

文章编号: 1001-3806(2016)05-0638-05

基于荧光微球的显微镜点扩散函数修正模型

鹿伟民^{1,2,3}, 杨西斌¹, 文 刚¹, 郑贤良¹, 李 辉¹, 熊大曦^{1*}

(1. 中国科学院 苏州生物医学工程技术研究所 江苏省医用光学重点实验室, 苏州 215163; 2. 中国科学院 长春光学精密机械与物理研究所, 长春 130033; 3. 中国科学院大学 材料科学与光电技术学院, 北京 100039)

摘要: 为了修正显微镜点扩散函数荧光微球传统测量方法中微球直径对测量结果的影响、提高显微镜点扩散函数的测量精度, 采用理论仿真、最小二乘拟合的方法, 建立荧光微球等效 2 维浓度分布, 模拟仿真了荧光微球显微成像过程; 利用最小二乘拟合以及残差拟合的方法, 得到荧光微球直径、荧光微球强度分布半峰全宽与系统实际点扩散函数半峰全宽之间的关系模型, 由此模型得到较为准确的系统点扩散函数半峰全宽。结果表明, 使用 100nm 荧光微球对系统点扩散函数进行测量时, 相对误差在 1% 左右。此研究结果说明通过该修正模型可以得到较为准确的系统点扩散函数。

关键词: 显微; 点扩散函数; 荧光微球; 非线性最小二乘拟合

中图分类号: O439 文献标志码: A doi:10.7510/jgjs.issn.1001-3806.2016.05.005

An optimized model of point spread function of microscopy based on fluorescence beads

LU Weimin^{1,2,3}, YANG Xibin¹, WEN Gang¹, ZHENG Xianliang¹, LI Hui¹, XIONG Daxi¹

(1. Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China; 2. Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130033, China; 3. College of Materials Science and Opto-Electronic Technology, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: In order to eliminate effect of fluorescent bead diameter on measurement results in traditional microscopic point spread function measurement method and improve the measurement accuracy, 2-D equivalent concentration distribution of fluorescent beads was deduced based on theoretical simulation and least square fitting method. The imaging process of fluorescent beads was simulated. The relationships among fluorescent beads diameter, full width at half maximum (FWHM) of fluorescent beads intensity distribution and FWHM of system point spread function were analyzed by using the least square fitting method and residual error fitting method. Precise FWHM correction model of point spread function was obtained. The results show that the relative error of point spread function FWHM is about 1% when measuring system point spread function with 100nm fluorescent beads. The precise measurement of point spread function is realizable with the optimized model.

Key words: microscopy; point spread function; fluorescent bead; nonlinear least square fitting

引 言

理想点光源经过光学系统后, 其像的光场分布被称为系统的点扩散函数 (point spread function, PSF)。点扩散函数描述了光学系统对点源的解析能力, 是评价各种显微成像系统的主要参量指标^[1-2]。因此, 精确

测量系统点扩散函数是不可或缺的。近些年来发展的超分辨率荧光显微成像技术对点扩散函数的精确测量提出了更高的要求, 例如随机光学重构显微镜 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM) 和光激活定位显微镜 (photoactivated localization microscopy, PALM) 需要用精确的点扩散函数去拟合每个荧光点, 精确定位每个荧光点的中心位置^[3-5]; 结构光照明显微镜 (structured illumination microscopy, SIM) 图像重构中需要精确估计系统的点扩散函数, 从而得到准确的光学传递函数 (optical transfer function, OTF) 进行去卷积, 获得超分辨率图像^[6-9]。

通常估计点扩散函数有两种方式: 数值计算和物理测量。数值计算通常使用透镜理论点扩散函数模

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (61475185); 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (61405238); 中国科学院百人计划资助项目

作者简介: 鹿伟民 (1990-), 男, 硕士研究生, 主要从事超分辨率显微成像的研究。

* 通讯联系人。E-mail: xiongdaxi@sibet.ac.cn

收稿日期: 2015-07-07; 收到修改稿日期: 2015-07-16

型^[10],由于瞳函数难以准确估计,使得理论模型不能反映实际的成像系统,因此,需要对具体每套成像装置进行点扩散函数的精确物理实验测量。

物理测量通常使用荧光微球检测方法,其基本原理是对纳米尺寸的荧光微球成像,得到显微镜聚焦平面的荧光微球强度分布函数 (beads spread function, BSF)。如果荧光微球的直径足够小,其 BSF 可近似为显微镜系统的点扩散函数 PSF。荧光微球直径越小,记录的荧光强度越小,导致图像信噪比降低,最终测量结果精度降低。通常采用 100nm ~ 200nm 直径的荧光微球才能得到足够的图像信噪比,这时微球的直径与系统点扩散函数的半峰全宽 (full width at half maximum, FWHM) 相近,其影响不可忽略,因此需要对 BSF 进行修正才能得到系统准确的 PSF^[11]。

为了消除荧光微球直径对测量结果的影响,研究人员采用高斯模型^[12]、贝塞尔模型^[13]等不同的点扩展函数模型,对实验得到的荧光微球强度分布进行拟合,重建点扩展函数,并通过荧光微球直径 D_{bead} , PSF 半峰全宽 F_{PSF} 和 BSF 半峰全宽 F_{BSF} 三者的关系,建立了不同修正模型。HIRVONEN 等人将荧光微球等效 2 维浓度分布近似为高斯分布,得到特殊的双曲线关系模型^[14];THEER 等人将荧光微球等效 2 维浓度分布近似为矩形脉冲分布,并通过残差拟合的方法,得到改进的双曲线关系模型^[11]。这两种模型都对荧光微球等效 2 维浓度分布做了近似,随着荧光微球直径越大,荧光微球对 BSF 的影响也越大,近似处理带来的误差越大,进而导致 F_{PSF} 误差增加。本文中建立了高精度的荧光微球等效 2 维浓度分布模型,通过其与 2 维点扩散函数的卷积模拟对荧光微球的成像过程,提出了新的关系模型,并运用残差分析和非线性最小二乘拟合的方法获取模型相关参量,最后通过实验验证了本文中模型的准确性。

1 PSF 测量原理与关系模型建立

1.1 PSF 测量原理

光学显微镜成像系统可以认为是一个线性时不变系统^[15]。当给定输入信号和系统的传递函数时,系统的输出就唯一确定,即:

$$d(x, y) = f(x, y) \otimes h(x, y) + n(x, y) \quad (1)$$

式中, \otimes 是卷积符号, $f(x, y)$ 为系统的输入信号, $h(x, y)$ 为系统的传递函数, $n(x, y)$ 为系统的噪声, $d(x, y)$ 为系统的输出信号。

对于光学显微镜成像系统,系统的点扩展函数即系统的传递函数,样品真实的结构信息即输入信号, CCD 上采集到的样品图像即系统的输出信号。由(1)

式及冲激函数的卷积性质^[16]可知,当样品结构信号 $f(x, y)$ 近似为冲激函数,且采集到的样品图像信息 $d(x, y)$ 信噪比足够高时, $d(x, y)$ 就可近似为光学显微镜成像系统的点扩展函数 $P(x, y)$ 。

假设理想荧光微球荧光浓度均匀^[17],其物理模型如下:

$$f_{\text{bead}}(x, y, z) = \begin{cases} C_0, & (\sqrt{x^2 + y^2 + z^2} \leq D_{\text{bead}}/2) \\ 0, & (\text{otherwise}) \end{cases} \quad (2)$$

式中, $f_{\text{bead}}(x, y, z)$ 为荧光微球 3 维荧光浓度分布, C_0 为常数, D_{bead} 为荧光微球直径。其等效 2 维浓度分布应为微球荧光浓度沿 z 轴的积分,即:

$$f_{\text{bead}}(x, y) = \begin{cases} 2C_0 \sqrt{(D_{\text{bead}}/2)^2 - (x^2 + y^2)}, & (\sqrt{x^2 + y^2} \leq D_{\text{bead}}/2) \\ 0, & (\text{otherwise}) \end{cases} \quad (3)$$

式中, $f_{\text{bead}}(x, y)$ 为荧光微球等效 2 维荧光浓度分布。

本文中选用第 1 类 1 阶贝塞尔点扩展函数模型^[13]作为光学显微镜成像系统的点扩展函数:

$$P(x, y) = \frac{2\mathbf{J}_1 \left[\frac{2\pi N}{\lambda} \sqrt{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2} \right]}{\frac{2\pi N}{\lambda} \sqrt{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2}} \quad (4)$$

式中, \mathbf{J}_1 表示第 1 类 1 阶贝塞尔函数, N 表示系统的数值孔径, λ 表示荧光微球发射波波长, x_0 和 y_0 表示点扩展函数的中心坐标。根据瑞利衍射极限:

$$F_{\text{PSF}} = \frac{0.512\lambda}{N} \quad (5)$$

式中, F_{PSF} 为 $P(x, y)$ 的半峰全宽,由以上两式得到:

$$P(x, y) = \frac{2\mathbf{J}_1 \left[\frac{1.024\pi}{F_{\text{PSF}}} \sqrt{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2} \right]}{\frac{1.024\pi}{F_{\text{PSF}}} \sqrt{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2}} \quad (6)$$

由(6)式可知,系统的点扩散函数可由 F_{PSF} 唯一确定,故只需精确得到 F_{PSF} ,即可准确得到系统的点扩散函数。

通过 $P(x, y)$ 与 $f_{\text{bead}}(x, y)$ 的卷积,仿真荧光微球显微成像过程,得到不同直径荧光微球在同一系统下的荧光微球强度分布 $B(x, y)$,如图 1 所示。荧光微球强度分布 $B(x)$ 与系统点扩散函数荧光微球强度分布 $P(x)$ 并不一致。故需根据荧光微球强度分布 $B(x, y)$ 得到荧光微球强度分布的半峰全宽 F_{BSF} ,进而得到 D_{bead} , F_{BSF} 和 F_{PSF} 三者关系,如图 2a 中实点所示。根据三者关系最终得到系统的点扩散函数。

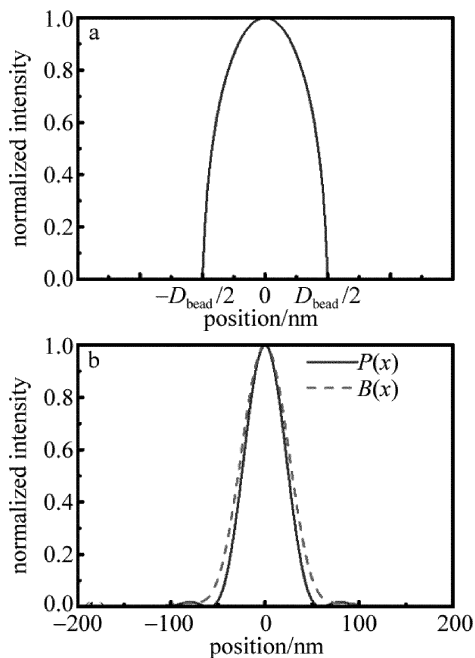


Fig. 1 a—equivalent 2-D concentration distribution of beads b—PSF and BSF intensity profiles

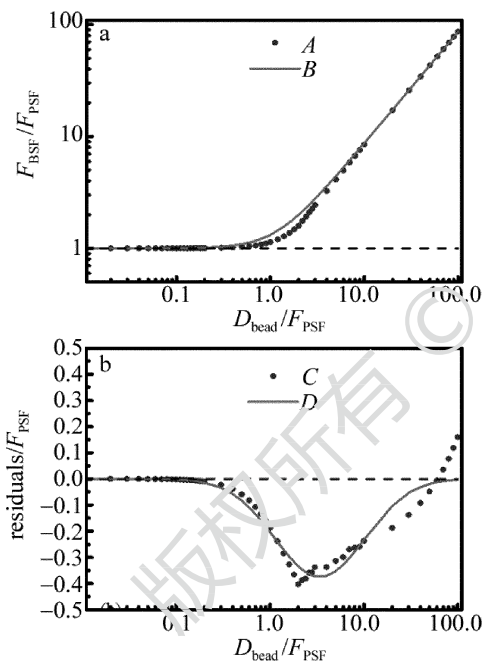


Fig. 2 a—the revised fitting curve of data of formula (7) b—the fitting curve of residuals

由图 1a 可知,当 D_{bead} 足够小时,可以将荧光微球近似为脉冲信号。为了表示出 PSF 与 BSF 的区别,图 1b 中展示了 $F_{\text{PSF}} = D_{\text{bead}}$ 时二者卷积得到的 BSF。其中, $P(x)$ 为 PSF 1 维强度分布, $B(x)$ 为 BSF 1 维强度分布。从图中可以看出, $B(x)$ 与 $P(x)$ 分布有明显差别,二者的半峰全宽也不相同。故为了得到精确的 PSF,需要从探测到的 BSF 中提取出 F_{PSF} 并代入(6)式,得到系统的 PSF。

1.2 BSF 与 PSF 半峰全宽的关系模型

通过对传统双曲线模型的分析,建立如下模型:

$$F_{\text{BSF}} = \sqrt{F_{\text{PSF}}^2 + aD_{\text{bead}}^2} \quad (7)$$

式中, a 为待求参量。

利用该模型对图 2a 中的数据点进行非线性最小二乘拟合,得到参量 a 的值为 0.7464,拟合均方根误差为 0.1938。拟合曲线如图 2a 中曲线 B 所示。

图 2a 中的 A 为原始数据点, B 为(7)式曲线;图 2b 中的 C 为(7)式的相对残差, D 为(8)式对相对残差 C 的拟合曲线。由图可知,(7)式模型 $D_{\text{bead}}/F_{\text{PSF}} \leq 0.6$ 和 $D_{\text{bead}}/F_{\text{PSF}} \geq 4$ 时,对仿真数据的拟合效果较好;在 $0.6 < D_{\text{bead}}/F_{\text{PSF}} < 4$ 的中间区域,拟合效果较差。(7)式模型的拟合残差如图 2b 中实点 C 所示,其残差分布近似正态分布。因此可以使用正态分布对该残差进行拟合,得到(7)式的修正项:

$$F_{\text{cor}} = bF_{\text{PSF}} \exp\left\{-\frac{[\ln(D_{\text{bead}}/F_{\text{PSF}}) - c]^2}{d}\right\} \quad (8)$$

式中, F_{cor} 为(7)式的修正项, b, c 和 d 为待求参量。进而得到最终的关系模型如下:

$$F_{\text{BSF}} = \sqrt{F_{\text{PSF}}^2 + 0.7464D_{\text{bead}}^2} + bF_{\text{PSF}} \exp\left\{-\frac{[\ln(D_{\text{bead}}/F_{\text{PSF}}) - c]^2}{d}\right\} \quad (9)$$

利用非线性最小二乘法,用(9)式对模拟数据进行拟合,结果如图 3a 中所示,其中 A 为原始数据点, B 为(9)式曲线;图 3b 中, D 为修正前的相对残差, C 为修正后的相对残差。拟合得到相应参量: $b = -0.3747$, $c = 1.223$, $d = 2.444$ 。从图 3a 中可以看出,本文中模型的拟合效果很好;当 $D_{\text{bead}}/F_{\text{PSF}} \leq 0.2$ 时,数据点基本在 $F_{\text{BSF}}/F_{\text{PSF}} = 1$ 的虚线上,说明此时 BSF 主要由系统

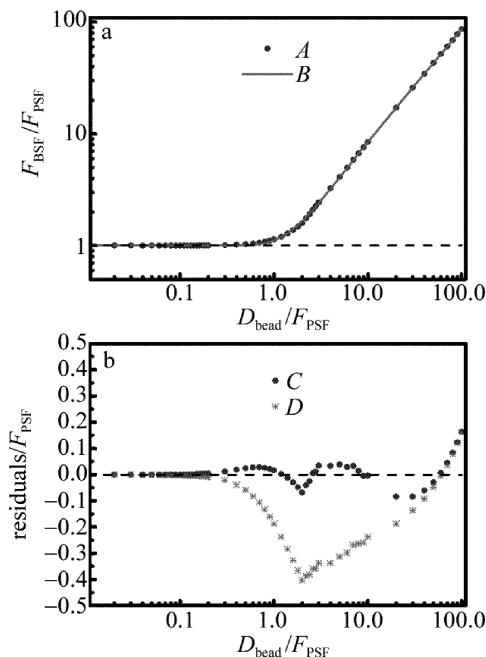


Fig. 3 a—the revised fitting curves of data of formula (9) b—the fitting curve of residuals

的 PSF 决定;当 $D_{\text{bead}}/F_{\text{PSF}} \geq 5$ 时,数据点基本成线性变化,说明此时 BSF 主要由荧光微球决定。图 3b 为拟合残差曲线,残差均方根误差为 0.04084,比未修正关系模型的均方根误差减小了 4 倍多,说明修正后的模型有更高的拟合精度。

1.3 Theer 模型、Hirvonen 模型以及修正模型的对比

为了验证本文中模型的可靠性,对 Theer 模型、Hirvonen 模型以及本文中提出的修正模型进行对比。如图 4 所示,其中, A 为模拟生成的原始数据点, B 为 THEER 等人所建关系模型曲线, C 为 HIRVONEN 等人所建关系模型曲线, D 为本文中所建关系模型曲线。由图 4 可知,在荧光微球直径不大于系统点扩散函数半峰全宽时,3 条曲线对实际数据的拟合都很好,但当荧光微球直径大于系统点扩散函数半峰全宽时,Theer 模型和 Hirvonen 模型的拟合误差较大;而本文中所建模型的拟合效果在整个区域都较为稳定。这是因为 Theer 模型和 Hirvonen 模型都对荧光微球 2 维分布做了近似;当荧光微球直径小于 F_{PSF} 时,系统 BSF 主要由系统 PSF 决定,故此时对荧光微球的近似处理不会带来明显误差;当荧光微球直径大于 F_{PSF} 时,系统 BSF 主要由荧光微球直径决定,随着荧光微球直径越大,其对 BSF 的影响也越大,近似处理带来的误差越大,进而导致得到的 F_{PSF} 误差增加。

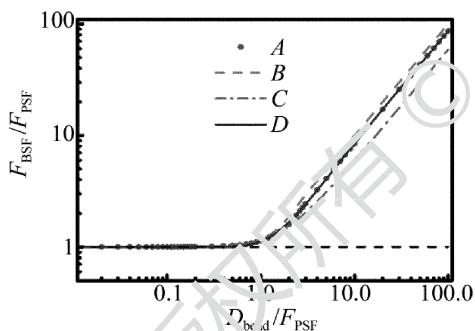


Fig. 4 Theer results with three models

2 宽场荧光显微镜点扩散函数测量

为验证本文中所建模型的可靠性,设计如下实验:使用同一系统分别对不同直径的荧光微球成像,将足够小的荧光微球采集到的荧光强度分布 $B(x, y)$ 作为系统实际的点扩展函数 $P(x, y)$ 。然后,使用较大的荧光微球,采用本文中模型对实验所得 $B(x, y)$ 进行处理,计算系统实际的点扩展函数 $P(x, y)$ 。

倒置荧光显微镜实验系统使用波长为 647nm、额定功率 132mW 的固体激光器作为激发光源,物镜采用 $N=1.49, 100\times$ 浸油物镜,图像采集设备采用 EM-CCD (Ixon DU-897D-C00 - #BV, Andor);实验中所用荧光微球为 LIFE 公司 T7280 (20nm), T7279 (100nm),

激发中心波长 660nm,发射中心波长 680nm。

由于 20nm 荧光微球 $D_{\text{bead}}/F_{\text{PSF}} < 0.09$,在采集到的荧光微球图像有足够大的信噪比的前提下,可以认为荧光强度分布 $B(x, y)$ 近似为系统实际的点扩展函数 $P(x, y)$ 。为了验证本文中提出的改进模型的有效性,可以使用增加曝光时间的方法来提高 20nm 荧光微球图像的信噪比。为了更精确地得到 F_{BSF} ,实验中一次使用多个荧光微球,分别求出 F_{BSF} 并取平均值。

荧光微球半峰全宽测量过程如图 5 所示,其中,方框框出的为运用质心法定位出的荧光微球,然后提取的单个荧光微球如图 5b 所示,最后分别计算出单个微球的半峰全宽 F_{BSF} 。

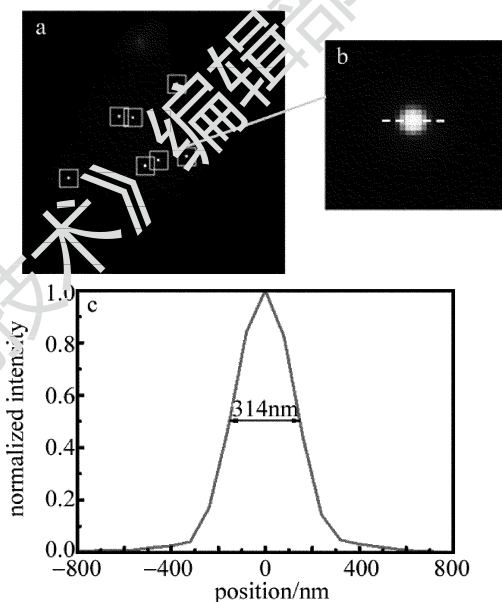


Fig. 5 Determination of F_{BSF}

a—fluorescent beads image b—the larger version of fluorescent bead in Fig. 5a c—the normalized intensity distribution of the location in Fig. 5b

使用同一系统分别对不同直径的荧光微球成像,获得不同的 BSF。利用关系模型(9)式,获得系统实际的 F_{PSF} 。实验数据如表 1 所示。

Table 1 Experimental data of different diameter fluorescent beads

| D_{bead} | 20nm | 100nm |
|-------------------|-----------------|-----------------|
| F_{BSF} | 309nm \pm 7nm | 314nm \pm 5nm |
| F_{PSF} | 309nm \pm 7nm | 312nm \pm 5nm |

可以看出,使用 20nm 荧光微球时, $F_{\text{PSF}} = F_{\text{BSF}}$,可以忽略荧光微球大小对测量结果的影响,因此系统实际的 $F_{\text{PSF}} = 309\text{nm}$;使用 100nm 荧光微球, $D_{\text{bead}}/F_{\text{PSF}} \approx 0.3$ 时,本文中测量方法得出的结果为 312nm,误差约为 1%,与仿真结果一致,说明本文中建立的仿真过程与实际过程吻合。

3 结论

模拟了显微镜成像过程,改进了 $D_{\text{bead}}, F_{\text{PSF}}, F_{\text{BSF}}$ 三

者间的关系模型。仿真结果表明,在 $D_{\text{bead}} \leq F_{\text{PSF}}$ 时,基于该模型的 PSF 测量误差在 3% 以内;在 $D_{\text{bead}} \geq F_{\text{PSF}}$ 时,该模型的测量精度优于 HIRVONEN 和 THEER 的方法。实验结果表明,改进后的关系模型与实际情况吻合,利用该关系模型可以实现点扩散函数的精准测量。

参 考 文 献

[1] HU S Y, XU Zh B. Design of objective lens with long focus depth for digital grayscale lithography [J]. *Laser Technology*, 2013, 37(4): 464-468 (in Chinese).

[2] YANG Ch P. The optical transfer function of a fluorescent confocal microscope with extended Gaussian source [J]. *Laser Technology*, 2005, 29(5): 552-554 (in Chinese).

[3] RUST M J, BATES M, ZHUANG X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-796.

[4] HOLDEN S J, UPHOFF S, KAPANIDIS A N. Daostorm: an algorithm for high-density super-resolution microscopy [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(4): 279-280.

[5] ZHU L, ZHANG W, ELNTAN D, *et al.* Faster STORM using compressed sensing [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 721-723.

[6] SHROFF S A, FIENUP J R, WILLIAMS D R. OTF compensation in structured illumination super-resolution images [J]. *Proceedings of the SPIE*, 2008, 7094: 709402.

[7] SOMEKH M G, HSU K, PITTEP M C. Effect of processing strategies on the stochastic transfer function in structured illumination microscopy [J]. *Journal of the Optical Society of America*, 2011, A28(9): 1925-1934.

[8] SOMEKH M G, HSU K, PITTEP M C. Stochastic transfer function for structured illumination microscopy [J]. *Journal of the Optical Society of America*, 2009, A26(7): 1630-1637.

[9] SOMEKH M G, HSU K, PITTEP M C. Resolution in structured illumination microscopy: a probabilistic approach [J]. *Journal of the Optical Society of America*, 2008, A25(6): 1319-1329.

[10] HAEBERLE O. Focusing of light through a stratified medium: a practical approach for computing microscope point spread functions. Part I: Conventional microscopy [J]. *Optics Communications*, 2003, 216(1): 55-63.

[11] THEER P, MONGIS C, KNOP M. PSF; know your fluorescence microscope [J]. *Nature Methods*, 2014, 11(10): 981-982.

[12] SARDER P, NEHORAI A. Deconvolution methods for 3-D fluorescence microscopy images [J]. *IEEE Signal Processing Magazine*, 2006, 23(3): 32-45.

[13] GU M. *Advanced optical imaging theory* [M]. Berlin, Germany: Springer Science & Business Media, 2000: 75.

[14] HIRVONEN L M, WICKEL K, MANDULA O, *et al.* Structured illumination microscopy of a living cell [J]. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 2009, 38(6): 807-812.

[15] DAN D, YAO B L, LEI M. Structured illumination microscopy for super-resolution and optical sectioning [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2014, 59(12): 1291-1307.

[16] MAO D Zh, YANG L Y, ZHANG Y R. *Analysis of signals and linear systems* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2005: 68-69 (in Chinese).

[17] VOORT H T M, STRASTERS K C. Restoration of confocal images for quantitative image analysis [J]. *Journal of Microscopy*, 1995, 178(2): 165-181.