

超衍射成像中双螺旋点扩展函数的三维定位精度*

陈鹤 于斌 陈丹妮 李恒 牛憨笨†

(深圳大学光电工程学院, 光电子器件与系统(教育部/广东省)重点实验室, 深圳 518060)

(2013年3月7日收到; 2013年3月29日收到修改稿)

开关效应和单分子定位的结合可以实现样品的超衍射分辨成像, 双螺旋点扩展函数将单分子定位纳米分辨从二维扩展到了三维. 本文对双螺旋点扩展函数的三维定位精度展开了探讨. 首先, 基于费希尔信息量, 计算了双螺旋点扩展函数的无偏估计, 得出其理论定位精度, 并分析了光子数、背景噪声以及有效像元尺寸大小对其定位精度的影响; 其次, 基于单分子定位实验过程中对于数据分析通常采用的高斯拟合质心定位算法, 通过误差传递函数定律求得双螺旋点扩展函数的轴向定位精度. 计算机模拟结果表明, 在光子数大于 1000 的条件下, 高斯拟合质心定位精度和费希尔信息量理论定位精度符合较好. 本文的讨论不仅为双螺旋点扩展函数的三维定位精度提供了理论依据, 同时也可为实验提供理论指导.

关键词: 双螺旋点扩展函数, 费希尔信息量, 定位精度, 高斯拟合

PACS: 42.30.-d, 42.30.Lr, 02.10.Yn, 87.10.-e **DOI:** 10.7498/aps.62.144201

1 引言

近年来, 远场纳米分辨荧光显微成像技术取得了较大的发展^[1]. 目前最为突出的方法有两种, 一种是基于缩小有效激发光斑, 通过直接减小点扩展函数的半高宽来提高分辨率, 包括受激辐射耗尽(stimulated emission depletion, STED)、基态耗尽(ground state depletion, GSD)、饱和结构激发显微术(saturated pattern excitation microscopy, SPEM)等; 另一种则是基于单分子定位技术, 包括随机光学重建显微术(stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)、光敏定位显微术(photoactivated localization microscopy, PALM)及荧光 PALM(fluorescence photoactivation localization microscopy, fPALM)等. 前者是利用受激态或基态耗尽的方式, 压缩荧光有效发射区域; 后者则是利用荧光标记本身的开关效应, 通过稀疏激发、分时成像、质心定位以及图像合成来实现纳米分辨成像, 并已经实现 20 nm 的横向空间分辨率成像.

然而, 传统的单分子定位方法只能对分子进行二维也就是横向定位, 但对于轴向分辨率并没有提高. 结合某些改进轴向分辨率的方法, 如柱面镜定位^[2]、双焦面探测^[3]、双螺旋点扩展函数法(double helix point spread function, DH-PSF)^[4]以及荧光干涉法^[5]等, 能将轴向分辨率提高到 50 nm 的水平. 其中, DH-PSF 是通过特殊设计相位板, 改变系统的点扩展函数形成双螺旋的形式, 并且旋转的方向与荧光分子的轴向位置有关, 从而获得荧光分子的轴向定位. 该方法具有相比其他方法更长的可探测焦深范围, 并且在整个成像深度内, 点扩展函数的形状近似不变, 仅随轴向位置发生旋转, 而不像其他方法需要通过精确形状图像比对来得到轴向位置, 从而定位精度可以做得更高.

考虑到单分子定位超分辨方法中, 定位精度直接决定了其极限分辨率, 因此有必要对 DH-PSF 的三维定位精度进行详细的分析. 本文通过两种方法来分析 DH-PSF 的三维定位精度: 首先, 基于费希尔信息量(Fisher information, FI)理论分析了 DH-PSF

* 国家重点基础研究发展计划(批准号: 2012CB825802)、国家自然科学基金(批准号: 11004136, 61178080, 61235012)、国家重大科学仪器设备开发专项(批准号: 2012YQ150092)和深圳市科技计划基础研究计划项目(批准号: JCYJ20120613173049560, ZYC201105170233A, GJHS20120621155433884)资助的课题.

† 通讯作者. E-mail: hbniu@szu.edu.cn

的三维 FI 理论定位精度; 此外, 基于高斯拟合质心定位算法, 利用误差传递理论求得 DH-PSF 的三维模拟质心定位精度, 并对二者进行了比较和分析. 结果表明, 在光子数大于 1000 的情况下, 二者得到的定位精度接近. 本文重点分析了光子数、背景噪声、轴向位置对定位精度的影响, 这将对于 DH-PSF 的三维定位实验提供理论指导.

2 DH-PSF 实现三维纳米定位原理

DH-PSF 实现三维纳米定位是基于一种被称为自成像的现象. DH-PSF 是一种三维光学响应, 具有随离焦量不断旋转的圆形不对称横截面轮廓. 实现 DH-PSF 的主要方法是通过位于 Laguerre-Gauss (LG) 模式平面上特定直线上的 LG 模式的线性叠加. LG 光束模式的线性叠加构成自成像光束. LG 光束模式为^[6]

$$u_{n,m}(r) = G(\hat{\rho}, \hat{z}) R_{n,m}(\hat{\rho}) \Phi_m(\phi) Z_n(\hat{z}), \quad (1)$$

式中 $r = (\rho, \phi, z)$ 为空间点的柱坐标, $\hat{\rho} = \rho/\omega(\hat{z})$ 是高斯光斑的径向坐标, $\omega(\hat{z}) = \omega_0 [1 + \hat{z}^2]^{1/2}$, ω_0 为束腰半径, $\hat{z} = z/z_0$ 纵向坐标, $z_0 = \pi\omega_0^2/\lambda$ 为瑞利长度, $u_{n,m}(r)$ 的组成为

$$G(\hat{\rho}, \hat{z}) = \frac{\omega_0}{\omega(\hat{z})} \exp(-\hat{\rho}^2) \exp(i\hat{\rho}^2 \hat{z}) \times \exp[-i\psi(\hat{z})], \quad (2)$$

$$R_{n,m}(\hat{\rho}) = \left(\sqrt{2}\hat{\rho}\right)^{|m|} L_{(n-|m|)/2}^{|m|}(2\hat{\rho}^2), \quad (3)$$

$$\Phi_m(\phi) = \exp(im\phi), \quad (4)$$

$$Z_n(\hat{z}) = \exp[-in\psi(\hat{z})], \quad (5)$$

式中 $\psi(\hat{z}) = \arctan(\hat{z})$ 为古伊相位, $L_{(n-|m|)/2}^{|m|}$ 为广义的拉盖尔多项式, 整数 n, m 应当满足

$$n = |m|, |m| + 2, |m| + 4, |m| + 6, \dots \quad (6)$$

将 (1, 1), (3, 5), (5, 9), (7, 13), (9, 17) 五个 LG 模式进行等权重叠加, 形成一个新的光场分布函数, 即双螺旋旋转光束 (图 1(a)). 基于 LG 函数的傅里叶变换不变特性, 该函数如作为光学传递函数应用到光学成像系统中, 光学系统的点扩展函数将变为 DH-PSF, 且随离焦量变化而旋转的速度与 LG 模式平面上所选取的直线斜率成正比, 在聚焦区速度最大 (图 1(c)). 一个 DH-PSF 系统是在标准成像系统的傅里叶平面加入一个特殊设计的相位板, 此相位板是其透射率函数在傅里叶变化的聚焦区形成双螺旋的形式. 更特别的是它展示了两个围绕着光轴旋转的旁瓣, 其中一个绕着光轴顺时针旋转, 而另一个则是逆时针旋转. 用 DH-PSF 进行三维纳米定位时, 分子的横向定位点通过两个旁瓣的中点来估计, 而其轴向位置则根据两个旁瓣中心连线的旋转角度 (图 1(b)) 确定^[7].

3 基于 FI 理论计算 DH-PSF 的三维定位精度

FI 是一种测量随机变量 X 与取决于 X 概率的未知参数 θ 的信息量. X 的概率函数也就是 θ 的似然函数, 记作 $f(X, \theta)$. 似然函数的对数对 θ 的偏导数叫作得分函数. 在特定的条件下, 得分函数的一阶矩为 0, 二阶矩为 FI, 则 FI 表达式为

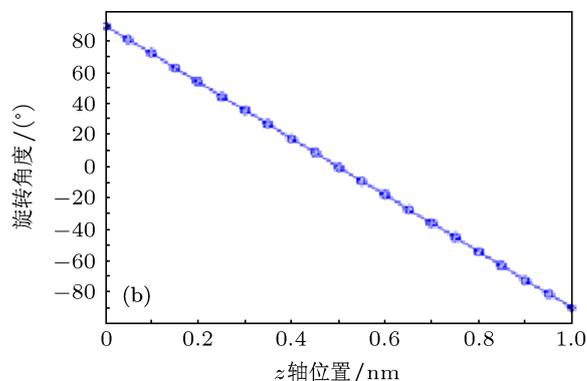
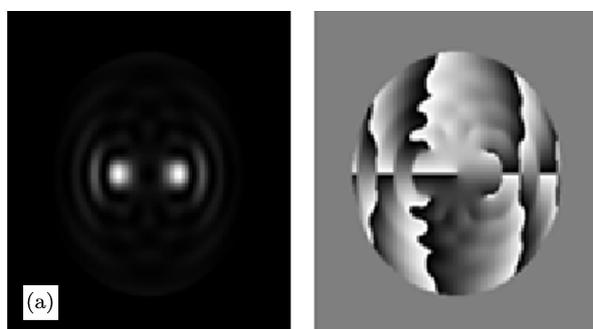


图 1 DH-PSF (a) DH-PSF 的强度与相位分布; (b) DH-PSF 两个旁瓣的旋转角度与 Z 轴位置的关系曲线图举例; (c) DH-PSF 在不同轴向位置处的图形

$$I(\theta) = E_{\theta} \left(\frac{\partial}{\partial \theta} \ln f(X; \theta) \right)^2, \quad (7)$$

式中 $\theta = (x, y, z)$, 对于一个给定的 θ 值, 表达式 $E_{\theta} \left(\frac{\partial}{\partial \theta} \ln f(X; \theta) \right)^2$ 为对数似然函数对 θ 求偏导平方的期望值.

就基于 DH-PSF 的单分子定位而言, 似然函数就是 DH-PSF, 感兴趣的参量就是单分子的横向和轴向位置根据 Cramer-Rao 不等式, 一个未知参数 θ 的无偏估计值 $\hat{\theta}$ 的变化往往大于或者等于 FI 逆矩阵 [8].

$$\text{Cov}(\hat{\theta}) \geq I^{-1}(\theta). \quad (8)$$

DH-PSF 的 Cramer-Rao 边界 (Cramer-Rao bound, CRB) 代表了无偏估计值的最小可能位置的估计方差, 通过选择适当的噪声分布, 可计算不同信噪比下的 CRB. 对于单分子的 3D 定位问题, 3D 定位精度的极限为 FI 逆矩阵的对角线元素的平方根, 其计算如下 [9]:

$$I(\theta) = \sum_{k=1}^K \frac{1}{\mu_{\theta}(k) + \beta} \left[\frac{\partial \mu_{\theta}(k)}{\partial \theta} \right]^T \frac{\partial \mu_{\theta}(k)}{\partial \theta}, \quad (9)$$

其中 $\theta = (x_0, y_0, z_0)$, μ_{θ} 为 PSF 在每个像素点上的概率密度函数, β 为每个像素点上的泊松背景噪声, K 为总的像素数.

则其光子受限系统中的 CRB 为

$$\text{CRB}(\theta) = I(\theta)^{-1} = \left[\sum_{k=1}^K \frac{1}{\mu_{\theta}(k) + \beta} \left[\frac{\partial \mu_{\theta}(k)}{\partial \theta} \right]^T \frac{\partial \mu_{\theta}(k)}{\partial \theta} \right]^{-1}. \quad (10)$$

由前面可知 3D 的定位精度与 CRB 的平方根是一致的, 所以光子受限系统中的三维定位精度表达式如下:

$$W(\theta) = \sqrt{\text{CRB}(\theta)} = \sqrt{\left[\sum_{k=1}^K \frac{1}{\mu_{\theta}(k) + \beta} \left[\frac{\partial \mu_{\theta}(k)}{\partial \theta} \right]^T \frac{\partial \mu_{\theta}(k)}{\partial \theta} \right]^{-1}}. \quad (11)$$

为了计算 DH-PSF 的 FI 矩阵, 我们必须求解成像函数的 PSF 及其偏导数. 在基于双螺旋点扩展函数的荧光显微系统中, 位于点 $(0, 0, z)$ 处的荧光分子所成的像, 即为系统的 DH-PSF, 其 3D-PSF 数学模型如下 [10,11]:

$$q_z(x, y) = u_{1,1}(r) + u_{3,5}(r) + u_{5,9}(r) + u_{7,13}(r) + u_{9,17}(r). \quad (12)$$

把 $q_z(x, y)$ 代入 (9)—(12) 式得:

$$[I(\theta)]_{ij} = \iint_{R^2} \frac{1}{B + Nq_z(x, y)} \frac{\partial Nq_z(x, y)}{\partial \theta_i} \frac{\partial Nq_z(x, y)}{\partial \theta_j}, \quad (13)$$

$$[\text{CRB}(\theta)]_{ij} = I(\theta)^{-1} = \left(\iint_{R^2} \frac{1}{B + Nq_z(x, y)} \frac{\partial Nq_z(x, y)}{\partial \theta_i} \frac{\partial Nq_z(x, y)}{\partial \theta_j} \right)^{-1}, \quad (14)$$

$$[W(\theta)]_{ij} = \sqrt{\text{CRB}(\theta)} = \sqrt{\left(\iint_{R^2} \frac{1}{B + Nq_z(x, y)} \frac{\partial Nq_z(x, y)}{\partial \theta_i} \frac{\partial Nq_z(x, y)}{\partial \theta_j} \right)^{-1}}, \quad (15)$$

$i, j = 1, 2, 3; \theta \in \{x, y, z\}$, N 表示总光子数, B 为背景噪声.

为了计算 DH-PSF 的理论定位精度, 我们重点分析了光子数、背景噪声、轴向位置对其定位精度的影响. 所有的理论定位精度的模拟计算均在 Matlab 编程环境下实现. 模拟参数如下: 荧光波长 $\lambda = 670 \text{ nm}$, 物镜放大倍率 $M = 100$, 数值孔径 $N = 1.4$, 探测器像元大小为 $16 \mu\text{m}$. 通过探测光子数的不同, 可以分别求出其不同的三维定位精度, 如图 2(a) 所示. 由于定位精度与光子数的开方成反比, 所以随着光子数的增加, 所求得的 $W(\theta)$ 值就越小, 也就是其定位精度越高. 如图 2(b) 所示, 光子数为 1000 时, 通过所加背景噪声的不同, 可以分别求出其不同的三维定位精度. 随着背景噪声的增加, 定位点的分布就越宽, 所求得的 $W(\theta)$ 值就越大, 也就是其定位精度越低. 光子数为 1000 和 5000 时, 通过 z 的取值不同 (-1 — $1 \mu\text{m}$), 可分别求得各个位置处的三维定位精度, 如图 2(c)—(e) 所示. 在 x, y 轴定位精度上, 由于其横向定位精度与光斑的大小有关, 光斑越小其定位精度就越高. 在不同的 z 轴位置上, 最中间的光斑最小, 旁边的都随着离焦而有所增大, 所以在中点位置的定位精度最高, 随着中点依次降低; 在 z 轴定位精度上, 其定位精度不仅与光斑尺寸有关, 还与两个光斑之间的距离有关, 距离越远定位精度越高. 离焦越远, 两个点之间的距离越大, 所以在中点位置的定位精度最低, 随着中点依次升高. 通过对轴向及横向定位精度随分子所处离焦量的变化曲线可以看到, 在焦点位置, 横向定位精度达到最高, 而轴向定位精度最低.

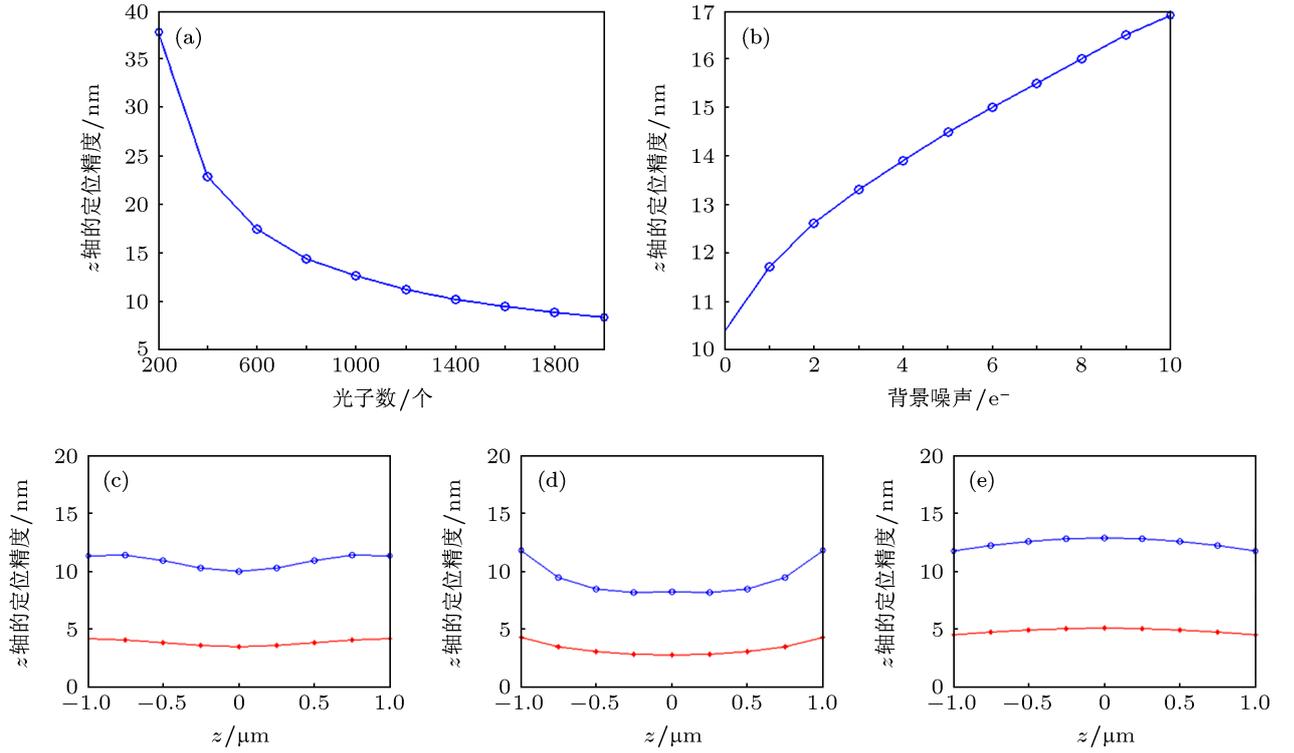


图2 DH-PSF 定位精度模拟图 (a) 不同光子数情况下的轴向定位精度; (b) 不同背景噪声的轴向定位精度; (c), (d), (e) 不同位置处的 x , y 和 z 轴定位精度 (蓝色为光子数 $N = 1000$, 红色为光子数 $N = 5000$)

4 运用误差传递定律计算 DH-PSF 的三维质心定位精度

DH-PSF 的轴向质心定位精度是由两个旁瓣相对于轴向距离的旋转角来确定的, 根据其产生原理, 可知旋转角 θ 为 [12]

$$\theta = c \cdot \tan^{-1}(z/z_0), \quad (16)$$

$$z_0 = (\pi \omega_0^2)/\lambda, \quad (17)$$

c 为在 LG 模式平面上所取点的斜率, z_0 为瑞利长度, ω_0 为束腰半径. 由数学知识我们可知, 两个点相对于水平方向的夹角为

$$\theta = \tan^{-1} \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}. \quad (18)$$

把 (18) 式代入 (16) 式可得:

$$z = z_0 \frac{x_2 - x_1}{y_2 - y_1} \left(-1 \pm \sqrt{1 + \left(\frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \right)^2} \right). \quad (19)$$

误差传递函数定律为 [13]

$$\sigma_z^2 = \left(\frac{\partial z}{\partial x_1} \right)^2 \sigma_1^2 + \left(\frac{\partial z}{\partial x_2} \right)^2 \sigma_2^2 + \left(\frac{\partial z}{\partial y_1} \right)^2 \sigma_3^2 + \left(\frac{\partial z}{\partial y_2} \right)^2 \sigma_4^2, \quad (20)$$

式中 $\sigma_1(\sigma_2, \sigma_3, \sigma_4)$ 为 $x_1(x_2, y_1, y_2)$ 的标准差, 把 (19) 式代入 (20) 式则 σ_z 为 DH-PSF 的轴向定位精度.

下面, 我们通过计算机进行 DH-PSF 定位精度的模拟, 所有计算均在 Matlab 编程环境下实现 [14]. 模拟参数如下: 样品尺度为 12×12 个像元, 荧光波长 $\lambda = 670 \text{ nm}$, 物镜放大倍率 $M = 100$, 数值孔径 $NA = 1.4$, 探测器像元大小为 $16 \mu\text{m}$. 如图 3(a) 所示, 源图像的生成方法如下: 首先, 通过 (1, 1), (3, 5), (5, 9), (7, 13), (9, 17) 五个 LG 模式叠加得到 DH-PSF 的图像; 然后, 再加上泊松分布的光子散弹噪声和高斯分布的背景噪声, 最终获得用于定位的 2000 幅源图像. 模拟实验中, 背景噪声均值为 $2e^-/\text{pixel}$.

图像重构步骤如图 3(b) 所示. 首先, 对上面的源图像进行滤波降噪; 再把图像分成两个区域, 分别求得两个区域的最大值的坐标, 并作为高斯拟合的初值, 用高斯拟合质心定位算法进行定位, 获得 4000 个定位点, 求得这 4000 个定位点的标准差, 代入 (20) 式即可求得其轴向的定位精度.

通过上面定位算法所求得的轴向质心定位精度与前面计算 CRB 所得出的 FI 理论定位精度比较, 如图 4 所示, 蓝色为计算 CRB 所得出的 FI 理论定位精度, 红色为质心定位算法所求定位精度. 通过质心定位算法求得的定位精度比 FI 理论定位精度低 (误差数值高), 且在光子数比较少时, 两个数值差距比较大, 但在光子数比较多时, 两个数值基本相同.

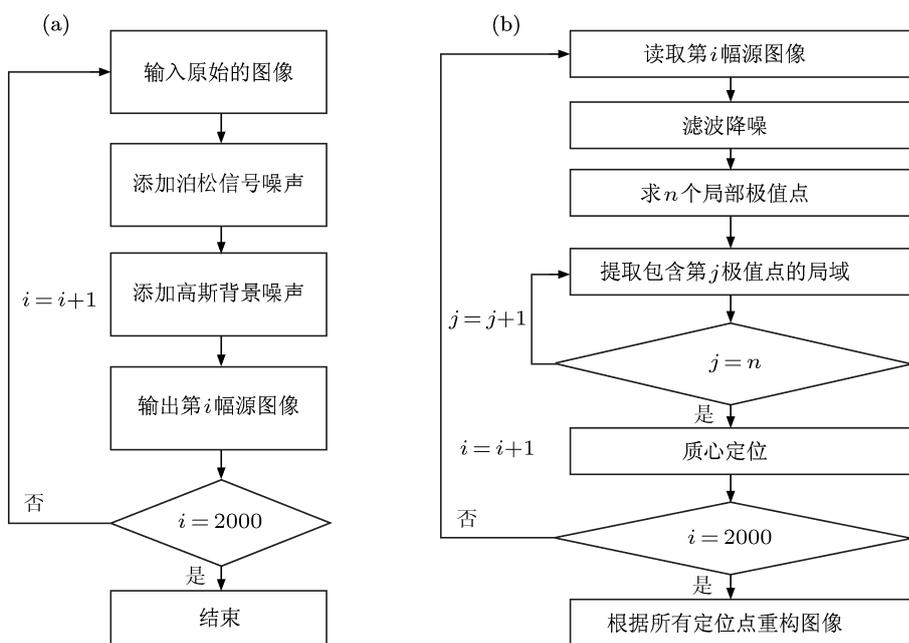


图3 定位算法步骤原理图 (a) 源图像的生成; (b) 图像的重构

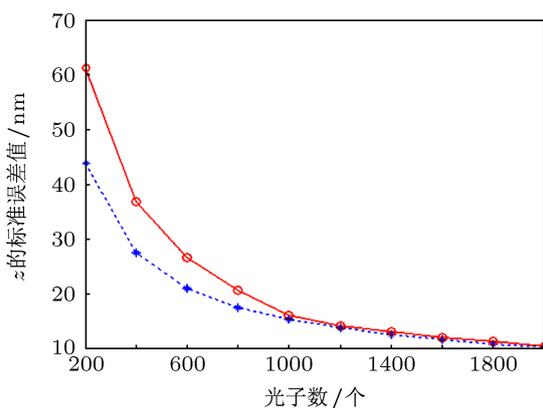


图4 质心定位算法(红色)所求得的轴向定位精度与计算CRB(蓝色)所得出的FI理论定位精度比较

5 总结与讨论

通过对 DH-PSFFI 矩阵的计算, 求得其 CRB 值, 表示了它的 FI 理论三维定位精度. 同样, 根据质心定位算法也求出了其定位精度. 两者相比较可知, 运用质心定位精度算法求出的定位精度要比直接运用公式计算 CRB 所得的 FI 理论定位精度要低; 但是, 在光子数大于 1000 的条件下, 二者的差别还是比较小的, 基本上一致. 由于在光子数少的情况下, 信噪比较差, 运用高斯拟合质心定位时, 造成对质心位置的定位偏差过大, 从而造成质心定位精度算法求出的定位精度标准误差增大, 即定位精度降低; 而在光子数多的情况下, 噪声对质心位置定位的偏差较小, 因此二者之间的定位精度基本一致.

- [1] Chen D N, Liu L, Yu B, Niu H B 2010 *Acta Phys. Sin.* **59** 6948 (in Chinese) [陈丹妮, 刘磊, 于斌, 牛慧笨 2010 物理学报 **59** 6948]
- [2] Holtzer L, Meckel T, Schmidt T 2007 *Appl. Phys. Lett.* **90** 053902
- [3] Toprak E, Balci H, Blehm B H, Selvin P R 2007 *Nano Lett.* **7** 2043
- [4] Pavani S R P, Thompson M A, Biteen J S, Lord S J, Liu N, Twieg R J, Piestun R, Moerner W E 2009 *PNAS* **106** 2995
- [5] Shtengel G, Galbraith J A, Galbraith C G, Lippincott-Schwartz J, Gillette J M, Manley S, Sougrat R, Waterman C M, Kanchanawong P, Davidson M W, Fetter R D, Hess H F 2009 *PNAS* **106** 3125
- [6] Piestun R, Schechner Y Y, Shamir J 2000 *JOSA A* **17** 294
- [7] Pavani S R P, Greengard A, Piestun R 2009 *Appl. Phys. Lett.* **95** 021103
- [8] Thompson M A, Lew M D, Badieirostami M, Moerner W E 2010 *Nano Lett.* **10** 211
- [9] Ober R J, Ram S, Ward E S 2004 *Biophys. J.* **86** 1185
- [10] Badieirostami M, Lew M D, Thompson M A, Moerner W E 2010 *Appl. Phys. Lett.* **97** 161103
- [11] Ram S, Prabhat P, Chao J, Ward E S, Ober R J 2008 *Biophys. J.* **95** 6025
- [12] Khonina S N, Kotlyar V V, Soifer V A, Honkanen M, Lautanen J, Turunen J 1999 *J. Mod. Opt.* **46** 227
- [13] Liu Z M 1981 *Error and Interpretation of Data* (Beijing: Atomic Energy Press) p21 (in Chinese) [刘智敏 1981 误差与数据处理 (北京:

Super-diffraction imaging in three-dimensional localization precision of the double-helix point spread function*

Chen He Yu Bin Chen Dan-Ni Li Heng Niu Han-Ben[†]

(*Optoelectronic Devices and Systems (Ministry of Education/Guangdong) Key Laboratory, College of Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China*)

(Received 7 March 2013; revised manuscript received 29 March 2013)

Abstract

The combination of switch effect and single molecule positioning can realize the sample super diffraction resolution imaging, and double helix point spread function will be a single molecular orientation nanometer resolution extending from two dimensions to three dimensions. In this paper, three-dimensional (3D) positioning accuracy of the double helix point spread function is discussed. First, the theoretical localization accuracy for an unbiased estimator of the double-helix point spread function is compared with that for 3D localization using Fisher information and the influences of localization accuracy including photon number, varying levels of background and pixel size are analyzed. Second, based on the localization algorithm of gaussian fitting, which is usually adopted in data analysis of single molecular orientation in the experimental process, the axial localization accuracy of double helix point spread function is obtained by the error transfer function law. Computer simulation results show that under the condition of more than 1000 photons in number, the positioning accuracy of gaussian fitting localization algorithm and theory localization accuracy of Fisher information are in good agreement. The discussion of the paper provides not only the theoretical basis for 3D positioning accuracy of double helix point spread function, but also the theoretical guidance for the experiment at the same time.

Keywords: double helix point spread function, Fisher information, localization precision, gaussian fitting

PACS: 42.30.-d, 42.30.Lr, 02.10.Yn, 87.10.-e

DOI: 10.7498/aps.62.144201

* Project supported by the National Basic Research Program of China (Grant No. 2012CB825802), the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 11004136, 61178080, 61235012), the Specially Funded Program on National Key Scientific Instruments and Equipment Development, China (Grant No. 2012YQ150092), and the Science and Technology Planning Project of Shenzhen, China (Grant Nos. JCYJ20120613173049560, ZYC201105170233A, GJHS20120621155433884).

[†] Corresponding author. E-mail: hbniu@szu.edu.cn