光电技术及应用

DOI：10.16818/j.issn1001－5868.20241221001

基于超瑞利散斑调制的荧光显微成像

张可凡[1,2]，王中阳[1,2*]

（1. 中国科学院上海高等研究院，上海 201210；2. 中国科学院大学，北京 100049）

摘　要： 光学衍射极限使得显微成像分辨率被限制在半波长量级。基于稀疏约束鬼成像的超分辨荧光显微技术（Nanoscopy based on Ghost Imaging via Sparsity Constraints，GISC-Nanoscopy）采用随机相位调制器对荧光信号进行空间分散，导致所采集图像信噪比降低。针对传统GISC-Nanoscopy存在信噪比不足问题，提出在系统中引入超瑞利散斑调制，利用超瑞利散斑统计分布的衰减速率较传统负指数分布更快的特性，使信号能更集中且空间对比度更高。经优化后的系统可生成对比度超过1的超瑞利散斑，相较于传统GISC-Nanoscopy系统，改进系统采集的荧光信号信噪比提升超过5 dB，重构图像归一化均方误差降低30%，单分子定位精度提高3 nm。

关键词： 超分辨成像；超瑞利散斑；荧光显微成像；稀疏约束

中图分类号： O436　**文章编号：** 1001－5868(2025)01－0083－07

Fluorescence Microscopic Imaging Based on Super-Rayleigh Speckle Modulation

ZHANG Kefan[1,2], WANG Zhongyang[1,2]

（1. Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, CHN; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, CHN）

Abstract: The optical diffraction limit restricts microscopic imaging resolution to the half-wavelength scale. Conventional Ghost Imaging via Sparsity Constraints-based Nanoscopy (GISC-Nanoscopy), which utilizes random phase modulators to spatially disperse fluorescence signals, suffers from reduced signal-to-noise ratio (SNR) in captured images. To address the inherent SNR limitations of traditional GISC-Nanoscopy, we propose integrating super-Rayleigh speckle modulation into the system. By leveraging the faster attenuation rate of super-Rayleigh speckle statistical distributions compared to conventional negative exponential distributions, this approach concentrates signal energy more effectively and enhances spatial contrast. The optimized system generates super-Rayleigh speckles with a contrast exceeding 1. Specifically, the enhanced system demonstrates a fluorescence signal SNR improvement exceeding 5 dB, a 30% reduction in normalized mean square error (NMSE) for reconstructed images and a 3 nm improvement in single-molecule localization accuracy compared to conventional GISC-Nanoscopy.

Key words: super-resolution imaging; super-Rayleigh speckle; fluorescence microscopy; sparsity constraints

0　引言

荧光显微镜通过利用染料分子对生物体特异性功能区域进行标记并收集激光的荧光信号实现对透明细胞的观测，成为研究生物体内部的微观结构和相互作用的过程的重要工具，并被广泛应用于

收稿日期：2024－12－10.

*通信作者：王中阳

细胞形态学[1-2]、细胞特异性表达[3]、活细胞成像[4-5]等领域。然而,由于传统的光学显微镜分辨率受衍射极限d($d = 0.61\lambda/NA$,λ表示光的波长,NA为显微镜物镜的数值孔径)的影响,使其无法观测半波长以下的精细结构,例如线粒体、内质网[6]等。

近年来,荧光超分辨技术的提出使得在衍射极限下观察样品精细结构成为可能。主流的超分辨荧光显微技术主要有三种:随机光学重构(Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM)[7]、受激辐射损耗(Stimulated Emission Depletion Microscopy, STED)[8]以及结构光照明(Structured Illumination Microscopy, SIM)[9]技术。其中,STED技术通过两束激光同时照射样品,一束激光用来激发荧光分子使其处于激发态,同时另一束中心光强为零的环形光使得该区域通过受激辐射损耗过程返回基态而不自发辐射荧光,从而获得超衍射极限的荧光发光点。然而,环形光的高功率会导致对生物样品的损伤较大,同时点扫描的方式会限制成像视场的大小,且扫描速度较慢,这些因素共同导致活细胞成像困难。SIM技术则通过特定的摩尔纹照明,使物体的高频信息迁移至低频区域进而被成像系统采集。然而,由于需要完全收集不同区域的高频信息,SIM技术通常需要进行多帧采集。目前,至少需要9帧图像才能实现完整的超分辨成像[10]。以单分子定位技术为核心的STORM和光敏化定位显微镜[11-12]等,则利用荧光分子自身固有性质或通过光诱导来获得荧光信号的随机闪烁,分别对单个荧光分子进行定位,再通过多帧叠加实现超分辨,具有极高的分辨率。在极高的信噪比条件下,定位精度可达到20 nm。然而,基于单分子定位的技术为实现精准定位,单帧采集只能获得极低密度的荧光分子。因此,在成像过程中往往需要采集成千上万帧图像进行重构,其漫长的采集过程极大降低了成像速度。

为了缩短采样STORM等技术的采样帧数,Huang等提出将压缩感知与STORM结合的CS-STORM技术[13],利用凸优化算法实现压缩采样,采样帧数可以从几万帧缩短到几百帧,单帧重构的分子密度可达7.8 μm^{-2}。2018年,Nehme等利用卷积神经网络(Deep-STORM)[14]实现了单帧重构密度6 μm^{-2}。近年来,Li等将压缩感知和鬼成像相结合并运用于超分辨显微镜中,实现基于稀疏约束鬼成像的超分辨荧光显微镜(Nanoscopy based on Ghost Imaging via Sparsity Constraints, GISC-Nanoscopy)[15]。该种技术不需要利用复杂激发方式或荧光染料的闪烁特性,可以实现单帧超分辨成像,系统分辨率可达80 nm。该技术还可以与STORM技术结合实现高密度定位,单帧的定位密度可达143 μm^{-2},定位精度低于25 nm。尽管如此,GISC-Nanoscopy的随机相位调制器将荧光信号调制为散斑信号,因此相较于传统STORM技术采集的荧光信号信噪比更差。同时,由于用于特定标记的荧光分子在每个闪烁周期内的发出的光子数有限。这导致该技术在单个闪烁周期、低荧光分子密度情况下,无法收集到有效的荧光信号。

为解决上述问题,实验基于GISC-Nanoscopy系统,通过幂次运算与逆传播方法,重新设计了空间光调制器(Spatial Light Modulator, SLM)的随机相位分布函数。该调制分布函数可以将原有GISC-Nanoscopy中的随机瑞利散斑场调制为超瑞利散斑场。超瑞利散斑场使得原本快速衰减的负指数分布的散斑场变为衰减较快的不服从负指数分布的散斑场,从而具有更高的散斑对比度。

1 方法与原理

由于GISC-Nanoscopy技术的分辨能力对信噪比较为敏感,而相位调制器会将荧光信号分散,使得信噪比降低。为解决上述问题,引入超瑞利散斑对荧光显微系统进行调制,从而使荧光显微系统信噪比得到提升。

1.1 超瑞利散斑特性

超瑞利散斑统计是将光集中到较少的明亮颗粒上而产生的,与瑞利散斑相比,超瑞利散斑强度分布衰减比负指数快,提高了检测到高强度的统计概率。鬼成像系统的成像性能在理论上与散斑分布的对比度C密切相关,系统生成的散斑对比度越高,通过优化算法所得重构图像的信噪比就越高。

1.2 GISC-Nanoscopy系统

在GISC-Nanoscopy系统的基础上将随机相位调制器更换成经特定设计的SLM,使得探测面所探测到的散斑为超瑞利散斑,GISC-Nanoscopy系统如图1所示。光路组成部分包括:物镜焦距f_1,数值孔径NA_1,物镜到成像透镜的距离L,成像透镜焦距f_2,成像透镜到第一成像面距离d_1,第一成像面到SLM距离z_1,SLM到散斑探测面距离z_2。具体数值

为 f_1=1.8 mm，d_0=f_1，L=20 cm，NA_1=1.49，f_2=180 mm，d_1=f_2。

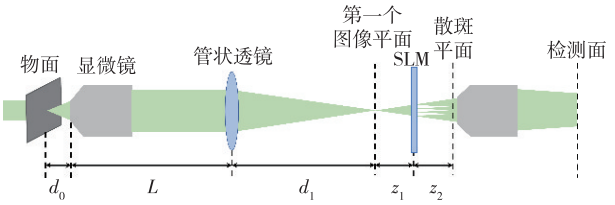


图1　GISC-Nanoscopy成像光路仿真模型

物面光源在经过物镜、成像透镜后在第一成像面成像，该像经过SLM调制后在散斑面得到散斑场，经物镜放大后由探测器探测。

1.3　超瑞利散斑生成方案与理论推导

实验基于菲涅尔逆传播的超瑞利散斑生成方案进行超瑞利散斑生成。具体步骤如图2所示。

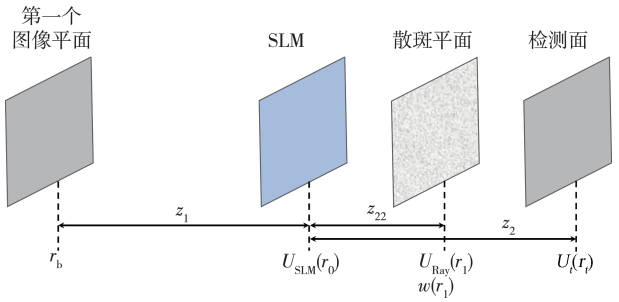


图2　基于逆传播的超瑞利散斑生成方案示意图

（1）在SLM所在面产生相位在0～2π范围内均匀分布的随机相位，通过光场自由传播z_{22}距离后，在散斑面得到瑞利散斑场$U_{Ray}(r_1)$；

（2）通过对瑞利散斑场进行n次幂运算（n为正整数），得到超瑞利散斑场：

$$w(r_1)=(U_{Ray}(r_1))^n \tag{1}$$

（3）随后，对超瑞利散斑场$w(r_1)$做菲涅耳衍射的逆运算，实现反向传播z_{22}后到达SLM所在平面，并得到相应的光场分布：

$$U_{SLM}(r_0)=\frac{j}{\lambda z_{22}}\exp(-j\frac{2\pi z_{22}}{\lambda})\cdots \int_{-\infty}^{\infty} w(r_1)\exp[-j\frac{\pi}{\lambda z_{22}}(r_0-r_1)^2]\mathrm{d}r_1 \tag{2}$$

（4）提取出该光场分布的相位与振幅，将该光场分布赋给SLM；

（5）假设在距SLM距离为z_1的地方有一点光源，点光源传播到SLM前的光场为：

$$U_0(r_0)=\exp[j\frac{2\pi z_1}{\lambda}\sqrt{1+(\frac{r_0-r_b}{z_1})^2}] \tag{3}$$

考虑到傍轴近似：

$$\frac{r_0-r_b}{z_1}\ll 1 \tag{4}$$

利用泰勒展开，公式（3）可简化为：

$$U_0(r_0)\approx\exp[j\frac{2\pi z_1}{\lambda}+j\frac{\pi}{\lambda z_1}(r_0-r_b)^2] \tag{5}$$

（6）$U_0(r_0)$经过SLM调制后，在自由空间内传播距离z_2得到超瑞利散斑$U_t(r_t)$，根据菲涅耳衍射，其光场分布为：

$$U_t(r_t)=\frac{1}{j\lambda z_2}\exp(j\frac{2\pi z_2}{\lambda})\cdots \int U_0(r_0)U_{SLM}(r_0)\exp[j\frac{\pi}{\lambda z_2}(r_t-r_0)^2]\mathrm{d}r_0 \tag{6}$$

已知$U_t(r_t)$，接下来计算散斑对比度C：

$$C=\sqrt{\frac{<I_t(r_t)^2>}{<I_t(r_t)>^2}-1} \tag{7}$$

其中，

$$<I_t(r_t)^2>=<(U_t(r_t)U_t^*(r_t))^2> \tag{8}$$

$$<I_t(r_t)>^2=<U_t(r_t)U_t^*(r_t)>^2 \tag{9}$$

由于瑞利散斑场$U_{Ray}(r_1)$的自相关函数满足瑞利分布，其自相关函数可以表达为：

$$<U_{Ray}(r_1)U_{Ray}{}^*(r_1)>=\frac{\exp(\frac{-(r_1-r_1')^2}{2\sigma^2})}{\sqrt{2\pi\sigma}} \tag{10}$$

式中，σ为光场分布标准差。

因此，传输光在经过基于逆传播的相位调制后继续传播到探测面时的散斑对比度可简化为：

$$C=1+\frac{\sum_{k=0}^{n-1}(C_n^k)^4[k!(n-k)!]^2}{(n!)^2}\Big/\frac{k(n-k)z_2{}^2\lambda^2[1-\frac{1}{(\gamma+\tau)}]^2}{\pi^2\sigma^4} \tag{11}$$

式中，$\gamma=\frac{z_{22}}{z_2}$，$\tau=\frac{z_{22}}{z_1}$。

根据公式（11）可知，对比度与传输距离z_1，z_2，z_{22}以及超瑞利幂次运算n有关。为获取最大对比度，接下来分析影响超瑞利散斑生成的因素。

1.4　影响超瑞利散斑生成的因素

对于生成的超瑞利散斑，其对比度越高，对系统信噪比提升越好。因此，对不同因素进行研究来得到高对比度的超瑞利散斑。

1.4.1　传播距离

由公式（11）可知，要在探测面得到对比度最大

的散斑，需满足：

$$1-\frac{1}{(\gamma+\tau)}=0 \tag{12}$$

式中，$\gamma=\frac{z_{22}}{z_2}$，$\tau=\frac{z_{22}}{z_1}$。

即对于传播产生瑞利散斑的距离z_{22}需要满足：

$$z_{22}=\frac{z_1 z_2}{z_1+z_2} \tag{13}$$

因此，在获得高对比度散斑时将距离参数z_{22}调整到满足公式(13)。

1.4.2 幂次运算参数n

由公式(11)可知，散斑对比度与散斑幂次数n有关。进一步使用Matlab程序进行仿真，选取系统参数z_1=8 mm，z_2=16 mm，得到不同n值下的散斑对比度。如图3所示，散斑对比度随幂次数n的增加而增加。当幂次为4，8和10时，其对比度分别为1.0624，1.4532和2.3910，对应散斑如图4所示。

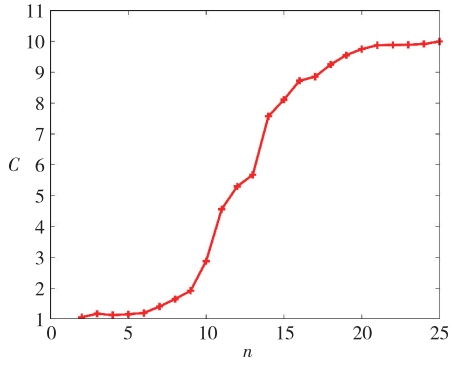
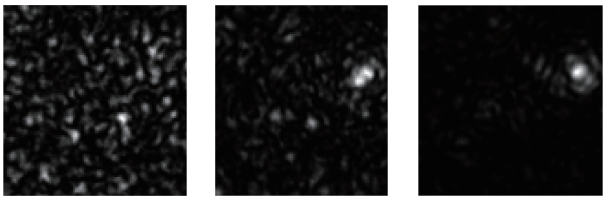


图3 超瑞利散斑对比度与散斑幂次数的关系



(a) n=4，C=1.0624 (b) n=8，C=1.4532 (c) n=10，C=2.3910

图4 不同幂次下生成超瑞利散斑及对比度

2 超瑞利散斑的统计分布与荧光显微系统信噪比对比

上述研究结果表明，经过改良后的显微成像系统可以得到对比度显著提升的超瑞利散斑，接下来对传输系统进行模拟仿真，分析两种散斑的统计分布并评估两种荧光显微系统在信噪比方面的表现。

2.1 散斑的统计分布对散斑对比度及平均颗粒尺寸影响

散斑的统计分布的差异造成了散斑对比度数值的变化，进一步影响散斑平均颗粒尺寸大小。

通过仿真模拟，当z_1=8 mm，z_2=16 mm时，GISC-Nanoscopy系统产生的瑞利散斑对比度大小为0.9892，对应散斑如图5所示。

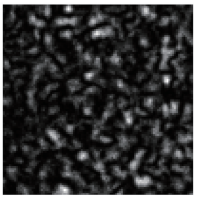


图5 C=0.9892的瑞利散斑

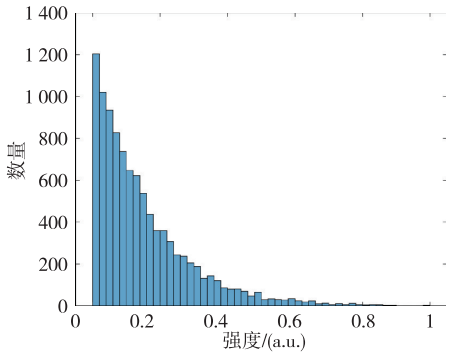
瑞利散斑(如图5所示)与超瑞利散斑(如图4(b)所示)概率分布图如图6(a)和(b)所示，超瑞利散斑统计分布较瑞利散斑更集中。而散斑的统计分布决定了散斑对比度：

$$C=\frac{\sigma_I}{<I>}=\sqrt{\frac{<I^2>}{<I>^2}-1} \tag{14}$$

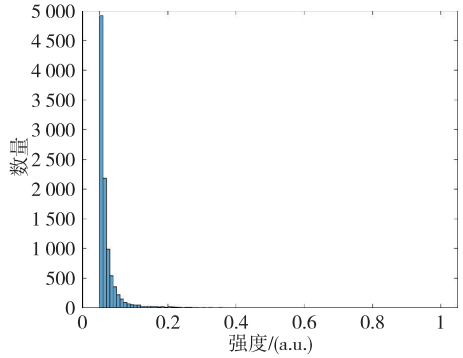
式中，σ_I为散斑统计分布的标准差，运算符号$<\cdot>$表示系综平均。

由公式(14)可知，散斑对比度与散斑统计分布标准差成正相关。散斑统计分布越集中，标准差越大，对比度越大。

散斑统计分布在影响对比度大小的同时，也影响散斑平均颗粒尺寸大小。散斑平均颗粒尺寸可通过移动物面点光源并计算经过荧光显微系统后的散斑相关度及散斑自相关度获得。如图7所示为图4(b)与图5中散斑的自相关度，计算得到瑞利散斑的平均颗粒尺寸为23 μm，超瑞利散斑的平均颗粒尺寸为33 μm。再次表明超瑞利散斑统计分布更集中。



(a) 瑞利散斑



（b）超瑞利散斑

图 6　瑞利散斑与与超瑞利散斑概率分布图

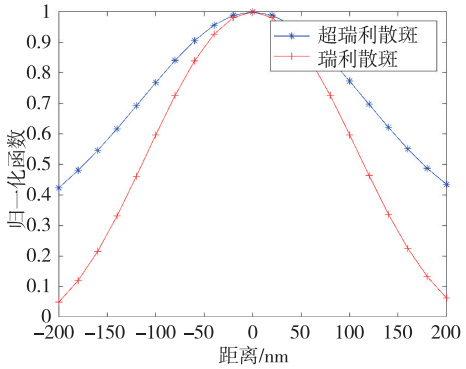


图 7　超瑞利散斑与瑞利散斑自相关度

2.2　超瑞利散斑与瑞利散斑信噪比对比

显微系统容易被噪声干扰，可能会导致信号被湮灭，因此提升信噪比对荧光显微系统至关重要。信噪比计算式为：

$$SNR = 10\log_{10}(\overline{I_0}/\overline{I_n}) \tag{15}$$

式中，$\overline{I_0}$表示散斑场信号强度的均值，$\overline{I_n}$表示探测噪声强度的均值。

通过添加具有不同光子数的荧光分子来模拟相应情况下的瑞利散斑场与超瑞利散斑场，计算了相同光子数条件下瑞利散斑场与超瑞利散斑场的信噪比。仿真结果如图 8 所示，随着总光子数的增加，两种散斑调制下的信噪比均有提升，但超瑞利散斑的抗噪性能较瑞利散斑提升更加明显，较瑞利散斑调制荧光显微系统提升了 5 dB。当采集的光子数在 100 万时，超瑞利散斑的信噪比可以达到 20 dB 以上。

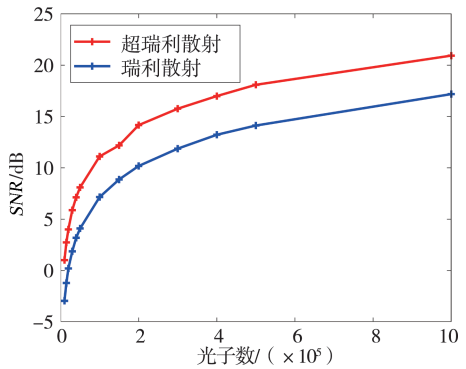


图 8　超瑞利散斑与瑞利散斑信噪比曲线

3　散斑调制荧光显微系统的重构成像对比

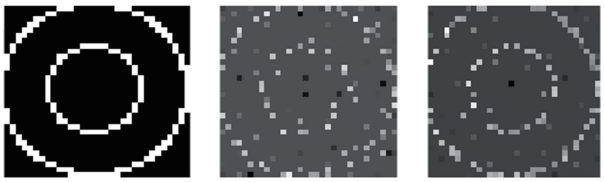
由第 2 节可知，在超瑞利散斑调制下的荧光显微系统信噪比相较于瑞利散斑调制下的荧光显微系统具有显著提升。通过构建双圆环，可进一步对比两种调制下的重构效果。重构采用正交匹配追踪算法（Orthogonal Matching Pursuit，OMP），评估两种调制下的重构效果，并计算单分子定位精度与归一化均方误差：

$$NMSE = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}(y_i - \hat{y}_i)^2 \Big/ \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}y_i^{\,2} \tag{16}$$

式中，N为图像大小，y_i为第 i 个重构图像，$\widehat{y_i}$为第 i 个预测重构图像，$\bar{y}$为重构图像均值。

3.1　圆环重构

圆环通常被用于检测系统重构效果。实验构造了一个内外直径分别为 80 nm，160 nm 的双圆环（图 9(a)）作为物面输入，经两种荧光显微系统传输后得到不同散斑图，再经过 OMP 算法进行处理得到两种圆环重构结果，如图 9(b)和(c)所示，超瑞利散斑重构的圆环相对于瑞利散斑的重构结果更加清晰。



（a）双圆环　（b）瑞利散斑　（c）超瑞利散斑

图 9　圆环重构图

同时分别计算噪声下不同光子数时，两种调制荧光显微系统经重构得到的双圆环与原始双圆环图像的归一化均方差误差（NMSE）。如图 10 所示，两种调制荧光显微系统在光子数越大的情况下，重构效果越好，且超瑞利散斑调制荧光显微系统的 NMSE 比瑞利散斑调制荧光显微系统更小。

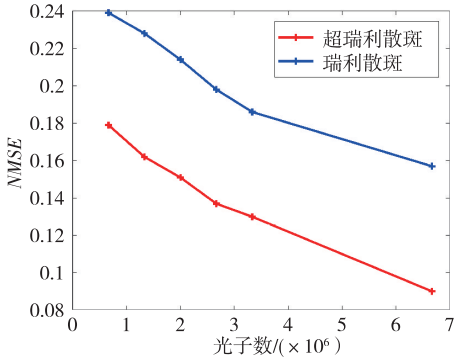


图10 超瑞利散斑与瑞利散斑荧光显微系统进行圆环重构后在不同光子数下的NMSE

3.2 单分子定位精度

单分子定位精度反映了系统对单个荧光分子在空间位置上的精确测定能力。计算了瑞利散斑与超瑞利散斑调制下的单分子定位精度来分析荧光显微系统性能。

基于瑞利散斑与超瑞利散斑重构的单分子定位精度如图11所示，经过超瑞利散斑调制的荧光显微系统，在不同光子数下的单分子定位精度比瑞利散斑调制的荧光显微系统更精确，表明经超瑞利散斑调制的荧光显微系统的定位精度更高，性能更优越。

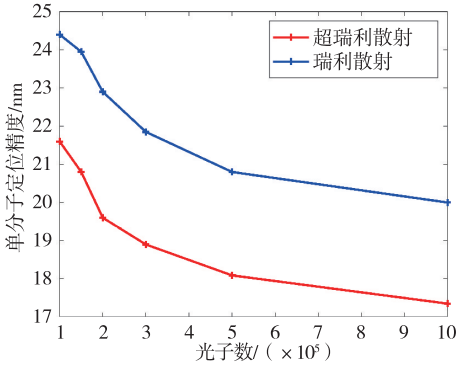


图11 不同散斑调制下的单分子定位精度

4 结论

本文研究了基于超瑞利散斑调制的荧光显微系统，通过引入空间光调制器对系统中的相位调制进行改良，得到超瑞利散斑，并分析了散斑统计分布。超瑞利散斑调制的引入，提升了系统信噪比，解决了GISC-Nanoscopy中存在的信噪比较低的问题。与传统的GISC-Nanoscopy技术相比，信噪比提升了5 dB。结合OMP算法对圆环进行重构，重构结果的NMSE较传统GISC-Nanoscopy降低了30%，在不同光子数下的单分子定位精度均提升约3 nm。因此，基于超瑞利散斑调制的荧光显微系统为活细胞成像提供了一种新的可参考路径。

参考文献：

[1] Mandelkow R, Gümbel D, Ahrend H, et al. Detection and quantification of nuclear morphology changes in apoptotic cells by fluorescence microscopy and subsequent analysis of visualized fluorescent signals[J]. Anticancer Research, 2017, 37(5): 2239-2244.

[2] Roukos V, Pegoraro G, Voss T C, et al. Cell cycle staging of individual cells by fluorescence microscopy [J]. Nature Protocols, 2015, 10(2): 334-348.

[3] McCool J D, Long E, Petrosino J F, et al. Measurement of SOS expression in individual Escherichia coli K-12 cells using fluorescence microscopy[J]. Molecular Microbiology, 2004, 53(5): 1343-1357.

[4] Ettinger A, Wittmann T. Chapter 5 Fluorescence live cell imaging[J]. Methods in Cell Biology, 2014, 123: 77-94.

[5] Hiraoka Y, Shimi T, Haraguchi T. Multispectral imaging fluorescence microscopy for living cells[J]. Cell Structure and Function, 2002, 27(5): 367-374.

[6] McCutchen C W. Superresolution in microscopy and the abbe resolution limit[J]. JOSA, 1967, 57(10): 1190-1192.

[7] Bates M, Jones S A, Zhuang X. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM): a method for superresolution fluorescence imaging[J]. Cold Spring Harbor Protocols, 2013, 2013(6): 498-520.

[8] Sigal Y M, Zhou R, Zhuang X. Visualizing and discovering cellular structures with super-resolution microscopy [J]. Science, 2018, 361(6405): 880-887.

[9] Hao X, Kuang C, Wang T, et al. Effects of polarization on the de-excitation dark focal spot in STED microscopy[J]. Journal of Optics, 2010, 12(11): 115707.

[10] 肖 康，田立君，王中阳. 基于深度学习的低信噪比下的快速超分辨荧光显微成像[J]. 中国激光，2020，47(10)：1007002.
Xiao Kang, Tian Lijun, Wang Zhongyang. Fast super-resolution fluorescence microscopy imaging with low signal-to-noise ratio based on deep learning[J]. Chinese Journal of Lasers, 2020, 47(10): 1007002.

[11] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution[J]. Science, 2006, 313(5793): 1642-1645.

[12] 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.

[13] Zhu L, Zhang W, Elnatan D, et al. Faster STORM using compressed sensing [J]. Nature Methods, 2012, 9(7):

721-723.

[14] Nehme E, Weiss L E, Michaeli T, et al. Deep-STORM: super-resolution single-molecule microscopy by deep learning [J]. Optica, 2018, 5(4): 458.

[15] Li W, Tong Z, Xiao K, et al. Single-frame wide-field nanoscopy based on ghost imaging *via* sparsity constraints[J]. Optica, 2019, 6(12): 1515.

作者简介：

张可凡(1998—)，女，河南省南阳市人，硕士研究生，主要研究方向为超分辨成像；

王中阳(1969—)，男，浙江省安吉县人，博士，研究员，主要研究方向为超分辨成像、超分辨光刻及超快光谱技术。