基于 FPGA 实时非线性校正的共振扫描激光共聚焦显微成像*

孔宵毓 1)3)4)# 温凯 1)3)4)# 郭栩宏 2)3)4) 蔡仲夏 1)3)4) 安莎 1)3)4) 郑娟娟 1)3)4) 高鹏 1)3)4) 郜鹏 1)3)4)†

1)（西安电子科技大学物理学院，西安 710071）

2)（西安电子科技大学光电工程学院，西安 710071）

3)（复杂环境光电感知教育部重点实验室，西安 710071）

4)（西安市超分辨光学显微工程研究中心，西安 710071）

摘 要

共聚焦显微技术具备优异的离焦背景抑制能力，是三维显微成像的主流技术。但其依赖线性振镜逐点扫描，成像速度慢。共振扫描是实现高速扫描的有效途径。针对高速共聚焦成像及共振扫描非线性畸变问题，本文构建了一种基于 FPGA 实时非线性校正的共振扫描激光共聚焦显微系统（RS-LCM）。该技术利用一共振和线性振镜组合实现对焦点的二维扫描，并利用 FPGA 同步控制激光调制、振镜扫描与单光子探测器采集。建立时间—空间位置映射模型，通过插值重采样实现图像实时畸变校正，克服了共振振镜非线性运动引起的空间采样不均匀问题。与传统共聚焦显微技术相比，该技术成像速度提升了 20 倍；相较于现有的共振扫描图像重建技术，基于 FPGA 的板内重建速度提升达 115 倍。此外，将 RS-LCM 与单颗粒追踪相结合，实现对动态微纳颗粒二维扩散过程的跟踪观测，并对其扩散系数进行了定量测量。

关键词：共振扫描；激光共聚焦；非线性图像重构；单颗粒追踪

*

* 国家自然科学基金（批准号：62335018，62575230，62505242）、中央高校青年教师科研创新能力支持项目（批准号：ZYGXQNJSKYCXNLZCXM-123）、陕西省重点研发计划（批准号：2024GH-ZDXM-05）、陕西省自然科学基金（批准号：2025JC-YBQN-819）和中国博士后科学基金（批准号：2024M762528）资助的课题。

† 通讯作者 E-mail：peng.gao@xidian.edu.cn

第一作者 E-mail：2096307328@qq.com

这些作者对本文做出了同等贡献

1 引 言

激光扫描共聚焦显微技术(Laser Scanning Confocal Microscope，LSCM)通过聚焦光斑逐点扫描样品，并利用共轭针孔抑制焦外信号，获得高信噪比、高空间分辨的光学切片图像，广泛应用于生命科学、材料科学及微纳尺度物理过程研究[1-8]。传统 LSCM 通常采用线性振镜进行二维焦点扫描，受振镜机械惯性限制，其扫描速度较低（≤1 kHz/线），导致单帧图像采集时间较长，难以满足快速动态过程的连续观测需求[9,10]。因此，如何在保持共聚焦成像质量的前提下提升其扫描速度，是构建高性能、实用化共聚焦显微技术中亟待解决的问题。

为提高成像速度，研究者先后发展了转盘共聚焦、多焦点并行扫描、线扫描及高速振镜扫描等方法。Tanaami 等利用微透镜阵列和 Nipkow 转盘实现了毫秒量级高速共聚焦成像[11]。Rutkauskas 和 Auksorius 利用数字微镜器件实现多点并行照明与共焦探测，提高了反射式共聚焦显微镜的采集速度[12]。Hell 团队利用两个级联的电光偏转振镜（≥100 kHz/线）实现超高速二维焦点扫描,并在此基础上实现了超高速受激发射损耗（stimulated emission depletion，STED）显微成像[13]。此外，共振振镜利用机械谐振实现高频周期性往返扫描,可将机械扫描速度提升一个数量级。近年来，共振扫描已应用于共聚焦、图像扫描显微及单颗粒追踪等快速成像系统[14-17]，显示出良好的动态成像潜力。

共振扫描会导致位移随时间呈非线性变化，等时间间隔内焦点在空间的位移不均匀[18]；若直接按等时间间隔重建图像，将出现中心压缩、两端拉伸，以及双向扫描错位等畸变。迄今为止，已有研究提出了多种非线性畸变校正方法以解决该问题。Carriles 等人[19]提出利用共振周期中速度变化较小的中央扫描区域进行成像，但该方法需要舍弃扫描两端的数据，会降低有效扫描范围和信号采集效率。Tsien[20]和 Leybaert[21]等人通过探测共振光束经过 Ronchi 光栅引起的强度随时间分布来实时检测焦点位置，并产生对应的非等时间间隔的可变像素时钟，从而将采集到的光子投影到对应的空间格点上。此类方法能够在数据采集阶段实现实时等空间采

样，但需要增加位置检测和可变时钟控制模块，使得系统结构较复杂。另一类方法利用共振振镜的正弦运动规律，通过坐标映射和数值插值将等时间采集得到的数据相应地投射到等空间间隔像素网格[22]。Giacomelli 采用位置相关滤波与三次 Hermite 插值[23]，并利用 CPU 的 AVX SIMD 向量化并行处理实现了超过 1 Gpixel/s 的插值处理速度。然而，其所采用的 PC 端光子流重建方法通常需要在采集后对原始事件进行逐点像素映射，数据传输及主机端后处理耗时较长（秒量级）[24]。针对单帧 1024×1024 分辨率图像的非线性校正，该方法耗时达 54 ms/帧；同时，其依赖的高阶滤波与插值运算对 CPU 计算吞吐能力及系统内存带宽构成明显瓶颈。

针对上述问题，本文提出了一种基于 FPGA 实时非线性校正的共振扫描的激光共聚焦显微成像方法(RS-LCM)。采用扫描频率为 12 kHz/line 的共振振镜完成 *x* 方向高速扫描，采用线性振镜完成 *y* 方向逐行扫描。为克服共振扫描固有的非线性时空畸变，系统基于 FPGA 构建专用硬件逻辑单元，通过并行实时计算建立精确的扫描时空映射关系，从而实现亚毫秒级在线非线性校正。相较于传统点扫描共聚焦显微技术，RS-LCM 的成像速度提升达 20 倍；相较于现有的共振扫描图像重建技术，基于 FPGA 的板内重建速度提升达 115 倍。最后，通过结合单粒子追踪（SPT）对布朗运动中微粒进行了跟踪观测，并准确量化其扩散系数。以上方案为活体或溶液环境中微粒动力学分析提供了可靠的技术支撑。

2 实验原理

2.1 RS-LCM成像光路

图 1 为 RS-LCM 成像系统的光路示意图。波长 637 nm 的激光经单模光纤输出后，由准直透镜 L1 扩束并准直为平行光束；该光束经二向色镜 DM1 反射后，入射至二维扫描振镜系统。二维扫描模块由共振振镜 RM 和线性振镜 GM 组成，其中 RM 以 12 kHz 线频在 *x* 方向执行高速谐振扫描，GM 用于控制光束在 *y* 方向逐行移动。扫描光束经扫描透镜 SL 会聚，并通过由筒镜 TL1 和显微物镜 MO 组成的望远镜系统投射至样品平面，在样品表面形成衍射受限

的聚焦光斑。通过共振振镜与线性振镜的协同扫描，聚焦光斑依次覆盖二维视场，从而完成样品的逐点扫描成像。样品返回的散射光/荧光信号由同一物镜收集，并由反射镜 RL 反射后沿照明光路反向传播，经二向色镜 DM1 分离后进入共聚焦探测通道。返回的信号光经筒镜 TL3 耦合至多模光纤，光纤端面同时作为共聚焦针孔，用于抑制焦平面外的离焦信号，随后由 APD 完成光子计数探测。此外，通过将反射镜 RL 切换为二向色镜 DM2，可将光信号通过筒镜 TL2 成像至 sCMOS 相机，实现可用于样品快速定位的宽场成像。

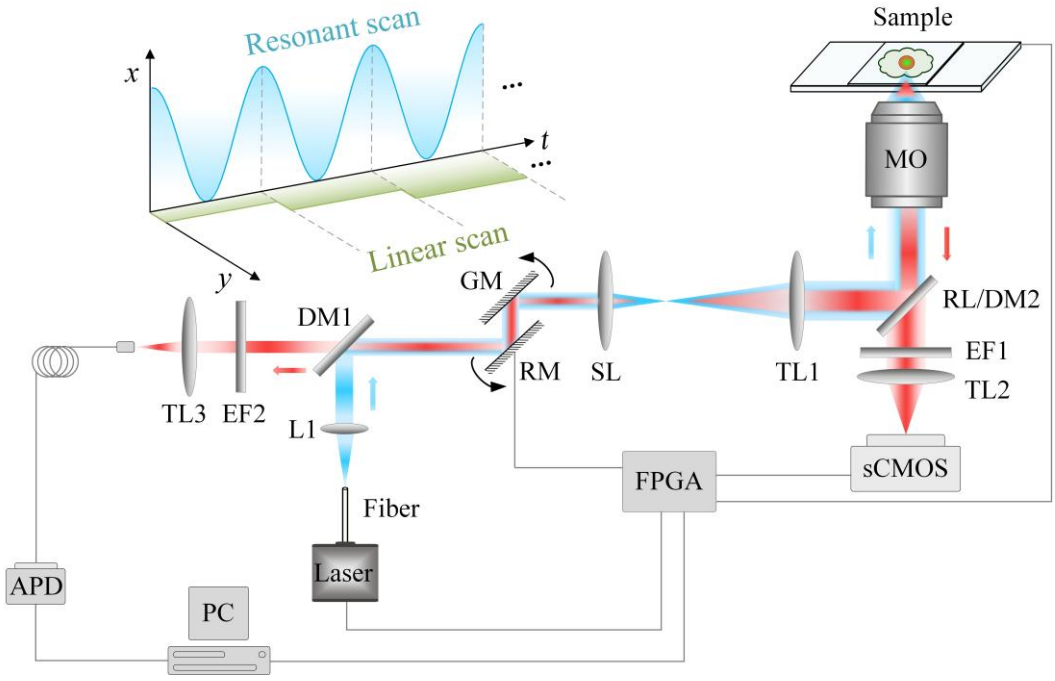


图 1 RS-LCM 成像光路图。Laser，激光器；Fiber，光纤；L1，准直透镜；DM1、DM2，二向色镜；RM，共振振镜；GM，线性振镜；SL，扫描透镜；TL1—TL3，筒镜；RL，反射镜；MO，显微物镜；EF1 和 EF2，滤光片；APD，雪崩光电二极管；sCMOS，科研级半导体相机；FPGA，现场可编程门阵列；PC，计算机。

Fig. 1. Optical layout of RS-LCM system. Laser, laser source; Fiber, optical fiber; L1, collimating lens; DM1 and DM2, dichroic mirrors; RM, resonant mirror; GM, galvanometric mirror; SL, scan lens; TL1–TL3, tube lenses; RL, reflecting mirror; MO, microscope objective; EF1 and EF2, optical filters; APD, avalanche photodiode; sCMOS, scientific complementary metal-oxide-semiconductor

camera; FPGA, field-programmable gate array; PC, personal computer.

RS-LCM 成像中光斑扫描和光子探测均由 FPGA 控制/采集板卡来完成。如图 2 所示，计算机通过编程控制 FPGA 产生光路中仪器所需的控制信号，实现对激光器的光强调制、RM 和 GM 的扫描控制以及 APD 单光子计数采集控制。实验开始后，首先启动共振振镜并使其进入稳定谐振状态，共振振镜的扫描周期为 83.33 μs (对应 12 kHz)。在一个共振周期中，焦点在 x 方向上完成一次往返扫描运动，其位置与时间的对应关系为：$x = F(t)$，这里的 $F(\cdot)$表示共振扫描中焦点位置与时间的非线性关系。共振振镜在每一次扫描的起始点位置都会产生一个严格同步的 TTL 信号作为控制系统的外触发信号，FPGA 以该信号作为该扫描周期的时间基准，并

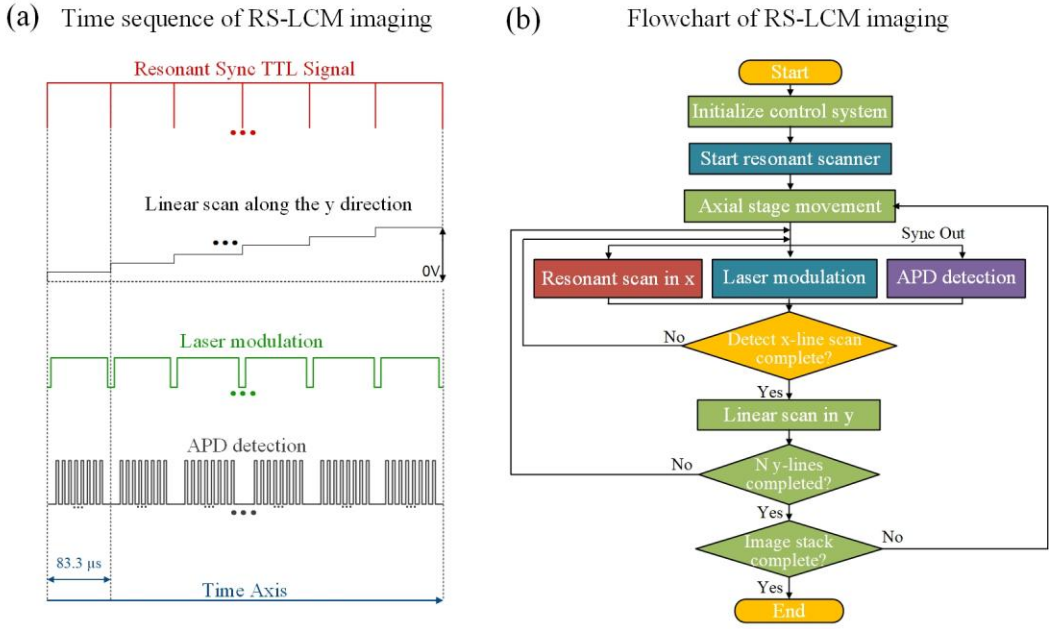


图 2 RS-LCM 成像中硬件协同工作时序图。(a) 单帧信号时序图；(b) 控制流程图

Fig. 2. Hardware synchronization and control during RS-LCM imaging. (a) Timing diagram for single-frame acquisition; (b) control flowchart.

据此确定有效采集窗口。在线扫描的有效时间内，控制激光器保持开启，同时按照设定的等时间间隔触发 APD 进行光子计数采样。为提高单条扫描线的光子统计量和图像信噪比，同一 y 位置可进行多次重复扫描，并对相同空间位置处的光子计数进行累积。完成当前行的采集后，

FPGA 控制激光器与 APD 保持关闭，并输出阶梯模拟电压驱动线性振镜 GM 移动至下一 y 位置，待振镜稳定后重新开启下一行的激光照明和 APD 采样过程。通过重复上述流程，可依次获得不同 y 位置处的扫描信号，直至完成整帧图像的实时采集。

2.2 共振扫描下图像恢复方法

共振振镜工作于机械谐振状态，其扫描角度随时间呈周期性非线性变化。$x = F(t)$的表达式可显性近似表示为：

$$x = A\cos(2\pi ft) \tag{1}$$

式中，A 为样品平面内的扫描幅度，f 为共振振镜扫描频率，t 为扫描时间。由式(1)可知，共振振镜在扫描中心附近运动速度较快，在扫描两端运动速度较慢。因此，当 APD 按照等时间间隔进行光子计数采样时，采样点在空间上呈非均匀分布，如图 3(a)所示。若直接按照等时间采样顺序排列光子计数，则会形成图 3(b)所示的两端拉伸、中心压缩的几何畸变。

以单个扫描半周期的起始时刻为 t=0，APD 相邻两次采样的时间间隔为 Δt，半周期内共获得 M 个采样点，则第 k 个采样点对应的采样时刻为

$$t_k = k\Delta t, \qquad k = 0,1,\ldots,M-1 \tag{2}$$

相应的光子计数记为 $I(t_k)$。

FPGA依据共振振镜转向同步信号区分一个共振周期内的去程和回程有效采集区间，并将去程和回程的光子计数分别写入16位BRAM行缓存。实际运行时，共振振镜同步信号与有效扫描位置之间存在相位偏差，需要对原始采样序号进行修正。去程采样序号k上叠加补偿相位 k_F，回程则采用 $M-1-(k+k_R)$，使两方向数据具有一致的空间方向。

修正后的采样时刻为 $\tilde{t}_k = (k+k_F)\Delta t$ 和 $\tilde{t}_k = [M-1(k+k_F)]\Delta t$，分别带入式(1)，可得到去程和回程中每个采样点对应的实际空间位置

$$x_k = A\cos(2\pi f\tilde{t}_k) \tag{3}$$

如图 3(c)所示，原始采样位置 x_k 在空间上是非均匀分布。为获得等空间间隔图像，首先在有效扫描范围等分分为 N 个像素点 $x_j, j=1,2,\ldots,N$ 。对于任一目标像素 x_j 的光强分布均可以由其相邻两个采样位置 x_{k_j} 和 x_{k_j+1} 的光强线性插值来获得：

$$I_{\text{corr}}(x_j)=(1-\alpha_j)I(t_{k_j})+\alpha_j I(t_{k_j+1}) \tag{4}$$

α_j 插值权重为:

$$\alpha_j=\frac{x_j-x_{k_j}}{x_{k_j+1}-x_{k_j}}, 0\le\alpha_j\le 1 \tag{5}$$

由此，可将等时间采样得到的强度分布映射等空间间隔像素网格，从而校正共振扫描引起的几何畸变，得到图 3(d)所示的校正图像。

不同于以往的非线性扫描校正算法(由计算机来完成)，本文将坐标映射、光子计数累加及插值重采样直接部署于 FPGA 采集链路中。如图 3(e)所示，根据上位机设置的有效扫描范围、APD 采样间隔和相位补偿参数，FPGA 将 $\tilde{t}_k$ 和 x_k 的映射关系物化为 Q11.8 格式查找表,避免每次的余弦计算。此外，逐像素处理过程中，尺度变换、相位补偿、边界判断、回程镜像、索引读取及插值系数生成均由独立硬件逻辑并行完成。在 FPGA 的 100 MHz 工作时钟下，核心映射位置可在一个时钟周期（10 ns）内完成，随后直接驱动 BRAM 读取相邻两原始光子计数，并通过定点线性插值完成等空间重采样。与三次 Hermite 插值相比，线性插值能够在不牺牲校正精度的情况下，节省一个时钟周期的时间并节省 FPGA 板内硬件资源。

以上过程中，FPGA 板内重构从数据回传与计算处理两方面提升效率。首先，PC 端需回传大量原始光子计数数据，而 FPGA 在板内完成光子数累加、非线性校正与图像重构，仅回传最终图像，显著减少数据量并缩短回传时间。其次，相较于 PC 端依靠 CPU 依次遍历原始数据的离线重建方式，FPGA 采用大规模流水并行结构，将光子计数、行缓存、非线性校正与光子数分配嵌入采集流程，使前序行处理与后续采集同步进行。实验测得，对于一帧 1024×1024 图像，采集结束至校正完成仅耗时约 0.47 ms，较缓存原始数据后再进行 PC 端离线重建的采

集后处理方式用时（54 ms）缩短两个数量。

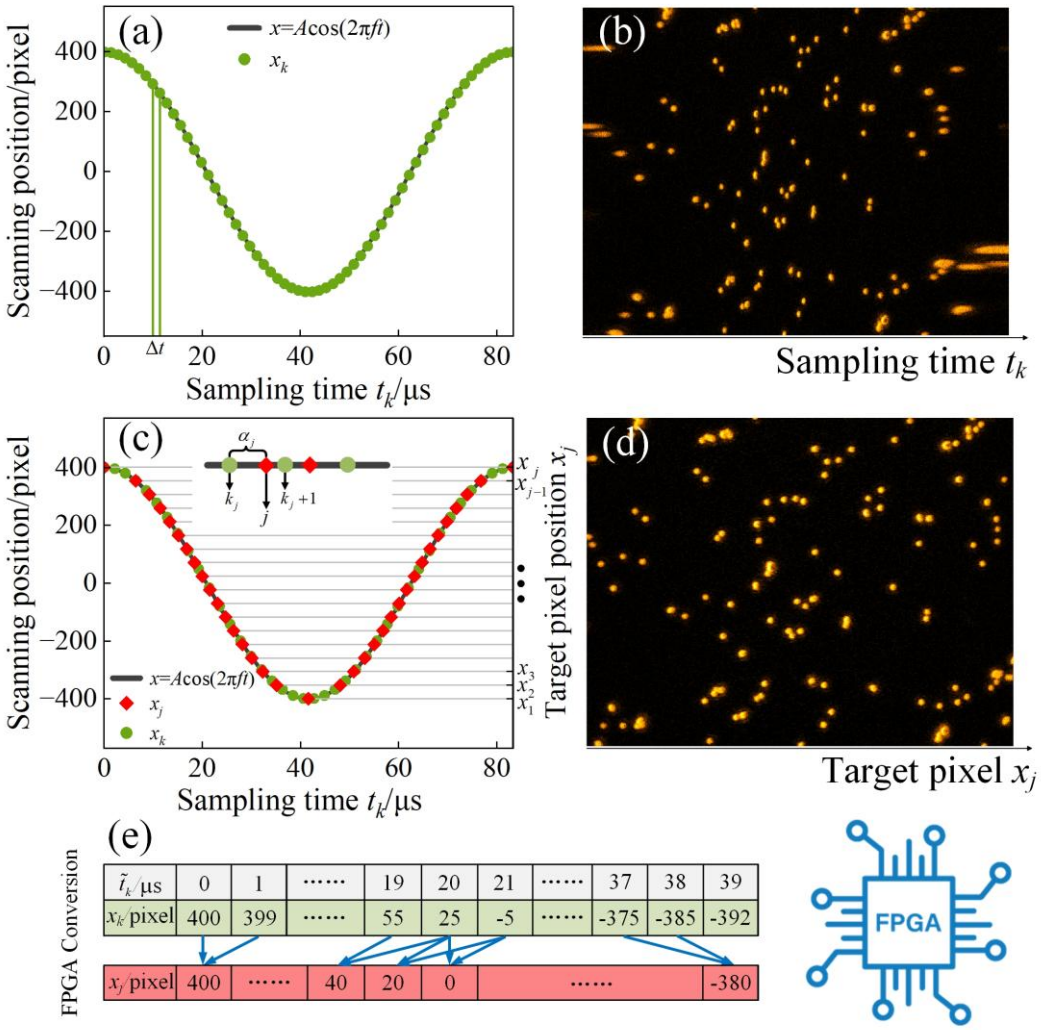


图 3 RS-LCM 中共振扫描的非线性校正 (a) 共振扫描中空间 x_k 和时间 t_k 的对应关系；(b) 非线性校正前的原始畸变图像；(c) 等时间间隔采样点 x_k (绿色圆点)与等空间间隔目标像素位置 x_j（红色方框）的映射关系；(d) 非线性校正（时间—空间坐标映射及插值重采样）后得到的图像；(e) 基于 FPGA 的非线性扫描校正示意图（$\tilde{t}_k$ 与 x_k 映射，以及 x_k 与 x_j 的插值）。

Fig. 3. Correction of nonlinear resonant scanning in RS-LCM. (a) Correspondence between the spatial position x_k and sampling time t_k during resonant scanning; (b) raw distorted image before nonlinear correction; (c) Mapping relationship between the spatial positions x_k of uniformly timed sampling points (green circles) and the uniformly spaced target pixel positions x_j (red squares); (d)

Reconstructed image after correction of nonlinear resonant scanning; (e) Schematics of the FPGA-based nonlinear scanning correction process, including the mapping from $\tilde{t}_k$ to x_k and the interpolation from x_k to x_j.

2.3 基于RS-LCM的运动粒子动力学过程分析

将 RS-LCM 与单粒子追踪(SPT)结合，实现对快速运动微粒的动力学过程研究。SPT 通过连续图像中的颗粒定位与跨帧关联获得单颗粒运动轨迹[25], 已被广泛用于表征细胞质黏度[26]，追踪细胞内溶酶体[27]和纳米颗粒[14]的动态过程。

在 SPT 分析中，首先对连续帧图像进行颗粒识别和质心定位，第 n 帧中颗粒的二维位置表示为 $\boldsymbol{r}_n = (x_n, y_n)$。随后，将不同帧中的同一颗粒进行关联，获得连续运动轨迹。设图像帧间隔为 Δt_{f}，延迟时间为 $\tau_m = m\Delta t_{\mathrm{f}}$，其中 m 为正整数，对于包含 N_q 个位置点的第 q 条轨迹，其均方位移为

$$MSD_q(\tau_m) = \frac{1}{N_q - m} \sum_{n=1}^{N_q - m} \left[(x_{n+m} - x_n)^2 + (y_{n+m} - y_n)^2 \right] \tag{6}$$

由于延迟时间增大时可用于统计的位移对数减少，本文选取MSD曲线前若干个短延迟时间点进行线性拟合。对于二维自由扩散过程[28, 29]

$$MSD(\tau) = 4D\tau + C \tag{7}$$

其中，D 为扩散系数，C 为定位误差、背景噪声等因素引入的常数项。若拟合直线的斜率为 k_{MSD}，则 $D = \frac{k_{\mathrm{MSD}}}{4}$。与基于传统共聚焦显微镜的 SPT 分析相比，基于 RS-LCM 的 SPT 分析技术具有更快的时间分辨率，将单分子动态扩散稀疏由~0.1 $\mu m^2 s^{-1}$ 提升至~1 $\mu m^2 s^{-1}$（图 6 和图 7）。此外，相较于传统荧光相关光谱（Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS）技术，本方法对组分或结构非均匀样品（如含多尺度微粒的异质体系）具有更强的适用性，可有效解析其中共存的多重扩散动力学过程。

3 实验结果与讨论

3.1 系统快速成像性能验证

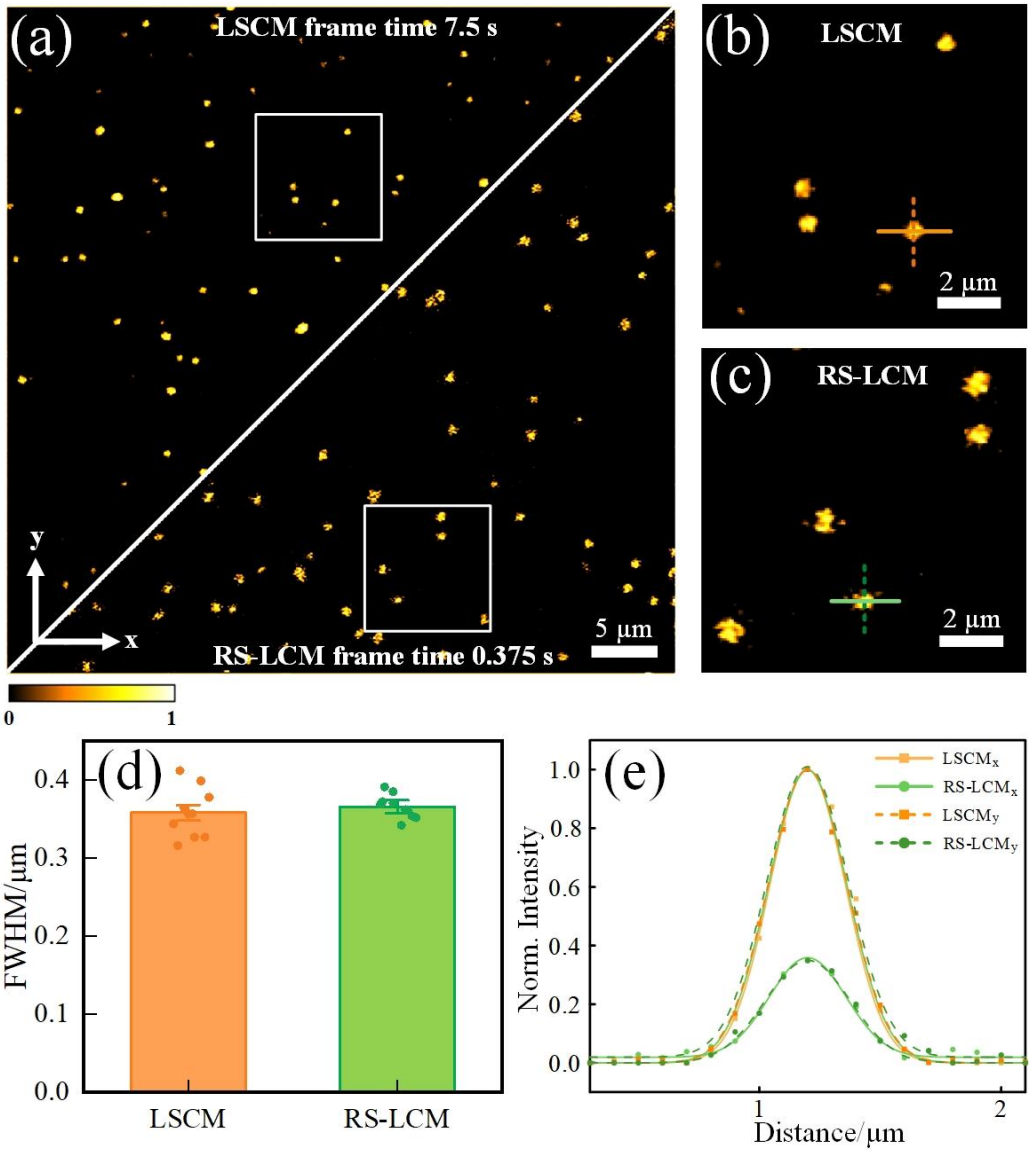


图 4 传统 LSCM 和 RS-LCM 对单层银纳米颗粒（直径 120 nm）样品的成像结果。(a) 银纳米颗粒传统 LSCM、RS-LCM 图像的对比；(b)和(c) 对应(a)中上下两个矩形标记区域的放大图；(d) 对传统 LSCM（橙色）和 RS-LCM（绿色）中的 10 个银纳米颗粒 FWHM 的统计结果。(e) (b)和(c)中橙色和绿色实线/虚线对应 LSCM 和 RS-LCM 图像中沿相应线段强度分布的高斯拟合曲线。LSCM 在 *x* 和 *y* 方向的高斯拟合的 FWHM 分别为：352 nm 和 361 nm；RS-LCM 在 *x* 和 *y* 方向的高斯拟合的 FWHM 分别为：360 nm 和 372 nm。比例尺：(a)中为 5 μm，(b)和(c)

中为 2 μm。

Fig. 4. Imaging results of a monolayer sample of silver nanoparticles with a diameter of 120 nm by LSCM and RS-LCM. (a) Comparison of the silver nanoparticle images acquired by conventional LSCM and RS-LCM; (b) and (c) enlarged views of the upper and lower rectangular regions marked in (a), respectively; (d) statistical results of the full widths at half maximum (FWHM) of 10 silver nanoparticles in conventional LSCM (orange) and RS-LCM (green) images; (e) the intensity distributions (symbols) along the lines in (b) and (c), together with the corresponding Gaussian fitting curves (curves). The FWHMs of the Gaussian fits (along the *x* and *y* directions) in LSCM are 352 nm and 361 nm; The counterparts in RS-LCM are 360 nm and 372 nm, respectively. Scale bars: 5 μm in (a), and 2 μm in (b) and (c).

实验以 120 nm 的银纳米颗粒为样品，对比了 RS-LCM 和传统 LSCM 的成像性能。传统 LSCM 模式下，曝光时间设为 30 μs/像素，50 μm × 50 μm 图像对应的单帧采集时间约为 7.5 s；RS-LCM 成像模式下，每一行重复 9 次共振扫描（周期为 83.33 μs），相同图像尺寸下的单帧采集时间约为 0.375 s，成像速度提高约 20 倍。图 4(a)给出了两种扫描模式下的银纳米颗粒成像结果，图 4(b)和图 4(c)分别为对应区域的局部放大结果。为定量评价两种模式的横向成像性能，对多个单颗粒横向强度分布进行高斯拟合并对其半高全宽（FWHM）进行了统计。图 4(d)表明：RS-LCM 的 FWHM (365±7 nm)略大于出传统 LSCM 的 FWHM (358±10 nm)。图 4(e)中对单个小球 FWHM 的拟合得出类似结果。此外，由于高速共振扫描显著缩短了单个空间位置的有效光子积累时间，RS-LCM 图像中颗粒峰值光子计数低于传统 LSCM。需要说明的是：该差别可通过在 RS-LCM 中采用较大激发光强来弥补。

进一步对比了传统 LSCM 和 RS-LCM 对水中自由扩散的直径为 120 nm 银纳米颗粒的动态成像能力。在 100 μm × 10 μm 的相同图像尺寸下，传统 LSCM 的单帧采集时间约为 3 s，而

RS-LCM 模式约为 0.15 s。为清晰展示动态颗粒形态，图 5(a)与图 5(b)分别从两种模式的完整视场截取 10 μm × 10 μm 的局部区域进行连续帧展示，可见，LSCM 因扫描速度受限（3 s/帧），导致运动颗粒呈现显著的拉伸形变与条纹状运动拖尾；而 RS-LCM 将单帧扫描时间压缩至 0.15 s，有效冻结快速运动过程，实现亚秒级动态事件的清晰分辨。上述结果表明，RS-LCM 在保持与传统 LSCM 相当的横向分辨率的前提下，成像速度提升约 20 倍，为后续单颗粒轨迹追踪及扩散系数等动力学参数的定量分析提供了高质量、高时效性的图像支撑。

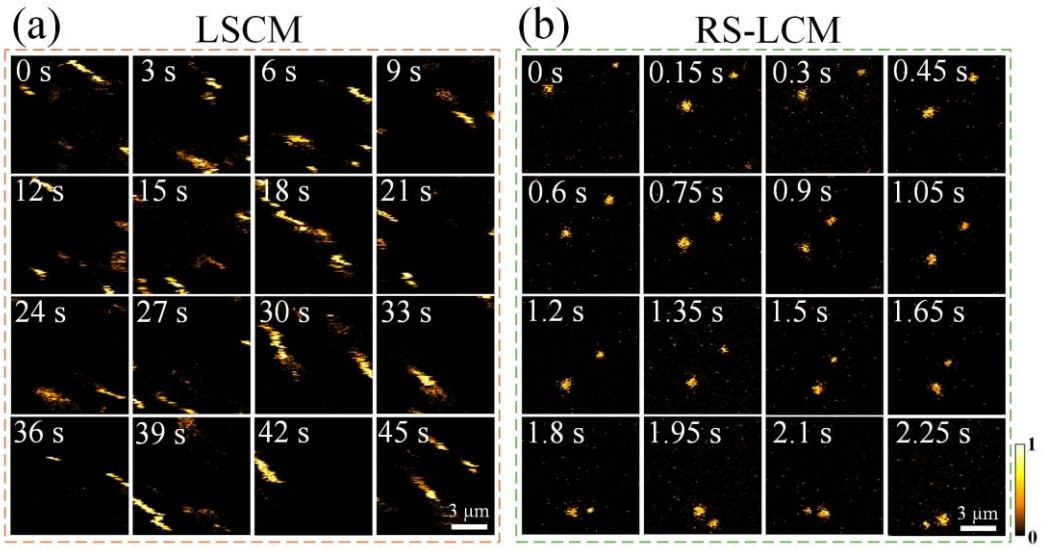


图 5 传统 LSCM 和 RS-LCM 对动态银纳米颗粒（直径 120 nm）的成像结果。(a) 传统 LSCM 对动态银纳米颗粒连续成像结果（时间分辨率：3 s）；(b) RS-LCM 对动态银纳米颗粒成像结果（时间分辨率：0.15 s）。比例尺：(a)和(b)都为 3 μm。

Fig. 5. Imaging of diffusing silver nanoparticles (120 nm diameter) by conventional LSCM and RS-LCM. (a) Image series of dynamic silver nanoparticles acquired by conventional LSCM with an interval of 3 s; (b) corresponding images acquired by RS-LCM with an interval of 0.15 s. Scale bars: both 3 μm in (a) and (b).

3.2 基于 SPT 和 FCS 的动态扩散特性定量分析

利用基于传统 LSCM 与 RS-LCM 的 SPT 方法对不同质量分数的甘油水溶液调节 120 nm

银纳米颗粒的布朗运动进行测量，为评价传统 LSCM 与 RS-LCM 对不同运动速度微纳颗粒的定量观测能力，采用不同质量分数的甘油水溶液调节 120 nm 银纳米颗粒的扩散速度，并与并分别利用 SPT 和荧光相关光谱(FCS)技术计算颗粒扩散系数测得的扩散系数进行对比。FCS 则通过分析焦点区域内光子计数的时间涨落获得颗粒的平均扩散特性[30]。后者具有时间分辨率高、测量精度高的优势，但仅适用于均匀粒径的微粒样品；SPT 分别通过对每条有效轨迹进行 MSD 拟合得到单颗粒扩散系数，适用于不同粒径分布样品中微粒扩散系数表征。需要说明的是，实验中我们采集微粒的背向散射信号（代替传统 FCS 中的荧光信号）进行自相关分析，以获得颗粒的平均扩散系数。

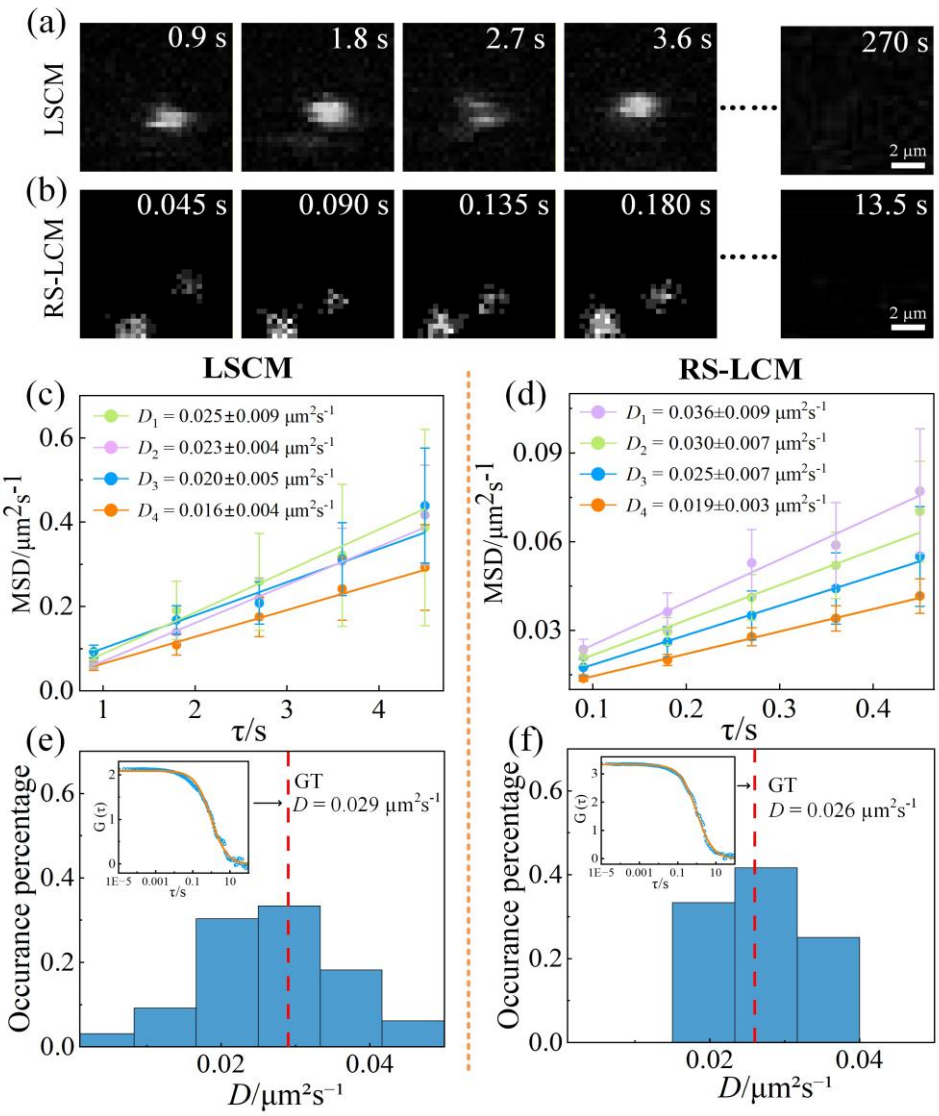


图 6 传统 LSCM 和 RS-LCM 对甘油水溶液（86 wt%）中 120 nm 纳米颗粒的扩散系数测量。(a)、(b) 分别为传统 LSCM 和 RS-LCM 模式下对动态银纳米颗粒的连续帧成像结果；(c)、(d) 分别为传统 LSCM 和 RS-LCM 模式下对 4 个单颗粒的 MSD 曲线及线性拟合结果；(e)、(f) 分别为传统 LSCM 和 RS-LCM 模式下对 30 个微粒 MSD 分析获得的扩散系数 *D* 的统计分布。插图为相应的自相关函数（ACF）及 FCS 模型拟合结果。竖直虚线表示 FCS 测得的扩散系数参考值（作为真值）。

Fig. 6. Diffusion coefficient measurement of 120 nm diameter nanoparticles in a glycerol–water solution (86 wt%) using conventional LSCM and RS-LCM. (a), (b) Image series of dynamic silver nanoparticles acquired by conventional LSCM and RS-LCM, respectively; (c), (d) MSD curves and corresponding linear fits for four representative single-particle trajectories obtained by conventional LSCM and RS-LCM, respectively; (e), (f) statistical distributions of the diffusion coefficient *D* obtained from MSD analysis of 30 particles under conventional LSCM and RS-LCM, respectively. The insets show the corresponding autocorrelation functions (ACFs) and FCS model fitting results. The vertical dashed lines indicate the diffusion coefficients measured by FCS as reference values (treated as the ground truth).

首先，在 86 wt%甘油水溶液（一种典型慢扩散介质）中，对比评估了传统 LSCM 与 RS-LCM 成像模式下单颗粒追踪（SPT）对慢速扩散颗粒的表征性能。如图 6 所示，在低速热运动（典型布朗扩散）条件下，两种扫描模式均能完整解析微粒的形貌特征并重建连续、无伪影的运动轨迹。传统 LSCM 模式下，30 个微粒的单轨迹统计平均值为 $D = 0.026 \pm 0.001$ $\mu m^2 s^{-1}$；RS-LCM 模式下，单轨迹统计平均值为 $D = 0.027 \pm 0.001$ $\mu m^2 s^{-1}$；两者都与 FCS 获得的结果（$D = 0.026$ $\mu m^2 s^{-1}$ 和 $D = 0.029$ $\mu m^2 s^{-1}$）相接近。两种成像模式下 SPT 所得扩散系数基本一致，并与 FCS 结果相符，说明在慢速扩散下，两种系统均能够实现可靠的颗粒追踪及扩散参数测量。

其次，比较了传统 LSCM 与 RS-LCM 成像模式下单颗粒追踪（SPT）对快速扩散颗粒的表征性能。为此，降低甘油质量分数至 39 wt%，以提高颗粒扩散速度，结果如图 7 所示。传统 LSCM 图像中出现明显的颗粒拉伸和运动拖尾，轨迹定位及跨帧关联可靠性显著下降。单轨迹统计平均值为 $D = 0.014 \pm 0.001$ μm^{2}s^{-1}，且如图 7(c)所示部分单轨迹 MSD 曲线出现明显波动甚至负斜率。相比之下，FCS 得到 $D = 0.81$ μm^{2}s^{-1}，与 SPT 结果相差近两个数量级，表明传统 LSCM 在该扩散速度下已难以实现可靠的单颗粒追踪。

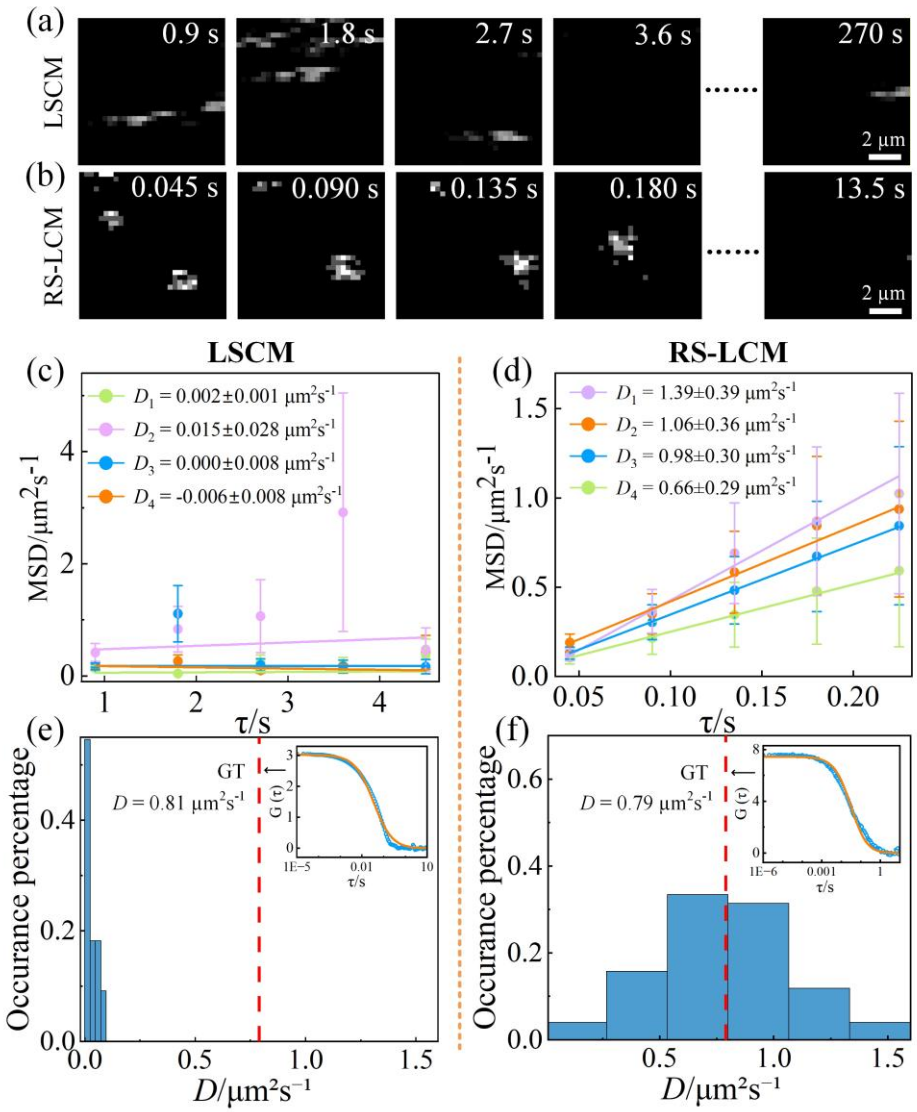


图 7 传统 LSCM 和 RS-LCM 对甘油水溶液（39 wt%）中 120 nm 纳米颗粒的扩散系数测量。(a)、(b) 分别为传统 LSCM 和 RS-LCM 模式下对动态银纳米颗粒的连续帧成像结果；(c)、(d) 分

别为传统 LSCM 和 RS-LCM 模式下对 4 个单颗粒的 MSD 曲线及线性拟合结果；(e)、(f) 分别为传统 LSCM 和 RS-LCM 模式下对 50 个微粒 MSD 分析获得的扩散系数 *D* 的统计分布。插图为相应的自相关函数（ACF）及 FCS 模型拟合结果。竖直虚线表示 FCS 测得的扩散系数参考值（作为真值）。

Fig. 7. Diffusion coefficient measurement of 120 nm diameter nanoparticles in glycerol–water solution (39 wt%) using conventional LSCM and RS-LCM. (a), (b) Image series of dynamic silver nanoparticles acquired by conventional LSCM and RS-LCM, respectively; (c), (d) MSD curves and corresponding linear fits for four representative single-particle trajectories obtained by conventional LSCM and RS-LCM, respectively; (e), (f) statistical distributions of the diffusion coefficient *D* obtained from MSD analysis of 50 particles under conventional LSCM and RS-LCM, respectively. The insets show the corresponding autocorrelation functions (ACFs) and FCS model fitting results. The vertical dashed lines indicate the diffusion coefficients measured by FCS as reference values (treated as the ground truth).

RS-LCM 在相同样品条件下仍能保持较清晰的颗粒形态和连续运动轨迹。50 个微粒的单轨迹统计平均值为 $D = 0.77\pm0.09\ \mu m^2 s^{-1}$，FCS 得到 $D = 0.79\ \mu m^2 s^{-1}$，两者具有较好一致性。

综合图 6 和图 7 可知，在慢速扩散条件下，两种扫描模式均可实现可靠定量；随着颗粒扩散速度提高，传统 LSCM 因帧内运动模糊导致 SPT 结果失真，而共振扫描通过缩短单次扫描时间仍可获得连续运动轨迹及与 FCS 一致的扩散系数，表明其具有更大的快速动态颗粒定量测量范围。

4 结　论

本文提出了一种基于 FPGA 实时非线性校正的共振扫描的激光共聚焦显微成像方法

(RS-LCM)。围绕传统 LSCM 中线性扫描速度慢的问题，构建了基于 12 kHz 共振振镜的高速共聚焦显微成像系统；通过时间—空间坐标映射及插值实现了共振非线性扫描下图像的实时校正与重构。实验结果表明，在保持与传统 LSCM 相同横向分辨能力的同时，RS-LCM 可将成像速度提高约 20 倍。将 RS-LCM 与单粒子追踪(SPT)结合，实现对快速运动微粒的动力学过程研究。SPT 通过对每条有效轨迹进行 MSD 拟合得到单颗粒扩散系数，适用于不同粒径分布样品中微粒扩散系数的表征。基于 RS-LCM 具有高成像速度，可以克服快速热运动中粒子的运动模糊，最终获得其动力学特性。实验室实现了对 39 wt%甘油-水溶液中微粒扩散系数的扩散系数测定，获得的结果（0.77 $\mu m^2 \cdot s^{-1}$）与 FCS 测得的 0.79 $\mu m^2 \cdot s^{-1}$相近。结果表明，共振扫描不仅提高了共聚焦成像速度，也拓展了其对快速扩散微纳颗粒进行可靠追踪和定量测量的适用范围。未来，将进一步提高共振扫描条件下的光子采集效率以提高 RS-LCM 的成像信噪比，并将 RS-LCM 用于复杂动态生物样品的研究。

参考文献

[1] Minsky M 1988 *Scanning* **10** 128

[2] White J G, Amos W B, Fordham M 1987 *J. Cell Biol.* **105** 41

[3] Zhang Y, Zhang Z H, Wang Y J, Xue X L, Chen L X, Shi L W 2024 *Acta Phys. Sin.* **73** 157801 (in Chinese) [张洋, 张志豪, 王宇剑, 薛晓兰, 陈令修, 石礼伟 2024 *物理学报* **73** 157801]

[4] Ren W, Guan M L, Liang Q X, Li M Q, Jin B Y, Duan G X, Zhang L Y, Ge X C, Xu H, Hou Y W, Gao B X, Sodmergen, Xi P 2024 *Natl. Sci. Rev.* **11** nwae303

[5] Hunter J J, Cookson C J, Kisilak M L, Bueno J M, Campbell M C W 2007 *J. Opt. Soc. Am. A* **24** 1284

[6] Elliott A D 2020 *Curr. Protoc. Cytom.* **92** e68

[7] Chen J H, Jiang H M, Lu Y, Wen K, An S, Gao P, Wang X F, Li T P, Zheng J J, Suo H F, Liu L X,

Zuo P 2025 *Laser Optoelectron. Prog*. **62** 1817023

[8] Gao Z L, Liu R H, Wen K, Ma Y, Li J L, Gao P 2022 *Acta Phys. Sin.* **71** 244203 (in Chinese) [高兆琳, 刘瑞桦, 温凯, 马英, 李建郎, 郜鹏 2022 *物理学报* **71** 244203]

[9] Pawley J B (ed.) 2006 *Handbook of Biological Confocal Microscopy* 3rd ed. (New York: Springer) pp1—42

[10] Straub B B, Lah D C, Schmidt H, Roth M, Gilson L, Butt H J, Auernhammer G K 2020 *Rev. Sci. Instrum.* **91** 033706

[11] Tanaami T, Otsuki S, Tomosada N, Kosugi Y, Shimizu M, Ishida H 2002 *Appl. Opt.* **41** 4704

[12] Rutkauskas D, Auksorius E 2024 *Opt. Lett.* **49** 686

[13] Göttfert F, Pleiner T, Heine J, Westphal V, Görlich D, Sahl S J, Hell S W 2017 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114** 2125

[14] Ta D M, Aguilar A, Bon P 2023 *Opt. Express* **31** 36420

[15] Wang F Y, Yuan Y H, Sun Q, Dai M, Ai L, Lu F 2020 *Chin. Opt. Lett.* **18** 121703

[16] ZEISS 2021 LSM 980 with Airyscan 2 System Manual: High-Speed Confocal Imaging (Oberkochen: ZEISS)

[17] Ahrens M B, Orger M B, Robson D N, Li J M, Keller P J 2013 *Nat. Methods* **10** 413

[18] An S, Guo X H, Cai Z X, Lei Y Z, Wen K, Suo H F, Kong X Y, Nienhaus G U, Gao P 2026 *Adv. Sci.* **13** e74516

[19] Carriles R, Schafer D N, Sheetz K E, Field J J, Cisek R, Barzda V, Sylvester A W, Squier J A 2009 *Rev. Sci. Instrum*. **80** 081101

[20] Tsien R Y, Bacskai B J 1995 Video-rate confocal microscopy, in Handbook of Biological Confocal Microscopy, Pawley J B (ed.) (New York: Plenum Press) pp459–478

[21] Leybaert L, de Meyer A, Mabilde C, Sanderson M J 2005 *J. Microsc*. **219** 133

[22] Haji-Saeed B, Khoury J, Woods C L, Pyburn D, Sengupta S K, Kierstead J 2007 *Opt. Eng*. **46** 027007

[23] Giacomelli M G 2023 *Biomed. Opt. Express* **14** 5861

[24] Dong Y, Bai Y, Zhang Q, Luan H, Gu M 2025 *eLight* **5** 29

[25] Bucci A, Tortarolo G, Held M O, Bega L, Perego E, Castagnetti F, Bozzoni I, Slenders E, Vicidomini G 2024 *Nat. Commun.* **15** 6188

[26] Ye Y, Homer H A 2022 *EMBO Rep.* **23** e55251

[27] Polev K, Kolygina D V, Kandere-Grzybowska K, Grzybowski B A 2022 *Cells* **11** 270

[28] Qian H, Sheetz M P, Elson E L 1991 *Biophys. J.* **60** 910

[29] Saxton M J, Jacobson K 1997 *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26** 373

[30] Yu L, Lei Y, Ma Y, Liu M, Zheng J, Dan D, Gao P 2021 *Front. Phys*. **9** 644450

Resonant-Scanning Laser Confocal Microscopy (RS-LCM) with FPGA-Based Real-Time Nonlinear Correction *

KONG Xiao-Yu[1) 3) 4)#] WEN Kai[1) 3) 4)#] GUO Xu-Hong[2) 3) 4)] CAI Zhong-Xia[1) 3) 4)] AN Sha [1) 3) 4)] ZHENG Juan-juan[1) 3) 4)] GAO Peng[1) 3) 4)] GAO Peng[1) 3) 4)†]

1) (School of Physics, Xidian University, Xi'an 710071, China)

2) (School of Optoelectronic Engineering, Xidian University, Xi'an 710071, China)

3) (Key Laboratory of Optoelectronic Perception of Complex Environment, Ministry of Education, Xi'an 710071, China)

4) (Xi'an Engineering Research Center of Super-resolution Optical Microscopy, Xi'an 710071, China)

Abstract

Laser scanning confocal microscopy (LSCM) provides effective suppression of out-of-focus background and high-contrast optical sectioning, but its imaging speed is limited by point-by-point scanning with conventional galvanometric mirrors. To improve the imaging speed of confocal microscopy, and address the nonlinear distortion inherent in resonant scanning, we developed a resonant-scanning laser confocal microscopy (RS-LCM) system with FPGA-based real-time nonlinear correction. In RS-LCM, a 12 kHz/line resonant scanner was employed for high-speed scanning along the x-direction, while a linear galvanometric mirror performed line-by-line scanning along the y-direction. FPGA was used to synchronously control laser modulation, scanner motion, and single-photon detection. To compensate for the intrinsic nonlinear spatiotemporal distortion of resonant scanning, dedicated FPGA hardware logic was developed to establish an accurate spatiotemporal mapping relationship through parallel real-time computation, and interpolation-based resampling was employed to achieve millisecond-level online nonlinear correction. Experimental results show that RS-LCM

increases the imaging speed by approximately 20-fold compared with conventional point-scanning LSCM while maintaining comparable lateral resolution. RS-LCM was further combined with single-particle tracking (SPT) to investigate the dynamics of rapidly moving particles. In SPT analysis, the diffusion coefficient of each particle was obtained by fitting the mean-square displacement (MSD) of each valid trajectory, enabling characterization of particle diffusion in samples with heterogeneous particle-size distributions. Owing to its high imaging speed, RS-LCM effectively reduces motion blur caused by rapid Brownian motion and enables reliable extraction of particle trajectories and dynamic parameters. For particles dispersed in a 39 wt% glycerol–water solution, the diffusion coefficient measured by SPT was 0.77 $\mu m^2 \cdot s^{-1}$, which agrees well with the value of 0.79 $\mu m^2 \cdot s^{-1}$ obtained by fluorescence correlation spectroscopy (FCS). These results demonstrate that resonant scanning not only improves the imaging speed of confocal microscopy, but also extends its capability for reliable tracking and quantitative measurement of rapidly diffusing micro- and nanoparticles. Future work will focus on further improving photon-collection efficiency under high-speed scanning conditions and extending the technique to more complex dynamic biological samples.

Keywords: resonant scanning; laser confocal microscopy; nonlinear image reconstruction; single-particle tracking

†

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 62335018, 62575230, 62505242), the Scientific Research Innovation Capability Support Project for Young Faculty (Grant No. ZYGXQNJSKYCXNLZCXM-123), the Key Research and Development Program of Shaanxi (Program No. 2024GH-ZDXM-05), the Natural Science Foundation of Shaanxi Province (Grant No. 2025JC-YBQN-819), and the China Postdoctoral Science Foundation (Grant No. 2024M762528).

† Corresponding Author. E-mails：peng.gao@xidian.edu.cn

The first author.E-mail:2096307328@qq.com
# These authors contributed equally to this paper