

## 光学移频超分辨成像技术进展

郝翔<sup>1</sup>, 杨青<sup>1</sup>, 匡翠方<sup>1,2</sup>, 刘旭<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>浙江大学光电科学与工程学院现代光学仪器国家重点实验室, 浙江 杭州 310027;<sup>2</sup>浙江大学宁波研究院, 浙江 宁波 315100

**摘要** 光学显微镜具有无损、样品友好、速度快等优点, 一直是人类探索微观世界的主要手段。但是, 由于受到衍射极限限制, 长期以来, 光学成像系统的分辨率最高仅能达到可见光半波长量级, 逐渐成为科学技术发展的桎梏。对于荧光标记样品, 可以利用荧光超分辨光学显微成像技术打破光学衍射极限, 填补电子显微镜(约为 1 nm)和普通可见光学显微镜(200~250 nm)之间的空缺。然而, 对于大多数样品特别是非荧光标记样品而言, 利用现有技术进行超分辨成像依旧存在相当难度。近年来, 科研人员从合成孔径成像原理出发, 提出了光学移频超分辨成像方法, 开辟了光学超分辨成像的新思路。光学移频超分辨成像不拘泥于荧光非线性效应的限制, 兼具非荧光标记样品以及荧光标记样品的超分辨成像能力, 而且因为其成像速度快、样品普适性高和光毒性低等优点, 在材料学、生物学和医学等领域展现了很好的应用前景。本文从原理和方法上详细综述了移频超分辨光学显微成像技术, 并对未来发展方向进行了评述和展望。

**关键词** 成像系统; 超分辨; 移频; 光场调制

中图分类号 O439

文献标志码 A

doi: 10.3788/AOS202141.0111001

## Optical Super-Resolution Imaging Based on Frequency Shift

Hao Xiang<sup>1</sup>, Yang Qing<sup>1</sup>, Kuang Cuifang<sup>1,2</sup>, Liu Xu<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation, College of Optical Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310027, China;<sup>2</sup>Ningbo Research Institute, Zhejiang University, Ningbo, Zhejiang 315100, China

**Abstract** Optical microscopy is non-invasive, sample-friendly, and fast, rendering itself the major approach for human beings to explore the microcosmic world. However, the diffraction limit has hindered the resolution of all optical imaging systems to approximately half the wavelength of visible light for over a century, until it was fundamentally broken by the development of super-resolution optical fluorescence microscopy. This technology bridges the gap between the electron microscopes (1 nm) and the ordinary optical microscopes (200 nm to 250 nm), but it is essentially useless for most samples, especially those non-fluorescent-labeled. In recent years, inspired by the synthetic aperture imaging, we have developed the optical super-resolution imaging based on frequency shift, providing a new approach to optical super-resolution imaging. As the technique is not limited by the nonlinear effects of fluorescence, it is applicable for both non-fluorescent-labeled and fluorescent-labeled samples. Besides, due to such advantages as fast imaging, high sample universality, and low phototoxicity, the technique shows good prospects in multiple fields, including materials science, biology, and medicine. In this paper, we deliver a detailed overview on both the principles and methods of optical super-resolution imaging based on frequency shift, as well as our prospects to the future development direction of this technique.

**Key words** imaging systems; super-resolution; frequency shift; light field modulation**OCIS codes** 110.1650; 100.6640

收稿日期: 2020-08-24; 修回日期: 2020-09-24; 录用日期: 2020-10-12

**基金项目:** 国家重点研发计划(2018YFA0701400)、国家自然科学基金(61827825, 61735017, 61975188)、中央高校基本科研业务费专项资金(2019QNA5006, 2019XZZX003-06, K20200132)、浙江省重点研发计划项目(2020C01116)、之江实验室(2018EB0ZX01, 2020MC0AE01)、浙大舜宇光学研究中心(2019-01, 2019-02)

\* E-mail: liuxu@zju.edu.cn

## 1 引言

在历史的长河中,利用相应设备对目标样品进行成像一直是人类感知外界并获取信息最为重要的手段。随着技术的发展,人类可利用的波段范围早已扩展至几乎整个电磁波领域,但主要收集并处理可见光区的光学仪器,其地位依旧不可替代。与其他成像仪器相比,光学成像系统因其成像速度快、对样品无损、操作方便、可进行三维(3D)成像以及可实现特异性结构区分等优点,在材料、生物与医学成像等领域具有广泛的应用。然而,由于衍射现象的存在,光学成像系统普遍存在分辨率受限的问题——这一问题在人类观察微观世界时显得尤为突出,并一度成为困扰人类科技进步的桎梏。光学衍射与系统分辨率之间的关系于 1873 年由 Abbe 等<sup>[1-2]</sup>首次确立。在可见光波段,普通光学显微镜的横向和轴向分辨率局限在 200~250 nm 和 500~600 nm 范围内。与此同时,随着物理学、材料学、生物学、医学以及生命科学的飞速发展,人们对显微镜的分辨率提出了更高的要求,如何实现亚百纳米甚至更小的分子水平的观测成了科学家们的迫切需求。因此,探索基于可见光波段、可以突破衍射极限、提高成像分辨率的显微技术成为当务之急。

本质上讲,提升分辨率就是获取样品更多、更细节的信息,而所谓的细节信息往往与频域中具有较大张量的频谱分量相关。根据傅里叶光学可知,系统光学传递函数(OTF)的截止频率直接决定了光学成像系统的分辨率水平。由此也派生出了提升系统分辨率水平的两种主要思路:一种是通过各种方法提高系统的截止频率,扩大系统光学传递函数的覆盖范围。例如,直接提高像方折射率的固态浸没透镜(SIL)<sup>[3]</sup>、使用双对置镜头架构增大系统数值孔径的 4Pi 显微成像技术<sup>[4]</sup>等。这些传统的方法由于材料学的限制,往往对分辨率的提升较为有限。相对而言,直接压缩系统有效点扩展函数(PSF)的方法则有效得多,其代表性技术包括受激辐射光淬灭显微成像技术(STED)<sup>[5-6]</sup>和单分子定位显微成像技术(SMLM)<sup>[7]</sup>。上述两种技术依赖于荧光染料分子对于照明光的非线性响应,可以在理论上无限制地压缩系统有效点扩展函数以获取更高的分辨率。其主要技术发明人:Betzig、Hell 和 Moerner 更是由于相关技术对于生物和医学研究的巨大推动作用而分享了 2014 年度的诺贝尔化学奖<sup>[8]</sup>。

提升系统分辨率水平的第二种思路则是光学移

频超分辨成像技术。受到合成孔径技术的启发,光学移频超分辨成像技术的核心思路是通过一些调制技术将传统光学显微镜无法获取到的样品高频分量移动到系统的低通频带范围内,随后通过频谱解调,实现实际频谱接收范围的有效扩展。相比于第一种思路,光学移频超分辨成像技术一般具有以下优点:

1) 对样品制备要求较低,无需荧光标记,因此样品普适性更高;

2) 所需照明光强较低,因此对样品的光漂白和光损失更小,更适用于长时程成像;

3) 可应用于宽场成像的场合,成像速度快,因此更适用于快速活细胞成像。

本文后续将对光学移频超分辨成像技术的相关内容进行了详细阐述。本文在内容上共分为 5 节。其中,第二节论述光学移频超分辨成像技术的机理,重点介绍高频信息产生机制、移频和重构的原理。第三节将论述传导(播)场移频成像技术,主要包括合成孔径显微镜、结构光显微镜为代表的、照明光为传播场的移频成像技术,特别是提出了移频成像既可以在照明端加载,也可以在探测端加载的思路,进一步开拓了在传播场移频成像的实现途径。第四节是重点,提出了采用倏逝场实现宽场移频成像方法,论述了波导型倏逝场移频、表面等离子激元(SPP)移频等各种超高频移频成像技术。重点探讨了传统光学移频超分辨成像技术在分辨率提升能力上的瓶颈,并针对性地提出打破上述瓶颈的有效方法。最后,本文对移频成像的发展方向做了总结与展望。

## 2 原理

### 2.1 移频提高分辨率的基本原理

由上节分析可知,获取高频频谱分量即可实现超分辨显微成像。虽然对于非线性系统可以采用诸如缩小点扩展函数(即频域扩展)的方式实现频域通带扩展,如图 1(a)所示。但对于绝大部分线性系统而言,由于衍射极限是光的固有属性,因此直接对频域进行扩展是非常困难的。这意味着,通过点扩展函数压缩扩展频域空间的方法对于此类系统存在明显的局限性。为了解决上述矛盾,对于频域通带范围表示为 $\{\mathbf{K}'_{\parallel} \mid \|\mathbf{K}'_{\parallel}\| \leq k_c\}$ 的线性系统,如果能采用一定的技术手段,使得系统通带能够在频域空间内实现平移,则平移后的系统通带 $\{\mathbf{K}''_{\parallel}\}$ 可以表示为<sup>[9]</sup>

$$\mathbf{K}''_{\parallel} = \mathbf{K}'_{\parallel} + \mathbf{K}_{\text{III}}, \quad (1)$$

式中: $\mathbf{K}_{\text{III}}$ 为移频矢量。图 1(b)表示了整个移频过程。值得注意的是,根据矢量合成法则,在与 $\mathbf{K}_{\text{III}}$ 一

致的方向上,系统最大截止频率为

$$k''_c = k'_c + \|\mathbf{K}_{in}\| > k'_c. \quad (2)$$

很显然,利用移频可以使系统接纳更高的频谱分量。但是,需要进一步指出的是:频域通带搬移具有方向性,在一个方向上频谱分量接收能力的增强

意味着在与之相反的方向上接收能力的减弱。因此,为了使整个频谱空间内各方向获得相同的截止频率,保证系统在整个二维空间内的分辨能力相同,系统频域通带往往需要经过多次搬移并最后加以合成,即所谓的“合成孔径”<sup>[11]</sup>[图 1(b)]。

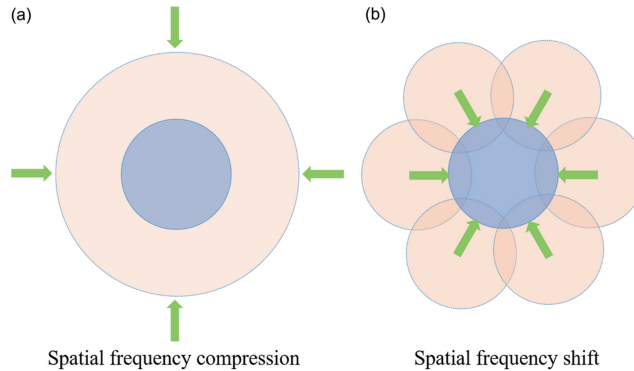


图 1 提升分辨率的两种基本思路<sup>[10]</sup>。(a)频域压缩;(b)移频<sup>[11]</sup>

Fig. 1 Two basic mechanisms for improving resolution<sup>[10]</sup>. (a) Frequency compression; (b) frequency shift<sup>[11]</sup>

## 2.2 光学移频超分辨成像技术的分类

光学移频超分辨成像技术在理论上可以有多种实现方式和相应的分类方法。例如,按照成像时对样品面的照面范围来划分,可以分为宽场和扫描式光学移频超分辨成像技术;类似地,按照移频作用的位置来划分,则可以分为照明和探测移频超分辨成像技术。本文根据移频后光波矢的性质,将整个技术领域划分为传导场移频超分辨成像技术和倏逝场移频超分辨成像技术两类。这种划分原则不仅更贴近已有的理论框架,还大致反映了整个技术在时间上的演进趋势。

对于波长为  $\lambda$  的光场,其在样品空间的波数可以表示为

$$\|\mathbf{K}_0\| = \frac{2n\pi}{\lambda}, \quad (3)$$

式中: $n$  为光学系统物方折射率。进一步可以定义

$$\mathbf{K}_0 \triangleq \mathbf{K}_{in} + \mathbf{K}_z = \|\mathbf{K}_{in}\| \hat{\mathbf{e}}_{||} + \|\mathbf{K}_z\| \hat{\mathbf{e}}_z, \quad (4)$$

式中: $\hat{\mathbf{e}}_{||}$  和  $\hat{\mathbf{e}}_z$  分别为该光场在焦平面和能量传播方向上的单位矢量。如果  $\|\mathbf{K}_{in}\| > \|\mathbf{K}_0\|$ , 则相应的  $\|\mathbf{K}_z\|$  为虚数,该光场无法传播到远场;反之,如果  $\|\mathbf{K}_{in}\| < \|\mathbf{K}_0\|$ , 则相应的  $\|\mathbf{K}_z\|$  为实数,该光场可以传播到远场。

因此,当使用上述定义描述移频光场时,如果光场参与移频的分量  $\|\mathbf{K}_{in}\| < \|\mathbf{K}_0\|$ , 则该类技术属于传导(播)场移频超分辨成像技术。特别地,当  $\|\mathbf{K}_{in}\| \leq k_c < \|\mathbf{K}_0\|$  时,承载移频的光场分量同样也

可以由原有成像系统经由远场产生(或接收),因此可以认为整个系统都工作在传导(播)场。许多经典的相关技术,如合成孔径技术、结构光照明显微成像(SIM)技术等,均可以纳入上述范畴。由于参与移频的光场波数分量大小有限,分辨率的提高不会超过原有成像系统分辨率的 2 倍。

与之相对应,如果  $\|\mathbf{K}_{in}\| > \|\mathbf{K}_0\|$ , 则相应的技术属于倏逝场移频超分辨成像技术。利用倏逝场照明的移频成像可以看作是利用光波的近场效应进行照明,而成像的信号是被样品空间频率调制移频后的传播场光,因此是远场成像。由于  $\|\mathbf{K}_{in}\|$  的大小不再受到照明光波长的限制,可以实现分辨率大小在理论上是无限的。当然这种分辨率的无限仅仅是指空间上的,实际上它还受限于倏逝场的强度。在后文中详细加以阐述。

## 3 传导场移频超分辨成像技术

### 3.1 合成孔径显微成像技术

实现光学移频超分辨成像的经典方法是利用合成孔径显微(SAM)技术<sup>[12-14]</sup>。起初,相关技术自 20 世纪 50 年代起被广泛应用于天文望远成像中<sup>[15-16]</sup>,在当时,科学家们将多个天文望远镜收集到的信号进行相干混叠,得到的图像分辨率可以大大提升。受到这一思路的启发,Turpin 等<sup>[17]</sup>于 1995 年首次提出将合成孔径应用到显微成像中,从而实现了显微镜孔径(通频带)的扩展。

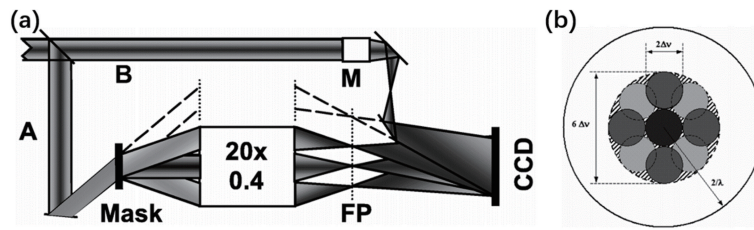


图 2 SAM 成像原理。(a) SAM 系统装置示意图<sup>[12]</sup>; (b) 合成频谱图<sup>[18]</sup>

Fig. 2 Imaging principle of SAM. (a) Schematic of SAM system<sup>[12]</sup>; (b) synthetic spectrum<sup>[18]</sup>

为了获得物体频谱的振幅与相位分布, SAM 通常采用干涉的方法进行全息成像。如图 2(a) 所示, 照明光被分为两束, A 光束倾斜照明样品, 使物体信息在频域产生平移并由物镜接收, 进而到达相机 CCD 所在的像面。总移频矢量大小为  $\|\mathbf{K}_{\text{til}}\| = 2n\pi\sin\alpha/\lambda$ 。其中  $\alpha$  为照明光束相对系统光轴的倾角。B 光束作为参考光束, 并以一定倾角直接入射到探测器面上, 与样品光发生干涉形成离轴全息图像并由探测器记录其强度分布。而后基于全息原理即可使用傅里叶变换对频域内的高频分量进行恢复 [图 2(b)], 从而提升系统的分辨率。

在孔径合成过程中, SAM 通常需要通过干涉求得物体频谱的复振幅分布, 在一定程度上增加了系统复杂度。一种同样应用合成孔径概念的方法——傅里叶层叠成像技术 (FP) 则可以在只测得物体强度分布的情况下实现频带扩展。该方法最早于 1969 年由 Hoppe<sup>[19]</sup> 提出, 并在电子显微成像

中应用, 直到 2013 年, 这一概念才由 Zheng 等<sup>[20]</sup> 应用于光学显微成像中。FP 的提出源自于层叠成像技术<sup>[21-24]</sup>, 后者通过照明光斑连续扫描样品, 每次记录样品散射的衍射图像, 利用拍摄的这些图像恢复样品的相位分布。“ptycho”一词来源于希腊语, 意为“重叠”, 因此 Ptychography 算法的特点之一即要求照明光在样品上进行相邻两次扫描时需有部分区域重叠 (通常为 60%)<sup>[25]</sup>, 照明扫描过程引入较高的数据冗余后, 可以显著改善算法的收敛特性。

傅里叶频谱折叠显微成像技术 (FPM) 实际上就是一种频谱域中将子孔径频谱不断循环区域迭代的计算方法, 其具体计算步骤如图 3 所示。上述步骤实际上是假设拍摄图像之间存在相干关系, 但在实际应用中并没有严格的相干限制, 当使用非相干光源照明样品时一样成立, 而且由于不存在相干噪声, 效果比激光照明更好。

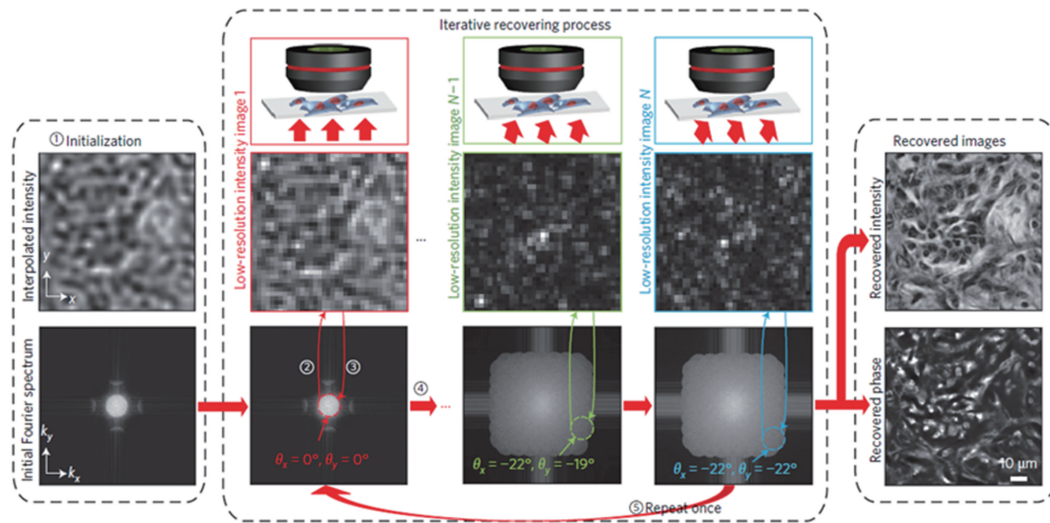


图 3 FPM 流程图<sup>[20]</sup>

Fig. 3 Flow chart of FPM<sup>[20]</sup>

### 3.2 结构光照明显微成像技术

当使用非相干成像时, 采用非均匀照明对样品进行调制也可以实现光学移频超分辨率成像, 实现这种思

路的典型技术是 SIM 技术, 由 Gustafsson<sup>[26]</sup> 于 2000 年实现, 如图 4 所示。与 SAM 不同, SIM 直接将空间频率为  $p$  (即  $\|\mathbf{K}_{\text{til}}\| = p$ ) 的正弦光栅状照明图像投射

到样品上, 荧光样品被激发后发出荧光, 其分布受到了条纹的调制, 即得到的荧光辐射强度分布是样品与照明条纹的乘积。由此得到的图像在频域上表现为

三个频谱带: 由宽场成像对应的低频频带, 以及由照明条纹调制引入的两个物体高频频带。为了分离这三个频带, 需要进一步使用三步移相法加以解析<sup>[26]</sup>。

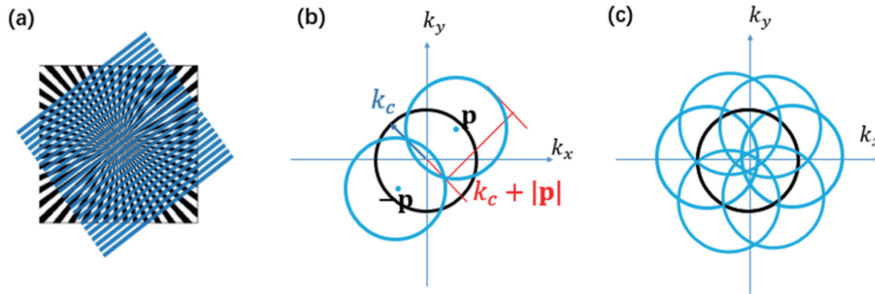


图 4 SIM 成像机理。(a) 正弦结构光条纹照明样品产生莫尔条纹;  
 (b) 通频带在某一方向上的扩展; (c) 通频带在二维方向上的扩展

Fig. 4 Imaging principle of SIM. (a) Moire fringe effect of illuminating the sample with the sinusoidal structured pattern;  
 (b) expansion of passband in one direction; (c) expansion of passband in two-dimensional orientation

在传统 SIM<sup>[27-29]</sup> 中, 通常需要精确求解照明条纹的参数(如频率和相位), 如果求解过程存在微小的误差, 则重构结果将产生伪像从而影响成像质量。因此, 人们提出了非正弦条纹照明方法, 包括盲 SIM (Blind-SIM)<sup>[30-32]</sup>、条纹照明的傅里叶层叠显微技术(piFPM)<sup>[33]</sup>等。通过迭代的方法, 在重构样品的同时, 也恢复照明的光斑,

数在光轴方向的焦深, 从而实现较好的层切效果, 克服结构光照明显微成像技术无法进行厚样品成像的缺陷。

除传统的宽场显微模式外, 利用结构光照明实现光学移频超分辨成像的方法也可以工作于扫描模式, 特别是共聚焦显微成像系统中。这类技术一般是以共聚焦系统为基础, 利用不同的方法得到一组类似于结构光照明显微成像技术的原始数据, 再用 SIM 算法解调出高频信息。相比于宽场成像, 共聚焦系统可以通过小孔限制点扩展函

Lu 等<sup>[34]</sup> 于 2009 年首次提出了扫描图案照明显微技术 (SPIN), 通过调制入射激发光的峰值强度以及宽场探测器的时间累积成像来合成有效的结构照明场。SPIN 的系统装置如图 5(a) 所示, 激光器发出的激发光被调制成随时间在  $[0, 1]$  区间变化的函数  $I_{ex} = 1/2(1 + \cos\omega t)$ , 其中  $\omega$  为时间调制频率。随着扫描的进行, CCD 相机在时间累加下能够生成一张类似于结构光照明的成像结果。因此只要改变激发光的时间调制函数, 就能产生沿同一方向不同相位的一组图像, 然后再改变振镜的扫描方向, 就能实现各项同性的分辨率增强。

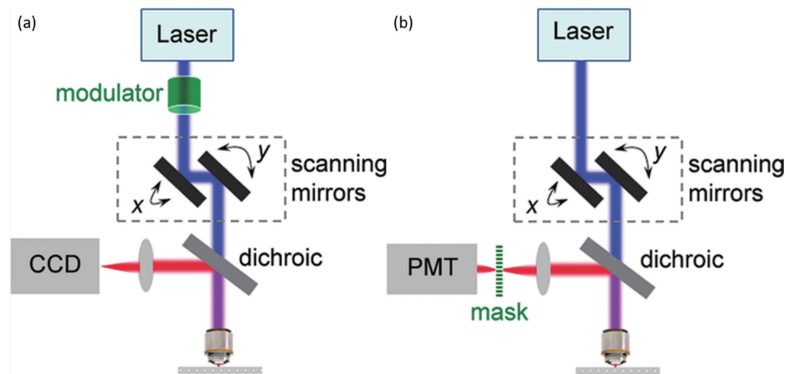


图 5 SPIN 与 SPADE 系统比较<sup>[34]</sup>。(a) SPIN 系统装置示意图; (b) SPADE 系统装置示意图

Fig. 5 Comparison between SPIN and SPADE system<sup>[34]</sup>. (a) Schematic of SPIN system; (b) schematic of SPADE system

值得注意的是, 常规的 SIM 由于照明光斑受到衍射极限的限制, 系统可通过的最大光斑频率仍为系统的截止频率, 故前面介绍的经典 SIM 技术只能

最多实现两倍于传统宽场显微镜分辨率的提升。为了实现更高分辨率的提升, 利用荧光样品本身的非线性效应是一个非常直接的思路, 特别是饱和效应

和光开关效应。这种利用荧光非线性效应的结构照明技术可统称为非线性 SIM (NL-SIM)。具体而言,其中利用荧光饱和效应的方法称为饱和 SIM

(SSIM,如图 6 所示)<sup>[35-36]</sup>;利用荧光光开关效应的方法主要是饱和去激活 NL-SIM (SD NL-SIM)<sup>[37-38]</sup>。

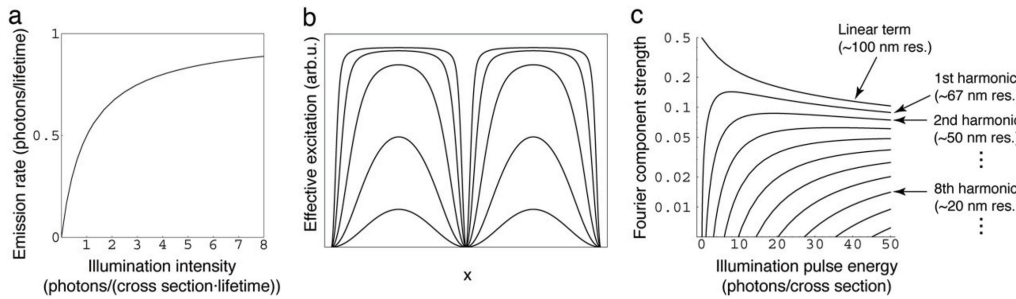


图 6 SSIM 原理<sup>[36]</sup>。(a) 荧光辐射率与照明光强之间的非线性关系;(b) 有效辐射条纹强度分布;(c) 有效辐射条纹的频谱分布

Fig. 6 Principle of SSIM<sup>[36]</sup>. (a) Nonlinear relationship between fluorescent emission rate and illumination intensity; (b) intensity distribution of effective emission pattern; (c) spectrum distribution of effective emission pattern

与宽场 SIM 类似,扫描模式下也可以利用荧光非线性效应。Zhao 等<sup>[39]</sup>提出非线性焦斑调制显微技术(NFOMM),通过高强度照明带来的荧光激发非线性效应来扩展系统的有效空间频率带宽,再采用空间光调制器在激发光路进行相位调制产生 PSF 空间频率的重新分配,从而保留来自物体的高频分量。样品的高频信息在一个或多个激发光斑的相位调制下被移回系统的频率通带后,就可以利用多视图反卷积算法进行后处理,以重建超分辨对象。其基本原理如图 7(a)所示,经过相位延迟和偏振调制的激发光波前被物镜聚焦在样本平面产生不同图案

的照明光斑。在普通的点扫描显微镜中样品发射的荧光是高斯型点扩展函数[图 7(b)左列],中列和右列分别为非线性焦斑调制显微技术使用的另外两种常用的照明图案,其是通过对应的相位掩模调制入射光束的相位而得到的。当增加激发光的功率时,由于荧光的非线性效应,从三种照明图案对应的光学传递函数就可以看出,饱和甜甜圈发射(SDE)模式具有多于饱和高斯发射(GE)模式的高频分量,而 y 方向饱和线形发射(SLE)模式涵盖了更多沿 x 方向的高频分量。图 7(c)给出了沿 x 方向的光学传递函数归一化轮廓曲线,可以直观地比较三种不同

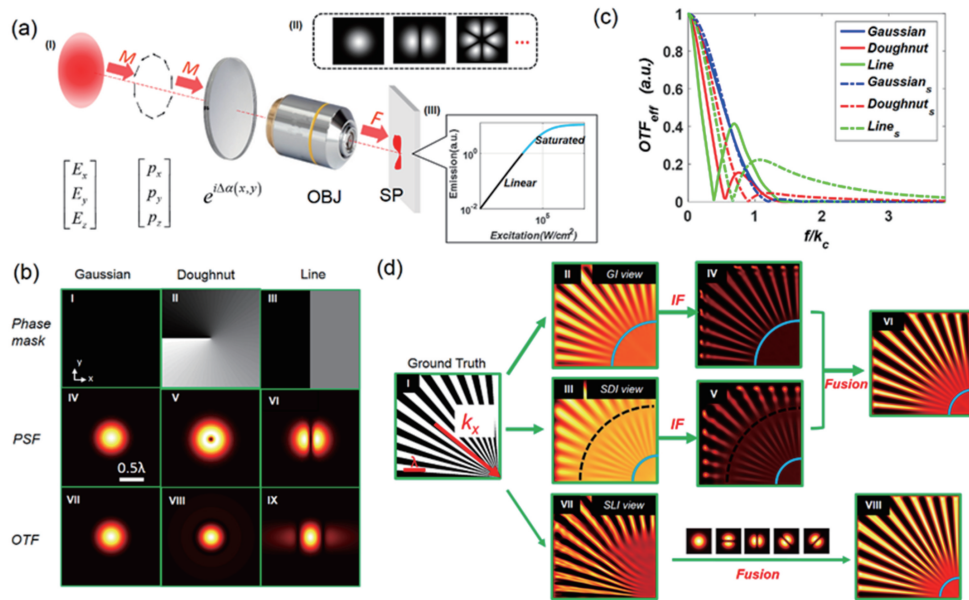


图 7 NFOMM 工作原理<sup>[39]</sup>。(a) 系统原理图;(b) 位相编解码及对应的系统有效点扩展函数与光学传递函数;(c) 受调制的各焦斑归一化光强分布曲线;(d) 仿真成像结果

Fig. 7 Working principle of NFOMM<sup>[39]</sup>. (a) System schematic; (b) phase coding and corresponding system effective PSFs and OTFs; (c) normalized intensity profiles of modulated foci; (d) simulated imaging results

照明光斑的性能。当照明强度增加到  $100 \text{ kW/cm}^2$  时,由于荧光饱和而产生的非线性效应扩展了三种发射模式的有效光学传递函数,高频分量明显增加。值得注意的是,SDE 和 SLE 模式虽然携带更多的高频信息,但是其中频区域存在着一个凹陷,因此为了弥补其频率缺失,采用 Richardson-Lucy 反卷积演变而成的多视图反卷积迭代模型,公式为

$$s^{k+1} = s^k \times \sum_{i=1}^N F^{-1} \left\{ \frac{F(I_i)}{F(s^k) \otimes \tilde{h}_{\text{eff}}^i} \times \tilde{h}_{\text{eff}}^i \right\}, \quad (5)$$

式中: $\tilde{h}_{\text{eff}}^i$  为第  $i$  个光学传递函数; $I_i$  为对应的第  $i$  张采集的图; $*$  为共轭算子; $s^k$  为经过  $k$  次迭代后样本的估计值。开始第一次迭代前的估计值  $s^1$  一般选择原始图像  $I$  本身。由于迭代是收敛的,可以设定当迭代前后样本的估计值变化小于某个值时终止迭代,当然也可以提前设置合适的迭代次数。NFOMM 将 SDE/SLE 模式与 GE 模式代入多视图反卷积迭代模型,就能将高频信息提取出来,同时弥

补了缺频现象,从而重建出超分辨图像,如图 7(d) 所示。

类似的方法还包括 Cao 等<sup>[40]</sup>提出的多焦点饱和和虚拟调制技术,利用荧光饱和激发的非线性效应以及多焦斑照明技术分别提高了空间分辨率和时间分辨率。如图 8(a)所示,周期性多个焦斑用以提高生成 SIM 数据的速度,星号表示物体的位置,箭头表示图案的扫描路径。当荧光团的激发强度达到最大值时,其发射强度将达到最大值,因此可以使用此先验知识来估计照明的各个焦斑的初始位置,进而重排成与单焦斑 SIM 成像相同的数据集。值得注意的是,两个相邻焦斑之间的间隔最好大于激发和探测点扩展函数的直径之和,以确保它们不会相互干扰。然后,再采用傅里叶叠层成像恢复算法对如图 8(b)所示的两种虚拟调制方法(虚拟时间调制和虚拟空间调制)生成的 SIM 数据集进行移频重建,提取出超过线性超分辨的高频信息。

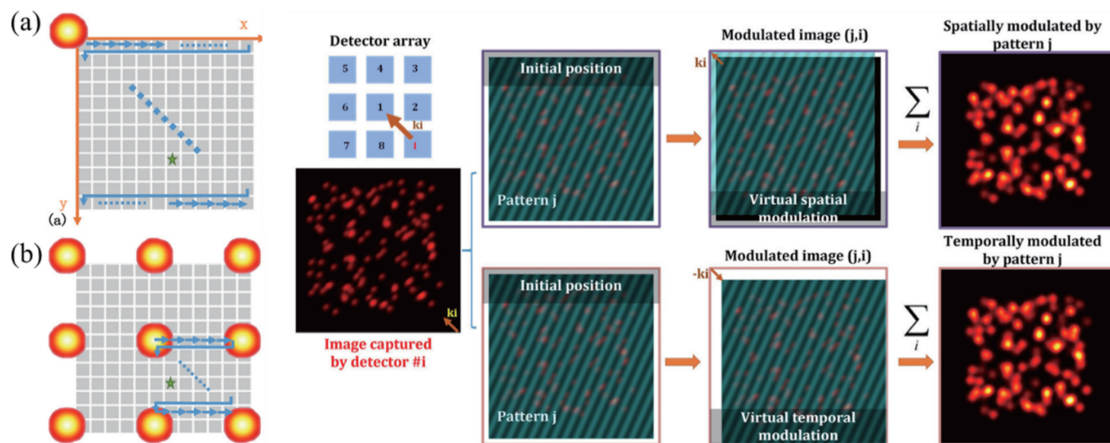


图 8 多焦点饱和和虚拟调制技术原理图<sup>[40]</sup>。(a)扫描过程;(b)多焦斑探测系统;(c)虚拟调制过程

Fig. 8 Principle of multi-focus saturated virtual modulation<sup>[40]</sup>. (a) Scanning process;

(b) multi-spot complex detection system; (c) procedure for virtual modulation

### 3.3 探测器端移频超分辨成像技术

由于共聚焦系统中有效点扩展函数可以表示为照明点扩展函数与探测点扩展函数的乘积,因此,在利用 SPIN 实现扫描型光学移频超分辨成像的基础上,可以将对于照明光斑的调制转移到探测端实现类似的效果。正是基于这一思路,Lu 等<sup>[34]</sup>在 2009 年同样实现了扫描图案探测显微技术(SPADE),其利用探测端的掩模和单点探测器的空间累积成像来实现系统的空间频移。与 SPIN 不同[图 5(a)],SPADE[图 5(b)]是将激发光的峰值强度保持恒定,通过在单点探测器前插入一块透射率为  $m(x) = 1/2(1 + \cos\omega_s x)$  的掩模来进行调制,其中

$\omega_s$  为空间调制频率。光电倍增管(PMT)将所有通过掩模的信号求和并将积分强度分配给当前二维振镜扫描位置对应的单个像素,这样在扫描整个视场后同样可以重构出一幅类似于 SIM 的图像。为了提取位于显微系统通带外的频率分量,SPADE 同样需要移动和旋转掩模  $m(x)$  以生成不同方向和相位的一系列图像,然后使用常规的 SIM 移频算法恢复出超分辨图像。

调制光强虽然可以提高系统分辨率,但也会导致光通量的降低,严重影响系统的信噪比。并行探测技术利用多个探测器取代原有系统中的单点探测模式,可以很好地解决上述问题。从频域的角度来

说,并行探测技术通过小针孔和阵列探测器中的离轴像素或子探测器来拓宽系统的频率带宽,再利用后处理算法将高频信息恢复。并行探测技术最早是由 Sheppard<sup>[41]</sup> 提出并被 Müller 等<sup>[42]</sup> 利用电子倍增电荷耦合器件(EMCCD)阵列探测器实验实现,是当前应用最为广泛的一种点扫描移频超分辨成像技术, Airyscan<sup>[43]</sup>、图像扫描显微成像技术(ISM)<sup>[41]</sup>、光学光子重排显微成像技术(OPRA)<sup>[44]</sup> 等都属于该类方法。

并行探测技术的主要问题在于图像往往需要相对复杂的后处理过程。在物理上,由于不同探测器不可能同时占据完全相同的空间位置,因此并行探

测中由各单点探测器所收集的信号不能简单相加。由于照明光点扩展函数和探测光点扩展函数是错位的,因此最终生成的系统有效点扩展函数也表现为离轴的形式(图 9),在数学上表示为

$$h_{\text{eff}}(\mathbf{r}) = h_{\text{exc}}(\mathbf{r}) \cdot [h_{\text{emi}}(\mathbf{r}) \cdot P(\mathbf{r} - \mathbf{v}_d)], \quad (6)$$

式中: $\mathbf{v}_d$  表示像素偏离光轴的距离矢量。需要注意的是:随着 $\mathbf{v}_d$  的增大,系统有效点扩展函数的峰值会不断降低,但是半峰全宽会减小,即分辨率更高。但是,重组的图像相对于中心点而言会有一定的偏移,通常表示为 $|\mathbf{v}_d|/(1+\beta)$ ,其中 $\beta$  是荧光激发和发射波长之比。在不考虑斯托克斯位移的前提下,可以简单令 $\beta=1$ 。

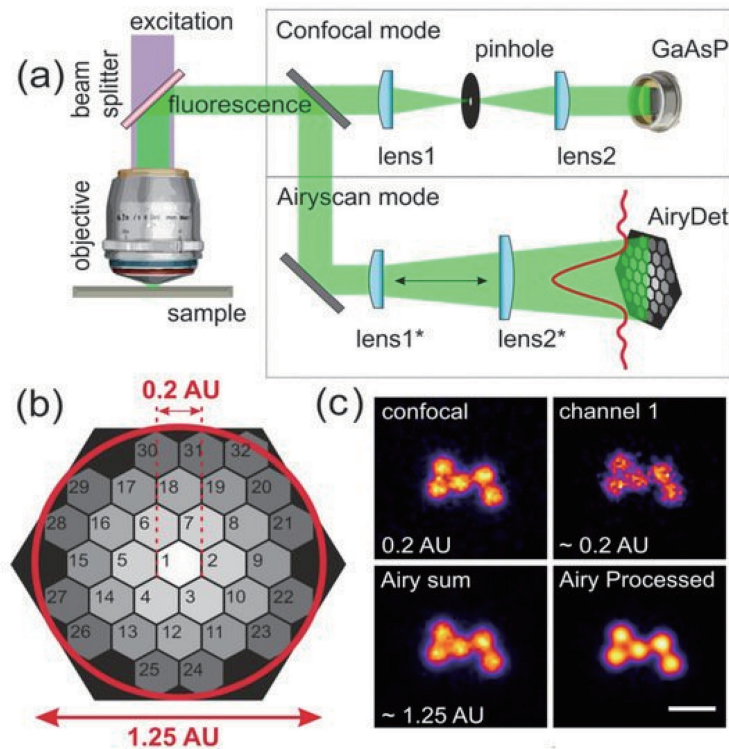


图 9 并行探测系统示意图<sup>[45]</sup>。(a)共聚焦(上)与并行探测(下)系统比较图;  
(b)并行探测模块中各探测器的位置分布;(c)由并行探测系统获取的代表性图像

Fig. 9 Schematic of parallel detection system<sup>[45]</sup>. (a) Scheme comparison between confocal (top) and parallel detection (bottom) detection paths; (b) position distribution of each detector in parallel detection module; (c) representative images obtained by parallel detection system

由于荧光的激发和发射谱均为宽谱,且易受环境因素的影响,因此可能存在对于 $\beta$  估值不准造成的图像质量恶化问题。针对该问题,刘旭课题组<sup>[46-47]</sup> 提出了一种新的移频算法来重建阵列探测器采集的图像。这种方法无需事先了解探测器阵列的分布,而是通过将各子探测器采集的图像相位信息转化到傅里叶域,代替原始的并行探测概念中那样重新分配像素,每个傅里叶图像的相位都移动一个

与像素位置相对应的值。这样就可以将像素重组过程以更灵活的方式完成。其允许虚拟像素重新分配移位像素大小为非整数,从而获得更好的成像结果。此外,Zhu 等<sup>[48]</sup> 还研究了 4 种不同的基于并行探测的显微镜分辨率增强方法,对其分辨率、成像速度和信噪比进行了分析和比较。

基于虚拟结构探测(VSD)的超分辨扫描激光显微技术<sup>[49]</sup> 是一种通过对图像进行数字处理来实现



时空调制的探测端虚拟移频成像技术,因此不需要使用复杂的装置(如光栅、数学微镜元件或声光调制器)对照明光路中的激光强度进行调制,也不需要像 SPADE 在探测光路中使用物理掩模,从而大大简化了系统的复杂度。而且 VSD 采用数字方式进行虚拟调制,不会因相位变化不够精确而产生调制伪像<sup>[50]</sup>。此外,在 SPIN 和 SPADE 中,由于调制图案和物理掩模不允许存在负值,需要加上一个直流分量,而这个直流分量要远大于能将样品频率移回系统带宽的有效谐波分量,否则在实验中可能导致被系统 OTF 衰减的谐波分量淹没在噪声中,从而影响图像高频信息的恢复。而数字掩模可以取任意值,故采用没有直流分量的正弦波作为调制图案。为了改进 VSD 有限的成像速度,该课题组还将其与线扫描显微技术相结合,对于  $400 \text{ pixel} \times 400 \text{ pixel}$  的超分辨率图像,能够将成像时间由原先的 160 s 缩

减至 3 s 左右<sup>[51]</sup>。

由浙江大学 Kuang 等<sup>[52]</sup>提出的虚拟  $k$  空间调制光学显微技术(VIKMOM)同样是通过探测端的数字图像进行虚拟调制以获得高频信息,但是其在将探测器阵列采集到的图像转换为 SIM 数据后,采用改进的傅里叶叠层成像算法而非传统的 SIM 移频算法来恢复超分辨率图像,因此对噪声不敏感,还能校正未知光学像差。其成像过程(图 10)类似于 VSD,使用带有二维探测器阵列的共聚焦显微镜进行图像采集,对于每个扫描位置,将激发光斑投影到样品上,并将记录在探测器阵列上的相应图像与数字掩模相乘来进行虚拟调制。当扫描样品的不同位置时,可以获得一系列强度图像,再将每张图像的信号求和并将积分强度分配给该位置的像素。同时改变虚拟数字掩模的参数以获得不同方向和相位的调制图像,最后构成一组 SIM 数据。

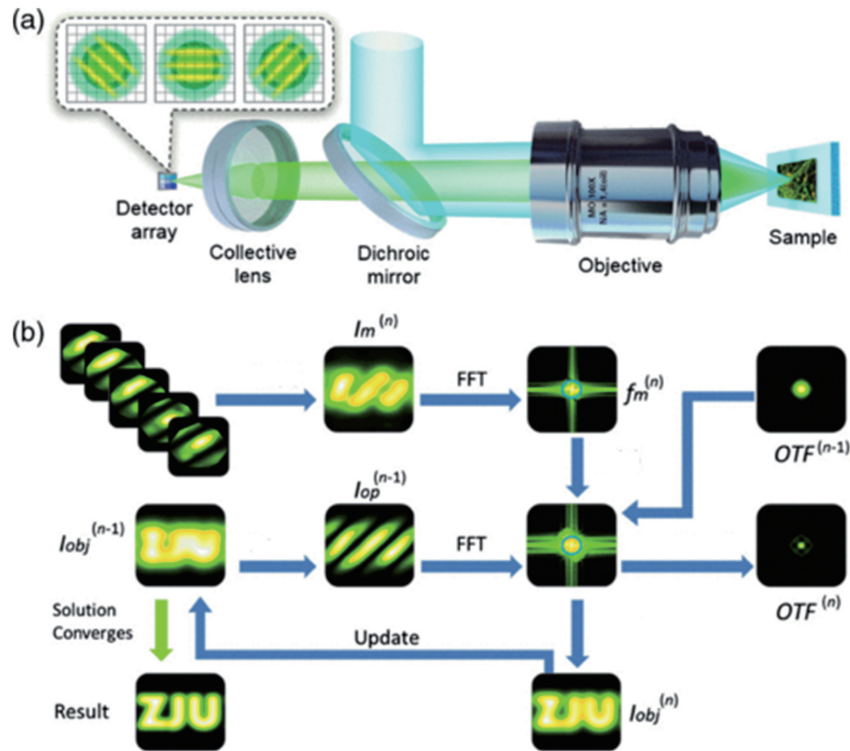


图 10 VIKMOM 示意图及其用于超分辨率图像恢复的解码过程<sup>[52]</sup>。(a)成像系统原理;  
(b)用于超分辨率图像恢复的解码程序流程图

Fig. 10 Schematic of VIKMOM and its decoding procedure for super-resolution image recovery<sup>[52]</sup>.  
(a) Principle of imaging system; (b) decoding procedure for super-resolution image recovery

VIKMOM 中超分辨率图像的恢复过程则以迭代方式在傅里叶域和空间域之间切换,如图 6(b)所示,使用  $I_{\text{obj}}^{(0)}(r)$  和  $\text{OTF}^{(0)}(k)$  分别代表样本空间信息和激发光路中光学传递函数的初始估计,在所有的调制图像被用于更新样品空间信息之后,重复

整个过程直到收敛为止,就能获得不受噪声和像差影响的超分辨率图像。

#### 4 倏逝场光学移频超分辨成像技术

由(2)式可知,横向波矢越大,移频量就越多,可

被远场探测到的空间频率就越高,对应的成像分辨率也会越高。经典的光学移频超分辨成像技术使用传导场,即根据(4)式,要求  $\|K_z\|$  为实数。因此,对应的截止频率上限受到了限制。为了提高系统分辨率,需要更大的  $\|K_{in}\|$ ,最终  $\|K_z\|$  会成为虚数,整个移频场因此成为倏逝场。

#### 4.1 基于倏逝场直接照明的光学移频超分辨成像技术

2013年,浙江大学刘旭课题组将通有激光的一维纳米光纤置于样品表面,如图 11(a)所示<sup>[53]</sup>。根据波导理论,纳米光纤在导光的同时,周围会环绕一

层倏逝波。样品在倏逝波的照明下,发生空间移频,散射光携带超衍射高频空间信息被远场显微物镜接收。图 11(b)显示了利用光纤表面倏逝波对双道微纳结构进行成像的实验结果(结构的中心间距为 225 nm)。这种方法无需对样品进行标记,适用样品类型广泛,成像波长可通过改变外界耦合激光光源的波长来调整。然而,纳米光纤的一维结构决定了这种方法只对一维成像较有优势,在进行二维成像时必须改变光纤的走向来调整照明方向,这种扫描方式可能对样品造成移位与破坏,而且径向上的成像视场被微纳光纤的直径限制在了微米量级。

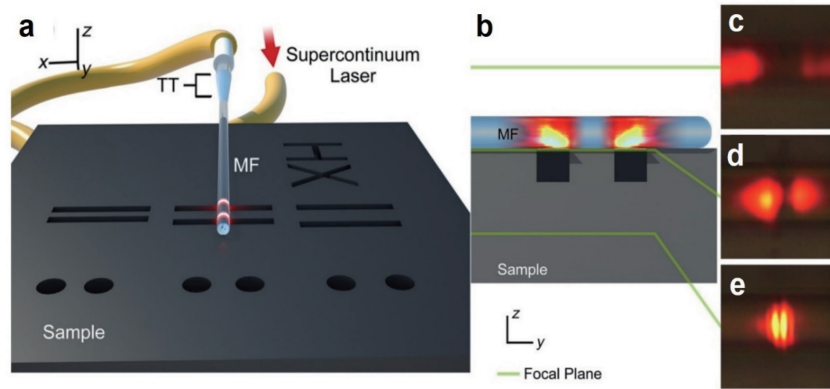


图 11 微纳光纤波导表面倏逝波照明超分辨显微成像<sup>[53]</sup>。(a)实验结构的三维示意图;

(b)微纳光纤、样品与显微物镜聚焦面的相对位置;(c)~(e)显微物镜聚焦在不同位置时获得的远场成像

Fig. 11 Scheme of microfiber based super-resolution imaging system<sup>[53]</sup>. (a) 3D structure of experimental system; (b) relative positions of microfiber, sample, and focal plane of objective lens; (c)–(e) far-field imaging obtained when the microscope objective lens is focused on different positions

同年,刘旭课题组使用棱镜(包括直角棱镜与道威棱镜)的全内反射界面实现了表面倏逝波照明<sup>[54]</sup>,如图 12 所示。该设计在发生全内反射的光束覆盖范围内均可实现倏逝波照明,相比于基于一维微纳光纤的倏逝波照明的设计,大大提高了成像视场。然而,这种基于棱镜的设计难以方便地改变照明方向,无法满足二维移频成像的需求。另一方面,倏逝波的横向波矢受限于全反射角,而且背景噪声难以过滤,所以只实现了  $\lambda/2.5$  的分辨率。

2017年,针对全内反射所形成的倏逝场光波矢受限的问题,刘旭课题组进一步改进了设计,首次使用纳米线配合高折射率薄膜的方法<sup>[55]</sup>,在扩大视场的同时,提高了图像对比度,实现了 122 nm 的横向分辨率。

上述方法虽然验证了倏逝场实现光学移频超分辨成像的基本原理,但是均存在难以调整倏逝场方向,进而较难实现全向超分辨的问题。针对上述难题,2017年,刘旭课题组提出了一种采用倏逝波进

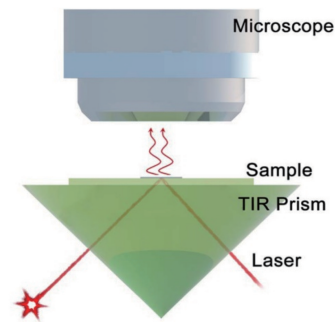


图 12 倏逝波移频超分辨显微方法装置图<sup>[54]</sup>

Fig. 12 Schematic of evanescent wave induced frequency shift for super-resolution microscopy<sup>[54]</sup>

行照明实现大频带移频的超分辨显微方法,称为环形纳米线照明显微镜(NWRIM)<sup>[56]</sup>。NWRIM采用纳米线作为光源,其在激光的泵浦下发光,并在衬底上镀高折射率的膜层结构(如镀在  $\text{SiO}_2$  上的  $\text{TiO}_2$  薄膜),放置其上的纳米线所发出的光将在接触位点上产生倏逝波,并耦合到高折射率膜中进行长程传播[图 13(a)]。利用这种  $\text{TiO}_2$  高折射率薄膜材料

可以激发出的倏逝波波数约为自由空间中光波数的 2.5 倍,可实现约 70 nm 的分辨率。此外,采用环状纳米线照明,还可以获得约  $1000 \mu\text{m}^2$  的大成像视场[图 13(b)],解决了无源微纳光纤产生倏逝波照明时视场小的问题。基于该理论模型,刘旭课题组随后还进一步研究了波导型倏逝场移频超分辨成像

中的偏振效应,发现了波导表面倏逝场照明超分辨成像中的偏振选择性,利用该特性,实现了对成像系统背景噪声的有效抑制,图像的信噪比提升了 4 倍以上<sup>[57]</sup>。以此为基础,刘旭课题组研制了各种光学移频超分辨成像芯片,实现了片上无标记移频超分辨成像的实用化。

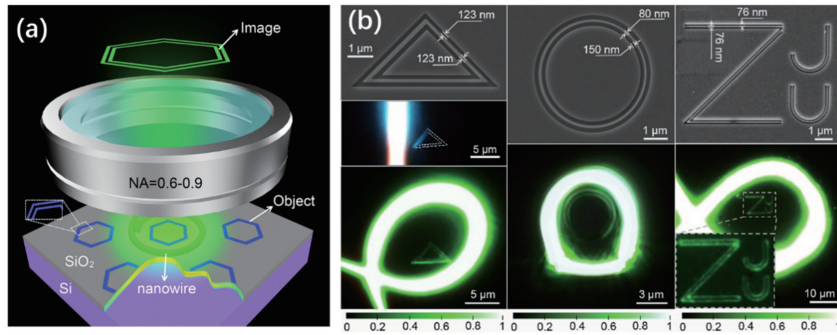


图 13 NWRIM 基本原理<sup>[56]</sup>。(a) NWRIM 的示意图;(b)多种二维亚衍射结构 NWRIM 超分辨显微成像结果

Fig. 13 Principle of NWRIM<sup>[56]</sup>. (a) Schematic illustration of NWRIM; (b) super-resolution imaging results of various two-dimensional sub-diffractive structures using NWRIM

#### 4.2 基于表面等离子激元的光学移频超分辨成像技术

除了直接使用倏逝场进行照明实现光学移频超分辨成像之外,也可以基于光与物质的相互作用,利用传导光激发具有较大光波矢的局域场来实现类似的作用。在这一方面,目前研究最为深入的是利用表面等离子激元(SPP)实现结构光照明。表面等离子基元是在导体与电介质界面存在的一种电磁振荡,这种电磁振荡本质上是电子对外界激发光的集约谐振响应。与激发光相比,表面等离子激元的波长更短,因此可以实现更密集的干涉条纹,从而在频谱域实现更大的光学移频,最终重构的图像也具有更高的空间分辨率。

2012 年,南开大学/深圳大学的袁小聪课题组率先在实验上证明了利用等离子激元驻波对纳米颗粒进行超分辨成像的可行性<sup>[58]</sup>。他们采用 1.42NA 的物镜,对于发光波长中心为 645 nm 的荧光样品实现了分辨率为 172 nm 的超分辨成像。2014 年,Wei 等<sup>[59]</sup>采用边缘/刻槽的激发方式,在单层厚度为 250 nm 的银薄膜上刻上周期为  $7.6 \mu\text{m}$  的刻槽结构,用以激发相对传播的表面等离子激元。

这些工作虽然证明了利用表面等离子激元实现光学移频超分辨成像的可行性,但是无法很好地解决表面等离子激元中普遍存在的有效折射率和传输距离之间的矛盾,必须在有效视场与分辨率之间进行取舍。因此,高效的表面等离子激元衬底研究逐

渐成为热点。例如,中国科学院西安光学精密机械研究所鱼卫星课题组提出了一种基于  $\text{Ag-Al}_2\text{O}_3\text{-Ag-SiO}_2\text{-Ag}$  的多层结构的 pSIM 衬底。有限差分域仿真和理论计算表明,通过优化各层薄膜的厚度,该结构可以产生周期为 84 nm 的表面等离子激元干涉条纹,实现 41 nm 的分辨率<sup>[60]</sup>。相比于传统显微镜,基于该衬底的 pSIM 可以实现 5.3 倍的分辨率提升。相同小组的另一项工作<sup>[61]</sup>则是利用介质薄膜之间的短程表面等离子激元的对称耦合效应,产生超高波矢的表面等离子激元模式。仿真结果表明,利用  $\text{Ag-Al}_2\text{O}_3\text{-Ag-H}_2\text{O}$  的金属/介质多层薄膜可以实现 16 nm 的分辨率,是普通光学显微镜的 13.6 倍。此外,通过改变薄膜的厚度和介质的折射率,可以实现表面等离子激元的有效调控。另一种热门的衬底材料是石墨烯。基于石墨烯的 pSIM 最初由 Zeng 等<sup>[62]</sup>提出,他们从理论上提出单层石墨烯加单层介质的结构。仿真计算表明,该衬底激发的石墨烯等离子激元的有效折射率可以达到 45.7。通过优化费米能级、激发光波长和介质的介电常数等参数,最终可以实现 10 nm 的分辨率。为了进一步提高分辨率,使其符合实际应用需求,研究人员设计出了另一种基于石墨烯的 pSIM 衬底结构,即 meta 表面的混合石墨烯结构<sup>[63]</sup>。该器件基于局域表面等离子激元增强效应和石墨烯等离子激元,其结构是在  $\text{SiO}_2/\text{Ag}/\text{SiO}_2$  衬底上放置一层石墨烯。其中厚度仅为 10 nm 的银薄膜作为石墨烯等离子激元的激发

源,可以满足很高的波矢匹配要求。仿真结果表明,当采用 980 nm 的激发光时,可以产生周期为 11 nm 的等离激元模式,其理论分辨率可以达到 6 nm。

除了采用传播的 SPPs 干涉作为结构照明光,还可以利用周期分布的局域等离激元(LPs)来进行更大范围的移频。局域等离激元照明图案可以由电子束刻蚀制备的等离激元天线阵列产生。2017 年, Ponsetto 等<sup>[64]</sup>在实验上证明了 LP-SIM 的超分辨能力。该天线阵列由六角分布于氧化硅或蓝宝石衬底的纳米银盘组成。银盘上覆盖有一层保护层,用来保护该银盘阵列不被氧化以及与所观察的生物样品隔离,同时该保护层的厚度需要控制在一定范围内,使得生物样品与银盘的间距在表面等离激元的衰减距离之内。为了保证最终成像效果,局域等离激元天线阵列的大小和周期需经过仿真优化设计,在实验中,他们采用了直径为 60 nm 和周期为 150 nm 的局域等离激元天线阵列,实现了 74 nm 的分辨率。实验过程中采集到由局域等离激元结构产生的近场模式分布调制过的样品远场分布。与 pSIM 类似,为了重构出最终的超分辨图需要改变激发光的偏振和入射角度。2018 年,Bezryadina 等<sup>[65-66]</sup>用 LP-SIM 成功地实现了在低激发光强(100~150 W/cm<sup>2</sup>)下的视频级速度(30~40 Hz)的超分辨成像。为了获得最优的分辨率,采用的阵列结构参数如下:银盘直径为 60 nm,周期为 125 nm。该实验采用绿色荧光分子标记的细胞微管作为样品,证明了该成像方法的生物兼容性。为了进一步提高分辨率,该移频方法还可以与微球透镜成像结合起来,采用低数值孔径的物镜实现 57 nm 的分辨率。

LP-SIM 的照明端和探测端实现了有效分离,因而可以同时实现高速大视场和超分辨成像。但是缺点在于其成像依赖于大面积精细加工的衬底结构,如果加工有缺陷将会引入误采样,产生失真的成像结果。此外,与其他近场照明方式类似,LP-SIM 只能探测到衬底表面一定范围内的样品,其成像深度受到了倏逝场衰减深度的限制,而且理论上移频的频率越大,倏逝场深入到样品中的距离越短,也就限制了成像的深度。不过从另一角度说,对于仅仅需要对样品表面进行成像的场合,这种方法可以实现更高信噪比的成像结果,局域性更强。

与 LP-SIM 类似,将表面等离子激元技术与 FPM 结合,也可以实现超分辨成像<sup>[67]</sup>。

利用 SPP 或 LP-SIM 可以产生极高频率的表

面波,因此可以获得相关频段的高分辨成像。但是,应该指出的是,当这些频率远高于显微物镜的截止频率  $k_{obj}$ ,也就是 SPP 的频率大于约 1.6 倍成像光波矢时,移频成像的结果就会出现低频域中间频段的缺失,如图 14 所示。

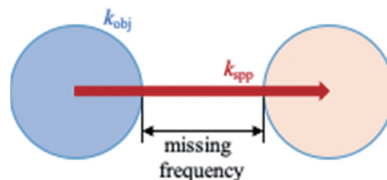


图 14 SPP 移频步长过大导致的频谱分量缺失现象  
Fig. 14 Absence of spectral components caused by excessive SPP frequency shift step

实际上移频成像的图像只能保证在 SPP 频率加减物镜数值孔径对应的频段成像是清晰的。因此,前面的 SPP 超分辨成像的工作<sup>[60-66]</sup>,实际上都是指该移频波段的超分辨成像,由于这些文章中 SPP 的频率已经远远大于 1.6 倍成像光波矢,所以即便加上物镜基频的成像,中间也缺了很大一个频段的图像信息。因此,对于极高 SPP 移频成像,要获得完整的样品图像超宽频谱的成像信息,不仅需要移频,还需要拓宽成像的空间频谱,即扩频,将中间缺失的频段信息补全。综上可知,基于频带拓宽的移频成像,是解决理论上移频不存在成像分辨率缺陷的关键,也是当前需要研究的方向。

## 5 结束语

本文总结了目前已有的实现光学移频超分辨成像的系列方法和技术,相关技术的总结如表 1 所示。相比于其他超分辨方法,光学移频超分辨成像技术的最大优势在于所需照明光强低,可以宽场成像、成像速度快,因此在活细胞成像领域具有更大的应用前景,而其中的 SIM 移频技术更是在目前所有超分辨光学显微成像技术中具有最快的成像速度记录<sup>[68]</sup>。从移频的特点可以看出,人们不仅可以在照明端加载移频信息(如 SIM 显微),也可以在探测端加载移频调制(如 VIKMOM)。这样极大地拓展了移频效应对超分辨成像的贡献。特别是采用倏逝场照明的超分辨移频成像,由于倏逝场的表面波频率可以无限大,因此这样的移频超分辨成像,从空间频率的角度说,几乎是没有限制的。但实际上它还受到探测噪声极限的限制,因为随着倏逝场频率的增大,局域效应就越强,所以与样品作用的距离就越小,成像的信号就越弱。

表 1 各种移频超分辨成像技术总结

Table 1 Summary of all frequency-shift based super-resolution imaging techniques

Classification	Name	Technical feature
Transmitted modality	Synthetic aperture microscopy	SAM <sup>[12-14]</sup> FPM <sup>[20]</sup>  1) Earliest emerging methods 2) Coherent imaging is an essential 3) Resolution enhancement is limited by the numerical aperture of the system 4) Work in wide-field illumination mode
	Structured illumination frequency-shift super-resolution imaging technique	SIM <sup>[27-33]</sup> SPIN <sup>[34]</sup> SSIM <sup>[35, 36]</sup> NL-SIM <sup>[37, 38]</sup> NFOMM <sup>[39]</sup> VSM/VTM <sup>[40]</sup>  1) Most classic methods 2) Compatible with fluoresce microscopy 3) Work in both wide-field and confocal modes 4) Unless the nonlinear effects of fluorescence is applied, the resolution is still limited by the systematic NA 5) If the nonlinear effects of fluorescence is applicable, the theoretical resolution can be unlimited, but in practice, the resolution improvement is confined by a series of factors, especially by the fluorescence bleaching
Evanescent modality	super-resolution imaging technique based on frequency shift on detector	SPADE <sup>[34]</sup> Airyscan <sup>[43]</sup> ISM <sup>[41]</sup> OPRA <sup>[44]</sup> VSD <sup>[49]</sup> VIKMOM <sup>[52]</sup>  1) Work in confocal mode, but most of them apply detector array to improve the performance 2) Befitting from the virtual frequency shift during the data processing, the flexibility improves
	Frequency shift super-resolution imaging technique based on direct evanescent wave illumination	Nano-fiber induced evanescent field <sup>[53]</sup> Total internal reflection induced evanescent field <sup>[54]</sup> Nano-wire induced evanescent field <sup>[55]</sup> NWRIM <sup>[56]</sup>  1) Work in wide-field mode 2) The resolution is determined by the $K$ vector of evanescent wave, instead of the systematic NA. In principle, the achievable resolution can be infinite 3) To maximize the resolution enhancement, the evanescent wave with larger $K$ vectors is an essence. To compensate the frequency loss, multiple frequency shift and retrieval steps with different step sizes are needed
	SPP frequency-shift super-resolution imaging technique	pSIM <sup>[58-63]</sup> LP-SIM <sup>[64-66]</sup>  1) Work in wide-field mode 2) Resolution is determined by the $K$ vector of SPP, instead of the systematic NA 3) Due to the refractive index of the available substrate material, it is challenging to compensate the frequency loss

需要指出的是,超分辨光学成像技术在近二十年得到了极大的发展,提出了各种新理论、新系统等,而每一种技术都有其优缺点和适用范围,比如移频技术的缺点在于:对于经典的传导场移频其分辨率提升仍然有限,经典宽场移频技术仅能实现两倍于普通宽场显微镜的分辨率提升;对于倏逝场移频,虽然可以实现频谱的较大数值移频,可以获得几乎没有空间频率限制的超高分辨率成像,但是又会受

到表面场照明光局限性的限制,而无法实现较厚样品的超分辨成像。因此研究者需要仔细分析,根据自身的需求选择最合适的成像技术<sup>[69]</sup>。

光学移频超分辨成像技术的进一步发展主要集中在两个方面。第一点是技术本身的发展,包括系统和算法优化两个方面。在系统上,如利用微纳光纤结构替代原有的较为庞大的光学系统,从而大大降低硬件要求<sup>[27,70]</sup>;优化或设计新型光学系统实现

更快速、更多功能的超分辨成像<sup>[71-73]</sup>。在算法上,如提升在低信噪比情况下的重构效果<sup>[27,74-5]</sup>;与系统优化结合实现实时的图像采集、超分辨重构和展示<sup>[76]</sup>;进一步减少重构所需的原始图像数量,从而实现更快速成像<sup>[74]</sup>。最关键的是利用移频原理构建移频超分辨成像芯片<sup>[55,57]</sup>,只要将样品放置在芯片上,利用简单的显微镜就可以实现超高分辨成像。

第二点则是与其他技术的有机结合,实现优缺点互补,从而大大提升单一技术的应用领域,如与基于样品膨胀的超分辨显微镜结合,可以实现更高的分辨率<sup>[77]</sup>;与自适应光学技术结合,校正成像像差,提升重构质量<sup>[78]</sup>;与单分子定位显微镜结合,实现定位信息和细胞结构信息的融合<sup>[79]</sup>;与电子显微镜或 X 射线显微镜结合,实现局部特异蛋白和全局细胞信息的融合,有助于生物学现象的全面解释<sup>[80-81]</sup>等。

当然,在期待相关技术发展前景的同时,也需要正视光学移频超分辨成像系列技术发展可能的瓶颈。虽然,利用荧光非线性效应和倏逝场效应,有望进一步提高光学移频超分辨成像技术的图像分辨能力。但是,由于单次成像所能覆盖的频谱范围始终有限,移频步长过大很容易造成中间频谱带的缺失。因此,如何在进一步提高分辨率的同时,填充中间缺失频谱,将是相关技术后续发展中应重点关注的问题。在这方面,浙江大学刘旭课题组已经有了一些开创性的思路<sup>[82]</sup>。例如:利用多波长效应<sup>[57]</sup>拓宽成像空间频谱,实现超高分辨移频;利用干涉原理,实现多角度、波矢可调的倏逝场分量并制造相应的成像芯片,在不改变整体光学架构的前提下实现频谱步长和方向的调节,进而在不牺牲整体分辨率的同时,提供填充缺乏频谱分量的可能<sup>[82]</sup>。类似地,其他可能的解决方案还包括使用多重周期结构的衍射型光栅实现波矢步长的改变,以及使用多波长、多角度的倏逝场干涉填补频谱缺失<sup>[83]</sup>等。不过,由于表面等离子激元往往具有固定的模式即相对确定的波矢,因此,很难利用上述思路实现移频波矢的调节。基于以上认识,在现有技术条件下,倏逝场直接照明相对于表面等离子激元,很可能是实现光学移频超分辨成像更为妥当的选择。

总之,我们相信,随着各方面技术的发展,光学移频超分辨成像系列技术的应用潜力将被进一步挖掘,并更好地助力前沿科学,特别是生物学、医学和材料学等相关科学问题的研究。

## 参 考 文 献

- [1] Abbe E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung[J]. Archiv Fur Mikroskopische Anatomie, 1873, 9(1): 413-468.
- [2] Born M, Wolf E, Hecht E. Principles of optics electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light[J]. Physics Today, 2000, 53(10): 77-78.
- [3] Mansfield S M, Kino G S. Solid immersion microscope[J]. Applied Physics Letters, 1990, 57(24): 2615-2616.
- [4] Hell S, Stelzer E H K. Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope[J]. Journal of the Optical Society of America A, 1992, 9(12): 2159-2166.
- [5] 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.
- [6] Blom H, Widengren J. Stimulated emission depletion microscopy[J]. Chemical Reviews, 2017, 117(11): 7377-7427.
- [7] Hess S T, Girirajan T P K, Mason M D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy [J]. Biophysical Journal, 2006, 91(11): 4258-4272.
- [8] Möckl L, Lamb D C, Bräuchle C. Super-resolved fluorescence microscopy: Nobel prize in chemistry 2014 for eric betzig, stefan hell, and William E. moerner [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2014, 53(51): 13972-13977.
- [9] Hao X. Research on the realization of far-field optical nanoscopy using manipulation of light field [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014. 郝翔. 基于光场操控的远场超分辨显微机理及方法研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [10] Tang M W, Liu X W, Wen Z, et al. Far-field superresolution imaging via spatial frequency modulation[J]. Laser & Photonics Reviews, 2020: 1900011.
- [11] Cutrona L. Synthetic aperture radar [J]. Radar Handbook, 1990, 2: 2333-2346.
- [12] Schwarz C J, Kuznetsova Y, Brueck S R J. Imaging interferometric microscopy [J]. Optics Letters, 2003, 28(16): 1424-1426.
- [13] Lee D J, Weiner A M. Optical phase imaging using a synthetic aperture phase retrieval technique [J]. Optics Express, 2014, 22(8): 9380-9394.
- [14] Kim M, Choi Y, Fang-Yen C, et al. High-speed synthetic aperture microscopy for live cell imaging [J]. Optics Letters, 2011, 36(2): 148-150.

- [15] Meinel A B. Aperture synthesis using independent telescopes[J]. *Applied Optics*, 1970, 9(11): 2501-2504.
- [16] Vedula V S S S C, Paladuga S R C, Prithvi M R. Synthesis of circular array antenna for sidelobe level and aperture size control using flower pollination algorithm[J]. *International Journal of Antennas and Propagation*, 2015, 2015: 1-9.
- [17] Turpin T M, Gesell L H, Lapidus J, et al. Theory of the synthetic aperture microscope[J]. *Proceedings of SPIE*, 1995, 2566: 230-240.
- [18] Mico V, Zalevsky Z, García J. Synthetic aperture microscopy using off-axis illumination and polarization coding [J]. *Optics Communications*, 2007, 276(2):209-217.
- [19] Hoppe W. Beugung im inhomogenen primärstrahlwellenfeld. III. Amplituden-und phasenbestimmung bei unperiodischen objekten [J]. *Acta Crystallogr*, 1969, 25: 508-514.
- [20] Zheng G A, Horstmeyer R, Yang C. Wide-field, high-resolution Fourier ptychographic microscopy [J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(9): 739-745.
- [21] Faulkner H M L, Rodenburg J M. Movable aperture lensless transmission microscopy: a novel phase retrieval algorithm [J]. *Physical Review Letters*, 2004, 93(2): 023903.
- [22] Rodenburg J M, Faulkner H M L. A phase retrieval algorithm for shifting illumination [J]. *Applied Physics Letters*, 2004, 85(20): 4795-4797.
- [23] Thibault P, Dierolf M, Menzel A, et al. High-resolution scanning X-ray diffraction microscopy[J]. *Science*, 2008, 321(5887): 379-382.
- [24] Thibault P, Dierolf M, Bunk O, et al. Probe retrieval in ptychographic coherent diffractive imaging [J]. *Ultramicroscopy*, 2009, 109(4):338-343.
- [25] Maiden A M, Rodenburg J M. An improved ptychographical phase retrieval algorithm for diffractive imaging[J]. *Ultramicroscopy*, 2009, 109(10):1256-1262.
- [26] Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 198(2): 82-87.
- [27] Huang X S, Fan J C, Li L J, et al. Fast, long-term, super-resolution imaging with Hessian structured illumination microscopy[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(5): 451-459.
- [28] Heintzmann R, Huser T. Super-resolution structured illumination microscopy [J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(23): 13890-13908.
- [29] Demmerle J, Innocent C, North A J, et al. Strategic and practical guidelines for successful structured illumination microscopy[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(5): 988-1010.
- [30] Mudry E, Belkebir K, Girard J, et al. Structured illumination microscopy using unknown speckle patterns[J]. *Nature Photonics*, 2012, 6(5): 312-315.
- [31] Jost A, Tolstik E, Feldmann P, et al. Optical sectioning and high resolution in single-slice structured illumination microscopy by thick slice blind-SIM reconstruction [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132174.
- [32] Ayuk R, Giovannini H, Jost A, et al. Structured illumination fluorescence microscopy with distorted excitations using a filtered blind-SIM algorithm [J]. *Optics Letters*, 2013, 38(22): 4723-4726.
- [33] Dong S Y, Nanda P, Shiradkar R, et al. High-resolution fluorescence imaging via pattern-illuminated Fourier ptychography [J]. *Optics Express*, 2014, 22(17): 20856-20870.
- [34] Lu J, Min W, Conchello J A, et al. Super-resolution laser scanning microscopy through spatiotemporal modulation[J]. *Nano Letters*, 2009, 9(11): 3883-3889.
- [35] Heintzmann R, Jovin T M, Cremer C. Saturated patterned excitation microscopy—a concept for optical resolution improvement [J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2002, 19(8): 1599-1609.
- [36] Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(37): 13081-13086.
- [37] 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 Sciences*, 2012, 109(3): E135-E143.
- [38] 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.
- [39] Zhao G Y, Zheng C, Kuang C F, et al. Nonlinear focal modulation microscopy [J]. *Physical Review Letters*, 2018, 120(19): 193901.
- [40] Cao R Z, Kuang C F, Liu Y, et al. Superresolution via saturated virtual modulation microscopy [J]. *Optics Express*, 2017, 25(26): 32364-32379.
- [41] Sheppard C J R. Super-resolution in confocal imaging[J]. *Optik International Journal for Light & Electron Optics*, 1988, 80(2):53-54.

- [42] Müller C B, Enderlein J. Image scanning microscopy [J]. *Physical Review Letters*, 2010, 104 (19): 198101.
- [43] Huff J. The Airyscan detector from ZEISS: confocal imaging with improved signal-to-noise ratio and super-resolution [J]. *Nature Methods*, 2015, 12 (12): i-ii.
- [44] Roth S, Sheppard C J, Wicker K, et al. Optical photon reassignment microscopy (OPRA) [J]. *Optical Nanoscopy*, 2013, 2(1): 1-6.
- [45] Korobchevskaya K, Lagerholm B, Colin-York H, et al. Exploring the potential of airyscan microscopy for live cell imaging[J]. *Photonics*, 2017, 4(4): 41.
- [46] Ge B L, Wang Y F, Huang Y J, et al. Three-dimensional resolution and contrast-enhanced confocal microscopy with array detection[J]. *Optics Letters*, 2016, 41(9): 2013-2016.
- [47] Ge B L, Huang Y J, Fang Y, et al. Frequency domain phase-shifted confocal microscopy (FDPCM) with array detection[J]. *Journal of Modern Optics*, 2017, 64(16): 1597-1603.
- [48] Zhu D Z, Fang Y, Chen Y H, et al. Comparison of multi-mode parallel detection microscopy methods [J]. *Optics Communications*, 2017, 387:275-280.
- [49] Lu R W, Wang B Q, Zhang Q X, et al. Super-resolution scanning laser microscopy through virtually structured detection[J]. *Biomedical Optics Express*, 2013, 4(9): 1673-1682.
- [50] Shroff S A, Fienup J R, Williams D R. Phase-shift estimation in sinusoidally illuminated images for lateral superresolution [J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2009, 26(2): 413-424.
- [51] Zhi Y N, Lu R W, Wang B Q, et al. Rapid super-resolution line-scanning microscopy through virtually structured detection [J]. *Optics Letters*, 2015, 40 (8): 1683-1686.
- [52] Kuang C F, Ma Y, Zhou R J, et al. Virtual-k-space modulation optical microscopy [J]. *Physical Review Letters*, 2016, 117(2): 028102.
- [53] Hao X, Liu X, Kuang C F, et al. Far-field super-resolution imaging using near-field illumination by micro-fiber[J]. *Applied Physics Letters*, 2013, 102 (1): 013104.
- [54] Hao X, Kuang C F, Li Y H, et al. Evanescent-wave-induced frequency shift for optical superresolution imaging[J]. *Optics Letters*, 2013, 38 (14): 2455-2458.
- [55] Pang C L, Liu X W, Zhuge M, et al. High-contrast wide-field evanescent wave illuminated subdiffraction imaging[J]. *Optics Letters*, 2017, 42 (21): 4569-4572.
- [56] Liu X W, Kuang C F, Hao X, et al. Fluorescent nanowire ring illumination for wide-field far-field subdiffraction imaging[J]. *Physical Review Letters*, 2017, 118(7): 076101.
- [57] Pang C L, Li J X, Tang M W, et al. Super-resolution microscopy: on-chip super-resolution imaging with fluorescent polymer films [J]. *Advanced Functional Materials*, 2019, 29 (27): 1970188.
- [58] Wang Q, Bu J, Tan P S, et al. Subwavelength-sized plasmonic structures for wide-field optical microscopic imaging with super-resolution [J]. *Plasmonics*, 2012, 7(3): 427-433.
- [59] Wei F F, Lu D, Shen H, et al. Wide field super-resolution surface imaging through plasmonic structured illumination microscopy [J]. *Nano Letters*, 2014, 14(8): 4634-4639.
- [60] Cao S, Wang T S, Xu W B, et al. Gradient permittivity meta-structure model for wide-field super-resolution imaging with a sub-45 nm resolution [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 1-7.
- [61] Cao S, Wang T S, Yang J Z, et al. Numerical analysis of wide-field optical imaging with a sub-20 nm resolution based on a meta-sandwich structure [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1-8.
- [62] Zeng X D, Al-Amri M, Zubairy M S. Nanometer-scale microscopy via graphene plasmons[J]. *Physical Review B*, 2014, 90(23): 235418.
- [63] Cao S, Wang T S, Sun Q, et al. Graphene on meta-surface for super-resolution optical imaging with a sub-10 nm resolution[J]. *Optics Express*, 2017, 25 (13): 14494-14503.
- [64] Ponsetto J L, Bezryadina A, Wei F F, et al. Experimental demonstration of localized plasmonic structured illumination microscopy [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(6): 5344-5350.
- [65] Bezryadina A, Zhao J X, Xia Y, et al. High spatiotemporal resolution imaging with localized plasmonic structured illumination microscopy [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(8): 8248-8254.
- [66] Bezryadina A, Zhao J X, Xia Y, et al. Localized plasmonic structured illumination microscopy with gaps in spatial frequencies[J]. *Optics Letters*, 2019, 44(11): 2915-2918.
- [67] Liu Q L, Fang Y, Zhou R J, et al. Surface wave illumination Fourier ptychographic microscopy [J]. *Optics Letters*, 2016, 41(22): 5373-5376.
- [68] Guo Y, Li D, Zhang S, et al. Visualizing intracellular organelle and cytoskeletal interactions at nanoscale resolution on millisecond timescales [J]. *Cell*, 2018, 175(5): 1430-1442.



- [69] Schermelleh L, Ferrand A, Huser T, et al. Super-resolution microscopy demystified [J]. *Nature Cell Biology*, 2019, 21(1): 72-84.
- [70] Helle Ø I, Dullo F T, Lahrberg M, et al. Structured illumination microscopy using a photonic chip [J]. *Nature Photonics*, 2020, 14(7): 431-438.
- [71] Chen Y, Liu W, Zhang Z, et al. Multi-color live-cell super-resolution volume imaging with multi-angle interference microscopy [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 4818.
- [72] Liu W J, Liu Q L, Zhang Z M, et al. Three-dimensional super-resolution imaging of live whole cells using galvanometer-based structured illumination microscopy [J]. *Optics Express*, 2019, 27(5): 7237-7248.
- [73] Roth J, Mehl J, Rohrbach A. Fast TIRF-SIM imaging of dynamic, low-fluorescent biological samples [J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(7): 4008-4026.
- [74] Jin L H, Liu B, Zhao F Q, et al. Deep learning enables structured illumination microscopy with low light levels and enhanced speed [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1-7.
- [75] Cao R Z, Chen Y H, Liu W J, et al. Inverse matrix based phase estimation algorithm for structured illumination microscopy [J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(10): 5037-5051.
- [76] Markwirth A, Lachetta M, Mönkemöller V, et al. Video-rate multi-color structured illumination microscopy with simultaneous real-time reconstruction [J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1-11.
- [77] Zwettler F U, Spindler M C, Reinhard S, et al. Tracking down the molecular architecture of the synaptonemal complex by expansion microscopy [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1-11.
- [78] Žurauskas M, Dobbie I M, Parton R M, et al. IsoSense: frequency enhanced sensorless adaptive optics through structured illumination [J]. *Optica*, 2019, 6(3): 370-379.
- [79] Modi S, López-Doménech G, Half E F, et al. Miro clusters regulate ER-mitochondria contact sites and link cristae organization to the mitochondrial transport machinery [J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1-15.
- [80] Kounatidis I, Stanifer M L, Phillips M A, et al. 3D correlative cryo-structured illumination fluorescence and soft X-ray microscopy elucidates reovirus intracellular release pathway [J]. *Cell*, 2020, 182(2): 1-16.
- [81] Hoffman D P, Shtengel G, Xu C S, et al. Correlative three-dimensional super-resolution and block-face electron microscopy of whole vitreously frozen cells [J]. *Science*, 2020, 367(6475): eaaz5357.
- [82] Liu X W, Meng C, Xu X C, et al. Wide-field 3D nanoscopy on chip through large and tunable spatial-frequency-shift effect [EB/OL]. (2019-06-27) [2020-08-24]. <https://arxiv.org/abs/1906.11647>.
- [83] Xu X C, Liu X W, Pang C L, et al. Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> waveguide platform for label-free super-resolution imaging: simulation and analysis [J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2019, 52(28): 284002.