

基于累积量标准差的超分辨光学涨落成像解卷积优化

王雪花 陈丹妮 于斌 牛憨笨

Deconvolution optimization in super-resolution optical fluctuation imaging based on cumulant standard deviation

Wang Xue-Hua Chen Dan-Ni Yu Bin Niu Han-Ben

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 65, 198701 (2016) DOI: 10.7498/aps.65.198701

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.198701>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2016/V65/I19>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

并行化叠层成像算法研究

[Ptychographical algorithm of the parallel scheme](#)

物理学报.2016, 65(15): 154203 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.154203>

半波片角度失配对通道调制型偏振成像效果的影响及补偿

[Effect of half wave plate angle mismatch on channel modulating imaging result and its compensation](#)

物理学报.2016, 65(13): 134202 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.134202>

多波长同时照明的菲涅耳域非相干叠层衍射成像

[Incoherent ptychography in Fresnel domain with simultaneous multi-wavelength illumination](#)

物理学报.2016, 65(12): 124201 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.124201>

厚样品三维叠层衍射成像的实验研究

[Experimental study on three-dimensional ptychography for thick sample](#)

物理学报.2016, 65(1): 014204 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.014204>

基于法布里-珀罗调谐滤波器的傅里叶域锁模扫频激光光源

[Fiber Fabry-Perot tunable filter based Fourier domain mode locking swept laser source](#)

物理学报.2013, 62(6): 068703 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.068703>

基于累积量标准差的超分辨光学涨落 成像解卷积优化*

王雪花 陈丹妮[†] 于斌 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, 深圳生物医学工程重点实验室, 深圳 518060)

(2016年6月13日收到; 2016年7月12日收到修改稿)

超分辨光学涨落成像方法通过计算一组随机闪烁图像序列的累积量来提高空间分辨率. 在实际实验中, 由于计算的图像序列帧数有限, 每个像素上累积量估计的误差将显著影响重构图像的均匀性和连续性. 传统超分辨光学涨落成像技术由于缺乏对累积量估计的误差分析, 在其后续的 Lucy-Richardson 解卷积算法中, 没有对累积量重构图像的噪声添加约束条件. 本文利用基于单组有限长数据的累积量标准差公式, 计算了超分辨光学涨落显微图像每个像素上的累积量标准差, 并将结果引入 Lucy-Richardson 解卷积算法中作为迭代优化的偏差阈值. 模拟和实验结果表明, 在相同图像序列长度下, 该优化方法显著提高了超分辨重构图像的均匀性和连续性; 在同等图像质量下, 该方法可缩短图像序列帧数至原来的一半以下, 有望用于活细胞动态超分辨成像.

关键词: 超分辨显微, 累积量, 解卷积

PACS: 87.64.M-, 42.30.-d, 43.60.Cg, 87.64.-t

DOI: 10.7498/aps.65.198701

1 引言

2009年, 研究人员利用发光体在时间序列上的随机光学涨落特性, 提出一种新的超分辨光学涨落成像方法(super-resolution optical fluctuation imaging, SOFI)^[1]. SOFI通过计算一组随机闪烁图像序列的累积量来突破光学衍射极限, 具有无背景噪声干扰、高对比度、系统简单和快速成像等优点^[1,2]. 在SOFI成像时, 样品中的每个荧光分子随机闪烁且相互独立, 相机连续拍摄一组宽场显微图像, 计算每个像素点在时间序列上的累积量, 作为这个像素点的重构图像灰度值^[1]. 这个方法的一个重要缺陷是SOFI图像的分辨率受限于原图的像素尺寸. 为此, Dertinger课题组^[3]提出了计算原图相邻像素的时空互累积量产生虚像素的方

法, 使有效像素大小满足超分辨图像的要求, SOFI图像分辨率突破了原图像素大小. 后来, 为了修正时空互累积量SOFI图像的非线性光强响应和闪烁非均匀性, Geissbuehler等^[4]提出了更为完善的平衡SOFI(balanced SOFI, bSOFI)方法. 最近, Stein课题组^[5]提出了另一种更简单和直接的傅里叶域插值SOFI方法(Fourier interpolation SOFI, fSOFI). 与时空互累积量SOFI技术直接将算法应用于相机获取的原图序列不同, fSOFI先通过傅里叶域插值将原图细分成具有更精细像素网格的新图像, 然后再计算每个像素上的累积量作为fSOFI的图像值. fSOFI不仅消除了繁复的多种像素组合的互累积量计算, 且消除了互累积量SOFI图像存在的伪影, 提高了超分辨重构图像的质量^[5].

同基于单分子定位的超分辨显微技术相

* 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: 61335001, 61178080, 61235012, 11004136)、国家重大科学仪器设备开发专项(批准号: 2012YQ15009203)和深圳市科技计划项目(批准号: JCYJ20120613173049560, GJHS20120621155433884)资助的课题.

[†] 通信作者. E-mail: danny@szu.edu.cn

[‡] 通信作者. E-mail: hbniu@szu.edu.cn

比^[6-10], SOFI无需同步控制标记物的发光特性,且允许单个衍射极限斑内标记多个发光分子^[2],但随着累积量阶数的提高或图像序列长度的减少,每个像素上累积量估计的误差将显著影响重构图像的均匀性和连续性^[11-14],从而无法保证SOFI图像中样品的完整结构和细节信息,给图像的解读带来困难和干扰.本文首先简要回顾了fSOFI成像原理,然后利用本研究组已推导出的基于单组有限长数据的累积量方差公式^[14],计算了fSOFI图像每个像素上的累积量标准差,并将其引入后续的Lucy-Richardson解卷积算法中作为迭代优化的偏差阈值,达到抑制噪声、提高重构图像质量的目的.模拟和实验结果表明,在相同图像序列长度下,累积量标准差解卷积优化方法可显著提高fSOFI图像质量(均匀性和连续性);在同等图像质量下,该方法可大幅缩短fSOFI图像帧数,提高超分辨率成像速度2倍.

2 fSOFI原理

宽场荧光显微图像由荧光分子分布与系统点扩散函数卷积而成:

$$F(\mathbf{r}, t) = \sum_{k=1}^M U(\mathbf{r} - \mathbf{r}_k) \varepsilon_k s_k(t), \quad (1)$$

其中 \mathbf{r} 表示像素的位置, t 表示序列开始的时刻, $F(\mathbf{r}, t)$ 表示 t 时刻 \mathbf{r} 位置收集到的光子数, $U(\mathbf{r} - \mathbf{r}_k)$ 是系统点扩散函数(point spread function, PSF), ε_k 是第 k^{th} 个分子的最大亮度, $s_k(t)$ 是归一化的时间涨落函数, M 表示标记的荧光分子个数.假设所有分子随机闪烁且相互独立,则二阶SOFI可以由像素上光振动量的相关函数来表示^[1]:

$$\begin{aligned} C_2(\mathbf{r}, t, \tau_1) &= \langle \delta F(\mathbf{r}, t) \cdot \delta F(\mathbf{r}, t + \tau_1) \rangle \\ &= \sum_k U^2(\mathbf{r} - \mathbf{r}_k) \cdot \varepsilon_k^2 \cdot \langle \delta s_k(t) \cdot \delta s_k(t + \tau_1) \rangle, \quad (2) \end{aligned}$$

其中 τ_1 表示延时, $\langle \dots \rangle$ 表示对时间求平均, $\delta F(\mathbf{r}, t) = F(\mathbf{r}, t) - \langle F(\mathbf{r}, t) \rangle$ 表示像素上光强的振动量.依次类推,根据矩与累积量的转换公式^[15,16],三、四阶SOFI可以表示为

$$\begin{aligned} C_3(\mathbf{r}, t, \tau_1, \tau_2) &= \langle \delta F(\mathbf{r}, t) \cdot \delta F(\mathbf{r}, t + \tau_1) \cdot \delta F(\mathbf{r}, t + \tau_2) \rangle, \\ C_4(\mathbf{r}, t, \tau_1, \tau_2, \tau_3) &= \langle \delta F(\mathbf{r}, t) \cdot \delta F(\mathbf{r}, t + \tau_1) \cdot \delta F(\mathbf{r}, t + \tau_2) \cdot \delta F(\mathbf{r}, t + \tau_3) \rangle - \langle \delta F(\mathbf{r}, t + \tau_1) \cdot \delta F(\mathbf{r}, t + \tau_2) \rangle \cdot \langle \delta F(\mathbf{r}, t) \cdot \delta F(\mathbf{r}, t + \tau_3) \rangle - \langle \delta F(\mathbf{r}, t + \tau_2) \cdot \delta F(\mathbf{r}, t + \tau_3) \rangle \cdot \langle \delta F(\mathbf{r}, t) \cdot \delta F(\mathbf{r}, t + \tau_1) \rangle. \quad (3) \end{aligned}$$

理想情况下,为了获得图像序列完整的相关信息,(2)和(3)式需对所有的延时 $\{\tau\}$ 积分^[5],其中 $0 < \tau < \tau_{\text{max}}$, τ_{max} 为任意大值,使所有分子涨落信号的延时累积量为0.本文为了简化计算,同时消除 $\tau = 0$ 时相关的散粒噪声,只计算 $\tau = 1$ 的延时累积量作为SOFI的图像值.模拟和实验结果表明, $\tau = 1$ 延时累积量SOFI也能取得较好的效果^[5].

上述自累积量SOFI技术,由于像素大小无法满足超分辨率重构图像的要求,其分辨率受限于原图的像素尺寸,因此,Stein课题组^[5]提出利用傅里叶域插值使相机获取的原图具有更多像素数目和更小的有效像素尺寸,然后再计算其每个像素上的累积量作为fSOFI的图像值.

3 累积量标准差

理论上,(2)和(3)式中用于矩和累积量计算的数据是无限长的,但在实际实验中,由于荧光漂白或其他时间因素,SOFI计算的图像序列是一个有限长的随机样本,任何基于此样本的统计(例如累积量)本身也是随机变量.根据统计理论,方差(标准差)可以表征有限长样本估计的精度.通常确定统计量方差的方法是多次重复试验,但对于SOFI实验来说,由于光损伤和成像系统漂移等因素,多次重复试验的方法不实际.最近,Vandenberg课题组提出用统计重采样的方法来估计互累积量SOFI图像每个像素上的累积量方差^[17].这个方法的缺点是它只是对累积量方差的一个估计,并不是精确结果.因此,我们提出利用数学软件Mathematica(wolfram research, champaign, Illinois)和软件包MathStatica(Mathstatica, Sydney, Australia)^[18]推导基于单组序列的累积量理论方差公式^[14].其步骤如下:假设 $\mathbf{X} = [x_1, x_2, \dots, x_N]$ 表示傅里叶插值后图像任意像素上的时间振动信号, N 表示数据长度,先求得振动信号的 n (n 为正整数)阶无偏估计累积量;再推算累积量的方差,并将结果表示

为振动信号中心矩的形式. 例如, 二阶累积量方差 (variance, VAR) 公式如下:

$$VAR_2 = -\frac{(N-2) \cdot M_{1,1}^2}{N \cdot (N-1)} + \frac{M_{0,2} \cdot M_{2,0}}{N \cdot (N-1)} + \frac{M_{2,2}}{N}, \quad (4)$$

其中 $M_{r,s} = \langle \delta^r \mathbf{X}(t) \cdot \delta^s \mathbf{X}(t + \tau_1) \rangle$ ($0 \leq r, s \leq 2$) 表示时间振动信号的中心矩. 我们推算到 $n = 5$ 阶, 其中二阶以上累积量方差公式太长没有表示出来. 累积量的标准差可以通过求方差的算术平方根得到.

为了验证累积量方差公式同时与统计重采样算法对比, 我们模拟生成了 100 组荧光分子随机闪烁序列, 每组序列添加 20 个光子的背景噪声和泊松散粒噪声. 一方面, 计算 100 组序列的延时累积量并统计其标准差; 另一方面, 随机抽取一组序列, 分别用统计重采样算法和理论公式计算累积量的标准差. 然后改变序列长度, 计算累积量标准差随序列长度的变化曲线, 如图 1 所示. 由于延时累积量计算的序列是同一个像素上的延时信号, 连续帧数的闪烁信号不是完全独立的, 导致统计重采样算法估计误差非常大^[17]; 而累积量方差公式是基于统计理论推导的表达式, 统计精度远高于统计重采样算法.

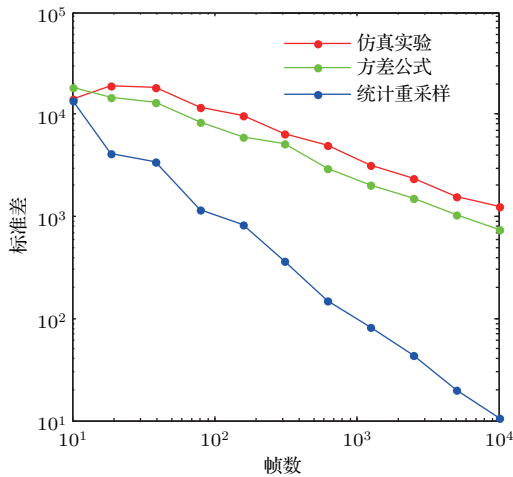


图 1 (网刊彩色) 统计重采样算法与理论累积量方差公式对比

Fig. 1. (color online) Comparison of statistical resampling algorithm with theoretical cumulant variance.

4 解卷积优化

SOFI 成像时, n 阶累积量重构图像的 PSF 是原系统 PSF 的 n 次方, 理论上, 通过累积量计算,

即可将三维空间分辨率提升至衍射极限的 $n^{1/2}$ 倍^[1]. 此外, 由于累积量等效光学传递函数 (optical transfer function, OTF) 的频谱是原系统 OTF 的 n 倍, 通过傅里叶域加权或解卷积可进一步提高分辨率至 n 倍^[3,4]. 因此, Geissbuehler 等^[4] 提出利用 Lucy-Richardson (LR) 算法对累积量重构图像进行解卷积, 再求 n 次方根以消除累积量图像强度与分子光强的非线性响应, 最后与 $U(n\mathbf{r})$ 重卷积, 使 SOFI 图像分辨率提高至衍射极限的 n 倍.

Lucy-Richardson 算法假定图像噪声服从 Poission 分布, 采样最大似然法估计清晰图像, 是一种基于贝叶斯分析的迭代算法. MATLAB 提供的 deconvlucy() 函数, 就是利用加速收敛的 Lucy-Richardson 算法对图像进行复原. 该算法的迭代式为^[19]

$$\hat{f}_{k+1} = \hat{f}_k \left(h * \frac{g}{h \otimes \hat{f}_k} \right) \triangleq \psi(\hat{f}_k), \quad (5)$$

其中, g 为输入图像, h 为等效 PSF, \hat{f}_k 为第 k 次迭代的输出图像, \otimes 和 $*$ 分别为卷积运算和相关运算符, $\psi(\hat{f}_k)$ 为 L-R 函数. 若输入图像噪声不可忽略, Lucy-Richardson 算法本身并不收敛, 在迭代过程中会放大噪声. 因此, 通常需在算法中添加噪声约束条件, 终止迭代过程, 防止噪声进一步放大^[19].

传统 SOFI 技术由于缺乏对每个像素上累积量估计的误差分析, 在其后续的 Lucy-Richardson 解卷积算法中, 除了估计累积量图像的等效 PSF, 和指定迭代次数为 100, 并没有对累积量重构图像的噪声添加约束条件^[4].

本文根据基于单组序列的累积量标准差公式 ((4) 式), 求得 fSOFI 图像每个像素上的累积量标准差, 并将其引入 Lucy-Richardson 算法中作为迭代优化的偏差阈值. 当恢复图像与输入图像的背离程度超过偏差阈值, 迭代过程停止, 从而达到抑制噪声, 提高超分辨重构图像质量的目的.

5 模拟和实验结果

我们通过 Matlab 模拟和实验数据, 验证了累积量标准差解卷积优化方法提高 fSOFI 图像质量的效果. 模拟采用系统点扩散函数的半高全宽为 250 nm, 探测器的有效像元尺寸为 100 nm, 有效成像大小为 $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$. 样品为均匀分布在两条平行带上的荧光分子, 带间隔为 200 nm, 标记密度为 8 个/ μm , 所有分子随机闪烁且相互独立 (如图 2 所

示). 模拟得到样品的800帧闪烁图像. 800帧闪烁图像的平均处理结果表明, 由于光学衍射极限, 两条分子带间隔无法区分(图2(a)). 图2(b)为800帧图像序列的原3阶fSOFI处理结果. fSOFI明显提高了图像空间分辨能力, 两条分子带被区分开来, 但是由于序列长度有限, 每个像素上累积量估计的误差致使重构fSOFI图像分布不均匀, 出现结构不完整的现象, 如图2(b)中黄色箭头所指处. 而在Lucy-Richardson解卷积算法中引入每个像素上的累积量标准差作为迭代优化的偏差阈值后, 重构图像的均匀性和连续性明显得到了增强(图2(c)).

接下来, 为了表明在同等图像质量下, 累积量标准差解卷积优化方法可以缩短图像序列帧数, 提高时间分辨率, 我们计算了2000帧序列的原3阶fSOFI处理结果, 如图2(d)所示. 与图2(b)相比, 图2(d)由于延长了图像序列, 每个像素上累积量统计的均匀性变好, fSOFI图像质量得到了改善. 为了定量评判图像的均匀性, 图2(e)分别计算了

图2(a)—(d)中分布在两条平行线上信号强度的相对误差(标准差/平均值). 如图所示, 图2(c)的相对误差比图2(b)要低, 表明累积量标准差解卷积优化提高了重构图像的均匀性. 而图2(d)相对误差与图2(c)相当. 这意味着在同等图像质量下, 采用本文提出的累积量标准差解卷积优化方法缩短图像帧数至原来的一半以下. 图2(f)分别给出了图2(a)—(d)中沿白线的光强分布(为了消除个别像素的影响, 这里的强度来自沿 x 轴20个像素上光强的平均), 依次用蓝、绿、红、花青表示. 结果表明, 与平均(蓝)处理的图像相比, 3阶fSOFI(绿、红、花青)不仅消除了平均图中存在的背景噪声, 且明显提高了空间分辨率. 其中800帧累积量标准差解卷积优化fSOFI(红)与原fSOFI(绿)相比空间分辨率稍有提升, 2000帧fSOFI处理后(花青), 空间分辨率进一步提高. 这表明, 累积量标准差解卷积优化方法, 不仅可以降低噪声, 增强重构图像均匀性, 而且使fSOFI分辨率更趋近理论值.

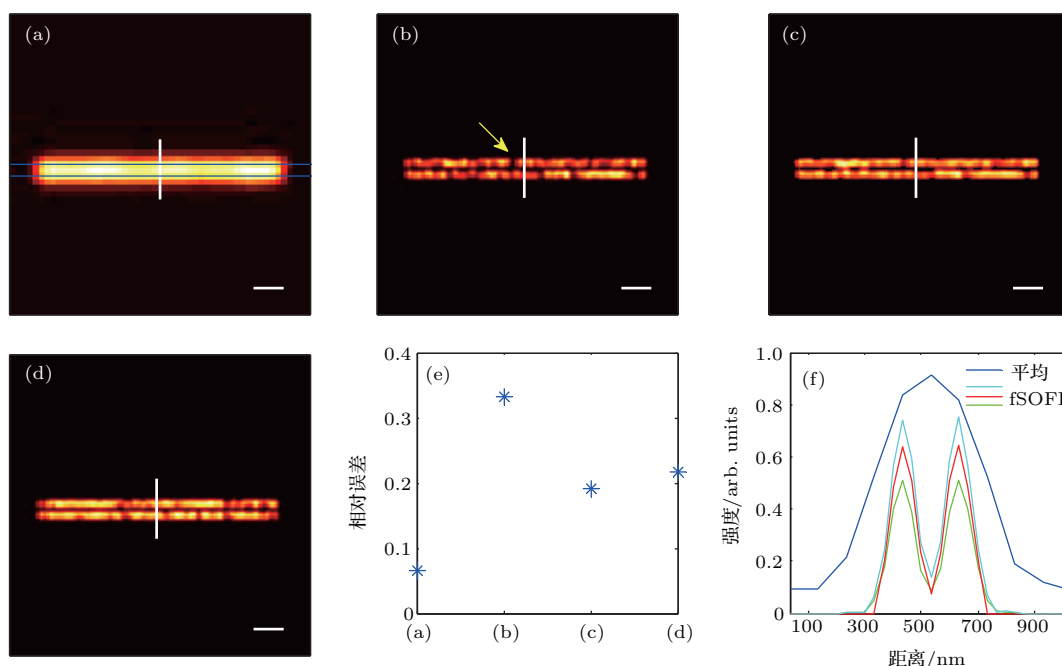


图2 (网刊彩色) 模拟数据原fSOFI处理和累积量标准差解卷积优化fSOFI处理结果比较 (a) 800帧荧光闪烁图像的平均; (b) 原3阶fSOFI处理结果; (c) 累积量标准差解卷积优化3阶fSOFI结果; (d) 2000帧序列的原3阶fSOFI处理结果; (e) 分别计算了(a)—(d)中分布在两条平行线上信号强度的相对误差; (f) 分别给出了(a)(蓝), (b)(绿), (c)(红)和(d)(花青)中沿白线的光强分布(沿 x 轴20个像素上光强的平均). 图中白色标尺为500 nm

Fig. 2. (color online) Comparison of raw fSOFI and deconvolution optimization fSOFI based on cumulant standard deviation with simulation: (a) Average image of superimposing 800 independent fluorophores blinking images; (b) super-resolution image of (a) after raw 3rd order fSOFI process; (c) 3rd order fSOFI result with the cumulant standard deviation in each pixel served as a DAMPAR in Lucy-Richardson algorithm; (d) raw 3rd order fSOFI result with 2000 blinking images; (e) relative error of signals distributed on two parallel lines in (a)–(d); (f) cross-sections indicated by white lines (averaged over 20 pixels along x) in (a) (blue), (b) (green), (c) (red) and (d) (cyanidin). Scale bars: 500 nm.

为了表明累积量标准差解卷积优化可以提高实际数据的图像质量, 我们将fSOFI算法应用于高密度闪烁荧光标记的微管蛋白实验数据^[20]. 系统参数为: 帧频=25 fps, 图像尺寸=64 × 64 像素,

像素大小=100 nm, 数值孔径=1.3油浸物镜, 波长=690 nm. 图3(a)为500帧闪烁序列的平均图, 图3(b)和图3(c)分别为原3阶fSOFI和累积量标准差解卷积优化3阶fSOFI处理结果.

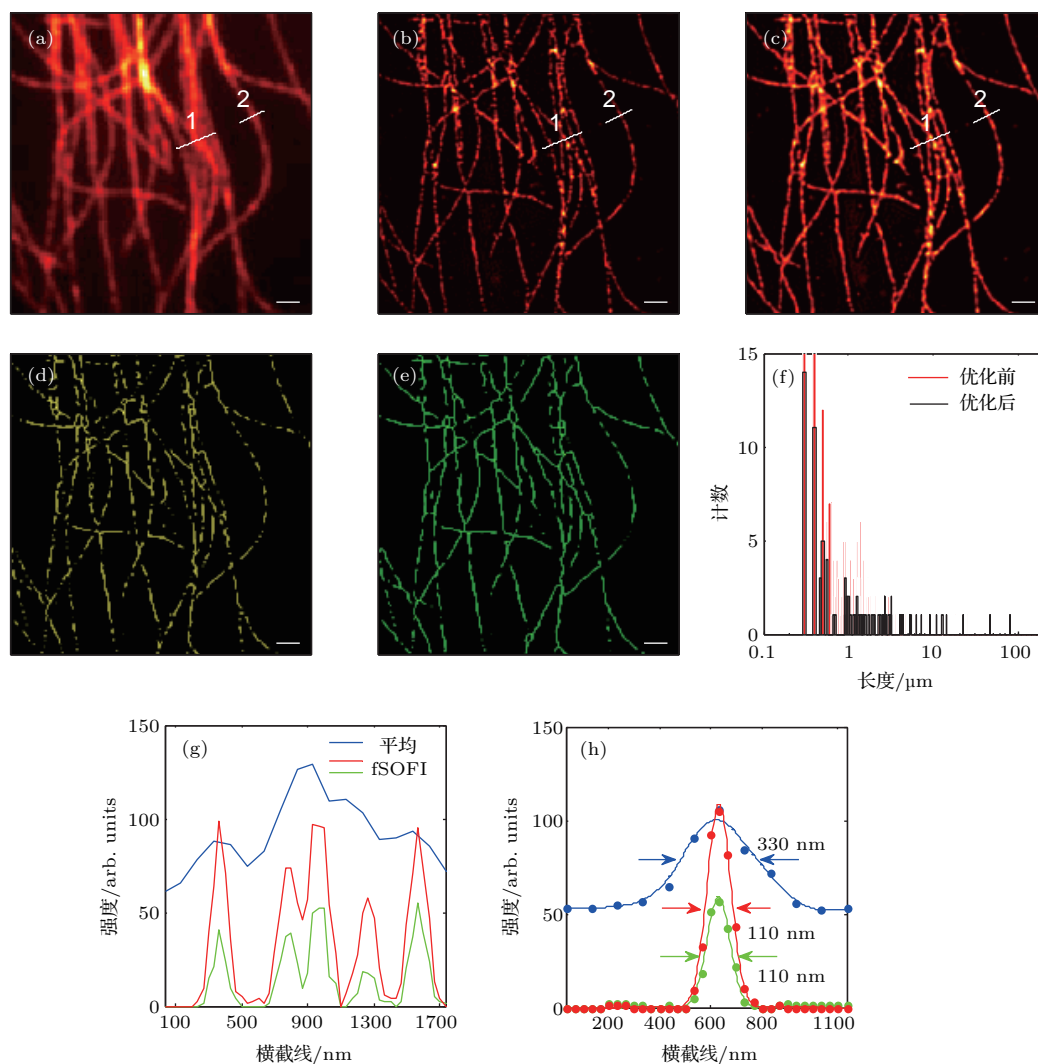


图3 (网刊彩色) 实验数据原 fSOFI 处理和累积量标准差解卷积优化 fSOFI 处理结果比较 (a) 500 帧高密度闪烁荧光标记微管蛋白图像的平均; (b) 原 3 阶 fSOFI 处理结果; (c) 累积量标准差解卷积优化 3 阶 fSOFI 结果; (d) 和 (e) 分别为 (b) 和 (c) 中微管网络的骨架图; (f) 直方图统计 (d) 和 (e) 中连续微管网络的长度和数目; (g) 分别给出了 (a) (蓝), (b) (绿), 和 (c) (红) 中沿白线 1 的光强分布; (h) 为 (a)–(c) 中沿白线 2 的光强分布; 图中白色标尺为 1 μm .
Fig. 3. (color online) Comparison of raw fSOFI and deconvolution optimization fSOFI based on cumulant standard deviation with real data: (a) Average images of Tubulins networks labeled by high density blinking fluorophores; (b), (c) super-resolution image of (a) after raw 3rd order fSOFI process and deconvolution optimization fSOFI process based on cumulant standard deviation, respectively; (d), (e) skeletonized images of (b) and (c); (f) histograms of the length of the continuous lines in (d) and (e); (g) cross-sections indicated by white line1 in (a) (blue), (b) (green) and (c) (red); (h) cross-sections indicated by white line2 in (a)–(c). Scale bars: 1 μm .

如图3所示, 图3(c)显著增强了fSOFI图像的对比度、均匀性和连续性, 保证了样品结构的完整信息. 为了更清晰地比较图中微管结构的连续性^[13], 我们利用软件Fiji和插件 Skeletonize 3D^[21,22]画出了图3(b)和图3(c)微管网络的骨骼

图, 如图3(d)和3(e)所示. 并在图3(f)中通过直方图统计定量分析了连续微管网络的长度和数目^[13]. 显然, 图3(d)具有的骨骼长度大多分布在0.1–10 μm 之间, 而图3(e)具有更多长度至几十微米, 甚至超过100 μm 的骨骼. 因此, 图3(c)比

图3(b)表现出增强的连续性和完整性. 图3(g)和图3(h)分别给出了图3(a)—(c)中沿白线1和2的光强分布. 如图3(g)所示, 原来无法区分的紧密排列的微管精细结构(蓝)在3阶fSOFI处理后(绿、红)可以很好的分辨. 图3(h)表明微管结构的半高全宽通过累积量标准差解卷积优化3阶fSOFI处理后(红), 从330 nm 缩减至110 nm, 空间分辨率提升至原来的3倍.

此外, 我们对比了500帧实验图像序列的原3阶fSOFI处理结果(图4(a))和250帧累积量标准差解卷积优化3阶fSOFI处理结果(图4(b)). 如图4所示, 两者图像质量相当, 表明累积量标准差解卷积优化方法可以大幅缩短图像帧数, 提高实际成像速度2倍.

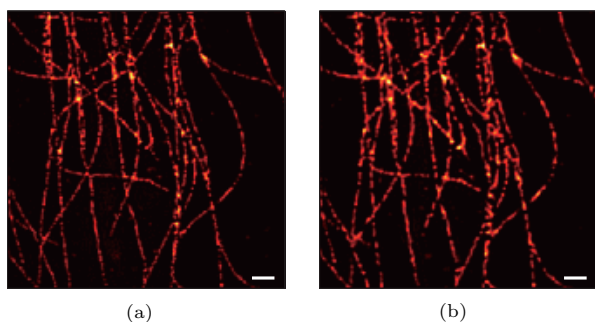


图4 (网刊彩色) 累积量标准差解卷积优化fSOFI提高实际成像速度 (a) 500帧序列原3阶fSOFI处理结果; (b) 250帧累积量标准差解卷积优化3阶fSOFI结果, 图中白色标尺为1 μm

Fig. 4. (color online) Deconvolution optimization fSOFI based on cumulant standard deviation improve imaging speed: (a) Raw 3rd order fSOFI result with 500 blinking images; (b) 3rd order fSOFI result after deconvolution optimization based on cumulant standard deviation with 250 blinking images. Scale bars: 1 μm .

6 结 论

本文利用基于单组有限长序列的累积量标准差公式, 计算了fSOFI图像每个像素上的累积量标准差, 并将其引入后续的Lucy-Richardson解卷积算法中作为迭代优化的偏差阈值. 模拟和实验结果表明, 在相同数据长度下, 累积量标准差解卷积优化fSOFI相比传统技术有效增强了重构图像的均匀性和连续性, 更加真实地还原出所研究生物样品的完整结构和细节信息. 另一方面, 在同等图像质

量下, 累积量标准差解卷积优化缩短了fSOFI图像帧数, 提高成像速度2倍, 为超分辨成像研究活细胞内动态过程提供了新的技术方法.

参考文献

- [1] Dertinger T, Colyer R, Iyer G, Weiss S, Enderlein J 2009 *Proc. Nat. Acad. Sci.* **106** 22287
- [2] Geissbuehler S, Dellagiacomma C, Lasser T 2011 *Biomed. Opt. Express* **2** 408
- [3] Dertinger T, Colyer R, Vogel R, Enderlein J, Weiss S 2010 *Opt. Express* **18** 18875
- [4] Geissbuehler S, Bocchio N L, Dellagiacomma C, Berclaz C, Leutenegger M, Lasser T 2012 *Opt. Nanoscopy* **1** 1
- [5] Stein S C, Huss A, Hähnel D, Gregor I, Enderlein J 2015 *Opt. Express* **23** 16154
- [6] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, Lindwasser O W, Olenych S, Bonifacino J S, Davidson M W, Lippincott-Schwartz J, Hess H F 2006 *Science* **313** 1642
- [7] Rust M J, Bates M, Zhuang X 2006 *Nat. Methods* **3** 793
- [8] 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, 牛憨笨 2010 物理学报 **59** 6948]
- [9] Li H, Yu B, Chen D N, Niu H B 2013 *Acta Phys. Sin.* **62** 124201 (in Chinese) [李恒, 于斌, 陈丹妮, 牛憨笨 2013 物理学报 **62** 124201]
- [10] Wang X, Chen D, Yu B, Niu H 2015 *Appl. Opt.* **54** 6919
- [11] Koppel D E 1974 *Phys. Rev. A* **10** 1938
- [12] Qian H 1990 *Biophys. Chem.* **38** 49
- [13] Zeng Z, Chen X, Wang H, Huang N, Shan C, Zhang H, Teng J, Xi P 2015 *Sci. Rep.* **5** 1
- [14] Wang X, Chen D, Yu B, Niu H 2016 *Appl. Opt.* **55** 7911
- [15] Kendall M G, Stuart A 1977 *The Advanced Theory of Statistics* (Vol. 1) (New York: MacMillan Publishing) pp57–96
- [16] Rose C, Smith M D 2002 *Mathematical Statistics with Mathematica* (New York: Springer) pp31–80
- [17] Vandenberg W, Duwé S, Leutenegger M, Moeyaert B, Krajnik B, Lasser T, Dedecker P 2016 *Biomed. Opt. Express* **7** 467
- [18] Müller J D 2004 *Biophys. J.* **86** 3981
- [19] Biggs D S C, Andrews M 1997 *Appl. Opt.* **36** 1766
- [20] Courtesy of Nicolas Olivier and Debora Keller, LEB, EPFL <http://bigwww.epfl.ch/smlm/datasets/>[2016-03-20]
- [21] Arganda-Carreras I, Fernández-González R, Muñoz-Barrutia A, Ortiz-De-Solorzano C 2010 *Microsc. Res. Tech.* **73** 1019
- [22] Lee T C, Kashyap R L, Chu C N 1994 *Graph. Model. Im. Proc.* **56** 462

Deconvolution optimization in super-resolution optical fluctuation imaging based on cumulant standard deviation^{*}

Wang Xue-Hua Chen Dan-Ni[†] Yu Bin Niu Han-Ben[‡]

(Key Laboratory of Optoelectronics Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, Shenzhen Key Laboratory of Biomedicine Engineering, College of Optoelectronics Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

(Received 13 June 2016; revised manuscript received 12 July 2016)

Abstract

The super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI) technique enhances image spatial resolution by evaluating the independent stochastic intensity fluctuations of emitters. In principle, it eliminates any noise uncorrelated temporally, and provides unlimited spatial resolution since the calculation of the n th-order cumulant followed by a deconvolution results in an image with n -fold resolution improvement in three dimensions. But in practice, due to limited data length, the statistical uncertainty of cumulants will affect the continuity and homogeneity of SOFI image, which results in the fact that the high order SOFI (typically over 3rd order) cannot improve spatial resolution significantly. Since the variance characterizes the statistical uncertainty of cumulant, we deduce its theoretical expression based on a single dataset. In traditional SOFI techniques, due to lack of statistical analysis of cumulant, there is no noise constraint condition of cumulant in the Lucy-Richardson deconvolution to prevent the algorithm from causing noise amplification. In this paper, based on the cumulant variance formula, we calculate the cumulant standard deviation in each pixel of SOFI image and introduce the results into the Lucy-Richardson algorithm as a DAMPAR to suppress the noise generation in such pixels. The simulation and experimental results show that under the same data length, the deconvolution optimization based on cumulant standard deviation significantly improves the uniformity and continuity of SOFI image. On the other hand, under the premise of identical image quality, this optimization technique can also greatly shorten the image frames to less than half the original, thus promoting the development of super-resolution imaging of living cells.

Keywords: super-resolution microscopy, cumulant, deconvolution

PACS: 87.64.M-, 42.30.-d, 43.60.Cg, 87.64.-t

DOI: [10.7498/aps.65.198701](https://doi.org/10.7498/aps.65.198701)

* Project supported by the National Basic Research Program of China (Grant No. 2012CB825802), National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 61335001, 61178080, 61235012, 11004136), the Special Funds of the Major Scientific Instruments Equipment Development of China (Grant No. 2012YQ15009203), and the Science and Technology Planning Project of Shenzhen, China (Grant Nos. JCYJ20120613173049560, GJHS20120621155433884).

† Corresponding author. E-mail: danny@szu.edu.cn

‡ Corresponding author. E-mail: hbniu@szu.edu.cn