

引用格式: XIE Xianfeng, QIAN Jia, LI Xing, et al. High Fidelity Image Reconstruction of Optical Sectioning Structured Illumination Microscopy[J]. Acta Photonica Sinica, 2023, 52(11): 1110004

谢贤峰, 千佳, 李星, 等. 结构光照明光切片显微图像的高保真重构方法[J]. 光子学报, 2023, 52(11): 1110004

# 结构光照明光切片显微图像的高保真重构方法

谢贤峰<sup>1,2</sup>, 千佳<sup>1</sup>, 李星<sup>1</sup>, 党诗沛<sup>1</sup>, 柏晨<sup>1</sup>, 闵俊伟<sup>1</sup>, 但旦<sup>1,2</sup>, 姚保利<sup>1,2</sup>

(1 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, 西安 710119)

(2 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 光切片图像的质量与使用的重构算法直接相关, 传统的均方根算法虽然简洁, 但在原始图像信噪比和条纹对比度不高时重构效果不佳, 得到的三维重建结果并不理想。针对该问题, 提出一种去背景和去卷积相结合的光切片方法。与传统均方根算法相比, 该方法能有效减少残留条纹, 提高微小细节的可见性。实验搭建了一套基于数字微镜器件的结构照明显微系统, 以小鼠肾脏细胞、牛肺动脉内皮细胞等为样品进行了光切片实验。实验结果表明, 该方法能获得更好的光切片和三维成像效果。

**关键词:** 结构照明显微镜; 光切片; 三维显微成像; 图像重构; 标准差

中图分类号: TP391.41

文献标识码: A

doi: 10.3788/gzxb20235211.1110004

## 0 引言

生命科学的发展需要对生物的微观结构分布和形态特征进行全面观察。光学显微镜因其低损伤和实时成像的优势成为生物研究的有力工具<sup>[1-2]</sup>。然而, 由于成像景深的限制, 传统光学显微镜不具备三维显微成像的能力。景深范围内的光线聚焦形成目标像, 而景深范围外的光线散焦形成背景, 两者混合在一起, 形成一个二维强度图像, 两个部分彼此难以区分, 影响对目标的精确识别<sup>[3]</sup>。要解决这一问题, 关键是如何从离焦背景中分离出在焦目标。目前已有许多技术可以解决此问题, 如激光扫描共聚焦显微术 (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM)<sup>[4-5]</sup>、光片荧光显微术 (Light Sheet Fluorescence Microscopy, LFSM)<sup>[6-8]</sup>、光切片结构照明显微术 (Optical Sectioning Structured Illumination Microscopy, OS-SIM)<sup>[9-12]</sup>等。其中, OS-SIM 技术由于其结构简单、成像速度快、兼容性好等优点, 非常适合应用于生物医学和材料科学等领域。

1997 年, NEIL M A A 等<sup>[13]</sup>提出了 SIM 显微术的概念, 用于消除宽场显微镜中的离焦背景, 从而获得光切片图像。当具有一定频率的空间条纹图案投射到物体上时, 只有在焦平面区域的物体才可以承载条纹, 而离焦区域则不受条纹图案影响。通过对三种不同相位结构光场照明下的图像进行简单处理, 即可提取光切片图像<sup>[14]</sup>。在光切片重构算法方面, 由 NEIL M A A 等提出的均方根 (Root Mean Square, RMS) 算法在大多数情况下仍然被使用。然而, 该算法也有一些缺点。RMS 算法在低信噪比和低条纹对比度的情况下, 重构出的光切片图像往往信噪比较低, 甚至出现残留条纹。对于生物荧光样品, 大多数时候荧光信号很微弱, 背景噪声较高, 使得 RMS 算法的处理结果往往不够理想。为了弥补 RMS 算法的不足, 一些改进的重建算法相继被提出。2014 年 PATORSKI K 等<sup>[15]</sup>提出了一种基于二维希尔伯特变换的 FABMED-HS (Fast and Adaptive Bi-Dimensional Empirical Mode Decomposition-Hilbert Spiral Transform) 算法。该方法在运算过程中进行了选择性的滤波, 可以在一定程度上去除光切片图像中的噪声, 但需要对图像进行复杂的二维经验模态分解和希尔伯特变换。之后, 2015 年 ZHOU Xing 等<sup>[16]</sup>提出了一种基于一维希尔伯特变换的 SHT

**基金项目:** 国家自然科学基金 (No. 12274451), 国家重点研发计划 (Nos. 2021YFF0700303, 2022YFE0100700), 中国博士后科学基金 (No. 2022M713338), 陕西省重点研发计划 (No. 2022GY-083), 西安光机所级中心高端科学仪器国产化及核心部件开放基金 (No. SJZ1-202206001)

**第一作者:** 谢贤峰, xiexianfeng@opt.ac.cn

**通讯作者:** 姚保利, yaobl@opt.ac.cn; 但旦, dandan@opt.ac.cn

**收稿日期:** 2023-04-27; **录用日期:** 2023-06-07

<http://www.photon.ac.cn>

(Sequence Hilbert Transform)算法,大大简化了处理流程,但该方法没有涉及噪声相关的操作,在噪声抑制方面表现不佳。2020年DANG Shipai等<sup>[17]</sup>提出一种Fourier-OS-SIM算法,该算法在频域上对图像进行处理,可以使用多种滤波器抑制背景噪声,提高图像重构质量,但在频域的运算相对复杂,处理速度相对较慢。

本文从理论上分析并推导出了一种新的光切片算法:标准差(STANDARD Deviation, STD)算法,该算法结合了去背景和去卷积处理。去背景处理可以解决由于背景荧光过强导致条纹对比度较低的问题,去卷积处理可以消除系统点扩散函数对成像的影响。与传统的RMS算法相比,STD算法不仅可以实现光切片重构,还可以增强图像中微小细节的可见性。设计并搭建了一套基于数字微镜器件(Digital Micro-mirror Device, DMD)的结构光照明显微成像系统,并在该系统上进行了一系列生物样品的光切片实验,通过与传统RMS算法的对比,证明了STD算法的优点和有效性。

## 1 理论分析

### 1.1 RMS算法存在的问题

RMS算法在推导过程中使用了两个近似:第一个是认为背景强度在成像过程中是近似不变的,可以通过两两之间相减的方法消去;第二个是近似认为系统点扩散函数对图像采集没有影响。当图像信噪比和条纹对比度都较高时,这两个近似对光切片重构影响不大。然而,在弱荧光显微的情况下,这两个近似带来的影响就会变得明显,这也是RMS算法重构出的结果信噪比低,往往会灰度值缺失的原因。图1展示了使用Nikon 40×/NA0.75的显微物镜,以小鼠肾脏细胞为样品,得到的宽场图像和RMS算法重构的结构光照明光切片图像。从图中可以看出,RMS算法重构的光切片图像中出现了许多残留条纹和噪点,这些缺陷掩盖了图像中的一些细节。

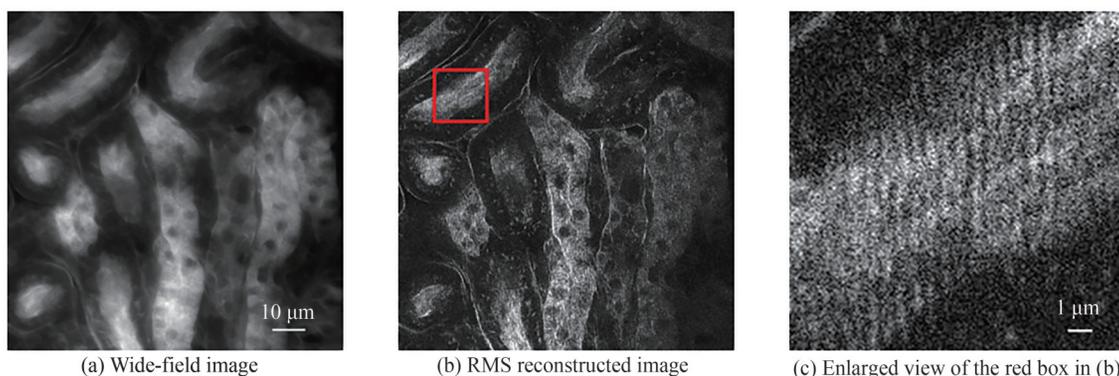


图1 小鼠肾脏细胞的宽场图像及RMS算法重构的SIM光切片图像  
Fig.1 Wide-field image and RMS reconstructed SIM optical sectioning image of mouse kidney cells

### 1.2 STD算法的数理基础

STD算法的流程可分为五个部分:结构光照明生成和相移、阵列数码相机捕获荧光图像、对获取的荧光图像进行去背景处理、对去背景后的图像进行去卷积处理、光切片图像重建。该流程如图2所示。

在OS-SIM技术中,照明光源发出的照明光经空间光调制器(Spatial Light Modulator, SLM)或DMD等光场调制器件调制后,经过显微物镜在样品上形成强度满足一维余弦函数分布的结构光场。该结构光场可以表示为

$$I(x) = I_0 \left[ 1 + m \cdot \cos(2\pi k_0 x + \varphi_0) \right] \quad (1)$$

式中, $I_0$ 为结构光场的光强平均值, $m$ 为条纹的调制度。 $k_0$ 和 $\varphi_0$ 分别为条纹的空间频率和初相位。通过控制光场调制器件可以在样品上产生任意的结构光场,在OS-SIM中,往往采用等间隔三步相移的余弦条纹光场。在荧光线性激发响应的情况下,结构光场照亮并激发样品产生荧光信号,这些信号经显微系统成像后,在显微成像系统的像面上,通过数码相机CMOS或CCD记录三幅荧光图像,记为 $D_1(x', y')$ 、 $D_2(x', y')$ 和 $D_3(x', y')$ ,其中 $x'$ 和 $y'$ 表示像平面上的二维图像坐标。由于结构光场只调制在焦分量 $D_m(x, y)$ ,对离焦分量

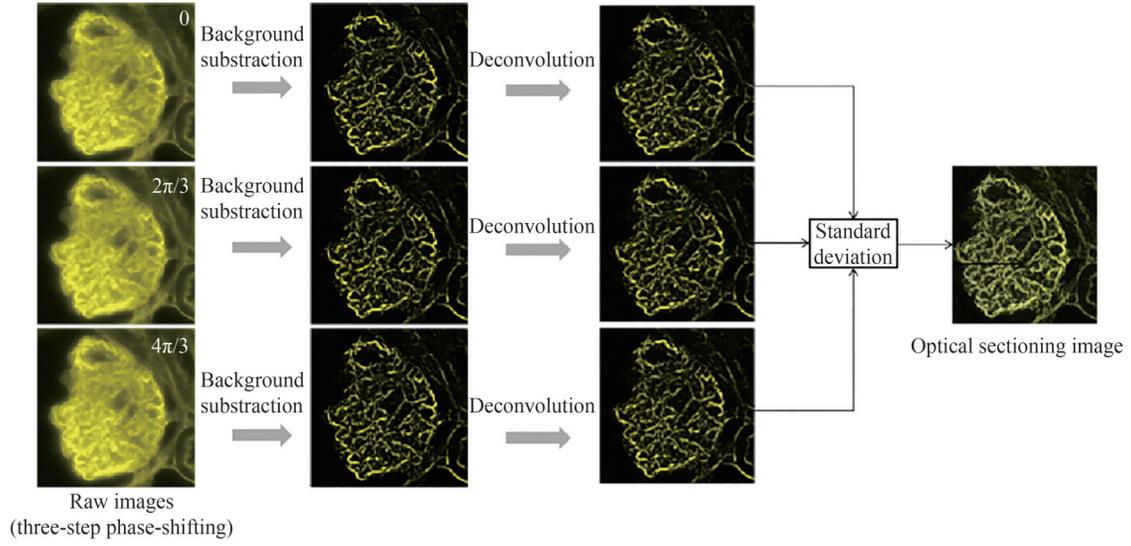


图2 STD 算法流程

Fig.2 Flow of STD algorithm

$D_{out}(x, y)$  没有影响,同时考虑到物体表面成像到数码相机 CMOS 或 CCD 的过程,该过程可以认为是结构光场照明下的成像结果与系统点扩散函数的卷积。结合式(1),此成像过程可以表示为

$$\begin{cases} D_1(x', y') = \left\{ D_{in}(x, y) \cdot I_0 \left[ 1 + m \cdot \cos(2\pi k_0 x + \varphi_0) \right] + D_{out}(x, y) \right\} \otimes \text{PSF} \\ D_2(x', y') = \left\{ D_{in}(x, y) \cdot I_0 \left[ 1 + m \cdot \cos\left(2\pi k_0 x + \varphi_0 + \frac{2\pi}{3}\right) \right] + D_{out}(x, y) \right\} \otimes \text{PSF} \\ D_3(x', y') = \left\{ D_{in}(x, y) \cdot I_0 \left[ 1 + m \cdot \cos\left(2\pi k_0 x + \varphi_0 + \frac{4\pi}{3}\right) \right] + D_{out}(x, y) \right\} \otimes \text{PSF} \end{cases} \quad (2)$$

式中,  $x$  和  $y$  表示物平面上的二维图像坐标, PSF 表示系统的点扩散函数,  $\otimes$  表示卷积运算。

由于背景荧光和噪声的干扰,获得的荧光图像信噪比和条纹对比度往往较差,这会给后续的重构算法带来很大压力。如果预先能够从图像中消除一部分背景荧光,则可以提高条纹对比度,从而缓解上述压力,该过程可以用式(3)表示。目前已经有很多方法可以实现此过程,比如使用深度学习的方法去除背景荧光<sup>[18]</sup>,但这需要大量的时间和数据进行训练,以确保它可以处理各种各样的图像。本文使用的是“滚球法(Rolling Ball)”方法<sup>[19-20]</sup>。该方法模拟了一个虚拟的球沿着图像强度曲线滚动,将滚球中心位置连接起来就是图像的背景强度,将图像的强度曲线与图像的背景强度曲线相减,就可以达到去背景的目的。

$$\begin{cases} D_1(x', y') - D_{out}(x', y') = \left\{ D_{in}(x, y) \cdot I_0 \left[ 1 + m \cdot \cos(2\pi k_0 x + \varphi_0) \right] \right\} \otimes \text{PSF} \\ D_2(x', y') - D_{out}(x', y') = \left\{ D_{in}(x, y) \cdot I_0 \left[ 1 + m \cdot \cos\left(2\pi k_0 x + \varphi_0 + \frac{2\pi}{3}\right) \right] \right\} \otimes \text{PSF} \\ D_3(x', y') - D_{out}(x', y') = \left\{ D_{in}(x, y) \cdot I_0 \left[ 1 + m \cdot \cos\left(2\pi k_0 x + \varphi_0 + \frac{4\pi}{3}\right) \right] \right\} \otimes \text{PSF} \end{cases} \quad (3)$$

在成像过程中,系统的点扩散函数会对图像进行调制,使点物不能形成点像,而是形成一个弥散斑,影响最终的成像效果。为此,在 STD 算法中,加入去卷积运算来消除这种影响。目前有许多流行的去卷积算法都可以实现该功能,如 Wiener 滤波算法<sup>[21-22]</sup>、盲去卷积算法<sup>[23-24]</sup>和 Lucy-Richardson 算法<sup>[25-26]</sup>。本文选用的是针对显微图像普适性较好的 Lucy-Richardson 算法。对式(3)进行去卷积运算后,可得

$$\begin{cases} D'_1(x, y) = D_{in}(x, y) \cdot I_0 \left[ 1 + m \cdot \cos(2\pi k_0 x + \varphi_0) \right] \\ D'_2(x, y) = D_{in}(x, y) \cdot I_0 \left[ 1 + m \cdot \cos\left(2\pi k_0 x + \varphi_0 + \frac{2\pi}{3}\right) \right] \\ D'_3(x, y) = D_{in}(x, y) \cdot I_0 \left[ 1 + m \cdot \cos\left(2\pi k_0 x + \varphi_0 + \frac{4\pi}{3}\right) \right] \end{cases} \quad (4)$$

式中,  $D'_1(x, y)$ 、 $D'_2(x, y)$  和  $D'_3(x, y)$  分别是经过去背景和去卷积处理后的三步相移图像。求解式(4)中的  $D_{in}(x, y)$ , 可得

$$D_{in}(x, y) = \frac{\sqrt{6}}{5mI_0} \cdot \sqrt{\left[ D'_1(x, y) - D_{WF}(x, y) \right]^2 + \left[ D'_2(x, y) - D_{WF}(x, y) \right]^2 + \left[ D'_3(x, y) - D_{WF}(x, y) \right]^2} \quad (5)$$

这就是需要的光切片图像。因为式(5)形似标准差公式, 所以将该方法称为“STD”。其中,  $m$  和  $I_0$  为常数, 取值由结构光场的参数决定,  $D_{WF}$  是式(4)中三幅图像的均值, 即宽场图像。

$$D_{WF}(x, y) = \frac{1}{3} \left[ D'_1(x, y) + D'_2(x, y) + D'_3(x, y) \right] \quad (6)$$

## 2 成像实验

### 2.1 实验光路

为了验证 STD 算法的性能, 搭建了一套基于 DMD 的结构光显微成像系统, 光路设计如图 3。光源采用激光二极管照明光源 (Laser Diode Illuminator, LDI) (LDI-7, 89NORTH Inc.), 通过液体光导提供七个波长

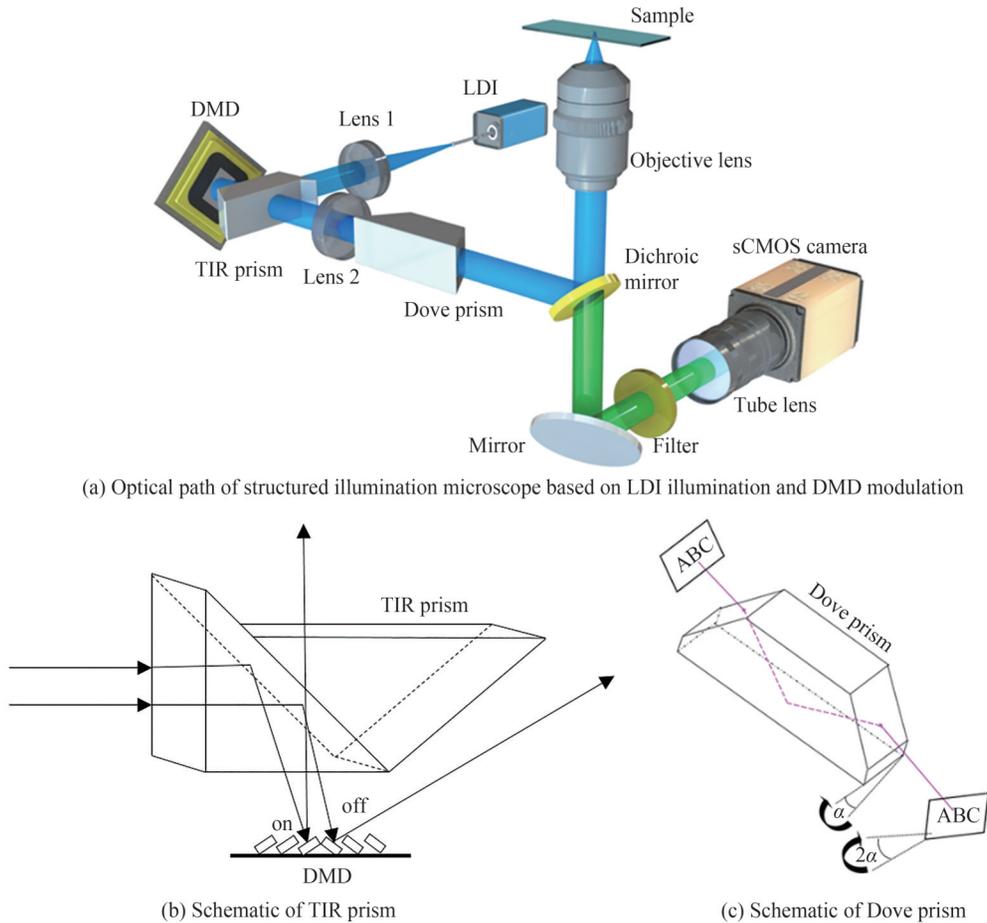


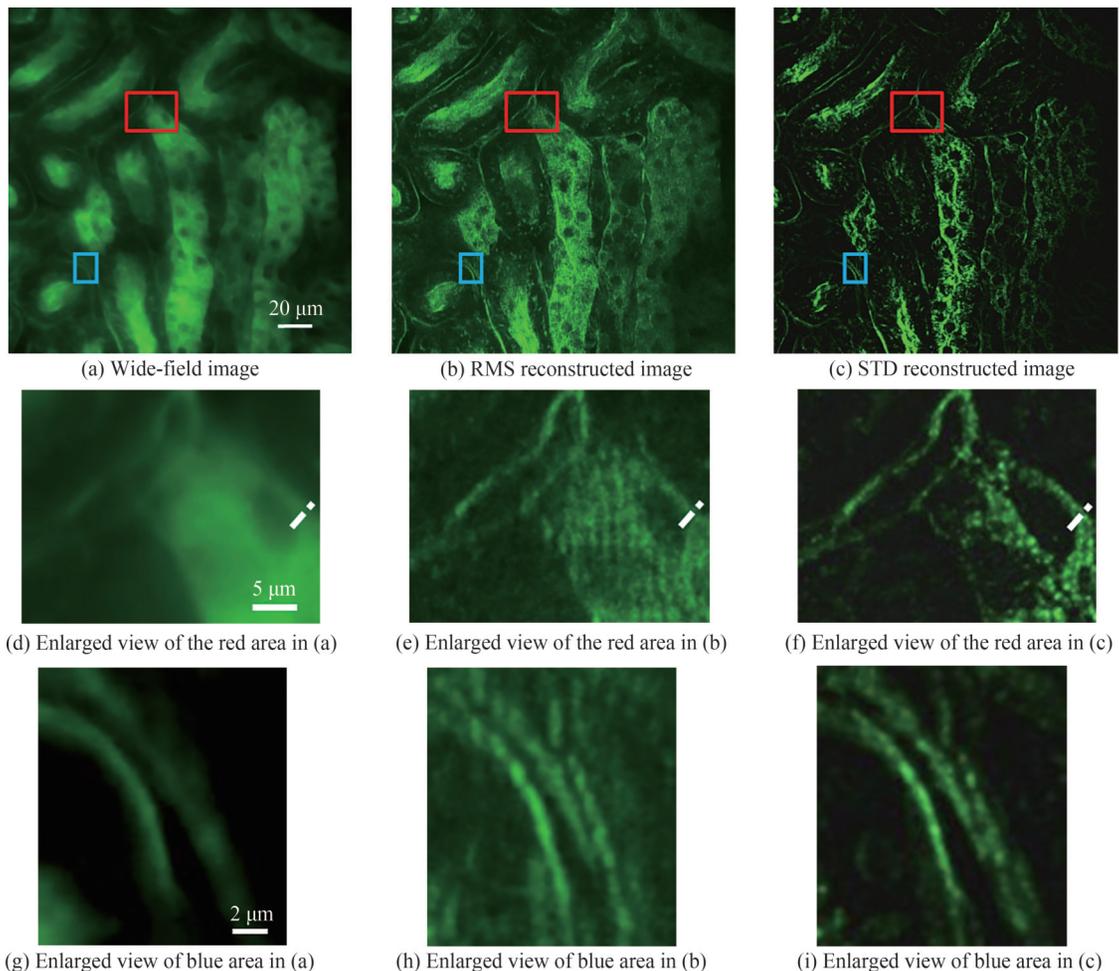
图3 实验光路  
Fig.3 Experimental optical path

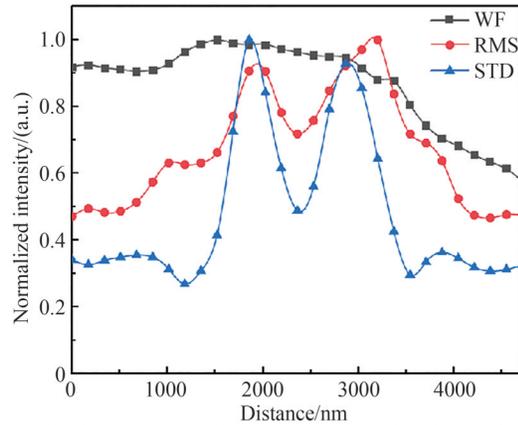
通道的照明,既可以保证照明光有良好的单色性和准直性,也避免了散斑噪声对成像的影响。光源发出的光束通过准直透镜(Lens 1,焦距 30 mm)准直,然后通过全内反射(Total Internal Reflection, TIR)棱镜耦合进入DMD(1 920×1 080像素,像元尺寸 7.56  $\mu\text{m}$ )。TIR棱镜基于全反射原理设计,可以保证较高的光能利用率,其原理示意如图 3(b)。光束首先通过 TIR 棱镜入射到 DMD 芯片上,然后被 DMD 上加载的条纹调制,最后通过 TIR 棱镜射出。TIR 棱镜与 DMD 的组合使用,既可以满足 DMD 特殊的  $24^\circ$  入射角,又大大缩短了光路长度,使系统更加紧凑。然后经调制的结构光由 Lens 2(焦距 300 mm)收集后,进入到 Dove 棱镜(PS994M, Thorlabs Inc.)中进行旋转。由于 DMD 特殊的偏转角度,调制光斑是旋转倾斜的,使用 Dove 棱镜的旋像功能可以使获得的图像旋转成水平方向,便于相机采集图像。结构光从 Dove 棱镜出射后,经二向色镜(490 nm 长通, DMLP490, Thorlabs Inc.)反射进入显微物镜,最终在样品焦面上汇聚。样品激发的荧光通过显微物镜返回,再次通过二向色镜,经过滤光片(FL-004532, Semorock Inc.)滤除照明光和环境光后,使用筒镜收集,最后在 sCMOS 相机(ORCA-flash4.0, Hamamatsu Inc.)上采集荧光图像。在三维成像过程中,利用电动位移工作台(P-725, Physik Instrumente Inc.)在  $z$  轴上移动样品,可获得样品不同深度位置的图像数据,经过后期数据处理和整合后可获得样品的三维图像。

## 2.2 实验结果与分析

### 2.2.1 STD 算法和 RMS 算法的成像对比

为了比较 STD 算法和 RMS 算法在光切片上的差异,基于上述系统对小鼠肾脏细胞和牛肺动脉内皮(Bovine Pulmonary Artery Endothelial, BPAE)细胞进行了成像实验。首先以小鼠肾脏细胞为样品,照明光波长为 470 nm,显微物镜为 Nikon 40×/NA0.75 物镜。利用 sCMOS 相机获取了三幅具有  $2\pi/3$  等间距相移、横向条纹周期为 1.35  $\mu\text{m}$  的原始图像,然后分别使用 RMS 算法和 STD 算法进行重建。图 4 为小鼠肾脏细胞成像结果。从图 4(d)~(f)和(g)~(i)中可以看出,RMS 算法和 STD 算法都可以实现光切片的功能。





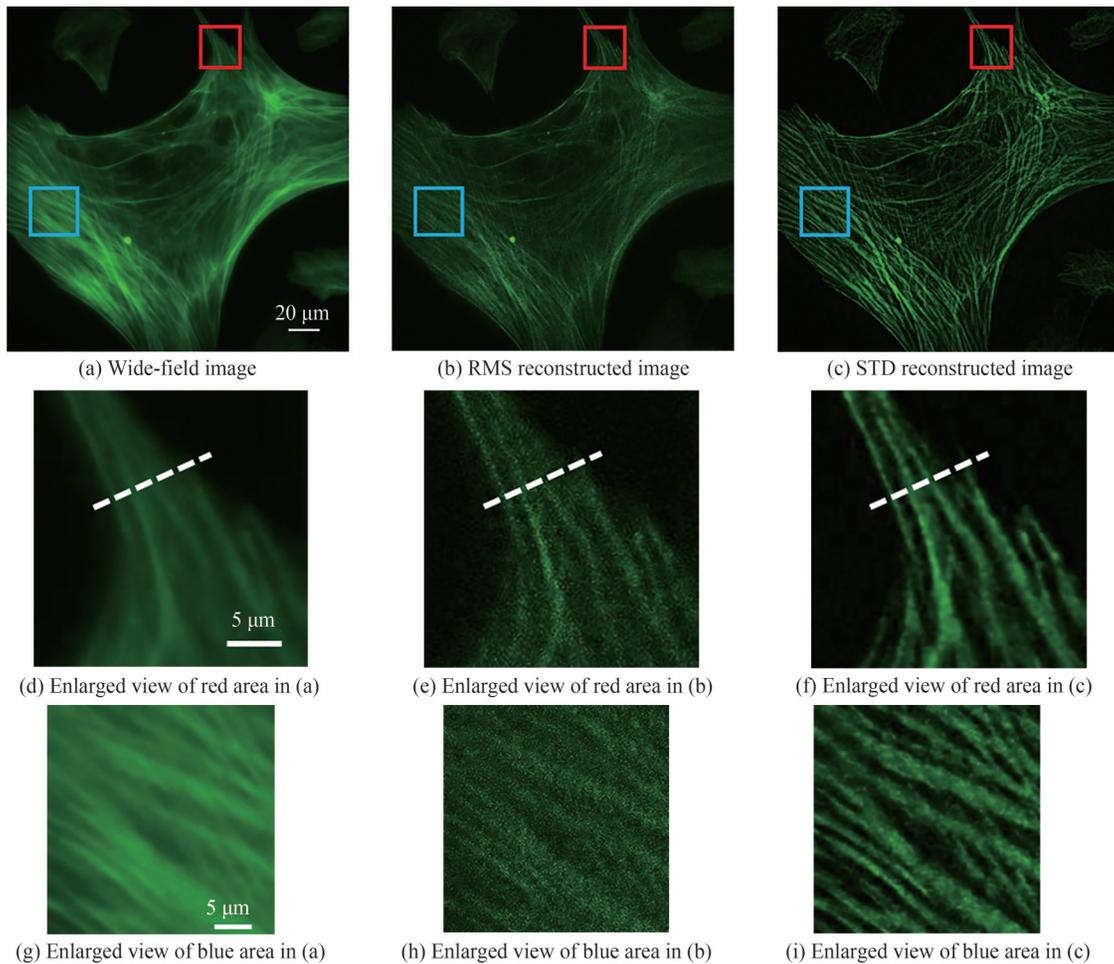
(j) The normalized intensity distribution curves along the white dashed lines in (d)~(f)

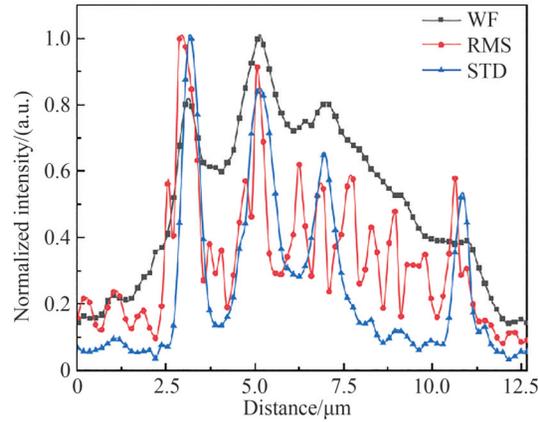
图4 使用RMS算法和STD算法重建小鼠肾脏细胞的成像结果对比

Fig.4 Comparison of imaging results reconstructed by RMS and STD algorithms for mouse kidney cells

但与STD算法相比,RMS处理结果中存在较严重的噪声和残余条纹,严重影响了光学切片图像的质量。从结果可以看出,STD算法可以有效地抑制噪声,消除残余条纹,提高成像质量。从图4(j)中的归一化强度曲线可以看出,STD算法使图像的背景强度更低,对比度更高。

为了进一步验证STD算法的优越性,用同样的显微物镜对BPAE细胞进行了成像实验。照明光波长依然为470 nm,二向色镜和滤光片型号保持不变。与之前不同的是,本次实验的条纹对比度很低(小于0.1)。结果如图5。从图中可以看出,STD算法的重构结果中仍然具有更低的噪声,更好的图像对比度和更精细的微观结构。相比之下,RMS算法的处理结果几乎被噪声淹没。从图5(j)还可以看出,RMS重构图像对应的





(j) The normalized intensity distribution curves along the white dashed lines in (d)–(f)

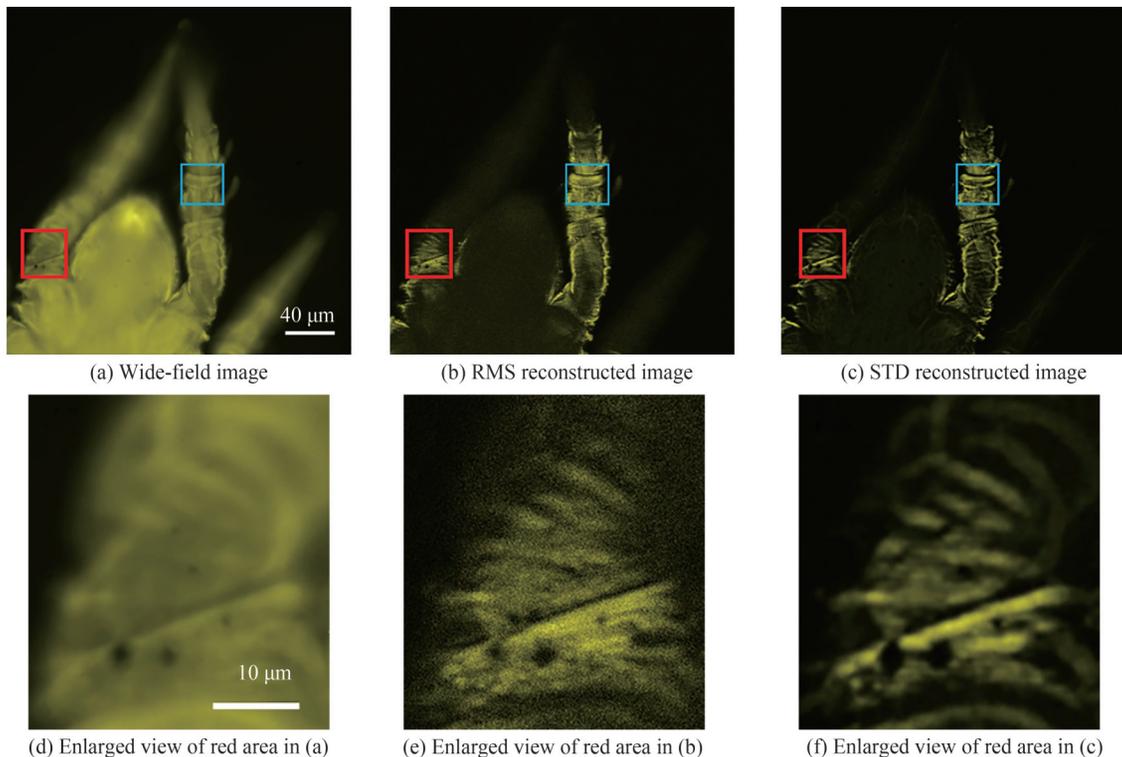
图5 低条纹对比度时不同算法重构牛肺动脉内皮细胞的成像结果对比

Fig.5 Comparison of imaging results reconstructed by RMS and STD algorithms for BPAE cells under low contrast structured illumination

曲线中有更多“毛刺”,而宽场图像和STD重构图像中几乎没有,这是由图像中的噪声引起的。这些“毛刺”严重影响光切片的质量。这说明当条纹对比度较低时,RMS算法的重构结果并不理想,而STD算法仍然可以获得较为理想的光切片图像。

### 2.2.2 与以前数据的重构结果对比

STD算法具有普适性,为了验证这一点将其应用于以前采集的数据中,同样得到了比RMS算法更好的光切片图像,如图6。样品为蠕虫样本,显微物镜为Nikon 20×/NA0.45物镜。由于蠕虫样本较厚,在宽场图像中,清晰的在焦部分和模糊的离焦部分糅合在一起,没有明显的区分,而在光切片图像中可以看出在焦部分和离焦部分有着明显的区分。对比图6(b)和6(c)可以发现,RMS算法和STD算法都可以实现光切片,但RMS算法重构结果中有着明显的噪点,掩盖了图像中的一些细节结构。STD算法的重构结果中没有明显噪声,样本中的细节结构依然清晰可见,说明STD算法有更加优秀的光切片重构能力。



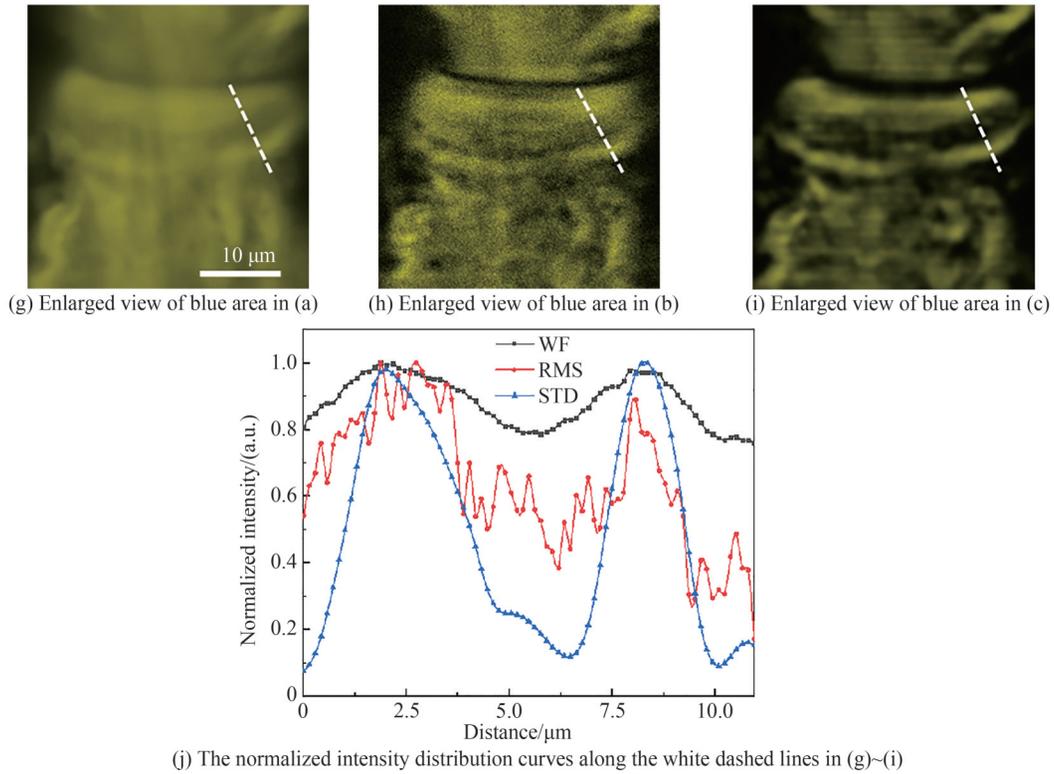


图6 使用RMS算法和STD算法重建螨虫样本的成像结果对比  
Fig.6 Comparison of imaging results reconstructed by RMS and STD algorithms for mite sample

### 2.2.3 双波长通道光切片

实验中发现改变照明波长对成像位置的影响很小,这使得多波长的光切片成为可能。使用两种波长的光照明小鼠肾脏细胞,显微物镜仍为Nikon 40×/NA0.75物镜。首先使用波长为470 nm的光束照明样品,图像采集完成后,将光源波长切换为555 nm,更换相应的二向色镜(567 nm长通, DMLP567, Thorlabs Inc.),继续采集图像。最后两组原始图像分别处理后叠加,即可获得双波长激发下的融合重构图像,结果如图7。该样品使用不同的荧光分子标记细胞中的不同结构,因此在不同波长的光照激发下,能够观测到不同

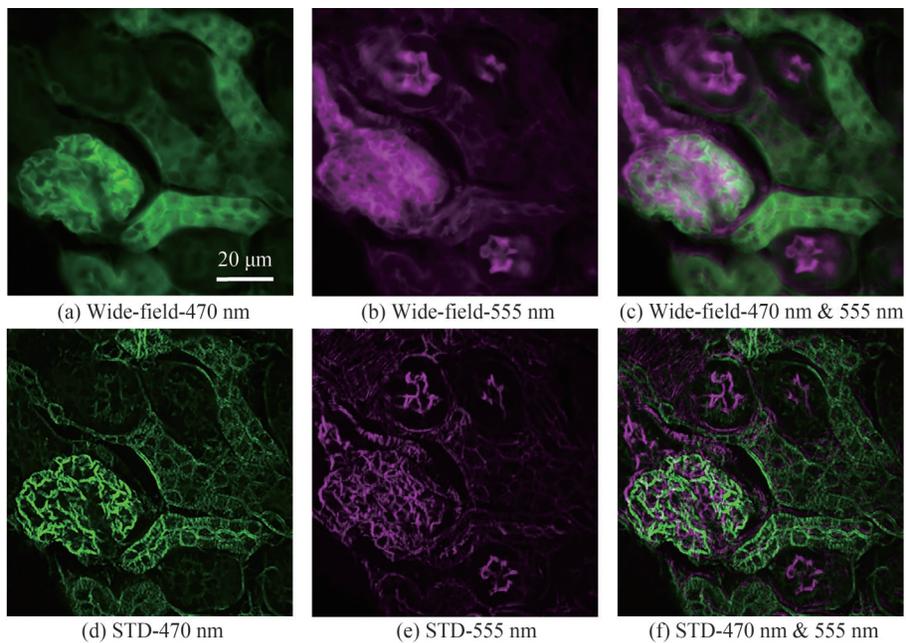


图7 双波长照明激发下小鼠肾脏细胞的成像结果  
Fig.7 Imaging results of mouse kidney cells under dual wavelength illumination

的荧光标记结构,获取更多的结构信息,有利于对样品的全面观察。从图7中可以看出,在双波长光源照明下,STD依然具有良好的光切片效果。

#### 2.2.4 三维显微成像

OS-SIM的最终目的是实现三维成像,STD算法能重构出更为理想的光切片图像,使三维成像效果更加真实。如图8,以花粉颗粒为样品进行了三维图像重构。使用的显微物镜放大倍率为20,数值孔径为0.75,切片每层厚度为200 nm,视场大小为 $163.84\ \mu\text{m} \times 163.84\ \mu\text{m}$ ,共采集了125层。

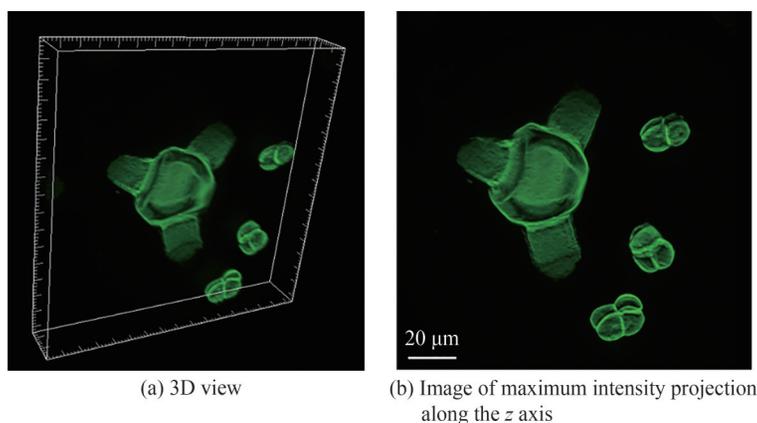


图8 花粉颗粒的三维成像结果  
Fig.8 3D image of pollen grains

### 3 结论

本文在结构光照明光切片成像理论的基础上,提出一种新的光切片图像重构算法:STD算法。该算法在原始图像信噪比和条纹对比度不高时仍然可以获得理想的光切片图像。从理论上对STD算法进行了推导,对STD算法的流程进行了说明。搭建了一套基于DMD的结构照明显微成像系统,利用该系统分别对小鼠肾脏细胞、牛肺动脉内皮细胞等样品进行了OS-SIM成像实验。结果表明,STD算法在重构效果上明显优于传统的RMS算法,能够有效降低背景噪声、消除残余条纹,实现更精细的光切片成像。STD算法对其它类型的结构照明光场也具有适用性,这将在后续的工作中开展进一步的研究。

#### 参考文献

- [1] BREUNINGER T, GREGER K, STELZER E H K. Lateral modulation boosts image quality in single plane illumination fluorescence microscopy[J]. Optics Letters, 2007, 32(13): 1938-1940.
- [2] PLANCHON T A, GAO Liang, MILKIE D E, et al. Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination[J]. Nature Methods, 2011, 8(5): 417-423.
- [3] DAN Dan, YAO Baoli, LEI Ming. Structured illumination microscopy for super-resolution and optical sectioning[J]. Chinese Science Bulletin, 2014, 59(12): 1291-1307.
- [4] HELMCHEN F, DENK W. Deep tissue two-photon microscopy[J]. Nature Methods, 2005, 2(12): 932-940.
- [5] STACHELEK P, MACKENZIE L, PARKER D, et al. Circularly polarised luminescence laser scanning confocal microscopy to study live cell chiral molecular interactions[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 553.
- [6] KRZIC U, GUNTHER S, SAUNDERS T E, et al. Multiview light-sheet microscope for rapid in toto imaging[J]. Nature Methods, 2012, 9(7): 730-733.
- [7] VETTENBURG T, DALGARNO H I C, NYLK J, et al. Light-sheet microscopy using an Airy beam[J]. Nature Methods, 2014, 11(5): 541-544.
- [8] STELZER E H K, STROBL F, CHANG Bojui, et al. Light sheet fluorescence microscopy[J]. Nature Reviews Methods Primers, 2021, 1(1): 73.
- [9] MERTZ J. Optical sectioning microscopy with planar or structured illumination[J]. Nature Methods, 2011, 8(10): 811-819.
- [10] QIAN Jia, LEI Ming, DAN Dan, et al. Full-color structured illumination optical sectioning microscopy[J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 14513.
- [11] LIN Ruizhe, KIPREOS E T, ZHU Jie, et al. Subcellular three-dimensional imaging deep through multicellular thick samples by structured illumination microscopy and adaptive optics[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 3148.

- [12] SUPEKAR O D, SIAS A, HANSEN S R, et al. Miniature structured illumination microscope for in vivo 3D imaging of brain structures with optical sectioning[J]. *Biomedical Optics Express*, 2022, 13(4): 2530–2541.
- [13] NEIL M A A, JUSKAITIS R, WILSON T. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope[J]. *Optics Letters*, 1997, 22(24): 1905–1907.
- [14] DAN Dan, LEI Ming, YAO Baoli, et al. DMD-based LED-illumination super-resolution and optical sectioning microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3(1):1116.
- [15] PATORSKI K, TRUSIAK M, TKACZYK T. Optically-sectioned two-shot structured illumination microscopy with Hilbert-Huang processing[J]. *Optics Express*, 2014, 22(8): 9517–9527.
- [16] ZHOU Xing, LEI Ming, DAN Dan, et al. Double-exposure optical sectioning structured illumination microscopy based on Hilbert transform reconstruction[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120892.
- [17] DANG Shipai, QIAN Jia, PENG Tong, et al. Background noise suppression of optical sectioning structured illumination microscopy via Fourier domain reconstruction[J]. *Frontiers in Physics*, 2022: 368.
- [18] BEERAVOLU A R, AZAM S, JONKMAN M, et al. Preprocessing of breast cancer images to create datasets for deep-CNN[J]. *IEEE Access*, 2021, 9: 33438–33463.
- [19] STERNBERG S R. Biomedical image processing[J]. *Computer*, 1983, 16(1): 22–34.
- [20] BECKER K, SAGHAFI S, PENDE M, et al. Visualizing minute details in light-sheet and confocal microscopy data by combining 3D rolling ball filtering and deconvolution[J]. *Journal of Biophotonics*, 2022, 15(2): e202100290.
- [21] SEKKO E, THOMAS G, BOUKROUCHE A. A deconvolution technique using optimal Wiener filtering and regularization[J]. *Signal Processing*, 1999, 72(1): 23–32.
- [22] FONTBONNE A, SAUER H, GOUDAIL F. Improved performance of a hybrid optical/digital imaging system with fast piecewise Wiener deconvolution[J]. *Optics Express*, 2022, 30(19): 34343–34361.
- [23] CHAN T F, WONG C K. Total variation blind deconvolution[J]. *IEEE Transactions on Image Processing*, 1998, 7(3): 370–375.
- [24] LEVIN A, WEISS Y, DURAND F, et al. Understanding and evaluating blind deconvolution algorithms[C]. 2009 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition, 2009: 1964–1971.
- [25] HOJJATOLESLAMI S A, AVANAKI M R N, PODOLEANU A G. Image quality improvement in optical coherence tomography using Lucy-Richardson deconvolution algorithm[J]. *Applied Optics*, 2013, 52(23): 5663–5670.
- [26] TSABARY A, ABOOKASIS D. Improving reconstruction of targets hidden in scattering media by introducing the Lucy-Richardson deconvolution algorithm into a system of multiview optical projections[J]. *Journal of Modern Optics*, 2022, 69(15): 850–860.

## High Fidelity Image Reconstruction of Optical Sectioning Structured Illumination Microscopy

XIE Xianfeng<sup>1,2</sup>, QIAN Jia<sup>1</sup>, LI Xing<sup>1</sup>, DANG Shipai<sup>1</sup>, BAI Chen<sup>1</sup>, MIN Junwei<sup>1</sup>,  
DAN Dan<sup>1,2</sup>, YAO Baoli<sup>1,2</sup>

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

(2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** In the research fields such as biomedicine and material science, researchers need to observe the Three-dimensional (3D) structure of samples. This promotes the development of 3D optical microscopic techniques, such as Laser Scanning Confocal Microscopy (LSCM), Light Sheet Fluorescence Microscopy (LSFM), Optical Sectioning Structured Illumination Microscopy (OS-SIM). Among them, OS-SIM has the capability of extracting the in-focus target information from the out-of-focus background of the sample to enable 3D optical imaging. The quality of the optical sectioning image is directly related to the reconstruction algorithm. Although the traditional RMS algorithm is simple, the reconstructed image is often poor when the signal-to-noise ratio and the fringe contrast of the original image are not high, and the 3D reconstructed image is not ideal. To overcome the deficiencies of the RMS algorithm, a number of methods have been proposed, such as the Fast and Adaptive Bi-Dimensional Empirical Mode Decomposition-Hilbert Spiral Transform (FABMED-HS) method, Sequence Hilbert Transform (SHT) method, Fourier-OS-SIM method. All these methods provide different ideas for realizing 3D microscopic imaging.

In this paper, we propose a new method, which can obtain high fidelity optical sectioning images. This method combines background removal and deconvolution processing, and finally obtains the optical sectioning image using standard deviation operation. Compared to the traditional RMS algorithm, the proposed method can effectively reduce the residual fringes and improve the visibility of minute details. Even in the low contrast of structured illumination where the RMS algorithm works abnormally, the STD algorithm can still perform well. Because the reconstruction formula of this method is similar to the standard deviation formula, the proposed method is named “STD (Standard Deviation) algorithm”. Experimentally, a Digital Micro-mirror Device (DMD) based structured illumination microscope is built. In this microscope, a Laser Diode Illuminator (LDI) is used as light source that provides illumination of seven wavelength channels. The DMD has a resolution of  $1\,920 \times 1\,080$  pixels, with a pixel size of  $7.56\ \mu\text{m} \times 7.56\ \mu\text{m}$ . The SCOMS camera has a resolution of  $2\,048 \times 2\,048$  pixels, with a pixel size of  $6.5\ \mu\text{m} \times 6.5\ \mu\text{m}$ . Firstly, we compare the reconstructed images of STD algorithm and RMS algorithm using mouse kidney cells and Bovine Pulmonary Artery Endothelial (BPAE) cells as samples. The experimental results demonstrate that RMS algorithm has better optical sectioning capability. The STD algorithm is also applied to previously collected data with a mite as the sample. The experimental results again suggest the robustness of the STD algorithm. And then, we find that changing the illumination wavelength has little effect on the imaging position, which makes it possible to optical sectioning at multiple wavelengths. We obtain dual-wavelength fluorescence images by using 470 nm and 555 nm to excite the mouse kidney cells samples. Finally, 3D imaging experiments is performed with pollen samples. The field-of-view of the image is  $163.84\ \mu\text{m} \times 163.84\ \mu\text{m}$ . We took 125 layers of images, each thickness is 200 nm. Using the STD algorithm, we get sharp 3D images. All the above experimental results demonstrate that the STD method can obtain better optical sectioning 3D images compared to the RMS method.

**Key words:** Structured illumination microscopy; Optical sectioning; Three-dimensional optical microscopy; Image reconstruction; Standard deviation

**OCIS Codes:** 110.3010; 100.2980; 100.1830