有限光子数荧光显微术的统计分辨率度量作者： Yilun Li[1], Fang Huang[1,2,3]*

所属机构:

[1]普渡大学韦尔登生物医学工程学院，美国印第安纳州西拉斐特[2]普渡大学整合神经科学研究所，美国印第安纳州西拉斐特[3]普渡大学炎症、免疫学与传染病研究所，美国印第安纳州西拉斐特

*通讯作者。电子邮件：fanghuang@purdue.edu

摘要：恩斯特·阿贝于1873年首次发现，远场显微镜的分辨率极限被认为由数值孔径和光波长决定，约为$\frac{\lambda}{2NA}$。随着过去一个世纪现代荧光显微术和纳米显微成像方法的发展，人们认识到，仅凭阿贝分辨率定义无法充分表征显微镜系统的分辨能力。要确定荧光显微镜的实际分辨率，光子噪声仍是基于统计学的理论框架中有待纳入的一个关键因素。共聚焦等技术可通过权衡光子噪声来获得其分辨率极限，这可能提高或降低对荧光标记目标的可分辨性。作为一种用于衡量有限光子数下荧光显微镜分辨能力的理论度量，我们在同时考虑衍射极限和光子统计的情况下，对荧光显微镜系统中周期结构的可分辨性进行量化。利用参数化目标的克拉美–罗下界，所得精度下界为各种现代荧光显微成像方法在噪声存在时的理论分辨能力提供了一种实际度量。

一句话总结：只有在考虑无限光子数时，远场荧光显微镜的分辨能力才由其衍射极限决定。然而，要确定样品的可分辨性，光子噪声仍是一个有待纳入统计考量的重要因素。我们提出了一种基于信息的分辨率度量，用于量化

有限光子数条件下荧光显微镜的理论分辨能力。所开发的方法能够量化各种荧光显微成像模式和超分辨显微术的实际分辨率极限；此外，它还可用于显微镜研发，预测显微镜设计在不同光子水平下可实现的分辨率。

引言

1873年，阿贝发表的研究指出，显微成像分辨率仅取决于数值孔径和光的波长（1, 2），这一论断后来得到了理论验证（3, 4）。对于传统显微镜而言，这一极限通常已足够；传统显微镜将透射光、反射光或散射光收集为信号（5），并可通过调节照明功率提高信噪比。然而，对于荧光显微镜，单个荧光探针产生的光子是分子信息的唯一来源，而受荧光团的光漂白和光化学环境影响，光子数量有限（6, 7）。

由于光具有离散性，光子计数噪声不可避免地服从泊松分布，检测到的光子数量越少，信噪比就越低。因此，在光子水平较低时，很难判断捕获到的强度差异究竟来自底层结构还是噪声波动，从而使显微成像方法无法达到理论分辨率极限（8–12）。

为了寻求一种实用的分辨率度量，研究人员尝试基于香农信息论中的信道容量（13）创建一种度量，其中可以纳入噪声（14–17）。其基本理念是，显微镜系统的信道容量反映了其分辨能力，并可根据噪声水平和系统配置计算得出。尽管这些研究揭示了显微镜信道容量与信噪比（SNR）、数值孔径等之间的理论关系，但要实现高分辨率，还需要特定的信息编码解码方案。此外，这些研究假设噪声是（频率）带限的，而光子噪声并不满足这一假设。

另一种量化噪声对分辨率影响的方法，是直接评估含噪图像（8, 9）。例如，Stelzer（8）通过量化两个间距很近的点物体之间的对比度，探讨了噪声对共聚焦和宽场系统实际分辨率的影响。这项工作是最早展示噪声存在时的实际可分辨性与阿贝分辨率极限之间存在关键差异的研究之一。然而，这些经验方法依赖于现有的显微成像数据和严格控制的样品。迄今为止，仍缺少一种纳入光子统计的理论分辨率度量。

在此，我们提出一种定量的理论度量，用于评估显微镜的分辨能力，并将数值孔径、发射波长和光子统计纳入考量。具体而言，我们将光栅的相位估计精度作为成像系统分辨能力的度量。基于可调节的可达到的精度下界判据，我们定义了基于信息的分辨率（IbR），并用其评估和区分多种常规及超分辨成像方式之间显著的分辨能力差异，包括宽场显微镜、共聚焦显微术（18, 19）、结构光照明显微术（SIM）（20, 21）和图像扫描显微术（ISM）（22–24）。我们预计，IbR 将成为估算考虑噪声的分辨率的有用度量，为新开发或拟议成像方式的设计提供指导并进行验证。

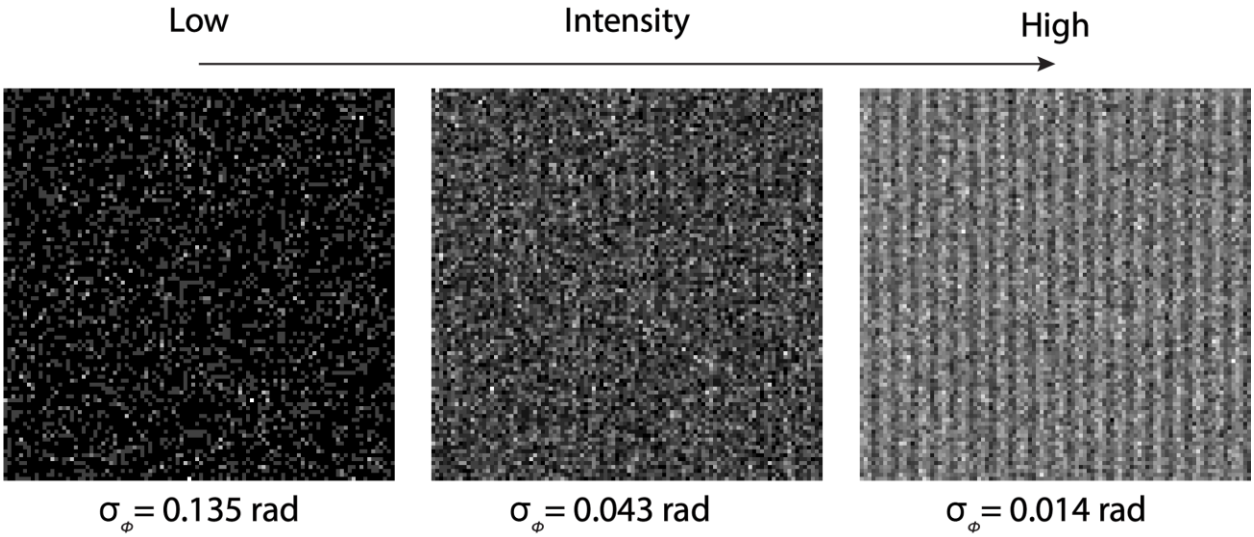


图 1. 噪声对单频正弦波光栅物体可分辨性的影响示意图。这里将 σ_ϕ 意义上的可分辨性视为该宽场系统的分辨能力。在该宽场系统中，模拟了不同强度下的含噪图像。物体的频率为 $1.\frac{6NA}{\lambda}$ 。从左到右，各图的光子密度分别为 500 光子/μm², 5000 光子/μm², 和 50,000 光子/μm²。σ_ϕ 为正弦物体的相位估计精度极限。图像模拟条件如下：视场（FOV）为 10 μm×10μm，$NA = 1.4$，波长为 $\lambda = 0.7\ \mu m$，浸没介质折射率为 $n = 1.5$，相机像素尺寸为 0.1 μm。

结果

模型

受阿贝基于显微镜下光栅可见度的实验方法（1）启发，我们通过费 Fisher 信息（25, 26）考察显微镜下理论二维正弦图案可达到的相位估计不确定度。

考虑一个二维光栅物体，其表达式为

$$obj(x,y) = U_{ave}[1 + \alpha \sin(2\pi klx + \phi)]. \quad (1)$$

这里，(x,y) 是两个维度上的像素索引，U_{ave} 是每像素的平均光子数，l 是像素长度，α 是相对振幅，k 是光栅沿 x 轴的空间频率，ϕ 是光栅在 $x = 0$ 处的初始相位。

费 Fisher 信息的定义为:

$$I(\theta) = \mathrm{E}[\left(\frac{\partial L(\theta)}{\partial \theta}\right)\left(\frac{\partial L(\theta)}{\partial \theta}\right)^T], \quad (2)$$

其中，$\theta = [\alpha, k, \phi]^T$ 是待估计的参数，$L(\theta)$ 是 θ 的对数似然函数。$\mathrm{E}[\cdot]$ 表示对所有可能结果（可能的含噪图像）取期望。假设来自上述物体、经特定显微镜系统探测到的光子服从泊松分布，这是由光子计数噪声导致的，则 Fisher 信息可计算为（27，28）

$$I(\theta) = \sum_i \frac{1}{u_i}\left(\frac{\partial u_i}{\partial \theta}\right)\left(\frac{\partial u_i}{\partial \theta}\right)^T, \quad (3)$$

其中，$\boldsymbol{u} = [u_1,\ldots、\ u_i、\ \ldots、\ u_N]$ 表示通过不同成像方式从 obj 获得的数据，u_i 表示各个像素的预期光子数。对于宽场和共聚焦系统，$\boldsymbol{u}$ 为理想图像（方法）。对于传统结构光照明显微镜，$\boldsymbol{u}$ 表示具有不同结构照明图案的 9 帧理想图像（方法）。对于图像扫描显微镜，$\boldsymbol{u}$ 为不同扫描位置处的发射图案图像（方法）。

相位估计的方差下界，以及频率和相对振幅的方差下界，可以通过克拉美–罗下界（克拉美-罗下界）（26、27）计算为费 Fisher 信息矩阵 $I(\theta)$ 的逆矩阵,

$$Var(\hat{\theta}) \geq CRLB(\theta) = I^{-1}(\theta). \quad (3)$$

该不等式表明两个矩阵之差是半正定的。

由于费 Fisher 信息 $I(\theta)$具有可加性，在单位面积光子通量恒定的情况下，同一物体在更大的视场（FOV）中成像会产生更大的费 Fisher 信息（更小的克拉美-罗下界）（图 S1）。因此，本文的研究始终将视场限制为 10μm×10 μm。为进一步简化问题，我们采用相位-σ_ϕ的克拉美-罗下界平方根，即相位估计精度极限，作为表示显微镜分辨能力的标量度量（σ_ϕ 越大，分辨能力越差）。

要定义分辨率极限，需要设定一个“可分辨”的判据。例如，瑞利判据，0.61λ，将两个点的距离定义为其点扩散函数（PSF）$_{NA}$的第一极小值恰好到达彼此中心时的距离（29）。Sparrow 等人将两个点的联合强度分布中点处出现极小值作为两点可分辨的条件（30）。为寻找考虑噪声的分辨率判据，我们考察了不同频率、光子密度和相位估计精度极限下的含噪图像可视化结果 σ_ϕ （图 S2）。通过视觉比较，我们决定将相位估计不确定度 σ_ϕ 的阈值设为 0.04 rad，作为分辨判据。随后，IbR 被定义为在上述判据下该成像方式能够分辨的最高频率的倒数（图 2a 中的彩色虚线）。

需要指出的是，定义 IbR 和 σ_ϕ 判据是为了便于解读，同时也可以构建其他判据，例如 σ_α、σ_k或单位面积 Fisher 信息。使用单位面积 Fisher 信息作为分辨能力的度量，可以避免在定义分辨率判据时需要设定固定视场（图 S3）。然而，与 σ_ϕ不同，后者可表述为相位可达到的最佳不确定度，而 Fisher 信息本身并没有直接的物理含义。此外，使用 Fisher 信息这一标量项时，不会考虑这三个参数之间的相关性。至于其他参数——相对振幅 α 和频率 k，我们认为相位 ϕ 与分辨率的关系更为密切。此外，在我们的模拟中，这三个参数呈现出相似的变化趋势（图 S4）。

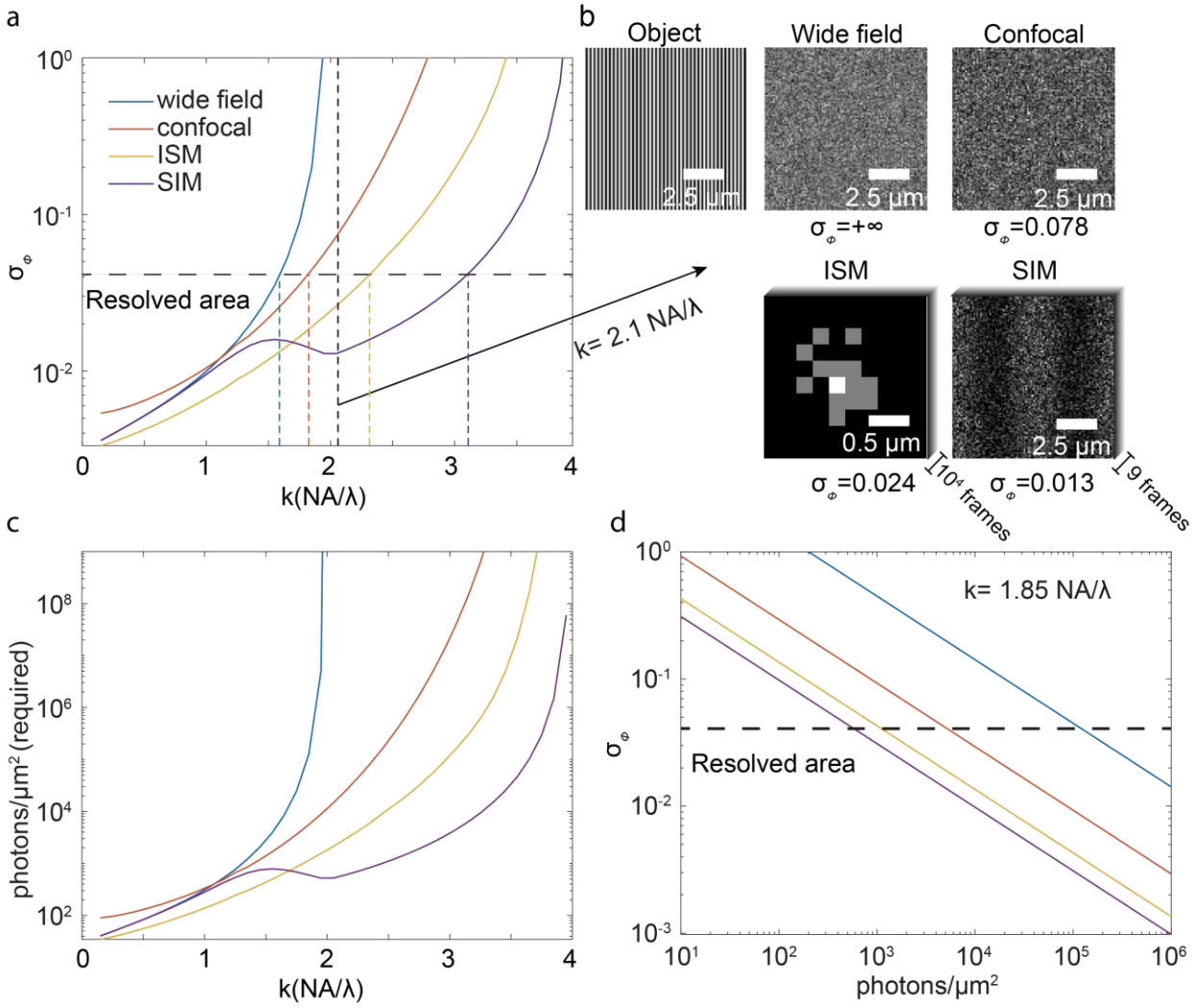


图 2. 使用相位估计精度极限 σ_ϕ比较四种成像方式——宽场显微镜、共聚焦显微术、结构光照明显微镜（SIM）和图像扫描显微镜（ISM）——对不同频率的分辨能力。(a) 展示四种成像方式以 σ_ϕ表示的分辨能力。横向黑色虚线（$\sigma_\phi = 0.04\,rad$）表示所采用的分辨判据。彩色虚线表示各成像方式的 IbR 倒数。(b) 物体频率为$2.\frac{1NA}{\lambda}$ 时含噪图像的可视化；该频率略高于衍射极限。SIM 中的原始图像是原始光栅物体的频移图像，因为结构光照明频率位于光学传递函数（OTF）边界处，因而不会出现在图像中。(c) 不同光栅结构达到所采用的分辨判据（$\sigma_\phi = 0.04\,rad$）所需的单位面积光子数，范围从 0 到 10 亿光子/每 μm²。(d) 对象频率为$1.\frac{85NA}{\lambda}$ 时，σ_ϕ 与光子计数之间的关系，以对数刻度绘制。模拟条件设定为：光子发射密度为 5000 光子/μm²,，数值孔径为 1.4，浸没介质折射率为 1.5，发射波长为 0.7 μm。共聚焦系统采用 0.5 艾里斑单位（AU）的针孔半径。SIM 所采用的结构光照明频率为 $k_{st} = \frac{2NA}{\lambda}$。宽场系统和 SIM 中的相机像素尺寸，以及共聚焦系统和 ISM 中的扫描间隔，均设为 0.1 μm。

噪声存在时可实现的分辨能力

在 IbR 中，光子是衡量分辨能力的信息货币。在极端情况下，如果没有检测到光子，就无法形成图像，因此所有成像方式都将毫无信息（σ_ϕ 无限）。相比之下，当光子数量无限时（噪声可忽略），各种成像方式的 IbR 均可达到其传统的（阿贝）分辨率极限（图 2a、2c）。当光子数量有限时（定义为单位面积发射的光子数，以下称为光子密度），由于泊松噪声的影响，成像方式将无法达到其传统极限。相反，它们的实际分辨能力差异很大，而且这种差异还取决于成像目标的复杂程度（例如目标的空间频率）。我们采用所开发的方法，研究了宽场显微镜、共聚焦显微术、SIM 和 ISM 这四种常用成像方式，量化了噪声存在时它们对空间频率范围从 0 到 $\frac{4NA}{\lambda}$ 的物体的分辨能力。

图 2a 展示了宽场系统、共聚焦系统、SIM 和图像扫描显微镜针对不同频率物体的分辨能力总体趋势。在远低于衍射极限的低频范围内，图像扫描显微镜的分辨能力显著优于所有其他成像方式，而宽场系统和 SIM 的表现相近。例如，在低频范围（$[0,\frac{NA}{\lambda}]$）内，图像扫描显微镜的相位估计精度极限 σ_ϕ 最高可比宽场系统和 SIM 低 1.5 倍（图 2a）。这是因为图像扫描显微镜有效利用了小面积像素探测器，从而拓宽了其光学传递函数；同时，基于多像素的点扩散函数探测避免了光子损失。相比之下，在所量化的所有成像方式中，共聚焦系统在低频下的分辨能力最差，这是因为针孔滤除造成了光子损失。在频率 $0.\frac{2NA}{\lambda}$ 处，共聚焦系统的相位估计精度极限 σ_ϕ 比宽场系统高（更差）1.5 倍（图 2a）。

在较高频率下，宽场系统在频率 $\frac{2NA}{\lambda}$ 处达到衍射极限，导致 σ_ϕ无穷大；而共聚焦系统、结构光照明显微镜和图像扫描显微镜则展现出超越宽场系统衍射极限的能力（图 2a）。在光子数量有限的情况下，结构光照明显微镜表现出最高的分辨能力。当光子密度为 5000 光子/μm^2 时（图 2a），结构光照明显微镜实现了 170 nm 的 IbR，超过了传统的 250 nm 衍射极限分辨率，而图像扫描显微镜，

共聚焦系统和宽场系统的 IbR 分别为 220 nm、270 nm 和 315 nm（图 2a 中的彩色虚线）。这种优势源于结构光照明显微镜能够将物体位于光学传递函数边界之外的频率分量移至光学传递函数中心，从而增强其传递幅度（图 S7、S8）。

上述结果也可以从光子需求量的角度加以说明。要达到特定的实际分辨率（IbR），不同成像方式所需的最少光子数各不相同（图 2c）。要分辨频率低至$0.\frac{2NA}{\lambda}$ 的物体，共聚焦系统需要 90 个光子/μm²。相比之下，其他方式所需的光子数少于 40 个/μm²，，相差两倍以上。要分辨频率为 $\frac{NA}{\lambda}$ 的物体，图像扫描显微镜需要 150 个光子/μm²，而其他成像方式则需要样品发射至少 380 个光子/μm²。在更高频率$1.\frac{85NA}{\lambda}$ （略低于衍射极限）下，宽场系统需要 125,000 个光子/μm²。共聚焦系统需要 5580 个光子/μm²，，约为宽场系统所需光子数的二十分之一；图像扫描显微镜和结构光照明显微镜所需光子数则少两个数量级，分别为 1147 个光子/μm² 和 600 个光子/μm²。要分辨频率显著更高的物体$3.\frac{5NA}{\lambda}$ ，结构光照明显微镜所需的光子密度最低，为 24,800 个光子/μm²；相比之下，图像扫描显微镜需要 4,607,000 个光子/μm²，相差两个数量级以上。相反，即使有 10 亿个光子/μm²，，共聚焦系统也无法分辨这样的结构，尽管根据其光学传递函数，该结构在理论上是可由共聚焦系统分辨的（19，31）。

相位估计精度极限 σ_ϕ 与光子计数呈反平方根关系（图 2d）。这是因为在费 Fisher 信息的计算中，每个入射光子都被视为一个事件；在不存在背景荧光的情况下，费 Fisher 信息矩阵（克拉美-罗下界的倒数）与光子计数呈线性正比。

在显微成像中，背景是会增加噪声的不需要的光子信号（12）。为了量化背景对分辨能力的影响，我们通过将式 1 重新表述为 $obj(x) = U'_{ave}[1 + \sin(2\pi klx + \phi)] + bg$，将目标物体与假定的均匀背景分离开来。此处，$U'_{ave}$ 是目标结构发射的光子密度。bg 是来自背景的光子密度。在低频下，图像扫描显微镜对背景光子的耐受性更好，而其他系统的表现相近。在给定信号水平为 U'_{ave} 1000 光子/μm²，、需要分辨一个相对

低频物体时，如 $0\frac{95NA}{\lambda}$ ，宽场系统、共聚焦系统和结构光照明显微镜可耐受最高达 5000 光子/μm^2, 的背景，而图像扫描显微镜可耐受最高达 12,000 光子/μm^{2}的背景。在高频下，结构光照明显微镜和图像扫描显微镜优于其他系统。要分辨频率相对较高、如 $1.\frac{85NA}{\lambda}$ 且接近衍射极限的物体，结构光照明显微镜可耐受最高达 800 光子/μm^2 的背景，而图像扫描显微镜只有在背景接近于零时才能分辨该结构。另一方面，在光子水平受限的情况下，宽场系统和共聚焦系统即使在无背景环境中也无法分辨该结构（图 S5）。

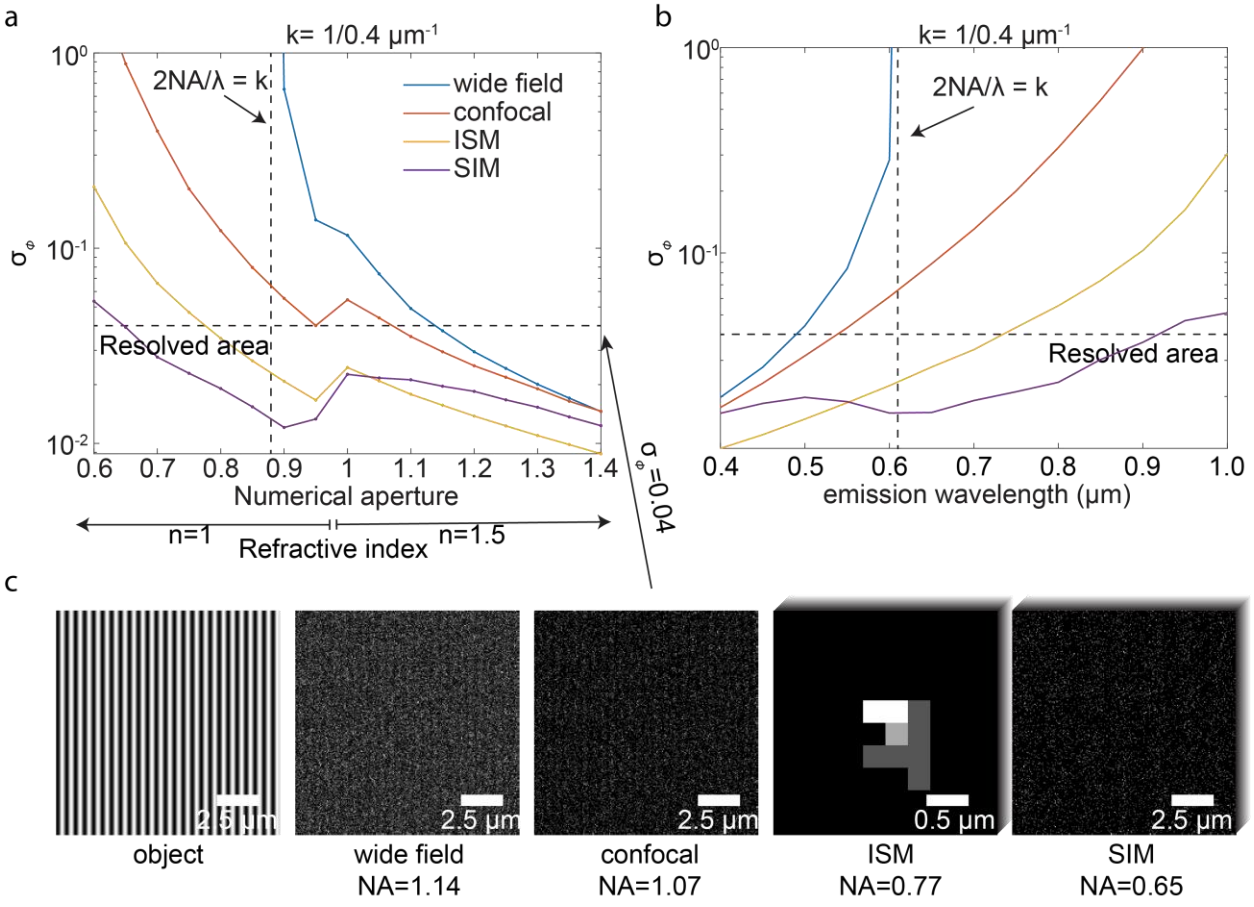


图 3. 数值孔径和发射波长对相位估计精度极限 σ_ϕ 的影响。(a) 数值孔径对 σ_ϕ 的影响。发射波长设为 700 nm。(b) 波长对σ_ϕ的影响。数值孔径设为 0.8，折射率设为 1。(c) 不同成像方式下黑色虚线 $\sigma_\phi = 0.04$ 的可视化结果。在上述图中，我们将光子发射密度设为 5000 光子/μm^2。共聚焦系统选择的针孔半径为 0.5 AU。SIM 的结构光照明频率为 $k_{st} = \frac{2NA}{\lambda}$ 。宽场系统和 SIM 中的相机像素尺寸，以及共聚焦系统和图像扫描显微镜中的扫描间隔，均设为 0.1 μm。

数值孔径和发射波长对分辨能力的影响

而在阿贝分辨率极限（$\frac{\lambda}{2NA}$）下，数值孔径（NA）和发射波长同样重要。然而，它们对 IbR（考虑噪声的分辨率）的影响有所不同。除了对光学传递函数（OTF）的影响外，增大数值孔径还会扩大光子收集角，因此，在 IbR 中，数值孔径比波长更为关键。对于频率为$1\ 0.4\ \mu m^{-1}$的物体，通过σ_ϕ 在图像扫描显微镜中进行量化时，将数值孔径从 0.6 增至 0.8，精度极限提高了 5.96 倍；而将探测波长从 0.8 改为 0.6 μm，作同等幅度的改变，精度极限仅提高了 2.45 倍（图 3a、3b）。

给定特定的光子密度，IbR 还可用于计算在不同成像方式下分辨物体所需的最小数值孔径和发射波长。例如，我们以光子密度为 5000 光子/μm^2 的光栅物体为例，其频率为$1\ 0.4\ \mu m^{-1}$（光栅物体的峰峰间距为 0.4 μm）。当发射波长固定为 700 nm 时，在无噪声的宽场系统中，理论上数值孔径大于 0.9 即可分辨该物体。然而，考虑噪声后，宽场系统需要数值孔径达到 1.15，因此需要使用油水浸没物镜。相比之下，共聚焦系统、图像扫描显微镜和结构光照明显微镜的要求宽松得多，所需最小数值孔径分别为 0.95、0.75 和 0.65（图 3a）。当显微镜的数值孔径固定时（例如空气中为 0.8），宽场系统、共聚焦系统、图像扫描显微镜和结构光照明显微镜所需的发射波长分别须小于或等于 480 nm、530 nm、720 nm 和 900 nm，才能分辨该结构（图 3b）。

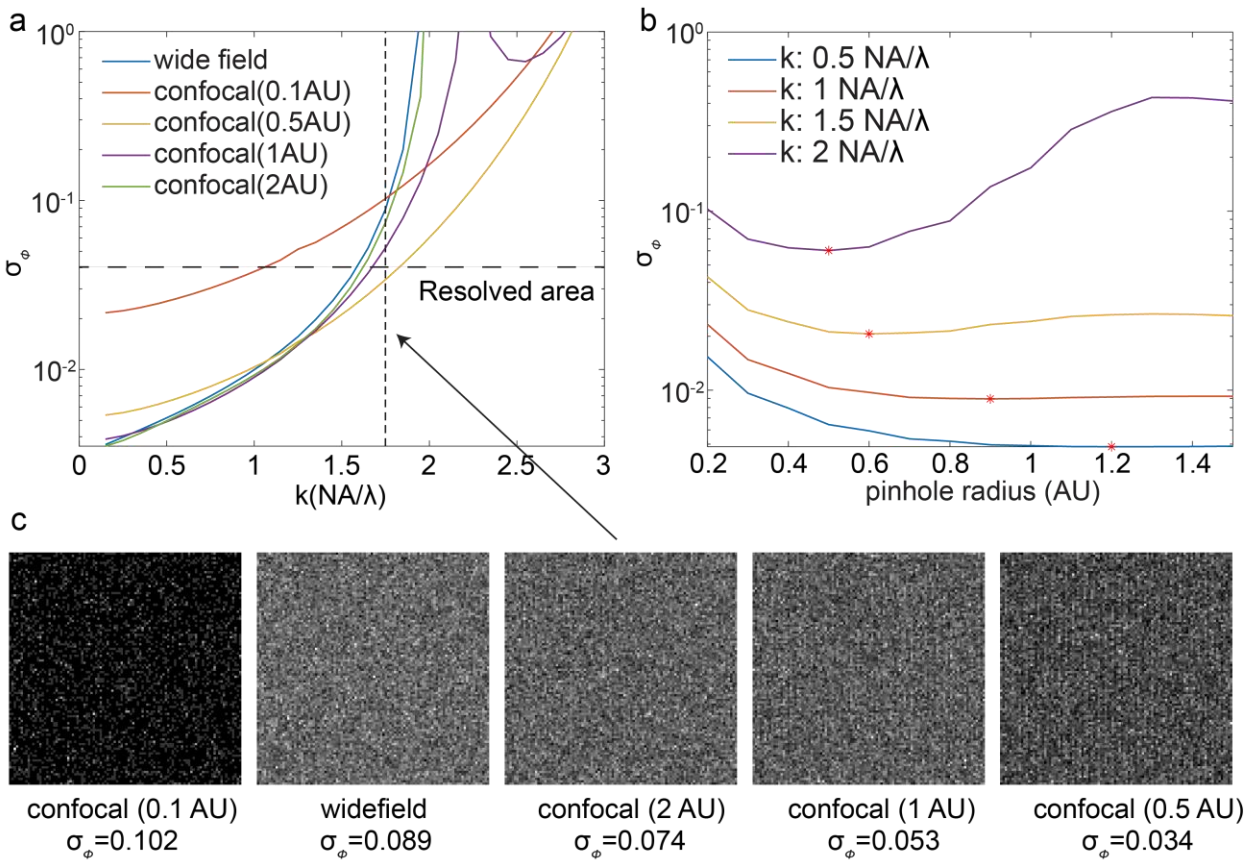


图 4. 不同圆形针孔半径下共聚焦系统中的相位估计精度极限 σ_ϕ 。(a) σ_ϕ宽场系统与针孔半径不同的共聚焦系统在目标物体频率方面的比较。(b) 对于频率特定的物体，针孔半径与 σ_ϕ 的关系。红色星号表示 σ_ϕ 达到最小值的位置。(c) 频率为 k =1.75$\frac{NA}{\lambda}$ 的物体含噪图像可视化。上述图中，光子发射密度设为 5000 光子/μm^2, 数值孔径设为 1.4，浸没介质折射率设为 1.5，发射波长设为 0.7 μm。宽场系统中的相机像素尺寸和共聚焦系统中的扫描间隔均设为 0.1 μm。

针孔尺寸对共聚焦系统的影响

在共焦成像中，缩小针孔尺寸会以两种相反的方式影响分辨能力：一方面拓宽有效光学传递函数，从而提升分辨能力；另一方面，针孔剔除光子会减少光子探测量，从而降低分辨能力（19, 24）（补充说明，图 S6）。当针孔半径过大时（例如 2 个艾里斑单位（AU）），共聚焦系统的性能会接近宽场系统（图 4a）（6,7）。随着针孔半径缩小，共聚焦

系统往往具有更强的分辨能力。例如，针孔半径为 1 AU（$AU = \frac{1.22\lambda}{}$）和 0.5 AU 的共聚焦系统，其 IbR 分别为 300 nm 和 270 nm，而$_{NA}$宽场系统为 315 nm（图 4a）。然而，当针孔尺寸进一步缩小时，共聚焦系统的分辨能力会因针孔剔除光子而迅速下降。例如，针孔半径为 0.1 AU 的共聚焦系统，其 IbR 为 500 nm。以往通常凭经验通过针孔尺寸来权衡共聚焦系统分辨能力的提升与下降；现在可以通过相位估计精度极限 σ_ϕ 对此进行量化，从而找到最佳针孔半径。我们发现，在较宽的频率范围内，针孔半径为 0.5 AU 时通常能达到最低的 σ_ϕ，这表明在大多数情况下，该设置适用于共聚焦系统，并且与共聚焦系统中的常见做法一致（24）。为了针对特定频率的物体寻求最佳分辨能力，图 4b 展示了对于四种频率各异的光栅物体，达到最低 σ_ϕ 时的最佳针孔半径。对于频率为 $0.\frac{5NA}{\lambda}$，$\frac{NA}{\lambda}$、$1.\frac{5NA}{\lambda}$ 和 $\frac{2NA}{\lambda}$ 的物体，最佳针孔半径分别为 1.2、0.9、0.6 和 0.5 AU。一般而言，小针孔半径适用于高频物体，而大针孔半径适用于低频物体。

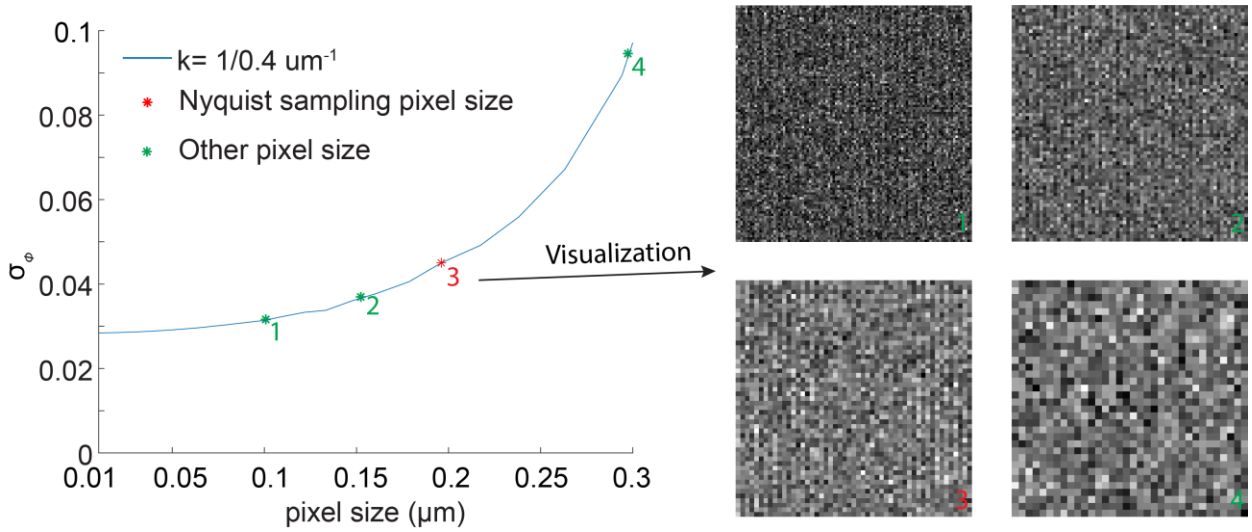


图 5. 相机像素尺寸对宽场显微镜分辨能力的影响，以 σ_ϕ 表示（左）。像素尺寸指映射到物平面上的像素尺寸。给定固定的发射光子计数时，不同像素尺寸下拍摄的含噪图像可视化结果（右）。成像条件设定为光子发射密度 5000 光子/μm^2, 、数值孔径 1.4、浸没介质折射率 1.5，发射波长为 0.7μm。

像素尺寸对宽场显微镜的影响

数字图像探测器的像素尺寸通常被认为与传统分辨率极限无关，但实际上会影响 IbR。一般而言，在忽略相机读出噪声（仪器噪声）的情况下，像素尺寸越小，分辨能力越强（IbR 越好）。即使像素尺寸小于奈奎斯特采样定理所要求的尺寸，这一趋势依然存在（32, 33）。以宽场显微镜为例，像素尺寸从 0.2 μm（奈奎斯特采样像素尺寸）变为 0.28 μm 时，相位估计精度极限 σ_ϕ 从 0.05 rad 增至 0.1 rad，表明使用小于奈奎斯特采样要求的像素尺寸十分重要（图 5）。此外，我们还研究了像素尺寸小于奈奎斯特采样所要求尺寸时的 IbR。我们发现，将像素尺寸进一步减小至 0.1 μm，与奈奎斯特采样像素尺寸 0.2 μm 相比，会使 σ_ϕ 降低约 30%；当像素尺寸趋于无限小（近似为 0.01 μm）时，该值接近其极限 0.029 rad。以上结果表明，在仪器噪声可以忽略时，对显微镜图像进行像素合并（相当于使用更大的像素尺寸）会降低成像系统的有效分辨能力。这是因为每个像素都是一个光子桶，会收集并积分落入其有效区域内的所有光子；像素化过程起到低通滤波器的作用（34）（补充说明）。

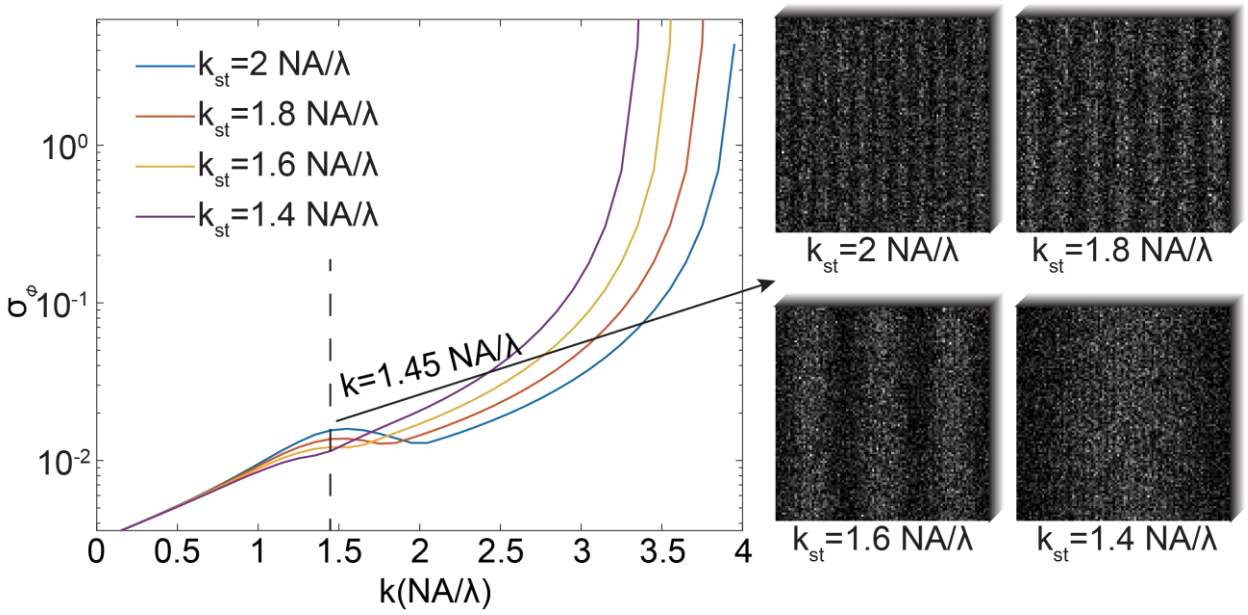


图 6 结构光照明频率对结构光照明显微镜性能的影响。σ_ϕ 对采用四种结构光照明频率的结构光照明显微镜进行量化，分析不同频率下的物体（左）。含噪图像的可视化

给定频率为$1.\frac{45NA}{\lambda}$ 的物体，不同结构光照明频率下结构光照明显微镜（SIM）的结果如右图所示。在上述图中，我们将光子发射密度设为 5000 光子/μm^2, ，数值孔径设为 1.4，浸没介质折射率设为 1.5，发射波长设为 0.7 μm。SIM 中的相机像素尺寸设为 0.1 μm。

结构光照明频率对结构光照明显微镜（SIM）的影响

在无像差系统中，人们通常认为复杂物体（具有高频分量的物体）更难分辨。就 IbR 而言，成像方式通常在低频下比在高频下具有更强的分辨能力（更低的 σ_ϕ）（图 2a）。然而，在某些频率范围内使用结构光照明显微镜（SIM）时也存在例外：高频结构比低频结构更容易分辨。以照明频率为 $k_{st} = \frac{2NA}{\lambda}$ 的 SIM 为例（图 6 中的蓝色曲线），频率为 $\frac{2NA}{\lambda}$ 时的相位估计精度极限 σ_ϕ 小于频率为$1.\frac{5NA}{\lambda}$ 时的值（0.016 rad，图 6），为 0.013 rad。由于结构光照明物体发出的光包含其原始空间频率和频移后空间频率的信息，随着物体频率增加，其原始频率的传递振幅在接近光学传递函数的边界时会降低。与此同时，其频移后频率的传递振幅在接近光学传递函数中心时会增加（图 S7、S8）。由于原始频率和频移后频率都会影响相位估计，它们产生的传递振幅呈相反变化趋势，因此相位估计精度极限 σ_ϕ 与物体频率 k 之间的关系也会发生变化。

由于结构照明显微中物体的频率组成受其结构光照明频率-k_{st}影响，我们探讨了不同结构光照明条件下的 SIM 如何影响其分辨能力。我们测试了使用四种照明频率的 SIM。总体趋势表明，在物体频率的大部分范围内，较高的照明频率-k_{st} 会带来较低的相位估计精度 σ_ϕ（即更好的分辨能力）（图 6 ）。这与 SIM 中通常使用的照明频率位于 OTF 边界处的做法一致（20，21）。然而，在某些情况下，与较高频率相比，较低的照明频率反而能提高分辨能力，这与这一惯例相悖。例如，在成像频率为$1.\frac{5NA}{\lambda}$ 的物体时， σ_ϕ 在使用 $k_{st} = \frac{2NA}{\lambda}$ 的照明频率时，SIM 的分辨能力不如使用

位于 OTF 边界处的频率；与较低照明频率（例如 $k_{st} = \frac{1.4NA}{\lambda}$，图 6a）相比，前者的分辨能力更差。以上结果表明，理论上，在 SIM 中使用较高的结构光照明频率通常有益，但并非总是如此。

在传统结构光照明显微镜中，结构照明图案是一种一维正弦波图案，只能使物体的频率沿一个方向发生偏移。通常的做法是采用一组三个图案，相邻图案之间的方向相差 60 度，以覆盖二维频率平面，但这会导致不同方向上的分辨率分布不均匀（20，21）。通过我们的相位估计精度极限 σ_ϕ，我们测量了这种依赖方向的分辨率，如图 S9 所示。在光子密度为 5000 photons/μm^2, 30 的条件下，结构光照明图案组初始方向之间的差异可使 SIM 沿一个方向的 IbR 从 150 nm 变为 192 nm。增加一组图案中照明图案方向的数量，可以缓解这种分布不均匀性。在上述条件下，我们测试发现，在 SIM 中采用六个而非三个照明图案组成的一组图案，可使所有初始方向下的 IbR 均达到 170 nm（图 S9）。

讨论

IbR 的目的是建立一种考虑噪声的分辨率极限，用于预测光子计数有限时各种成像方式的性能。IbR 的概念基于周期性物体的理想图像形成。在我们的计算中，我们假设荧光响应是线性的，即发射强度与照明功率成正比。因此，我们的 IbR 不能直接应用于某些超分辨成像方式，例如单分子定位显微镜（SMLM）（35–38）和受激发射损耗显微镜（STED）（39，40），因为它们依赖非线性荧光响应。例如，SMLM 需要单个发射体“闪烁”。然而，发射体会随机切换，因此，SMLM 的分辨率极限取决于成像单分子的确切开关时间序列，而这很难纳入 IbR 进行概括。STED 的分辨率取决于损耗激光的功率及其点扩散函数。在理想情况下，如果损耗点扩散函数具有完美的甜甜圈形状且功率无限大，STED 的分辨率可以达到分子的尺寸（40）。如果已知探针非线性行为的性质及其在损耗过程中的物理模型，IbR 有望提供一种评估其实际分辨率的方法。在

此外，IbR 的另一项局限是，目前它只能量化二维样品的横向分辨率。由于没有考虑样品中的实际三维环境，IbR 无法衡量其抵抗离焦背景的能力，而共聚焦系统正是为此而设计的。

费 Fisher 信息使我们能够在分辨率度量中考虑光子噪声，而相位估计精度极限 σ_ϕ 可理解为光栅图案横向定位的不确定性。尽管克拉美-罗下界并不保证任何估计量都能达到该下界，但它通常被视为参数可实现的最佳精度。这是因为无偏最大似然估计量（MLE）的方差渐近趋近于克拉美-罗下界（26）。

在现代显微成像方法中，原始数据通常会经过后处理，以生成用于可视化的图像。自然会产生这样一个问题：数据后处理是否能增加信息，从而提高分辨率（例如 IbR）。为此，我们的理论推导（补充说明）表明，确定性数据后处理方法无法增加费 Fisher 信息。因此，包括图像重建算法在内的后处理方法，只能使 IbR 保持不变或变差。

IbR 提供了一种新的度量方法，用于量化考虑有限光子数时显微成像模式的实际分辨能力。考虑噪声的分辨率度量可为光子数受限条件下的荧光显微成像模式提供理论和统计参考，也可为新型显微成像方法的进一步发展提供指导。

方法

二维周期结构生成与显微镜成像系统模拟

我们根据公式 1，在 20 μm×20 μm 的区域内模拟二维单频正弦波光栅物体，该区域包含 4000×4000 pixels（每像素 5 nm）。除专门考察背景水平的情况外，整个模拟过程中相对振幅 α 设为 0.95（95% 信号，5% 背景），初始相位 ϕ 设为 0。理想图像模拟为投影在物平面上，因此放大倍率为 1。我们基于菲涅耳近似（4）模拟理想成像过程，不考虑光学像差。该过程可视为物体与点扩散函数（4）卷积。为生成点扩散函数，我们首先在傅里叶空间中创建一个半径为 $\frac{NA}{\lambda}$ 的圆形光瞳函数。在傅里叶空间中，每个像素表示频率间隔$\frac{1}{L}$，其中 $L = 20\ \mu m$ 为图像的长度。以像素数表示的光瞳函数半径为 $round(\frac{NA}{\lambda} * L)$，其中 $round$ 函数使 $\frac{NA}{\lambda} * L$ 成为整数。点扩散函数是光瞳函数的傅里叶变换的模平方。各图的理想图像模拟条件列于图注中，包括物镜的数值孔径、浸没介质的折射率、荧光发射波长以及预期光子密度。

宽场显微成像模拟

在宽场显微成像模拟中，我们直接将物体与点扩散函数卷积，以获得理想图像。卷积后，为避免边界处的模拟误差，我们从理想图像中裁剪出中心区域 10 μm×10 μm，作为视场。随后将裁剪后的图像分箱为 100 像素 ×100 pixels，以模拟相机探测中的像素积分效应；图 5 除外，该图专门考察宽场系统中的像素尺寸。在这幅 100 像素×100 pixels 图像中，相机像素尺寸为 0.1 μm。用于进一步计算费 Fisher 信息矩阵的分箱图像表示方程 1 中的 $\boldsymbol{u}$。

共聚焦显微成像模拟

在共聚焦系统仿真中，我们假设激发激光焦点达到衍射极限，且其数值孔径与发射探测相同。尽管由于荧光发射的斯托克斯位移，发射波长通常大于激发波长，但为简化数学计算，我们假设激发波长与发射波长相同。此假设使我们可以省去一个额外参数，从而简化仿真模型。因此，在整个仿真过程中，激发点扩散函数与发射点扩散函数相同。在像平面上，我们在共轭平面中模拟一个圆形针孔，其中心与激发点扩散函数的中心重合。各图中模拟的针孔半径列于图注中。我们将图像记录传感器模拟为桶式光子探测器，用于积分每个扫描位置所收集的光子。对于每个位置，我们将物体与激发点扩散函数点乘，以生成受激发物体的荧光分布。随后，将该受激发物体与点扩散函数卷积，形成针孔前的图像。我们将图像与针孔掩模（针孔半径以内为 1，其余为 0）点乘，对结果求和，并将其赋值给相应的扫描位置。在整个仿真过程中，我们将扫描位置总数设为 100×100 ，以 0.1 μm 的扫描间隔覆盖中心 10μm×10 μm 区域。由 100*100 个扫描点记录的图像表示方程 1 中的 $\boldsymbol{u}$ ，并用于进一步计算费 Fisher 信息矩阵。

图像扫描显微镜模拟

图像扫描显微镜的模拟步骤与共聚焦系统模拟相同，只是使用阵列探测器代替带有实体针孔的桶形探测器。我们使用一台包含 10 pixels×10 个像素、像素尺寸为 0.2 μm 的相机，记录每个扫描位置处的图像；而根据奈奎斯特采样，最大像素尺寸为 0.25 μm。我们将扫描位置总数设为 100×100 ，覆盖中央 10 μm×10 μm 区域，扫描间隔为 0.1 μm。因此，总计有 10^4 帧来自不同扫描位置的图像构成了公式 1 中的数据 $\boldsymbol{u}$ ，用于进一步计算费 Fisher 信息。

结构照明显微术模拟

在结构光照明显微镜中，为了形成理想图像，我们首先将结构照明图案施加到物体上，形成结构照明物体。在整个研究中，我们使用了

单频正弦波结构照明图案。结构光照明强度的振荡范围为 0 到 2，因此将该图案施加到物体上不会影响物体发射的光子总数。各图中模拟的结构照明图案频率列于图注中。我们将结构照明物体与点扩散函数卷积，得到理想图像。与宽场显微镜类似，我们裁剪理想图像的中心区域 10 μm×10 μm，然后将裁剪后的图像分箱为 100 个像素 ×100 pixels，以模拟实际的相机探测，其中相机像素尺寸为 0.1 μm。总计，我们采集了三种结构照明方向的图像，方向之间的差值为 60°，每种方向包含三个相位差为 $^{2\pi}$ 的图案。我们采集了总共九帧具有不同结构照明方向和相位的图像[3]，作为式 1 中的数据 $\boldsymbol{u}$，用于进一步计算费 Fisher 信息。

费 Fisher 信息计算

当随机变量（在此情况下为：像素值）服从泊松分布时，可根据公式 3 计算费 Fisher 信息，该计算需要求出 $\boldsymbol{u}$ 对 $\boldsymbol{\theta} = [\alpha, k, \phi]$ 的导数。我们通过对特定参数施加一个微小的增量和减量，计算 $\boldsymbol{u}$ 函数的差值，从而进行数值求导。例如，我们计算 $\frac{\partial u_i}{\partial \alpha} = u_i(\alpha+\Delta\alpha,\ k,\ \phi) - u_i(\alpha-\Delta\alpha, k, \phi)$（，，），其中在模拟中将 $\Delta\alpha$ 设为 0.01，α 为周期性物体的调制振幅（$^{2\Delta\alpha}\alpha \in [0,1]$）。相应地，我们使用 $\Delta\phi = 0.01$ 和 $\Delta k = \frac{1}{L}$，其中 $L = 20\,\mu m$ 为图像的总长度；~~三者均小于典型模拟范~~围的 2%。通过以这种方式安排 Δk，我们可以确保在频域中，单色正弦图案的傅里叶变换会在单个像素中产生彼此孤立的频率峰。

参考文献与注释

1. E. Abbe, 《显微镜理论与显微观察的贡献》。Arch. für Mikroskopische Anat. 9, 413–468（1873年）。2. B. R. Masters, 《超分辨率光学显微镜：追求更高的分辨率

与对比度》（施普林格，2020年）。

3. Helmholtz, H. Fripp，《显微镜光学容量的极限》。《月刊显微镜杂志》16，15–39（1876）。4. J. W. Goodman，《傅里叶光学导论》第3版（2005）。5. D. B. Murphy，《光学显微术与电子成像基础》（约翰·威立父子公司，2002）。6. H. Giloh, J. W. Sedat，荧光显微术：通过正丙基没食子酸酯减少罗丹明和荧光素蛋白质偶联物的光漂白。《科学》217，1252–1255（1982）。7. L. Song, E. J. Hennink, I. T. Young, H. J. Tanke，定量荧光显微术中荧光素的光漂白动力学。《生物物理学杂志》68，2588–2600（1995）。8. Stelzer，对比度、分辨率、像素化、动态范围和信噪比：荧光光学显微术分辨率的基本极限。《显微镜学杂志》189，15–24（1998）。9. G. Cox, C. J. R. Sheppard，共聚焦和非线性显微术的实际分辨率极限。《显微镜研究与技术》63，18–22（2004）。10. O. Mandula, M. Kielhorn, K. Wicker, G. Krampert, I. Kleppe, R. Heintzmann，线扫描结构照明显微术：厚荧光样品的超分辨成像。《光学快报》20，24167–24174（2012）。11. E. A. Ingerman, R. A. London, R. Heintzmann, M. G. L. Gustafsson，线性与非线性结构照明显微术中的信号、噪声和分辨率。《显微镜学杂志》273，3–25（2019）。12. D. R. Sandison, W. W. Webb，共聚焦及其他荧光显微镜中的背景抑制与信噪比优化。《应用光学》33，603–615（1994）。13. C. E. Shannon，通信的数学理论。《贝尔系统技术杂志》27，379–423（1948）。14. I. J. Cox, C. J. R. Sheppard，光学系统的信息容量与分辨率。《美国光学学会期刊A辑》3，1152–1158（1986）。15. G. W. King, A. G. Emslie，从通信理论的角度看光谱学

理论。第一部分：分辨率。《美国光学学会期刊》41，
405 _412（1951）。
16. A. G. Emslie、G. W. King，《从通信理论的角度看光谱学》。II. 谱线宽度。美国光学学会期刊。43，658–663（1953）。17. N. J. Bershad，分辨率、光信道容量与信息论。美国光学学会期刊。59，157–163（1969）。18. M. MINSKY，显微镜装置US3013467A（1961）。19. T. Wilson，“针孔在共聚焦成像系统中的作用 BT - 生物共聚焦显微镜手册”，载于 J. B. Pawley 编（施普林格，1995），第167–182页。20. M. G. L. Gustafsson，利用结构光照明显微术将横向分辨率极限提高两倍。《显微镜学杂志》198，82–87（2000）。21. M. Saxena、G. Eluru、S. S. Gorthi，结构光照明显微术。《先进光学与光子学》7，241–275（2015）。22. C. B. Müller、J. Enderlein，图像扫描显微术。《物理评论快报》104，198101（2010）。23. C. J. R. Sheppard、S. B. Mehta、R. Heintzmann，利用像素重分配的图像扫描显微术实现超分辨率。《光学快报》38，2889–2892（2013）。24. C. J. R. Sheppard、S. Roth、R. Heintzmann、M. Castello、G. Vicidomini、R. Chen、X. Chen、A. Diaspro，光学传递函数的解读：其对图像扫描显微术的意义。《光学快报》24，27280–27287（2016）。25. R. A. Fisher，论理论统计学的数学基础。《伦敦皇家学会哲学汇刊》。A辑，收录数学或物理特征论文，222，309–368（1922）。26. S. M. Kay，《统计信号处理基础》（普伦蒂斯霍尔，1993）。27. J. Chao、E. S. Ward、R. J. Ober，单分子显微术参数估计的费歇尔信息理论：教程。《美国光学学会期刊 A辑》33，B36–B57（2016）。28. F. Huang、T. M. P. Hartwich、F. E. Rivera-Molina、Y. Lin、W. C. Duim、J. J. Long、P. D. Uchil，J. R. Myers，M. A. Baird，W. Mothes，M. W. Davidson，D. Toomre，J. Bewersdorf，使用基于 sCMOS 相机特性的单分子定位算法实现视频速率纳米显微术

算法。《自然·方法》10, 653–658 (2013)。29. Lord Rayleigh, 《光学研究：特别论述分光镜》。《皇家天文学会月报》40, 254 (1880)。30. C. M. Sparrow, 《论光谱分辨本领》。《天体物理学杂志》44, 76 (1916)。31. C. J. R. Sheppard, S. Roth, R. Heintzmann, M. Castello, G. Vicidomini, R. Chen, X. Chen, A. Diaspro, 《光学传递函数的解读：对图像扫描显微术的意义》。《光学快报》24, 27280 (2016)。32. C. E. Shannon, 《噪声环境中的通信》。《IRE会刊》37, 10–21 (1949)。33. I. T. Young, 《定量显微术》。《IEEE工程医学与生物学杂志》15, 59–66 (1996)。34. T. Bachmann, 《像素化图像的感知》（学术出版社，2016）。35. E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, 《以纳米分辨率成像细胞内荧光蛋白》。《科学》313, 1642–1645 (2006)。36. M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, 《通过随机光学重建显微术实现亚衍射极限成像》。《自然·方法》3, 793–796 (2006)。37. S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, M. D. Mason, 《通过荧光光活化定位显微术实现超高分辨率成像》。《生物物理学杂志》91, 4258–4272 (2006)

.

38. M. Lelek, M. T. Gyparaki, G. Beliu, F. Schueder, J. Griffié, S. Manley, R. Jungmann, M .

Sauer, M. Lakadamyali, C. Zimmer, 单分子定位显微术。《自然综述：方法入门》1, 1–27（2021）。39. S. W. Hell, J. Wichmann, 通过受激发射损耗打破衍射分辨率极限

n:

受激发射损耗荧光显微术。《光学快报》19, 780–782（1994）。40. E. Rittweger, K. Y. Han, S. E. Irvine, C. Eggeling, S. W. Hell, 受激发射损耗显微术揭示

s

具有纳米级分辨率的晶体色心。《自然·光子学》3, 144–147（2009）。41. R. Zamir, 通过数据处理论证证明费舍尔信息不等式。《IEEE信息论汇刊》44, 1246-1250（1998）。

致谢：感谢 Sheng Liu 就这一主题进行讨论，感谢 Vamara Dembele、Maryam Mahmoodi、Peiyi Zhang 和 Hao-Cheng Gao 在稿件撰写期间提出建议。

资助：美国国立普通医学科学研究所（R35GM119785）　　.

利益冲突：作者声明不存在利益冲突。

数据和材料可用性：评估本文结论所需的代码已发布在 GitHub 上。与本文相关的其他数据可向作者索取。

`

补充材料

有限光子数荧光显微术的统计分辨率度量 Yilun Li[1], Fang Huang[1,2,3]*

联系邮箱：fanghuang@purdue.edu

此 PDF 文件包括:

补充文本：注释1–注释3，图
S1–S10

补充文本

注释 1：数据后处理对费 Fisher 信息的影响

假设有两个随机变量 J 和 K，分别表示原始数据和处理后数据。K 由 J 通过函数 $K = H(J)$确定，其中 H 是一个确定性函数。考虑 Fisher 信息的链式法则 (41)

$$I_{J,K}(\theta) = I_J(\theta) + I_{K|J}(\theta).$$

条件 Fisher 信息为

$$I_{K|J}(\theta) = E_j[I_{K|J=j}(\theta)].$$

根据 Fisher 信息的定义，我们有

$$I_{K|J=j}(\theta) = E_k[\left(\frac{\partial \log(p(K|J=j;\theta))}{\partial \theta}\right)^2],$$

其中 $p(K|J = j;\theta)$ 是条件概率密度函数。由于 $K = H(J)$ 确定为

$$p(K|J = j;\theta) = \begin{cases} 1 & K = H(j) \\ 0 & otherwise \end{cases},$$

上式表明，条件概率密度函数是在给定条件下确定的，但与任何参数 θ 无关。因此，偏导数为零，从而得到

$$I_{K|J=j}(\theta) = 0, \forall j,$$

$$I_{K|J}(\theta) = E_j[I_{K|J=j}(\theta)] = 0.$$

结合第一个方程可得

$$I_J(\theta) = I_{J,K}(\theta) = I_K(\theta) + I_{J|K}(\theta) \geq I_K(\theta).$$

不等式的最后一步来自这样一个事实：任意费 Fisher 信息都大于或等于 0 (26)。如果处理是确定性的，那么处理后数据 K 中的费 Fisher 信息总是小于或等于原始数据 J中的费 Fisher 信息。换句话说，确定性图像后处理无法增加任何参数的费 Fisher 信息。请注意，这一结论成立的条件是图像处理具有确定性。如果能够获取其他先验信息，这种关系便不再成立。

注 2：像素合并效应

文献（33）中提到了像素合并效应。然而，据作者所知，尚未发现对像素合并效应的清晰推导。我们将按如下方式推导这一效应。

假设我们有一幅坐标为（x, y）的二维图像，该图像由离散像素索引 $[n, m]$ 记录。每个独立像素的作用是对落在该像素内的所有光子进行积分

$$Img[n,m] = \int_{x_n-\frac{d}{2}}^{x_n+\frac{d}{2}} \int_{y_m-\frac{d}{2}}^{y_m+\frac{d}{2}} Img(x,y)dxdy.$$

这里，(x_n, y_m) 是位于像素 $[n, m]$ 中心的坐标，d 是像素尺寸。$Img(x, y)$ 是光子分布函数。$Img[n, m]$ 是每个像素处的图像值。我们定义一个函数如下

$$f(x,y) = \frac{1}{d^2} \int_{x-\frac{d}{2}}^{x+\frac{d}{2}} \int_{y-\frac{d}{2}}^{y+\frac{d}{2}} Img(x',y')dx'dy'.$$

Then

$$Img[n,m] = f(x_n, y_m)d^2.$$

对函数 $f(x, y)$ 进行傅里叶变换，得到

$$\hat{f}(\xi,\eta) = \frac{1}{d^2} \iint_{-\infty}^{+\infty} f(x,y)e^{-2\pi i x\xi} e^{-2\pi i y\eta} dxdy$$

$$= \frac{1}{d^2} \iint_{-\infty}^{+\infty} [\int_{x-\frac{d}{2}}^{x+\frac{d}{2}} \int_{y-\frac{d}{2}}^{y+\frac{d}{2}} Img(x',y')dx'dy'] e^{-2\pi i(y\eta+x\xi)} dxdy.$$

令 $x' = x + \delta x, y' = y + \delta y$，则有

$$= \frac{1}{d^2} \iint_{-\infty}^{+\infty} [\int_{\frac{d}{2}}^{\frac{d}{2}} \int_{\frac{d}{2}}^{\frac{d}{2}} Img(x+\delta x, y+\delta y)d\delta x d\delta y] e^{-2\pi i(y\eta+x\xi)} dxdy.$$

交换积分顺序，得到

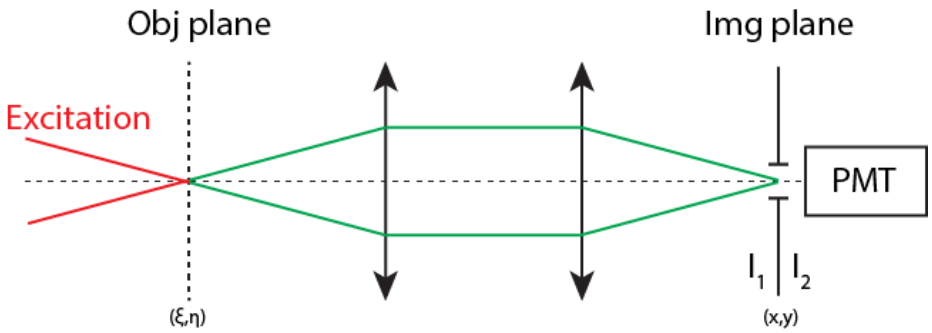
$$= \frac{1}{d^2} \int_{\frac{d}{2}}^{\frac{d}{2}} \int_{\frac{d}{2}}^{\frac{d}{2}} [\iint_{-\infty}^{+\infty} Img(x+\delta x, y+\delta y) e^{-2\pi i(y\eta+x\xi)} dxdy] d\delta x d\delta y$$

$$= \frac{1}{d^2} \int_{\frac{d}{2}}^{\frac{d}{2}} \int_{\frac{d}{2}}^{\frac{d}{2}} \widehat{Img}(\xi,\eta) e^{2\pi i(\delta y\eta+\delta x\xi)} d\delta x d\delta y$$

$$= \widehat{Img}(\xi,\eta) \frac{\sin(\pi\xi d)}{\pi\xi d} \frac{\sin(\pi\eta d)}{\pi\eta d}.$$

根据表达式，函数 $f(x, y)$ 是函数 $Img(x, y)$ 经两个 sinc函数进行频率滤波后的结果。图像像素的值 $Img[n, m]$ 是对函数 $f(x_n, y_m)$ 的采样。像素尺寸d 不仅会影响采样过程，还会影响应用于图像的频率滤波器。

注 3：共聚焦的有效光学传递函数



共聚焦显微镜示意图。

共聚焦的光学传递函数推导可见文献（19,24）。为确保内容完整并供参考，我们在下文给出自己的推导版本。

物平面上的荧光分布为

$$I_{obj}(\xi,\eta) = obj(\xi,\eta)\cdot PSF_{ex}(\xi-\xi_0,\eta-\eta_0)\cdot\kappa,$$

其中，$obj(\xi,\eta)$ 表示荧光团密度分布，$PSF_{ex}(\xi,\eta)$ 表示激发点扩散函数，(ξ_0,η_0) 表示扫描位置，κ 是激发到发射系数，为简化起见，我们假设 d 其值为 1。为简化起见，我们还假设放大倍率为 1。

形成针孔前的理想图像，可得

$$I_1(x,y) = \iint_{-\infty}^{+\infty} PSF(x-\xi,y-\eta)I_{obj}(\xi,\eta)d\xi d\eta.$$

经过针孔后的理想图像为

$$I_2(x,y) = I_1(x,y)\cdot I_{ph}(x-x_0,y-y_0),$$

其中，$I_{ph}(x,y)$ 是取值为 0 或 1 的针孔函数，(x_0,y_0) 是像平面上扫描位置的共轭位置。由于放大倍率为 1，共轭关系为 $(x_0,y_0) = (-\xi_0,-\eta_0)$。

在共焦成像中，桶式光子探测器会收集每个扫描位置的所有光子，并形成一个数值。因此，共聚焦在 (x_0,y_0) 处的理想图像值为

$$I_{img}(x_0,y_0) = \iint_{-\infty}^{+\infty} I_2(x,y)dxdy$$

$$= \iint_{-\infty}^{+\infty} I_1(x,y)\cdot I_{ph}(x-x_0,y-y_0)dxdy$$

$$= \iint_{-\infty}^{+\infty}\left[\iint_{-\infty}^{+\infty} PSF(x-\xi,y-\eta)I_{obj}(\xi,\eta)d\xi d\eta\right]\cdot I_{ph}(x-x_0,y-y_0)dxdy.$$

交换积分次序后，我们得到

$$= \iint_{-\infty}^{+\infty}\left[\iint_{-\infty}^{+\infty} PSF(x-\xi,y-\eta)I_{ph}(x-x_0,y-y_0)dxdy\right]\cdot I_{obj}(\xi,\eta)\,d\xi d\eta.$$

假设针孔函数是对称的，我们有

$$= \iint_{-\infty}^{+\infty}[\iint_{-\infty}^{+\infty} PSF(x-\xi, y-\eta) I_{ph}(x_0 - x, y_0 - y) dxdy] \cdot I_{obj}(\xi, \eta)\, d\xi d\eta.$$

Let $x' = x - \xi$ and $y' = y - \eta$, the equation becomes

$$= \iint_{-\infty}^{+\infty}[\iint_{-\infty}^{+\infty} PSF(x', y') I_{ph}(x_0 + \xi - x', y_0 + \eta - y') dx'dy'] \cdot I_{obj}(\xi, \eta)\, d\xi d\eta.$$

上面括号中的积分可视为 PSF 与 I_{ph}之间的卷积，并取 $(x_0 + \xi, y_0 + \eta)$ 处的值，则方程变为

$$= \iint_{-\infty}^{+\infty}(PSF \otimes I_{ph})(x_0 + \xi, y_0 + \eta) \cdot I_{obj}(\xi, \eta)\, d\xi d\eta.$$

考虑共轭关系（x_0, y_0） = （$-\xi_0, -\eta_0$），可得

$$= \iint_{-\infty}^{+\infty}(PSF \otimes I_{ph})(\xi - \xi_0, \eta - \eta_0) \cdot I_{obj}(\xi, \eta)\, d\xi d\eta.$$

展开荧光分布表达式，可得

$$= \iint_{-\infty}^{+\infty}(PSF \otimes I_{ph})(\xi - \xi_0, \eta - \eta_0) \cdot PSF_{ex}(\xi - \xi_0, \eta - \eta_0) \cdot obj(\xi, \eta)\, d\xi d\eta$$

$$= \iint_{-\infty}^{+\infty}(PSF \otimes I_{ph} \cdot PSF_{ex})(\xi - \xi_0, \eta - \eta_0) \cdot obj(\xi, \eta)\, d\xi d\eta.$$

若考虑到PSF 和PSF_{ex} 也是对称的，则方程变为

$$= \iint_{-\infty}^{+\infty}(PSF \otimes I_{ph} \cdot PSF_{ex})(\xi_0 - \xi, \eta_0 - \eta) \cdot obj(\xi, \eta)\, d\xi d\eta.$$

将该表达式写出后，我们可以将共聚焦中的理想成像识别为物体与有效点扩散函数的卷积，其中

$$PSF_{eff} = PSF \otimes I_{ph} \cdot PSF_{ex}.$$

相应的有效光学传递函数可由对点扩散函数表达式进行傅里叶变换得到

$$OTF_{eff} = OTF \cdot FT\{I_{ph}\} \otimes FT\{PSF_{ex}\}.$$

图　　不同针孔半径下共聚焦系统的有效光学传递函数绘制于图 S6 中。

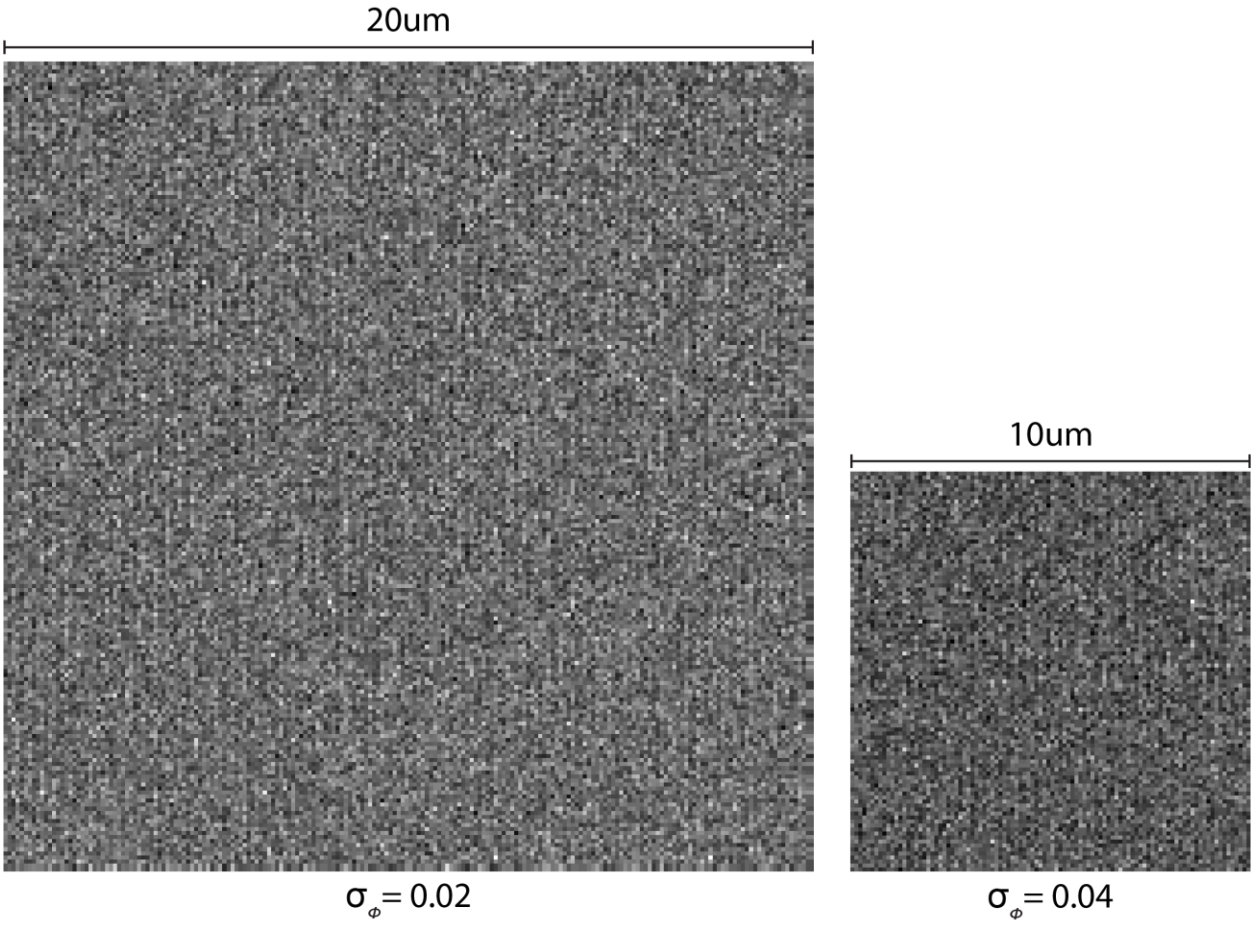


图 S1. 在光子密度恒定为 5000 光子/μm^{2}的条件下，对不同视场下宽场系统的 σ_ϕ 进行计算。图像模拟条件：NA=1.4、发射波长λ=0.7 μm、浸没介质折射率 n=1.5，以及相机像素尺寸 0.1 μm。

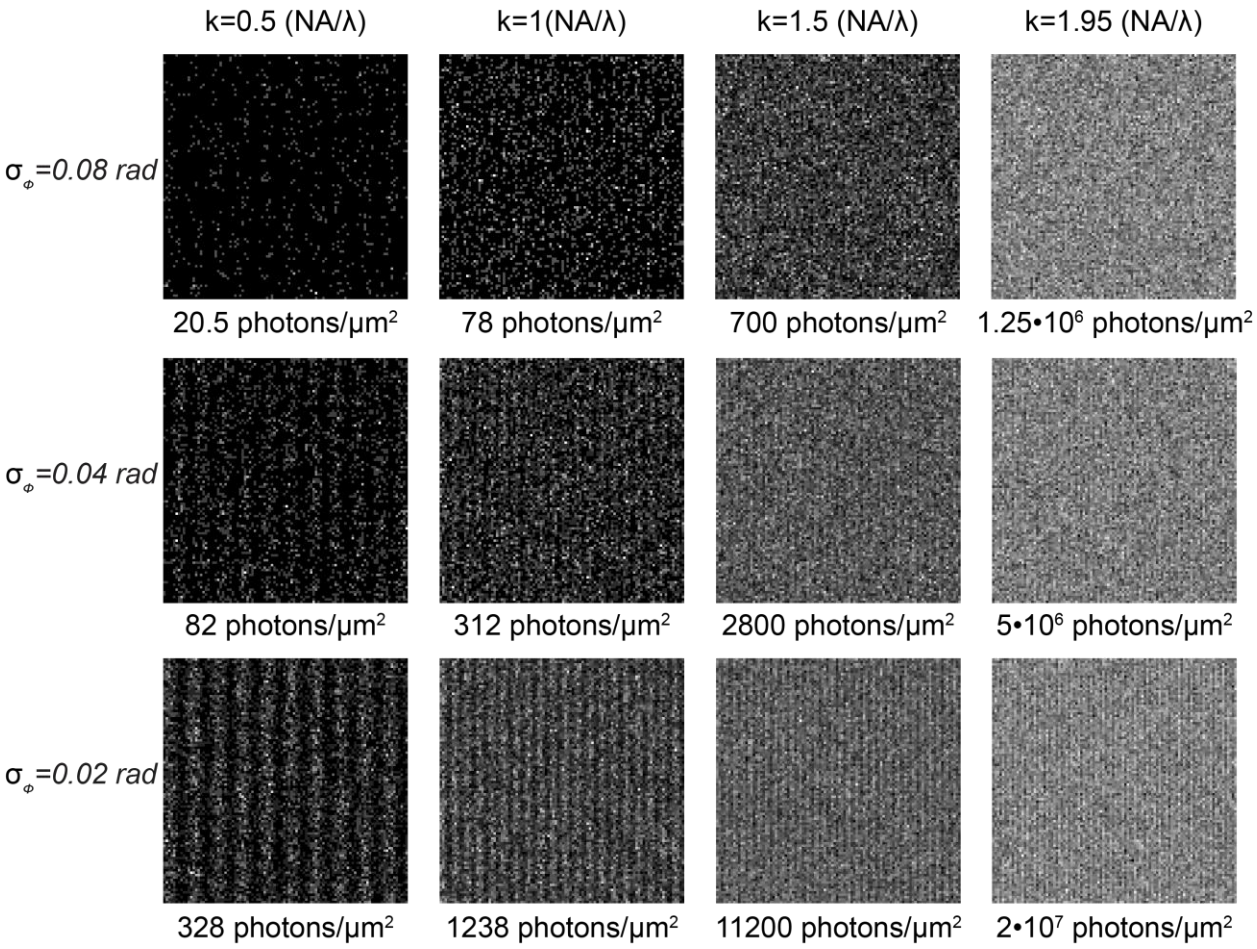


图 S2. 宽场显微镜中不同频率、光子数和 σ_ϕ 范围下的图像可视化。图像模拟条件为：视场 10 μm×10 μm、数值孔径 NA=1.4、发射波长 λ=0.7 μm、浸没介质折射率 n=1.5，以及相机像素尺寸 0.1 μm。

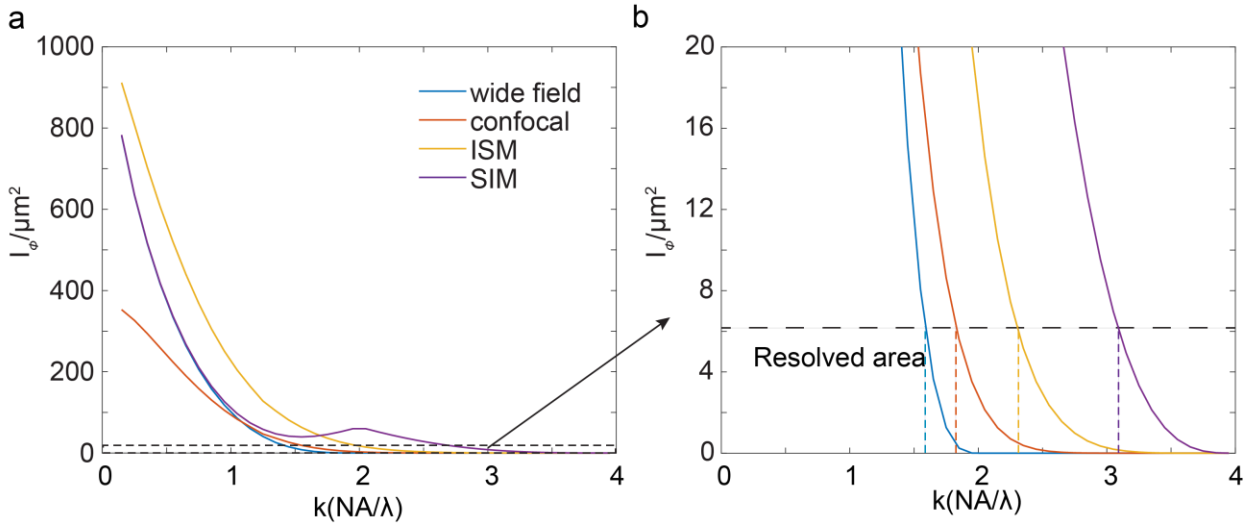


图 S3。（a）不同频率物体在 4 种成像方式下的 Fisher 信息 I_ϕ/μm² 计算。I_ϕ 是 Fisher 信息矩阵 $I(\theta)$ 中的第 3rd 行、第 3rd 列项，其中 $\theta = [\alpha, k, \phi]$。（b）（a）的局部放大图。分辨判据（黑色虚线）定义为 $I_\phi/\mu m^2$ =6.25，约等于 $\sigma_\phi = 0.04$（若考虑 $[\alpha, k, \phi]$之间的零相关性）。彩色虚线表示一种基于单位面积 Fisher 信息定义的 IbR 变体。图中数据是在以下条件下模拟得到的：视场为 10 μm×10 μm，数值孔径为 =1.4，发射波长为 λ=0.7 μm，浸没介质折射率 n=1.5，相机像素尺寸为 0.1 μm。光子密度为 5000 光子/μm²。

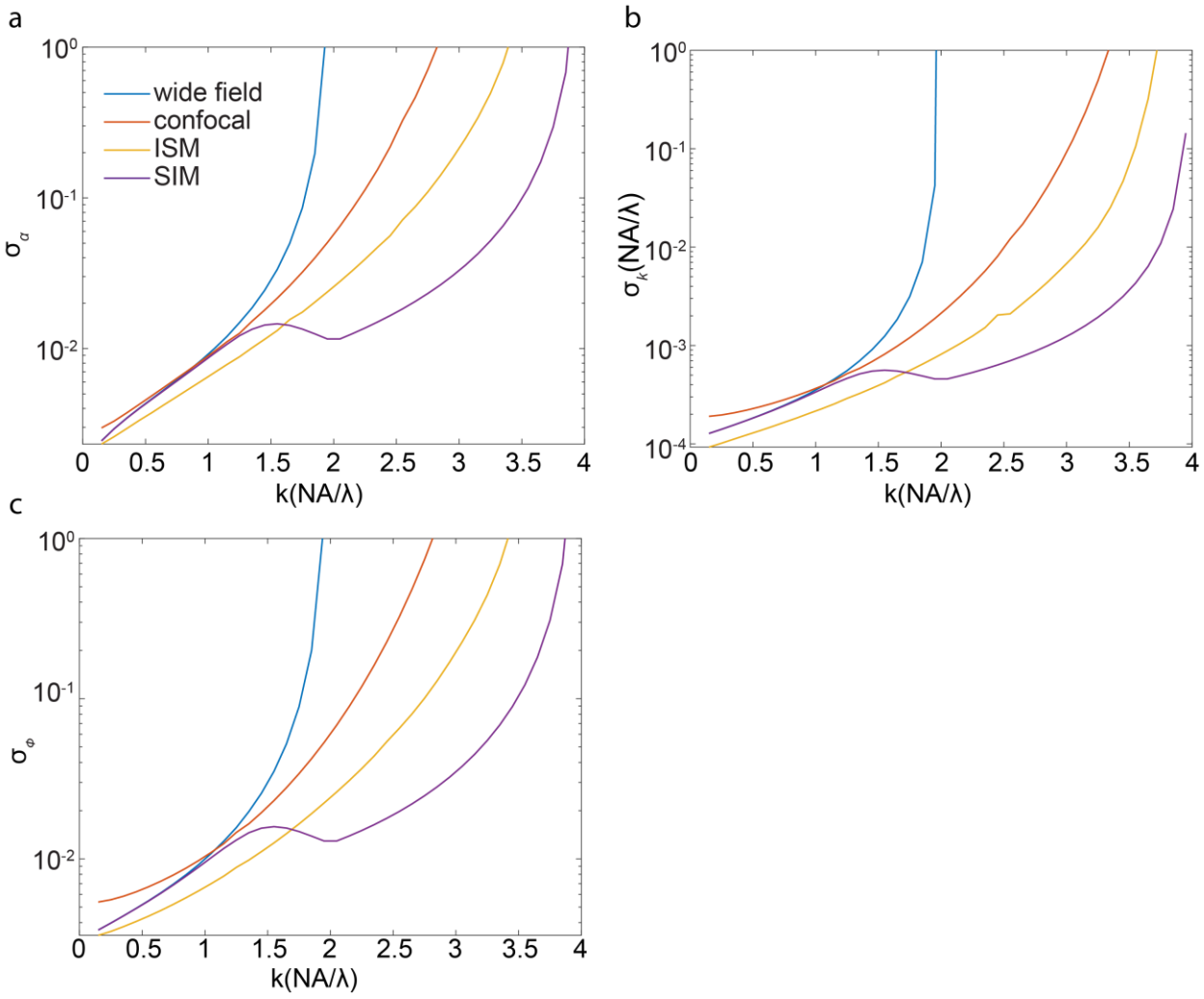


图 S4. $\boldsymbol{\sigma}$ 所有参数下的$[\boldsymbol{\alpha}, \boldsymbol{k}, \boldsymbol{\phi}]$，计算方法与$\boldsymbol{\sigma_\phi}$相同。模拟条件为：视场 10 μm×10 μm，数值孔径 NA=1.4，发射波长 λ=0.7 μm，浸没介质折射率 n=1.5，相机像素尺寸为 0.1 μm。光子密度为 5000 光子/μm^2。

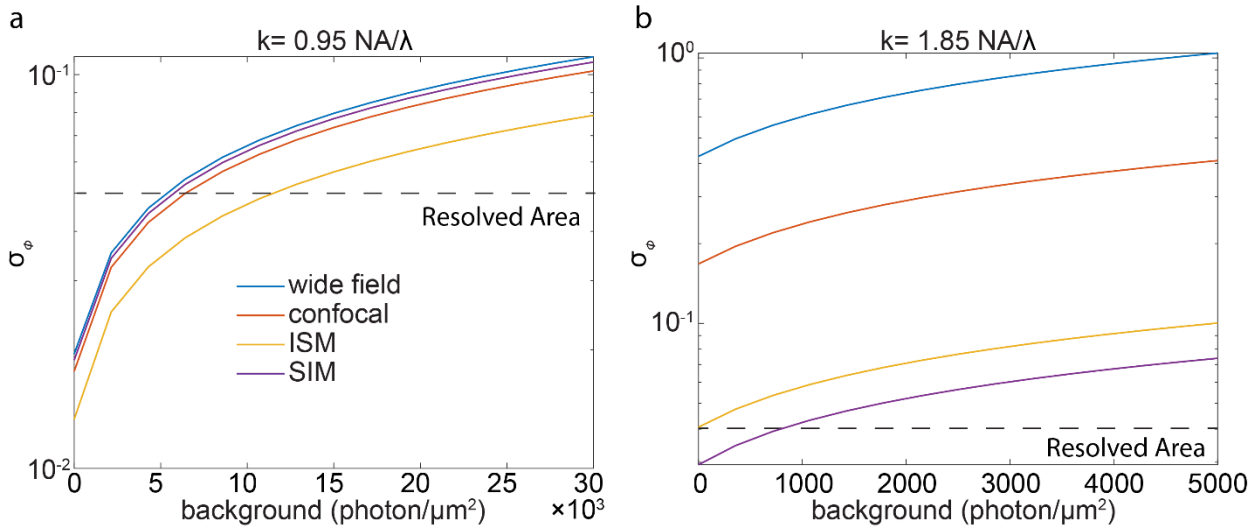


图 S5. $\boldsymbol{\sigma_{\phi}}$ 相对于背景。不同频率的物体的信号光子密度为 1000 光子/μm^2 。模拟图的条件为：视场 10 μm×10 μm，数值孔径=1.4，发射波长 λ=0.7 μm，浸没介质折射率 n=1.5，以及相机像素尺寸 0.1 μm。

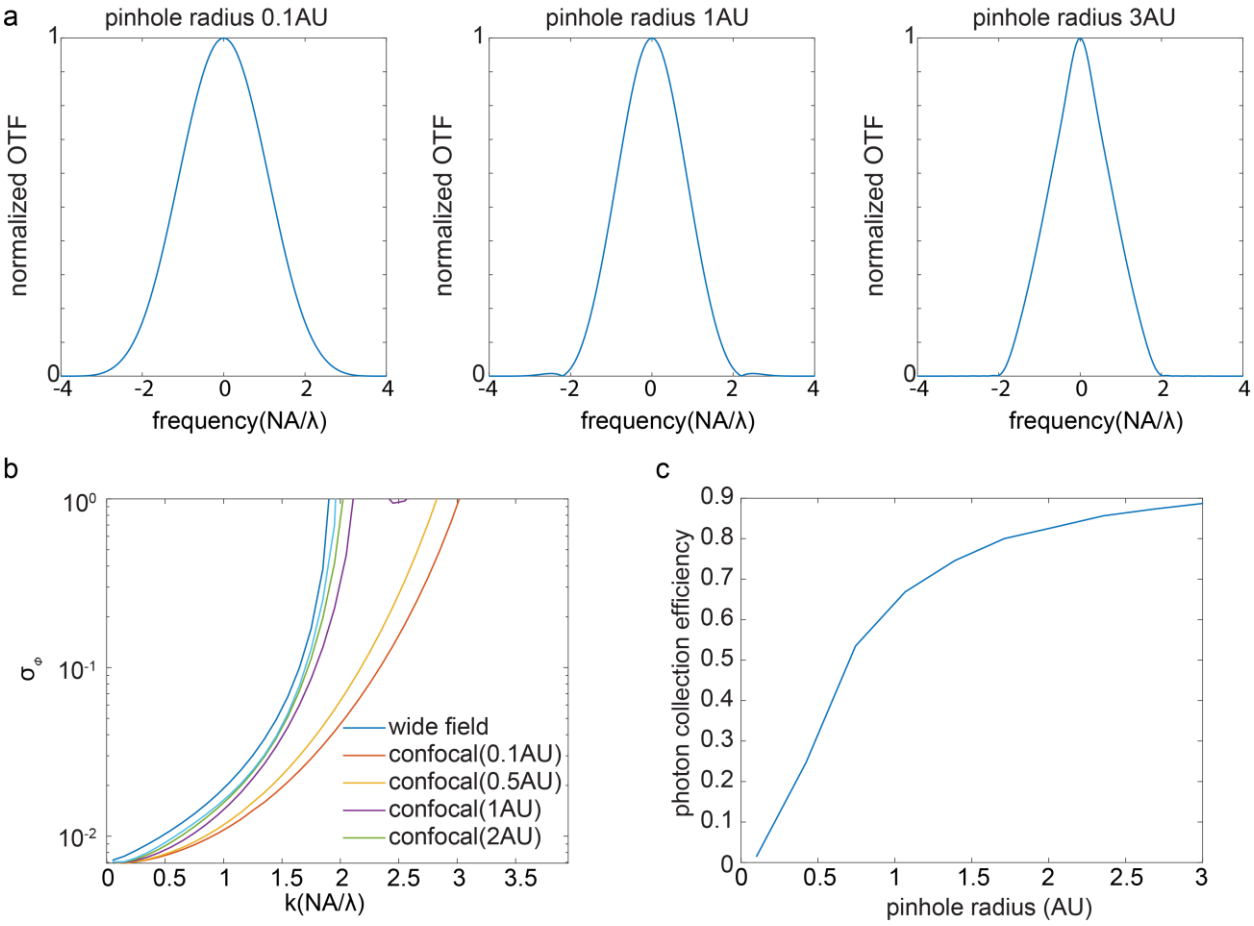


图 S6. 共聚焦系统的性能、光学传递函数和光子收集效率随针孔半径的变化。(a) 共聚焦显微镜的归一化有效光学传递函数。(b) 在收集的光子计数固定时，不同针孔尺寸下绘制的 $\boldsymbol{\sigma_{\phi}}$ 曲线。接收相同数量的光子时，针孔尺寸越小，分辨能力越强。(c) 光子收集效率随针孔半径的变化。(b) 和 (c) 中的曲线均在以下条件下模拟得到：视场 10 μm×10 μm、数值孔径 =1.4、发射波长 λ=0.7 μm、浸没介质折射率 n=1.5，以及宽场系统中的像素尺寸和共聚焦系统中的扫描间隔均为 0.1 μm。

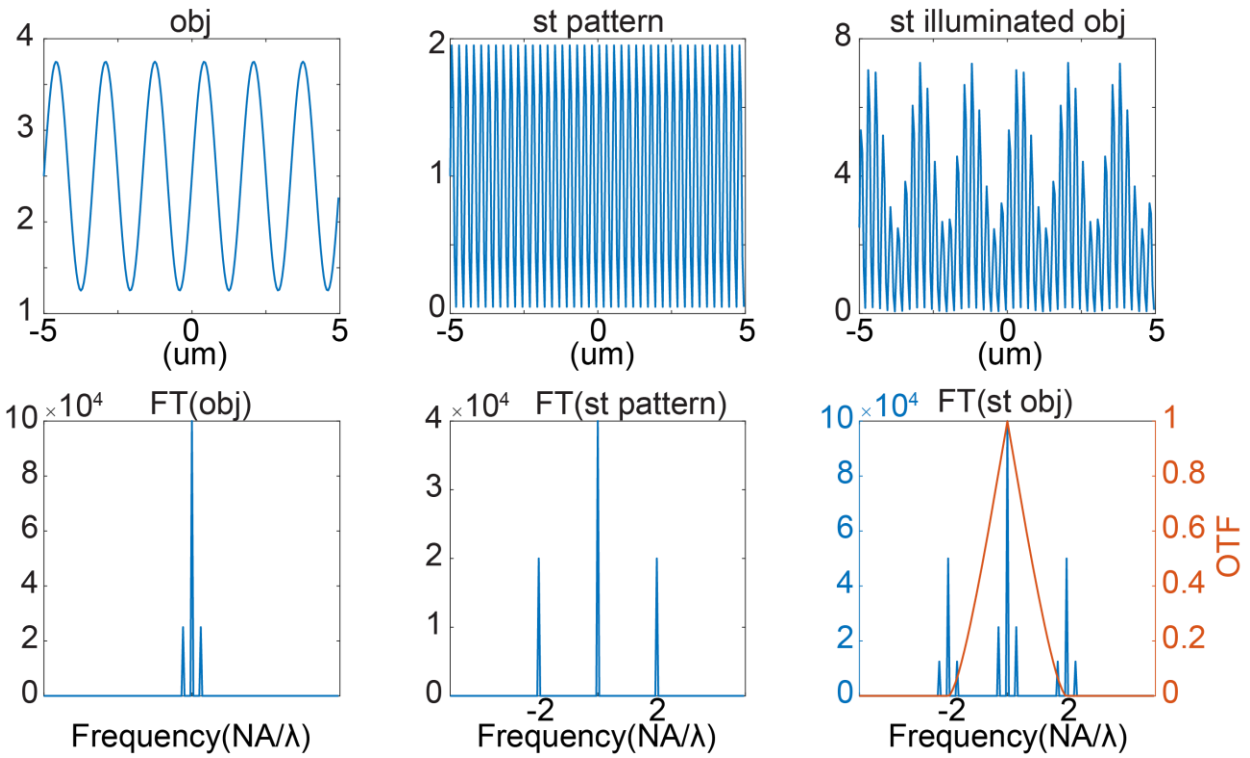


图 S7. 物体频率较低时，采用横向正弦图案照明的结构光显微镜图像的一维可视化。从左至右，依次为荧光团分布、结构光照明图案强度分布和受照物体的荧光分布。上方各图为实空间表示，下方各图为傅里叶空间表示。

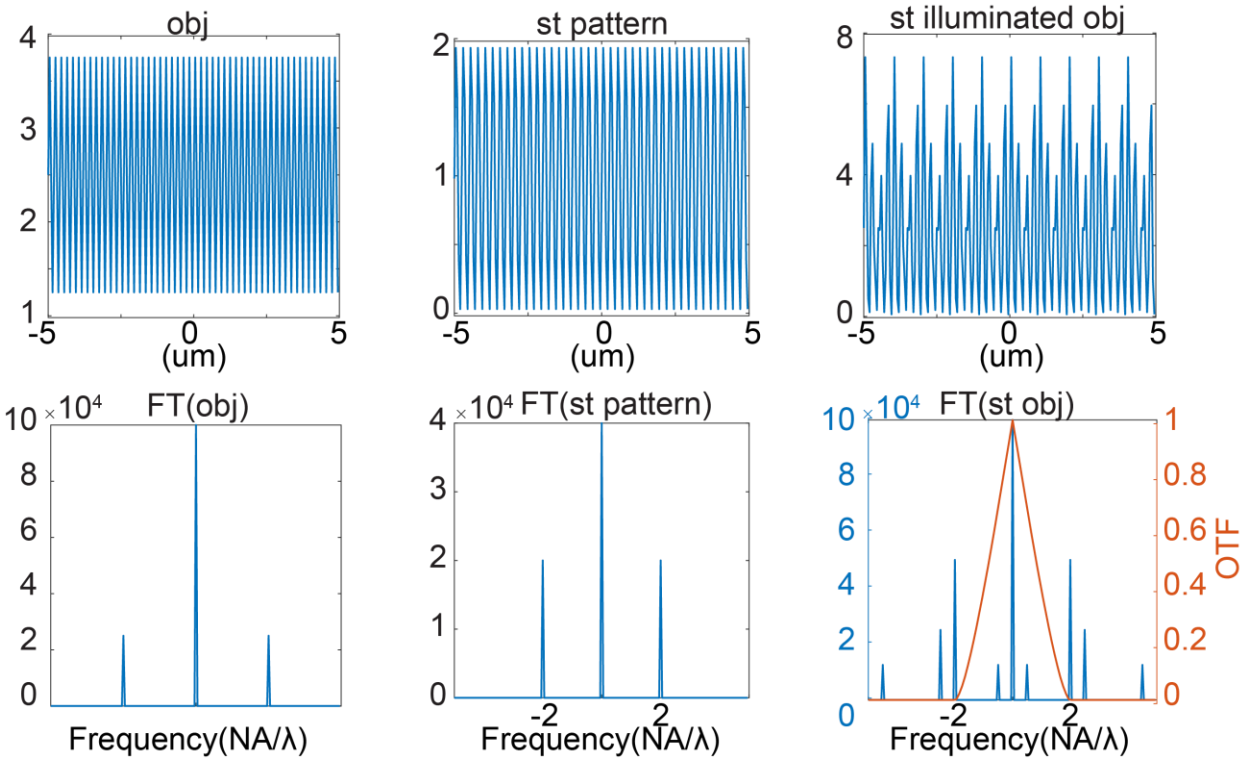


图 S8. 物体具有高频时，采用横向正弦图案照明的结构光显微镜图像的一维可视化结果。从左至右，依次为荧光团分布、结构光照明图案强度分布以及受照物体的荧光分布。上方各图为实空间图，下方各图为傅里叶空间图。

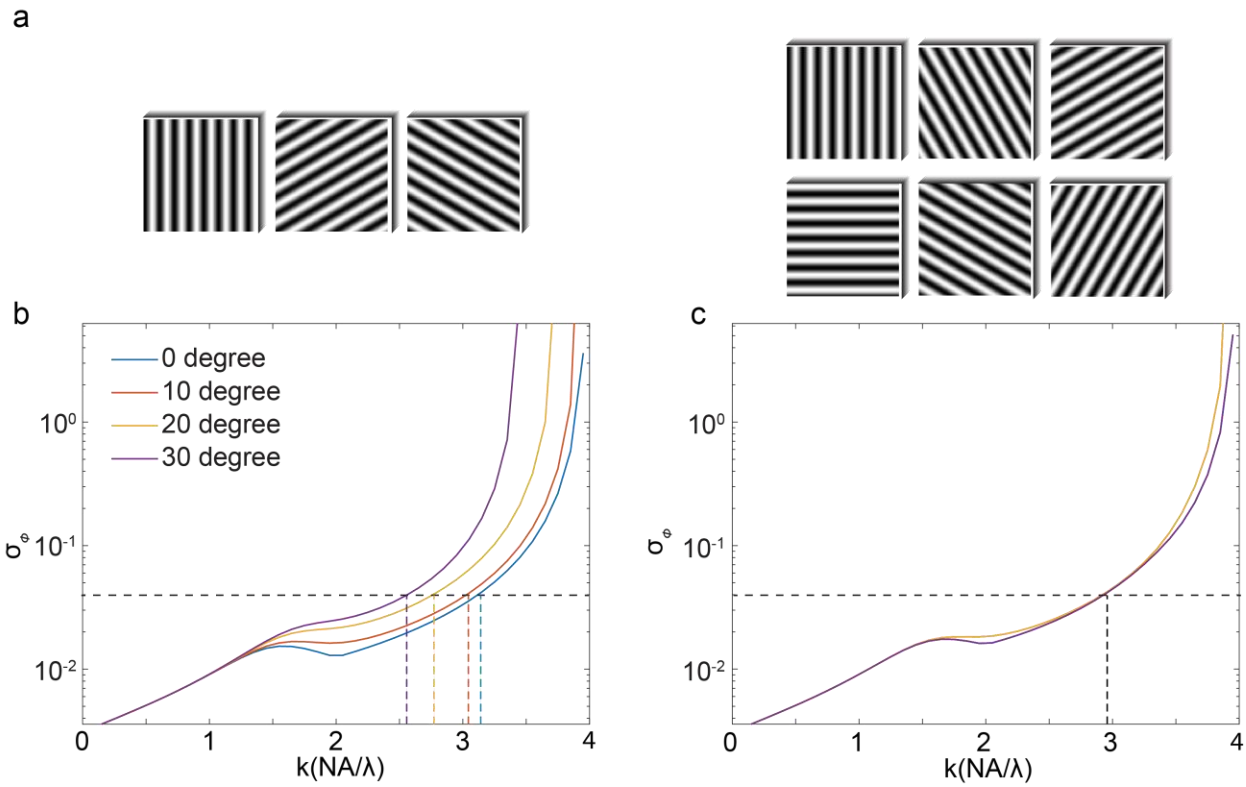


图 S9. SIM 相位估计精度极限 σ_ϕ 与结构照明图案组的初始方向之间的关系。(a) 结构照明图案的可视化。每个图标（一个方向的结构照明图案）包含 3 个相位的图案。(b) σ_ϕ 的 SIM 结构照明图案组包含 3 个方向。图中绘出了照明图案组的 4 个初始方向（角度表示顺时针旋转的度数）。(c) σ_ϕ 的结构照明图案组包含 6 个方向。(b) 和 (c) 中的图是在以下条件下模拟得到的：视场 10 μm×10 μm、数值孔径=1.4、发射波长 λ=0.7 μm、浸没介质折射率 n=1.5，以及相机像素尺寸 0.1 μm。光子密度为 5000 光子/μm^2。

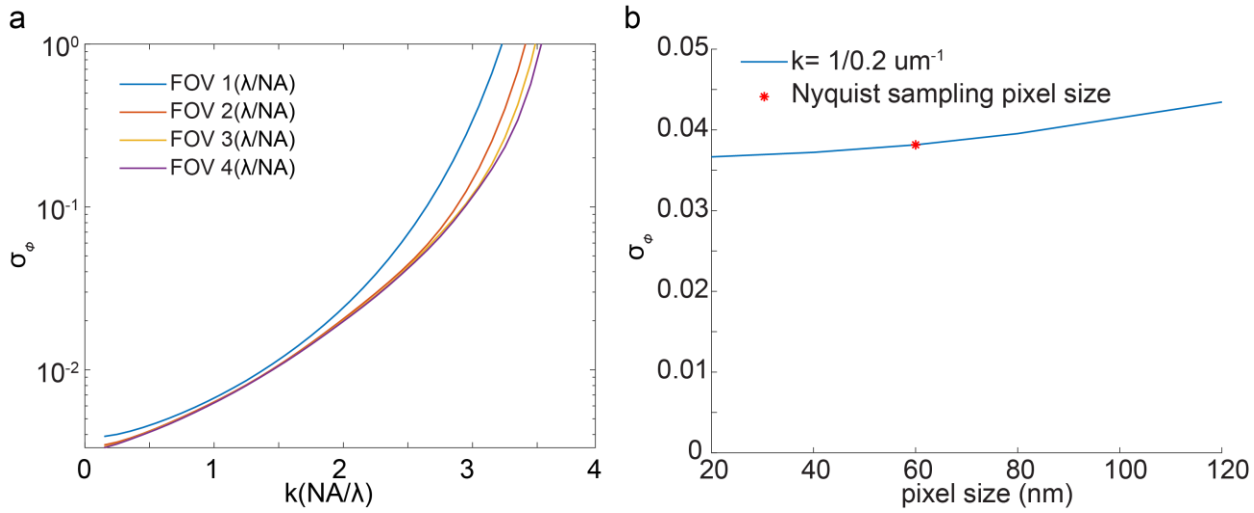


图 S10. 图像扫描显微镜的分辨能力与扫描位置视场及相应相机像素尺寸的关系。(a) σ_ϕ 图像扫描显微镜的分辨能力与不同图像扫描显微镜视场尺寸（每个扫描位置对应的相机尺寸）的关系。相机视场大于 $\frac{2\lambda}{}$ 时，彼此之间的$_{NA}$影响很小。(b) σ_ϕ 图像扫描显微镜的分辨能力与相机像素尺寸的关系。视场为 $\frac{4\lambda}{NA}$。图像扫描显微镜最高频率对应的奈奎斯特采样像素尺寸为 $\frac{1}{2*}(k_{obj}+k_{illumination})$。我们发现，图像扫描显微镜中相机的像素尺寸对其分辨能力影响很小。模拟条件：视场10 μm×10 μm，数值孔径=1.4，发射波长 λ=0.7 μm，浸没介质折射率 n=1.5。光子密度为 5000 光子/μm^2。