

基于 r-ADMM 算法的轴向超分辨荧光显微技术研究

李金瑜^{1**}, 陈友华^{1,2*}, 韩伟¹, 尚禹², 桂志国²

¹中北大学山西省光电信息与仪器工程技术研究中心, 山西 太原 030051;

²中北大学生物医学成像与影像大数据山西省重点实验室, 山西 太原 030051

摘要 多角度全内反射荧光显微镜层析成像技术是实现轴向超分辨的主要技术之一,其关键算法是基于交替方向乘子算法对逆问题模型求解。为进一步提高交替方向乘子算法的迭代速度及收敛性,提出将一种基于松弛因子的改进型交替方向乘子算法应用于逆问题的求解中,其核心思想是对拉格朗日函数的分解迭代过程进行过松弛求解。基于该算法,搭建了多角度全内反射荧光显微镜成像系统,采集不同照明角度对应的不同穿透深度的图像堆栈,利用改进型算法重构细胞微管的深度信息,给出了系统的轴向分辨率,并传统交替方向乘子算法进行了收敛速度的对比,给出了改进型算法达到最优收敛的松弛因子的取值范围,最后通过对线粒体样品进行长时程拍摄,重构了其三维信息,并观测了其融合和裂变的连续过程。实验结果表明,改进型交替方向乘子算法可以实现 40 nm 的轴向分辨率,并能在保证图像重构质量的同时,使迭代过程的收敛速度提升 20% 以上。

关键词 显微; 全内反射荧光显微镜; 交替方向乘子算法; 轴向超分辨率; 逆问题求解

中图分类号 O439

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201939.0218001

Axial Super-Resolution Fluorescence Microscopy Imaging Technology Based on r-ADMM Algorithm

Li Jinyu^{1**}, Chen Youhua^{1,2*}, Han Wei¹, Shang Yu², Gui Zhiguo²

¹Engineering Technology Research Center of Shanxi Province for Opto-Electronic Information and Instrument, North University of China, Taiyuan, Shanxi 030051, China;

²Shanxi Provincial Key Laboratory for Biomedical Imaging and Big Data, North University of China, Taiyuan, Shanxi 030051, China

Abstract The multi-angle total internal reflection fluorescence microscopy tomography imaging technology is one of the main techniques for achieving the axial super resolution. The key algorithm is to solve the inverse problem based on the alternating direction multiplier algorithm. In order to further improve the iterative speed and convergence of the alternating direction multiplier algorithm, we propose an improved alternating direction multiplier algorithm based on relaxation factors, which is used for the solution of the inverse problems and whose core idea is to solve the relaxation process of the Lagrangian function decomposition iterative process. Based on the proposed algorithm, the multi-angle total internal reflection fluorescence microscopy imaging system is built. The image stacks with different penetration depths corresponding to different illumination angles are acquired. Then the depth information of cell microtubules is reconstructed using the improved algorithm, and the axial resolution of the system is also given. Moreover, the convergence speed comparison of the improved algorithm with the traditional alternating direction multiplier algorithm is accomplished and the range of relaxation factors for the improved algorithm to achieve the optimal convergence is also given. Finally, the three-dimensional information of mitochondrial samples is reconstructed by long time photographing, and the consecutive processes of fusion and fission are observed. The experimental results show that the improved alternating direction multiplier algorithm can be used to achieve an axial resolution of 40 nm. Moreover, the convergence speed of the iterative process is improved by more than 20% when the image reconstruction quality is ensured.

Key words microscopy; total internal reflection fluorescence microscopy; alternating direction multiplier algorithm; axial super-resolution; inverse problem solving

OCIS codes 180.2520; 100.6640; 100.3190; 110.3010

收稿日期: 2018-08-07; 修回日期: 2018-08-27; 录用日期: 2018-09-17

基金项目: 国家自然科学基金(61505179)、山西省自然科学基金(201601D021079)

* E-mail: chenyh@nuc.edu.cn; ** E-mail: s1605027@st.nuc.edu.cn

1 引 言

细胞是生物体的基本结构和功能单位,纳米尺度超分辨率成像技术可以实现细胞观测及对细胞生命活动的探究,揭示物质的内在机理及相互关系。近几十年来,研究人员致力于突破衍射极限以获得纳米级分辨率,并首先在横向超分辨方面取得了进展,主流的超分辨仪器包括受激辐射损耗显微镜(STED)^[1]、单分子定位显微镜(SMLM)^[2-3]和结构光照明荧光显微镜(SIM)^[4-5]等。在此之后,研究人员逐步开展了轴向超分辨的研究工作,因为提高轴向分辨率对观察生物组织同样具有重要意义,如:轴向分辨率较高的显微镜能够对较厚的样品提供更好的层析能力;高轴向分辨率有助于检测样品的三维(3D)结构;高轴向分辨率或轴向定位精度有利于三维单粒子的定位和跟踪等。

通常,提高轴向分辨率的方法有两种:一种是将点扩展函数(PSF)工程、矢量场调控聚焦、干涉场等技术与已有的横向超分辨技术进行有机结合,实现系统的三维超分辨提升,如 i-PLAM^[6]、iso-STED^[7]、3D-SIM^[8]等,这类方法通常需要复杂的硬件系统;另一种是基于全内反射荧光显微镜(TIRFM)的层析成像技术,该方法主要基于倏逝场传输中的指数衰减特性,通过构建特定的传输模型,利用样品图像中的强度特征来提取轴向深度信息,从而实现纳米级的轴向分辨率。TIRFM属于宽场照明,光毒性低,成像速度快,尤其适合于活体细胞和生物组织的超分辨成像。

目前,基于TIRFM的轴向超分辨方法主要是多角度全内反射荧光显微镜(MA-TIRFM)层析成像技术,该方法通过建立前向模型来求解逆问题,对生物样品的轴向结构进行重构,然后根据重构的图像信息来表征轴向分辨率^[9-10]。该方法要求的系统硬件结构简单,保留了TIRFM低光毒性的优点,较容易实现,适合于活细胞显微成像。在MA-TIRFM中,针对前向模型逆问题求解的办法有很多,例如:逆拉普拉斯方法、贝叶斯概率分析、标记点过程方法、交替方向乘子算法(ADMM)和平行近端算法等。与其他算法相比,ADMM算法结合了乘子法弱条件的收敛性以及偶上升法可分解求解性的优势,将优化问题分为几个子问题进行求解^[11-12],具有更快的收敛速度和更高的稳健性,并且不需要系统和样品的先验信息,因此,ADMM算法已成为当前求解逆问题最优解的主要方法之一。但由于轴向分

辨率的重构过程需要将采集到的多角度图像堆栈进行相关运算,尤其是在活细胞显微成像时,数据量较大,对算法的重构速度提出了更高的要求。

鉴于此,本文引入一种松弛因子,通过对拉格朗日函数的分解迭代过程进行过松弛求解,来加快迭代速度,从而实现算法的加速收敛,称为relaxed-ADMM算法(r-ADMM算法)。在此基础上,本文通过搭建MA-TIRFM实验系统获取了不同入射角度对应不同穿透深度的图像堆栈,然后采用r-ADMM算法重构深度信息来表征轴向分辨率,在保证重构图像质量的同时提高了迭代过程的收敛速度。

2 理论基础

2.1 实验系统及工作原理

实验系统以Nikon Eclipse Ti显微镜架为基本平台,它可以采集细胞样品在不同TIRFM角度下对应不同深度的图像,系统原理如图1(a)所示。图1(a)中:绿色表示激发光束;灰色表示荧光信号;L1、L2为透镜;M为反射镜;DM为二向色镜。首先,488 nm激发光(Coherent, Sapphire 488-300 CW CDRH)准直后经反射镜M反射通过透镜L1,再经二向色镜DM(Chroma, C174298)反射后进入显微镜,并聚焦在显微镜物镜(Nikon, Apo 100×/1.49油浸TIRFM物镜)后焦面(BFP)上,使得入射光以超过全内反射临界角的角度入射盖玻片表面,并

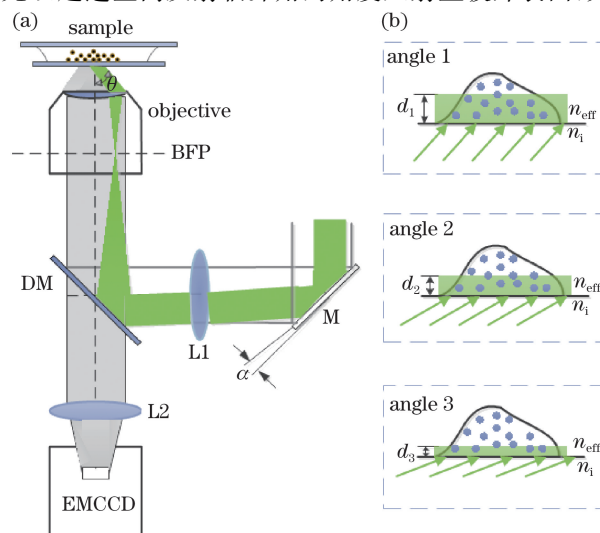


图1 实验装置及原理图。(a)实验装置示意图;

(b)不同入射角度对应的不同穿透深度

Fig. 1 Experimental setup and principle. (a) Schematic of experimental setup; (b) different penetration depths for different incident angles

产生倏逝波,进而激发荧光,最后由 EMCCD(Andor, iXon Ultra 888)采集样品的荧光图像。该装置通过电压控制倾斜反光镜 M 的角度 α 来调整入射盖玻片的角度 θ , θ 随电压增大而线性增大^[13-14]。

该系统在不同 TIRFM 角度下获取的图像堆栈对应不同的深度^[15],如图 1(b)所示。其中, d_1 、 d_2 、 d_3 表示穿透深度, n_i 和 n_{eff} 分别表示盖玻片的折射率和样本的有效折射率。

当入射角 θ 大于阈值 θ_s 时,可忽略 TIRFM 中细胞膜宿主部分的荧光贡献^[16]。 θ_s 的表达式为

$$\theta_s \approx \arcsin(n_{\text{eff}}/n_i), \quad (1)$$

式中: n_{eff} 为样本局部平均有效折射率; n_i 为玻璃基质的折射率。由该式计算可得 θ_s 为 61.39° 。

2.2 前向模型

由于光照亮度的不均匀性,图 1 所示实验系统获取的不同 TIRFM 角度的图像堆栈通常使用形态学顶帽滤波法消除局部背景,然后根据采集的图像信息建立前向模型,再通过 r-ADMM 算法对目标函数求取最优解,重构三维图像。该系统算法流程图如图 2 所示。

当 TIRFM 入射光束角度大于临界角时会产生倏逝波,且当其穿透深度小于细胞厚度时,只有部分细胞质膜被倏逝波激发。同时,假设一些近似值,对 MA-TIRFM 进行理论描述。

单角度 TIRFM 图像中获得的荧光信号为

$$I_{\text{det}}(\varphi, \theta, z) = \iiint I_{\text{exc}}(z) S(z) Q(z) \eta(z) V_{\text{PSF}_{\text{det}}} d\varphi d\theta dz, \quad (2)$$

式中: $I_{\text{exc}}(z)$ 为倏逝波的激发场; $S(z)$ 为样品中染料分子的局部分布; $Q(z)$ 为影响荧光激发的参数,如荧光染料的量子效率、吸收率、偶极取向和衰变速率; $\eta(z)$ 为探测速率; $V_{\text{PSF}_{\text{det}}}$ 为系统的检测点扩展函数; φ 、 θ 、 z 分别为样本的方位角、入射角和深度。

设由探测器记录的宽场荧光显微镜下的荧光信号在像素点 (x_d, y_d) 处的分布为^[17]

$$I_{\text{det}}(x_d, y_d, \theta, z_0) = \iiint dx_s dy_s dz_s f_s(x_s, y_s, z_s, \theta, z_0) \times V_{\text{PSF}_{\text{det}}}(x_d - x_s, y_d - y_s, -z_s), \quad (3)$$

式中: f_s 为样品 (x_s, y_s, z_s) 处发出的荧光信号,可表示为

$$f_s(x_s, y_s, z_s, \theta, z_0) = I_{\text{exc}}(x_s, y_s, z_s, \theta, z_0) S(z_0) Q(z_0) \eta(z_0). \quad (4)$$

同时,激发光场 I_{exc} 可表示为

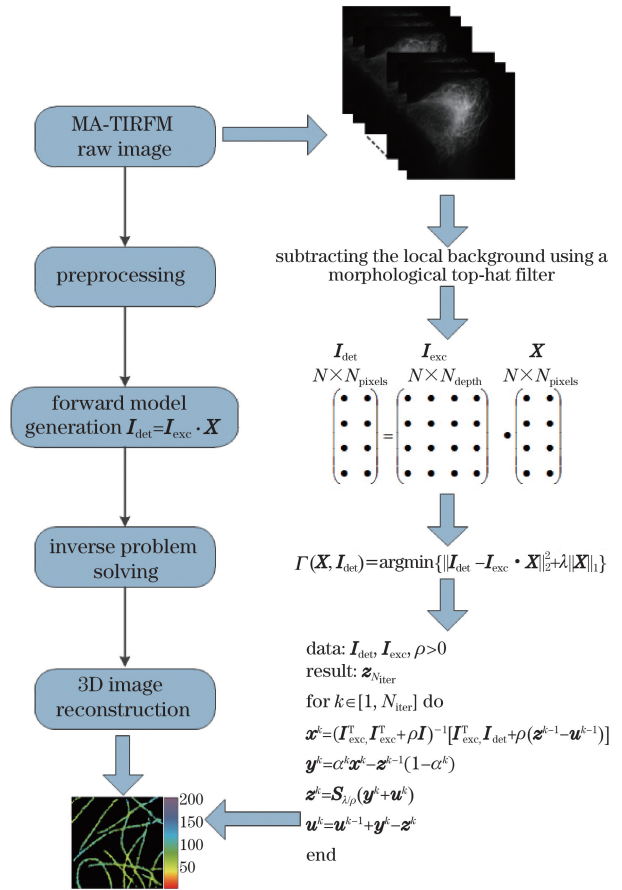


图 2 算法流程图

Fig. 2 Flow chart of the algorithm

$$I_{\text{exc}}(x_s, y_s, z_s, \theta, z_0) \approx I_0 \exp\left[-\frac{2(x_s^2 + y_s^2)}{\omega_L^2}\right] \exp\left[-\frac{(z_s + z_0)}{d(\theta)}\right], \quad (5)$$

式中: θ 为入射角度; z_0 为盖玻片到样品的距离; ω_L 为束腰半径; 衰减深度 $d(\theta)$ 可表示为

$$d(\theta) = \frac{\lambda}{4\pi} (n_i^2 \sin^2 \theta - n_{\text{eff}}^2)^{-1/2}. \quad (6)$$

$I_0(\theta)$ 为由菲涅耳方程给出的界面处的光强,对于 p 偏振光束,可表示为

$$I_0(\theta) = \frac{4\cos^2 \theta (2\sin^2 \theta - n^2)}{n^2 \cos^2 \theta + \sin^2 \theta - n^2}, \quad (7)$$

式中: $n = n_{\text{eff}}/n_i$ 。

当探测器在样品 (x_s, y_s, z_s) 处拍摄时,可认为该样品的轴向距离 $z_s = 0$ 。因此,结合(3)~(5)式化简得

$$I_{\text{det}}(x_d, y_d, \theta, z_0) = S(z_0) Q(z_0) \eta(z_0) I_0(\theta) \times \exp\left[-\frac{z_0}{d(\theta)}\right] \iint dx_s dy_s \exp\left[-\frac{2(x_s^2 + y_s^2)}{\omega_L^2}\right] \times V_{\text{PSF}_{\text{det}}}(x_d - x_s, y_d - y_s, 0). \quad (8)$$

可见,图像值 I_{det} 不仅与倏逝场有关,还受 $S(z)$ 、

$Q(z)$ 、 $\eta(z)$ 及 $V_{\text{PSF}_{\text{det}}}$ 的影响。然而,参数 $S(z)$ 、 $Q(z)$ 、 $\eta(z)$ 主要取决于分子深度 z_0 , 而 $V_{\text{PSF}_{\text{det}}}$ 只与轴向距离 z_s 相关, 且当探测器在样品处进行拍摄时, 轴向距离 $z_s = 0$; $V_{\text{PSF}_{\text{det}}}$ 可以看作是常数, 因此, 改变入射角度 θ 并不会使这些参数发生变化。

为了进一步简化(8)式, 引入参数 X , 令

$$X = S(z_0)Q(z_0)\eta(z_0) \iint dx_s dy_s \exp\left[-\frac{2(x_s^2 + y_s^2)}{\omega_L^2}\right] \times V_{\text{PSF}_{\text{det}}}(x_d - x_s, y_d - y_s, 0). \quad (9)$$

考虑到入射角和重构平面的数量有限, (2)式可离散为矩阵形式

$$\mathbf{I}_{\text{det}} = \mathbf{I}_{\text{exc}} \cdot \mathbf{X}, \quad (10)$$

式中: \mathbf{I}_{det} 是维度为 $N_{\text{angles}} \times N_{\text{pixelx}} \times N_{\text{pixely}}$ 的矩阵, 与获得的图像堆栈一致; \mathbf{I}_{exc} 是维度为 $N_{\text{angles}} \times N_{\text{planes}}$ 的矩阵, 代表不同入射角度下不同倏逝波的强度分布; \mathbf{X} 是维度为 $N_{\text{planes}} \times N_{\text{pixelx}} \times N_{\text{pixely}}$ 的矩阵, 代表样品的三维分布特征。 N_{angles} 为入射角度的数量; N_{pixelx} 、 N_{pixely} 为图像在 x 、 y 方向的像素数; N_{planes} 为需要重构的平面数目。

因此, 求解三维样本分布的重构矩阵 \mathbf{X} 就变为求矩阵逆的优化问题^[18], 其目标函数为

$$\Gamma(\mathbf{X}, \mathbf{I}_{\text{det}}) = \arg \min(\|\mathbf{I}_{\text{det}} - \mathbf{I}_{\text{exc}} \cdot \mathbf{X}\|_2^2 + \lambda \|\mathbf{X}\|_1), \quad (11)$$

式中: λ 为平衡等式的限制因子。

2.3 重构算法

本研究使用的 r-ADMM 算法可将(11)式视为一个凸优化问题, 该过程无需对系统参数(如量子效率、吸收率、检测效率和点扩展函数等)进行精确求解, 在一定程度上减小了运算量。同时, r-ADMM 算法可用于解决线性和二次目标函数^[19]、lasso 正则化最小化问题^[20]以及模型拟合等问题。

r-ADMM 算法一般用于解决以下形式的问题

$$\text{minimize } f(\mathbf{x}) + g(\mathbf{z}), \text{ subject to } \mathbf{A}\mathbf{x} + \mathbf{B}\mathbf{z} = \mathbf{c}, \quad (12)$$

式中: \mathbf{x} 为变量, $\mathbf{x} \in \mathbf{R}^n$, $\mathbf{z} \in \mathbf{R}^m$; \mathbf{A} 、 \mathbf{B} 为线性算子, $\mathbf{A} \in \mathbf{R}^{p \times n}$, $\mathbf{B} \in \mathbf{R}^{p \times m}$; $\mathbf{c} \in \mathbf{R}^p$ 。(8)式对应的增广拉格朗日表达式为

$$L_\rho(\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z}) = f(\mathbf{x}) + g(\mathbf{z}) + \mathbf{y}^T(\mathbf{A}\mathbf{x} + \mathbf{B}\mathbf{z} - \mathbf{c}) + (\rho/2)\|\mathbf{A}\mathbf{x} + \mathbf{B}\mathbf{z} - \mathbf{c}\|_2^2, \quad (13)$$

式中: \mathbf{y} 为拉格朗日乘子, $\mathbf{y} \in \mathbf{R}^p$; ρ 为惩罚参数, $\rho > 0$ 。

传统增广拉格朗日方程的求解是同时对 \mathbf{x} 和 \mathbf{z} 求极小值, 因此该过程需要同时更新两个变量, 求解过程比较复杂。r-ADMM 算法充分利用可分离结构的特点, 将增广拉格朗日方程分解转化为一系列子问题进行交替求解, 使原问题得以简化。

定义缩放变量 $\mathbf{u} = (1/\rho)\mathbf{y}$, r-ADMM 算法的迭代过程可表示为

$$\mathbf{x}^{k+1} = \arg \min_x [f(\mathbf{x}) + (\rho/2)\|\mathbf{A}\mathbf{x} + \mathbf{B}\mathbf{z}^k - \mathbf{c} + \mathbf{u}^k\|_2^2], \quad (14)$$

$$\mathbf{z}^{k+1} = \arg \min_z [g(\mathbf{z}) + (\rho/2)\|\alpha^k \mathbf{A}\mathbf{x}^{k+1} - (1 - \alpha^k)(\mathbf{B}\mathbf{z}^k - \mathbf{c}) + \mathbf{B}\mathbf{z} - \mathbf{c} + \mathbf{u}^k\|_2^2], \quad (15)$$

$$\mathbf{u}^{k+1} = \mathbf{u}^k + \alpha^k \mathbf{A}\mathbf{x}^{k+1} - (1 - \alpha^k)(\mathbf{B}\mathbf{z}^k - \mathbf{c}) + \mathbf{B}\mathbf{z}^{k+1} - \mathbf{c}. \quad (16)$$

α^k 为松弛因子, $\alpha^k \in (0, 2)$ 。当 $\alpha^k = 1$ 时, 该算法等价于传统的 ADMM 算法; 当 $\alpha^k > 1$ 时, 该算法表示为过松弛算法, 对于凸优化问题, 该算法比传统 ADMM 算法收敛快得多。同时, 在传统的 ADMM 算法中, 惩罚参数 ρ 对算法的收敛有直接影响, 而且若对 ρ 的调整不足, 可能会导致该算法速度变慢^[21]。在 r-ADMM 算法中加入松弛因子可以提高算法的收敛迭代速度, 同时可使 ρ 对算法收敛的影响减小。

在 r-ADMM 算法中, lasso 模型的一般形式可表示为

$$\text{minimize } f(\mathbf{x}) + g(\mathbf{z}), \text{ subject to } \mathbf{x} - \mathbf{z} = \mathbf{0}, \quad (17)$$

式中: $f(\mathbf{x}) = (1/2)\|\mathbf{A}\mathbf{x} - \mathbf{b}\|_2^2$, $g(\mathbf{z}) = \lambda \|\mathbf{z}\|_1$ 。由于该模型与得到的目标函数(10)式的形式一致, 因

此这里应用 lasso 模型对目标函数进行优化。

根据(14)~(16)式, 目标函数(11)式中各变量的迭代过程可表示为

$$\bar{\mathbf{x}}^k = (\mathbf{I}_{\text{exc}}^T \mathbf{I}_{\text{exc}} + \rho \mathbf{I})^{-1} [\mathbf{I}_{\text{exc}}^T \mathbf{I}_{\text{det}} + \rho(\mathbf{z}^{k-1} - \mathbf{u}^{k-1})], \quad (18)$$

$$\bar{\mathbf{z}}^k = \mathbf{S}_{\lambda/\rho}(\mathbf{x}^k + \mathbf{u}^k), \quad (19)$$

$$\bar{\mathbf{u}}^k = \mathbf{u}^{k-1} + \mathbf{x}^k - \mathbf{z}^k, \quad (20)$$

$$\mathbf{x}^{k+1} = \alpha^k \bar{\mathbf{x}}^k + (1 - \alpha^k) \mathbf{x}^k, \quad (21)$$

$$\mathbf{z}^{k+1} = \alpha^k \bar{\mathbf{z}}^k + (1 - \alpha^k) \mathbf{z}^k, \quad (22)$$

$$\mathbf{u}^{k+1} = \alpha^k \bar{\mathbf{u}}^k + (1 - \alpha^k) \mathbf{u}^k. \quad (23)$$

r-ADMM 算法的本质是求解目标函数的最优问题, 原始残差和双残差的值可作为判断目标函数达到最优条件的界限^[22]。当原始残差和双残差

达到 $\|r^k\|_2 \leq \epsilon^{\text{pri}}$ 且 $\|s^k\|_2 \leq \epsilon^{\text{dual}}$ 时, 目标函数取得最优解。其中: $\|r^k\| = \|x^k - z^k\|_2$, 表示原始残差; $\|s^k\| = \|-\rho(z^k - z^{k-1})\|_2$, 表示双残差; $\epsilon^{\text{pri}} > 0$ 且 $\epsilon^{\text{dual}} > 0$, 是可行性条件的可行性公差, 可分别表示为

$$\begin{cases} \epsilon^{\text{pri}} = \sqrt{p}\epsilon^{\text{abs}} + \epsilon^{\text{rel}} \max(\|Ax^k\|_2, \|Bz^k\|_2, \|c\|_2) \\ \epsilon^{\text{dual}} = \sqrt{n}\epsilon^{\text{abs}} + \epsilon^{\text{rel}} \|A^T y^k\|_2 \end{cases}, \quad (24)$$

式中: $\epsilon^{\text{abs}} > 0$, 为绝对公差, 一般情况下, $\epsilon^{\text{abs}} = 10^{-4}$; $\epsilon^{\text{rel}} > 0$, 为相对公差, 一般情况下, $\epsilon^{\text{rel}} = 10^{-2}$; \sqrt{p} 和 \sqrt{n} 分别对应不同模型的稀疏密度和特征个数。

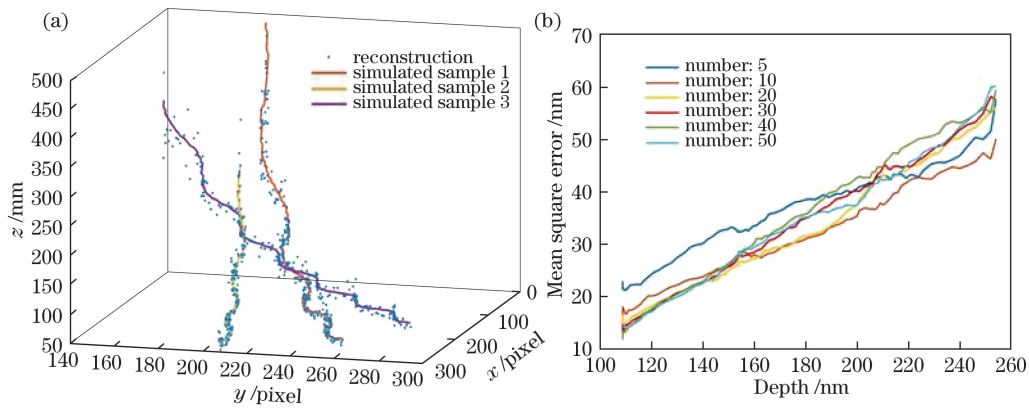


图 3 基于 MA-TIRFM 的模拟微管结构的仿真结果。(a) 模拟的微管结构及重构结果; (b) 不同入射角数量下不同深度对应的精度
Fig. 3 Simulation results of cellular microtubule structures based on MA-TIRFM. (a) Simulated microtubule structures and reconstructed results; (b) accuracy corresponding to different depths at different incident angle numbers

3 结果与分析

3.1 r-ADMM 算法重构轴向图像

由(1)式计算可得实验系统的阈值角度 $\theta_s = 61.39^\circ$, 令 62° 为初始角, 以 0.3° 为步长采集 20 张 TIRFM 图像堆栈进行三维重构。MA-TIRFM 成像过程中 EMCCD 获取到的原始图像是通过样本在同一区域不同 TIRFM 角度下的图像堆栈构成的。为了验证本研究 MA-TIRFM 成像技术的轴向重构能力, 使用 Pt-K2 细胞中的固定微管样本 (Abberior, Tub-CAGE 500) 进行重构。

微管的宽场图像如图 4(a) 所示, 将系统采集到的图像堆栈分别通过传统 ADMM 算法和 r-ADMM 算法进行重构, 该过程表示 20~200 nm 深度图像的叠加, 重构结果分别如图 4(b) 和图 4(c) 所示。由图 4(d) 可知, 传统 ADMM 算法重构三维图像的轴向分辨率可达到 40 nm。由图 4(e) 可知, r-ADMM 算法重构图像在相同深度时的轴向分辨率也可达到

2.4 仿真及讨论

为了验证 r-ADMM 算法的可行性, 本研究通过模拟微管结构和仿真重构结果来测试算法的准确性。通常, 三维空间中的微管可以用抛物线曲线或指数曲线描述, 因此使用正弦函数来表示微管曲线的局部弧长。模拟的微管结构和使用 r-ADMM 算法重构的结果如图 3(a) 所示, 其均方误差 (MSE) 约为 21 nm, 保证了重构图像的质量。此外, 还分析了不同入射角数量对重构模拟微管结构的影响, 如图 3(b) 所示, 结果表明, 选择不同的入射角度步长来改变图像堆栈层数对重构精度几乎没有影响。综合考虑图像拍摄时间和重构精度之间的关系后, 本研究选择采集 20 张图像进行重构。

40 nm。从图 4(f) 中可以明显地看出 20~200 nm 深度连续性的形态学改变。可见, 与传统 ADMM 算法相比, r-ADMM 算法重构图像可以实现相同的轴向分辨率和图像重构质量。

3.2 收敛速度分析及对比

为了验证 r-ADMM 算法是否能优化迭代速度, 本研究将不同 ρ 值对应的 r-ADMM 算法与传统 ADMM 算法随迭代次数变化的残差曲线进行对比, 并且给出了 r-ADMM 算法达到最优收敛的 α^k 值区间。

图 5(a) 为不同的 ρ 值对应的传统 ADMM 算法与 r-ADMM 算法随迭代次数变化的残差曲线对比图, 其中 y 表示 $\epsilon^{\text{pri}} + \epsilon^{\text{dual}}$ 的值; y_1 表示传统 ADMM 算法的 $\|r^k\|_2 + \|s^k\|_2$ 的值; y_2 表示 r-ADMM 算法的 $\|r^k\|_2 + \|s^k\|_2$ 的值, 具体数据如表 1 所示。可见, 与传统 ADMM 算法相比, r-ADMM 算法的迭代收敛速度可提高 20% 以上。图 5(b) 为 r-ADMM 算法在 $\rho=0.4$ 时不同松弛因子对应残差随迭代次数

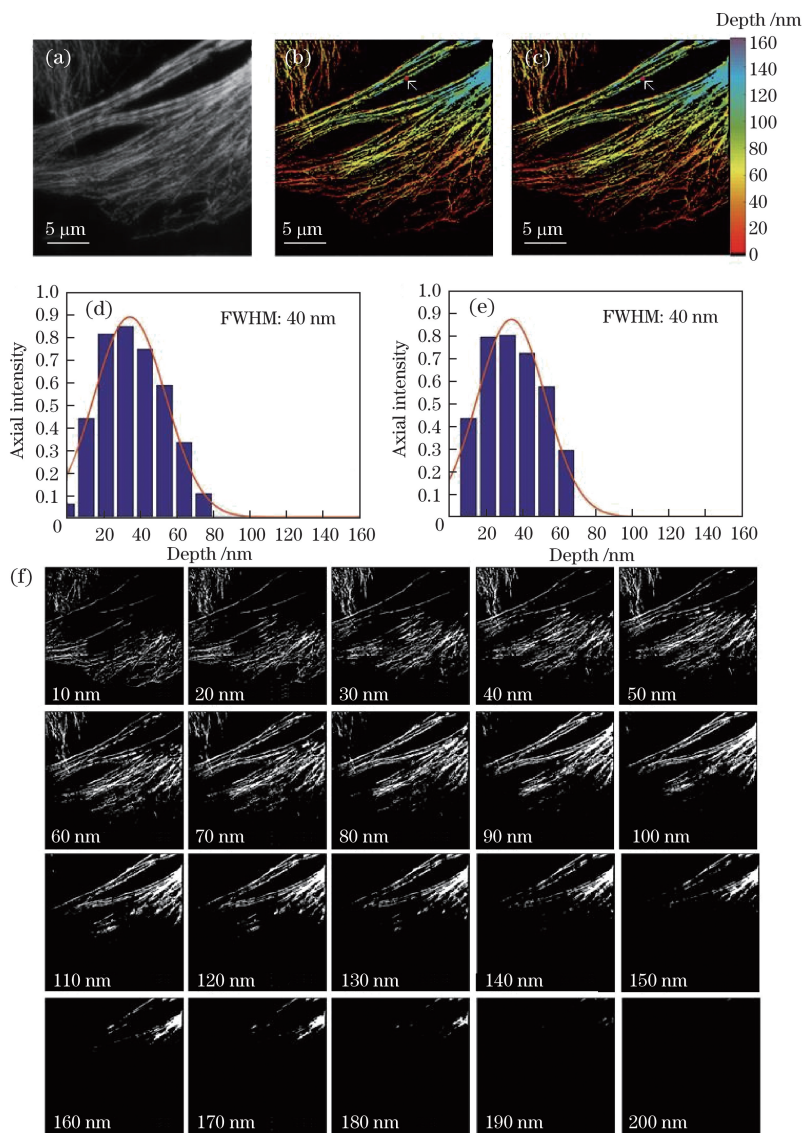


图 4 固定微管的 MA-TIRFM 成像。(a)微管宽场图像;(b)传统 ADMM 算法重构的三维图像;(c) r-ADMM 算法重构的三维图像;(d)传统 ADMM 算法实现 40 nm 的轴向分辨率[对应(b)中白色箭头指向的红点位置];(e) r-ADMM 算法实现 40 nm 的轴向分辨率[对应(c)中白色箭头红点位置];(f) r-ADMM 算法重构的微管在不同深度处对应的图像

Fig. 4 MA-TIRFM imaging of fixed microtubules. (a) Wide-field image of microtubules; (b) three-dimensional map reconstructed by traditional ADMM algorithm; (c) three-dimension map reconstructed by r-ADMM algorithm; (d) 40 nm axial resolution achieved by traditional ADMM algorithm [corresponding to red dot pointed by white arrow in (b)]; (e) 40 nm axial resolution achieved by r-ADMM algorithm [corresponding to red dot pointed by white arrow in (c)]; (f) images of microtubules at different depths reconstructed by r-ADMM algorithm

表 1 不同 ρ 值对应的 r-ADMM 算法与传统 ADMM 算法的迭代次数与时间

Table 1 Iterations and time for r-ADMM and traditional ADMM algorithms at different ρ values

Algorithm	Iterations under different ρ values			Time /s
	$\rho=0.3$	$\rho=0.4$	$\rho=0.5$	
Traditional ADMM algorithm	24	19	17	16
r-ADMM algorithm	16	15	13	12
Increase rate of iterative convergence speed /%	33.33	21.05	23.52	25

的变化曲线,其中 r 表示松弛因子 α^k 。当 $r=1$ 时,传统 ADMM 算法等价于 r-ADMM 算法;当 $r \in$

$[1.3, 1.8]$ 时, r-ADMM 算法可提高收敛性,且当 $r=1.5$ 时,收敛速度最快。

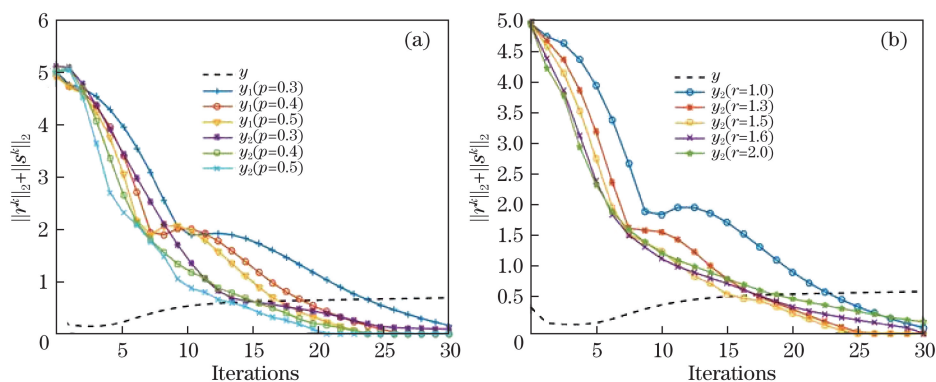


图 5 残差曲线对比图。(a) ADMM 算法与 r -ADMM 算法随迭代次数变化的残差曲线图；
(b) r -ADMM 算法在不同 r 值下随迭代次数变化的残差曲线图

Fig. 5 Comparison chart of residual error curves. (a) Residual error versus iterations for ADMM and r -ADMM algorithms; (b) residual error versus iterations for r -ADMM algorithm with different r values

3.3 细胞动态过程

MA-TIRFM 成像技术的时间分辨率较高,可用于观测活细胞的动态变化过程。线粒体直径一般为 $0.75 \sim 3 \mu\text{m}$,它是广泛参与许多重要细胞过程的动态细胞器。ATTO 647N (ATTO-TEC) 作为线粒体标记,在活细胞成像中具有较高的荧光强度和极好的光稳定性^[23],因此,本课题组采集该染料下活的 U2OS 细胞线粒体结构,观察其动态过程,并进行了三维图像重构。本实验使用 Nikon Eclipse Ti

镜架,其配置的三维电动纳米级载物台具有 PFS 防漂移系统,可保证整个显微系统在拍摄过程中的横向漂移误差在 1 nm 左右,轴向误差在 10 nm 左右,可基本消除外部震动的影响。图 6(a)为几种粒状线粒体荧光背景下的 TIRFM 图像及采用 r -ADMM 算法重构的三维图像。同时,以 100 ms 的曝光时间拍摄 20 张图像进行重构,成功记录了以 2 s 为时间间隔的 10 组图像堆栈的序列,它们可表示活性线粒体融合和裂变的连续过程,如 6(b)所示。

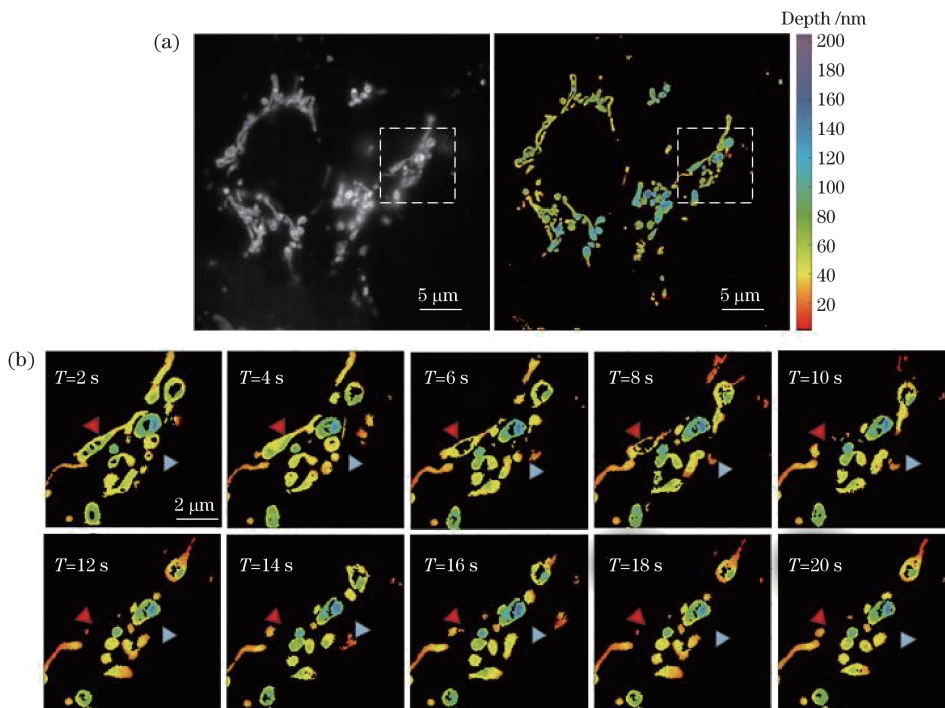


图 6 活性线粒体的动态过程。(a)宽场图像和重构图像;(b)图 (a)虚线框中由 MA-TIRFM 获取的 2 s 时间间隔的图像堆栈的裂变(红色三角形)与融合(蓝色三角形)过程

Fig. 6 Dynamic process of active mitochondria. (a) Wide-field image and reconstructed map; (b) fission (red triangle) and fusion (blue triangle) events in dotted box in Fig. 6 (a) captured by MA-TIRFM image stacks for 2 s time interval

4 结 论

基于 MA-TIRFM 成像技术,通过搭建实验系统获取微管和线粒体在不同入射角度对应的不同穿透深度的图像堆栈,将获得的图像堆栈使用 r-ADMM 算法重构深度信息,可用于表征轴向分辨率,并且以 10 组不同的 TIRFM 入射角度记录的活性线粒体的图像堆栈可表示其融合和裂变的连续过程。实验数据表明,采用 r-ADMM 算法重构三维图像,在保证重构图像质量的同时可实现 40 nm 的轴向分辨率。与传统的 ADMM 算法相比,当松弛因子 $\alpha^k \in [1.3, 1.8]$ 时, r-ADMM 算法迭代过程的收敛速度可提高 20% 以上;当 $\alpha^k = 1.5$ 时,该迭代过程的收敛速度最快。可见,使用 r-ADMM 算法可以进一步促进 MA-TIRFM 技术的发展,使其在实时三维活细胞荧光显微成像领域具有一定的应用价值。

致谢 感谢浙江大学匡翠方课题组在本文搭建实验平台及进行生物样品实验方面提供的支持。

参 考 文 献

- [1] Klar T A, Jakobs S, Dyba M, *et al.* Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 97(15): 8206-8210.
- [2] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. Nature Methods, 2006, 3(10): 793-796.
- [3] Pan L T, Hu F, Zhang X Z, *et al.* Multicolor single-molecule localization super-resolution microscopy[J]. Acta Optica Sinica, 2017, 37(3): 0318010.
潘雷霆, 胡芬, 张心正, 等. 多色单分子定位超分辨显微成像术[J]. 光学学报, 2017, 37(3): 0318010.
- [4] Ströhl F, Kaminski C F. Frontiers in structured illumination microscopy [J]. Optica, 2016, 3(6): 667-677.
- [5] Zhou X, Dan D, Qian J, *et al.* Super-resolution reconstruction theory in structured illumination microscopy[J]. Acta Optica Sinica, 2017, 37(3): 0318001.
周兴, 但旦, 千佳, 等. 结构光照明显微中的超分辨图像重建研究[J]. 光学学报, 2017, 37(3): 0318001.
- [6] Shtengel G, Galbraith J A, Galbraith C G, *et al.* Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(9): 3125-3130.
- [7] Auksorius E, Boruah B R, Dunsby C, *et al.* Stimulated emission depletion microscopy with a supercontinuum source and fluorescence lifetime imaging[J]. Optics Letters, 2008, 33(2): 113-115.
- [8] Gustafsson M G L, Shao L, Carlton P M, *et al.* Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination [J]. Biophysical Journal, 2008, 94(12): 4957-4970.
- [9] Fu Y, Winter P W, Rojas R, *et al.* Axial superresolution via multiangle TIRF microscopy with sequential imaging and photobleaching [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, 113(16): 4368-4373.
- [10] Jin L H, Wu J, Xiu P, *et al.* High-resolution 3D reconstruction of microtubule structures by quantitative multi-angle total internal reflection fluorescence microscopy[J]. Optics Communications, 2017, 395: 16-23.
- [11] Boyd S, Parikh N, Chu E, *et al.* Distributed optimization and statistical learning via the alternating direction method of multipliers[J]. Now Foundations and Trends, 2011, 3(1): 1-122.
- [12] Xu Y Y, Yin W T, Wen Z W, *et al.* An alternating direction algorithm for matrix completion with nonnegative factors[J]. Frontiers of Mathematics in China, 2012, 7(2): 365-384.
- [13] Zheng C, Zhao G Y, Liu W J, *et al.* Three-dimensional super-resolved live cell imaging through polarized multi-angle TIRF[J]. Optics Letters, 2018, 43(7): 1423-1426.
- [14] Chen Y H, Cao R Z, Liu W J, *et al.* Widefield and total internal reflection fluorescent structured illumination microscopy with scanning Galvo mirrors[J]. Journal of Biomedical Optics, 2018, 23(4): 1.
- [15] Santos M C D, Vézy C, Jaffiol R. Membrane-substrate separation distance assessed by normalized total internal reflection fluorescence microscopy [J]. Proceedings of SPIE, 2014, 8949: 89491H.
- [16] Burmeister J S, Truskey G A, Reichert W M. Quantitative analysis of variable-angle total internal reflection fluorescence microscopy (VA-TIRFM) of cell/substrate contacts [J]. Journal of Microscopy, 1994, 173(1): 39-51.
- [17] Cardoso D S M, Déturche R, Vézy C, *et al.* Topography of cells revealed by variable-angle total internal reflection fluorescence microscopy [J]. Biophysical Journal, 2016, 111(6): 1316-1327.
- [18] Beck A, Teboulle M. A fast iterative shrinkage-thresholding algorithm for linear inverse problems [J]. SIAM Journal on Imaging Sciences, 2009, 2(1): 183-202.

- [19] Teixeira A, Ghadimi E, Shames I, *et al.* The ADMM algorithm for distributed quadratic problems: parameter selection and constraint preconditioning[J]. IEEE Transactions on Signal Processing, 2016, 64(2): 290-305.
- [20] Yang J F, Zhang Y. Alternating direction algorithms for l1 problems in compressive sensing[J]. SIAM Journal on Scientific Computing, 2011, 33(1): 250-278.
- [21] Ghadimi E, Teixeira A, Shames I, *et al.* Optimal parameter selection for the alternating direction method of multipliers (ADMM): quadratic problems[J]. IEEE Transactions on Automatic Control, 2015, 60(3): 644-658.
- [22] Goldstein T, O'Donoghue B, Setzer S, *et al.* Fast alternating direction optimization methods[J]. SIAM Journal on Imaging Sciences, 2014, 7(3): 1588-1623.
- [23] Han Y B, Li M H, Qiu F W, *et al.* Cell-permeable organic fluorescent probes for live-cell long-term super-resolution imaging reveal lysosome-mitochondrion interactions[J]. Nature Communications, 2017, 8: 1307.