 DH-PSF 的成像深度、能量利用率、系统像差的抑制、衍射旁瓣的抑制等还可以进一步优化。2) 新的基于 DH-PSF 的单粒子定位算法。在单分子定位超分辨成像和单粒子示踪领域发展三维高密度、高精度快速定位算法对完整细胞三维超分辨动态成像至关重要。因此,开发新的基于 DH-PSF 的高密度、高速度三维单分子快速定位算法具有重要的意义。3) 双螺旋成像透镜的小型化和集成化。目前利用超表面已初步实现 DH 超透镜的小型化,仍需要发展新的制备技术和集成技术,实现基于 DH-PSF 的紧凑和低功耗深度成像系统,对增强现实、机器人技术、手势检测和人脸识别等新兴技术至关重要。4) 进一步拓展 DH-PSF 工程技术的应用范围,推进各领域的不断发展。

总之,随着上述各方面的发展,DH-PSF 成像技术的应用潜力将被进一步挖掘,并更好地助力前沿科学,特别是生命科学、医学、材料科学和信息科学等相关科学问题的研究。

参 考 文 献

[1] 潘岳,丁剑平,王慧田. 新型矢量光场调控: 简介、进展与应用[J]. 光学学报, 2019, 39(1): 0126001.
Pan Y, Ding J P, Wang H T. Manipulation on novel

vector optical fields: introduction, advances and applications [J]. Acta Optica Sinica, 2019, 39(1): 0126001.

- [2] 周源,李润泽,于湘华,等. 基于液晶空间光调制器的光场调控技术及应用进展[J]. 光子学报, 2021, 50(11): 1123001.
Zhou Y, Li R Z, Yu X H, et al. Progress in study and application of optical field modulation technology based on liquid crystal spatial light modulators[J]. Acta Photonica Sinica, 2021, 50(11): 1123001.
- [3] 张希纯,吕金光,张崇,等. 基于超表面光场调控的阵列局域空心光束研究[J]. 中国激光, 2021, 48(21): 2105001.
Zhang X C, Lü J G, Zhang C, et al. Multiple bottle beams based on metasurface light field control[J]. Chinese Journal of Lasers, 2021, 48(21): 2105001.
- [4] Bekshaev A Y, Soskin M S, Vasnetsov M V. Angular momentum of a rotating light beam[J]. Optics Communications, 2005, 249(4/5/6): 367-378.
- [5] Schechner Y Y, Piestun R, Shamir J. Wave propagation with rotating intensity distributions[J]. Physical Review E, 1996, 54(1): R50-R53.
- [6] Piestun R, Schechner Y Y, Shamir J. Self-imaging with finite energy[J]. Optics Letters, 1997, 22(4): 200-202.
- [7] Piestun R, Shamir J. Generalized propagation-invariant wave fields[J]. Journal of the Optical Society of America A, 1998, 15(12): 3039-3044.
- [8] 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.
- [9] Greengard A, Schechner Y Y, Piestun R. Depth from diffracted rotation[J]. Optics Letters, 2006, 31(2): 181-183.
- [10] Pavani S R P, Piestun R. High-efficiency rotating point spread functions[J]. Optics Express, 2008, 16(5): 3484-3489.
- [11] Quirin S, Piestun R. Depth estimation and image recovery using broadband, incoherent illumination with engineered point spread functions[J]. Applied Optics, 2012, 52(1): A367-A376.

- [12] Grover G, Pavani S R P, Piestun R. Performance limits on three-dimensional particle localization in photon-limited microscopy[J]. *Optics Letters*, 2010, 35(19): 3306-3308.
- [13] Pavani S R P, DeLuca J G, Piestun R. Polarization sensitive, three-dimensional, single-molecule imaging of cells with a double-helix system[J]. *Optics Express*, 2009, 17(22): 19644-19655.
- [14] Pavani S R P, Piestun R. Three dimensional tracking of fluorescent microparticles using a photon-limited double-helix response system[J]. *Optics Express*, 2008, 16(26): 22048-22057.
- [15] Pavani S R P, Greengard A, Piestun R. Three-dimensional localization with nanometer accuracy using a detector-limited double-helix point spread function system [J]. *Applied Physics Letters*, 2009, 95(2): 021103.
- [16] 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.
- [17] Pavani S R P, Piestun R. 3D microscopy with a double-helix point spread function[J]. *Proceedings of SPIE*, 2009, 7184: 71840I.
- [18] Jin C Q, Zhang J H, Guo C L. Metasurface integrated with double-helix point spread function and metalens for three-dimensional imaging[J]. *Nanophotonics*, 2019, 8(3): 451-458.
- [19] Grover G, DeLuca K, Quirin S, et al. Super-resolution photon-efficient imaging by nanometric double-helix point spread function localization of emitters (SPINDLE) [J]. *Optics Express*, 2012, 20(24): 26681-26695.
- [20] 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.
- [21] Baránek M, Bouchal Z. Optimizing the rotating point spread function by SLM aided spiral phase modulation[J]. *Proceedings of SPIE*, 2014, 9441: 161-170.
- [22] Li H F, Yun X, Zhang Y H, et al. Optimization of Fresnel-zones-based double helix point spread function and measurement of particle diffusion coefficient[J]. *Optics Communications*, 2022, 502: 127411.
- [23] Jin C Q, Afsharnia M, Berlich R, et al. Dielectric metasurfaces for distance measurements and three-dimensional imaging[J]. *Advanced Photonics*, 2019, 1(3): 036001.
- [24] Colburn S, Majumdar A. Metasurface generation of paired accelerating and rotating optical beams for passive ranging and scene reconstruction[J]. *ACS Photonics*, 2020, 7(6): 1529-1536.
- [25] Berlich R, Bräuer A, Stallinga S. Single shot three-dimensional imaging using an engineered point spread function[J]. *Optics Express*, 2016, 24(6): 5946-5960.
- [26] Wang Z J, Cai Y N, Liang Y S, et al. Single shot, three-dimensional fluorescence microscopy with a spatially rotating point spread function[J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 8(12): 5493-5506.
- [27] Dupont A, Lamb D C. Nanoscale three-dimensional single particle tracking[J]. *Nanoscale*, 2011, 3(11): 4532-4541.
- [28] Thompson M A, Lew M D, Badieirostami M, et al. Localizing and tracking single nanoscale emitters in three dimensions with high spatiotemporal resolution using a double-helix point spread function[J]. *Nano Letters*, 2010, 10(1): 211-218.
- [29] Thompson M A, Casolari J M, Badieirostami M, et al. Three-dimensional tracking of single mRNA particles in *saccharomyces cerevisiae* using a double-helix point spread function[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(42): 17864-17871.
- [30] Wang D P, Agrawal A, Piestun R, et al. Enhanced information content for three-dimensional localization and tracking using the double-helix point spread function with variable-angle illumination epifluorescence microscopy[J]. *Applied Physics Letters*, 2017, 110(21): 211107.
- [31] Gahlmann A, Moerner W E. Exploring bacterial cell biology with single-molecule tracking and super-resolution imaging[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(1): 9-22.
- [32] Lew M D, Thompson M A, Badieirostami M, et al. *In vivo* three-dimensional superresolution fluorescence tracking using a double-helix point spread function[J]. *Proceedings of SPIE*, 2010, 7571: 75710Z.
- [33] Wang D P, Wu H C, Schwartz D K. Three-dimensional tracking of interfacial hopping diffusion[J]. *Physical Review Letters*, 2017, 119(26): 268001.
- [34] Wu H C, Sarfati R, Wang D P, et al. Electrostatic barriers to nanoparticle accessibility of a porous matrix[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(10): 4696-4704.
- [35] Lasker K, von Diezmann L, Zhou X, et al. Selective sequestration of signalling proteins in a membraneless organelle reinforces the spatial regulation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5(3): 418-429.
- [36] Rocha J M, Gahlmann A. Single-molecule tracking microscopy-a tool for determining the diffusive states of cytosolic molecules[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2019, 151(151): e59387.
- [37] Li H, Chen D N, Xu G X, et al. Three dimensional multi-molecule tracking in thick samples with extended depth-of-field[J]. *Optics Express*, 2015, 23(2): 787-794.
- [38] Chen D N, Yu B, Li H, et al. Approach to multiparticle parallel tracking in thick samples with three-dimensional nanoresolution[J]. *Optics Letters*, 2013, 38(19): 3712-3715.
- [39] Li H F, Wang F M, Wei T D, et al. Particles 3D tracking with large axial depth by using the 2π -DH-PSF [J]. *Optics Letters*, 2021, 46(20): 5088-5091.
- [40] Wang F M, Li H F, Ji L, et al. Three-dimensional diffusion coefficient measurement by a large depth-of-field rotating point spread function[J]. *Applied Optics*, 2021, 60(35): 10766-10771.

- [41] Yu B, Yu J, Li W H, et al. Nanoscale three-dimensional single particle tracking by light-sheet-based double-helix point spread function microscopy[J]. *Applied Optics*, 2016, 55(3): 449-453.
- [42] Gustavsson A K, Petrov P N, Lee M Y, et al. 3D single-molecule super-resolution microscopy with a tilted light sheet[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 123.
- [43] Wu Y C, FasterShroff H. Faster, shaper, and deeper: structured illumination microscopy for biological imaging[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(12): 1011-1019.
- [44] Sahl S J, Hell S W, Jakobs S. Fluorescence nanoscopy in cell biology[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, 18(11): 685-701.
- [45] Zanicchi F C, Lavagnino Z, Donnorso M P, et al. Live-cell 3D super-resolution imaging in thick biological samples[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(12): 1047-1049.
- [46] Schermelleh L, Ferrand A, Huser T, et al. Super-resolution microscopy demystified[J]. *Nature Cell Biology*, 2019, 21(1): 72-84.
- [47] 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.
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.
- [48] Huang B, Wang W Q, Bates M, et al. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy[J]. *Science*, 2008, 319(5864): 810-813.
- [49] Toprak E, Balci H, Blehm B H, et al. Three-dimensional particle tracking via bifocal imaging[J]. *Nano Letters*, 2007, 7(7): 2043-2045.
- [50] Lee H L D, Sahl S J, Lew M D, et al. The double-helix microscope super-resolves extended biological structures by localizing single blinking molecules in three dimensions with nanoscale precision[J]. *Applied Physics Letters*, 2012, 100(15): 153701.
- [51] Yoon J, Comerci C J, Weiss L E, et al. Revealing nanoscale morphology of the primary cilium using super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2019, 116(2): 319-329.
- [52] Bennett H W, Gustavsson A K, Bayas C A, et al. Novel fibrillar structure in the inversin compartment of primary cilia revealed by 3D single-molecule superresolution microscopy[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2020, 31(7): 619-639.
- [53] Alvarez L H, Eisold S, Gumerov R A, et al. Deformation of microgels at solid-liquid interfaces visualized in three-dimension[J]. *Nano Letters*, 2019, 19(12): 8862-8867.
- [54] Nehme E, Freedman D, Gordon R, et al. DeepSTORM 3D: dense 3D localization microscopy and PSF design by deep learning[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(7): 734-740.
- [55] 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.
- [56] Rehman S A, Carr A R, Lenz M O, et al. Maximizing the field of view and accuracy in 3D single molecule localization microscopy[J]. *Optics Express*, 2018, 26(4): 4631-4637.
- [57] Barsic A, Grover G, Piestun R. Three-dimensional super-resolution and localization of dense clusters of single molecules[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 5388.
- [58] Carr A R, Ponjavic A, Basu S, et al. Three-dimensional super-resolution in eukaryotic cells using the double-helix point spread function[J]. *Biophysical Journal*, 2017, 112(7): 1444-1454.
- [59] Backlund M P, Lew M D, Backer A S, et al. The role of molecular dipole orientation in single-molecule fluorescence microscopy and implications for super-resolution imaging[J]. *ChemPhysChem*, 2014, 15(4): 587-599.
- [60] Sage D, Kirshner H, Pengo T, et al. Quantitative evaluation of software packages for single-molecule localization microscopy[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(8): 717-724.
- [61] 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.
- [62] 陆青霜, 金璐红, 许迎科. 深度学习在超分辨显微成像中的应用研究进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(24): 2400007.
Lu Q S, Jin L H, Xu Y K. Progress on applications of deep learning in super-resolution microscopy imaging[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(24): 2400007.
- [63] Ikoma H, Peng Y F, Broxton M, et al. Snapshot multi-PSF 3D single-molecule localization microscopy using deep learning[C]//*Imaging and Applied Optics Congress*, June 22-26, 2020, Washington, DC. Washington, D.C.: OSA, 2020: CW3B.3.
- [64] 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.
- [65] Schmidt R, Wurm C A, Jakobs S, et al. Spherical nanosized focal spot unravels the interior of cells[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(6): 539-544.
- [66] Westphal V, Rizzoli S O, Lauterbach M A, et al. Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement[J]. *Science*, 2008, 320(5873): 246-249.
- [67] Bingen P, Reuss M, Engelhardt J, et al. Parallelized STED fluorescence nanoscopy[J]. *Optics Express*, 2011, 19(24): 23716-23726.
- [68] Laporte G P J, Conkey D B, Vasdekis A, et al. Double-helix enhanced axial localization in STED nanoscopy[J]. *Optics Express*, 2013, 21(25): 30984-30992.
- [69] York A G, Parekh S H, Nogare D D, et al. Resolution doubling in live, multicellular organisms via multifocal structured illumination microscopy[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 749-754.
- [70] Li S W, Wu J J, Li H, et al. Rapid 3D image scanning microscopy with multi-spot excitation and double-helix point spread function detection[J]. *Optics Express*, 2018,

- 26(18): 23585-23593.
- [71] Wang Z J, Cai Y N, Qian J, et al. Hybrid multifocal structured illumination microscopy with enhanced lateral resolution and axial localization capability[J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(6): 3058-3070.
- [72] Jesacher A, Ritsch-Marte M, Piestun R. Three-dimensional information from two-dimensional scans: a scanning microscope with postacquisition refocusing capability[J]. *Optica*, 2015, 2(3): 210-213.
- [73] 李四维, 林丹樱, 邹小慧, 等. 基于双螺旋点扩散函数工程的多焦点图像扫描显微[J]. *物理学报*, 2021, 70(3): 038701.
Li S W, Lin D Y, Zou X H, et al. Multifocal image scanning microscopy based on double-helix point spread function engineering[J]. *Acta Physica Sinica*, 2021, 70(3): 038701.
- [74] Xue Y, Berry K P, Boivin J R, et al. Scanless volumetric imaging by selective access multifocal multiphoton microscopy[J]. *Optica*, 2019, 6(1): 76-83.
- [75] Ji N. Adaptive optical fluorescence microscopy[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(4): 374-380.
- [76] Fazal F M, Block S M. Optical tweezers study life under tension[J]. *Nature Photonics*, 2011, 5(6): 318-321.
- [77] 张聿全, 张硕硕, 闵长俊, 等. 飞秒光镊技术研究与应用进展[J]. *中国激光*, 2021, 48(19): 1918001.
Zhang Y Q, Zhang S S, Min C J, et al. Research progress of femtosecond optical tweezers and their applications[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2021, 48(19): 1918001.
- [78] 梁言生, 姚保利, 雷铭, 等. 基于空间光场调控技术的光学微操纵[J]. *光学学报*, 2016, 36(10): 1026003.
Liang Y S, Yao B L, Lei M, et al. Optical micro-manipulation based on spatial modulation of optical fields[J]. *Acta Optica Sinica*, 2016, 36(10): 1026003.
- [79] Conkey D B, Trivedi R P, Pavani S R P, et al. Three-dimensional parallel particle manipulation and tracking by integrating holographic optical tweezers and engineered point spread functions[J]. *Optics Express*, 2011, 19(5): 3835-3842.
- [80] Zhang S J, Li Y, Liu Z P, et al. Two-photon polymerization of a three dimensional structure using beams with orbital angular momentum[J]. *Applied Physics Letters*, 2014, 105(6): 061101.
- [81] 刘力谱, 张世杰, 杨宏, 等. 双螺旋微结构的双光子聚合制备[J]. *中国激光*, 2017, 44(1): 0102006.
Liu L P, Zhang S J, Yang H, et al. Fabrication of double-helix microstructures by two-photon polymerization[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2017, 44(1): 0102006.
- [82] Ni J C, Hu Y L, Liu S L, et al. Controllable double-helical microstructures by photonic orbital angular momentum for chiroptical response[J]. *Optics Letters*, 2021, 46(6): 1401-1404.
- [83] 杨渤, 程化, 陈树琪, 等. 基于傅里叶分析的超表面多维光场调控[J]. *光学学报*, 2019, 39(1): 0126005.
Yang B, Cheng H, Chen S Q, et al. Multi-dimensional manipulation of optical field by metasurfaces based on Fourier analysis[J]. *Acta Optica Sinica*, 2019, 39(1): 0126005.