

结构光照明显微中的超分辨图像重建研究

周 兴, 但 旦, 千 佳, 姚 保 利, 雷 铭

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

摘要 近年来,随着各种新型荧光探针的出现和成像方法的改进,远场光学成像的分辨率已经突破了衍射极限的限制。基于结构光照明的荧光显微技术凭借成像速度快、光毒性弱等优点,已成为目前主流的超分辨成像技术之一。实现结构光照明超分辨显微成像的关键在于照明光场的精准调控和后期的超分辨图像重建算法,否则将会在重建的超分辨图像中产生不可预估的伪影,混淆对观测结构真实形态的判断。详细对比了几种典型的结构光照明显微超分辨重建算法,证明基于图像重组变换的结构光照明超分辨图像重建算法可以有效解决极低结构光场调制度下的超分辨图像重建问题,降低结构光照明显微中的激发光功率。

关键词 显微; 荧光显微; 图像重建; 结构光照明; 超分辨

中图分类号 O436 文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201737.0318001

Super-Resolution Reconstruction Theory in Structured Illumination Microscopy

Zhou Xing, Dan Dan, Qian Jia, Yao Baoli, Lei Ming

State Key Laboratory of Transient Optics and Photonics, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Xi'an, Shaanxi 710119, China

Abstract In recent years, the resolution of far field optical imaging has broken the limit of diffraction limit with the appearance of new fluorescent probes and the improvement of imaging methods. The fluorescence microscopy based on structured illumination has become one of the main superresolution imaging techniques owing to its advantages such as fast imaging speed and light toxicity. The most critical technologies in structured illumination microscopy are concentrated on rapid control of the high-quality illumination pattern and the image reconstruction method. An unsuitable method will generate the artifacts in the reconstruction super-resolution image and that may confuse the scientific evaluation of biological morphology. Several typical structured illumination microscopic super resolution reconstruction algorithms are compared. It is proven that the image transform of the structured illumination microscopic super resolution reconstruction algorithm based on image recombination transform can effectively solve the low structure light modulation under the super-resolution image reconstruction problem, and reduce the excitation power of the structured illumination microscopy.

Key words microscopy; fluorescence microscopy; image reconstruction; structured illumination; super resolution

OCIS codes 180.2520; 110.3010; 100.6640

1 引 言

光作为大自然的基本构成,是生命体赖以生存的基础之一。以光为载体,人类能以近乎无损伤的方式观测微观世界的正常生命活动,光学显微镜的出现为生命科学领域打开了一个崭新的世界。在迄今为止的四百多年间,如何实现高时空分辨率成像一直是光学显微领域的一个重大课题,然而,传统的光学显微成像技

收稿日期: 2016-10-24; 收到修改稿日期: 2016-11-09

基金项目: 国家自然科学基金(61522511,11404389,81427802,61275193)、陕西省自然科学基金基础研究计划(2016JZ020)

作者简介: 周 兴(1991—),男,博士研究生,主要从事超分辨显微方面的研究。E-mail: zhouxing@opt.ac.cn

导师简介: 雷 铭(1978—),男,博士,研究员,主要从事先进光学成像方面的研究。

E-mail: leiming@opt.ac.cn(通信联系人)

术的空间分辨率受制于衍射极限^[1],仅能达到半波长量级,极大地限制了光学显微技术的应用范围。20世纪末,各种荧光蛋白的出现为显微成像提供了新的工具,基于荧光分子对光场响应特性差异,多种超分辨荧光显微技术^[2-3]相继提出,例如光激活定位荧光显微技术(PALM)^[4-6]、随机光学重构荧光显微技术(STORM)^[7-9]、受激发射损耗荧光显微技术(STED)^[10-12]和结构光照明荧光显微技术(SIM)^[13-15]。目前,超分辨荧光显微成像技术所能获得的最高分辨率甚至接近电子显微镜水平,在为现代生物医学提供了强有力工具的同时,亦将相关领域的研究推向了全新的高度。

SIM技术是目前主流的超分辨光学显微成像技术之一,可分为线性SIM技术^[13,16-17]和非线性SIM技术^[18-20]。线性SIM技术最初由Heintzmann等^[16]于1998年提出,通过以序列二维结构光激发样品,横向空间分辨率可提升至100 nm左右。随后,Frohn等^[21]提出利用三维结构光(3D-SIM)实现空间分辨率在全空间增强的理论方案,并由Gustafsson等^[22-23]实验论证,实现了双色三维超分辨活体成像。总体来说,线性SIM技术具有时间分辨率高、对荧光分子无特殊要求、光毒性小等优点,尤为适合高分辨率情况下的活体细胞动态观测。非线性SIM技术利用荧光非线性响应特性,可产生高阶空间频率的结构光场,使横向空间分辨率进一步提高至50 nm^[20,24],但其时间分辨率相对线性SIM较低。本文着重于讨论线性SIM技术,其基本原理是对样品施加高空间频率的余弦强度分布的条纹结构照明光场,样品的超衍射极限高频信息将频移至光学成像系统可探测的频谱区域并被探测器采集。然而,探测器采集到的超衍射极限高频信息因产生频移而与样品的低频信息混叠,难以直接区分,因此需要后期求解出该部分高频信息,进而重建超分辨图像。显然,结构光照明光场的调控和后期的超分辨图像重建算法是SIM的两个关键技术。快速精确的结构光调控不仅能提高成像系统的时间分辨率,更为后期的数据重建奠定了基础。而超分辨图像重建作为SIM技术的最后一环,其重要性不言而喻,重建算法的有效实施保证了SIM的超分辨成像效果,反之,将在重建图像中产生不可预估的伪影^[25],影响对样品真实形态的判断。

理论上,重建一幅超分辨图像需要多幅不同结构光相位和载频方向的原始图像。起初,Heintzmann等^[16]选择了四相位重建方案,每个载频方向加载4个相位差为 $\pi/2$ 的相位,其优势在于算法简单易实施,但所需原始图像较多,影响了成像速度;为了减少原始图像的数量,Gustafsson^[13,22]尝试使用基于图像互相关的三相重建方案,由于该方案可获得更高的时间分辨率,因此,更适合活体生物的快速成像;随后,基于贝叶斯估测的重建算法^[26]被引入SIM技术,使得单载频方向仅需两幅不同相位(相邻相位差为 π)的结构光图像即可完成超分辨图像重建,但由于贝叶斯估测算法仅可求得重构频谱的近似解,且计算量大,并未获得很大关注。相比之下,三相重建方案的应用较为广泛,该方案需要准确获得加载结构光场的多个参数,如结构光场的空间频率、调制度和初相位,其中初相位尤其重要。为了解决结构光场的参数估测问题,Shroff等^[27]于2009年提出了峰值相位(POP)法,该方法简单易行,但在结构光调制度较低和空间频率较高时会产生较大的误差;为了解决POP算法不适应高空间频率的问题,2013年,Wicker等^[28]在Gustafsson小组的研究基础上提出了优化的图像互相关迭代算法,有效弥补了POP法的部分缺陷,但迭代算法计算量大;为此,同年,Wicker^[29]提出了非迭代的图像自相关(ACR)算法,有效地压缩了原有迭代算法的计算时间,然而,ACR算法定参前需要准确地测量光学成像系统的点扩展函数(PSF),测量误差将会对其精度产生影响;2016年,Zhou等^[30]提出了基于图像重组变换(IRT)的定参算法,解决了低调制度下的SIM超分辨图像重建问题,降低了SIM的激发光功率。

本文对几种典型的超分辨重建算法进行了对比:1)SIM超分辨成像的基本原理;2)主流的SIM成像方式和光路比较;3)不同图像超分辨重建算法的对比。

2 SIM超分辨成像的基本原理

从阿贝成像的角度^[1],可将光学成像系统看作是一个低通滤波器,其空间频率调制函数又称为光学传递函数(OTF),OTF的大小决定了光学成像系统可通过的空间频率范围,OTF的范围越大,意味着可探测的高频信息越多,光学成像系统的空间分辨率也越高。阿贝理论证明,固定数值孔径NA和波长 λ 的光学成像系统的最高空间频率 $k_0=2NA/\lambda$,即阿贝衍射极限。如何突破这一极限是超分辨光学成像的基本问题。既然衍射极限外的高频信息无法进入OTF的范围,那么是否可以通过某种方式将高频信息搬运至OTF范

围内,并在探测后将其解析还原。脉冲响应函数(δ 函数)可使与其卷积的函数发生空间平移,即具有搬运特性,在光学成像系统中,物像之间恰好满足卷积关系,因此,理论上存在构建关系的可能。但是搬运过程发生在频域,而成像过程却在空域,下一步需要解决如何在空域操作进而实现频域的搬运。由于余弦函数的频谱分布恰为三个 δ 函数,因此,在空域对物体加载满足余弦函数分布的结构光,即可实现衍射极限外高频信息的搬运。基于以上分析,可进一步证明结构光照明超分辨成像的基本原理。

在线性响应的荧光显微成像系统中,荧光强度与激发光强度 $I(r)$ 和荧光分子浓度 $S(r)$ 成正比,且物像的强度之间满足卷积关系,可表示为

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

式中 $H(r)$ 和 $D(r)$ 分别为系统的 PSF 和像分布函数,符号 \otimes 代表卷积。若激发光强度满足余弦函数分布,即

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

式中 I_0 、 m 、 p 和 φ 分别为结构照明光场的平均强度、调制度、空间频率和初相位,则(1)式可改写为

$$D(r) = I_0 \{S(r) \cdot [1 + m \cdot \cos(2\pi p \cdot r + \varphi)]\} \otimes H(r), \quad (3)$$

此时, $D(r)$ 即为经结构光照明的图像强度分布,但仅从(3)式中无法辨别 $D(r)$ 是否包含超衍射极限的信息,因此需要从频谱的角度观察是否有更高频的信息被搬运至光学成像系统中。由傅里叶变换关系,不难求出像频谱 $\bar{D}(k)$ 表达式为

$$\bar{D}(k) = I_0 \left[\bar{S}(k) + \frac{m}{2} \exp(i\varphi) \cdot \bar{S}(k) \otimes \delta(k - p) + \frac{m}{2} \exp(-i\varphi) \cdot \bar{S}(k) \otimes \delta(k + p) \right] \cdot \bar{H}(k), \quad (4)$$

式中 $\bar{S}(k)$ 为 $S(r)$ 的傅里叶变换,即物的频谱; $\bar{H}(k)$ 为 PSF 的 $H(r)$ 的傅里叶变换,即系统的光学传递函数。根据 δ 函数在卷积操作时的空间平移特性,(4)式可进一步改写成

$$\bar{D}(k) = I_0 \left[\bar{S}(k) + \frac{m}{2} \exp(i\varphi) \cdot \bar{S}(k - p) + \frac{m}{2} \exp(-i\varphi) \cdot \bar{S}(k + p) \right] \cdot \bar{H}(k), \quad (5)$$

不难看出,若均匀照明下探测器可收集的空间频谱 $k \in [-k_0, k_0]$,则结构光照明下将其扩展至 $k \in [-k_0 - p, k_0 + p]$,即经结构光照明,图像空间频谱已包含衍射极限外的高频信息,且扩展范围由结构光的空间频率 p 决定。显然 p 值越高,扩展的频谱范围就越大,但是产生结构光的光学成像系统亦是衍射受限系统,空间频率 p 最大值不超过 $\lambda_{em} k_0 / \lambda_{ex}$,其中 λ_{ex} 为激发光波长, λ_{em} 为荧光波长。因此在线性 SIM 中,系统可探测的最大频域半径为

$$|k| = k_0 + \frac{\lambda_{em}}{\lambda_{ex}} k_0 \approx 2k_0. \quad (6)$$

此外,由(5)式可知,SIM 系统所获得的图像空间频谱实为宽场频谱和衍射极限外高频信息所叠加产生的混合频谱。为了复原超分辨频谱的真实分布,首先需要将各频谱分量 $\bar{S}(k)$ 、 $\bar{S}(k+p)$ 和 $\bar{S}(k-p)$ 准确分离;再将已分离的高频信息 $\bar{S}(k+p)$ 和 $\bar{S}(k-p)$ 搬回原有的位置;最后,结合去卷积运算^[31],获得最优化的超分辨图像显示效果。

基于以上分析可知,由于(5)式中共包含三个未知频谱分量 $\bar{S}(k)$ 、 $\bar{S}(k+p)$ 和 $\bar{S}(k-p)$,至少需要构建三个独立方程式以获得未知数的精确解。显然,在结构光调控过程中,初相位 φ 是最合适的调制参数。选择三个不同初相位($\varphi_1, \varphi_2, \varphi_3$)的结构光激发样品,可构建矩阵方程为

$$\begin{bmatrix} \bar{D}_1(k) \\ \bar{D}_2(k) \\ \bar{D}_3(k) \end{bmatrix} = I_0 H(k) \begin{bmatrix} 1 & (m/2) \exp(-i\varphi_1) & (m/2) \exp(i\varphi_1) \\ 1 & (m/2) \exp(-i\varphi_2) & (m/2) \exp(i\varphi_2) \\ 1 & (m/2) \exp(-i\varphi_3) & (m/2) \exp(i\varphi_3) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \bar{S}(k) \\ \bar{S}(k+p) \\ \bar{S}(k-p) \end{bmatrix}. \quad (7)$$

若相邻相位之间的相位差为 $2\pi/3$,则(7)式可改写为^[32]

$$\begin{bmatrix} \bar{S}(k) \\ \bar{S}(k+p) \\ \bar{S}(k-p) \end{bmatrix} = [1/3 I_0 H(k)] \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 2 \exp(i\varphi_1) / m & 2 \exp(i\varphi_2) / m & 2 \exp(i\varphi_3) / m \\ 2 \exp(i\varphi_1) / m & 2 \exp(i\varphi_2) / m & 2 \exp(i\varphi_3) / m \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \bar{D}_1(k) \\ \bar{D}_2(k) \\ \bar{D}_3(k) \end{bmatrix}. \quad (8)$$

随后,经频谱分量的平移和去卷积运算,即可完成相应空间频率方向的频谱拼接。图 1(a)所示为宽场

频谱,然而,单一频率方向的结构光仅能扩展相应方向的空间频谱[图 1(b)],通过旋转结构光场的条纹方向(0° 、 60° 和 120°),即可获得近似各向同性的二维超分辨图像[图 1(c)]。

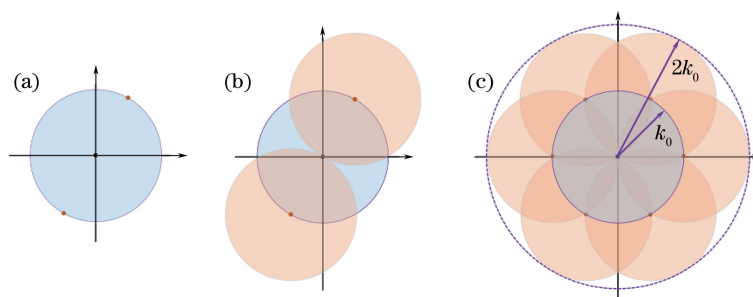


图 1 (a) 宽场频谱; (b) 单一频率方向结构光获得的扩展频谱; (c) 多频率方向结构光获得的扩展频谱

Fig. 1 (a) Wide-field spectrum; (b) extended spectrum with single frequency direction;
(c) extended spectrum with multi-frequency direction

3 两种 SIM 超分辨成像系统

由 SIM 超分辨成像的基本原理可知,其成像系统需要满足以下条件:1)产生空间频率接近光学成像系统衍射极限的结构照明光场,以实现最大的频谱扩展;2)精确调制结构光照明光场相位,以便实现准确的频谱分离;3)产生多个不同方向的结构光照明光场,以实现接近各向同性的频谱扩展。目前,主流的结构光产生方式可分为干涉式和投影式。

3.1 干涉式 SIM 系统

干涉式 SIM 系统最早由 Gustafsson 等^[33]提出,其基本思路是通过双光束干涉的方法,在显微物镜焦平面形成高空间频率的余弦强度分布的条纹结构照明光场。早期的结构光照明显微系统均使用衍射光栅产生结构照明光场。结构光的平移和旋转通常使用电控平移台和旋转台移动衍射光栅位置来实现,这将不可避免地带来机械振动并降低系统的时间分辨率。此外,光栅衍射角随波长的变化而产生差异,在改变激发波长时,需要对光路进行一定程度的调整,不利于多色荧光成像。为了实现快速稳定的结构光调制,液晶空间光调制器(LC-SLM)代替衍射光栅对入射激光进行调制,通过编程控制空间光调制器可以实时改变结构光场的强度分布。由于使用空间光调制器代替电控平台和衍射光栅,SIM 的时间分辨率和稳定性都得到了极大的提高。

目前,干涉式结构光照明显微系统主要以向列型 LC-SLM^[35-38]和铁电型 LC-SLM^[23,34,39-41]为主,凭借在刷新频率方面的优势,铁电型 LC-SLM 在活体细胞的快速成像研究中获得了广泛的应用,其光路示意图如图 2(a)所示。为了在不同的结构光频率方向获取相同的结构光场调制度,系统需要额外的偏振控制[图 2(b)],即在结构光频率方向发生旋转时,光场偏振方向需要随之发生偏转^[42],由此增加了干涉式 SIM 系统的复杂度。

3.2 投影式 SIM 系统

投影式 SIM 系统最初由 Heintzmann 等^[16]应用于超分辨成像,其基本思路是在显微物镜焦平面的共轭面放置光栅,利用显微系统将光栅条纹微缩投影于物镜焦平面,通过选择合适光栅常数的光栅,可获得空间频率接近衍射极限的条纹结构光照明光场。与干涉式结构光照明显微系统相比,投影式 SIM 系统无需掩模滤波,光路简单易搭建。与前文所述的光栅干涉法类似,基于光栅投影方式的结构光照明显微系统同样面临着稳定性方面的问题,因此,光路中需要引入一种可编程控制的强度型光场调制器件。2013 年,Dan 等^[43]提出并实现了基于数字微镜阵列(DMD)投影和 LED 照明的 SIM 技术,光路示意图如图 3 所示。LED 光源经全内反射分光棱镜(TIR-Prism)后垂直照射至 DMD 表面,通过 DMD 反射,携带条纹信息的反射光再次经过 TIR-Prism 并依次经由聚光镜、二向色镜和物镜投影至物镜焦平面,形成高空间频率的结构光照明光场。由于该系统采用了 LED 照明,可在有效减弱激光照明所带来的散斑问题的同时避免干涉式 SIM 系统中复杂的偏振控制,有利于仪器的小型化发展。此外,基于 DMD 的投影方式,不仅避免了机械移动带来的稳定性问题,而且投影条纹的空间频率在一定范围内快速可调,极大地扩展了该系统的应用范围^[44-47],其中在多

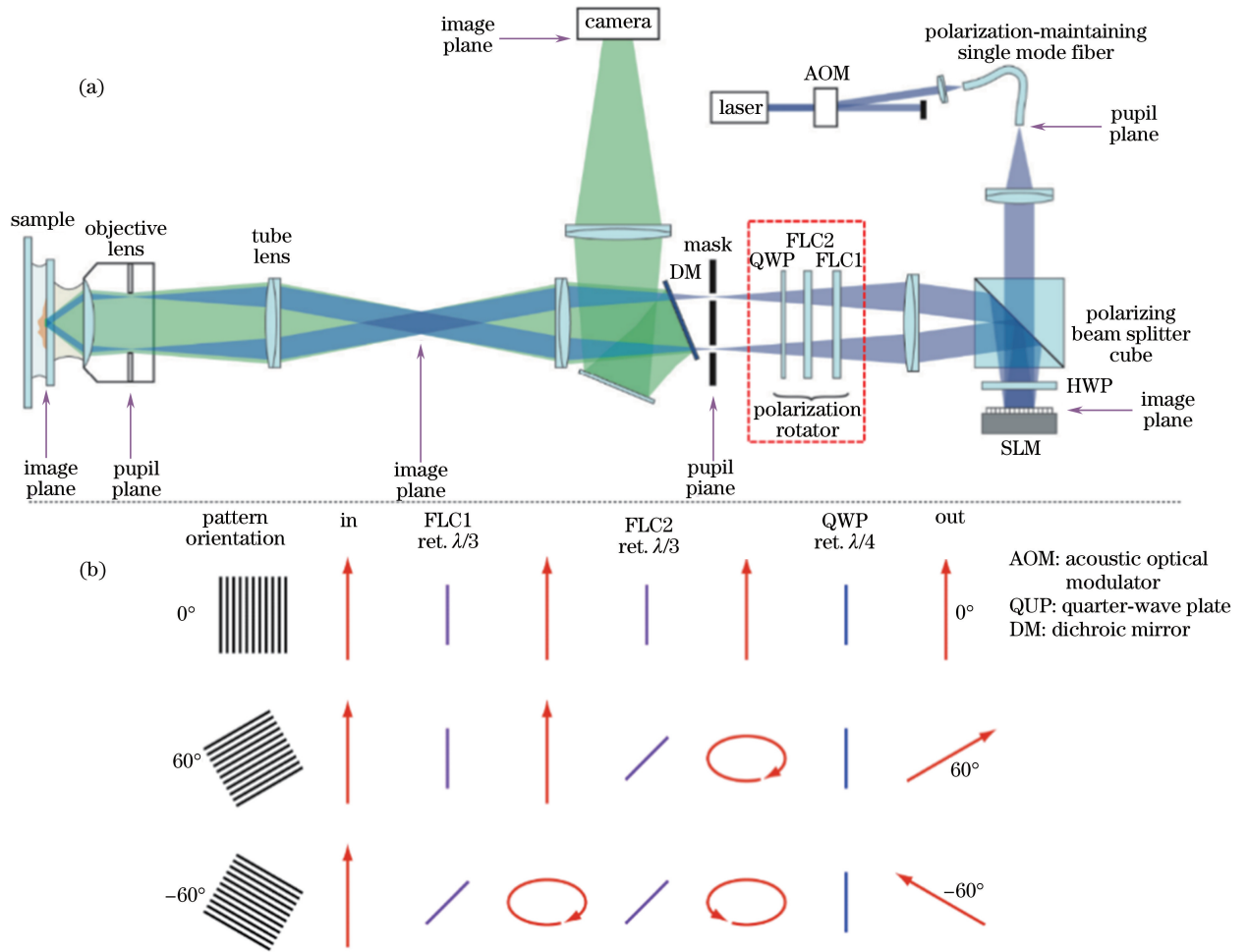


图 2 (a) 基于铁电型 LC-SLM 的结构光照明显微系统示意图；(b) 偏振控制示意图^[34]

Fig. 2 (a) Schematic of ferro-electric LC-SLM based structured illumination microscopy;

(b) schematic of polarization control^[34]

波长激发的快速超分辨成像领域的发展潜力巨大。

4 SIM 超分辨图像重建算法

超分辨图像重建算法是 SIM 技术的核心。如(7)、(8)式所示,在重建过程中,结构照明光场的调制度 m 、空间频率 p 和初相位 φ 等参数的估测精度直接决定了高频信息的还原效果,其中调制度 m 的取值仅影响高频信息在整体频谱的占比,可通过去卷积等频谱运算将其误差影响消除,故对其精度要求不高;空间频率 p 可通过频谱分量对比^[13]和峰值寻找^[27]等方式获取,估测精度也可以满足;而相位值 φ 由于位于系数矩阵的指数项,因此微小的估算误差会对后期图像重建带来严重影响,在超分辨图像重建算法中尤为重要。选取了具有代表性的三种算法(POP、ACR 和 IRT),对初相位值的估测进行了详细地介绍,并分别在理论、模拟和实验方面进行对比。

4.1 理论基础

在 SIM 成像过程中,探测器采集到的图像会受到一定离焦背景的干扰^[48]。考虑到结构光场仅在物镜焦面附近产生调制,因此,离焦干扰可作为未调制的背景项^[49]引入(3)式,即

$$D(r) = I_0 \{ S(r) \cdot [1 + m \cdot \cos(2\pi p \cdot r + \varphi)] \} \otimes H(r) + D_{BG}(r), \quad (9)$$

式中 $D_{BG}(r)$ 为离焦背景,则 $D(r)$ 相应的频谱分布为

$$\bar{D}(k) = I_0 \left[\bar{S}(k) + \frac{m}{2} \exp(i\varphi) \cdot \bar{S}(k - p) + \frac{m}{2} \exp(-i\varphi) \cdot \bar{S}(k + p) \right] \cdot \bar{H}(k) + \bar{D}_{BG}(k). \quad (10)$$

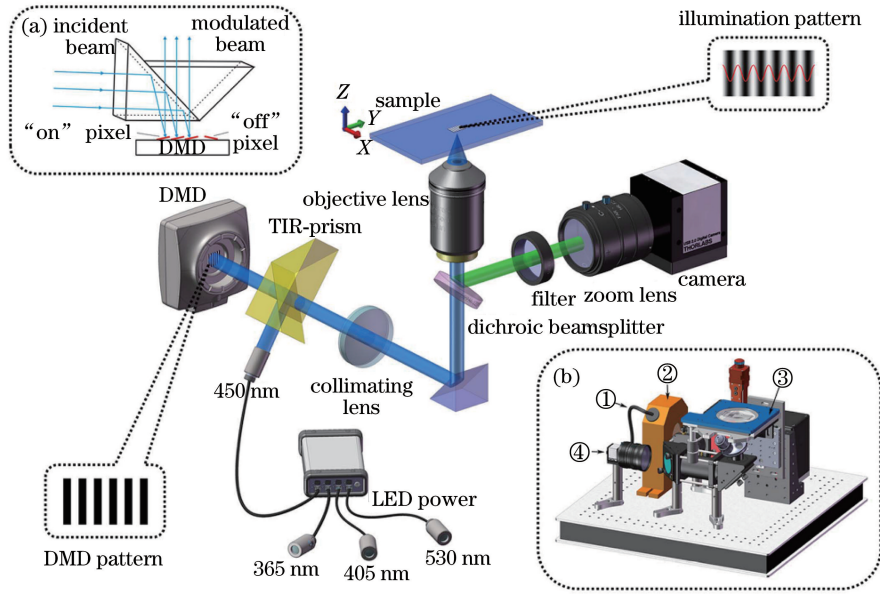


图 3 基于 DMD 投影和 LED 照明的结构光照明显微系统^[43]

Fig. 3 Schematic of the DMD-based LED-illumination structured illumination microscopy^[43]

4.1.1 POP 算法

Shroff 等^[27]提出,若令 $k = p$,则(10)式可写为

$$\tilde{D}(p) = I_0 \left[\tilde{S}(p) + \frac{m}{2} \exp(i\varphi) \cdot \tilde{S}(0) + \frac{m}{2} \exp(-i\varphi) \cdot \tilde{S}(2p) \right] \cdot \tilde{H}(p) + \tilde{D}_{BG}(p), \quad (11)$$

进一步分析(11)式可知若满足如下条件:1)离焦背景干扰很弱;2)结构光场调制度光场调制度 m 足够高;3)物频谱的高频分量衰减足够快且条纹频率适中。则有

$$\begin{cases} \tilde{D}_{BG}(p) \approx 0 \\ |m\tilde{S}(0)|^2 \gg |\tilde{S}(p)|^2 + |m\tilde{S}(2p)|^2 \end{cases} \quad (12)$$

由此,(11)式可改写为

$$\tilde{D}(p) \approx 0.5 \cdot [I_0 m \tilde{S}(0) \tilde{H}(p)] \cdot \exp(i\varphi), \quad (13)$$

显然, I_0 和 m 均为实数。由于物分布均为实数,因此,中心频谱值 $\tilde{S}(0)$ 亦为实数。通常情况下,光学成像系统的 PSF 满足中心对称分布且为实数,故 PSF 的傅里叶变换 OTF 在频谱空间的任一点也均为实数,即 $\tilde{H}(p)$ 为实数。由此可知,(13)式中仅初相位 φ 位于虚部,则

$$\varphi \approx \arg\{\tilde{D}(p)\}. \quad (14)$$

需要注意的是,当结构光空间频率 p 过高甚至接近衍射极限时, $\tilde{S}(0) \tilde{H}(p)$ 将接近于零,从而导致 $\tilde{D}(p)$ 的信噪比严重降低,进而影响最终的定参精度^[28]。

4.1.2 ACR 算法

为了解决 POP 算法在高频结构光照明时失效的问题,Wicker 等^[28]于 2013 年提出了基于互相关迭代的重建算法,但由于迭代过程耗时严重,同年,Wicker^[29]改进了原有算法,提出了无需迭代的 ACR 算法。在忽略离焦背景干扰的情况下,令

$$\tilde{\chi}(k) = \tilde{D}(k) \tilde{H}^*(k), \quad (15)$$

则 $\tilde{\chi}(k)$ 在 $k = p$ 处的自相关结果可表示为

$$\begin{aligned} \zeta(p) &= \tilde{\chi}(k) \odot \tilde{\chi}(k) \big|_{k=p} = \int \tilde{\chi}(k) \cdot \tilde{\chi}^*(k+p) dk = \\ &= \int [\tilde{S}(k) + (m/2) \exp(i\varphi) \cdot \tilde{S}(k-p) + (m/2) \exp(-i\varphi) \cdot \tilde{S}(k+p)] \cdot |\tilde{H}(k)|^2 \\ &\quad \cdot [\tilde{S}^*(k+p) + (m/2) \exp(-i\varphi) \cdot \tilde{S}^*(k) + (m/2) \exp(i\varphi) \cdot \tilde{S}^*(k+2p)] \cdot |\tilde{H}(k+p)|^2 = \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 & [m \exp(-i\varphi) / 2] \int |\tilde{S}(k)|^2 |\tilde{S}(k+p)|^2 \cdot |\tilde{a}(k)|^2 dk + \int \tilde{S}(k) \tilde{S}^*(k+p) \cdot |\tilde{a}(k)|^2 dk + \\
 & [m \exp(i\varphi) / 2] \int \tilde{S}(k) \tilde{S}^*(k+2p) \cdot |\tilde{a}(k)|^2 dk + \frac{m \exp(-i\varphi)}{2} \int \tilde{S}(k-p) \tilde{S}^*(k+p) \cdot |\tilde{a}(k)|^2 dk + \\
 & (m^2/4) \int \tilde{S}(k-p) \tilde{S}^*(k) \cdot |\tilde{a}(k)|^2 dk + (m^2/4) \int \tilde{S}(k+p) \tilde{S}^*(k+2p) \cdot |\tilde{a}(k)|^2 dk + \\
 & [m^2 \exp(-2i\varphi) / 4] \int \tilde{S}(k+p) \tilde{S}^*(k) \cdot |\tilde{a}(k)|^2 dk + [m^2 \exp(2i\varphi) / 4] \int \tilde{S}(k-p) \tilde{S}^*(k+2p) \cdot |\tilde{a}(k)|^2 dk,
 \end{aligned} \tag{16}$$

式中符号 \odot 代表相关运算, $\tilde{a}(k) = \tilde{H}(k) \tilde{H}(k+p)$ 。通常情况下,物频谱信息的高频成分远大于低频成分,且频谱强度分布沿着高频方向迅速衰减,则在(16)式中仅第一项为强相关,其余子项为相对弱相关,从而可进一步近似为

$$\zeta(p) \approx [m \exp(-i\varphi) / 2] \int |\tilde{S}(k)|^2 |\tilde{S}(k+p)|^2 \cdot |\tilde{a}(k)|^2 dk, \tag{17}$$

式中被积函数为实数,则其积分结果亦为实数,由此可知

$$\varphi \approx -\arg\{\zeta(p)\}. \tag{18}$$

虽然 ACR 算法与 POP 算法均仅获得近似解,但是,POP 算法的近似条件相对严苛,因此通常情况下,ACR 算法可获得更高的精度和稳定性。

4.1.3 IRT 算法

在干涉式 SIM 系统中,结构光场调制度通常较高,因此 POP 算法的近似条件可以满足。但在投影式 SIM 系统中,投影结构光场调制度会受到光学成像系统 OTF 的调制,结构光场空间频率越大,光场调制度 m 就越低,若在投影式 SIM 系统中仍以 POP 算法进行图像重建,则可能引起较大的误差。此外,虽然 ACR 算法在精度上有所提升,但仍旧仅获得近似解,且计算时间相对较长。为了解决以上问题,Zhou 等^[30]利用结构光图像间的相互关系,提出了可同时适用于投影式和干涉式 SIM 系统的 IRT 算法。由(9)式可知,若结构光图像间的相移为 $2\pi/3$,则采集图像可表示为

$$\begin{cases}
 D_1(r) = I_0 \{S(r) \cdot [1 + m \cdot \cos(2\pi p \cdot r + \varphi)]\} \otimes H(r) + D_{BG}(r) \\
 D_2(r) = I_0 \{S(r) \cdot \{1 + m \cdot \cos[2\pi p \cdot r + \varphi + (2\pi/3)]\}\} \otimes H(r) + D_{BG}(r), \\
 D_3(r) = I_0 \{S(r) \cdot \{1 + m \cdot \cos[2\pi p \cdot r + \varphi - (2\pi/3)]\}\} \otimes H(r) + D_{BG}(r)
 \end{cases} \tag{19}$$

在此基础上构建新图像 $D_c(r)$,使得

$$\begin{aligned}
 D_c(r) &= D_1(r) + D_2(r) \exp[-i(2\pi/3)] + D_3(r) \exp[i(2\pi/3)] = \\
 & (3mI_0/2) \exp(-i\varphi) [\exp(-i2\pi pr) S(r)] \otimes H(r),
 \end{aligned} \tag{20}$$

经以上操作,图像 $D_c(r)$ 中已去除了离焦背景干扰,其频谱分布为

$$\tilde{D}_c(k) = (3mI_0/2) \exp(i\varphi) \tilde{S}(k-p) \tilde{H}(k), \tag{21}$$

同样,取 $k=p$,则

$$\tilde{D}_c(p) = [(3mI_0/2) \tilde{S}(0) \tilde{H}(p)] \exp(i\varphi). \tag{22}$$

如前所述,由于物分布均为实数且 PSF 满足中心对称,则 $\tilde{S}(0) \tilde{H}(p)$ 为实数,于是,

$$\varphi = \arg\{\tilde{D}_c(p)\}, \tag{23}$$

不同于 POP 算法和 ACR 算法的近似解,IRT 算法可直接获得结构照明光场初相位 φ 的精确解。此外,(21)式中已单独分离了高频分量 $\tilde{S}(k-p)$,同理,对 $D_c(r)$ 取共轭并求其频谱,可得

$$\tilde{D}_c^*(k) = \mathcal{F}\{D_c^*(r)\} = (3mI_0/2) \exp(-i\varphi) \tilde{S}(k+p) \tilde{H}(k), \tag{24}$$

式中 \mathcal{F} 表示傅里叶变换。

由(21)和(24)式,可求得

$$\begin{cases}
 \tilde{S}(k) = \mathcal{F}\{D_1(r) + D_2(r) + D_3(r)\} \\
 \tilde{S}(k-p) = [2 \exp(-i\varphi) / 3mI_0] \cdot [\tilde{D}_c(k) / H(k)]. \\
 \tilde{S}(k+p) = [2 \exp(i\varphi) / 3mI_0] \cdot [\tilde{D}_c^*(k) / H(k)]
 \end{cases} \tag{25}$$

由以上分析可知,三种算法均通过分析频谱在 $k=p$ 处的信息来获取初相位的估测值,不同的是,POP算法的分析对象为直接采集的结构光图像的频谱,需要采用相对严苛的近似条件;ACR算法通过分析原始频谱经预处理后获得的自相关频谱,弱化了近似条件,提高了定参精度;IRT算法则利用原始结构光图像之间的相位关系,构建了新的图像频谱,并由此求得初相位的精确解。总体来说,IRT算法在精度和耗时方面具有很大优势。

4.2 数值模拟

基于上述理论分析,本节将对以上三种算法进行模拟对比。在模拟系统中,为了与实验条件匹配,设置物镜的数值孔径为 1.49,浸油折射率为 1.515,同时,考虑到 SIM 系统中常选用高灵敏度的 sCMOS 作为探测器,设探测器分辨率为 2048 pixel \times 2048 pixel,像素大小为 6.5 μm 。如图 4(a)所示,选用分辨率渐变的圆形轮盘作为复原目标,其空间频率在中心处达到最高,往边缘呈逐级递减趋势,其空间频谱如图 4(b)所示。以 DAPI 染料为参考,系统探测的荧光波长为 461 nm,则由阿贝衍射极限理论^[1]可知,该模拟系统可分辨的最小空间尺度为 155 nm。

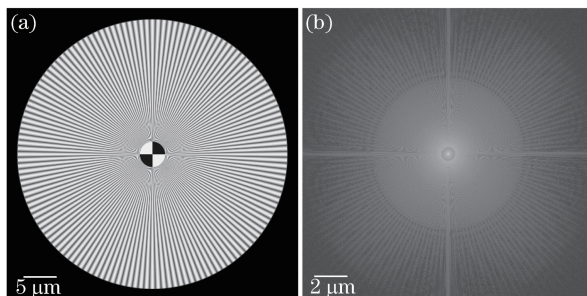


图 4 (a) 模拟复原目标和 (b) 其傅里叶频谱

Fig. 4 (a) Simulated object and (b) its Fourier transform spectrum

理论上,当结构光条纹频率在 80% 的衍射极限频率附近时,POP 算法仍可获得优异的表现,但当条纹频率增至衍射极限时,初相位的估测误差将显著增大,且精度容易受到噪声的干扰^[27-28]。因此,模拟中,设置加载的条纹周期分别为 193 nm 和 156 nm,对应于 80% 和 99% 的衍射极限频率,并使用泊松噪声和高斯噪声退化图像,其中高斯噪声的方差为 0.001。图 5 显示了三种算法在不同噪声环境和条纹周期下初相位估测误差随结构光场调制度变化的模拟曲线,选取的调制度范围为 0.001~0.12。可以看出,当调制度大于 0.1 时,三种算法均可获得高精度的初相位估测值,而当调制度降至 0.05 以下时,不同算法的估测误差将开始显现出差异,并随条纹周期的减小而增大,这一特征在 POP 算法中尤为明显。对比(14)、(18)和(23)式可知,理论上仅 IRT 算法可求得初相位值的精确解,因此,在无噪声(或者信噪比很高)环境中,IRT 算法可在低调制度 ($m < 0.01$) 下始终保持相位误差接近于零。当引入泊松噪声时,三种算法的相位误差均受到不同程度的影响,其中 POP 算法的影响最大,如图 5(a)、(c)所示。高斯噪声的干扰不仅会增加相位误差,还会引起误差曲线的剧烈波动,结果如图 5(b)和(d)所示,在条纹周期较大 ($T = 193$ nm) 时,IRT 算法的稳定性较高,但当条纹周期缩小至衍射极限附近 ($T = 156$ nm) 时,ACR 算法的稳定性将超过 IRT 算法。总体来说,IRT 算法在相位误差和稳定性方面的表现优异,但在空间频率接近衍射极限时,其精度同样容易受到噪声干扰。

相位估测误差因调制度的差别和算法的选取而存在一定的差异,并与超分辨图像的重建质量息息相关,图 6 所示为三种算法在不同结构光场调制度下重建的超分辨图像对比结果以及宽场图像的模拟结果。模拟中,选取调制度分别为 0.01、0.05 和 0.1 的结构光条纹进行照明,条纹周期为 156 nm,加载的条纹方向分别为 0° 、 60° 和 120° ,以便获取近似各向同性的二维分辨率。通过放大蓝色虚框的内部区域,可以看到,相对于宽场图像而言,三种超分辨重建算法均可以有效提高图像分辨率,区别在于是否存在图像伪影。当 $m = 0.01$ 时,经 POP 算法重建的图像已产生明显的波浪状扭曲,其右上角的频谱图亦存在分离不彻底的现象,同等情况下,ACR 算法仅在局部出现少量伪影,而 IRT 算法则表现更为优异。随着调制度的增加,初相位估测误差逐渐减小,伪影也因此减弱,当调制度增至 0.1 时,三种算法重建的超分辨图像几乎无明显差别。因此,理论上,在结构光场调制度大于 0.1 且信噪比较高的条件下,POP 算法、ACR 算法和 IRT 算法重建结果相近,当调制度降低时,IRT 算法仍能保持较高的超分辨图像重建质量。

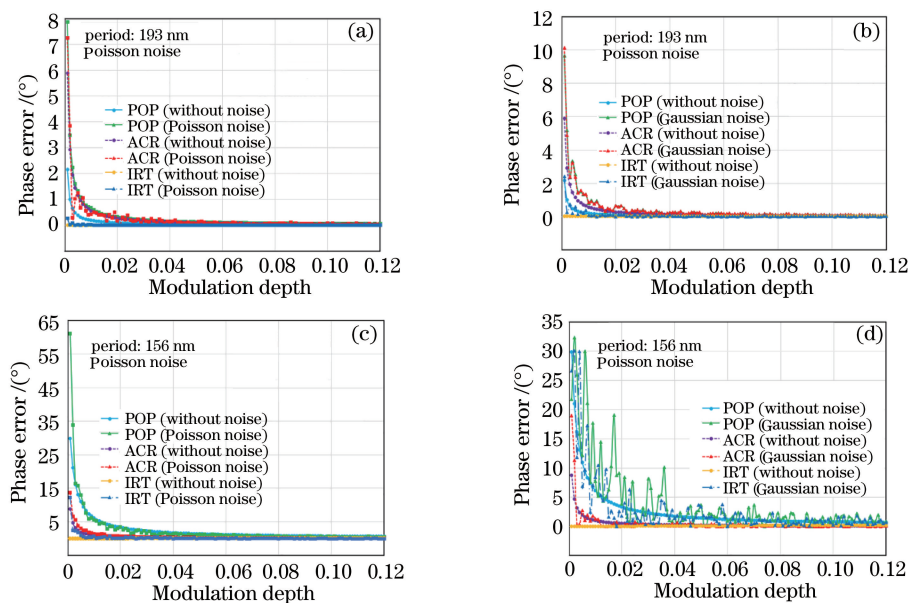


图 5 初相位估测值在不同条件下随结构光场调制度变化的误差曲线^[30]

Fig. 5 Estimation error curves of initial phase under different conditions with the structural light field modulation^[30]

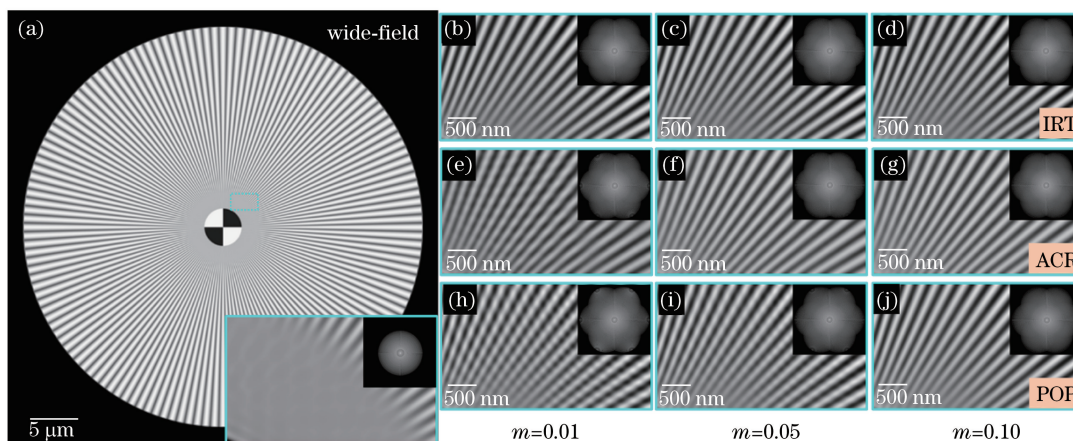


图 6 三种算法在不同调制度下重建的图像对比结果^[30]

Fig. 6 Contrast of reconstructed images by using three methods at different modulation depths^[30]

4.3 实验对比

对于投影式 SIM 系统,因光学传递函数的调制作用,条纹空间频率越高,结构光场调制度越低。因此,在 DMD 投影的 SIM 系统中,当结构照明光场空间频率接近衍射极限时,结构光场调制度通常低于 0.1,因此需要考虑选择合适的超分辨重建算法。图 7 所示为 POP 算法、ACR 算法和 IRT 算法重建的牛肺动脉内皮细胞(BPAEC)内肌动蛋白丝的超分辨图像。图 7(a)为 IRT 算法重建的全视场超分辨图像,图 7(b)~(e)为不同算法对同一局部的重建图像,图 7(f)~(i)显示的是相应重建图像的频谱图。与模拟结果一致,相对于衍射受限的宽场图像,三种重建算法均可进一步提高显微成像的空间分辨率,但是,在 POP 算法和 ACR 算法的重构频谱中[图 7(g)和(h)],仍存在少量的频谱分离不完全现象,从而导致重建的超分辨图像中存在些许残留的伪影。相比之下,IRT 算法所产生的伪影极少,可在低调制度条纹下准确地重建超分辨图像。此外,在计算耗时方面,基于主频为 4 GHz 的处理器和 32 GB 内存的 64 位操作系统,POP 算法、ACR 算法和 IRT 算法的耗时分别为 2.97、9.65 和 3.02 s。

以上实验结果虽然进一步证实了 IRT 算法在低调制度条纹照明时的重建优势,但不可忽略的一点,如果图像中存在显著的噪声干扰,将有可能导致 IRT 算法的重建质量下降,实验上选择高信噪比的探测器对于 IRT 算法而言至关重要。如图 5(d)所示,在一定程度的噪声干扰下,ACR 算法的定参精度将优于 IRT 算法,此时选用 ACR 算法则更有利于图像超分辨重建。对于高调制度的结构光条纹,三种算法的表现几乎是一致的。

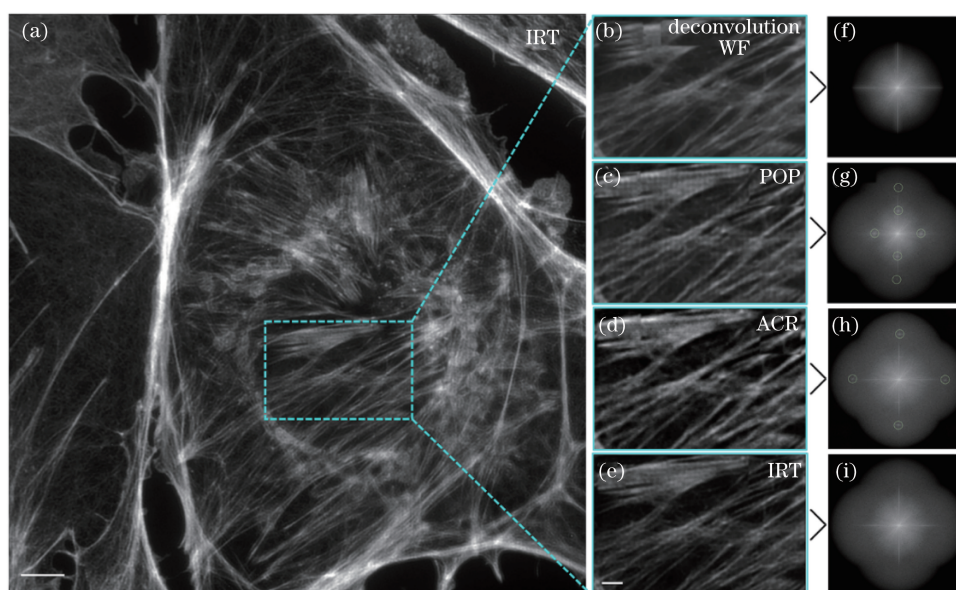


图 7 基于不同算法重建的牛肺动脉内皮细胞内肌动蛋白丝的超分辨图像^[30]

Fig. 7 Super-resolution image of actin filament in BPAEC by different reconstruction algorithms^[30]

5 结 论

在主流的超分辨光学显微成像技术中, SIM 技术凭借时间分辨率高、光毒性和光漂白性小等众多优点, 尤为适合应用于活体样品的高分辨动态观测。从线性 SIM 成像的基本原理出发, 综述了 SIM 技术的发展简史和 SIM 采用的两种结构光场调控方法(干涉式和投影式结构光产生方案); 详细对比了三种 SIM 超分辨图像重建算法, 分别是 POP 算法、ACR 算法和 IRT 算法。三种典型 SIM 超分辨图像重建算法的理论模型、误差模拟和实验结果的对比显示, 在高结构光场调制度下, 三种算法的定参误差和重建效果几乎是一致的, 但在低结构光场调制度下, IRT 算法具有明显的优势, 而 ACR 算法相对更适合应对较强噪声的系统环境。此外, 在计算时间方面, IRT 算法与 POP 算法相近, 而 ACR 算法则耗时相对较高, 如何在保证参数估计精度和伪影抑制效果的基础上进一步压缩计算耗时, 仍是下一步超分辨重建工作的重点。此外, 对于光漂白较严重的荧光蛋白, 通常需要进行弱光照明和短时间曝光成像, 由此引起的信噪比降低亦会对超分辨重建过程产生影响, 如何在低信噪比环境中解析出高质量的超分辨图像仍是目前面临的一大难题。

近十多年来, SIM 技术在系统搭建和图像重建等方面不断完善, 已成为探索微观世界的重要工具, 通过与其他成像技术的结合, 甚至有望应用于临床医学领域, 进一步促进生命科学领域的可持续发展。同时, 凭借其光路简单易搭建的优势, 未来在仪器小型化的道路上将可能获得重大突破, 甚至成为可随身携带的便携式超分辨成像设备。综上, SIM 技术不失为一种最具发展潜力的超分辨荧光显微技术。

参 考 文 献

- [1] Abbe E. Beiträge zur theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung[J]. Archiv für mikroskopische Anatomie, 1873, 9(1): 456-468.
- [2] Huang B, Bates M, Zhuang X. Super resolution fluorescence microscopy[J]. Annu Rev Biochem, 2009, 78(1): 993-1016.
- [3] Schermelleh L, Heintzmann R, Leonhardt H. A guide to super-resolution fluorescence microscopy[J]. Journal of Cell Biology, 2010, 190(2): 165-175.
- [4] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution[J]. Science, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [5] Huang F, Hartwich T M, Rivera-Molina F E, *et al.* Video-rate nanoscopy using sCMOS camera-specific single-molecule localization algorithms[J]. Nat Methods, 2013, 10(7): 653-658.
- [6] Sengupta P, van Engelenburg S B, Lippincott-Schwartz J. Superresolution imaging of biological systems using

- photoactivated localization microscopy[J]. *Chem Rev*, 2014, 114(6): 3189-3202.
- [7] Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. *Nat Methods*, 2006, 3(10): 793-795.
- [8] Jones S A, Shim S H, He J, *et al.* Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells[J]. *Nat Methods*, 2011, 8(6): 499-508.
- [9] Tam J, Merino D. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) in comparison with stimulated emission depletion (STED) and other imaging methods[J]. *J Neurochem*, 2015, 135(4): 643-658.
- [10] Klar T A, Hell S W. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy[J]. *Opt Lett*, 1999, 24(14): 954-956.
- [11] 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.
- [12] Otomo K, Hibi T, Kozawa Y, *et al.* STED microscopy-super-resolution bio-imaging utilizing a stimulated emission depletion[J]. *Microscopy*, 2015, 64(4): 227-236.
- [13] Gustafsson M G. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy[J]. *J Microsc*, 2000, 198(Pt 2): 82-87.
- [14] Heintzmann R. Saturated patterned excitation microscopy with two-dimensional excitation patterns[J]. *Micron*, 2003, 34(6-7): 283-291.
- [15] Dan D, Yao B, Lei M. Structured illumination microscopy for super-resolution and optical sectioning[J]. *Chin Sci Bull*, 2014, 59(12): 1291-1307.
- [16] Heintzmann R, Cremer C G. Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating[C]. *Proc SPIE*, 1998, 3568: 185-196.
- [17] Frohn J T, Knapp H F, Stemmer A. True optical resolution beyond the Rayleigh limit achieved by standing wave illumination[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2000, 97(13): 7232-7236.
- [18] Heintzmann R, Jovin T M, Cremer C. Saturated patterned excitation microscopy-a concept for optical resolution improvement[J]. *J Opt Soc Am A: Opt Image Sci Vis*, 2002, 19(8): 1599-1609.
- [19] Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2005, 102(37): 13081-13086.
- [20] Rego E H, Shao L, Macklin J J, *et al.* Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2012, 109(3): E135-E143.
- [21] Frohn J T, Knapp H F, Stemmer A. Three-dimensional resolution enhancement in fluorescence microscopy by harmonic excitation[J]. *Opt Lett*, 2001, 26(11): 828-830.
- [22] Gustafsson M G, Shao L, Carlton P M, *et al.* Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination[J]. *Biophys J*, 2008, 94(12): 4957-4970.
- [23] Fiolka R, Shao L, Rego E H, *et al.* Time-lapse two-color 3D imaging of live cells with doubled resolution using structured illumination[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2012, 109(14): 5311-5315.
- [24] Li D, Shao L, Chen B C, *et al.* Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics[J]. *Science*, 2015, 349(6251): aab3500.
- [25] Schaefer L, Schuster D, Schaffer J. Structured illumination microscopy: artefact analysis and reduction utilizing a parameter optimization approach[J]. *J Microsc*, 2004, 216(Pt 2): 165-174.
- [26] Orieux F, Sepulveda E, Lorient V, *et al.* Bayesian estimation for optimized structured illumination microscopy[J]. *Transactions on Image Processing*, 2012, 21(2): 601-614.
- [27] Shroff S A, Fienup J R, Williams D R. Phase-shift estimation in sinusoidally illuminated images for lateral superresolution[J]. *J Opt Soc Am A*, 2009, 26(2): 413-424.
- [28] Wicker K, Mandula O, Best G, *et al.* Phase optimisation for structured illumination microscopy[J]. *Opt Express*, 2013, 21(2): 2032-2049.
- [29] Wicker K. Non-iterative determination of pattern phase in structured illumination microscopy using auto-correlations in Fourier space[J]. *Opt Express*, 2013, 21(21): 24692-24701.

- [30] Zhou X, Lei M, Dan D, *et al.* Image recombination transform algorithm for superresolution structured illumination microscopy[J]. J Biomed Opt, 2016, 21(9): 096009.
- [31] Chakrova N, Rieger B, Stallinga S. Deconvolution methods for structured illumination microscopy[J]. J Opt Soc Am A, 2016, 33(7): 12-20.
- [32] Thomas B, Momany M, Kner P. Optical sectioning structured illumination microscopy with enhanced sensitivity[J]. Journal of Optics, 2013, 15(9): 094004.
- [33] Gustafsson M G, Agard D A, Sedat J W. Doubling the lateral resolution of wide-field fluorescence microscopy using structured illumination[C]. Proc SPIE, 2000, 3919: 141-150.
- [34] Kner P, Chhun B B, Griffis E R, *et al.* Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination[J]. Nat Methods, 2009, 6(5): 339-342.
- [35] Chang B J, Chou L J, Chang Y C, *et al.* Isotropic image in structured illumination microscopy patterned with a spatial light modulator[J]. Opt Express, 2009, 17(17): 14710-14721.
- [36] Chang B J, Lin S H, Chou L J, *et al.* Subdiffraction scattered light imaging of gold nanoparticles using structured illumination[J]. Opt Lett, 2011, 36(24): 4773-4775.
- [37] Hirvonen L M, Wicker K, Mandula O, *et al.* Structured illumination microscopy of a living cell [J]. European Biophysics Journal, 2009, 38(6): 807-812.
- [38] Fiolka R, Beck M, Stemmer A. Structured illumination in total internal reflection fluorescence microscopy using a spatial light modulator[J]. Opt Lett, 2008, 33(14): 1629-1631.
- [39] Shao L, Kner P, Rego E H, *et al.* Super-resolution 3D microscopy of live whole cells using structured illumination[J]. Nat Methods, 2011, 8(12): 1044-1046.
- [40] Förster R, Lu-Walther H W, Jost A, *et al.* Simple structured illumination microscope setup with high acquisition speed by using a spatial light modulator[J]. Opt Express, 2014, 22(17): 20663-20677.
- [41] Shaw M, Zajiczek L, O'Holleran K. High speed structured illumination microscopy in optically thick samples[J]. Methods, 2015, 88: 11-19.
- [42] O'Holleran K, Shaw M. Polarization effects on contrast in structured illumination microscopy[J]. Opt Lett, 2012, 37(22): 4603-4605.
- [43] Dan D, Lei M, Yao B, *et al.* DMD-based LED-illumination super-resolution and optical sectioning microscopy[J]. Sci Rep, 2013, 3: 1116.
- [44] Zhou X, Lei M, Dan D, *et al.* Double-exposure optical sectioning structured illumination microscopy based on hilbert transform reconstruction[J]. PloS One, 2015, 10(3): e0120892.
- [45] Qian J, Lei M, Dan D, *et al.* Full-color structured illumination optical sectioning microscopy[J]. Sci Rep, 2015, 5: 14513.
- [46] Gong H, Xu D, Yuan J, *et al.* High-throughput dual-colour precision imaging for brain-wide connectome with cytoarchitectonic landmarks at the cellular level[J]. Nature Communications, 2016, 7: 12142.
- [47] Ruan Y, Dan D, Zhang M, *et al.* Visualization of the 3D structures of small organisms via LED-SIM[J]. Frontiers in Zoology, 2016, 13(1): 26.
- [48] Vermeulen P, Zhan H, Orioux F, *et al.* Out-of-focus background subtraction for fast structured illumination super-resolution microscopy of optically thick samples[J]. J Microsc, 2015, 259(3): 257-268.
- [49] Chasles F, Dubertret B, Boccara A C. Optimization and characterization of a structured illumination microscope[J]. Opt Express, 2007, 15(24): 16130-16140.