



超分辨光学显微成像中的分辨率检测： 适配方法与前沿进展*

方三华** 陈静瑶 杨丹 刘丽

(浙江大学医学院公共技术平台, 杭州 310058)

摘要 光学显微镜作为探索微观世界的核心工具, 其分辨率直接决定了解析生物及材料精细结构的能力。随着超分辨荧光显微技术的突破性发展, 传统基于衍射极限的经验判据(如瑞利准则)和点扩散函数宽度法等分辨率检测手段已无法满足对纳米尺度成像质量的客观量化需求。本文系统梳理了光学显微成像分辨率检测方法从传统经验判据到超分辨技术适配方案的完整演进脉络。首先, 回顾了基于傅里叶变换的定量方法, 包括傅里叶环相关及其三维扩展形式傅里叶壳层相关, 它们通过分析独立图像在频域的相关性, 为电子显微镜和超分辨成像提供了客观、抗噪的全局分辨率标准。进而, 重点阐述了针对不同超分辨成像机理的专属优化策略: 面向单分子定位显微镜的傅里叶图像分辨率(FIRE)方法, 综合了定位精度与标记密度对最终图像分辨率的共同制约; 针对受激发射损耗(STED)等非线性调制显微镜, 则发展了基于点扩散函数(PSF)压缩测量及生物样本线宽分析的有效分辨率评估手段。特别值得关注的是, 近年来兴起的基于去相关分析的无参数方法, 通过解析单幅图像的频谱自相关衰减, 实现了无需人工设定阈值、无需成对图像的客观分辨率评估, 在多模态超分辨成像中展现出卓越的普适性与效率。此外, 本文还探讨了基于已知纳米结构(如DNA折纸术)的直接验证“金标准”, 以及深度学习在图像重建质量评估与伪影识别中的新挑战与应用潜力。最后, 文章展望了未来分辨率检测技术向跨模态统一标准、实时动态监测、局部分辨率图谱绘制及人工智能增强的智能校正等方向的发展趋势。本综述旨在为超分辨光学显微成像技术的精准量化提供系统的理论支撑与实践指南, 推动其在生物医学及材料科学中的广泛应用。

关键词 光学显微镜, 分辨率检测, 超分辨成像, 傅里叶环相关, 去相关分析

中图分类号 TH742, Q334

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0540

CSTR: 32369.14.pibb.20250540

光学显微镜自17世纪发明以来, 始终是人类探索微观世界的核心工具, 在生物医学(如细胞结构观测、单分子追踪、蛋白质相互作用分析)、材料科学(如纳米材料表征、薄膜结构分析)、微电子学(如芯片缺陷检测)等领域发挥着不可替代的作用^[1]。分辨率作为光学显微镜最核心的性能指标, 定义为系统区分相邻两个物点的最小距离, 其检测精度直接影响对微观结构的定量分析与科学解读。

传统光学显微镜的分辨能力受限于光的衍射现象。对此, 存在两个经典且互补的描述: 其一是恩斯特·阿贝(Ernst Abbe)于1873年提出的阿贝衍射极限, 它针对周期性结构(如光栅), 指出光学系统能够传递的最小空间周期(即分辨率极限)为 $d = \lambda/(2NA)$ ^[2]。其二是瑞利判据(Rayleigh

criterion), 它针对两个非相干点光源, 给出了人眼或探测器能分辨这两个点像的最小间距 $R = 0.61\lambda/NA$ ^[3]。这两个判据共同构成了传统分辨率理论的基础, 但它们均基于线性、衍射受限的理想成像系统。20世纪末至21世纪初, 超分辨光学显微技术的出现彻底打破了衍射极限的束缚, 包括受激发射损耗显微术(stimulated emission depletion microscopy, STED)^[4]、光敏定位显微术(photo-activated localization microscopy, PALM)^[5]、随机光学重构显微术(stochastic optical reconstruction

* 浙江大学仪器研制培育专项(YQZX-C202412)和浙江省基础公益研究计划(LGC19H090001)资助。

** 通讯联系人。

Tel: 0571-88206765, E-mail: fshfbzxhq@zju.edu.cn

收稿日期: 2025-12-09, 接受日期: 2026-03-05

microscopy, STORM)^[6]、结构光照明显微镜 (structure illumination microscope, SIM)^[7]、计算超分辨成像^[8-9]等技术,将横向分辨率提升至20~100 nm量级。特别是近年来,结合最小光子通量 (minimal photon fluxes, MINFLUX) 等新型定位技术,光学显微镜的分辨率已进一步突破至分子尺度的1 nm水平^[10-11],这对分辨率检测方法的精度与灵敏度提出了前所未有的要求。

超分辨技术的飞速发展对分辨率检测方法提出了全新挑战:传统基于经验判据的检测方法(如瑞利准则)难以量化纳米尺度的分辨率^[12];超分辨成像过程中引入的非线性光学效应、随机定位误差、荧光分子光漂白与闪烁等因素,使得分辨率检测需综合考虑信噪比 (signal-to-noise ratio, SNR)、标记密度、定位精度等多维度参数^[13];不同超分辨技术的成像机理差异显著(如STED基于受激发射损耗的非线性调制, PALM/STORM基于单分子随机定位与重建),亟需针对性的分辨率检测策略。另外,值得注意的是,“分辨率”在超分辨成像的不同层面具有不同含义。理论分辨率是基于光学系统的物理原理(如衍射极限、STED的受激发射损耗公式)计算出的极限值。它是系统性能的“上限”,是一个设计参数。系统分辨率是指在理想样本(如荧光微球)和理想成像条件下,光学系统本身实际能达到的分辨率。它反映了仪器本身的“硬实力”,受光学像差、光路校准等系统误差影响。图像有效分辨率是指在实际生物样本成像中,最终图像所能解析细节的能力。对于最终用户而言,图

像有效分辨率才是最关键的指标,它综合反映了在特定生物学实验条件下(包括有限的SNR、标记密度、光漂白等),最终图像所能可靠解析结构细节的能力。重建分辨率特指计算超分辨技术(如单分子定位显微术 (single molecule localization microscopy, SMLM)、超分辨径向涨落 (super-resolution radial fluctuations, SRRF)、深度学习超分辨)中,由算法从原始数据重建出的图像的分辨率。它可能因算法引入的伪影(如过度平滑或锐化)而与真实的“有效分辨率”产生偏差。

当前,分辨率检测的前沿研究正聚焦于人工智能辅助的自动化评估^[14]、对活细胞动态过程的高通量化^[15],以及面向异质性生物样本的局部分辨率图谱绘制^[16]。这些进展正推动分辨率检测从离线分析工具向智能、在线、多维的系统性表征范式演进。因此,系统梳理光学显微图像分辨率检测方法的演进脉络,深入剖析各类方法的理论基础与适用场景,建立与超分辨技术相适配的分辨率量化体系,对于推动光学显微技术的发展与应用具有重要的理论价值与实践意义。

1 分辨率检测方法的演进与最新突破

光学显微成像分辨率检测方法的发展大致可分为3个阶段(图1)。

经典经验判据阶段:以瑞利准则(1879年)、斯派罗准则(1916年)为代表,基于物点成像的Airy斑强度分布特征,通过相邻物点图像的重叠程度判断分辨率。瑞利准则规定,当一个Airy斑的

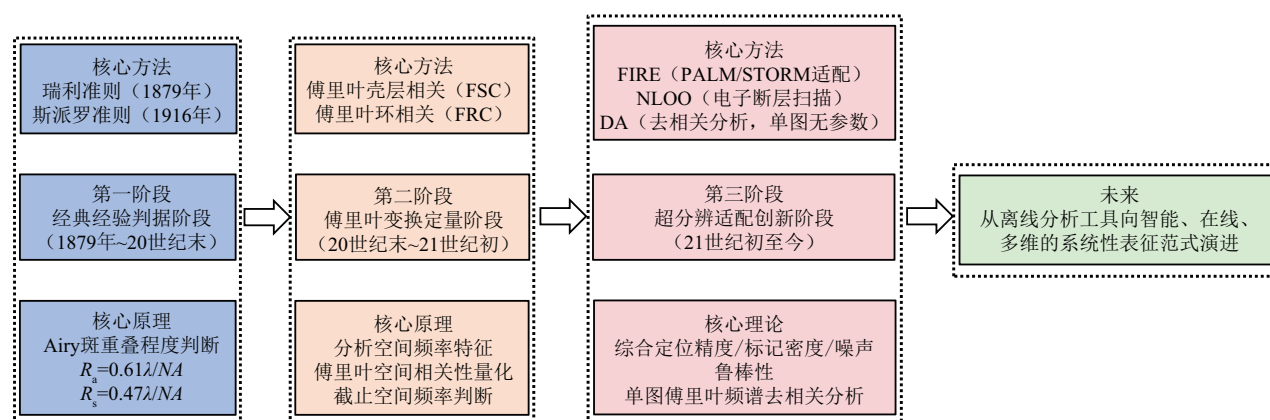


Fig. 1 Evolution of assessment methods for optical microscopy image resolution

图1 光学显微成像分辨率检测方法演进

FIRE: 傅里叶图像分辨率 (Fourier image resolution); PALM/STORM: 光敏定位显微术/随机光学重构显微术 (photo-activated localization microscopy/stochastic optical reconstruction microscopy); NLOO: 噪声补偿留一法 (noise-compensated leave-one-out); DA: 去相关分析 (decorrelation analysis); λ : 波长 (wavelength); NA: 数值孔径 (numerical aperture)。

中心与另一个Airy斑的第一极小值(暗环)重合时, 两物点可分辨, 对应的最小距离为 $R_0=0.61\lambda/NA$ ^[3]; 斯派罗准则则以两物点图像强度分布的鞍点消失为判据, 对应的最小距离为 $R_s=0.47\lambda/NA$ ^[17]。这类方法直观易懂、计算简便, 但主观性强、定量精度低, 且仅适用于理想条件下的点光源成像, 无法满足复杂样本与超分辨成像的检测需求。

傅里叶变换定量阶段: 随着数字图像处理技术的发展, 基于傅里叶变换的分辨率检测方法应运而生, 核心思想是通过分析图像的空间频率特征来量化分辨率^[18-19]。傅里叶壳层相关(Fourier shell correlation, FSC)方法通过比较两个独立重建图像在傅里叶空间不同壳层的相关性, 确定分辨率对应的截止空间频率^[20]; 傅里叶环相关(Fourier ring correlation, FRC)方法则针对二维图像, 通过计算傅里叶空间同心圆环上的相关性系数实现分辨率量化^[21]。这类方法具有客观定量、抗噪性强等优势, 广泛应用于电子显微镜分辨率检测, 但对图像的独立性与完整性要求较高, 且难以适配动态成像与各向异性分辨率表征。

超分辨适配创新阶段: 针对超分辨成像技术的特性, 一系列新型分辨率检测方法被提出。针对PALM/STORM等定位显微镜的傅里叶图像分辨率(Fourier image resolution, FIRE)方法, 综合考虑定位精度、标记密度与样本结构特征, 通过FRC曲线的阈值分析实现分辨率的精准量化^[22]; 针对电子断层扫描技术的噪声补偿留一法(noise-compensated leave-one-out, NLOO), 基于交叉验证思想, 通过排除单个投影重建图像与原始投影的相关性分析, 实现噪声鲁棒的分辨率检测^[23]; 尤为重要的是, 为克服上述方法对多张图像或数据分割的依赖, 基于去相关分析(decorrelation analysis, DA)的无参数方法被提出, 该方法通过分析单张图像的傅里叶频谱与其滤波版本的相关性曲线来定量分辨率, 实现了对宽场、STED、SIM等多种模态的单图像、无参数评估^[24]。针对STED等非线性成像技术的分辨率检测方法, 则结合受激发射损耗效率与点扩散函数(point spread function, PSF)压缩程度, 建立分辨率与激光功率、荧光分子特性的量化关系^[25]。这类方法能够适配不同超分辨技术的成像机理, 定量精度与适用性显著提升, 成为当前分辨率检测的主流方向。

目前, 分辨率评估领域的核心突破集中在克服傅里叶相关方法的固有局限, 并提升对复杂生物样

本和动态成像的适配性。主要进展包括以下两方面。a. 深度学习(deep learning, DL)与SMLM的融合: DL技术推动SMLM进入高密度、高时间分辨率时代, 这要求分辨率评估重点从传统的定位统计转向对DL重建图像中潜在伪影和数字保真度的验证^[26-27]; b. 局部分辨率量化成为焦点: 针对生物样本的非均匀性, 滚动FRC等衍生技术被开发出来, 实现了分辨率的空间热图映射, 将评估从系统全局性能转向样本局部质量控制^[16, 28]。

2 传统光学显微成像分辨率检测方法

2.1 基于Airy斑强度分布的经验判据

瑞利准则和斯派罗准则均属于基于点光源像(Airy斑)强度分布的经验判据, 它们主要用于评估传统光学显微镜分辨两个相邻点源的能力。值得注意的是, 这些判据与描述周期性结构分辨能力的阿贝衍射极限($d=\lambda/(2NA)$)在物理意义和应用对象上有所区别, 但都是衍射受限系统的经典描述。

2.1.1 瑞利准则(Rayleigh criterion)

瑞利准则是最经典的光学显微镜分辨率检测方法, 由英国物理学家瑞利(Lord Rayleigh)于1879年提出^[3], 其理论基础是点光源在光学系统成像后的Airy斑强度分布。理想光学系统中, 点光源的成像强度分布由Airy函数描述:

$$I(r) = I_0 \left[\frac{2J_1(kr)}{kr} \right]^2 \quad (1)$$

其中, $I(r)$ 为距离光轴 r 处的光强, I_0 为Airy斑中心最大强度, J_1 为一阶贝塞尔函数, $k=2\pi NA/\lambda$ 为波数(rad/nm)(其中 NA 为物镜数值孔径(无单位, 典型取值0.7~1.49), λ 为激发光波长(nm)), r 为到光轴的径向距离(nm)。Airy斑强度分布具有一系列交替的极大值与极小值, 第一极小值对应的径向距离为 $r_1=0.61\lambda/NA$, 对应强度为0, 第二极小值对应的径向距离为 $r_2=1.116\lambda/NA$, 以此类推。

瑞利准则规定: 当两个强度相等的点光源成像后, 若一个Airy斑的中心与另一个Airy斑的第一极小值重合, 则认为这两个点光源可分辨, 此时两物点的中心间距即为分辨率极限, 表达式为: $R=0.61\lambda/NA$, λ 为激发光波长(nm), NA 为物镜数值孔径(无单位, 典型取值为0.7~1.49)。瑞利准则的直观判据为: 两Airy斑叠加后的强度分布存在明显的鞍点(中央凹陷), 鞍点强度与极大值强度之比约为0.735。在实验检测中, 通常采用标准分辨率测试样本(如光刻光栅、荧光微球阵列), 通

过观察样本成像后的细节区分程度, 结合上述公式计算分辨率。

瑞利准则的优势在于直观易懂、计算简便, 无需复杂的数字图像处理, 适用于传统宽场显微镜、共聚焦显微镜等常规光学系统的分辨率快速评估。但其局限性显著: a. 仅适用于强度相等的点光源成像, 对于强度不均的样本(如生物组织中的荧光标记分子)误差较大; b. 基于经验性判据, 主观性较强, 不同观察者对“可分辨”的定义可能存在差异; c. 未考虑噪声、像差等实际成像因素的影响, 理想条件与实验环境的差异会导致检测结果偏离真实分辨率; d. 无法适配超分辨成像技术, 对于分辨率突破衍射极限的图像, 瑞利准则的物理基础不再成立^[29]。

2.1.2 斯派罗准则 (Sparrow criterion)

斯派罗准则由美国物理学家斯派罗 (C. M. Sparrow) 于1916年提出, 是对瑞利准则的补充与优化, 其核心改进在于消除了对 Airy 斑强度极小值的依赖, 更适用于低对比度样本的分辨率检测^[17]。

斯派罗准则的判据为: 当两个点光源成像后的叠加强度分布中, 鞍点完全消失(即强度分布呈现单一平滑峰)时, 两物点恰好不可分辨, 此时对应的两物点中心间距即为分辨率极限。数学上, 鞍点消失的条件为叠加强度分布的二阶导数为零, 对于强度相等的点光源, 对应的分辨率极限表达式为 $R_s = 0.47\lambda/NA$ ^[17]。与瑞利准则相比, 斯派罗准则对应的分辨率极限更小(约为瑞利准则的 77%), 更接近光学系统的实际分辨能力。在低对比度样本成像中, 斯派罗准则的检测精度高于瑞利准则, 因为其判据不受强度极小值深度的影响, 更能反映样本细节的真实区分能力。

然而, 斯派罗准则同样存在显著局限: a. 仅适用于点光源成像, 对于扩展物体(如细胞结构、薄膜材料)的分辨率检测不适用; b. 对噪声极为敏感, 实验环境中的光子噪声、电子噪声会导致叠加强度分布的鞍点特征模糊, 影响检测准确性; c. 仍基于经验性判据, 缺乏严格的数学推导与定量标准, 难以满足高精度成像的检测需求。

2.2 基于点扩散函数 (PSF) 的分辨率检测方法

PSF 是描述光学系统成像特性的核心函数, 定义为点光源通过光学系统后的成像强度分布。基于 PSF 的分辨率检测方法通过分析 PSF 的宽度参数(如半高全宽、 $1/e^2$ 宽度)量化光学系统的分辨率,

避免了经验性判据的主观性, 适用于各类常规光学显微镜的分辨率定量检测^[30]。

2.2.1 半高全宽 (full width at half maximum, FWHM) 法

半高全宽 (FWHM) 是 PSF 最常用的宽度参数, 定义为 PSF 强度下降至最大值一半时对应的横向距离(或轴向距离)。对于理想光学系统的 Airy 斑, FWHM 的理论值为: $FWHM_{\text{Airy}} = 0.51\lambda/NA$ 。在实验检测中, 通常采用亚分辨率荧光微球(直径远小于衍射极限, 如 100 nm 荧光微球)作为点光源样本, 通过成像获得微球的 PSF, 采用高斯函数或 Airy 函数拟合 PSF 强度分布, 计算其 FWHM 值, 以此作为光学系统的分辨率^[31]。

FWHM 法的优势在于: a. 定量性强, 基于客观的 PSF 宽度参数, 避免了经验判据的主观性; b. 适用于各类常规光学系统(如宽场、共聚焦、双光子显微镜), 且可同时检测横向与轴向分辨率; c. 计算简便, 可通过常规图像处理软件(如 ImageJ)实现自动化拟合与计算。其局限性主要包括: a. 对 PSF 的拟合模型依赖性强, 实际成像的 PSF 受像差、噪声影响可能偏离理想 Airy 分布或高斯分布, 导致拟合误差; b. 仅反映单个点光源的成像宽度, 无法直接体现相邻物点的区分能力, 对于非点光源样本的分辨率检测适用性有限; c. 未考虑样本标记密度、信号噪声比等因素的影响, 难以全面反映光学系统的实际成像性能^[32]。

2.2.2 $1/e^2$ 宽度法

$1/e^2$ 宽度法以 PSF 强度下降至最大值 $1/e^2$ (约 0.135) 时对应的横向距离作为分辨率指标, 适用于高斯光束成像的光学系统(如激光扫描共聚焦显微镜)^[33]。对于理想高斯 PSF, 其强度分布为:

$$I(r) = I_0 \exp\left(-\frac{2r^2}{\omega^2}\right) \quad (2)$$

其中, $I(r)$ 为距离光轴 r 处的光强, I_0 为 Airy 斑中心最大强度, ω 为高斯光束的束腰半径 (nm), 对应的 $1/e^2$ 宽度为 2ω , $\exp$ 为自然指数函数, 分辨率极限表达式为: $r_{1/e^2} = \lambda/(\pi NA)$, λ 为激发光波长 (nm), NA 为物镜数值孔径(无单位, 典型取值为 0.7~1.49)。 $1/e^2$ 宽度法的优势在于对高斯分布 PSF 的拟合精度高于 FWHM 法, 且与激光光束质量评估标准一致, 适用于激光扫描类显微镜的分辨率检测。但其局限性与 FWHM 法类似, 对 PSF 分布类型依赖性强, 且无法直接反映相邻物点的区分能力^[34]。

2.3 传统检测方法的局限性与适用场景总结

传统光学显微图像分辨率检测方法（经验判据法与PSF宽度法）的核心局限性可归纳为以下几点：a. 基于衍射极限的物理模型，无法适配超分辨成像技术；b. 对样本类型（如点光源、扩展光源、强度均一性等）依赖性强，适用范围窄；c. 未充分考虑噪声、像差、样本标记密度等实际成像因素的影响，检测精度有限；d. 难以实现各向异性分辨率与动态分辨率的量化检测^[12]。

各类传统检测方法的适用场景与性能对比如表1所示。在实际应用中，需根据光学系统类型、

样本特性与检测精度需求选择合适的方法：瑞利准则与斯派罗准则适用于常规光学显微镜的快速质量评估；FWHM法与1/e²宽度法适用于常规光学系统的分辨率定量检测；对于低对比度样本，斯派罗准则优于瑞利准则；对于高斯光束成像系统，1/e²宽度法优于FWHM法^[35-36]。值得注意的是，传统PSF宽度法在新型探测器的像差校准与性能标定中仍发挥着关键作用^[37]。同时，瑞利准则的物理内涵在新型超振荡透镜的理论分辨率界定中得到了重新审视与扩展^[38]。

Table 1 Comparison of traditional methods for optical microscopy resolution detection
表1 传统光学显微成像分辨率检测方法对比

检测方法	核心判据	分辨率表达式	优势	局限性	适用场景
瑞利准则 ^[3]	一个Airy斑中心与另一个Airy斑第一极小值重合	$R=0.61\lambda/NA$	直观易懂、计算简便	主观性强、仅适用于等强度点光源、未考虑噪声	常规光学显微镜快速质量评估
斯派罗准则 ^[17]	两Airy斑叠加鞍点消失	$R=0.47\lambda/NA$	适用于低对比度样本、精度高于瑞利准则	对噪声敏感、适用范围窄	低对比度点光源样本分辨率检测
FWHM法 ^[31]	点扩散函数强度下降至最大值一半的宽度	$FWHM=0.51\lambda/NA$	定量性强、可自动化计算、适用于横向或轴向分辨率	对拟合模型依赖、无法反映相邻物点区分能力	常规光学系统分辨率定量检测
1/e ² 宽度法 ^[35]	点扩散函数强度下降至最大值1/e ² 的宽度	$R_{1/e^2}=\lambda/(\pi NA)$	适配高斯光束、与激光质量标准一致	仅适用于高斯分布点扩散函数、适用范围窄	激光扫描类显微镜分辨率检测

FWHM: 半高宽 (full width at half maximum); R: 分辨率 (resolution); λ: 波长 (wavelength); NA: 数值孔径 (numerical aperture)。

3 基于傅里叶变换的定量分辨率检测方法

基于傅里叶变换的分辨率检测方法通过将图像从空间域转换至频率域，分析图像的空间频率特征量化分辨率，其核心思想是：光学系统的分辨率对应其能够传递的最高空间频率，超过该频率的信号将被系统滤波衰减。这类方法具有客观定量、抗噪性强、适用范围广等优势，是当前光学显微成像分辨率检测的主流技术，尤其适用于超分辨成像与电子显微镜图像的高精度检测，已在透射电子显微术 (transmission electron microscopy, TEM)、共聚焦显微术、超分辨荧光显微术（如STED、SRRF）、超声定位显微术（ultrasound localization microscopy, ULM）等多种成像技术中得到广泛验证与应用^[39-43]。必须强调的是，基于傅里叶变换的定量分辨率检测方法有效性的核心前提是两组数据的统计独立性。任何破坏独立性的操作都会使FRC系数偏高，导致截止频率上移，从而高估图像分辨率。常见的数据非独立性来源包括：a. 对两组数据使用了相同的漂移校正、去噪或图像重建算法，引入了共同的数值偏差；b. 在分割数据时，样

本发生了显著的光漂白或动态变化，导致前后数据的统计特性不一致；c. 在单张图片的像素随机分割策略中，若图像噪声存在空间相关性（如EMCCD/sCMOS相机的像素间相关性），则随机分割无法完全保证噪声的独立性。因此，在应用FRC前，必须审慎评估数据采集和预处理流程，以确保独立性能得到最大程度的满足。

3.1 傅里叶壳层相关 (FSC) 方法

3.1.1 理论基础与数学模型

FSC方法由Harauz与van Heel^[20]于1986年提出，最初用于电子显微镜单颗粒重建图像的分辨率检测，其核心原理是通过比较两个独立重建图像在傅里叶空间不同壳层的相关性，确定系统能够可靠传递的最高空间频率。

对于两个独立的3D重建图像 $f_1(\vec{r})$ 与 $f_2'(\vec{r})$ ，其傅里叶变换分别为3D空间频率向量。FSC系数定义为傅里叶空间中同一壳层（球壳）上两个傅里叶变换的归一化交叉相关：

$$FSC(q) = \frac{\sum_{\vec{q} \in S(q)} \hat{f}_1(\vec{q}) \hat{f}_2^*(\vec{q})}{\sqrt{\sum_{\vec{q} \in S(q)} |\hat{f}_1(\vec{q})|^2 \sum_{\vec{q} \in S(q)} |\hat{f}_2(\vec{q})|^2}} \quad (3)$$

其中, $\hat{f}_1(\vec{q})$ 为第一个 3D 重建图像的傅里叶变换 (复数), $\hat{f}_2(\vec{q})$ 为第二个 3D 重建图像的傅里叶变换 (复数), (q) 为傅里叶空间中半径为 q 的球壳, $q = |\vec{q}|$ 为空间频率大小 (径向频率), $*$ 表示复共轭, $S(q)$ 傅里叶空间中半径为 q 的球壳 (所有满足 $|\vec{q}|=q$ 的频点集合), $\sum_{\vec{q} \in S(q)}$ 对球壳 $S(q)$ 内所有频点求和, 为两图像在球壳上的互相关求和 (分子), 反映两图像在频率 q 处的一致性, $\sqrt{\sum_{\vec{q} \in S(q)} |\hat{f}_1(\vec{q})|^2 \sum_{\vec{q} \in S(q)} |\hat{f}_2(\vec{q})|^2}$ 为两图像在球壳上的自相关几何平均 (分母), 用于将分子归一化至 $[-1, 1]$ 区间。FSC 系数的取值范围为 $[-1, 1]$, 值越接近 1 表示两个图像在该空间频率处的一致性越好, 值越接近 0 表示一致性越差。

分辨率的确定基于 FSC 曲线的阈值判据: 当 FSC 系数下降至某一阈值时, 对应的空间频率即为系统的截止空间频率 q_c , 分辨率 r 为截止空间频率的倒数: $r=1/2q_c$ 。常用的 FSC 阈值包括 0.5、0.3、0.143 等: 0.5 阈值为传统经验判据, 适用于高信噪比图像; 0.3 阈值更适用于低信噪比图像; 0.143 阈值 (1/7) 由 Rosenthal 与 Henderson 基于统计理论推导, 考虑了噪声对相关性的影响, 是当前超分辨成像与电子显微镜分辨率检测的常用标准^[44-45], 在 TEM 相位板成像、超分辨荧光成像等场景中已得到广泛应用^[41, 43]。

3.1.2 实验实现与关键步骤

FSC 方法的实验实现通常包括以下关键步骤。

a. 样本制备与成像: 选择合适的标准样本 (如荧光标记的生物大分子、纳米颗粒阵列、蛋白质晶体等), 通过光学系统获取两组独立的成像数据 (如不同批次成像、同一批次数据随机分为两组)。

b. 图像重建: 对两组独立数据分别进行 3D 重建 (如电子断层扫描的滤波反投影重建、PALM/STORM 的单分子定位重建), 获得两个独立的 3D 图像 $\hat{f}_1(\vec{q})$ 与 $\hat{f}_2(\vec{q})$, 重建过程中需保持参数一致性, 避免因算法差异引入系统性偏差^[41]。

c. 傅里叶变换: 对两个 3D 图像分别进行傅里叶变换, 得到对应的傅里叶变换 $\hat{f}_1(\vec{q})$ 与 $\hat{f}_2(\vec{q})$, 对于存在像差或漂移的图像, 需先进行预处理 (如配准、噪声过滤等), 减少非均匀性对相关性的影响^[42]。

d. 壳层划分与相关性计算: 在傅里叶空间中, 以不同半径 q 划分球壳, 计算每个球壳上的 FSC 系

数, 得到 FSC 曲线。壳层划分数量需合理, 通常设置为 10~20 组, 过多会导致每个壳层的像素数过少, FSC 系数波动较大, 过少则会降低分辨率检测的精度^[41]。

e. 阈值确定与分辨率计算: 根据图像信噪比选择合适的 FSC 阈值, 确定截止空间频率 q_c , 计算分辨率 $r=1/(2q_c)$, 例如, 在 TEM 相位板成像中, 通过 FSC 阈值 0.5 确定的分辨率约为 4 Å, 而结合相位板校正后可将分辨率提升至 2.5 Å^[41]。

FSC 方法的关键技术要点包括: a. 两组成像数据需保证独立性, 避免相关性导致的 FSC 系数偏高, 进而高估分辨率; b. 傅里叶变换前需对图像进行预处理 (如噪声过滤、配准), 减少像差与漂移对相关性的影响; c. 壳层划分的数量需合理, 过多会导致每个壳层的像素数过少, FSC 系数波动较大, 过少则会降低分辨率检测的精度。

3.1.3 适用场景与局限性

FSC 方法的优势在于: a. 客观定量, 基于统计理论与傅里叶变换, 避免了经验判据的主观性; b. 抗噪性强, 通过壳层平均与归一化处理, 减少了噪声对分辨率检测的影响; c. 适用于 3D 成像与超分辨成像技术, 如电子断层扫描、PALM/STORM 的 3D 重建图像; d. 可同时检测各向同性与各向异性分辨率, 通过分析不同方向壳层的 FSC 系数, 实现分辨率的多维度表征。

其局限性主要包括: a. 对数据独立性要求高, 两组数据的相关性会导致 FSC 曲线偏高, 分辨率检测结果不准确; b. 计算复杂度高, 尤其对于大尺寸 3D 图像, 傅里叶变换与壳层相关性计算耗时较长; c. 难以适用于动态成像的实时分辨率检测, 需离线处理两组独立数据; d. 对图像重建算法依赖性强, 不同重建算法可能导致 FSC 曲线差异, 影响分辨率检测结果^[46]。

3.2 傅里叶环相关 (FRC) 方法

3.2.1 理论基础与数学模型

FRC 方法是 FSC 方法在 2D 图像中的拓展, 由 Saxton 与 Baumeister^[21] 于 1982 年提出, 适用于宽场显微镜、共聚焦显微镜、2D 超分辨成像 (如 2D STED、2D PALM) 等 2D 图像的分辨率检测。对于两个独立的 2D 图像 $f_1(x, y)$ 与 $f_2(x, y)$, 其傅里叶变换分别为 $\hat{f}_1(u, v)$ 与 $\hat{f}_2(u, v)$ ((u, v) 为 2D 空间频率向量)。FRC 系数定义为傅里叶空间中同一圆环上两个傅里叶变换的归一化交叉相关:

$$FRC(q) = \frac{\sum_{(u,v) \in C(q)} \hat{f}_1(u,v) \hat{f}_2^*(u,v)}{\sqrt{\sum_{(u,v) \in C(q)} |\hat{f}_1(u,v)|^2 \sum_{(u,v) \in C(q)} |\hat{f}_2(u,v)|^2}} \quad (4)$$

其中, q 为空间频率, 对应傅里叶空间中圆环的半径, 表示图像结构的尺度, (u, v) 为傅里叶空间中的二维坐标, 对应频域中的点, $C(q)$ 为半径为 q 的圆环 (或环带) 上的像素集合, $f_1(u, v)$ 为第一个图像的傅里叶变换在频点 (u, v) 处的复数值, $f_2^*(u, v)$ 第二个图像的傅里叶变换的复共轭, 用于计算交叉相关, $|f_1(u, v)|^2$ 为第一个图像在频点 (u, v) 处的功率谱, 即傅里叶变换幅度的平方, $|f_2(u, v)|^2$ 为第二个图像在频点 (u, v) 处的功率谱, $\sum_{\{(u, v) \in C(q)\}}$ 对圆环 $C(q)$ 内所有像素的求和运算。与 FSC 类似, FRC 系数的取值范围为 $[-1, 1]$, 反映两个 2D 图像在不同空间频率处的一致性。

分辨率的确定同样基于 FRC 曲线的阈值判据, 截止空间频率 q_c 对应 FRC 系数下降至阈值时的空间频率, 分辨率 r 为: $r=1/2q_c$ 。常用的 FRC 阈值与 FSC 一致, 包括 0.5、0.3、0.143 等, 其中 0.143 阈值在超分辨 2D 图像检测中应用最为广泛^[12], 在共聚焦显微镜、SRRF 成像、ULM 中均被作为标准阈值^[39, 42-43]。在多焦点共聚焦显微术中, 通过 FRC 阈值 0.143 确定的 Attention U-Net 重建图像分辨率显著优于传统 U-Net^[39]; 在 ULM 中, 基于 FRC 阈值 0.5 与 2σ 标准可实现微血管成像分辨率的精准量化^[42]。

3.2.2 实验实现与关键优化

FRC 方法的实验实现步骤与 FSC 类似, 主要包括样本成像、数据分割、傅里叶变换、圆环划分、FRC 系数计算、阈值确定与分辨率计算。针对 2D 图像的特性, FRC 方法的关键优化包括下面 4 种。

a. 数据分割策略: 对于单幅 2D 图像, 传统 FRC 对两组独立成像数据的依赖限制了其在稀有样本、动态成像或无法重复采样场景中的应用。为此, 单张图片的傅里叶变换相关处理通过随机分割策略突破该局限——无需额外采集数据, 仅通过对单幅图像的像素信息或原始信号进行无偏分割, 即可构建两组具有统计独立性的数据集^[47]。对于常规宽场/共聚焦图像采用像素级随机分割, 将单张图像的像素矩阵按 50% 概率随机分配至两组子图像, 确保两组数据在空间分布与灰度特征上保持一

致性; 对于单分子定位成像 (如 2D PALM/STORM) 直接对单分子定位数据集进行随机分组, 将每个荧光分子的定位坐标随机归入两组, 分别重建两个 2D 超分辨图像, 保证两组数据的独立统计特性。该策略的核心优势在于无需重复成像, 仅通过单张图片即可完成分辨率定量, 显著降低实验成本并适配稀有样本 (如珍贵生物组织切片、短时程动态过程) 的检测需求。分割后需验证两组数据的独立性: 通过计算原始图像与分割后子图像的灰度分布相似度或定位数据的密度分布一致性, 确保分割未引入系统性偏差。

b. 圆环划分优化: 根据图像尺寸与空间频率范围, 合理设置圆环的数量与宽度, 通常采用等对数间隔划分, 确保低频率与高频率区域均有足够的采样点。对于单张图片的傅里叶变换结果, 圆环划分需适配分割后子图像的分辨率。若单张原图像素尺寸为 $M \times M$, 分割后子图像仍保持 $M \times M$ 尺寸 (零填充补充), 则傅里叶空间的圆环半径范围为 $0 \sim \sqrt{2} M/2$, 圆环数量建议设置为 10~20 组, 平衡检测精度与计算效率。

c. 噪声补偿与校正: 针对低信噪比图像, 传统 FRC 方法精度会下降, 此时可采用噪声补偿 FRC (详见 3.3.1 节) 进行校正^[48]。

d. 各向异性分辨率表征: 通过计算不同方向扇形区域的 FRC 系数 (傅里叶线相关 (Fourier line correlation, FLC)), 实现 2D 图像各向异性分辨率的量化检测。对于单张图片, 该表征可进一步结合傅里叶变换的角度分布特性。在傅里叶空间中, 按 $15^\circ \sim 30^\circ$ 间隔划分扇形区域, 分别计算每个区域的 FRC 系数与对应分辨率, 最终生成单张图像的分辨率角分布热力图, 直观反映镜头像差、样本取向等因素导致的分辨率各向异性。

3.2.3 与 FSC 方法的对比及适用场景

FRC 方法与 FSC 方法的核心原理一致, 均基于傅里叶变换的相关性分析, 但适用场景不同 (表 2)。FRC 适用于 2D 图像分辨率检测, 计算复杂度较低, 可快速实现常规 2D 光学显微镜与 2D 超分辨成像技术的分辨率定量; FSC 适用于 3D 图像分辨率检测, 可实现 3D 空间分辨率的全面表征, 但计算复杂度较高^[49-50]。

在实际应用中, 2D 成像技术 (如宽场显微镜、2D STED、2D PALM、SRRF、ULM) 采用 FRC 方法^[39, 42-43], 3D 成像技术 (如 3D STED、3D PALM、电子断层扫描、3D 超分辨容积受激拉曼

散射 (ultra-resolution volume-stimulated Raman scattering, URV-SRS)) 采用FSC方法^[40-41], 对于2D+Z堆叠成像, 可结合FRC与FSC方法, 分别检测横向与轴向分辨率^[40]。例如: 在3D URV-SRS

成像中, 通过FRC检测横向分辨率 (86 nm), 通过FSC检测轴向分辨率 (405 nm)^[40]; 在电子断层扫描中, 通过FSC表征3D体分辨率, 通过FRC分析单个切片的横向分辨率^[41]。

Table 2 Comparison of Fourier ring correlation and Fourier shell correlation methods

表2 傅里叶环相关与傅里叶壳层相关方法对比

方法	适用图像维度	傅里叶空间采样	计算复杂度	关键优势	适用场景	典型分辨率结果
傅里叶环相关	2D	圆环	低	计算快速、适用于2D成像、可实现各向异性与局部分辨率表征、跨模态对比标准化	宽场显微镜、2D超分辨成像 (2D STED/2D PALM/SRRF)、共聚焦显微镜、ULM、振动成像	共聚焦显微镜: 130 nm ^[39] ; SRRF: 100 nm ^[43] ; ULM: 6.9 μm ^[42] ; URV-SRS: 86 nm ^[40]
傅里叶壳层相关	3D	球壳	高	全面表征3D分辨率、适用于体积分成像、适配3D超分辨技术	3D超分辨成像、电子断层扫描、3D URV-SRS成像、TEM相位板成像	电子断层扫描: 4 Å ^[45] ; 3D URV-SRS: 405 nm (轴向) ^[40] ; 3D STED: 50 nm

STED: 受激发射损耗显微术 (stimulated emission depletion microscopy); PALM: 光敏定位显微术 (photo-activated localization microscopy); SRRF: 超分辨径向涨落 (super-resolution radial fluctuations); ULM: 超声定位显微术 (ultrasound localization microscopy); URV-SRS: 超分辨容积受激拉曼散射 (ultra-resolution volume-stimulated Raman scattering); TEM: 透射电子显微术 (transmission electron microscopy)。

3.3 基于傅里叶变换的衍生方法

3.3.1 噪声补偿傅里叶环相关 (NC-FRC) 方法

针对低信噪比图像 (如单分子成像中的弱荧光信号), 传统FRC方法的分辨率检测精度会显著下降, 因为噪声会导致FRC系数偏低, 进而低估分辨率。噪声补偿傅里叶环相关 (noise-compensated FRC, NC-FRC) 方法通过引入噪声模型 (如泊松噪声、高斯噪声等), 对FRC系数进行校正, 提高低信噪比图像的分辨率检测精度^[48]。

NC-FRC方法的核心思想是: 假设图像噪声为加性 (additive) 噪声, 通过估计噪声的功率谱密度, 从傅里叶变换中扣除噪声贡献, 再计算FRC系数。具体步骤为: a. 估计图像噪声的功率谱密度 $N(q)$; b. 对两个图像的傅里叶变换进行噪声扣除: $\tilde{f}_1'(q) = \tilde{f}_1(q) - N(q)$, $\tilde{f}_2'(q) = \tilde{f}_2(q) - N(q)$; c. 基于噪声扣除后的傅里叶变换计算FRC数。

NC-FRC方法显著提高了低信噪比图像的分辨率检测精度, 适用于单分子定位显微镜 (如PALM/STORM)、弱荧光样本成像等场景。然而, 它并未解决根本的数据依赖性问题。在高光毒性或稀有样本场景中, 如果无法获得统计独立的双数据集, NC-FRC的物理前提依然不成立, 这促使研究人员转向基于单幅图像的评估方法, 如DA。

3.3.2 多尺度傅里叶环相关 (MS-FRC) 与滚动傅里叶环相关 (rolling FRC) 方法

多尺度傅里叶环相关 (multi-scale FRC, MS-FRC) 方法针对图像中不同尺度结构的分辨率差异, 通过在多个空间尺度上计算FRC系数, 实现图像局部分辨率的量化表征。传统FRC方法仅提供图像的全局分辨率, 无法反映局部结构 (如细胞边缘与内部、高密度与低密度标记区域) 的分辨率差异^[16]。

MS-FRC方法的核心步骤为: a. 将图像划分为多个重叠的局部子区域; b. 对每个子区域分别计算FRC系数与对应的局部分辨率; c. 通过插值得到全图像的局部分辨率分布图。该方法可直观展示图像不同区域的分辨率差异, 适用于不均匀样本 (如生物组织切片、细胞骨架网络) 的分辨率检测^[51]。该方法的拓展形式——滚动FRC方法进一步优化了子区域划分策略, 采用滑动窗口方式连续计算局部分辨率, 提高空间分辨率映射的连续性^[16]。例如: 在超分辨荧光成像中, 通过滚动FRC方法发现细胞边缘的局部分辨率 (80 nm) 高于细胞内部 (120 nm), 这与边缘结构的荧光标记密度更高相关; 在ULM成像中, 通过MS-FRC方法量化脑皮层与丘脑区域的微血管分辨率差异, 为神经血管耦合研究提供局部分辨率依据^[42]; 在组织切片成像

中, MS-FRC方法可揭示不同细胞层的分辨率异质性。

MS-FRC与滚动FRC方法的优势在于: a. 直观展示图像不同区域的分辨率差异, 为成像质量评估提供精细化指标; b. 适配不均匀样本的分辨率检测, 尤其适用于生物组织切片、细胞骨架网络、肿瘤微血管等复杂结构^[42-43]; c. 可用于成像系统优化, 通过局部分辨率分布图定位像差严重区域, 指导光学系统校准。其局限性在于: 计算量较传统FRC显著增加, 需依赖GPU加速; 子区域尺寸选择会影响结果稳定性, 需通过交叉验证确定最优窗口大小(通常为50~100像素)^[16]。

3.3.3 模态特异性傅里叶相关方法

随着成像技术的多元化, 研究者开发了针对特定模态的傅里叶相关衍生方法, 进一步拓展了其应用范围。

a. 电子显微镜相位板成像适配FRC方法: 考虑相位板引入的线性相位偏移, 在FRC计算中加入相位校正项, 修正因相位偏移导致的高频率信号衰减。例如, 在双电子束相位板TEM成像中, 通过相位校正FRC, 成功验证了4 Å的分辨率, 并证实修正后的CTF校正可将分辨率拓展至2.5 Å^[41]。

b. ULM专用FRC方法: 结合超声成像的频域特性, 采用对数尺度的圆环划分, 适配超声信号的频率分布; 同时引入微泡运动补偿, 修正微泡流动导致的相关性下降。例如, 在小鼠脑微血管ULM成像中, 通过该方法量化不同探头频率(15/23/31 MHz)的分辨率差异, 证实31 MHz探头在高微泡浓度下可实现6.9 μm的最高分辨率^[42]。

c. 振动成像(URV-SRS)FRC方法: 针对振动成像的信号特性, 采用傅里叶重加权(Fourier reweighting)增强高频率成分后再计算FRC, 提高低浓度代谢物结构的分辨率检测精度。例如, 在URV-SRS成像中, 通过该方法验证了86 nm的横向分辨率, 且FRC曲线与理论光学传递函数(optical transfer function, OTF)高度吻合^[40]。

4 基于去相关分析(DA)的无参数图像分辨率检测方法

超分辨成像技术的多样化应用对分辨率检测提出了“单幅图像适配、无主观参数、跨模态兼容”的新需求。传统傅里叶变换类方法(如FRC/FSC)依赖两组独立数据, 且需手动设定阈值, 难以满足动态成像与自动化检测场景。2019年Descloux

等^[24]提出的基于DA的无参数分辨率检测方法^[24, 32], 通过单幅图像的部分相位自相关分析, 实现了无需用户定义参数、适配多成像模态的分辨率量化, 为超分辨与传统光学显微图像的分辨率检测提供了全新解决方案。该方法后续通过补充研究完善了SMLM数据的适配性问题, 并提出了优化的渲染策略^[32], 进一步拓展了其应用场景。

4.1 方法原理与核心创新

该方法的核心创新在于通过归一化傅里叶变换平衡信号与噪声贡献, 利用相位信息保留目标结构特征, 再通过动态滤波与峰值检测自动确定系统的截止空间频率, 无需依赖双数据集或预设阈值, 其本质是分析图像在傅里叶空间的相关性衰减规律, 提取能够可靠传递的最高空间频率以量化分辨率^[24]。

对输入图像的傅里叶变换 $I(k)$ (其中 $k=(k_x, k_y)$ 为傅里叶空间坐标)进行边缘切趾预处理以抑制高频伪影后, 计算其归一化傅里叶变换:

$$I_n(k) = \frac{I(k)}{|I(k)|} \quad (5)$$

其中, $|I(k)|$ 为傅里叶变换的幅值, 归一化操作可分离信号相位与幅值的影响, 使相位信息(决定图像结构的核心)得以保留, 同时平衡噪声分布。

定义去相关系数($d(r)$)为原始傅里叶变换与带通滤波后的归一化傅里叶变换的皮尔逊交叉相关:

$$d(r) = \frac{\int \text{Re}\{I(k)I_n^*(k)M(k;r)\} dk_x dk_y}{\sqrt{\int |I(k)|^2 dk_x dk_y \int |I_n(k)M(k;r)|^2 dk_x dk_y}} \quad (6)$$

其中, $d(r)$ 为去相关系数, 衡量原始傅里叶变换与带通滤波后归一化变换之间的皮尔逊交叉相关, 反映信号在半径 r 的频率区间内的一致性, ($M(k;r)$)为半径($r \in [0, 1]$ (归一化频率))的圆形掩模, $I_n^*(k)$ 为归一化傅里叶变换 $I_n(k)$ 的复共轭, 用于相关计算中的互相关项, $\text{Re}\{\cdot\}$ 表示取实部, $\int \cdots dk_x dk_y$ 在傅里叶空间上的二重积分, 表示对整个频率平面或特定区域(如掩模内)的累加操作, 用于计算能量或相关值, $\int |I(k)|^2 dk_x dk_y$ 为原始傅里叶变换 $I(k)$ 的总能量, 作为去相关系数分母的一部分, $\int |I_n(k)M(k;r)|^2 dk_x dk_y$ 为带通滤波后归一化傅里叶变换 $I_n(k)$ 在掩模 $M(k;r)$ 内的能量, 用于去相关系数分母的归一化; $D(r) = \epsilon [0, 1]$, 值越接近1表明该频率区间内信号一致性越好。

分辨率计算通过截止空间频率的自动提取实现：通过遍历掩模半径 (r) 计算 $d(r)$ 曲线，其局部最大值对应“最佳噪声抑制-信号保留”平衡点，该峰值位置 (r_0) 与图像空间频率分布直接相关。为充分提取高频信号信息，对原始图像进行 (N_g) 次梯度增强的高通滤波，对每个滤波后图像重复上述去相关分析，提取所有局部峰值位置 ($[r_0, r_1, \dots, r_{N_g}]$) 1 取最大值作为截止空间频率： $k_c = \max [r_0, r_1, \dots, r_{N_g}]$ ，最终分辨率计算公式为：

$$\text{Resolution} = \frac{2 \times \text{pixel size}}{k_c} \quad (7)$$

其中， pixel size 为图像像素尺寸， k_c 为归一化截止空间频率。该方法通过数据驱动自动确定截止频率，避免了传统方法中阈值选择的主观性^[24]。

针对 SMLM 数据的特殊性，后续研究补充了关键优化：SMLM 输出的是定位点集合而非直接图像，需通过渲染转化为图像后才能进行去相关分析，但传统高斯渲染（固定标准差或基于定位不确定性的高斯渲染）会引入额外假设，导致分辨率估计偏差。为此，Descloux 等^[32] 提出双线性直方图 (bilinear histogram) 渲染策略，将每个定位点分布到 4 个相邻像素并赋予权重，有效减少了标准直方图渲染的舍入误差，且无需依赖定位不确定性参数，使去相关分析在 SMLM 数据中实现真正的无参数特性。该渲染方法与 DA 结合后，分辨率估计仅依赖定位密度和定位精度，在 STORM、DNA-PAINT 等 SMLM 模态中均表现出稳定性能。

4.2 实验实现与关键技术要点

DA 的实验流程分为 4 个核心步骤，全程无需用户干预。

4.2.1 图像预处理

对输入图像进行边缘切趾 (edge apodization) 处理，抑制傅里叶变换中的高频伪影；确保图像非饱和且满足奈奎斯特采样准则，避免因采样不足导致的频率信息丢失^[24]。对于 SMLM 数据，采用双线性直方图渲染方法，将定位点 $[x_n, y_n]$ 分布到 4 个相邻像素，权重通过张量积计算 $w_n[x_n, y_n] = \begin{pmatrix} 1 - y_n + \lfloor y_n \rfloor \\ y_n - \lfloor y_n \rfloor \end{pmatrix} \otimes \begin{pmatrix} 1 - x_n + \lfloor x_n \rfloor \\ x_n - \lfloor x_n \rfloor \end{pmatrix}$ ，渲染像素尺寸需平衡采样充分性与稀疏性（典型值 5~15 nm），避免过小将导致定位点空间相关性丧失（稀疏限制），过大则违反奈奎斯特准则（采样

限制)^[32]。

4.2.2 傅里叶变换与归一化

计算预处理后图像的傅里叶变换，通过幅值归一化得到纯相位相关的归一化傅里叶变换 ($I_n(k)$)，分离信号结构信息与幅值噪声的影响。对于 SMLM 渲染图像，归一化操作可有效降低渲染引入的系统性偏差。

4.2.3 动态掩模滤波与去相关系数计算

遍历归一化频率半径 ($r \in [0, 1]$)，通过二元圆形掩模 $M(k; r)$ 对 $I_n(k)$ 进行带通滤波，逐点计算去相关系数 $d(r)$ ，生成 $d(r)$ - r 曲线，提取首个局部最大值对应的频率 r_0 。关键优化：针对 SMLM 图像的定位密度差异，需确保定位密度达到 $(1\sim4) \times 10^4 \text{ loc./}\mu\text{m}^2$ ，以形成稳定的空间相关性，避免因稀疏导致分辨率低估。

4.2.4 高通滤波增强与截止频率确定

对原始图像施加 N_g 次梯度高通滤波（从弱到强），重复步骤 4.2.2~4.2.3，提取各滤波图像的局部峰值频率 $[r_1, \dots, r_{N_g}]$ ；取所有峰值频率的最大值作为截止空间频率 k_c ，代入分辨率公式计算最终结果。

关键技术要点：高通滤波次数 N_g 需根据图像信噪比自适应调整，确保充分覆盖高频信号区间；掩模遍历步长需平衡检测精度与计算效率，通常采用等对数间隔划分以优化高频区域采样；SMLM 数据需额外验证定位密度收敛性——通过逐步增加参与渲染的定位点数，计算分辨率随定位密度的变化，当分辨率趋于稳定（出现平台期）时，表明定位密度足够，避免因密度不足导致的偏差；像素尺寸选择——对于非 SMLM 图像，像素尺寸需与成像系统的物理分辨率匹配，对于 SMLM 图像，像素尺寸建议设置为定位精度的 1/3~1/2，兼顾空间分辨率与计算效率^[32]。

4.3 性能特点与最新进展

4.3.1 核心性能优势与局限性

该方法的核心性能优势在于以下 4 个方面。

a. 无参数特性：算法内置分辨率判定标准，无需用户手动设定任何参数，避免了主观误差。在 SMLM、STED、宽场等多模态成像中，不同操作者使用该方法获得的分辨率估计差异小于 6.5%，适合自动化显微镜系统的集成应用^[24, 32, 43]。

b. 单幅图像适配：仅需单张图像即可完成分辨率检测，摆脱了对多组独立数据的依赖。在 STED 成像中，光漂白会破坏 FRC 所需的两组独立数据

的一致性, 导致FRC失效, 而DA通过单图分析成功规避该问题, 准确量化STED在实际生物学条件下的有效分辨率(如微管成像中STED分辨率经DA检测为 (64 ± 1) nm, 与理论值一致)^[43]。

c. 跨模态兼容性强: 原理不依赖于特定成像技术的成像机理, 已验证适用于宽场、共聚焦、STED、SIM、SMLM (STORM、PALM)、SRRF等多种模态^[24, 32, 43]。在复杂生物结构成像中(微管、线粒体、核孔复合物Nup98), DA在所有结构类型中均表现出稳定的分辨率量化能力, 而FWHM在Nup98等密集结构中因PSF重叠无法准确区分相邻点, 导致分辨率低估30%以上^[43]。

d. 计算效率高: 已开发开源ImageJ插件(ImDecorr)与MATLAB代码, 单幅 $12 \times 12 \mu\text{m}^2$ 图像的分辨率计算时间约30 s, 支持批量处理, 便于科研与工业场景的推广应用^[32]。

其主要局限性为: 当前版本主要适用于2D/2D+Z堆叠图像, 3D图像检测需扩展至球坐标下的傅里叶壳层分析; 对严重失焦或像差过大的图像, 分辨率估计偏差会增加, 但精度仍优于传统方法^[24]; SMLM数据中, 当定位密度低于 1×10^4 loc./ μm^2 时, 会因空间相关性不足导致分辨率低估, 需通过增加定位点数或优化渲染像素尺寸来改善^[32]。

4.3.2 跨模态鲁棒性与应用拓展

近期研究证实, DA在多种超分辨模态(SRRF、STED)和复杂生物结构(微管、线粒体、核孔复合物Nup98)中, 表现出比FWHM和FRC更卓越的通用性和鲁棒性。在高功率STED成像中, 光漂白会破坏FRC所需的数据独立性导致其失效, 而DA作为单图分析方法成功规避该问题, 能准确评估STED在实际生物学条件下的有效分辨率, 成为其实证验证的首选工具; 对于PSF高度重叠的密集结构(如Nup98), 传统FWHM法因无法区分相邻点而严重低估分辨率, DA依赖整个频谱信息, 能够准确量化分辨能力。此外, DA方法计算高效且无参数, 具备从单纯的评估工具升级为成像参数自动化优化工具的潜力^[43]。另外, 在活体皮肤成像、红细胞储存质量评估等非传统分辨率检测场景中, DA展现出拓展应用潜力: 在红细胞储存质量评估中, DA通过分析激光散斑的去相关时间(speckle decorrelation time, SDT), 间接量化红细胞的聚集程度与变形能力, 为血液储存损伤检测

提供了新的量化指标; 在光学相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)的运动跟踪中, 基于DA原理的自适应散斑DA实现了微米级运动位移检测, 分辨率达 $8.6 \mu\text{m}$, 为OCT图像的运动伪影校正提供了技术支撑^[52-53]。

5 基于已知结构验证的分辨率“金标准”

无论是基于傅里叶变换的FRC/FSC方法, 还是基于PSF分析或DA的方法, 它们提供的都是对图像分辨率的间接估计。从定义出发, 衡量一个超分辨成像系统能否达到预期分辨率的最直接、最可靠的“金标准”, 是验证其是否能够真实地分辨出具有已知距离或已知几何形态的精细结构。

这类验证方法的核心在于使用标准样品, 其结构特征在纳米尺度上是先验已知的。通过成像系统能否清晰、准确地还原这些特征, 即可直接评判系统的分辨能力。常用的标准样品包括人工设计的结构、固定间距的生物学结构和可控间距的合成结构。人工设计的结构如商业化的分辨率测试靶(Argo-SIM, GATTA-BEADS等), 它们通常包含具有特定间距的荧光标记条纹或点阵; 固定间距的生物学结构如核孔复合物(nuclear pore complex, NPC)、网格蛋白小窝(clathrin-coated pits, CCP)、中心粒和联会复合体(synaptonemal complex, SC)等; 可控间距的合成结构如基于DNA的点积累纳米级形貌成像(DNA-based point accumulation for imaging in nanoscale topography, DNA-PAINT)技术结合DNA折纸术, 可以构建出任意可控间距的荧光分子阵列, 为分辨率验证提供了原子级精度的标尺^[54-56]。

这种“金标准”验证方法不仅适用于所有超分辨技术, 更重要的是, 它能揭示间接测量方法可能忽略的问题。例如, 一个图像可能有很高的FRC分辨率数值, 但在实际验证中却无法正确还原NPC的环状结构。这可能是因为定位精度虽高, 但标记密度不足, 或存在系统性的漂移、畸变。因此, 将间接的数学评估与直接的已知结构验证相结合, 是确保超分辨成像结果真实可靠的必要途径。

6 超分辨光学显微成像分辨率检测方法

超分辨光学显微技术突破了衍射极限的束缚, 其成像机理与传统光学显微镜存在本质差异, 导致传统分辨率检测方法与基于傅里叶变换的通用方法

难以直接适配^[57]。针对不同超分辨技术的特性, 研究者们开发了一系列专属的分辨率检测方法, 包括单分子定位显微镜、非线性调制显微镜等光学超分辨技术的分辨率检测方法。

6.1 单分子定位显微术 (SMLM) 分辨率检测方法

SMLM是超分辨成像技术的重要分支, 包括PALM、STORM、dSTORM (direct STORM) 等, 其核心原理是通过单分子的随机光激活与精确定位, 重建超分辨图像。需要明确的是, 在SMLM中, 单分子定位精度 (localization precision) 与最终重建图像的分辨率是两个不同层级的指标。定位精度反映了确定单个分子位置的不确定性, 而图像分辨率则描述了在考虑所有定位点及其空间分布后, 图像中可解析结构细节的能力, 后者同时受定位精度和标记密度的共同制约。针对单分子定位显微镜的特性, 分辨率检测方法需综合考虑定位精度、标记密度、样本结构等多因素^[6]。

6.1.1 FIRE方法

FIRE方法由Nieuwenhuizen等^[12]于2013年提出, 是基于FRC方法优化的SMLM专属分辨率检测方法, 综合考虑了单分子定位精度、标记密度与样本空间结构对分辨率的影响。

FIRE方法的核心步骤有4步。a. 数据分割: 将单分子定位数据随机分为两组, 保证两组数据的独立性; b. 图像重建: 基于两组定位数据分别重建两个2D/3D超分辨图像, 图像的像素尺寸需满足奈奎斯特采样准则; c. FRC系数计算: 对两个重建图像进行傅里叶变换, 计算不同空间频率圆环/球壳上的FRC系数, 得到FRC曲线; d. 分辨率确定: 采用0.143阈值作为FRC曲线的截止判据, 对应的空间频率即为截止空间频率, 分辨率为截止空间频率的倒数。

与传统FRC方法相比, FIRE方法的关键优化在于: a. 针对定位显微镜的单分子数据特性, 优化了数据分割策略, 确保两组数据的独立性与统计代表性; b. 引入了标记密度与定位精度的校正模型, 通过分析FRC曲线的形状的, 定量评估标记密度不足或定位精度有限对分辨率的影响; c. 可实现各向异性分辨率与局部分辨率的表征, 通过计算不同方向与局部子区域的FRC系数, 全面反映定位显微镜的成像性能。

FIRE方法的数学模型可表示为:

$$\langle FRC(q) \rangle = \frac{\sum_{q \in C(q)} (Q + N|\hat{\psi}(q)|^2) \exp(-4\pi^2\sigma^2q^2)}{\sum_{q \in C(q)} [2 + (Q + N|\hat{\psi}(q)|^2) \exp(-4\pi^2\sigma^2q^2)]} \quad (8)$$

其中, $\langle FRC(q) \rangle$ 为傅里叶环相关系数的期望值, 表征在空间频率 q 处两幅独立图像的相关性, 用于评估图像分辨率, $C(q)$ 傅里叶空间中半径为 q 的圆环区域, 用于收集该频率附近的所有像素点以计算平均相关, Q 为荧光分子闪烁导致的虚假相关参数, N 为单分子定位总数, $\hat{\psi}(q)$ 为荧光分子空间分布的傅里叶变换, σ 为单分子定位精度, q 为空间频率, 对应傅里叶空间中的径向坐标, $\exp(-4\pi^2\sigma^2q^2)$ 为由定位精度 σ 引起的衰减因子, 描述了高频信息的衰减, 源于定位误差导致的模糊效应。该模型定量描述了定位精度(σ)、标记密度(N)、分子闪烁(Q)对FRC系数的影响, 为分辨率检测结果的校正提供了理论基础。FIRE方法适用于各类定位显微镜的分辨率检测, 包括PALM、STORM、dSTORM等, 其检测结果与单分子定位精度、标记密度的理论预测高度一致, 是当前定位显微镜分辨率检测的主流方法。

6.1.2 定位精度结合标记密度的分辨率评估方法

SMLM的分辨率不仅取决于单分子定位精度, 还与荧光分子的标记密度密切相关: 即使定位精度很高, 若标记密度不足, 也无法准确还原样本的精细结构。基于单分子定位精度与标记密度的分辨率评估方法通过建立两者与分辨率的量化关系, 实现定位显微镜分辨率的快速评估^[58]。

单分子定位精度 σ 的计算通常基于Cramér-Rao下界 (Cramér-Rao lower bound, CRLB), 表达式为^[59]:

$$\sigma = \frac{\lambda}{2\pi NA \sqrt{N_{\text{photon}}}} \quad (9)$$

其中, N_{photon} 为单个荧光分子检测到的光子数。标记密度 ρ 定义为单位面积内的荧光分子数。对于连续样本, 标记密度需满足奈奎斯特采样准则, 即相邻标记分子的间距不超过分辨率的一半。

基于定位精度与标记密度的分辨率表达式为:

$$r = \frac{2\pi\sigma}{\sqrt{W(6\pi\rho\sigma^2)}} \quad (10)$$

其中, $W(\cdot)$ 为朗伯W函数 (Lambert W-function), 定义为函数 $x=y \exp(y)$ 的反函数。该表

达式定量描述了定位精度 σ 与标记密度 ρ 对分辨率的综合影响, 当标记密度较低时 ($\rho\sigma^2 < \epsilon/(6\pi) \approx 0.14$), 分辨率主要受标记密度限制, 当标记密度较高时 ($\rho\sigma^2 > 0.14$), 分辨率主要受定位精度限制。

这类方法的优势在于无需进行复杂的图像重建与傅里叶变换, 仅通过单分子定位精度与标记密度即可快速评估分辨率, 适用于定位显微镜的实时性能监测与实验参数优化^[60]。其局限性在于假设样本为连续均匀结构, 对于非均匀样本 (如生物组织中的离散结构) 误差较大, 需结合FIRE等方法进行校正。

6.2 非线性调制显微镜分辨率检测方法

非线性调制显微镜通过引入非线性光学效应 (如受激发射损耗、基态损耗等) 压缩PSF, 实现超分辨成像, 典型代表包括STED、基态损耗 (ground state depletion, GSD)、可逆饱和光学荧光跃迁 (reversible saturable optical fluorescence transitions, RESOLFT) 等^[4]。这类技术的分辨率主要取决于非线性调制效率与激光功率, 分辨率检测方法需结合PSF压缩程度与调制参数的量化关系。

6.2.1 基于PSF压缩的分辨率检测方法

STED显微镜的核心原理是通过一束中空环形的损耗激光, 将激发激光形成的PSF压缩至衍射极限以下, 其分辨率与损耗激光功率、荧光分子的受激发射截面密切相关^[61]。基于PSF压缩的分辨率检测方法通过分析压缩后PSF的宽度参数 (如FWHM) 量化分辨率。

具体步骤包括以下3步。a. PSF测量: 采用亚分辨率荧光微球作为样本, 通过STED显微镜成像获得压缩后的PSF; b. PSF拟合: 采用高斯函数或洛伦兹函数拟合PSF的强度分布, 计算其FWHM值; c. 分辨率计算: STED显微镜的分辨率表达式为:

$$r_{\text{STED}} = \frac{\lambda}{2NA \sqrt{1 + \frac{P_{\text{depletion}}}{P_{\text{saturation}}}}} \quad (11)$$

其中, $P_{\text{depletion}}$ 为损耗激光功率, $P_{\text{saturation}}$ 为荧光分子的受激发射饱和功率。通过测量不同 $P_{\text{depletion}}$ 下的PSF宽度, 结合上述公式可定量评估STED显微镜的分辨率, 以及损耗激光功率对分辨率的影响。这

类方法的优势在于直观反映PSF压缩效果, 适用于STED显微镜的功率优化与性能评估^[62]。尽管基于PSF压缩的FWHM测量法直观且常用, 但它主要反映的是光学系统在理想点源 (荧光微球) 下的潜在分辨能力, 即“系统分辨率”, 而非在实际生物样本中成像的“有效分辨率”。该方法存在若干固有局限: 首先, 它未充分考虑STED耗尽光斑中心零值点的完美程度, 任何对准偏差或像差都会导致PSF压缩不充分或旁瓣增强, 而FWHM值可能无法完全捕捉到这种复杂畸变对成像质量的影响。其次, 该方法忽略了成像过程中的光漂白效应。在高功率耗尽光的作用下, 荧光分子的光漂白加剧, 导致信噪比下降, 这会严重制约实际可解析的结构细节, 但静态的PSF测量无法反映这一动态过程。因此, PSF压缩法更适用于系统调试和性能标定的初级阶段, 对于评估真实生物学样本的成像质量, 需要结合其他方法 (如后文将提到的DA) 进行综合判断。

6.2.2 线宽/边缘扩展函数法

PSF压缩法仅反映系统对孤立点源的响应。在实际生物学应用中, 更为常见且直接的方法是测量已知生物结构成像后的表观宽度。例如, 对直径远小于衍射极限的细胞骨架纤维 (如微管) 进行STED成像, 通过高斯拟合获取其强度分布曲线的半高全宽 (FWHM), 即可直接估计该系统对该类样本的有效分辨率。类似地, 也可对细胞膜等锐利边缘的成像进行边缘扩展函数 (edge spread function, ESF) 分析, 进而求得线扩展函数 (line spread function, LSF) 的宽度。这类方法制备简单 (直接利用生物样本), 能更真实地反映技术在实际研究中的分辨能力, 因此是实验室内评估STED等非线性调制显微镜成像性能的最常用手段。相比之下, 基于调制传递函数 (modulation transfer function, MTF) 的方法, 由于其需要制备覆盖宽频率范围的特殊荧光结构样本, 操作复杂且与生物样本差异大, 在实际研究中应用较少^[25, 63]。

6.3 基于DA的无参数方法在多模态超分辨成像中的应用

基于DA的无参数方法因其仅需单张图像、无需人工阈值设定的独特优势, 已被成功应用于多种超分辨成像模态^[24, 32, 43]。该方法的核心在于通过分析图像傅里叶频谱的自相关衰减来客观确定截止

频率,从而避免了传统FRC/FIRE等方法对双数据集的依赖,以及PSF拟合法中模型选择的主观性。本节将分别阐述其在SMLM和STED中的具体应用特点。

6.3.1 在SMLM中的应用特点

在SMLM中,DA方法为重建后的超分辨图像提供了一种快速、客观的质量评估工具^[32]。其核心优势体现在以下3方面。a. 克服数据分割限制: SMLM数据常因分子定位数有限或闪烁行为导致无法分割成两个统计独立的子集, FIRE等方法在此类场景下失效。DA方法直接对单张重建图像进行分析,有效解决了这一问题。b. 重建算法普适性: DA方法不依赖于特定的重建算法,无论是传统的高斯渲染、直方图渲染,还是基于DL重建的图像,均可直接评估其有效分辨率。这一特性对于当前SMLM领域日益多样化的图像重建策略尤为重要。c. 指导渲染参数优化: 研究表明,同一组定位数据采用不同的渲染方式(如像素尺寸、归一化策略等)会显著影响最终图像的分辨率。DA方法可实时反馈不同渲染参数下的分辨率变化,帮助用户在图像平滑度和细节保真度之间找到最佳平衡点。

6.3.2 在STED中的应用特点

对于STED等非线性调制显微镜, DA方法展现出了超越传统校准样品评估的实用价值,特别适合于实际生物样本的成像质量监控^[43]。其核心优势体现在以下3方面。a. 样本普适性与真实性: 传统方法(如PSF压缩法、MTF法)依赖于亚分辨率荧光微球或光栅等校准样品,无法反映实际生物样本中因标记密度、光学像差和光漂白等因素造成的真实有效分辨率。DA方法可直接对染色的细胞、组织等复杂样本图像进行分析,其结果更贴近实际实验条件下的成像性能。b. 动态参数优化: DA方法的计算高效性使其能够作为实时质量监测工具。例如,在调整STED损耗激光功率、优化光束对准或调节时间门控参数时,研究人员可以即时看到分辨率的变化趋势,从而快速锁定最佳实验条件。这种能力对于需要精细调校的STED实验尤为关键,有助于在提升分辨率的同时,避免因过度曝光导致的光毒性和样品损伤。c. 揭示非线性分辨率行为: 通过DA方法可以定量揭示STED分辨率的

非线性特性——随着损耗激光功率增加,分辨率先迅速提升,随后因信噪比恶化而趋于饱和甚至下降。这种评估结果对于指导功率选择和系统优化具有直接参考价值。

6.4 基于深度学习(DL)的分辨率与质量评估

随着DL在显微成像领域的普及,基于数据驱动分辨率评估正逐渐发展为超分辨成像质量评价的新范式。不同于传统基于物理模型的方法(如FRC、FIRE或去相关分析), DL方法能够从海量数据中自主挖掘和学习高维特征,为解决超分辨成像中缺乏绝对“真值(ground truth)”的难题提供了全新思路^[14, 64]。

6.4.1 DL作为超分辨重建工具带来的新挑战

DL技术推动了SMLM、探头式共聚焦激光显微内镜(probe-based confocal laser endomicroscopy, pCLE)等多种显微成像技术进入高密度、高时间分辨率成像的新阶段。例如, Deep-STORM等方法使得从高密度、低信噪比的原始数据中直接重建超分辨图像成为可能,而Meng等^[65]提出的基于广义退化对抗学习的无监督超分辨框架,无需高分辨率pCLE参考图像即可显著提升图像质量,有效解决了临床pCLE成像中因光纤束物理限制导致的分辨率不足问题。然而,这类基于DL的重建结果往往缺乏物理模型的有效约束,可能产生“幻觉”(hallucination)或伪影,即生成在原始数据中不存在但看似合理的高频细节。

6.4.2 DL在分辨率与质量评估中的应用范式

针对上述挑战,研究者开发了多种基于DL的分辨率与质量评估策略。

a. 隐式质量评估: Lohr等^[64]综述了DL在荧光显微镜图像恢复中的应用,指出结构相似性指标(structural similarity index measure, SSIM)、峰值SNR、灰度共生矩阵(gray-level co-occurrence matrix, GLCM)和等效视数(equivalent number of looks, ENL)等被广泛用于评估重建图像的结构保真度和噪声抑制效果。Xu等^[66]开发了基于光谱-光谱去噪的DL框架,不仅提升了多色SMLM图像的信噪比,还通过SSIM的优化实现了对成像质量的隐式评估。Meng等^[65]在pCLE图像超分辨研究中,通过整合SSIM、全局对比度因子提升量、感知图像块相似度等多维度指标,构建了综合评分

体系,有效平衡了结构相似性与对比度提升的评估需求。这些研究为超分辨图像的定量评估建立了可比较的基准。

b. 无真值条件下的解析度推断: 针对超分辨成像缺乏绝对“真值”的根本性难题, Nabi等^[14]提出了基于弱监督学习的人工智能(artificial intelligence, AI)分析范式,能够在无金标准参考的情况下,通过潜在空间的特征映射来推断生物结构的解析度。这种方法的核心思想是利用大量同类样本的统计特性,通过学习图像特征在潜在空间中的分布规律,自动识别那些与生物结构固有特征不一致的伪影或分辨率不足区域。与此思路相呼应的是,在无监督超分辨领域, Meng等^[65]开发了基于退化模型对抗学习的方法,通过分布假设模块(DAM)随机生成光纤位置,模拟pCLE成像原理构建伪低分辨率-高分辨率图像对,无需真实高分辨率参考即可实现图像质量评估。Zhao等^[67]进一步提出了基于历史增强对比度元学习的无监督盲超分辨框架,通过对比学习机制在没有真实值的情况下诱导模型收敛。

c. 置信度图生成与物理模型融合: Mazidi等^[68]开发的 Wasserstein 诱导通量 (Wasserstein-

induced flux, WIF) 方法提供了一种全新的分辨率可信度评估思路。该方法直接评估成像系统本身的光学模型(如PSF)与原始数据之间的一致性,生成像素级的置信度图(confidence map),直观显示图像中哪些区域可信度高、哪些区域可能存在伪影^[13]。类似地, Li等^[69]提出的 Richardson-Lucy 网络(RLN)将传统去卷积算法的迭代步骤与神经网络层相结合,通过算法展开(algorithm unrolling)实现了物理可解释性与数据驱动学习的融合,提升了评估结果的可靠性。Meng等^[65]在消融实验中通过对比真实光纤位置退化模块、下采样退化模块与所提分布假设模块的性能差异,验证了物理模型约束对减少伪影、提升评估可信度的重要性。这些“物理模型+数据驱动”的混合范式为深度学习时代的超分辨图像质量评估开辟了新路径。

6.5 超分辨率检测方法对比与适配规律

不同超分辨技术的成像机理差异显著,对应的分辨率检测方法也各有侧重。表3总结了各类超分辨技术的专属分辨率检测方法、核心原理、优势与适用场景。

Table 3 Comparison of super-resolution optical microscopy resolution detection methods

表3 超分辨光学显微成像分辨率检测方法对比

超分辨技术	专属检测方法	核心原理	优势	适用场景
PALM/STORM ^[12]	傅里叶图像分辨率方法	基于傅里叶环相关, 综合定位精度与标记密度	客观定量、抗噪性强、可表征各向异性的分辨率	2D/3D单分子定位成像
PALM/STORM ^[58, 60]	定位精度+标记密度法	基于Cramér-Rao下界定位精度与奈奎斯特标记密度	快速评估、适用于实时参数优化	定位显微镜实验参数优化
STED/GSD ^[61-62]	点扩散函数压缩法	分析亚分辨率荧光珠成像的PSF半高全宽	直观反映系统PSF压缩效果, 便于硬件调试	系统分辨率的初始标定与功率优化
STED/GSD ^[25, 63]	线宽/边缘扩展函数法	测量已知结构(如微管、膜边缘)成像的表现宽度	样本制备简单, 直接评估生物样本中的有效分辨率, 实验中最常用	评估实际生物样本成像质量、验证成像效果

STED/GSD: 受激发射损耗/基态损耗 (stimulated emission depletion/ground state depletion); PALM/STORM: 光敏定位显微术/随机光学重构显微术 (photo-activated localization microscopy/stochastic optical reconstruction microscopy)。

超分辨分辨率检测方法的适配规律可归纳为:
a. 定位显微镜优先采用FIRE方法, 结合定位精度和标记密度法进行快速评估与参数优化; b. 非线性

调制显微镜采用PSF压缩法和线宽/边缘扩展函数法; c. 各向异性分辨率与局部分辨率表征需采用多方向/多尺度FRC/FSC方法(图2)。

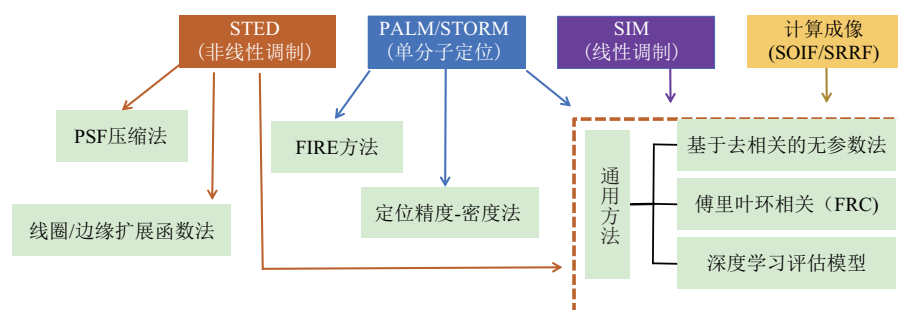


Fig. 2 Super-resolution imaging technology and adaptive resolution detection methods

图2 超分辨成像技术与适配分辨率检测方法

STED: 受激发射损耗 (stimulated emission depletion); PALM/STORM: 光敏定位显微术/随机光学重构显微术 (photo-activated localization microscopy/stochastic optical reconstruction microscopy); SIM: 结构光照明显微术 (structured illumination microscopy); SOIF/SRRF: 超分辨光学涨落成像/超分辨径向涨落 (super-resolution optical fluctuation imaging/super-resolution radial fluctuations); PSF: 点扩散函数 (point spread function); FIRE: 傅里叶图像分辨率 (Fourier image resolution)。

7 挑战与展望

尽管光学显微成像分辨率检测方法已取得显著进展,但在超分辨成像技术的快速发展与复杂样本的广泛应用中,仍面临一系列挑战。**a. 多模态成像分辨率统一量化:**不同成像技术(如光学显微术、电子显微术、原子力显微术)的分辨率定义与检测方法差异显著,难以实现跨模态成像分辨率的直接对比。**b. 动态成像实时分辨率检测:**传统分辨率检测方法(如FRC、FIRE)需离线处理多组数据,无法满足动态超分辨成像(如活细胞实时成像)的实时分辨率监测需求。**c. 复杂生物样本的分辨率表征:**生物样本(如细胞组织、生物大分子复合物等)通常具有非均匀性、各向异性、动态性等特征,现有方法难以全面表征其局部分辨率与动态分辨率变化。**d. 超分辨技术的固有误差校正:**不同超分辨技术存在专属的固有误差(如PALM的定位偏差、STED的光毒性导致的样本变形等),现有方法缺乏针对性的校正模型。**e. 计算复杂度与效率平衡:**高精度检测方法(如NLOO、多尺度FRC)通常计算复杂度较高,难以适用于大尺寸图像与高通量成像数据的快速检测。**f. AI方法的可靠性与可解释性挑战:**随着DL在超分辨成像中的广泛应用,基于数据驱动的图像增强和重建算法(如反卷积、生成对抗网络(generative adversarial network, GAN)、扩散模型等)在提升图像分辨率和SNR方面展现出巨大潜力。然而,这类方法也带来了全新的挑战。首先,算法可能产生“幻觉”或“伪影”。

例如,反卷积算法若使用过小或不准确的PSF模型,可能将噪声或平滑区域错误地锐化为分离的结构,而基于GANs的生成模型,即使输入随机噪声或模糊图像,也能“无中生有”地生成细节丰富、视觉上真实的图像,但这些细节并非源于真实的生物物理信号,而是网络从训练数据中习得的统计先验。其次,这类方法生成的高分辨率图像,在现有的分辨率评估指标(如FRC、DA)上可能表现优异,因为图像本身具有丰富的高频信息,但这些信息未必反映真实的样本结构,导致“指标假象”。

针对当前挑战,未来光学显微图像分辨率检测方法的发展趋势将集中在以下方向。**a. 跨模态分辨率统一标准建立:**基于物理本质(如最小可分辨距离)与统计理论,建立跨模态成像分辨率的统一量化标准,实现光学显微镜、电子显微镜、原子力显微镜等技术的分辨率直接对比。**b. 实时动态分辨率检测算法:**开发基于DL的实时分辨率检测算法,通过训练神经网络直接从单幅动态图像中预测分辨率,满足活细胞实时超分辨成像的监测需求。最新的研究已开始尝试利用生成对抗网络(GAN)和扩散模型(diffusion models)进行图像增强的同时输出置信度图,从而实现像素级的局部分辨率预测^[70],但需确保AI增强图像中细节的物理保真度和生物学真实性,建立能够检测和量化“算法幻觉”的新评估标准,并增强深度模型的“可解释性”,让研究者理解图像细节的生成依据。**c. 多维度分辨率表征技术:**结合空间、时间、光谱等多维度信息,开发多维度分辨率表征方法,实现各向异

性分辨率、局部分辨率、动态分辨率的同步量化。
d. 超分辨固有误差智能校正: 利用机器学习算法学习不同超分辨技术的固有误差模式, 建立自适应校正模型, 提高复杂场景下的分辨率检测精度。
e. 高效轻量化检测方法: 通过算法优化(如快速傅里叶变换、稀疏采样等)与硬件加速(如图形处理器、现场可编程门阵列), 降低高精度检测方法的计算复杂度, 实现大尺寸、高通量图像的快速检测。
f. 标准化工具与数据库建设: 建立分辨率检测的标准化软件工具(如 ImageJ 插件、Python 库等)与标准样本数据库, 推动不同实验室间检测结果的可比性与重复性。

8 结 论

光学显微图像分辨率检测方法的发展与光学显微技术的演进密切相关, 从传统基于经验判据的瑞利准则、斯派罗准则, 到基于傅里叶变换的 FRC、FSC 方法, 再到针对超分辨技术优化的 FIRE、NLOO 以及基于 DA 的无参数分辨率检测等方法, 分辨率检测的精度、客观性与适用性不断提升。本文系统综述了各类分辨率检测方法的理论基础、实验实现、性能对比与应用场景, 重点分析了超分辨成像技术对分辨率检测方法的特殊需求与创新突破。

研究表明: 传统经验判据法适用于常规光学显微镜的快速质量评估, 但无法适配超分辨成像; 基于傅里叶变换的 FRC、FSC 方法具有客观定量、抗噪性强等优势, 是通用分辨率检测的主流技术; 针对超分辨技术的专属方法(如 FIRE、NLOO)通过结合成像机理的专属优化, 显著提高了检测精度与适用性。特别值得指出的是, 基于 DA 的无参数方法代表了分辨率评估的一个重要发展方向。它通过分析单幅图像的频谱特性, 实现了无需用户设定阈值、无需多幅图像或数据分割的客观评估, 极大地简化了操作流程并增强了结果的可比性, 为超分辨显微镜的日常性能监控和实时参数优化提供了强大工具。

在实际应用中, 需根据光学系统类型、样本特性、成像参数与检测需求选择合适的方法, 实现分辨率的精准量化。未来, 随着超分辨成像技术的不断创新与复杂样本应用的日益广泛, 分辨率检测方法将向跨模态统一标准、实时动态检测、多维度表征、智能误差校正等方向发展, 特别需要强调的是, 面对人工智能在超分辨成像领域的广泛应用,

未来分辨率检测方法不仅要评估图像的分辨率高低, 更需肩负起验证图像细节真实性的重任, 发展能够识别“算法伪影”、量化生成信息可靠度的新工具。只有这样, 才能确保人工智能真正成为推动生物学发现的有力助手, 而非制造“虚假真实”的干扰源, 从而为微观世界的精准探索提供既“锐利”又“真实”的方法论支撑。

参 考 文 献

- [1] Wang Y, Zhang X, Xu J, *et al.* The development of microscopic imaging technology and its application in micro- and nanotechnology. *Front Chem*, 2022, **10**: 931169
- [2] Abbe E. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung. *Archiv F Mikrosk Anatomie*, 1873, **9**(1): 413-468
- [3] Rayleigh. XXXI. Investigations in optics, with special reference to the spectroscope. *Lond Edinb Dublin Philos Mag J Sci*, 1879, **8**(49): 261-274
- [4] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett*, 1994, **19**(11): 780-782
- [5] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 2006, **313**(5793): 1642-1645
- [6] Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods*, 2006, **3**(10): 793-795
- [7] Gustafsson M G. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(37): 13081-13086
- [8] Dertinger T, Colyer R, Iyer G, *et al.* Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(52): 22287-22292
- [9] Gustafsson N, Culley S, Ashdown G, *et al.* Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations. *Nat Commun*, 2016, **7**: 12471
- [10] Moosmayer T, Kiszka K A, Westphal V, *et al.* MINFLUX fluorescence nanoscopy in biological tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2024, **121**(52): e2422020121
- [11] Scheiderer L, Marin Z, Ries J. MINFLUX achieves molecular resolution with minimal photons. *Nat Photonics*, 2025, **19**(3): 238-247
- [12] Nieuwenhuizen R P, Lidke K A, Bates M, *et al.* Measuring image resolution in optical nanoscopy. *Nat Methods*, 2013, **10**(6): 557-562
- [13] Liu S, Hoess P, Ries J. Super-resolution microscopy for structural cell biology. *Annu Rev Biophys*, 2022, **51**: 301-326
- [14] Nabi I R, Cardoen B, Khater I M, *et al.* AI analysis of super-resolution microscopy: biological discovery in the absence of ground truth. *J Cell Biol*, 2024, **223**(8): e202311073

- [15] Woodhams B, Uhlmann V. From images to understanding: advances in deep learning for cellular dynamics analysis. *Curr Opin Cell Biol*, 2025, **97**: 102585
- [16] Zhao W, Huang X, Yang J, *et al.* Quantitatively mapping local quality of super-resolution microscopy by rolling Fourier ring correlation. *Light Sci Appl*, 2023, **12**(1): 298
- [17] Sparrow C M. On spectroscopic resolving power. *ApJ*, 1916, **44**: 76
- [18] Unser M, Trus B L, Steven A C. A new resolution criterion based on spectral signal-to-noise ratios. *Ultramicroscopy*, 1987, **23**(1): 39-51
- [19] Van Heel M. Similarity measures between images. *Ultramicroscopy*, 1987, **21**(1): 95-100
- [20] Harauz G, van Heel M. Exact filters for general geometry three dimensional reconstruction. *Optik*, 1986, **73**: 146-156
- [21] Saxton W O, Baumeister W. The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein. *J Microsc*, 1982, **127**(Pt 2): 127-138
- [22] Nieuwenhuizen R P J, Stallinga S, Rieger B. Image resolution in optical nanoscopy. *Nanoimaging Nanospectroscopy*, 2013, **8815**: 881508
- [23] Cardone G, Grünwald K, Steven A C. A resolution criterion for electron tomography based on cross-validation. *J Struct Biol*, 2005, **151**(2): 117-129
- [24] Descieux A, Grußmayer K S, Radenovic A. Parameter-free image resolution estimation based on decorrelation analysis. *Nat Methods*, 2019, **16**(9): 918-924
- [25] Tortarolo G, Castello M, Diaspro A, *et al.* Evaluating image resolution in stimulated emission depletion microscopy. *Optica*, 2018, **5**(1): 32
- [26] Speiser A, Müller L R, Hoess P, *et al.* Deep learning enables fast and dense single-molecule localization with high accuracy. *Nat Methods*, 2021, **18**(9): 1082-1090
- [27] Serag M F, Abadi M, Al-Zarah H, *et al.* Deep learning and single-molecule localization microscopy reveal nanoscopic dynamics of DNA entanglement loci. *ACS Nano*, 2025, **19**(6): 6236-6249
- [28] Steves M A, Xu K. Mapping super-resolution image quality. *Light Sci Appl*, 2024, **13**: 39
- [29] Li M, Huang Z L. Rethinking resolution estimation in fluorescence microscopy: from theoretical resolution criteria to super-resolution microscopy. *Sci China Life Sci*, 2020, **63**(12): 1776-1785
- [30] Huang B, Wang W, Bates M, *et al.* Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, 2008, **319**(5864): 810-813
- [31] Cole R W, Jinadasa T, Brown C M. Measuring and interpreting point spread functions to determine confocal microscope resolution and ensure quality control. *Nat Protoc*, 2011, **6**(12): 1929-1941
- [32] Descieux A C, Grußmayer K S, Radenovic A. Parameter-free rendering of single-molecule localization microscopy data for parameter-free resolution estimation. *Commun Biol*, 2021, **4**(1): 550
- [33] Pawley J B. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 3rd. New York, NY: Springer, 2006
- [34] Zhang B, Zerubia J, Olivo-Marin J C. Gaussian approximations of fluorescence microscope point-spread function models. *Appl Opt*, 2007, **46**(10): 1819-1829
- [35] Demmerle J, Wegel E, Schermelleh L, *et al.* Assessing resolution in super-resolution imaging. *Methods*, 2015, **88**: 3-10
- [36] Schermelleh L, Ferrand A, Huser T, *et al.* Super-resolution microscopy demystified. *Nat Cell Biol*, 2019, **21**(1): 72-84
- [37] Liu S, Chen J, Hellgoth J, *et al.* Universal inverse modelling of point spread functions for SMLM localization and microscope characterization. *bioRxiv*, 2023: 2023.10.26.564064
- [38] Liu Y, Eleftheriades G V. Numerical super-oscillatory filtering for sub-diffraction optical imaging. *Opt Lett*, 2025, **50**(23): 7356-7359
- [39] Suresh S A, Vyas S, Yeh J A, *et al.* Retaining spatial resolution multifocal confocal fluorescence microscopy with deep learning. *Opt Express*, 2025, **33**(6): 12288-12303
- [40] Lin H, Seitz S, Tan Y, *et al.* Label-free nanoscopy of cell metabolism by ultrasensitive reweighted visible stimulated Raman scattering. *Nat Methods*, 2025, **22**(5): 1040-1050
- [41] Sondur S, Svenberg H E A, Johansson A, *et al.* Simulating dynamic image formation in a transmission electron microscope with a proposed electron beam phase plate. *Micron*, 2025, **196/197**: 103862
- [42] Lowerison M R, Wang Y, Lin B Z, *et al.* Comparison of high-frequency ultrasound transducers for microvascular localization microscopy in the mouse brain. *Imaging Neurosci (Camb)*, 2025, **3**: IMAG.a.151
- [43] Fang S, Liu L, Yang D, *et al.* Resolution assessment of super-resolution microscopy imaging: structural and technical dependencies for cell biology. *Cytotechnology*, 2025, **77**(5): 170
- [44] Verbeke E J, Gilles M A, Bendory T, *et al.* Self Fourier shell correlation: properties and application to cryo-ET. *Commun Biol*, 2024, **7**(1): 101
- [45] Rosenthal P B, Henderson R. Optimal determination of particle orientation, absolute hand, and contrast loss in single-particle electron cryomicroscopy. *J Mol Biol*, 2003, **333**(4): 721-745
- [46] van Heel M, Schatz M. Fourier shell correlation threshold criteria. *J Struct Biol*, 2005, **151**(3): 250-262
- [47] Rieger B, Droste I, Gerritsma F, *et al.* Single image Fourier ring correlation. *Opt Express*, 2024, **32**(12): 21767-21782
- [48] Liao H Y, Frank J. Definition and estimation of resolution in single-particle reconstructions. *Structure*, 2010, **18**(7): 768-775
- [49] van Heel M, Gowen B, Matadeen R, *et al.* Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution. *Q Rev Biophys*, 2000, **33**(4): 307-369
- [50] Koho S, Tortarolo G, Castello M, *et al.* Fourier ring correlation simplifies image restoration in fluorescence microscopy. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 3103
- [51] Culley S, Tosheva K L, Matos Pereira P, *et al.* SRRF: universal live-cell super-resolution microscopy. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, **101**: 74-79

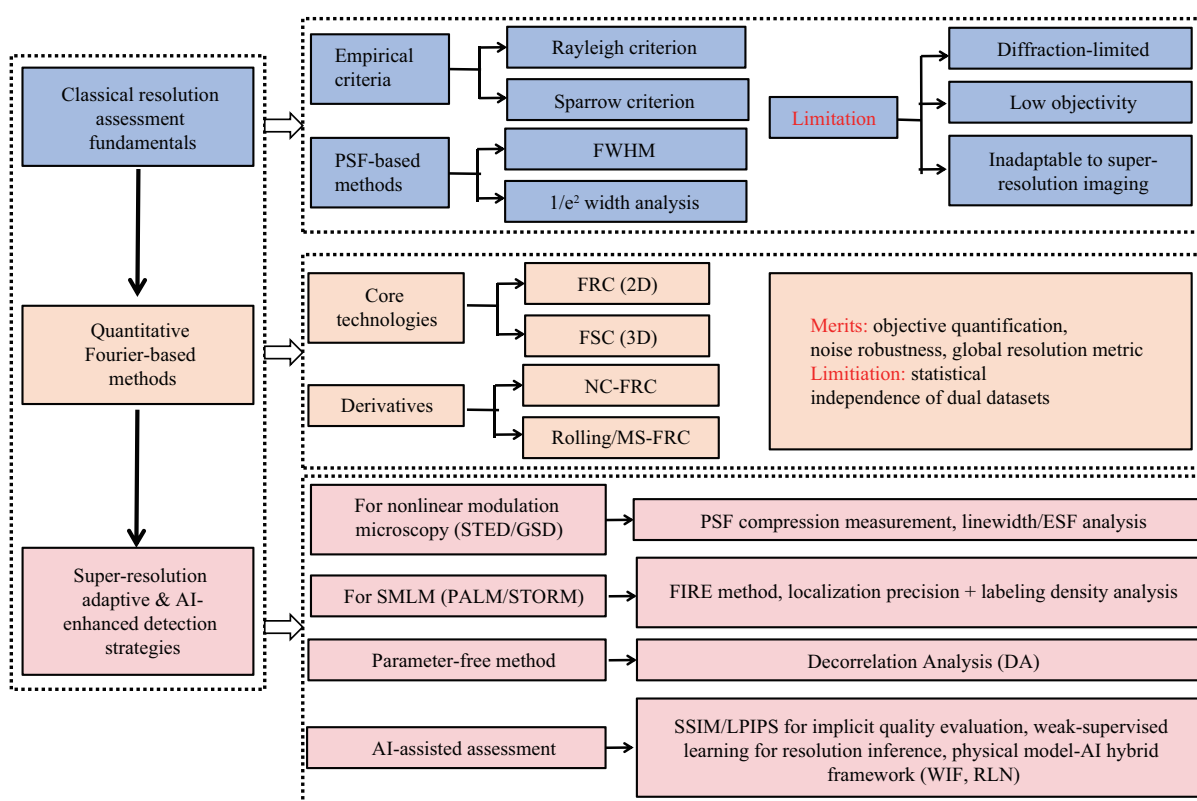
- [52] Jeon H J, Qureshi M M, Lee S Y, *et al.* Optofluidic laser speckle image decorrelation analysis for the assessment of red blood cell storage. PLoS One, 2019, **14**(10): e0224036
- [53] Wang Y, Wang Y, Akansu A, *et al.* Robust motion tracking based on adaptive speckle decorrelation analysis of OCT signal. Biomed Opt Express, 2015, **6**(11): 4302-4316
- [54] Schmied J J, Gietl A, Holzmeister P, *et al.* Fluorescence and super-resolution standards based on DNA origami. Nat Methods, 2012, **9**(12): 1133-1134
- [55] Dai M, Jungmann R, Yin P. Optical imaging of individual biomolecules in densely packed clusters. Nat Nanotechnol, 2016, **11**(9): 798-807
- [56] Zhao W, Zhao S, Li L, *et al.* Sparse deconvolution improves the resolution of live-cell super-resolution fluorescence microscopy. Nat Biotechnol, 2022, **40**(4): 606-617
- [57] Huang B, Bates M, Zhuang X. Super-resolution fluorescence microscopy. Annu Rev Biochem, 2009, **78**: 993-1016
- [58] Mukamel E A, Schnitzer M J. Unified resolution bounds for conventional and stochastic localization fluorescence microscopy. Phys Rev Lett, 2012, **109**(16): 168102
- [59] Thompson R E, Larson D R, Webb W W. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. Biophys J, 2002, **82**(5): 2775-2783
- [60] Sage D, Kirshner H, Pengo T, *et al.* Quantitative evaluation of software packages for single-molecule localization microscopy. Nat Methods, 2015, **12**(8): 717-724
- [61] Westphal V, Hell S W. Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope. Phys Rev Lett, 2005, **94**(14): 143903
- [62] Harke B, Keller J, Ullal C K, *et al.* Resolution scaling in STED microscopy. Opt Express, 2008, **16**(6): 4154-4162
- [63] Bewersdorf J, Schmidt R, Hell S W. Comparison of I5M and 4Pi-microscopy. J Microsc, 2006, **222**(Pt 2): 105-117
- [64] Lohr D, Meyer L, Woelk L M, *et al.* Deep learning-based image restoration and super-resolution for fluorescence microscopy: overview and resources//Diercks B P. T Cell Activation: Methods and Protocols. New York: Springer, 2025: 2904
- [65] Meng L, Li Y, Zheng Y, *et al.* Generalized degradation-based adversarial learning for unsupervised super-resolution of endomicroscopy images. Comput Methods Programs Biomed, 2025, **270**: 108914
- [66] Xu D, Gu Y, Lu J, *et al.* Deep-learning-assisted spectroscopic single-molecule localization microscopy based on spectrum-to-spectrum denoising. Nanoscale, 2024, **16**(11): 5729-5736
- [67] Zhao H J, Lu J, Jiang Y, *et al.* History-augmented contrastive learning with soft mixture of experts for blind super-resolution of planetary remote sensing images. arXiv, 2025. DOI: 10.48550/arXiv.2511.20045
- [68] Mazidi H, Ding T, Nehorai A, *et al.* Quantifying accuracy and heterogeneity in single-molecule super-resolution microscopy. Nat Commun, 2020, **11**(1): 6353
- [69] Li Y, Su Y, Guo M, *et al.* Incorporating the image formation process into deep learning improves network performance. Nat Methods, 2022, **19**(11): 1427-1437
- [70] Dutta D, Sonowal N, Barauh R, *et al.* Recent advancements in microscopy image enhancement using deep learning: a survey// IEEE. 2024 IEEE International Conference on Computer Vision and Machine Intelligence (CVMI). Prayagraj, India: IEEE, 2024: 1-7

Resolution Assessment in Super-resolution Optical Microscopy: Adaptive Methods and Recent Advances*

FANG San-Hua**, CHEN Jing-Yao, YANG Dan, LIU Li

(Core Facilities, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

Graphical abstract



Abstract Optical microscopy is essential for exploring biological and material structures, with resolution determining the level of observable detail. The advent of super-resolution fluorescence microscopy has broken the diffraction limit, achieving nanoscale resolution. However, traditional assessment methods, such as the Rayleigh criterion and point spread function (PSF) width measurement, rely on empirical judgments and diffraction-limited models, rendering them inadequate for modern super-resolution imaging. This review systematically traces the evolution of resolution assessment methodologies, from classical criteria to advanced strategies tailored for

* This work was supported by grants from the Zhejiang University Instrument Development and Cultivation Program (YQZX-C202412) and the Zhejiang Province Basic Public Welfare Program (LGC19H090001) .

** Corresponding author.

Tel: 86-571-88206765, E-mail: fshfbzxhq@zju.edu.cn

Received: December 9, 2025 Accepted: March 5, 2026

various super-resolution modalities. We first discuss Fourier-based quantitative methods. Fourier ring correlation (FRC) and its 3D counterpart, Fourier shell correlation (FSC), objectively determine resolution by evaluating the statistical correlation of two independent image reconstructions in frequency space. These methods offer robustness against noise and provide a global resolution metric, but they require data independence and are computationally intensive. They have become the prevailing standards in electron and super-resolution microscopy. Subsequently, we examine adaptations for specific super-resolution techniques. For single-molecule localization microscopy (SMLM) techniques such as PALM and STORM, the Fourier image resolution (FIRE) method extends FRC by incorporating a physical model that accounts for localization precision and labeling density. For stimulated emission depletion (STED) microscopy and other nonlinear techniques, assessment strategies differ. While PSF shrinkage measurements using fluorescent beads are useful for system calibration, evaluating the effective resolution directly on biological samples is more practical. This is typically performed *via* linewidth analysis of known structures (*e.g.*, microtubules) or edge-spread function measurements, capturing the effects of photobleaching and sample-induced aberrations. A major paradigm shift is parameter-free resolution estimation based on decorrelation analysis. This method analyzes the autocorrelation decay of a single image's Fourier spectrum to identify the cutoff spatial frequency without requiring dual datasets or user-defined thresholds. Its high efficiency and broad applicability have been validated across widefield, confocal, STED, SIM, and SMLM modalities. Optimized rendering strategies for SMLM data further enhance its accuracy, and it is emerging as a tool for real-time optimization of experimental parameters. The review also addresses the “gold standard” of resolution validation using well-defined nanostructures, such as DNA origami and nuclear pore complexes, which provide ground truth for verifying resolution claims and detecting artifacts. In the era of artificial intelligence, deep learning plays a dual role: it powerfully enhances image resolution but also introduces challenges, as models may generate “hallucinations” or false details. This underscores the need for new validation metrics to verify the physical fidelity of AI-generated content. Finally, we outline future directions: developing unified cross-modality standards, enabling real-time dynamic resolution monitoring for live-cell imaging, creating techniques for generating local resolution maps to capture sample heterogeneity, and integrating intelligent error correction to ensure data veracity. By providing a comprehensive overview of resolution assessment progress and challenges, this review aims to equip researchers with the knowledge to select appropriate tools, thereby fostering rigorous quantitative imaging in the life and material sciences.

Key words optical microscopy, resolution assessment, super-resolution imaging, Fourier ring correlation (FRC), decorrelation analysis

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0540

CSTR: 32369.14.pibb.20250540