

荧光单分子的频率域纳米级快速定位算法及其在超分辨荧光成像中的应用

于 斌 陈丹妮 刘 磊 屈军乐 牛憨笨

(深圳大学光电工程学院教育部/广东省光电子器件与系统重点实验室, 广东 深圳 518060)

摘要 为了解决现有单分子定位算法中定位速度慢和对噪声有评估依赖性的问题,基于补零快速傅里叶变换和相位梯度算子提出一种新型的噪声自由的频率域非迭代荧光单分子定位算法。计算机模拟结果表明该算法定位精度可达纳米量级,而定位速度与解线性方程组法在同一个数量级。进而在传统实验参数条件下,对不同间隔分子带模型进行了模拟超分辨成像。模拟结果表明,可以区分中心相隔 30 nm 的两个分子带。此外,将该算法用于 HeLa 细胞突起中微丝束结构的荧光超分辨成像,从重构获得的图像中可以看到微丝束的直径为 75~200 nm,验证了该算法的实用性。

关键词 显微;超分辨成像;单分子定位;相位梯度;微丝束

中图分类号 TH742 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS201232.0218001

Fast Fourier-Domain Localization Algorithm of Single Molecule with Nanometer Resolution for Super-Resolution Fluorescence Imaging

Yu Bin Chen Danni Liu Lei Qu Junle Niu Hanben

(Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, College of Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China)

Abstract In order to improve the computational speed and prior background noise-dependent problem of single molecule localization algorithm, a Fourier domain localization scheme based on zero-padded fast Fourier transform and phase gradient operators is used to obtain a powerful mathematical model for localizing a single molecule without numerical fitting. Numerical simulations indicate that the proposed method exhibits nanometer scale localization precision while executing almost as fast as the fluoroBancroft algorithm. Furthermore, a sample consisted of several lines of molecules are simulated imaged. The results demonstrate that two lines of molecules separated by 30 nm can be resolved. Finally, super-resolution images of filopodia in HeLa cells are reconstructed based on the method, in which filopodia with diameter of 75~200 nm are resolved.

Key words microscopy; super-resolution imaging; single molecule localization; phase gradient; filopodia

OCIS codes 180.2520; 100.2960; 100.6640

1 引 言

荧光显微成像由于受光学衍射极限的限制,其空间分辨率只能达到横向约 200 nm、轴向约 600 nm。对于尺度小于衍射极限的单个荧光分子来说,探测到的荧光图像的大小由显微光学系统的艾里(Airy)斑确定,但是该荧光分子的实际空间位

置可由该弥散斑的质心确定,其定位精度可达纳米级^[1,2]。单个荧光分子的定位和探测为监测蛋白质及生物大分子的动力学过程提供了强大的工具,成为细胞生物学最重要的研究领域之一,如在感染过程中的流感病毒的运动,分子马达的运动等^[3~9]。近年来,基于单分子定位的超分辨显微成像技术

收稿日期: 2011-07-15; 收到修改稿日期: 2011-08-31

基金项目: 国家自然科学基金(61178080, 60878053, 61078067, 11004136)和深圳市科技计划基础研究计划项目(JC200903130329A)资助课题。

作者简介: 于 斌(1976—),男,博士,副研究员,主要从事成像光谱学和超分辨成像等方面的研究。

E-mail: yubin@szu.edu.cn

(SMLSRM),如光敏定位显微技术(PALM)^[10]、荧光光敏定位显微技术(FPALM)^[11]、随机光学重构显微技术(STORM)^[12],将荧光显微镜的分辨率提高到20 nm,并可以在活细胞上看到纳米尺度的蛋白质。随着新型荧光分子探针的出现和成像方法的改进^[13,14],这些技术的进步势必极大地推动生命科学的发展。SMLSRM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,对这些荧光分子进行稀疏激发,分时成像,获得单分子荧光图像,然后对荧光分子精确质心定位,最后将不同时刻获得的成千上万个单分子定位信息叠加,最终获得纳米分辨图像。从中可以看出 SMLSRM 的分辨率与荧光分子标记密度和分子定位精度有关,而理论上的极限分辨能力则取决于后者。目前,单个荧光分子定位算法主要有质心法^[15]、高斯拟合法^[16]、高斯模板法^[1]和解线性方程组(fluoroBancroft,FB)算法^[17]等。在这些算法中,最常用的方法是高斯拟合法,该方法在图像中选取感兴趣的区域,采用高斯模型拟合选定区域的像元值,获得荧光分子的精确位置。然而该算法需要进行迭代拟合运算,收敛速度和精度对初始值的选取有很强的依赖性,并且非常耗时。另外,目前所有这些算法都是在空间域进行定位的。本文基于离散傅里叶变换(DFT)和相位梯度算法,提出一种新型的频率域单个荧光分子定位算法(FDLA),计算机模拟分析表明,该算法的定位精度可达纳米量级。在此基础上,将该算法用于 HeLa 细胞突起中微丝束的超分辨荧光成像。

2 算法与计算机模拟实验

2.1 频率域单分子定位算法

对于单分子荧光显微成像来说,探测到的单分子的荧光强度分布就是系统点扩展函数(PSF) h 决定的衍射斑,即艾里斑^[18]。因此,考虑到噪声,对于位于坐标 (x_0, y_0) 处的单个荧光分子,在探测器上 (m, n) 像元处的强度分布可以描述为

$$I(m, n) = h(m - x_0, n - y_0) + b(m, n), \quad (1)$$

式中 b 表示噪声的强度,噪声主要包括信号噪声和背景噪声。

对(1)式进行离散傅里叶变换,可得到频域中像元 (k, l) 处单分子荧光强度的傅里叶谱分布:

$$\tilde{I}(k, l) = H(k, l) \exp\left[-i2\pi\left(\frac{x_0}{M}k + \frac{y_0}{N}l\right)\right] + B(k, l), \quad (2)$$

式中 M, N 表示图像的像元数, H 表示 h 的傅里叶

变换,即系统的光学传递函数(OTF), B 为 b 的傅里叶变换。

由(2)式可知,在信噪比较高的时候,对于图像的傅里叶谱,第二项的贡献小于第一项,而且对于像差校正完善的光学系统, $H(k, l)$ 是实函数。相位贡献主要来自于 $\exp\left[-i2\pi\left(\frac{x_0}{M}k + \frac{y_0}{N}l\right)\right]$,如果能精确计算出该项的相位,就能估计出荧光分子的位置 (x_0, y_0) 。因此,由(2)式可知,单分子荧光图像傅里叶谱的相移可以用以下方程近似给出:

$$\phi_w = \arctan\left\{\frac{\text{Im}[\tilde{I}(k, l)]}{\text{Re}[\tilde{I}(k, l)]}\right\}, \quad (3)$$

式中 $\text{Re}()$ 和 $\text{Im}()$ 分别表示求实部和虚部。

从(3)式可以看出,计算相位需要进行反正切三角函数运算,其复角主值范围为 $[-\pi/2, +\pi/2)$,再根据(3)式中分子和分母数值的符号,可以将相位延拓至 $[-\pi, \pi)$ (或者换算为 $[0, 2\pi)$)之间,这样就造成在实际相位值为 $2n\pi$ 的地方将会出现间断点或称为跳变点,即折叠相位。但折叠相位并不会影响相位的梯度(微分),微分只是会在间断点处产生一些突变点,通过设置阈值可以非常容易地排除这些点。因此,对上述折叠相位进行梯度运算,就可确定单分子的坐标 (x_0, y_0) ,其值如下:

$$\begin{cases} x_0 = \text{mean}\left[\left(\frac{\partial\phi_w}{\partial k}\right)\frac{M}{2\pi}\right] \\ y_0 = \text{mean}\left[\left(\frac{\partial\phi_w}{\partial l}\right)\frac{N}{2\pi}\right] \end{cases}, \quad (4)$$

式中 $\text{mean}()$ 表示对所有像元求平均(排除间断点)。由于噪声的存在,肯定会产生一些起伏,因此,在(4)式中对所有像元进行了平均运算,以尽量减少噪声的影响。

另外,对于上述定位方法,通常是选择一个矩形的局域图像来进行运算,矩形区域的宽度大约为系统 PSF 的半峰全宽(FWHM)的 3 倍大小,如像元数为 7×7 ,对如此小的区域进行傅里叶变换,导致频率域信号的采样率非常低,将影响相位的计算精度。为了提高算法的精度和运算速度,可利用信号处理中常用的技术——补零(Zero-padding)技术来增加频谱的采样密度,即在原图像的周围填充零使得图像变为一幅像元数为 2 的整数次幂的更大图像,如 32×32 ,这样,在做傅里叶变换时,可利用补零快速傅里叶变换(ZP-FFT)提高算法的精度和运算速度。

总之,基于该算法的单个荧光分子的纳米定位步骤如下:1)以单个荧光探针图像的极大值点为中

心, 选取感兴趣的矩形区域 ROI (region of interest), 矩形区域的宽度大约为系统 PSF 的 FWHM 的 3 倍大小; 2) 对该图像进行 ZP-FFT, 获得单个荧光探针图像的傅里叶频谱; 3) 基于(3)式获得相位信息; 4) 基于(4)式进行梯度运算, 精确定位单个荧光分子的位置坐标 (x_0, y_0) 。

2.2 算法的定位精度

判断一个单分子定位算法是否可以获得实际应用, 首先必须确定它的定位精度, 通常用位置坐标的均方根误差来描述。由于单分子荧光光子的产生和探测是一个随机过程, 不可能从单分子图像直接确定它的位置。而且, 探测器的量化采样和读出会引入一些噪声, 使图像进一步降质。基于这些因素, 并不能精确地确定单分子的位置, 只能给出一个具有一定误差范围的估计值。Thompson 等^[1]指出荧光单分子的定位位置坐标的均方根误差 σ 为

$$\sigma_{x,y}^2 = \frac{s^2 + a^2/12}{N} + \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2}, \quad (5)$$

式中 s 为光学系统 PSF 的标准差, N 为探测到的荧光分子产生的光子数, a 探测器的有效像元大小 (即像元尺寸除以成像光路放大倍率), b 为背景噪声。

为了验证该算法的定位精度, 首先对位于坐标 $(0, 0)$ 点的单个荧光分子进行模拟定位分析。模拟参数如下: 光学系统物镜放大倍率为 100, 数值孔径 (NA) 为 1.4, 探测器像元大小为 $16 \mu\text{m}$, 像元数为

13×13 。探测到的光子数假设为一个确定的值 2000。叠加的噪声分为泊松分布的信号噪声和高斯分布的背景噪声, 背景噪声光子数的均值为 20, 标准差为 10, 相当于目前使用的电子倍增 CCD (EMCCD) 参数。首先根据光学系统 PSF 获得单分子荧光图像, 再根据像元大小对上述图像进行像元化采样, 最后加上泊松分布的光子计数噪声和高斯分布的背景噪声。对该分子重复成像 2000 次, 获得 2000 幅单分子荧光图像。基于这些模拟单分子荧光图像, 对每一幅图像, 根据上述算法中 1~3 步骤对该分子进行定位, 共获得 2000 个定位点, 如图 1(a) 所示, 分析这些定位点的坐标分布。由于图像的中心对称, 这里只给出 x 坐标直方图分布 [图 1(b) 中竖条表示], 并通过高斯函数拟合 [图 1(b) 中实线表示], 可以确定定位点位置坐标分布的均方根误差为 5.07 nm , 相应的 FWHM 为 11.93 nm 。而在同样参数条件下 ($s = 0.22\lambda/\text{NA} = 105.29 \text{ nm}$, $a = 16 \mu\text{m}/100 = 160 \text{ nm}$, $b = 10$, $N = 2000$), 根据定位精度(5)式计算可知, 理论极限定位均方根误差为 3.10 nm , 对应 FWHM 为 $2\sqrt{2\ln 2}\sigma = 7.31 \text{ nm}$ 。计算机模拟定位精度和理论定位精度稍微有点差别, 可能是图像模拟产生过程中, CCD 量化采样过程产生的。综上, 该算法的定位精度可以达到纳米量级, 因此可以用于基于定位的超分辨荧光成像、单分子追踪等领域。

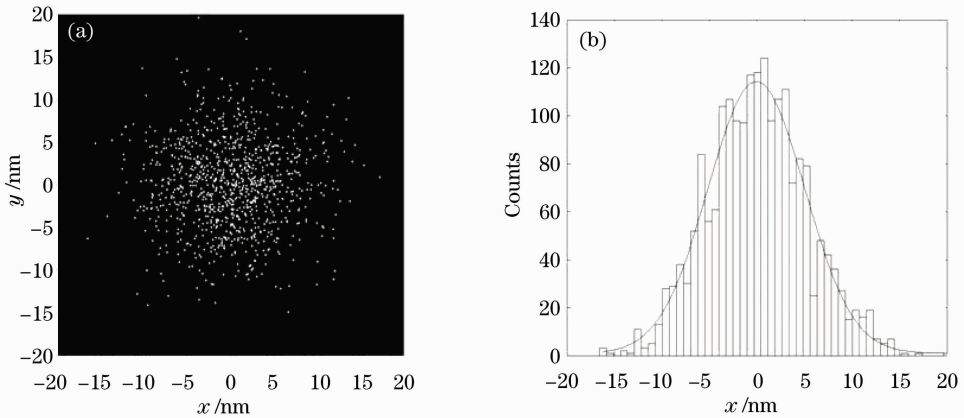


图 1 单个荧光分子模拟定位分析。(a) 2000 个定位点的分布; (b) 定位点的坐标分布

Fig. 1 Localization simulations of a single molecule. (a) Distribution of 2000 localization points; (b) distribution of the localization points in x coordinate

2.3 算法的时间复杂度

根据单分子定位超分辨显微的原理可知, 单分子定位算法的优劣对超分辨图像质量和数据处理速度都有重要的影响。荧光分子定位所耗时间是评价算法优劣的一个重要指标, 提高荧光分子的定位速

度是进行实时成像的重要选择。FB 算法是一种快速的解析方法, 精度可与高斯拟合算法相比拟, 但计算速度快两个数量级, 是目前单分子定位算法中最快的一种, 因此将 FDLA 和 FB 算法进行了比较。实验运行环境为 Intel(R) Pentium(R) 4 处理器, 3.06 GHz ,

64-bit Microsoft Windows XP 操作系统, 1 GB RAM, 使用软件为 Matlab R2008a。然而, 算法实际的运行时间依赖于所利用计算机的硬件和软件平台, 运行时间本身无任何实际意义, 因此计算了两者所耗时间的比值。针对所获得的 2000 幅模拟图片, 进行定位时间分析, FB 所耗时间为 12.52 s, FDLA 所耗时间为 11.56 s, 两者的比值为 1.08, 从这里可以看出, 两者的运算速度几乎在同一个量级, 微小的差别主要来自于解线性方程组和傅里叶变换之间的差异。然而 FB 算法是在知道荧光分子成像模型与背景噪声强度的情况下, 导出一个线性方程组, 通过求解线性方程组获得荧光分子的精确位置, 该算法速度虽然很快, 但对噪声评估有很强的依赖性, 而本文算法并不需要先验的背景知识。

3 算法应用

为了评估上述频率域单分子定位算法的实用性, 将该算法用于 SMLSRM 中超分辨图像的重构。基于 SMLSRM 原理, 图像重构算法如下: 1) 在每一幅荧光图像中搜索极大值点(大于预先设定的阈值); 2) 以每个极大值点为中心, 选取感兴趣的矩形区域 ROI, 矩形区域的宽度大约为系统 PSF 的 FWHM 的 3 倍大小; 3) 在此矩形区域, 利用上述频率域单分子定位算法, 精确定位单个荧光分子的位置坐标 (x_0, y_0) ; 4) 对每一幅荧光图像中的其他极大值点重复执行 2~3 步骤, 获取其中所有的单分子位置; 5) 对所有的图片重复执行 2~4 步骤, 最终定位出所有的单分子位置; 6) 根据所有定位点描绘出超分辨图像。

3.1 计算机模拟生物样品的超分辨成像

基于 Matlab 编程环境, 产生了一个 $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ 样品, 如图 2 所示, 该样品为沿 y 方向排列的 4 对细丝, 从下而上两条细丝间距分别为 20, 30, 50, 100 nm, 每对细丝间的距离为 100, 200, 300 nm。每条细丝上每隔 10 nm 标记一个荧光分子(如 Alexa647, 忽略荧光分子本身的大小), 产生的荧光波长 670 nm(为 Alexa647 的发射峰波长)。

假定探测过程中, 分子处于荧光态的概率为 $p=0.001$, 模拟采用的光学系统参数如下: 物镜放大倍率 100, NA 为 1.4, 探测器像元大小 $16 \mu\text{m}$ 。探测到的单荧光分子发出的光子数假设为一个确定的值 2000。叠加的噪声分为泊松分布的信号噪声和高斯分布的背景噪声。用于重构的源图像为 3000 幅。首先, 根据概率统计随机采样, 并在用于重构的每幅源图像中每一弥散斑内最多只能包含一

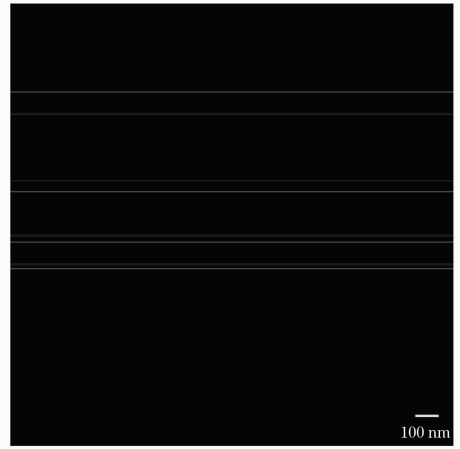


图 2 用于计算机模拟的微丝样品结构
Fig. 2 A simulated network of straight adjacent filament pairs

个发光荧光分子。再经光学系统后获得由成像光路 PSF 导致的模糊图像; 根据像元大小对上述图像进行像元化采样。最后加上泊松分布的光子计数噪声和高斯分布的背景噪声。背景噪声光子数的均值为 20, 标准差为 10, 相当于目前使用的 EMCCD 参数。

对模拟的样品(图 2)进行成像并按上述算法重构, 得到的图像如图 3(a)所示。四对直线沿 y 轴方向的横截面荧光强度分布如图 3(b)所示。从图 3(b)中可以看出, 间距为 30 nm 的一对直线可以分辨, 和理论模拟结果相一致。

3.2 实际生物样品的超分辨成像

根据上述模拟结果, 可以看出该算法的分辨率达到 30 nm, 因此, 将该算法用于 HeLa 细胞突起中的微丝束的超分辨成像重构。首先, 用 Alexa647 耦连的鬼笔环肽(phalloidin) (Invitrogen, 美国)对细胞中的微丝进行荧光标记。实验系统以 IX71 倒置荧光显微镜为基础, 物镜放大倍率 100, NA 为 1.4; 640 nm 的激光同时作为激活光和去激活光; 采用 EMCCD(DU897D, Andor, 日本)作为探测器, 探测器有效像元大小为 $16 \mu\text{m}$, 制冷温度为 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 。源图像采集时, 单幅曝光时间为 20 ms, 图像采集频率约为 46 Hz。图 4(a)为传统的荧光图像, 图 4(b)是图 4(a)中矩形框区域的放大图像, 图 4(c)是通过 20000 幅源图像重构的图 4(b)的超分辨图像。图 4(d)是选取图 4(c)中矩形框区域内一条细胞突起结构, 沿着垂直于细胞突起结构走向经过直方图分析它的强度分布, 得到这条细胞突起结构的直径为 80 nm(FWHM), 并分析图 4(c)中多条突起结构直径, 均处于 75~200 nm 的范围。这一结果和文献中电镜测量结果^[19]是一致的。通过本实验, 成功验证了所提出的定位算法的实用性。

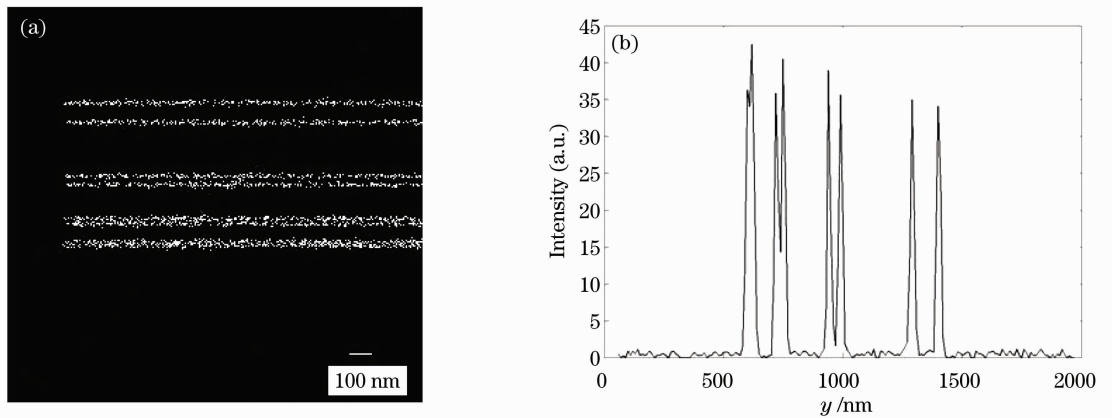


图 3 样品模型的图像重构。(a)重构的荧光图像；(b) y 方向的荧光强度分布

Fig. 3 Reconstructed images of simulated samples. (a) Reconstructed image; (b) fluorescence intensity distribution in y direction

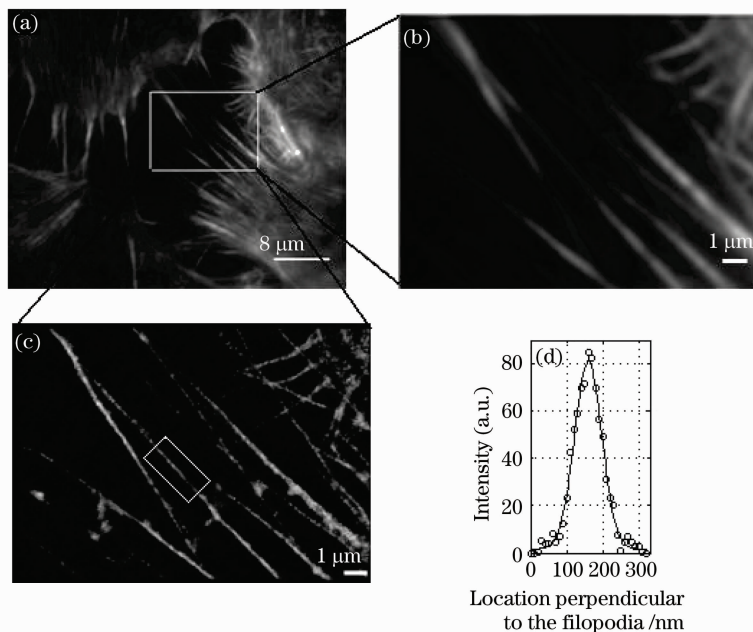


图 4 HeLa 细胞突起结构的微丝束超分辨图像

Fig. 4 Super-resolution fluorescence images of the filopodial protrusion of a HeLa cell

4 结 论

本文提出一种新型的频率域单个荧光分子的定位算法,理论模拟实验表明该方法可以达到纳米级的定位精度,而且该算法不需要迭代运算,节省了时间。对 HeLa 细胞突起中微丝束结构的超分辨成像验证了算法的实用性。该算法可应用于单分子追踪、超分辨荧光成像等领域。

参 考 文 献

1 Russell E. Thompson, Daniel R. Larson, Watt W. Webb. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent

probe[J]. *Biophys. J.*, 2002, **82**(5): 2775~2783
 2 Quan Tingwei, Zeng Shaoqun, Lü Xiaohua. Comparison of algorithms for localization of single fluorescent molecule in super resolution imaging [J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37** (11): 2714~2718
 全廷伟, 曾绍群, 吕晓华. 超分辨成像中荧光分子定位算法性能比较[J]. *中国激光*, 2010, **37**(11): 2714~2718
 3 M. Lakadamyali, M. J. Rust, H. P. Babcock *et al.*. Visualizing infection of individual influenza viruses[J]. *P. Natl. Acad. Sci USA*, 2003, **100**(6): 9280~9285
 4 C. Kural, H. Balci, P. R. Selvin. Molecular motors one at a time: FIONA to the rescue [J]. *J. Phys: Condens. Matter*, 2005, **17**(47): S3979~S3995
 5 W. E. Moerner. New directions in single-molecule imaging and analysis [J]. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, **104** (31): 12596~12602

- 6 C. Joo, H. Balci, Y. Ishitsuka *et al.*. Advances in single-molecule fluorescence methods for molecular biology [J]. *Ann. Rev. Biochem.*, 2008, **77**(1): 51~76
- 7 Wang Chen, Wang Guiying, Xu Zhizhan. The application of total internal reflection fluorescence microscopy in single fluorophore molecules axial imaging [J]. *Acta Physica Sinica*, 2004, **53**(5): 1325~1330
王琛, 王桂英, 徐至展. 全内反射荧光显微术应用于单分子荧光的纵向成像 [J]. *物理学报*, 2004, **53**(5): 1325~1330
- 8 Mao Zhengle, Wang Chen, Cheng Ya. Superresolution far-field fluorescence bio-imaging; breaking the diffraction barrier [J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(9): 1283~1307
毛峥乐, 王琛, 程亚. 超分辨远场生物荧光成像——突破光学衍射极限 [J]. *中国激光*, 2008, **35**(9): 1283~1307
- 9 He Yi, Zhang Yudong, Li Guojun *et al.*. Axial super-resolution effects of super-Gaussian phase filters [J]. *Acta Optica Sinica*, 2010, **30**(9): 2568~2572
何毅, 张雨东, 李国俊等. 超高斯相位型光瞳滤波器轴向超分辨性能 [J]. *光学学报*, 2010, **30**(9): 2568~2572
- 10 E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat *et al.*. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, **313**(5793): 1642~1645
- 11 S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, M. D. Mason. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy [J]. *Biophys. J.*, 2006, **91**(11): 4258~4272
- 12 M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. *Nature Methods*, 2006, **3**(10): 793~796
- 13 Danni Chen, Bin Yu, Junle Qu *et al.*. Background suppression by axially selective activation in single-molecule localization microscopy [J]. *Opt. Lett.*, 2010, **35**(6): 886~888
- 14 Cheng Ya, Chen Jianfang. Breaking the diffraction limit using silica nanoparticles with exotic nonlinear optical properties [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2009, **46**(8): 35~40
程亚, 陈建芳. 利用具有奇异非线性光学特性的纳米粒子突破光学衍射极限 [J]. *激光与光电子学进展*, 2009, **46**(8): 35~40
- 15 Y. Feng, J. Goree, B. Liu. Accurate particle position measurement from images [J]. *Rev. Sci. Instrum.*, 2007, **78**(5): 053704
- 16 C. M. Anderson, G. N. Georgiou, I. E. G. Morrison *et al.*. Tracking of cell surface receptors by fluorescence digital imaging microscopy using a charge-coupled camera [J]. *J. Cell Sci.*, 1992, **101**(2): 415~425
- 17 S. B. Andersson. Localization of a fluorescent source without numerical fitting [J]. *Opt. Express*, 2008, **16**(23): 18714~18724
- 18 Bo Zhang, Josiane Zerubia, Jean-Christophe Olivo-Marin. Gaussian approximations of fluorescence microscope; point spread function models [J]. *Appl. Opt.*, 2007, **46**(10): 1819~1829
- 19 Changsong Yang, Lubov Czech, Silke Gerboth *et al.*. Novel roles of formin mDia2 in lamellipodia and filopodia formation in motile cells [J]. *PLoS Biology*, 2007, **5**(11): 2624~2645

栏目编辑: 韩峰