

多色虚拟荧光辐射差分显微成像

黄宇然 张智敏 董婉洁 徐良 韩于冰 郝翔 匡翠方 刘旭

Multi-color virtual fluorescence emission difference microscopy

HUANG Yu-ran, ZHANG Zhi-min, DONG Wan-jie, XU Liang, HAN Yu-bing, HAO Xiang, KUANG Cui-fang, LIU Xu

引用本文:

黄宇然, 张智敏, 董婉洁, 徐良, 韩于冰, 郝翔, 匡翠方, 刘旭. 多色虚拟荧光辐射差分显微成像[J]. *中国光学*, 2022, 15(6): 1332-1338. doi: 10.37188/CO.2022-0080

HUANG Yu-ran, ZHANG Zhi-min, DONG Wan-jie, XU Liang, HAN Yu-bing, HAO Xiang, KUANG Cui-fang, LIU Xu. Multi-color virtual fluorescence emission difference microscopy[J]. *Chinese Optics*, 2022, 15(6): 1332-1338. doi: 10.37188/CO.2022-0080

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.37188/CO.2022-0080>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

双色荧光辐射差分超分辨显微系统研究

Dual-color fluorescence emission difference super-resolution microscopy

中国光学. 2018, 11(3): 329 <https://doi.org/10.3788/CO.20181103.0329>

结构光照明超分辨光学显微成像技术与展望

Structured illumination super-resolution microscopy technology: review and prospect

中国光学. 2018, 11(3): 307 <https://doi.org/10.3788/CO.20181103.0307>

超分辨率成像荧光探针材料应用进展

Advances in application of materials of super-resolution imaging fluorescent probe

中国光学. 2018, 11(3): 344 <https://doi.org/10.3788/CO.20181103.0344>

氧化石墨烯的多色发光及其在荧光成像中的应用

Multicolor fluorescent emission of graphene oxide and its application in fluorescence imaging

中国光学. 2018, 11(3): 377 <https://doi.org/10.3788/CO.20181103.0377>

微分干涉差共焦显微膜层微结构缺陷探测系统

Detection system of multilayer coating microstructure defects based on differential interference contrast confocal microscopy

中国光学. 2018, 11(2): 255 <https://doi.org/10.3788/CO.20181102.0255>

新型多光子成像技术研究进展

Advances in multiphoton microscopy technologies

中国光学. 2018, 11(3): 296 <https://doi.org/10.3788/CO.20181103.0296>

文章编号 2097-1842(2022)06-1332-07

多色虚拟荧光辐射差分显微成像

黄宇然¹, 张智敏², 董婉洁¹, 徐良¹, 韩于冰¹, 郝翔¹, 匡翠方^{1,3,4,*}, 刘旭¹
(1. 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;
2. 之江实验室 智能芯片与器件研究中心, 浙江 杭州 311121;
3. 浙江大学杭州国际科创中心, 浙江 杭州 311200;
4. 山西大学 极端光学协同创新中心, 山西 太原 030006)

摘要: 荧光辐射差分显微成像是一种荧光染料普适性强、光毒性较低的超分辨成像技术。然而传统荧光辐射差分成像由于其成像原理限制, 系统复杂度较高、稳定性低且成像速度受限。针对上述问题, 本文设计搭建了一套多色虚拟荧光辐射差分显微系统, 并对该系统的成像方法和参数间的制约关系进行了分析, 基于已有的多色虚拟荧光辐射差分显微术原理, 进一步考虑了信噪比和背景噪声等的影响, 建立了可通过实验验证的虚拟荧光辐射差分显微成像模型。实验表明, 本系统与具有结构简单、背景去噪能力强、荧光染料普适性强以及光毒性低等特性, 成像分辨率较共聚焦系统提升了 1.9 倍, 成像速度较传统的荧光辐射差分显微系统提升一倍, 在 3 个波长上均获得了良好的成像效果, 并在生物细胞成像中得到实验验证。

关键词: 荧光显微镜; 超分辨成像; 光子重组; 荧光辐射差分显微术

中图分类号: O436 文献标志码: A doi: 10.37188/CO.2022-0080

Multi-color virtual fluorescence emission difference microscopy

HUANG Yu-ran¹, ZHANG Zhi-min², DONG Wan-jie¹, XU Liang¹,
HAN Yu-bing¹, HAO Xiang¹, KUANG Cui-fang^{1,3,4,*}, LIU Xu¹

(1. *State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation, College of Optical Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;*
2. *Research Center for Intelligent Chips and Devices, Zhejiang Lab, Hangzhou 311121, China;*
3. *ZJU-Hangzhou Global Scientific and Technological Innovation Center, Hangzhou, Zhejiang 311200, China;*
4. *Collaborative Innovation Center of Extreme Optics, Shanxi University, Taiyuan 030006, China*)

* *Corresponding author, E-mail: cfkuang@zju.edu.cn*

Abstract: Fluorescence emission difference microscopy is a super-resolution imaging technique with strong

收稿日期: 2022-04-24; 修订日期: 2022-05-19

基金项目: 国家自然科学基金(No. 61827825, No. 62125504, No. 61735017); 浙江省自然科学基金重大项目(No. LD21F050002); 浙江省重点研究计划(No. 2020C01116); 之江实验室(No. 2020MC0AE01); 浙江省青年拔尖人才万人计划(No. 2020R52001); 中国博士后科学基金(No. BX2021272)

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 61827825, No. 62125504, No. 61735017); Major Program of the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. LD21F050002); Key Research and Development Program of Zhejiang Province (No. 2020C01116); Zhejiang Lab (No. 2020MC0AE01); Zhejiang Provincial Ten Thousand Plan for Young Top Talents (No. 2020R52001); China Postdoctoral Science Foundation (No. BX2021272)

universality of fluorescent dyes and low phototoxicity. However, due to the limitation of its principle, traditional fluorescence emission difference microscopy has a high system complexity, low stability and limited imaging speed. In order to improve these defects, we design and build a set of multi-color virtual fluorescence difference microscopy system, and its imaging method and parameter are analyzed. On the basis of the existing principle of multi-color virtual fluorescence emission difference microscopy, the influence of the signal-to-noise ratio and background is further considered, and a virtual fluorescence emission difference microscopy imaging model that can be verified experimentally is established. The experiments show that the system and method have the characteristics of simple structure, strong background denoising ability, strong universality of fluorescent dyes, and low phototoxicity. Its imaging resolution is 1.9 times higher than that of confocal system, and its imaging speed is doubled compared to the traditional fluorescence emission difference microscopy system. It has obtained good imaging results at three wavelengths, and has been experimentally verified in biological cell imaging.

Key words: fluorescence microscopy; super-resolution imaging; photon reassignment; fluorescence emission difference microscopy

1 引言

荧光显微镜是生命科学领域探索细胞结构、分析细胞生命活动的重要工具。然而,由于阿贝衍射极限^[1]的存在,荧光显微镜的分辨率被限制在半波长左右,从而限制了对亚细胞器、蛋白质等更细微结构的研究。近年来,为了突破衍射极限的限制,一系列超分辨显微成像技术被提出,其根据原理可分为3类:基于点扩散函数(PSF)工程^[2-3]、基于单分子定位^[4-5]和基于频域扩展^[6]。

在基于PSF工程的点扫描超分辨显微技术中,受激辐射损耗显微术(STIMULATED Emission Depletion microscopy, STED)^[2]是最具代表性的一种,其基本原理是利用一束经涡旋相位调制产生的高光强空心损耗光斑抑制位于实心激发光斑外围的荧光分子的发射荧光,以获得更窄的有效PSF。目前,STED技术已经获得了广泛应用,但其生物成像能力仍受特异性染料需求及高损耗光强引起的光漂白和光毒性问题的限制。

荧光辐射差分显微术(Fluorescence Emission Difference microscopy, FED)^[3]使用空心激发光斑扫描样品,获得空心光斑图像;再与实心激发光斑扫描样品获得的图像进行差分,从而获得背景噪声更低且分辨率较共聚焦系统提升一倍的荧光显微图像。FED的空心光斑光强与实心激发光斑相近,远远低于STED中的损耗光,因此极大地

缓解了光漂白和光毒性问题,且对荧光染料高度普适。

由于FED需要进行两次扫描成像,近年来,本团队提出了一系列旨在提高FED成像速度的方法^[7-9]。其中与并行探测相结合而形成的虚拟荧光辐射差分显微术(virtual Fluorescence Emission Difference microscopy, vFED)^[7]只使用空心激发光斑对样品进行单次扫描形成空心光斑图像,再经过光子重组形成虚拟的实心光斑图像,两者差分后得到vFED图像。在这一方法的基础上,本团队进一步提出了饱和虚拟荧光辐射差分显微术^[10],该方法利用荧光的非线性效应将分辨率在vFED的基础上又提升了34.5%。然而,这两项工作主要进行了原理与计算方面的研究,vFED方法的实验验证尚未完成。

本文在前述工作的基础上,进一步考虑了信噪比和背景噪声的影响,提出了实验上可行的vFED成像模型,设计并搭建了一套三色虚拟荧光辐射差分显微成像系统,并对系统性能进行了实验验证。

2 vFED系统及原理

2.1 系统光路

vFED系统相较于需要两个激发光路的FED系统更加简化,只需单路即可实现超分辨成像,降低了光路的搭建和校准难度。图1为简化光路

图, 激光由一单模保偏光纤出射后, 经过准直透镜 L1, 并被涡旋相位板调制为涡旋光, 从而在物镜聚焦后产生甜甜圈形的空心光斑。用一个半波片和一个 1/4 波片联合调整光束的偏振, 以在焦面上获得高质量的圆偏振光。然后, 通过一组 4f 透镜组 L2、L3 对激发光进行扩束, 在实现激发光充满物镜入瞳的同时, 也起到了使涡旋相位板与物镜入瞳共轭的作用。激发光照明样品产生的荧光沿原光路返回, 此时透镜 L3 也同时用作探测光的收集透镜; 荧光透过二色镜后被 19 芯多模光纤束收集, 光纤束中每根光纤的端面都起到了共聚焦显微镜中小孔的作用。光纤束将光信号分别导入 19 个雪崩光电二极管中, 产生的电信号被采集卡采集并导入计算机中进行分析, 并实时成像。本文使用 488 nm、561 nm、640 nm 3 个波段的激发光分别调制, 3 束光合束后进入同一个物镜, 从而实现了三色 vFED 成像。

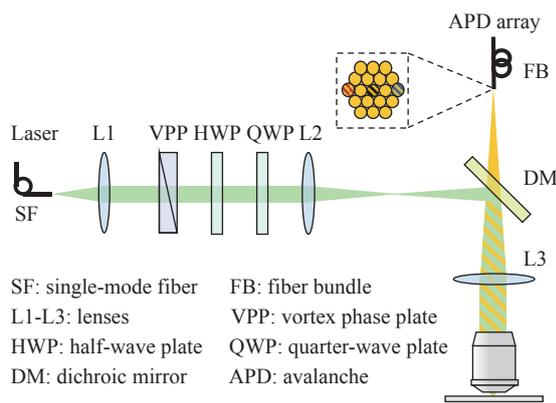


图 1 虚拟荧光辐射差分显微系统简图

Fig. 1 Sketch of virtual fluorescence emission difference microscopy

2.2 系统成像原理与模型

在 vFED 中, 在每个扫描位置都进行一次 19 通道的并行探测, 在完成整个视场的扫描后, 即获得了 19 幅图像。光纤束端面中处于 \vec{s} 位置的光纤所对应的图像可表示为:

$$I(\vec{r}; \vec{s}) = \int O(\vec{r} - \vec{r}') h_c(\vec{r}'; \vec{s}) d\vec{r}' \quad (1)$$

式中 \vec{r} 是扫描位置; \vec{r}' 代表样品面上各点, 其原点位置与 \vec{r} 相同; $O(\vec{r} - \vec{r}')$ 表示样品面的荧光强度分布; $h_c(\vec{r}'; \vec{s})$ 表示系统的最终 PSF, 它可以进一步表示为:

$$h_c(\vec{r}'; \vec{s}) = h_{\text{ext}}(\vec{r}') \times (h_{\text{det}}(\vec{r}') \otimes a(\vec{s})) \quad (2)$$

式中 $h_{\text{ext}}(\vec{r}')$ 和 $h_{\text{det}}(\vec{r}')$ 分别表示系统的激发和探测 PSF; $a(\vec{s})$ 是表征光纤束中对应光纤的端面大小和位置的函数; \otimes 表示卷积。

由式(2)可知, 由于 $a(\vec{s})$ 的存在, 不同位置的光纤对应的 PSF 峰值位置也不同。例如, 若使用实心的激发光斑扫描, 则边缘通道获得的图像相较于中心通道的位移是 $\vec{s}/2$ 。若将这些图像直接相加, 则近似获得了小孔大小与光纤束总直径相等的共聚焦图像。然而, 由于边缘通道相较中心通道的位移均与光纤的物理位置 \vec{s} 有关, 而与样品无关, 因此可以根据每根光纤的物理位置对位移做出补偿, 而后相加。此时即获得了小孔大小与单根光纤直径相等的高分辨率图像。这一过程称为光子重组^[11-12], 其获得的图像可表示为:

$$I_{\text{pr}}(\vec{r}) = \sum_{\vec{s}} I(\vec{r} - q\vec{s}; \vec{s}) \quad (3)$$

式中 q ($0 < q \leq 1$) 是位移系数。相应地, 光子重组后的图像最终 PSF 为:

$$h_{\text{pr}}(\vec{r}') = \sum_{\vec{s}} h_c(\vec{r}' - q\vec{s}; \vec{s}) \quad (4)$$

在 vFED 中, 虽然是使用空心光斑而非实心光斑扫描样品, 但光子重组仍然有效。图 2(彩图见期刊电子版) 是遵循矢量衍射理论计算^[13-14] 的 vFED 原理仿真结果。图 2(a) 中的黑红蓝 3 条曲线分别代表图 1 中对应颜色通道 PSF 的归一化强度分布, 在计算时各项参数设置得与实际实验中的参数相同, 物镜 NA 为 1.49, 激发光波长为 640 nm 时光纤束总直径相当于 1.2 个艾里斑。不同通道的 PSF 峰值位置发生了偏移, 然而它们的 0 值位置仍然都位于中心处。此时若将各图像直接相加, 结果图仍得到空心 PSF, 但若如图 2(b) 所示进行光子重组, 则 PSF 原中心处将不再是 0 值, 相加后得到了实心 PSF, 通过选取合适的位移系数 q , 可使实心 PSF 与空心 PSF 的外轮廓能够较好地匹配。将实心 PSF 与空心 PSF 对应的图像进行差分, 即得到 vFED 图像。这一过程及其对应的 PSF 可以表示为:

$$I_{\text{rec}}(\vec{r}) = I_{\text{pr}}(\vec{r}) - p \times I_{\text{hollow}}(\vec{r}) \quad (5)$$

$$h_{\text{rec}}(\vec{r}') = h_{\text{pr}}(\vec{r}') - p \times h_{\text{hollow}}(\vec{r}') \quad (6)$$

式中 p ($0 < p \leq 1$) 是差值系数。其中,

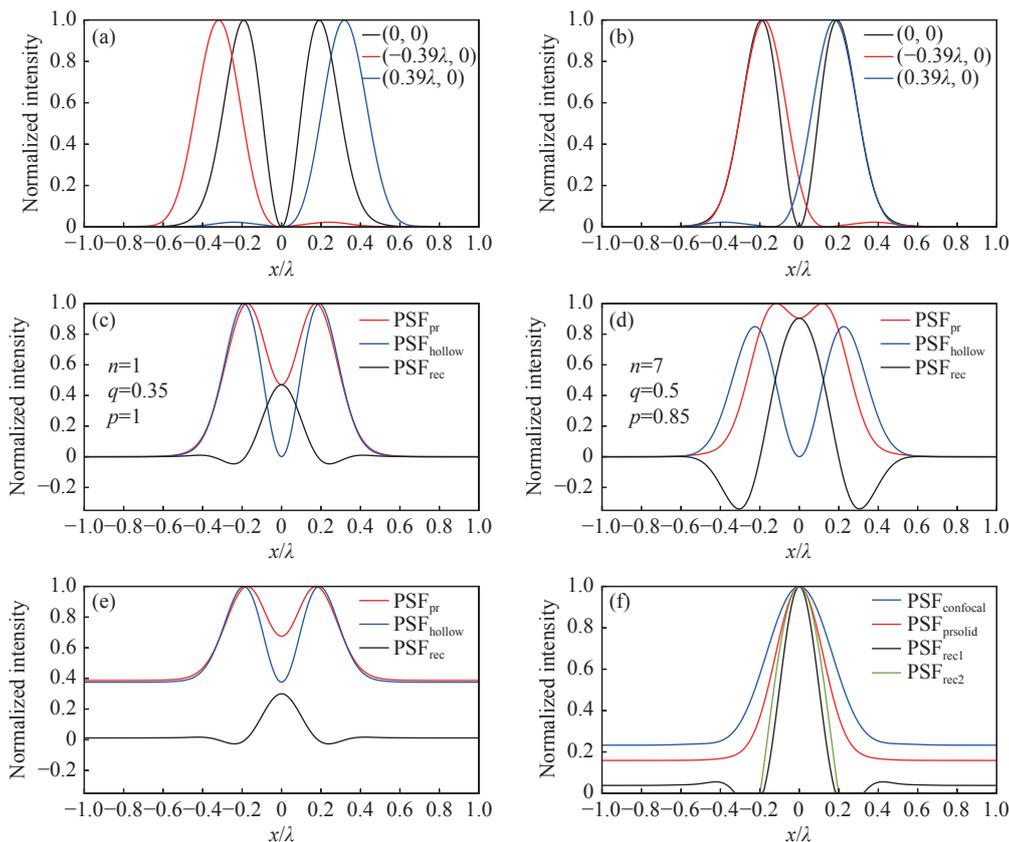


图 2 系统成像模型。(a)黑色、红色、蓝色曲线分别是并行探测的中心通道和左侧、右侧边缘通道的 PSF 的归一化强度分布;(b)进行光子重组后边缘通道的 PSF 归一化强度分布,与中心通道外轮廓匹配;(c) $n=1, q=0.35, p=1$,无噪声时的 vFED 成像模型,红色、蓝色、黑色曲线分别是光子重组并相加得到的虚拟实心光斑图像 PSF、中心通道获得的空心光斑图像 PSF、vFED 图像 PSF;(d) $n=7, q=0.5, p=0.85$,无噪声时的 vFED 成像模型,曲线的意义和(c)相同;(e)考虑背景噪声时的 vFED 成像模型,各通道包含的背景噪声在该通道总光子数中的占比相同,参数 n, q, p 与(c)相同;(f)蓝色、红色、黑色、绿色曲线分别是共聚焦 PSF、实心光斑光子重组方法 PSF、按(c)和(d)的 n, q, p 参数计算的 vFED 图像 PSF,背景噪声水平与(e)相同

Fig. 2 Imaging model of the system. (a) The black, red, and blue curves are the normalized PSFs of the center, left and right edge channels in parallel detection, respectively; (b) the normalized PSFs of the edge channels after photon reassignment, matching the outer contour of the center channel; vFED imaging model without noise at (c) $n=1, q=0.35, p=1$ and (d) $n=7, q=0.5, p=0.85$, the red, blue and black curves are virtual solid spot image PSF obtained by photon reassignment and summation, the hollow spot image PSF obtained from the center channel, and the vFED image PSF, respectively; (e) vFED imaging model when background noise is considered, the background noise contained in each channel accounts for the same proportion of the total number of photons in the channel, and the parameters n, q, p are the same as those in (c); (f) the blue, red, black, and green curves are the confocal PSF, solid spot photon reassignment method PSF, vFED image PSF calculated according to the n, q, p parameters of (c) and (d), respectively. The background noise level is the same as that in (e)

$$h_{\text{hollow}}(\vec{r}') = \sum_{\vec{s}_i, i=0}^{n-1} h_c(\vec{r}'; \vec{s}_i) \quad , \quad (7)$$

式中 \vec{s}_i 是由中心向边缘排布的光纤位置, $\vec{s}_0 = \vec{0}$; n 表示空心光斑图像包含的原始图像数量。理想情况下, $n = 1$, 即空心光斑图像只由中心通道构成。图 2(c) 给出了这种情形下的虚拟实心 PSF、空心 PSF 和 vFED 图像的 PSF, 位移系数 q 取为 0.35, 差值系数 p 取为 1。由于实心 PSF 与空心

PSF 的外轮廓基本一致, vFED 图像的 PSF 只包含极小的负值, 从而避免了经典 FED 中的负值畸变问题。

然而, 若考虑噪声的影响, 由于中心通道只接收到总光子数中的一部分, 由单张图像构成的空心光斑图像往往信噪比不足, 使得差分后的 vFED 图像的信噪比受到限制。为解决这一问题, 可采用部分非中心通道获得的图像相加; 此外

采取较大的位移系数 q 也可进一步提升信噪比。然而,更大的空心光斑图像数 n 将导致分辨率略微下降。同时,随着位移系数 q 的增大负值畸变也将出现。此时为避免过大的负值畸变淹没样品的有效信息,差值系数 p 需适当减小。图 2(d)展示了倾向于保证信噪比时的各图像 PSF,此时,空心光斑图像数 n 取 7,位移系数 q 取 0.5,差值系数 p 取 0.85。此时 vFED 图像 PSF 出现了与传统 FED 相似的负值畸变,但相较传统 FED,其只需单次扫描即可成像的优势仍得以保留。实际成像时,需选取合适的空心光斑图像数 n 、位移系数 q 和差值系数 p ,以使分辨率、信噪比和负值畸变这三者达到平衡:首先由信噪比确定合适的空心光斑图像数 n ,再确定不产生明显负值畸变时的最大位移系数 q 和差值系数 p 。

进一步地,在实际成像时由于样品的离焦信号和杂散光等的影响,各通道获得的图像可能包含一定的背景噪声。图 2(e)和图 2(f)说明了考虑背景噪声时 vFED 的成像性能,其中各通道包含的背景噪声在该通道总光子数中的占比相同。

图 2(e)除有背景噪声外,其余参数与图 2(c)相同。可见,经过 vFED 差分处理后,vFED 图像基本消除了背景噪声的影响,其总光子数、半高全宽等与图 2(c)基本相同。图 2(f)对比了 vFED 与共聚焦以及实心光斑光子重组方法的成像性能,各方法设置的背景噪声水平相同,两个 vFED 图像的归一化强度分布采用的参数(除背景噪声外)分别与图 2(c)和图 2(d)相同。差分产生的负值被置为 0。可见即使相较于效果略好于共聚焦的实心光斑光子重组方法,vFED 图像的 PSF 半高全宽也明显减小,分辨率得到提高,且其背景噪声水平显著降低,证明 vFED 方法具有良好的去背景能力。

3 实验结果

为了验证虚拟荧光辐射差分显微系统的超衍射极限成像能力,本文首先使用波长为 640 nm 的激发光激发 200 nm 荧光颗粒进行成像,结果如图 3(彩图见期刊电子版)所示。图 3(a)是从光路中取出涡旋相位板后扫描样品,将各通道图像直

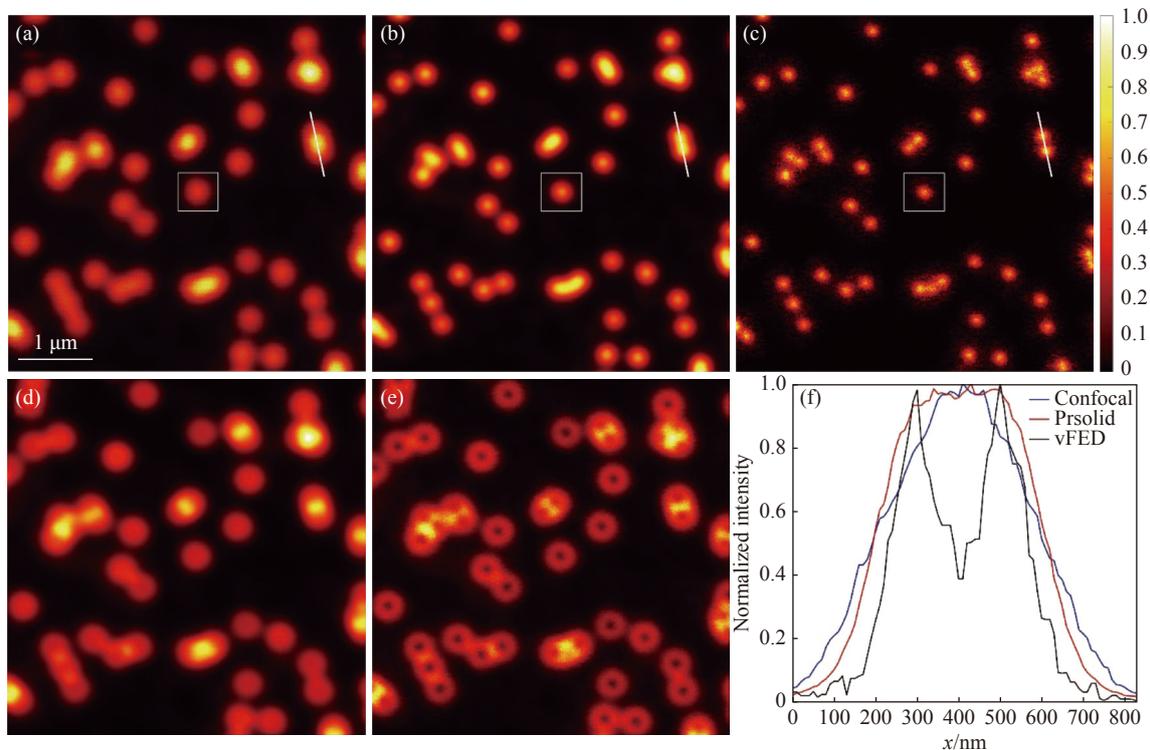


图 3 荧光颗粒成像结果。(a)共聚焦图像;(b)实心光斑光子重组图像;(c)vFED 图像;(d)虚拟实心光斑图像;(e)空心光斑图像;(f)图(a)~(c)中白色截线的归一化强度分布

Fig. 3 Fluorescent particle imaging results. (a) Confocal image; (b) solid spot photon reassignment image; (c) vFED image; (d) virtual solid spot image; (e) hollow spot image; (f) normalized intensity of the white truncation line in figures (a)~(c)

接相加得到的共聚焦图像; 图 3(b) 是对同一组数据进行光子重组后得到的图像。图 3(c) 是加入涡旋相位板后的同一区域的 vFED 图像, 它是通过图 3(d) 光子重组后的虚拟实心光斑图像和图 3(e) 中心通道的空心光斑图像之间进行差分得到的。由图 3 可见, 一系列在共聚焦中因为衍射极限的存在而无法分辨的彼此靠近的颗粒, 在 vFED 图像中能够被很好地分开。图 3(f) 选取了其中一个区域, 给出了沿共聚焦图像、实心光斑光子重组图像和 vFED 图像中白色截线的归一化强度分布。可见, 不同于前两者, vFED 图像对应的曲线呈现两个明显的峰值, 从而清晰地揭示了两个颗粒的位置。为进一步定量说明 vFED 图像分辨率的提升, 分别对图 3(a)~3(c) 中方框内的区域进行了高斯拟合, 得到的半高全宽分别为 425.75 nm、320.96 nm、224.72 nm, 由此可知, vFED 方法相较于 1.2 倍艾里斑针孔下的共聚焦图像实现了 1.9 倍分辨率提升。事实上, 考虑到荧光颗粒具有一定的大小, vFED 方法的实际分辨率的提升性能还要高于这一水平。

生物样品较荧光颗粒结构更加复杂, 且更易漂白, 限制了激发光功率, 使其成像时较荧光颗粒更易受到噪声的影响。本文进一步使用三色生物样品(640:star red 标记的核孔复合物; 561:star orange 标记的高尔基体; 488:star green 标记的波形蛋白)进行成像, 结果如图 4(彩图见期刊电子版)

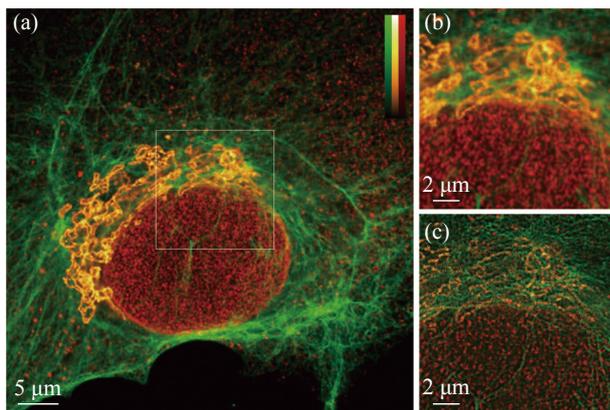


图 4 三色生物样品的成像结果。(a)实心光斑光子重组图像;(b)图(a)中方框内区域的放大图;(c)同一区域的 vFED 图像

Fig. 4 Imaging results of three-color biological samples. (a) Solid spot photon reassignment image; (b) enlarged view of the area inside the box in (a); (c) vFED image of the same area

所示。图 4(a)~4(b) 是实心光斑光子重组图像, 其中图 4(b) 是图 4(a) 中方框内区域的放大图, 图 4(c) 是同一区域的 vFED 图像。通过对比可以发现尽管 vFED 图像信噪比有一定程度下降, 但相较于实心光斑光子重组图像, 其可揭示出更多的样品细节, 分辨率得到明显提高。

4 结 论

本文提出了存在背景噪声和受信噪比限制的 vFED 成像模型, 设计搭建了一套三色虚拟荧光辐射差分显微系统, 并通过荧光颗粒和生物样品成像验证了其超衍射极限成像能力。

vFED 方法在应用中遇到的主要困难是空心光斑图像数 n 、位移系数 q 和差值系数 p 三者间存在制约关系, 而引起这一制约关系的根本因素是 vFED 方法受到的信噪比限制。为避免降低分辨率或引入较大的负值畸变, 不宜选取过大的空心光斑图像数 n , 这意味着部分边缘通道包含的信息不会体现在空心光斑图像中, 从而一定程度上导致信噪比下降。然而, 由于 vFED 方法比 STED 方法对样品的损伤更小, 因而其能够容忍的激发光强度提高, 单点停留时间适当延长, 从而可以对信噪比进行补偿。此外, 其他消除负值畸变的方法^[15] 也可用于 vFED 中, 从而打破这一三角制约关系。

总体上说, vFED 是一种对样品高度普适、损伤低的超分辨方法, 由于 STED 中损耗光不存在对激发光波长的制约, 因此易于实现三色成像, 为细胞器间的相互作用等研究提供强有力的研究工具。由于只需单次扫描即可成像, vFED 系统成像速度较经典 FED 系统提升了一倍。此外, vFED 方法的去背景能力也使得系统更不易受到杂散光或使用低 NA 物镜时出现的样品离焦信息的干扰。总之, 本文所搭建的三色虚拟荧光辐射差分显微系统光路易于搭建和校准, 对荧光染料普适性强。实验结果表明: 搭建的多色虚拟荧光辐射差分显微成像系统在 3 个波长上都获得了良好的成像效果, 通过荧光颗粒和三色生物样品的实验验证, 本系统较 1.2 倍艾里斑针孔下的共聚焦实现了 1.9 倍的分辨率提升。实现了良好的成像效果, 在细胞生命活动的研究中具有广泛的应用前景。

参考文献:

- [1] ABBE E. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung[J]. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 1873, 9(1): 413-468.
- [2] 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.
- [3] KUANG C F, LI SH, LIU W, *et al.*. Breaking the diffraction barrier using fluorescence emission difference microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 1441.
- [4] BETZIG E, PATTERSON G H, SOUGRAT R, *et al.*. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution[J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [5] RUST M J, BATES M, ZHUANG X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-796.
- [6] 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.
- [7] MA Y, KUANG C F, FANG Y, *et al.*. Virtual fluorescence emission difference microscopy based on photon reassignment[J]. *Optics Letters*, 2015, 40(20): 4627-4630.
- [8] HE M F, HAN Y B, GAN Y H, *et al.*. Dynamic live-cell super-resolution imaging with parallelized fluorescence emission difference microscopy[J]. *Optics Communications*, 2020, 460: 125087.
- [9] 张智敏, 黄宇然, 刘少聪, 等. 共路并行荧光辐射差分超分辨显微成像[J]. *中国激光*, 2021, 48(16): 1607002.
ZHANG ZH M, HUANG Y R, LIU SH C, *et al.*. Common-path parallel fluorescence emission difference super-resolution microscopy[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2021, 48(16): 1607002. (in Chinese)
- [10] LIU SH C, SUN SH Y, KUANG C F, *et al.*. Saturated virtual fluorescence emission difference microscopy based on detector array[J]. *Optics Communications*, 2017, 395: 45-50.
- [11] MÜLLER C B, ENDERLEIN J. Image scanning microscopy[J]. *Physical Review Letters*, 2010, 104(19): 198101.
- [12] SHEPPARD C J R, MEHTA S B, HEINTZMANN R. Superresolution by image scanning microscopy using pixel reassignment[J]. *Optics Letters*, 2013, 38(15): 2889-2892.
- [13] RICHARDS B, WOLF E. Electromagnetic diffraction in optical systems, II. Structure of the image field in an aplanatic system[J]. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 1959, 253(1274): 358-379.
- [14] LIU X, PENG Y F, TU SH J, *et al.*. Generation of arbitrary longitudinal polarization vortices by pupil function manipulation[J]. *Advanced Photonics Research*, 2021, 2(1): 2000087.
- [15] WANG N, KOBAYASHI T. Numerical study of the subtraction threshold for fluorescence difference microscopy[J]. *Optics Express*, 2014, 22(23): 28819-28830.

作者简介:



黄宇然(1998—), 男, 陕西西安人, 博士研究生, 2020年于浙江大学获得学士学位, 主要从事光学超分辨显微成像方面的研究。E-mail: huangyr@zju.edu.cn



匡翠方(1977—), 男, 江西泰和人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事光学超分辨显微成像方面的研究。E-mail: cfkuang@zju.edu.cn