arXiv:2305.05542v1 [eess.SP] 7 May 2023

使用神经网络进行超高密度发射体定位

Armin Abdehkahka 和 Craig Snoeyink*

布法罗大学机械与航空航天工程系

电子邮箱：craigsno@buffalo.edu

电话： +1(716) 645-1468

摘要

单分子定位显微术（单分子定位显微镜）拓展了我们观察亚细胞结构的能力，但其时间分辨率有限。提高发射体密度可以改善时间分辨率，但当发射体图像大幅重叠时，现有分析算法难以应对。本文介绍了一种名为 LUENN 的深度卷积神经网络，它采用独特的架构，摒弃了孤立发射体假设；对于从完全孤立到彼此共定位的发射体，它都能平稳地处理。该架构结合了能够准确估计位置不确定性的估计器，将可用发射体密度范围扩大了 6 倍，达到每$/\mu m^2$ 超过 31 个发射体，同时降低了对定位精度的影响，并提高了时间分辨率。除了提供不确定性估计外，该算法还通过缩短成像时间并降低实验成功所需的条件，提升了其在实验室中的易用性。

关键词：超分辨率显微镜、人工智能、深度卷积神经网络、定位、三维重建

引言

STORM[1], 、PALM[2], 、STED[3], 等超分辨率方法[4–6] 通过将生物过程可视化到衍射极限[7,8]之外，彻底改变了生物科学。STORM 和 PALM 均基于定位显微术，尤其凭借其灵活性和高分辨率产生了重大影响，但代价是时间分辨率较低，且数据分析计算开销巨大[9]。基于深度学习和卷积神经网络（CNN）[10–13] 的算法在克服这两项缺点方面取得了显著进展：它们将分析时间缩短了数个数量级，并通过提高每张图像中可分析的发射体密度，提升了时间分辨率。

通过提高 AI 算法可接受的发射体密度来提升时间分辨率，需要以牺牲精度和准确度为代价；随着发射体密度增加，精度会迅速下降[10–13]。这实际上限制了可用的发射体密度，超过这一限值后，定位精度和检测准确率便不再令人满意。我们推测，这一限制源于当前最先进的卷积神经网络定位算法的架构中内置的孤立发射体假设；这些算法经过构建和训练，旨在返回与各个发射体三维位置相对应的离散位置。随着发射体密度增加，发射体图像显著重叠的可能性也越来越大，这些神经网络便难以给出连贯的结果。

基于卷积神经网络（CNN）的定位算法虽然计算效率高，但在低信噪比下也存在一种独特的偏差，会将位置推向像素中心[10–12]。这种所谓的棋盘格效应[14,15] 会在重建图像中造成明显的棋盘状图案，其排列与采集图像时使用的像素网格一致。通过滤波在一定程度上减轻这一影响已取得一些成效，但代价是识别准确度降低[13]。我们推测，这些伪影是由使用某些类型的池化和上采样操作造成的[16] ，通过选择合适的上采样方法[17], 并结合亚像素卷积[18]，即可消除这些伪影。

我们提出了一种新型架构——基于神经网络的超高密度发射体定位（LUENN）。该架构旨在不对发射体是否相互孤立作任何假设，并确保在低信噪比下不存在偏差。其实现方式是减轻神经网络的负担：不再要求它返回离散的发射体位置，而是让神经网络输出一对上采样网格，其中包含平滑变化的函数，分别表示发射体横向位置和深度的似然。这种输出设计，加上在层间上采样时避免使用最近邻插值，使基于神经网络的定位算法能够以极小的精度损失分析密度高得多的发射体，在低信噪比（SNR）下不产生偏差，并准确估计发射体定位不确定性。

方法

LUENN 是一种自编码器模型，在帧中集成了用于同时检测和定位发射体的新输出。该模型基于 U-Net 架构设计，U-Net 架构广泛用于多种定位算法[19–22]，由编码器和解码器阶段组成，如图 1 所示。解码器阶段整合编码后的空间信息，并将输出映射到复数域中的两张超分辨率（$\times 4$）图像上，如图 1a 所示。发射体的横向与深度信息通过复数表示层耦合，以促进训练；这与通过点扩散函数的深度相关变化耦合横向与深度定位信息的方式相似，而后者是实现三维定位所必需的。类似于数字信号处理[23]，中的复分析，这两个通道的范数包含每个发射体在亚像素尺度上的二维高斯分布，其质心被设定为二维位置（在 X-Y 坐标中），相应的相位则表示发射体在轴向（z）上的深度。有关 LUENN 架构的更多细节，请参见补充图 1。

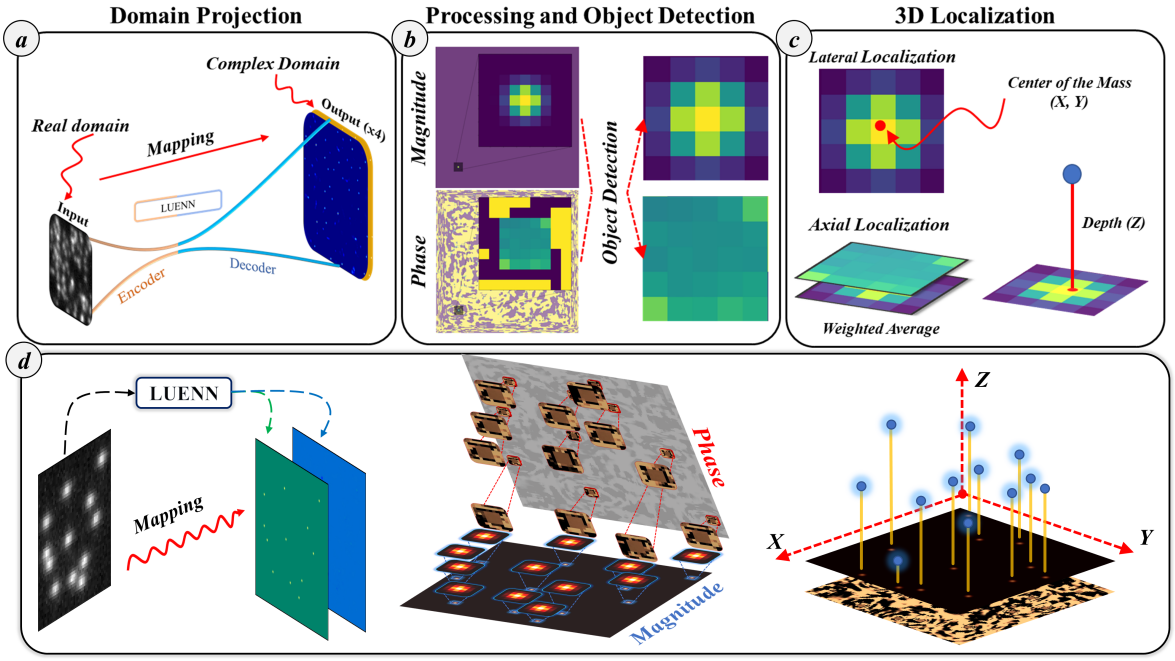

图 1：**LUENN 的图像处理流程。a.** 图像到图像的变换以及从实数域到复数域的投影。**b.** 通过相位和幅度计算进行目标检测与逆变换。**c.** 对检测到的目标进行横向和轴向定位。**d.** 低分辨率模拟帧的完整处理步骤。

这种表示方式使神经网络无需估计离散的发射体位置，而是改为估计每个子像素位置处发射体似然的模拟值及其深度。LUENN 的训练采用监督学习方法，该方法基于 Spieser 等人提出的逼真帧模拟方法[13]。训练时，将发射体真实值分布相加，从而实现从完全分离到完全重合的平滑过渡。

将这种灵活性引入神经网络输出后，需要进行额外的后处理以估计发射体位置。如图 1c 所示，这一过程表现为在上采样后的横向似然图像中寻找峰值并进行亚像素定位。通过对峰值进行亚像素插值，可以估计发射体的横向位置[24]。随后，根据相位图估计发射体的深度，并按照相应横向似然峰值的强度进行平均和加权。

LUENN 输出设计的另一项优势是，它能够揭示神经网络对其结果的相对确定性和预测置信度水平；具有高不确定性的发射体的输出分布，除其他特征外，往往也更加宽广。我们训练了另一个卷积神经网络，用于分析主神经网络的输出，并提供 x、y 和 z 方向总体均值误差的估计值。由此可以准确估计底层位置的总体统计量，并利用这些统计量高效地筛选结果，从而针对给定实验优化精度与定位准确度之间的权衡。

这些架构设计选择带来的结果是：即使在超高密度发射体图像中，该算法也能生成精确的定位估计。图 2 展示了 LUENN 的多项性能指标，例如，在不进行滤波的情况下，即使在图 2e 中发射体密度为 1 个发射体/μm^2 时，它仍能以极小的代价保持较高的检测准确率。当发射体密度超过 1 个发射体/μm^2 后，正如预期，针对低、中等和高信噪比，使用 Jacardian指数（JI）[9], 测得的检测准确率会持续下降，而定位精度则呈现出一种定位算法前所未有的行为。随着发射体密度增加，此处使用均方根误差（RMSE）[9], 测得的定位精度先增加，随后趋于平稳。据我们所知，所有其他定位算法在发射体密度增加时，定位精度都会单调增加，实际上形成了一道屏障，使得超过该屏障后再提高发射体密度变得不切实际。对于 LUENN，这道屏障依然存在，但其主要受发射体检测准确率驱动，并且比当前最先进的人工智能驱动的定位算法（如 DECODE）高出近五倍，即约为 31 个发射体/μm^2。

该算法在发射体密度不断增加的情况下仍具有良好的鲁棒性，因此能够以最小的定位精度损失换取更高的时间分辨率。例如，在一项低信噪比实验中，发射体在帧内随机分布，当发射体密度从 1 个发射体/μm^2 增加到 31 个发射体/μm^2, 时，成功定位的发射体数量将增加至原来的三倍以上，同时三维定位精度从 51

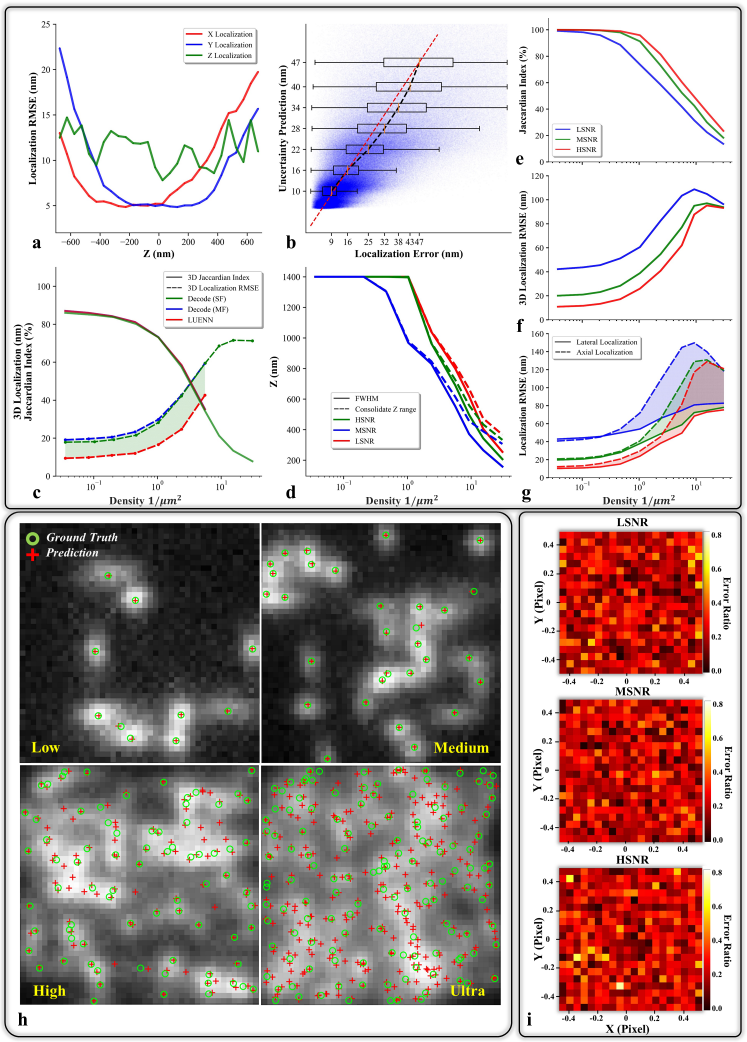

图 2：**LUENN 结果。a.** 高信噪比下的单发射体定位结果。**b.**展示对发射体群体平均误差进行估计的能力。结果来自密度相对较高（0.46 至 1.03 个发射体/μm^2 ）且背景强度随机变化的模拟帧。误差棒表示发射体群体定位误差的标准差。**c.** 定量比较 LUENN 的检测准确率（JI）和定位精度（RMSE）与 DECODE 单帧（SF）及多帧（MF）在中信噪比下的表现。比较时改变了模拟参数（见图 3）。**d.** 像散成像模式下，随发射体密度变化的可用测量深度。**e-g.** 进一步展示 LUENN 定位性能随发射体密度的变化；h）可视化展示 LUENN 在发射体密度最高达 31 个发射体/μm^{2}时的定位结果。**h.** LUENN 在低、中、高和超高密度示例模拟帧中的检测与定位性能。（i）展示低、中、高信噪比定位不存在像素级定位偏差。

从79 nm降至79 nm。这表明，为生成超分辨率重建，所需采集的帧数可减少至原来的三分之一。

尽管这种潜在的时间分辨率三倍提升令人欣喜，但需要注意的是，用户所获得的灵活性极大。在高密度和超高密度条件下，LUENN 的定位精度和时间分辨率对发射体密度相对不敏感。将发射体密度从15 emitter/μm^2 加倍至30 emitter/μm^2 ，将产生大致相同数量的正定位发射体，且不会降低定位精度。因此，发射体密度在15 emitter/μm^2 至30 emitter/μm^{2}之间时，会产生非常相似的实验结果。

如图2d所示，超高密度发射体定位精度的提升并不会带来像素内定位偏差。传统上，在其架构中采用上采样的基于神经网络的定位算法，在低信噪比实验中会产生像素级偏差[13]。DECODE 等最先进的基于人工智能的方法通过增加滤波成功消除了这些误差，但这必然会降低其检测准确率。在卷积神经网络中，上采样层采用双线性插值而非最近邻插值，可以消除这种偏差以及对强滤波的需求。最终，这既提高了测量的准确度和精度，也最大限度地减少了用户在滤波方面的决策。

由于定位不确定性估计器准确，筛选决策变得简单明了。图2b以散点图的形式展示了不确定性估计器的结果，其中每个定位的估计平均误差以实际误差为函数绘制。实际误差的平均值与估计的平均定位误差密切吻合，并根据 LUENN 网络输出的特征，成功估计了每个单独发射体的总体统计量。随后，用户可以利用这一不确定性估计，高效筛选定位结果；必要时，可通过牺牲检测准确率（JI）来降低不确定性。本研究始终采用这一方法。例如，在下文与 DECODE 结果的比较中，我们调整了不确定性阈值，使检测准确率与

图 3 与已发表的 DECODE 结果[13]的对比。

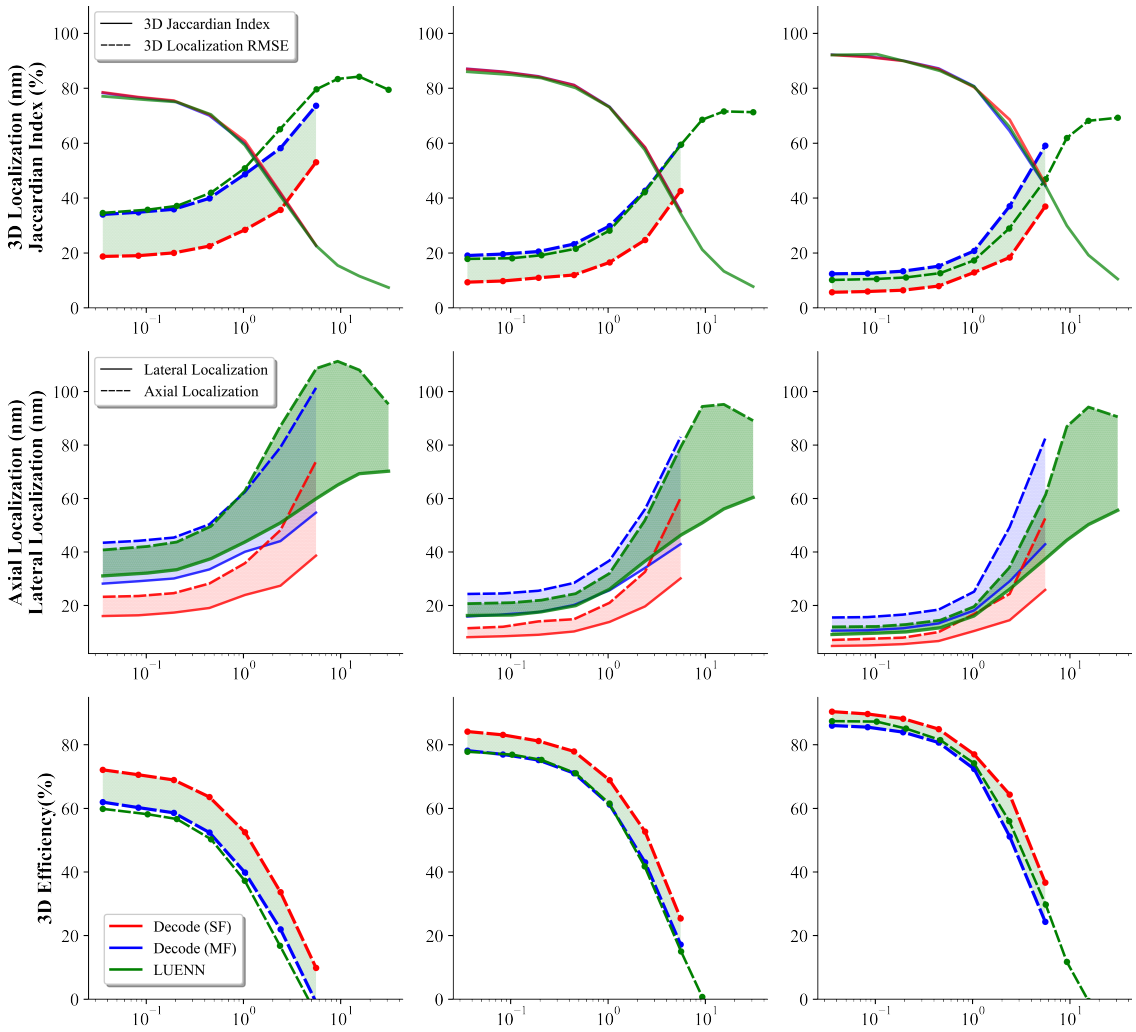

图 3：在低、中、高三种不同信噪比下（分别对应左、中、右），对 LUENN 与 DECODE 的单帧和多帧性能进行定量比较。在每种模式下，我们将 LUENN 的三维 JI（第一行图中的实线）与已发表的 DECODE 结果进行匹配，以展示三维定位均方根误差的独特表现：该误差在超高发射体密度下开始趋于平稳；当发射体密度达到或超过 5 emitter/μm^2 时，其表现可与多帧 DECODE 相当或更优。最后一行显示，LUENN 的三维效率高于单帧 DECODE、低于多帧 DECODE；但在超高发射体密度下，LUENN 的效率开始与多帧 DECODE 相当，随后更胜一筹。

如图3所示，这些结果与当前最先进的 AI 驱动 DECODE 算法相比表现良好。在发射体密度低于 5 emitter/μm^2 时，LUENN 在低信噪比下的表现略差，在高信噪比下的表现更好。高于 5 emitter/μm^2 时，

目前尚无已发表的结果可供比较，但值得注意的是，LUENN 打破了 DECODE 结果所显示的趋势：随着发射体密度增加，精度越来越差；同时，它还降低了检测准确率随发射体密度增加而下降的速率，进一步提升了时间分辨率。

我们已将 LUENN 应用于 SMLM 2016 挑战赛、Speiser 等人和 Li 等人提供的多个数据集[9,13,25]，结果见图 4 和图 5。在低信噪比的实验数据中，消除像素级偏差的优势也显而易见：即使不使用额外滤波，结果也不会被强行限制在像素中心。图 4a 展示了 SMLM 挑战赛数据集中的微管蛋白网络[9,25]，图 5b 展示了核孔复合物（NPCs）的重建图像[13]。图 4a 表明，LUENN 算法能够忠实地重建微管蛋白，包括其圆形横截面，如 $A - A'$ 横截面图所示。在核孔复合物重建图像中，135 nm 的孔径也得到了忠实重建。这些结果是在未经滤波的情况下获得的，提升了 JI，并有望改善时间分辨率。

LUENN 算法在活细胞时间分辨定位重建中也表现出良好性能。图 4b 展示了对标记有 α-甘露糖苷酶 II-mEos3.2[13] 的高尔基体进行快速活细胞单分子定位显微镜成像的结果。在***III*** 和***IV*** 时间序列视图中，可以观察到高尔基体结构随时间的演变。图 5a 展示了对标记有钙联蛋白-mEos3.2[13] 的内质网进行快速活细胞重建的结果。在***I*** 和***II***时间序列视图中，记录了整个实验期间内质网的生长与解构。此处在背景上展示了完整的时间序列，并按帧编号进行颜色编码，清晰呈现了该结构的演变。

讨论与结论

LUENN 定位算法采用独特的卷积神经网络架构，旨在实现从完全孤立到完全重叠的发射体之间的平滑过渡，并且

该算法没有偏差。此架构揭示了结果中的不确定性，从而能够开发出第二个卷积神经网络，用于准确估计定位不确定性。二者结合后构成了一种三维定位算法，即使发射体密度发生变化，也具有出色的鲁棒性。

最引人注目的是，随着发射体密度增加，LUENN 的定位精度表现。就我们所知，所有定位算法都会因发射体图像重叠程度不断增加而出现精度下降。相比之下，LUENN 在高发射体密度下（> 5发射体/μm^2）的精度趋于平稳，使可接受的发射体密度比当前最先进的算法提高了 6 倍。将其应用于时间压缩后的 SMLM Challenge MT0 数据集时，与单发射体情况相比，时间分辨率提高了 30 倍，同时定位精度约损失 30 nm。

时间分辨率的提升以及定位精度的损失对发射体密度变化具有稳健性，这使实验设计更加容易。实验允许的发射体密度范围得以扩大，从而降低实验设计要求并减少实验迭代次数[26]。

致谢

作者感谢 Artur Speiser、Srinivas Turaga 博士和 Jakob Macke 博士给予的帮助并与他们交流；若没有他们的协助，就不可能对当前最先进的 DECODE 算法进行基准测试。

补充信息

LUENN 是一种自编码器网络，可学习低分辨率帧与高分辨率帧之间的非线性映射函数。如补充图 6 所示，LUENN 是一种非常深的卷积编码器 - 解码器网络，具有对称的跳跃连接-

。编码器阶段充当特征提取模型，用于表示输入数据的压缩知识，并提取输入帧的独立特征。我们利用了现有先进的 VGG19 的优势，该模型专门用于构建超深度卷积网络，以实现大规模视觉识别。VGG19 包含 16 个用于学习特征的卷积层，且所有卷积层均具有相同的卷积核尺寸和步幅，即采用步幅为 1 的 3x3 滤波器、ReLU 激活函数以及一个像素的零填充。在每个卷积块的末尾，都设有一个下采样因子为 2 的池化层。

网络中的解码器阶段旨在整合编码器阶段提取的信息，由两个步骤组成：第一步将编码器阶段的输出通过四个卷积块上采样至与输入帧相同的尺寸。该阶段中相互镜像的模块与编码器阶段之间设有跳跃连接。每个跳跃连接都会将编码器模块最后一次激活的结果与解码器中对应模块的输入拼接起来。这些跳跃连接用于将特征从编码器路径传递到解码器路径，以恢复下采样过程中丢失的空间信息，从而实现特征重用，并稳定深层架构中的梯度更新。这提高了训练的稳定性和模型的收敛性。第二步包含两个稠密连接的卷积块，每个卷积块均将图像上采样 2 倍，并在复数域中预测超分辨率（X4）图像的通道。这两个通道包含在三维空间中定位发射体并评估预测不确定性所需的信息。

分步训练和损失函数。图像到图像转换问题通常被表述为逐像素回归问题，在此过程中，模型通过最小化损失函数，学习重建图像与标注图像之间的端到端映射函数。均方误差（MSE）是逐像素图像比较中常用的损失函数。如补充图 7a 所示，它通过计算每个像素平方差的平均值，得到预测图像与

真实图像之间的差异。由于能够清晰地衡量预测图像与真实图像之间的差异，并且可以使用梯度下降方法轻松优化，因此它是图像到图像转换问题中的常用选择。在优化过程中，我们采用了 ADAM 优化方法，并在迁移学习阶段之后安排了 4 个步骤。除前两个阶段外，每个阶段开始时都将学习率减半，并保持不变。补充图 7b 展示了归一化训练损失和验证损失随训练时间的变化。运行时间是在单个 NVIDIA Tesla V100 GPU 上测量的，所使用的示例模型是在低发射体密度、高信噪比和像散模式下模拟的帧上训练得到的。

训练数据采样颇具挑战性。在深度卷积神经网络中，可训练参数（也称为参数域）的数量庞大；随着每个训练轮次中分析的、具有相似特征的图像增多，过拟合风险也会随之增加。此外，在单分子定位显微镜中，特征域（指特征及其分布的集合）广阔且多样，而可用的带有真实标注的真实实验帧数量有限，因此难以有效训练模型。为应对这一挑战，我们采用了多种技术。首先，我们使用了在 ImageNet 数据集上预训练的 VGG-19，以便在训练初期利用并迁移其已学习的知识。迁移学习有助于提升训练稳定性，并增强模型在目标域上的泛化能力。其次，我们在训练过程中采用了一种利用点扩散函数工程函数生成训练样本的方法。训练数据的在线采样可确保模型不会提取特定样本的特征，也不会在特定帧集合上过拟合。

LUENN 预测与定位的完整计算时间。在单台设备上测量了不同发射体密度下单帧的计算时间

英伟达 RTX 2080 Ti 图形处理器，并在补充材料表1中同时报告了每帧和每个种子的计算时间。一帧的计算时间是预测和定位步骤所需时间的总和。如表中所示，随着发射体密度增加，每帧处理时间也随之增加，这是因为需要定位的种子数量增加了。然而，每个种子的处理时间逐渐减少。需要注意的是，这些处理时间是对所有模拟帧进行测量并取平均值后得到的。

表1：LUENN 定位处理时间

ID	密度 (发射体/μm^2)	每个 种子的处理时间（ms）	每个的处理时间 帧（毫秒）
1	0.035870	16.0	11.1
2	0.103306	8.0	16.0
3	0.206612	7.0	27.9
4	0.464876	4.8	43.1
5	1.033058	2.7	53.7
6	2.376033	1.2	57.3
7	5.630165	0.6	66.9
8	9.297520	0.3	54.8
9	15.49587	0.2	50.8
10	30.99174	0.9	85.9

需要多少数据才够？ 在任何基于数据的统计方法中，确定多少数据才算“足够”都是一个重要问题。数据量会影响计算时间和分析结论。我们需要在不浪费资源的前提下，对评估结果有足够的信心。数据不足可能导致结论和评估不准确，而数据过多则会增加计算复杂度。在单分子定位显微镜（SMLM）中，每帧包含的发射体数量各不相同，即发射体密度不同；每帧都会作为一个样本参与定位评估。在评估中，定位方法的精度通过体积（3D）和横向（2D）均方根误差（RMSE）衡量，并对检测到的发射体取平均。从统计学角度来看，离群值数量增加时，RMSE 会显著变化；只有当数据样本数量覆盖所有可能的取值范围时，其数值才可靠。然而，先前的研究从未回答过这个问题。

研究中，作者只是报告了模拟帧的数量，却没有说明为什么这些样本帧足以用于评估。如果模拟更多帧，定位精度是否会改变？为了从统计学角度回答这个问题，我们首先模拟了 100 帧，并测量定位精度参数。随后逐帧增加模拟帧数并进行处理。这样，我们便能随着模拟的持续进行绘制参数残差，并在残差可以忽略时停止。在补充图 8 中，我们绘制了杰卡德指数、横向均方根误差和体积均方根误差随检测到的发射体数量变化的曲线。通过这种方法，我们发现至少需要 25,000 个种子，且这一数量与帧密度无关。

不确定性估计以及滤波率对定位误差和检测准确率的影响。滤波对定位误差、体积均方根误差、检测准确率和杰卡德指数的影响如补充图10所示。每条曲线对应特定密度下的定位结果，滤波率从 0% 到 85% 不等。在任一滤波率下，都会移除不确定性模型估计出的最差预测结果的一定比例。可以看出，随着滤波率提高，定位精度有所提升，而检测准确率则有所下降。这意味着，移除更大比例的估计精度较低或不确定性较高的预测结果后，剩余预测结果的整体定位准确度会提高，但检测数量会减少。最佳滤波率取决于具体应用，以及定位精度与检测效率之间所需的权衡。

SMLM 2016 数据集的重建质量。补充图 11 展示了 LUENN 在 SMLM 2016 挑战赛数据集上的表现。这些数据集是在像散（左）和双螺旋（右）成像模式下，模拟高发射体密度和低信噪比条件生成的。结果表明，LUENN 能够准确重建真实图像，并在两种成像模式下实现高定位精度。这些数据集中的高发射体密度和低信噪比，是对基于定位的方法最具挑战性的条件，因此 LUENN 的结果更加令人瞩目。总的来说，

表 2：针对所提供的结果训练的不同 LUENN 版本。

模型	强度 (μ, σ)	训练密度 $(1/\mu^2)$	评估密度 $(1/\mu^2)$	SNR	Ref. 图
AI-1	1k,50	0.77	0.04-1.0	Low	2 & 3
AI-2	5k,250	0.77	0.04-1.0	中等	2 & 3
AI-3	20k,1k	0.77	0.04-1.0	High	2 & 3
AI-4	1k,50	4.13	2.4-5.47	Low	2 & 3
AI-5	5k,250	4.13	2.4-5.47	中等	2 & 3
AI-6	20k,1k	4.13	2.4-5.47	High	2 & 3
AI-7	1k,50	15.5	9.3-31	Low	2 & 3
AI-8	5k,250	15.5	9.3-31	中等	2 & 3
AI-9	20k,1k	15.5	9.3-31	High	2 & 3
AI-Tublins	7k,1k	1.22	NA	中等	4a
AI-IiveCell	5k,1.5k	0.85	NA	中等	4b & 5a
AI-NPC	2.5k,700	1.22	NA	中等	5b
AI-AS	1k,300	0.62	0.31	Low	Sup. 11a
AI-DH	3.6k,1k	0.62	0.31	Low	Sup. 11b

结果表明，LUENN 是一种稳健高效的超分辨显微成像算法，能够应对各种成像条件。

参考文献

(1) Rust, M. J.; Bates, M.; Zhuang, X. 通过随机光学重构显微镜（STORM）实现亚衍射极限成像。*Nature Methods* **2006**，*3*，793–796。（2）Betzig, E.; Patterson, G. H.; Sougrat, R.; Lindwasser, O. W.; Olenych, S.; Bonifa- cino, J. S.; Davidson, M. W.; Lippincott-Schwartz, J.; Hess, H. F. 以纳米级分辨率成像细胞内荧光蛋白。*Science (New York, N.Y.)* **2006**，*313*，1642–5。（3）Hell, S. W.; Wichmann, J. 通过受激发射打破衍射分辨率极限：受激发射损耗荧光显微镜。

发射：受激发射损耗荧光显微镜。*Optics letters***1994**，*19*，780–2。

(4) Gustafsson, M. G. L. 利用结构光照明显微镜将横向分辨率极限提高一倍。简短通讯。显微镜学杂志 **2000**，*198*，82–87。

(5) Hell, S.; Stelzer, E. H. K. 4Pi 共聚焦荧光显微镜的特性。*JOSAA* **1992**，*9*，2159–2166。

(6) Sharonov, A.; Hochstrasser, R. M. 通过扩散探针的累积结合实现宽视场亚衍射成像。美国国家科学院院刊 **2006**，*103*，18911–18916。

(7) Liu, S.; Hoess, P.; Ries, J. 用于结构细胞生物学的超分辨率显微镜。生物物理学年度评论 **2022**，*51*，301–326。

(8) Lelek, M.; Gyparaki, M. T.; Beliu, G.; Schueder, F.; Griffi´e, J.; Manley, S.; J ung- mann, R.; Sauer, M.; Lakadamyali, M.; Zimmer, C. 单分子定位显微镜。自然综述：方法入门**2021**，*1*，1–27。

(9) Sage, D. 等。超分辨率搏击俱乐部：二维和三维单分子定位显微术软件评估。*Nature Methods* **2019**，*16*，387–395。

(10) Liu, K.; Qiao, H.; Wu, J.; Wang, H.; Fang, L.; Dai, Q. 通过深度学习利用宽视场荧光显微镜快速进行 3D 细胞追踪。*arXiv* 预印本 *arXiv:1805.05139***2018**,

(11) Boyd, N.; Jonas, E.; Babcock, H.; Recht, B. DeepLoco：使用神经网络进行快速三维定位显微术。*BioRxiv* **2018**, 267096.

(12) Nehme, E.；Freedman, D.；Gordon, R.；Ferdman, B.；Weiss, L. E.；Alalouf, O.；Naor, T.；

Orange, R.; Michaeli, T.; Shechtman, Y. DeepSTORM3D：通过深度学习实现密集三维定位显微成像与点扩散函数设计。*Nature Methods* **2020**，*17*，734–740。

(13) Speiser, A.; M¨uller, L.-R.; Hoess, P.; Matti, U.; Obara, C. J.; Legant, W. R.; Kreshuk, A.; Macke, J. H.; Ries, J.; Turaga, S. C. 深度学习实现快速、密集且高准确度的单分子定位。*Nature Methods* **2021**，*18*，1082–1090。

(14) Sugawara, Y.; Shiota, S.; Kiya, H. 无棋盘格伪影的卷积神经网络。*APSIPA*《信号与信息处理汇刊》 **2019**，*8*，e9。

(15) Odena, A.; Dumoulin, V.; Olah, C. 反卷积与棋盘格伪影。*Distill***2016**，*1*，e3。

(16) Kinoshita, Y.; Kiya, H. 用于避免卷积神经网络中棋盘格伪影的固定平滑卷积层。ICASSP 2020-2020 IEEE声学、语音与信号处理国际会议（ICASSP）。2020;pp3712–3716。

(17) Li, Y.; Huang, Q.; Pei, X.; Jiao, L.; Shang, R. RADet：用于遥感图像任意方向目标检测的特征金字塔网络改进方法与多层注意力网络。《遥感》**2020**，*12*，389。

(18) Aitken, A.; Ledig, C.; Theis, L.; Caballero, J.; Wang, Z.; Shi, W. 无棋盘格伪影的亚像素卷积：关于亚像素卷积、调整大小卷积和卷积调整大小的注记。*arXiv*预印本 *arXiv:1707.02937* **2017**,

(19) Isola, P.; Zhu, J.-Y.; Zhou, T.; Efros, A. A. 使用条件对抗网络进行图像到图像转换。2017 IEEE计算机视觉与模式识别会议（CVPR）。2017；第5967–5976页。

(20) M¨ockl, L.; Roy, A. R.; Petrov, P. N.; Moerner, W. E. 在单分子定位显微术中实现准确、快速的背景

估计：使用深度神经网络 BGnet。美国国家科学院院刊 **2020**，*117*，60–67。

(21) Hyun, Y.; Kim, D. 基于深度学习的单分子定位图像分析。国际分子科学杂志 **2022**，*23*，6896。

(22) Zelger, P.; Kaser, K.; Rossboth, B.; Velas, L.; Sch¨utz, G. J.; Jesacher, A. 利用深度学习进行三维定位显微术。光学快报 **2018**，*26*，33166–33179。

(23) Nikolova, Z.; Iliev, G.; Ovtcharov, M.; Poulkov. 见数字信号处理的应用；Cuadrado-Laborde, C. 编；InTech，2011。

(24) Li, J.; Valentine, J. D.; Rana, A. E. 用于确定高斯峰参数的改进三点高斯法。《核仪器与方法物理研究*A*辑：加速器、光谱仪、探测器及相关设备》**1999**，*422*，438–443。

(25) Li, Y.; Mund, M.; Hoess, P.; Deschamps, J.; Matti, U.; Nijmeijer, B.; Sabinina, V. J.; Ellenberg, J.; Schoen, I.; Ries, J. 使用实验点扩散函数进行实时三维单分子定位。*Nature methods* **2018**，*15*，367–369。

(26) Hess, S. T.; Girirajan, T. P. K.; Mason, M. D. 通过荧光光激活定位显微镜实现超高分辨率成像。生物物理学杂志 **2006**，*91*，4258。

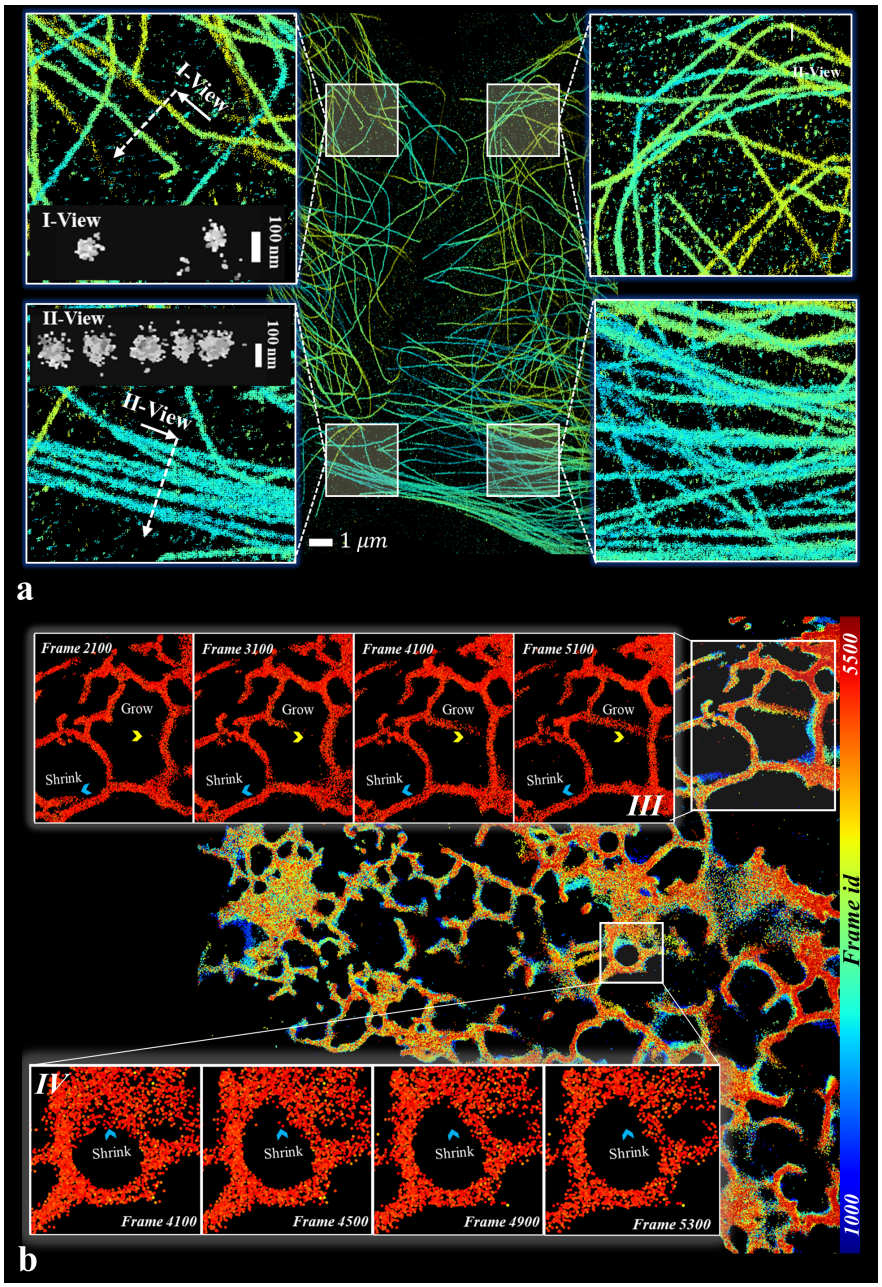

图4：**LUENN 在超高密度标记的微管蛋白和快速活细胞中的重建性能。a.** 使用高浓度抗-α 和抗-β-微管蛋白一抗及 Alexa Fluor 647二抗标记的微管。用于记录数据的相机像素尺寸为 117 × 127 纳米。所示 I 和 ***II*** 视图中放大区域的侧视重建图像。**b.** 在使用 α-甘露糖苷酶 II-mEos3.2标记的高尔基体上进行快速活细胞单分子定位显微镜成像。合并所有帧的定位种子，并按相应的帧编号着色。**II**。生长与收缩显示为合并最后1500帧并依据轴向位置进行渲染。**(补充视频1) IV**。孔洞收缩和增大显示为合并最后1500帧并依据轴向位置进行渲染。**(补充视频2)**。

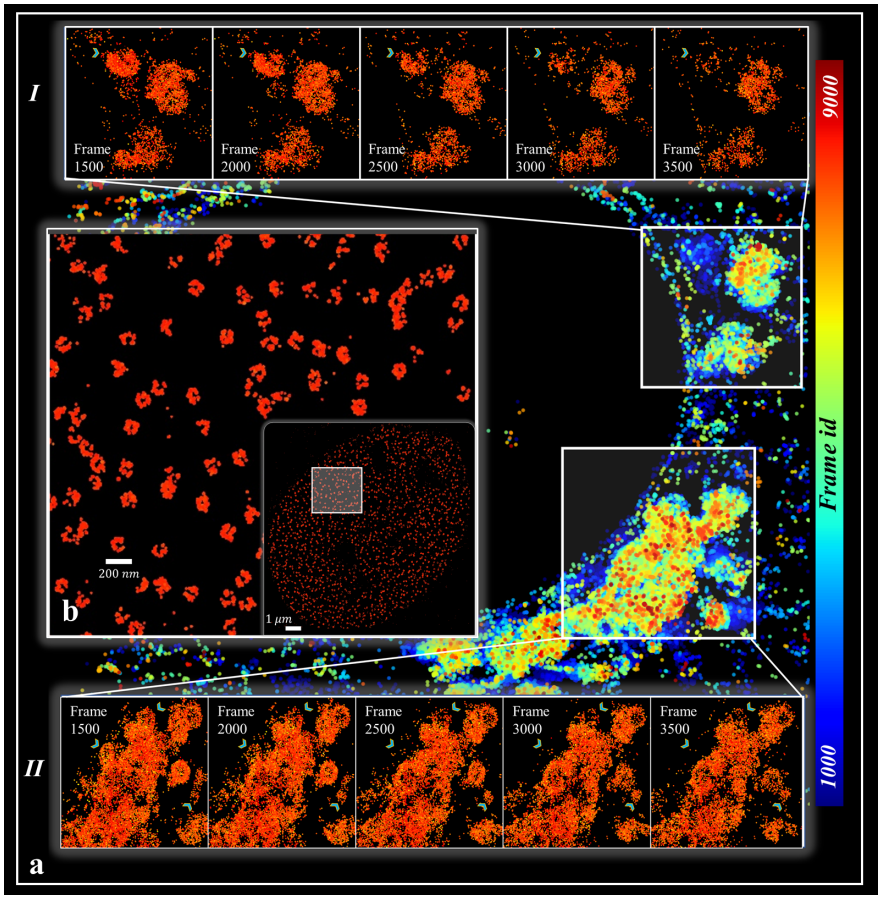

图 5：**LUENN 在快速活细胞和超高标记密度核孔上的重建性能。a.** 使用钙联蛋白-mEos3.2 标记的内质网上的快速活细胞单分子定位显微镜成像。合并所有帧的定位种子，并根据对应的帧编号着色。***I*** 和***II*** 由最后 1500 帧合并后显示，并根据轴向位置进行渲染。**（补充视频 3 和 4）b.** 对核孔复合体蛋白 Nup96-mMaple 进行快速活细胞单分子定位显微镜成像，数据采集时长为 3 秒。放大区域显示在背景上，标注尺寸为 200 nm。

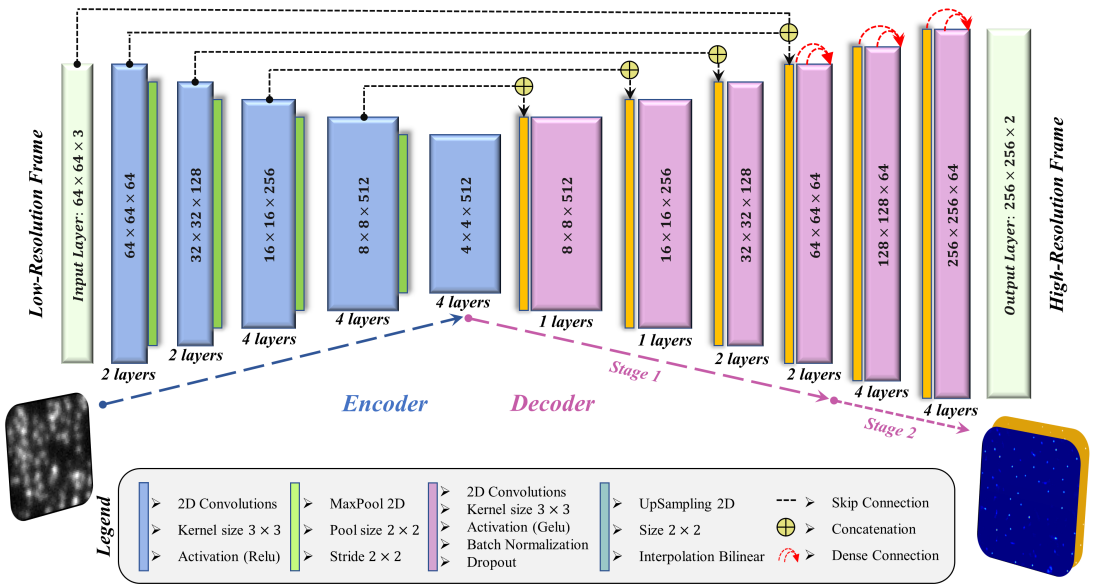

图 6：**LUENN 架构**。所提出的 LUENN 是一种深度卷积编码器-解码器网络，旨在将低分辨率图像映射为高分辨率图像。**编码器**。位于左侧，采用 VGG-19 模型，负责从原始输入帧中提取特征。它包含 5 个卷积块（蓝色块）、16 个卷积层，总计 2000 万个可训练参数。每个卷积块中的卷积层具有相近的通道数和输入尺寸，卷积核尺寸为 3x3、步幅为 1，并采用 ReLU 激活函数。此外，每个块还包含一个池化层（绿色块），通过缩小图像尺寸实现 2 倍下采样，并采用最近邻插值。**解码器阶段**。位于右侧，用于整合提取的特征，并将其映射为复数域中的两幅高分辨率图像。它包含 6 个卷积块（粉色块）、14 个卷积层和 570 万个可训练参数。每个块的输入层都是一个上采样层（橙色块），放大倍数为 2，并采用双线性插值；该层与编码器阶段中镜像对应块的激活相拼接。卷积层由一个卷积核尺寸为 3x3、步幅为 1 的二维卷积层、一个 GeLU 激活函数、一个批归一化层和一个 Dropout 层组成。最后 3 个卷积块（阶段 2 ）的各层采用密集连接，以实现更好的收敛和鲁棒训练。

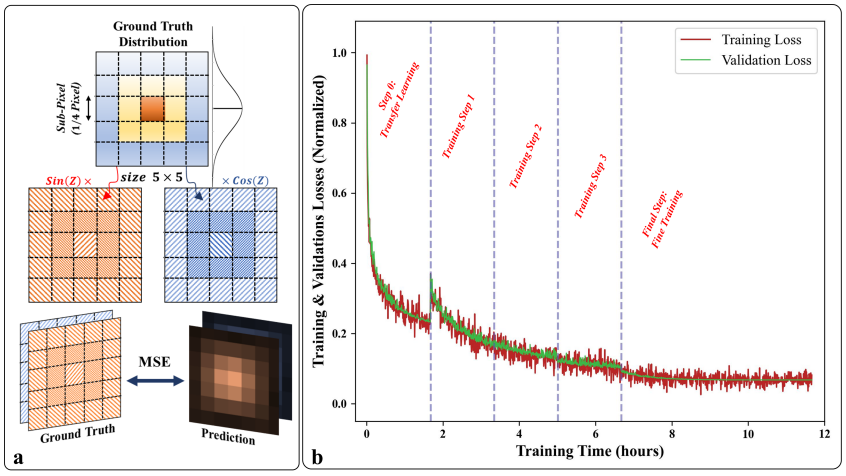

图 7：**a. 标签示例**。复数域中真实值分布与使用均方误差（MSE）损失函数得到的相应模型预测结果的逐像素比较。**b. 分步训练与损失**。在单个 NVIDIA Tesla V100 GPU 上测得的归一化训练损失和验证损失随训练时间的变化。结果对应于一个示例模型，该模型使用低发射体密度、高信噪比和像散模式下模拟的帧进行训练。迁移学习阶段（步骤 0）之后安排了 4 个训练步骤，每一步的学习率均为前一步的一半，并保持不变。

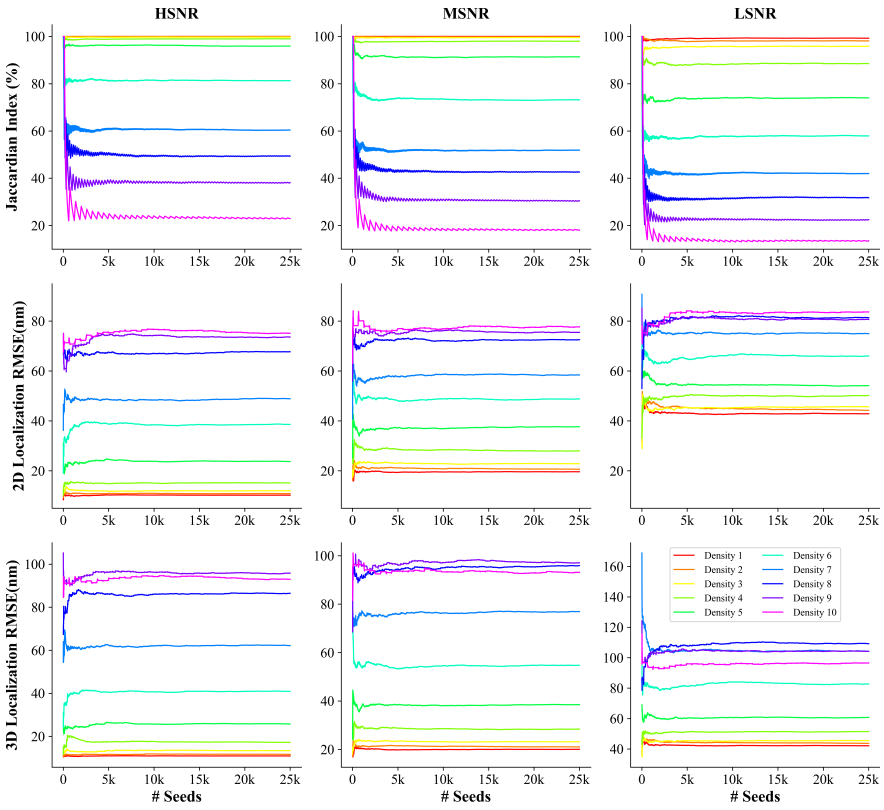

图 8：**残差图**。在仿真评估过程中，绘制了三个信噪比水平（低、中等和高信噪比）下，统计评估参数、杰卡德指数、体积均方根误差和横向均方根误差随检测到的种子数量的变化。

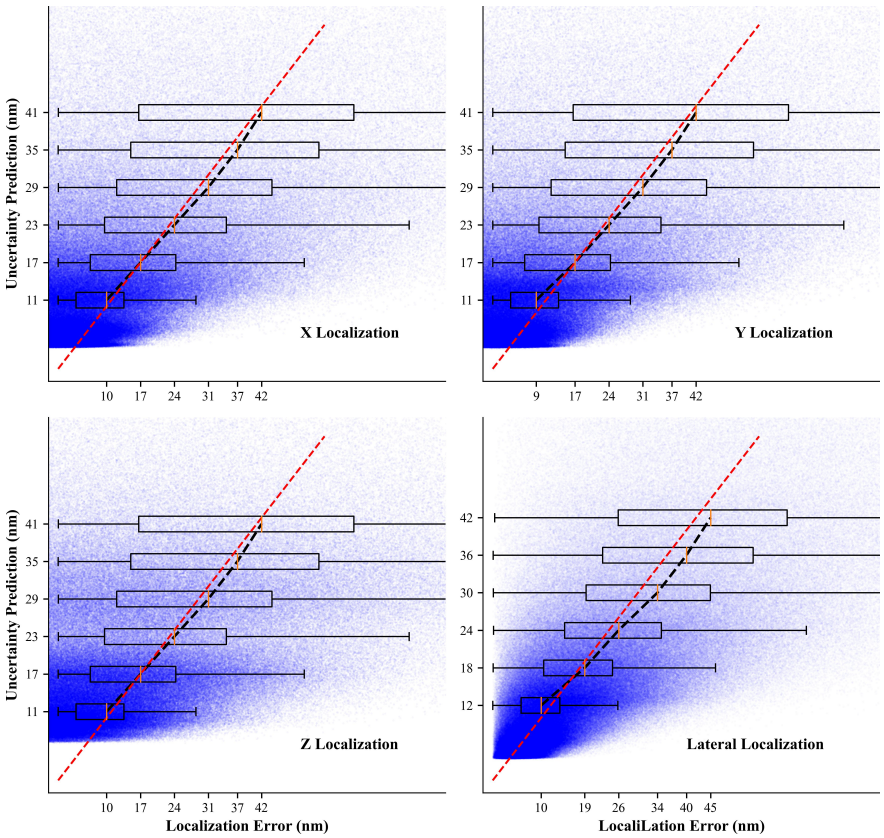

图9：**定位误差估计** LUENN不确定性预测模型能够分别估计X、Y和Z方向上的定位误差，可用于横向误差和总误差的估计。在这些图中，蓝色点表示来自低、中等和高信噪比以及密度为1和2.4的帧中的检测到的种子。

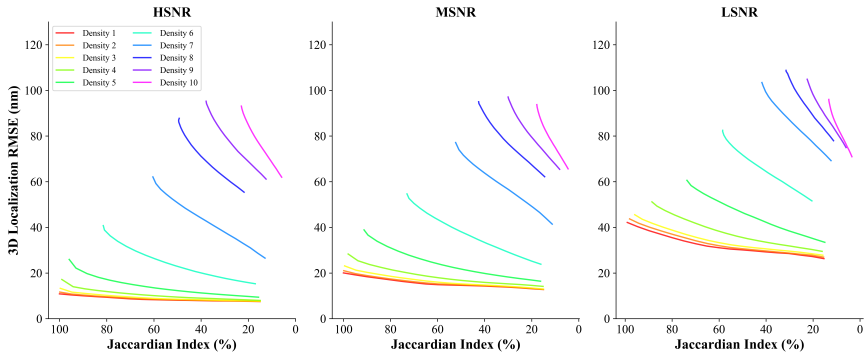

图10：**LUENN不确定性估计以及滤波率对定位误差和检测准确率的影响。** 在仿真评估过程中，针对低、中等和高三个信噪比水平，将统计评估参数、杰卡德指数、体积均方根误差和横向均方根误差绘制为检测到的种子数量的函数。

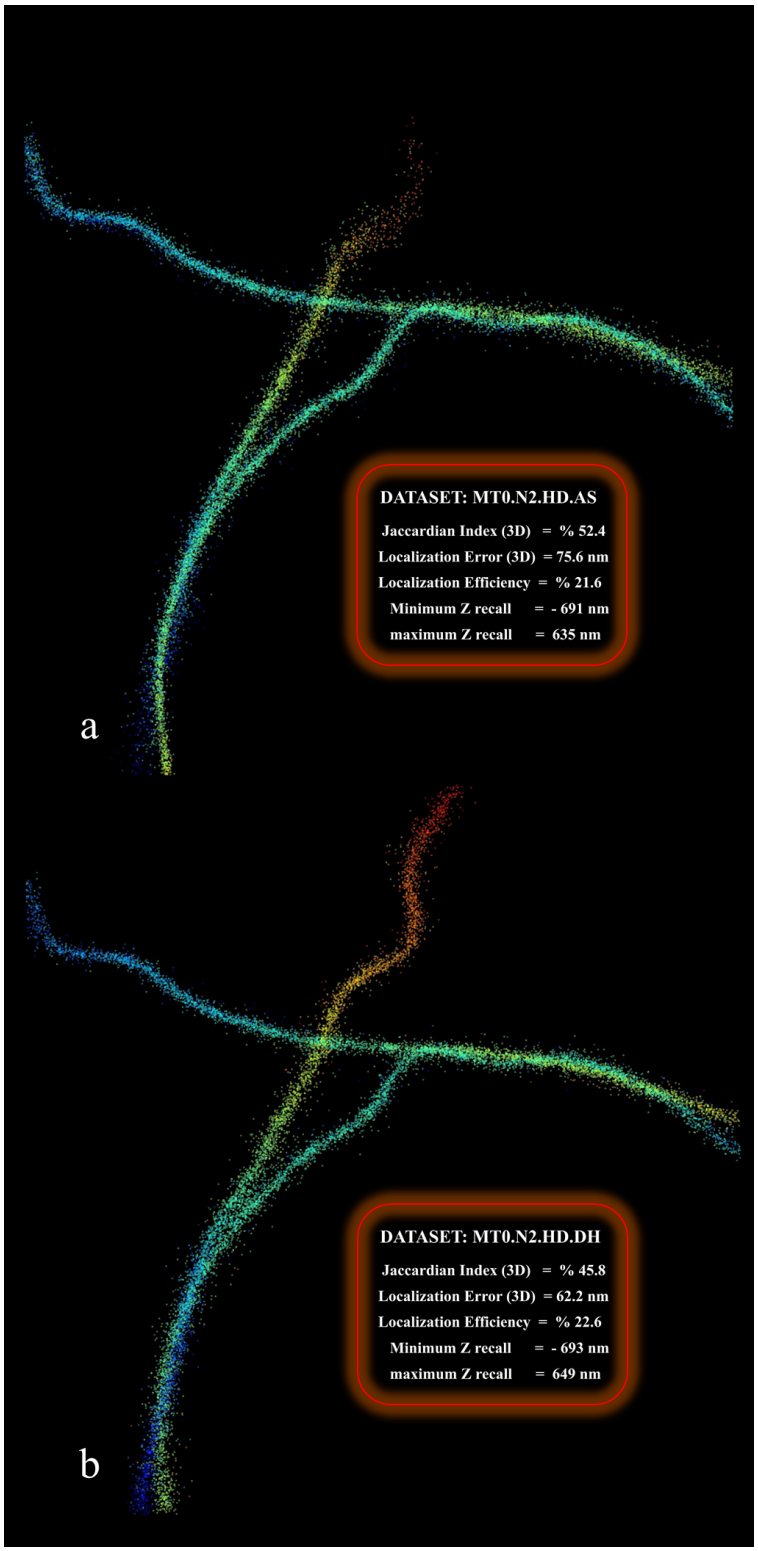

图 11：在最具挑战性的低信噪比和高发射体密度条件下，LUENN 在 SMLM 2016 挑战赛数据集上采用 (a) 像散和 (b) 双螺旋成像模式时的定位与重建性能。