

用于在线 E-FRET 定量成像的 自动背景识别与数据筛选

孙晗^{1,2**}, 陈同生^{2*}

¹华南师范大学信息光电子科技学院, 广东 广州 510006;

²华南师范大学生物光子学研究院, 广东 广州 510631

摘要 因灵敏性高、无损伤和测量速度快等特性,基于 3-cube 的荧光能量共振转移(E-FRET)显微成像是目前最流行的活细胞定量 FRET 成像技术。为了实现活细胞在线实时 FRET 定量成像,首先提出了一种细胞图像背景自动识别与图像阈值设定的方法:逐像素统计灰度值出现的次数,第 1 个峰值处的灰度值确定为背景值;将背景值的 β (经验常数)倍设为阈值,将扣除背景的供体激发供体探测通道图像和受体激发受体探测通道图像再次扣除阈值,负值置零后进行逻辑与运算制作用于数据筛选的布尔逻辑模板,并将其用于 FRET 效率和供受体浓度比的数据筛选。利用所提出的方法对转染了不同 FRET 质粒的细胞进行活细胞在线动态定量 E-FRET 成像,得到了与期望值一致的测量结果。

关键词 成像系统; 荧光共振能量转移; 背景识别; 布尔模板; 在线测量; 定量成像

中图分类号 TP391

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201939.0217001

Automatic Background Recognition and Data Selection for Online Quantitative E-FRET Imaging

Sun Han^{1,2**}, Chen Tongsheng^{2*}

¹ School of Information and Optoelectronic Science and Engineering, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510006, China;

² College of Biophotonics, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China

Abstract Three-cube-based fluorescence resonance energy transfer (E-FRET) microscopy is the most popular live-cell quantitative FRET imaging technique owing to its high sensitivity, no damage and fast measurement speed. To realize live-cell online real-time quantitative FRET imaging, we propose an automatic cell imaging background recognition and threshold setting method that counts gray values of an image pixel by pixel and assign the first peak gray value in the corresponding gray value-count plot as the background. The β (the empirical constant) times of the background value are set as a threshold. The corrected donor-excitation and donor-detection, and acceptor-excitation and acceptor-detection images obtained by subtracting the corresponding threshold from the raw images are used to create a Boolean logic template for data filtering of the FRET efficiency and relative concentration ratio between the acceptor and the donor via logical and operation. The results obtained through online dynamic quantitative E-FRET images of live cells expressing different plasmids on our self-assembled automatic E-FRET microscope are consistent with the expected values.

Key words imaging system; fluorescence resonance energy transfer; background recognition; Boolean template; online measurement; quantitative imaging

OCIS codes 180.2520; 170.0110; 170.2520; 170.3880

1 引 言

荧光共振能量转移(FRET)是目前唯一可以在

活细胞内监测蛋白质动态相互作用过程的实时检测技术^[1-3]。基于荧光蛋白(FPs)的 FRET 显微术已经被广泛应用于实时监测活细胞生物分子之间的相

收稿日期: 2018-07-11; 修回日期: 2018-09-02; 录用日期: 2018-09-25

基金项目: 国家自然科学基金(81471699)、国家重大科研仪器研制项目(61527825)

* E-mail: chentsh@scnu.edu.cn; ** E-mail: s3056@sina.com

相互作用^[4-5]。基于3种不同滤光模块组合的受体敏化定量 FRET 成像分析技术(E-FRET)^[6]特别适合于活细胞定量 FRET 检测。其中的3个滤光模块分别是供体激发供体探测模块(DD)、受体激发受体探测模块(AA)和供体激发受体探测的 FRET 模块(DA)。

FRET 的定量计算首先需要将3个通道的图像背景进行分离。图像背景分离的方法通常有两种:1)利用边缘检测算法提取图像中所研究对象的轮廓,再按轮廓进行图像分割^[7-11]。这种方法要求图像的轮廓比较清晰、规则。2)利用形态学运算提取背景,如顶帽变换^[12]、分水岭变换^[13-14]和灰度级分水岭变换^[14-15]。活细胞 E-FRET 定量成像一般采用后处理方式,即先进行大批量细胞的测量,然后进行逐个细胞的 FRET 计算处理。后处理方式主要有两个弊端:1)结果的后知性。实验出现错误既无法立即知晓,也无法立即弥补和修正。2)在观察样本出现较大变化或揭示新研究问题的情况下,无法及时处理所遇到的问题。

实时的活细胞 FRET 定量成像需要建立稳定的背景自动识别和数据筛选方法。该方法不能由于离散的强度分布而每次获得不同的值,也不能受图像中细胞数目的影响。活细胞 FRET 定量实时在线成像分析主要受困于各个探测通道背景的自动识别与扣除,以及一些奇异区域的处理等。另外,不同视野中细胞的数目有多有少,特别是对于细胞比较密集视野,常规的背景处理方法很难适应 E-FRET 图像的在线处理要求。

本文提出了一种适用于在线定量对 E-FRET 显微成像进行背景识别和有效数据筛选的方法。背景识别采用图像逐像素灰度值统计法,即以像素灰度值为横坐标,灰度值出现的频次作为纵坐标进行统计,将逐像素统计得到的第一个峰值处的灰度值确定为背景(I_{bg})。从 E-FRET 探测通道的供体激发供体探测通道和受体激发受体探测通道中扣除 βI_{bg} (β 为经验常数,由实验确定),并将灰度值为负数的像素灰度值置零后进行逐像素逻辑与运算,得到用于制作数据筛选模板的布尔逻辑模板(B_{mask})。利用该方法对转染了不同质粒的样本进行活细胞定量 E-FRET 显微成像,并分别进行动态在线检测,得到了与期望值一致的测量结果。结合所研制的电动定量 FRET 成像显微镜,实现了活细胞动态实时定量 FRET 成像。

2 材料与方法

2.1 细胞与培养

细胞(HeLa cells)均来自于暨南大学(中国广州);DMEM 培养基购买于 Life technologies, Inc;新生胎牛血清购买于杭州四季青生物公司;胰蛋白酶购买于华美生物工程公司;转染试剂 TurbofectTM in vitro transfection reagent 购买于 Fermentas(USA)。将新生胎牛血清加入 DMEM 培养基中(体积比为 1:10)作为细胞培养液,将细胞放在含有 5%(体积分数)CO₂ 的 37 °C 的培养箱(Thermo ScientificTM FormaTM 310 直热式 CO₂ 培养箱)中培养。细胞用胰蛋白酶消化后转到细胞培养皿中,培养 24 h 后,当细胞生长至 70%~90% 时,用体外转染试剂 TurbofectTM 将质粒瞬时转入细胞中。

2.2 质粒与转染

质粒 ECFP(C, 增强型青色荧光蛋白)、EYFP(Y, 增强型黄色荧光蛋白)、质粒 C4Y、C10Y、C40Y 和 C80Y 都是 C 与 Y 按一定的数量,即一定长度的氨基酸链连接而成的固定的 FRET 模型质粒,它们均获赠于美国马里兰州巴尔的摩约翰霍普金斯大学医学院生物医学工程系信号实验室^[16](ECFP addgene plasmid 13030;EYFP addgene plasmid 13033;C4Y Dimer for calibration 84953; C10Y Dimer for calibration 84954; C40V Dimer for calibration 84955;C80Y Dimer for calibration 84956)。

2.3 荧光显微镜及 FRET 定量成像

FRET 显微成像系统主要由一台宽场荧光显微镜(Axio Observer D1, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)和一台 CMOS 相机(ORCA-Flash4.0 V2, HAMAMATSU PHOTONICS K K, Japan)组成。本系统荧光显微镜包含一个电动控制转轮(Zeiss Axio Observer Mot Reflector, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany),它能够通过计算机实现自动控制。转轮上有 6 个 cube 孔位,且每个 cube 包含一套激发片、二色片、发射片。以 BP 436/20 nm 为激发片、FT 455 nm 为二色片、BP 480/40 nm 为发射片组成 DD 通道,以 BP 436/20 nm 为激发片、FT 455 nm 为二色片、BP 535/30 nm 为发射片组成 DA 通道,以 BP 500/20 nm 为激发片、FT 515 nm 为二色片、BP 535/30 nm 为发射片组成 AA 通道。

根据 E-FRET 成像的要求编写专用的 E-FRET 动态成像控制程序,实现电动转盘 cube 和 CMOS 相机的联动控制及 FRET 动态成像。

2.4 背景自动识别与图像修正

背景自动识别:对每个成像通道获取的原始图像(I_{raw})进行逐像素灰度值统计,然后以灰度值为横坐标、以 count 为纵坐标做逐像素灰度值统计图,将该统计图中第一个峰值对应的灰度值视为该视野的背景灰度值(I_{bg})。

图像修正:从 I_{raw} 中扣除 I_{bg} ,并将负的像素灰度值置零后得到每个成像通道的修正图像(I_{corr}),即

$$I_{\text{corr}} = I_{\text{raw}} - I_{\text{bg}} \quad (1)$$

2.5 E-FRET 成像及其数据筛选

2.5.1 定量 E-FRET 成像^[6]

首先分别利用单转供体和单转受体的细胞测量供受体之间的 4 个光谱串扰系数——供体的激发串扰系数(a)、供体的发射串扰系数(b)、受体的激发串扰系数(c)和受体的发射串扰系数(d)。然后利用含有固定 FRET 结构的细胞测量系统的校正参数——敏化淬灭转化因子(G)和供受体浓度转化因子(k)^[17],则 FRET 的效率 E 和供受体浓度比 R_C 的表达式为

$$E = \frac{F_C}{F_C + G \times I_{\text{DD}}}, \quad (2)$$

$$R_C = \frac{C_A}{C_D} = \frac{kI_{\text{AA}}}{I_{\text{DD}} + F_C/G}, \quad (3)$$

其中,

$$F_C = I_{\text{DA}} - a(I_{\text{AA}} - cI_{\text{DD}}) - d(I_{\text{DD}} - bI_{\text{AA}}), \quad (4)$$

式中: I_{DD} 为供体激发光激发时,在供体荧光探测通道探测到的供体荧光强度; I_{AA} 为受体激发光激发时,在受体荧光探测通道探测到的受体荧光强度; C_A 为受体浓度; C_D 为供体浓度; F_C 为在受体通道测量的受体 FRET 敏化荧光强度; I_{DA} 为供体激发光激发时,在受体荧光探测通道探测到的荧光强度。

2.5.2 定量 E-FRET 图像数据的筛选

为了进一步降低低强度信号像素对整体定量测量的影响,利用 $I_{\text{corr}}(\text{DD})$ 和 $I_{\text{corr}}(\text{AA})$ 制作了一个数据筛选模板,以实现 E 、 R_C 的筛选。数据筛选的布尔逻辑模板(B_{mask})由 $I_{\text{mask}}(\text{DD})$ 和 $I_{\text{mask}}(\text{AA})$ 通过逻辑与运算得到,即

$$B_{\text{mask}} = I_{\text{mask}}(\text{DD}) \wedge I_{\text{mask}}(\text{AA}), \quad (5)$$

其中,

$$I_{\text{mask}}(\text{DD}) = I_{\text{corr}}(\text{DD}) - \beta I_{\text{bg}}(\text{DD}), \quad (6)$$

$$I_{\text{mask}}(\text{AA}) = I_{\text{corr}}(\text{AA}) - \beta I_{\text{bg}}(\text{AA}), \quad (7)$$

式中: β 为经验常数。在这里特别指出,利用修正后的 DD 和 AA 通道强度扣除 $\beta I_{\text{bg}}(\text{DD})$ 和 $\beta I_{\text{bg}}(\text{AA})$,

并将负的像素灰度值置零后就可以得到模板。

根据 B_{mask} 对 E 和 R_C 进行筛选,即 B_{mask} 分别与 E 及 R_C 对应的像素点做乘法筛选,就可以得到最终的 E 和 R_C 图像。

3 结果与讨论

3.1 背景的自动识别与扣除

图 1(a)给出了转染 C4Y 模型 FRET 质粒 HeLa 细胞的 $I_{\text{raw}}(\text{DD})$ 、 $I_{\text{raw}}(\text{DA})$ 和 $I_{\text{raw}}(\text{AA})$ 荧光图像,图 1(b)给出了经逐像素统计得到的灰度值出现的频次图。 $I_{\text{raw}}(\text{DD})$ 频次图中第 1 个峰的峰值处的灰度值为 798,该值即为该通道图像的背景值, $I_{\text{bg}}(\text{DD}) = 798$;同理, $I_{\text{bg}}(\text{DA}) = 1904$, $I_{\text{bg}}(\text{AA}) = 252$ 。

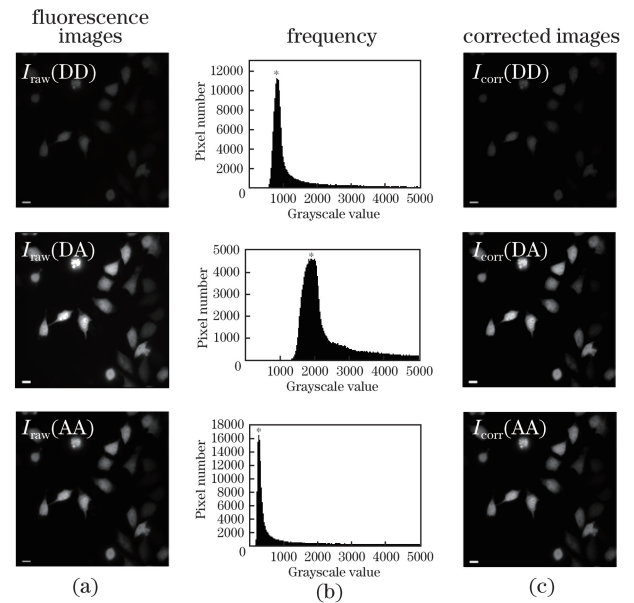


图 1 图像逐像素灰度值统计和修正图像

Fig. 1 Statistical pixel grayscale values of images and corrected images

背景信号主要来源于细胞培养液的自发荧光。本研究小组前期对细胞培养液的自发荧光进行详细的测量分析^[18-21]后发现,436 nm 激发时的自发荧光要比 510 nm 激发时的自发荧光强,而且培养液的自发荧光峰值在 530 nm 附近。因此,DD、DA、AA 通道的背景值有较大差别。

在确定背景灰度的方法上,本研究小组也尝试了半高值法,即将第 1 个峰左、右两侧的半峰全宽对应的灰度值区间的平均值确定为背景灰度。与峰值法相比,半高值法在精确确定背景灰度方面更加优秀;虽然峰值法简单粗暴,但在处理速度上更占优势。实际应用结果表明,利用峰值法和半高值法确定的背景灰度在最终结果上的差异很小。

根据(1)式,每个通道分别扣除背景,并将其灰度值为负值的像素灰度值置零进行数值修正得到 I_{corr} ,如图 1(c)所示。在实际研究过程中发现,所有不同视野第 1 个峰出现的灰度值都小于 5000。所以,为减小运算量,提高效率,在灰度统计时一般只需统计灰度在 0~5000 范围内的像素。

3.2 定量 FRET 成像及其数据筛选

结合事先测量的系统参数 G 因子、 K 因子和光谱串扰系数 a 、 b 、 c 、 d ,并根据图 1 中的 I_{corr} (DD)、 I_{corr} (DA)和 I_{corr} (AA)得到定量 E-FRET 检测的 E 和 R_C 图像及其逐像素统计结果,如图 2 所示。图 2 中: E 表示两个蛋白之间的相互作用; R_C 表示供体和受体的浓度比。背景区域的 E 和 R_C 值本应为零,但实际伪彩图中的定量成像结果却不为零,在对应的分布直方图中也出现了一些明显不正确的统计结果。信号随机涨落、图像采集过程中相机的轻微震动和荧光散射的共同影响,使细胞边缘及周围区域的结果出现了偏差。

接下来制作 E 、 R_C 数据筛选的模板。根据 I_{bg} (DD)、 I_{bg} (AA)、 I_{corr} (DD)、 I_{corr} (AA),并分别设定 β 为 0、1、2、3,将它们代入(6)~(7)式得到用于制作数据筛选模板的 I_{mask} (DD)和 I_{mask} (AA);然后

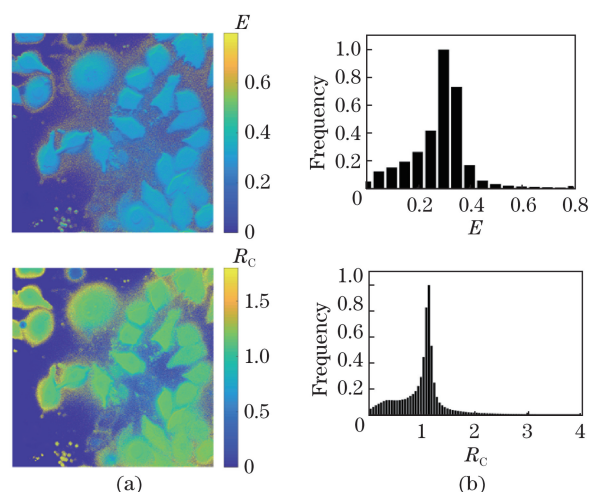


图 2 量化的 E 和 R_C 。(a) 图像;(b) 分布直方图

Fig. 2 Quantitative E and R_C . (a) Images; (b) corresponding histograms

按照(5)式进行逻辑与运算,并将运算后灰度值都不为零的像素点灰度值置 1;最后得到只含像素灰度值为 0 或 1 的数据筛选模板 B_{mask} ,如图 3(a)所示。利用对应 β 值的 B_{mask} 分别与 E 、 R_C 图像做逐像素灰度值乘法运算,得到的对应 E 、 R_C 的图像及直方图如图 3(b)、(c)所示。表 1 给出了经不同 β 值模板筛选后的 E 和 R_C 值及其标准差 SD。当 $\beta=0$ 时(即

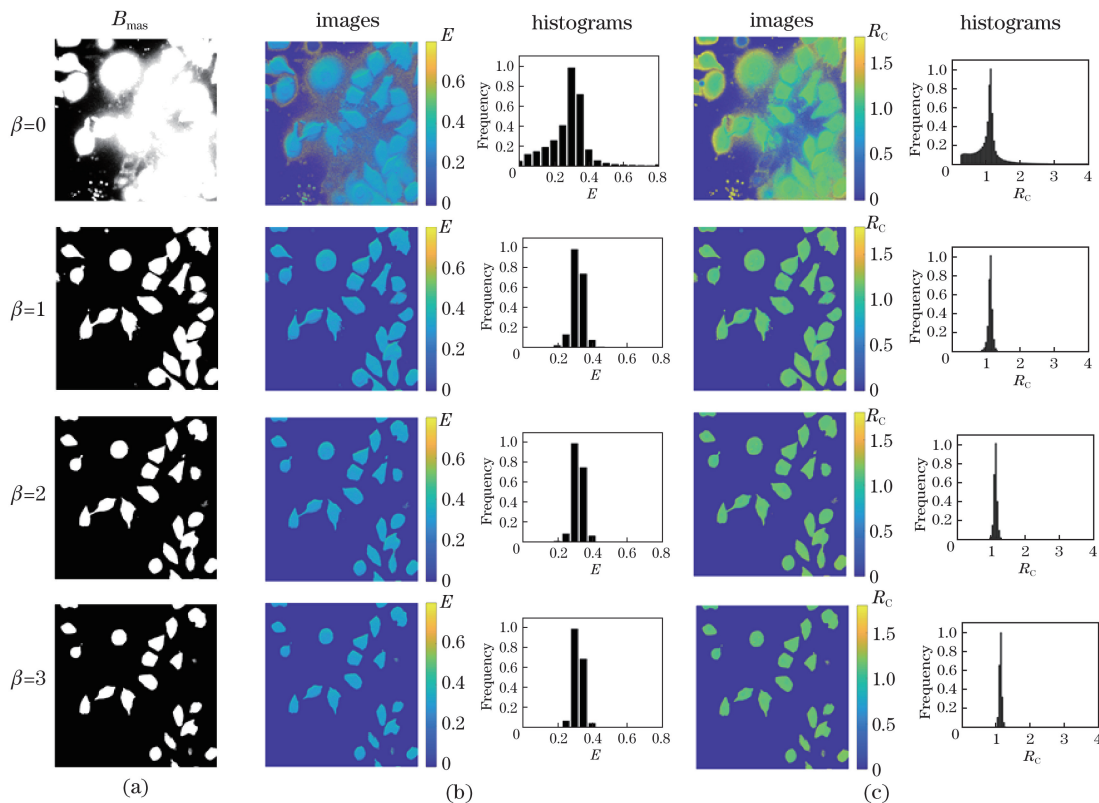


图 3 不同布尔逻辑模板筛选数据后的 E 和 R_C 。(a) 布尔逻辑模板;(b) E ; (c) R_C

Fig. 3 E and R_C results after data filtering with different Boolean logic templates. (a) B_{mask} ; (b) E ; (c) R_C

表 1 经不同 β 值模板筛选后的 E 和 R_C

Table 1 E and R_C after template filtering with different β

β	E		R_C	
	Mean	SD	Mean	SD
0	0.2835	0.1146	1.12	1.15
1	0.3187	0.0363	1.13	0.07
2	0.3019	0.0293	1.14	0.05
3	0.3123	0.0266	1.14	0.04

Notes: reported $E^{[16]}$ is 0.299 ± 0.004 , and expected R_C is 1. 无模板), 图中有大面积的白色连通区域, E 的标准差与期望值的标准差相比非常大, 而 R_C 的标准差也非常大; 经 $\beta=1$ 的模板筛选后, 图中大面积的连通区域明显减少了, 初显细胞形态, E 和 R_C 的标准差明显减小, 说明 B_{mask} 确实能对数据进行有效过滤; 经 $\beta=2$ 的模板筛选后, E 和 R_C 图像中的细胞区域

进一步缩小, 此时 E 的平均值与期望值一致; 随着 β 取值增加, 模板的筛选能力增强, 经模板筛选后得到的细胞面积明显减少, 出现了筛选后得到 E 的平均值高于期望值的现象。从模板筛选后 E 的平均值来看, 经 $\beta=1$ 与 $\beta=2$ 模板筛选后的结果与期望值更加一致, 所以 β 的取值范围为 $1 \sim 2$, 这样可以达到最优的筛选结果。

利用分别转染了 C4Y、C10Y、C40Y、C80Y 标准质粒的 HeLa 细胞进行定量 E-FRET 成像, 取 $\beta=2$ 制作模板, 对 E 和 R_C 图像进行筛选, 并对所有测量数据进行统计, 统计结果如表 2 所示。由统计结果可知, C4Y、C10Y、C40Y 的 E 与其对应的期望值一致, 但 C80Y 的统计值明显低于期望值。由于 C80Y 的 E 值很小, 为保证标准差足够小, 部分较高的 E 值因筛选而被丢失, 从而导致得到的结果与报道值出现偏差。

表 2 不同质粒的 E-FRET 定量成像结果

Table 2 E-FRET quantitative imaging results of different plasmids

Plasmid	β	E			R_C		
		Mean value	SD	Reported value	Mean value	SD	Expected value
C4Y	0	0.3200	0.1144		1.28	0.96	
	1	0.3165	0.0396	0.299 ± 0.004	1.14	0.08	1
	2	0.2911	0.0277		1.13	0.07	
C10Y	0	0.2391	0.0736		1.27	0.70	
	1	0.2301	0.0346	0.223 ± 0.003	1.15	0.11	1
	2	0.2206	0.0382		1.09	0.09	
C40Y	0	0.1430	0.0851		1.13	0.91	
	1	0.1444	0.0362	0.158 ± 0.002	1.10	0.13	1
	2	0.1486	0.0319		1.09	0.10	
C80Y	0	0.0907	0.0534		1.23	0.92	
	1	0.0840	0.0215	0.116 ± 0.002	1.10	0.13	1
	2	0.0852	0.0196		1.08	0.07	

3.3 在线动态检测

将数据处理算法与针对本系统编写的控制程序相结合, 可以实现 FRET 的在线动态检测。对模型质粒 C40Y 进行在线动态检测, 设定 10 s 为时间间隔, 控制程序自动进行三通道成像、背景自动确定和扣除, 以及逐像素定量 E-FRET 定量计算与 E 、 R_C 图像重构, 最终输出 $I_{\text{raw}}(\text{DD})$ 、 $I_{\text{raw}}(\text{DA})$ 、 $I_{\text{raw}}(\text{AA})$ 以及最终的 E 和 R_C 的伪彩图、统计图, 如图 4 所示。图 5 展示了前 90 s 的输出结果, E 和 R_C 都很稳定。

4 结 论

本研究发展了一种图像背景自动识别方法和用于定量 FRET 图像数据筛选的布尔逻辑模板制作方法。无论是稀疏细胞图像还是非稀疏细胞图像, 应用本研究提及的方法都能快速准确地自动识别图像背景。采用扣除不同背景值的 I_{DD} 和 I_{AA} 图像进行逐像素逻辑与运算得到的布尔逻辑模板, 可以有效实现 FRET 效率图像和供受体浓度比图像的有效筛选。结合本研究小组研制的电动定量 FRET 显

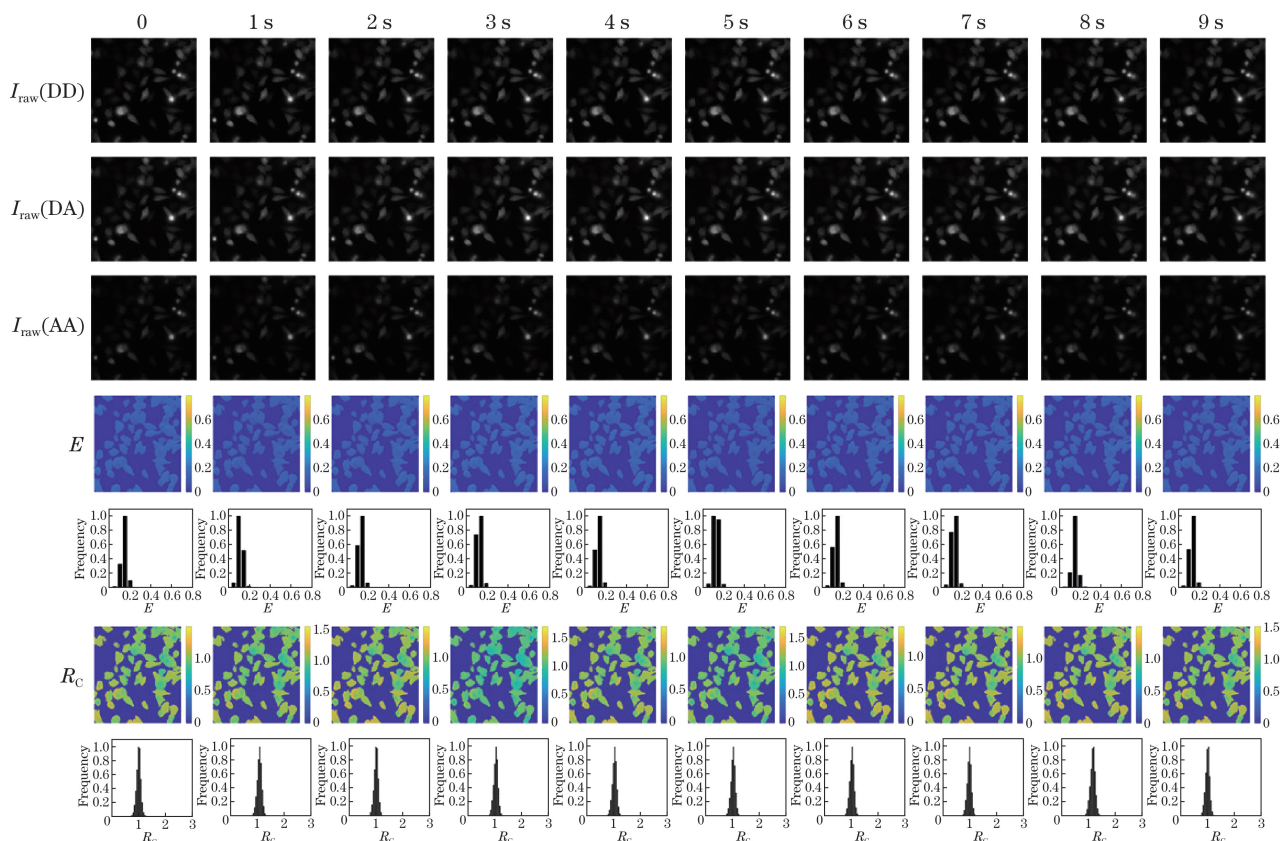


图 4 在线动态检测得到的 E 和 R_C 图

Fig. 4 E and R_C images obtained by online dynamic detection

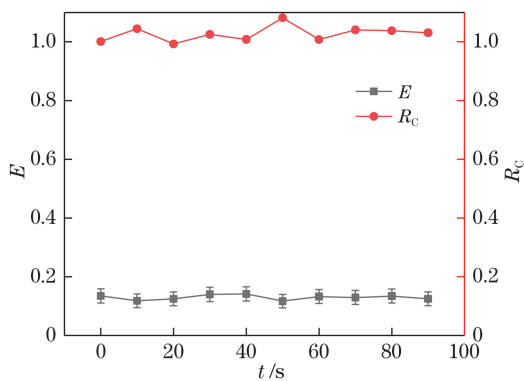


图 5 根据图 4 得到的 E 和 R_C 值

Fig. 5 E and R_C values according to Fig. 4

显微镜,利用本研究建立的方法可以实现快速动态定量 FRET 成像,为实现活细胞在线动态定量 FRET 成像分析提供了强有力的技术手段。

参 考 文 献

[1] Hush J M, Wadsworth P, Callahan D A, *et al.* Quantification of microtubule dynamics in living plant cells using fluorescence redistribution after photobleaching[J]. *Journal of Cell Science*, 1994, 107(4): 775-784.
 [2] Adams C L, Chen Y T, Smith S J, *et al.*

Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein[J]. *Journal of Cell Biology*, 1998, 142(4): 1105-1119.
 [3] Chang H, Qi C, Yi Q L, *et al.* P53 gene deletion detected by fluorescence *in situ* hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation[J]. *Blood*, 2005, 105(1): 358-360.
 [4] Tsien R Y. The green fluorescent protein[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1998, 67(1): 509-544.
 [5] Shaner N C, Steinbach P A, Tsien R Y. A guide to choosing fluorescent proteins[J]. *Nature Methods*, 2005, 2(12): 905-909.
 [6] Zal T, Gascoigne N R J. Photobleaching-corrected FRET efficiency imaging of live cells[J]. *Biophysical Journal*, 2004, 86(6): 3923-3939.
 [7] Canny J. A computational approach to edge detection [J]. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 1986, 8(6): 679-698.
 [8] Ramesh V, Haralick R M. An integrated gradient edge detector-theory and performance evaluation[C]. *Proceedings of the 1994 ARPA Image Understanding Workshop*, 1994: 689-702.
 [9] Haralick R M. Edge and region analysis for digital

- image data[J]. *Computer Graphics and Image Processing*, 1980, 12(1): 60-73.
- [10] Demigny D, Lorca F G, Kessal L. Evaluation of edge detectors performances with a discrete expression of Canny's criteria[C]. *Proceedings of International Conference on Image Processing, Washington, 1995*: 169-172.
- [11] Senthilkumar N, Rajesh R. Edge detection techniques for image segmentation—a survey of soft computing approaches[J]. *International Journal of Recent Trends in Engineering*, 2009, 1(2): 250-254.
- [12] Meyer F. Iterative image transformations for an automatic screening of cervical smears[J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1979, 27(1): 128-135.
- [13] Beucher S. The watershed transformation applied to image segmentation[J]. *Scanning Microscopy*, 2000(s6): 299-314.
- [14] Vincent L. Morphological grayscale reconstruction in image analysis: applications and efficient algorithms[J]. *IEEE Transactions on Image Processing*, 1993, 2(2): 175-201.
- [15] Serra J. *Image analysis and mathematical morphology* [M]. 1st ed. Orlando: Academic Press, 1983: 446-472.
- [16] Butz E S, Ben-Johny M, Shen M, *et al.* Quantifying macromolecular interactions in living cells using FRET two-hybrid assays[J]. *Nature Protocols*, 2016, 11(12): 2470-2498.
- [17] Chen H, Puhl H L, Koushik S V, *et al.* Measurement of FRET efficiency and ratio of donor to acceptor concentration in living cells[J]. *Biophysical Journal*, 2006: 91(5): 39-41.
- [18] Chai L Y, Zhang J W, Zhang L L, *et al.* Miniature fiber optic spectrometer-based quantitative fluorescence resonance energy transfer measurement in single living cells[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(3): 037008.
- [19] Zhang J W, Chai L Y, Zhang J, *et al.* Quantitative FRET measurement using emission-spectral unmixing with independent excitation crosstalk correction[J]. *Journal of Microscopy*, 2015, 257(2): 104-116.
- [20] Zhang J, Lin F R, Chai L Y, *et al.* Iem-spFRET: improved Iem-spFRET method for robust FRET measurement[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2016, 21(10): 105003.
- [21] Du M Y, Zhang L L, Xie S S, *et al.* Wide-field microscopic FRET imaging using simultaneous spectral unmixing of excitation and emission spectra[J]. *Optics Express*, 2016, 24(14): 16037-16051.