arXiv:2603.01606v1 [physics.optics] 2 Mar 2026

基于同步的图像重建：用于超越帧率的周期性运动物体三维宽场共聚焦成像

Kanta Adachi，* Soyoka Hemmi和Nobutomo Nakamura大阪大学工学研究生院，日本大阪吹田市山田丘*2-1*，*565-0871*（日期：2026年3月3日）

摘要

我们将先前提出的图像重建方法加以扩展，使其从能够让共聚焦显微镜以超出其帧率的频率捕获周期性运动物体，进一步应用于三维与二维宽场成像。这一扩展通过在共聚焦激光扫描显微镜与函数发生器之间实施同步方案来实现，以确保在不同焦深或视场下采集的图像序列具有一致的初始相位对齐。该方法通过可视化附着于以100赫兹振荡的铝棒上的二氧化硅粒子的三维运动，以及胶体颗粒在周期性脉冲激励下的二维宽场响应得到了验证。定量单颗粒分析证实，重建图像准确捕获了粒子的内在动力学。该扩展方法无需额外的专用硬件，并可方便地与常规共聚焦显微镜集成。因此，它将共聚焦成像的适用范围扩展到生物学与软物质系统中周期性过程的快速动力学。

* adachi@mech.eng.osaka-u.ac.jp

I. 引言

共聚焦显微镜广泛应用于生物学与软物质研究，因为它能够在样品深处实现高分辨率成像，并通过光学切片进行三维重建 [1–8]。其基本工作原理是将激发光聚焦到样品中的衍射极限点，并利用置于探测器前方的针孔排除离焦光。通过在样品上逐点扫描激发光束，共聚焦显微镜可获得背景低、离焦干扰极小的光学切片。将沿轴向采集的光学切片堆叠，即可获得高分辨率三维图像。

然而，共聚焦显微镜存在一项根本性局限：逐像素图像采集限制了可实现的帧率，因此，高成像速度长期以来一直是技术挑战 [9–11]。在此背景下，共聚焦显微镜大致可分为单点扫描、多点扫描和混合扫描三类 [4]。单点扫描共聚焦显微镜（包括传统激光扫描共聚焦显微镜）是最常见的商业实现。在这些系统中，帧率直接取决于逐点数据采集速率。将这些系统中的振镜替换为共振扫描镜或声光偏转器，可提高单光束扫描速率，从而提升成像速度 [12–15]。多点扫描共聚焦显微镜，尤其是转盘式共聚焦显微镜 [16–19], ，通过同时扫描多束激光并并行采集多个焦点处的荧光，实现更高的帧率 [20]。混合扫描共聚焦显微镜采用介于单点扫描和多点扫描之间的方案，并使用狭缝光阑而非针孔来滤除离焦光 [21–24]。迄今为止，共聚焦显微镜中报道的最高帧率正是通过这种方案实现的：在图像尺寸为 40 µm × 42µm [25] 时，帧率最高可达每秒 16,000 帧。尽管这些策略显著提高了成像速度，但通常会增加仪器复杂性，并牺牲空间分辨率或视场。

最近，我们开发了一种技术，使传统激光扫描共聚焦显微镜能够以超过标称帧率的频率对周期性运动物体成像 [26]。该方法通过将每条扫描线与外部

振荡进行相位对齐来重建图像，从而克服了图像采集速度较慢所带来的限制。由于重建无需额外硬件且能保持固有成像性能，该方法适用于多种共聚焦显微镜。在最初的实现中，该方法用于二维成像，以观测弹性波传播过程中频率超过显微镜帧率的胶体颗粒运动。在这种情况下，只需确定扫描线之间的相对相位，因此重建图像不受每个图像序列的绝对初始相位影响。选择初始相位的自由度简化了实现过程，足以用于谐波颗粒运动的平面成像。由于该方法根据跨越周期性现象多个周期采集的共聚焦图像序列重建图像，因此仅适用于可重复的动态过程。

原则上，这种方法可以扩展到二维和三维宽场成像。本研究主要旨在通过可视化以下运动来展示这些扩展：频率超过帧率的振荡棒上附着粒子的三维运动，以及脉冲波在多个视场中传播期间胶体颗粒的二维非谐波运动。为此，我们在共聚焦激光扫描显微镜与函数发生器之间实现了同步方案。该同步方案确保在连续的图像序列中，激光扫描均在相同时间启动，从而可以将不同焦深处采集的重建图像堆叠成一个体数据集，并将连续视场中对应于同一运动相位的图像拼接在一起。

II. 实验细节

一根铝棒的尖端牢固附着有二氧化硅颗粒（直径：1.5 μm），这是我们先前胶体振荡实验 [26–28] 的结果；该铝棒被安装在压电位移台上。为了对附着粒子进行共聚焦成像，将铝棒浸入含有荧光素钠盐溶液的二甲亚砜/水混合物中。混合物的组成经过选择，使其折射率与二氧化硅颗粒的折射率密切匹配。定义了一个坐标系，其中x轴平行于杆的振动方向，z轴沿深度方向，y轴与x轴和z轴正交。在对铝棒施加100赫兹简谐振动的同时，通过采集由30个切片组成的共聚焦图像堆栈，观察了附着粒子的三维运动。

使用Nikon A1R共聚焦激光扫描显微镜以每秒15帧的速率采集共聚焦图像（512×512 像素）。在每个焦平面上，在机械振动条件下采集55幅原始图像，随后将位移台移动到下一个焦平面。为使横向和轴向的有效空间分辨率相匹配，在ImageJ [29]中将所得30层图像堆栈线性插值为80层堆栈。

对于二维宽场成像实验，通过将二氧化硅颗粒分散在三维成像实验中使用的相同溶剂中，制备了颗粒体积分数为 2% 的胶体悬浮液。为抑制周期性外部驱动下，在跨多个视场进行共聚焦成像期间胶体样品的结构变化，在悬浮液中加入浓度为 10 μmol/L 的聚（4-苯乙烯磺酸钠），以诱导粒子之间的吸引性耗尽相互作用[30, 31]。随后，将 600 μL 悬浮液置于圆柱形铝池中（内径：13 mm），铝池底部附有一块厚度为 0.15 mm 的玻璃盖玻片。然后，以 1000 rpm 的转速对样品离心 10 min，使胶体玻璃在盖玻片上形成。随后，将安装在压电位移台上的铝棒小心插入玻璃中，使其尖端位于盖玻片上方 20 μm 处，并将样品静置 24 h，以稳定胶体结构。之后，通过铝棒施加周期为 0.4 s、脉冲宽度为 4 ms 的周期性脉冲激励。在这些条件下，使用早先实验中所用的同一台共聚焦激光扫描显微镜采集共聚焦图像。在盖玻片上方 40 μm 深度处获取了一系列共聚焦图像，并以 50 μm 为步长系统地改变 x 位置。

图 1(a) 显示了测量系统的框图。记录显微镜的垂直和水平同步信号，以确定共聚焦图像 T_{V} 和扫描线 T_{H} 的采集时间间隔。用于共聚焦图像重建的每条扫描线相对于所关注的周期性现象的相对相位 $\varphi'(p, q)$ 由下式给出

$$\varphi'(p,q) = 2\pi f\{(p-1) \times T_{\mathrm{V}} + (q-1) \times T_{\mathrm{H}}\} + \varphi_0, \tag{1}$$

其中，p 是正在采集的共聚焦图像的序号，q 是该图像中相关扫描线的序号。例如，重建尺寸为 512×512 像素的 N 个连续共聚焦图像时，$p = 1, 2, \cdots, N$和 $q = 1, 2, \cdots, 512$。在单个视场内进行二维成像时，图像重建只需要扫描线之间的相对相位

因此，初始相位 φ_0 可以任意设定。为方便起见，在展示该方法最初实现的先前研究 [26], 中，我们将 φ_0 设为零。然而，将该方法扩展到三维成像和二维宽场成像时，为获得内部一致的图像堆栈或宽场图像，不同焦平面和视场中的 φ_0 必须相同。因此，使用垂直同步信号触发函数发生器，从而使信号生成与共聚焦显微镜开始图像扫描同步。这种同步确保所有共聚焦图像序列的 φ_0 值保持一致，使得在不同焦平面或视场下采集的重建图像能够一致地组合。

图1(b)示意性说明了对以超过帧率的频率运动的物体进行三维成像的过程。该过程首先在初始深度（$z = z_1$）处获取 N 连续的共聚焦图像。随后，在系统地改变焦深的同时重复进行图像采集，从而在所需深度范围（$z = z_1, z_2, \cdots, z_L$）内获得一系列图像序列。当物体以超过帧率的频率运动时，原始共聚焦图像通常会产生严重失真。在每个深度处，将 N 原始图像重建为 M 共聚焦图像，以校正这些失真。根据运动的相同相位对重建图像进行堆叠，即可得到以超过帧率的频率运动的物体的精确三维表示。图1(b)展示了附着在以100赫兹振荡的铝棒尖端上的二氧化硅颗粒的代表性共聚焦图像序列，这些图像在两个不同深度处采集。尽管受限帧率导致原始图像出现明显失真，但重建图像清晰地解析出了运动各相位下的粒子位置。同样的重建方案也可应用于二维宽场成像，只需横向移动视场，而不必改变焦深。因此，所提出的同步方案使传统激光扫描共聚焦显微镜能够以超出其标称帧率的频率，对周期性运动物体进行三维成像和二维宽场成像。

III. 结果与讨论

图2(a)（多媒体视图）展示了从重建的80 层图像堆栈中提取的代表性对比度增强x–z 横截面图像，对应相位为0.4π 和

1.4π。共计使用55幅原始图像，在每个焦深（$N = 55$和 $M = 20$）处重建20幅图像，从而得到一系列重建图像，以规则的相位间隔表示一个振荡周期内的粒子运动。由于共聚焦显微镜的轴向分辨率本质上低于其横向分辨率 [4], ，粒子在x–z 横截面视图中呈椭球形而非圆形（图2(a)）。尽管减小针孔直径可以提高轴向分辨率，并使粒子形状更接近圆形，但本研究获得的三维图像仍为黏附于铝棒上的粒子三维运动的定量分析提供了足够的空间分辨率（见多媒体2）。使用粒子追踪软件 [32, 33]追踪了各个粒子的位置。所得轨迹近似呈直线，表明粒子主要沿单一方向振荡（图2(b)）。通过对位移时间序列进行离散傅里叶变换，并分离出铝棒振荡频率处的分量，量化了每个粒子的振荡幅度。对于一个代表性粒子，拟合位移表明沿x轴的振荡幅度显著大于沿其他轴的振荡幅度，从而证实了100赫兹下平行于x轴的简谐振动（图2(b)）。在一次振荡期间能够被追踪的全部76个粒子均表现出相似行为，表明粒子运动忠实地跟随铝棒的运动。这些结果证实，所提出的同步方案使共聚焦激光扫描显微镜能够捕捉频率超过标称帧率的三维粒子运动。

图 3（多媒体视图）显示了采用所提出方法的二维宽场成像实验中，在一个脉冲波生成周期内、不同x位置处沿x轴的粒子位移。在该实验中，每个视场采集了 237 张共聚焦图像。经过对比度增强和均值滤波后，将这些图像重建为单个脉冲波周期内具有等间隔相位的 100 张图像（$N = 237$ 和 $M = 100$）。按照三维成像实验中的方法对单个粒子位置进行跟踪 [32], ，从而获得沿脉冲波传播方向的位移时间序列。利用每个x位置处的平均粒子位移，评估了脉冲波在胶体颗粒中传播时的距离相关衰减（图 4）。然而，铝棒附近的粒子位移极大；在 $x < 200$ μm 区域内，由于图像序列开始时的胶体结构与结束时并不相同，无法准确重建共聚焦图像序列

以及每个图像序列结束时的胶体结构并不相同。尽管如此，位移数据表明，随着距铝棒距离的增加，位移振幅减小（图 4），这与预期一致。然而，脉冲波传播速度显著高于重建图像序列的有效帧率，因此无法直接观察具有空间衰减的脉冲波传播。这表明，与脉冲波相关的粒子运动实际上从铝棒附近瞬时传播到了最远的视场（见多媒体 3）。有效帧率由 M 确定。在本实验中，使用 100 张重建图像来表示周期为 0.4 s 的现象，对应的有效时间分辨率为 0.004 s。尽管该时间分辨率不足以直接解析脉冲波传播，但能够捕捉脉冲波激励过程中粒子位移在x正负方向之间的滞后行为（图 3）。这些结果表明，即使难以直接观察脉冲波传播，也可以通过分析各空间位置处的粒子运动来表征胶体系统的力学响应和非线性行为。因此，利用传统共聚焦显微镜，所提出的技术同样适用于对脉冲波诱导的非谐快速粒子运动进行二维宽场成像。

IV. 结论

我们实现了共聚焦激光扫描显微镜与函数发生器之间的同步方案，将我们先前提出的图像重建方法扩展至三维和二维宽场成像。该同步确保在不同焦深或视场下采集的图像序列之间保持一致的相位对齐，从而能够对周期性可重复的动力学进行体积重建和大范围拼接。这些扩展在无需任何额外专用硬件的情况下保留了原技术的通用性，并维持了固有成像性能。所提出的方法可方便地与常规共聚焦显微镜集成，用于可视化和定量分析生物及软物质系统中周期性过程的快速动力学，包括自发运动和非谐波运动。

作者声明

利益冲突

作者声明不存在利益冲突。

作者贡献

Kanta Adachi: 形式分析（同等贡献）；调查（同等贡献）；软件（同等贡献）；撰写——初稿（主要贡献）；撰写——审阅与编辑（同等贡献）。**Soyoka Hemmi:** 形式分析（同等贡献）；调查（同等贡献）；软件（同等贡献）；撰写——审阅与编辑（同等贡献）。**Nob-utomo Nakamura:** 概念化（主要贡献）；调查（同等贡献）；监督（主要贡献）；撰写——初稿（辅助贡献）；撰写——审阅与编辑（同等贡献）。

数据可用性

支持本研究结论的数据可向通讯作者合理提出申请后获取。

---

[1] P. Schall, I. Cohen, D. A. Weitz, and F. Spaepen, 《科学》**305**，1944 (2004)。[2] V. Prasad, D. Semwogerere, and R. Weeks, 《物理学杂志：凝聚态物质》**19**，113102 (2007)。[3] M. C. Jenkins and S. U. Egelhaaf, 《胶体与界面科学进展》**136**，65 (2008)。[4] A. D. Elliott, 《细胞计量学当前方案》**92**，e68 (2020)。[5] J. Jonkman, C. M. Brown, G. D. Wright, K. I. Anderson, and A. J. North, 《自然·实验方案》**15**，1585 (2020)。[6] S. Kim, I. Svetlizky, D. A. Weitz, and F. Spaepen, 《自然》**630**，648 (2024)。[7] J. Z. Terdik, D. A. Weitz, and F. Spaepen, 《物理评论E》**110**，024606 (2024)。[8] J. Z. Terdik, D. A. Weitz, and F. Spaepen, 《科学仪器评论》**96**，053902 (2025)。[9] G. Q. Xiao, T. R. Corle, and G. S. Kino, 《应用物理快报》**53**，716 (1988)。[10] P. W. Winter and H. Shroff, 《化学生物学当前观点》**20**，46 (2014)。

[11] B. B. Straub, D. C. Lah, H. Schmidt, M. Roth, L. Gilson, H. Butt, and G. K. Auernhammer, 《科学仪器评论》**91**，033706 (2020)。[12] N. Callamaras and I. Parker, 《细胞钙》**26**，271 (1999)。[13] K. Im, S. Han, H. Park, D. Kim, and B. Kim, 《光学快报》**13**，5151 (2005)。[14] L. Leybaert, A. D. Meyer, C. Mabilde, and M. J. Sanderson, 《显微镜学杂志》**219**，133 (2005)。[15] V. Bansal, S. Patel, and P. Saggau, 《生物医学光学杂志》**11**，034003 (2006)。[16] M. Petran, M. Hadravsky, M. D. Egger, and R. Galambos, 《美国光学学会杂志》**58**，661 (1968)。[17] T. Tanaami, S. Otsuki, N. Tomosada, Y. Kosugi, M. Shimizu, and H. Ishida, 《应用光学》**41**，4704 (2002)。[18] T. Shimozawa, K. Yamagata, T. Kondo, S. Hayashi, A. Shitamukai, D. Konno, F. Matsuzaki, J. Takayama, S. Onami, H. Nakaya ma, Y.Kosugi, T. M.Watanabe, K. Fujita, andY. Mimori- Kiyosue, 《美国国家科学院院刊》**110**，3399 (2013)。[19] M. N. Rodrigo, F. Gorlitz, A. Felekary, and A. Rohrbach, 《ACS光子学》**13**，80 (2026)。[20] A. M. Watson, A. H. Rose, G. A. Gibson, C. L. Gardner, C. Sun, D. S. Reed, L. K. M. Lam, C. M. St. Croix, P. L. Strick, W. B. Klimstra, and S. C. Watkins, 《公共科学图书馆·综合》**12**，e0180486 (2017)。[21] C. J. R. Sheppard and X. Q. Mao, 《现代光学杂志》**35**，1169 (1988)。[22] R. Wolleschensky, B. Zimmermann, and M. Kempe, 《生物医学光学杂志》**11**，064011 (2006)。[23] M. Castellano-Munoz, A. W. Peng, F. T. Salles, and A. J. Ricci, 《显微镜与微分析》**18**，753 (2012)。[24] W. Chu, Y. Li, Z. Wen, H. Luo, Y. Long, W. Guo, X. Liu, and D. Ma, 《光学与激光技术》**193**，114330 (2026)。[25] H. Mikami, J. Harmon, H. Kobayashi, S. Hamad, Y. Wang, O. Iwata, K. Suzuki, T. Ito, Y. Aisaka, N. Kutsuna, K. Nagasawa, H. Watarai, Y. Ozeki, and K. Goda, 《Optica》**5**，117 (2018)。[26] K. Adachi, S. Mukai, K. Higami, T. Saito, and N. Nakamura, 《应用物理快报》**126**，263704 (2025)。[27] N. Nakamura, K. Inayama, T. Okuno, H. Ogi, and M. Hirao, 《科学报告》**7**，1369 (2017)。[28] N. Nakamura, S. Nakashima, and H. Ogi, 《科学报告》**9**，12836 (2019)。[29] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, 《自然·方法》**9**，671 (2012)。

[30] S.Asakuraand F. Oosawa, Polym.Sci. **33**,183(1958).[31] N. Nakamura,Y.Sakamoto, and H.Ogi,《科学报告》**11**,8929 (2021年).[32] Y. Gao andM. L.Kilfoil, Opt.Express**17**,4685 (2009年).[33] K. E.Jensen and N.Nakamura,Rev. Sci.Instrum.**87**, 066103(2016年).

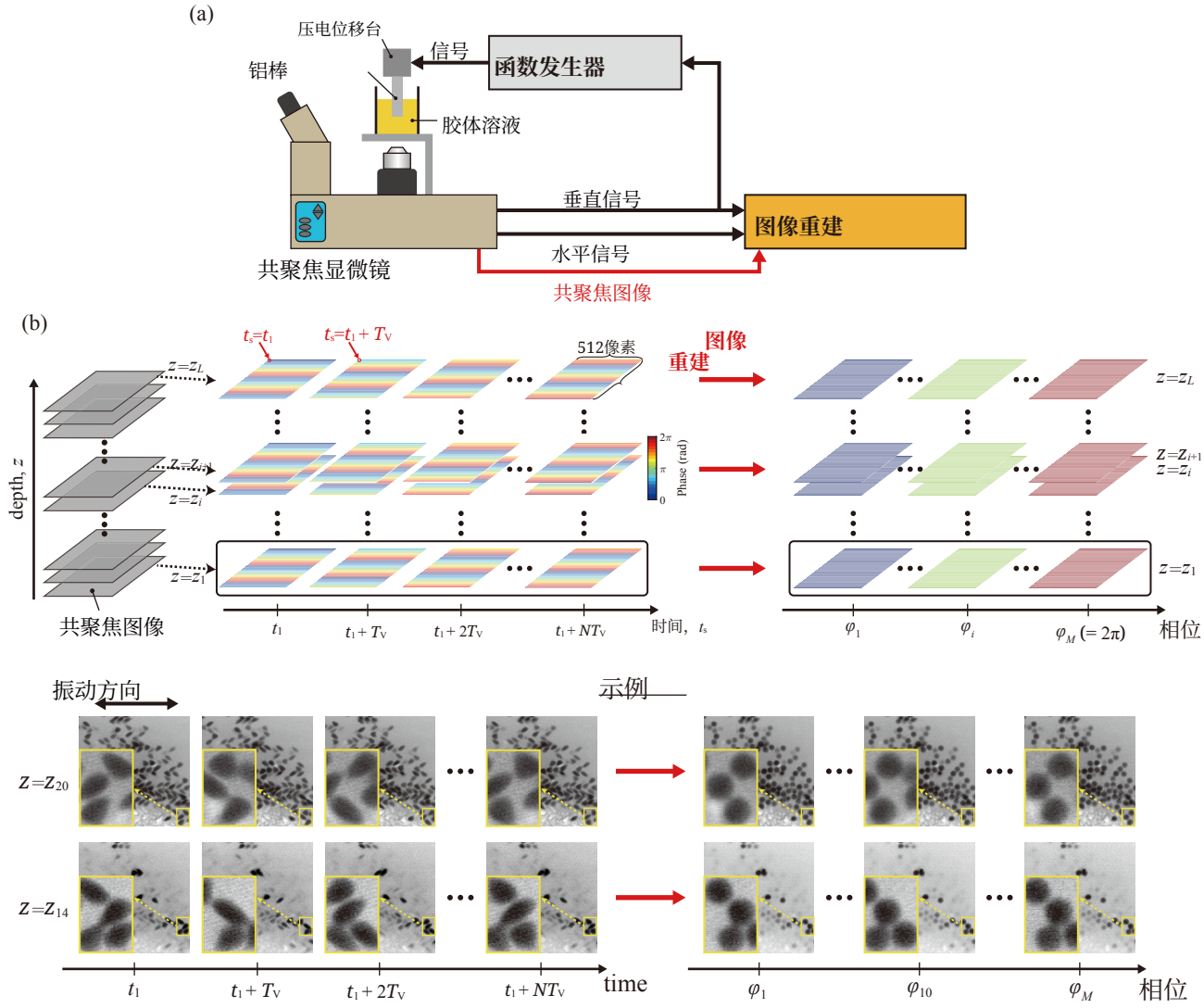


图1。（a）共聚焦显微镜分析系统框图。共聚焦显微镜与函数发生器同步，以确保每个图像序列的绝对初始相位一致。（b）对运动频率超过帧率的物体进行三维成像的图像重建过程示意图。像素尺寸未按比例绘制。图中还展示了附着在以100赫兹振荡的铝棒上的粒子在两个深度处的代表性原始共聚焦图像和重建共聚焦图像。

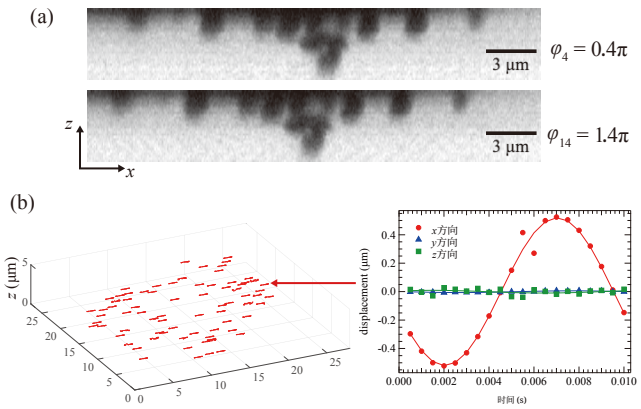


图 2。（a）x–z 截面图像，分别对应相位 0.4π 和 1.4π，即粒子沿x轴位移达到最大值时的相位。（b）76 个粒子在一个振荡周期内的三维轨迹。同时展示了一个代表性粒子沿x轴、y轴和z轴的位移。实线表示离散傅里叶变换拟合结果。多媒体内容可在线获取。

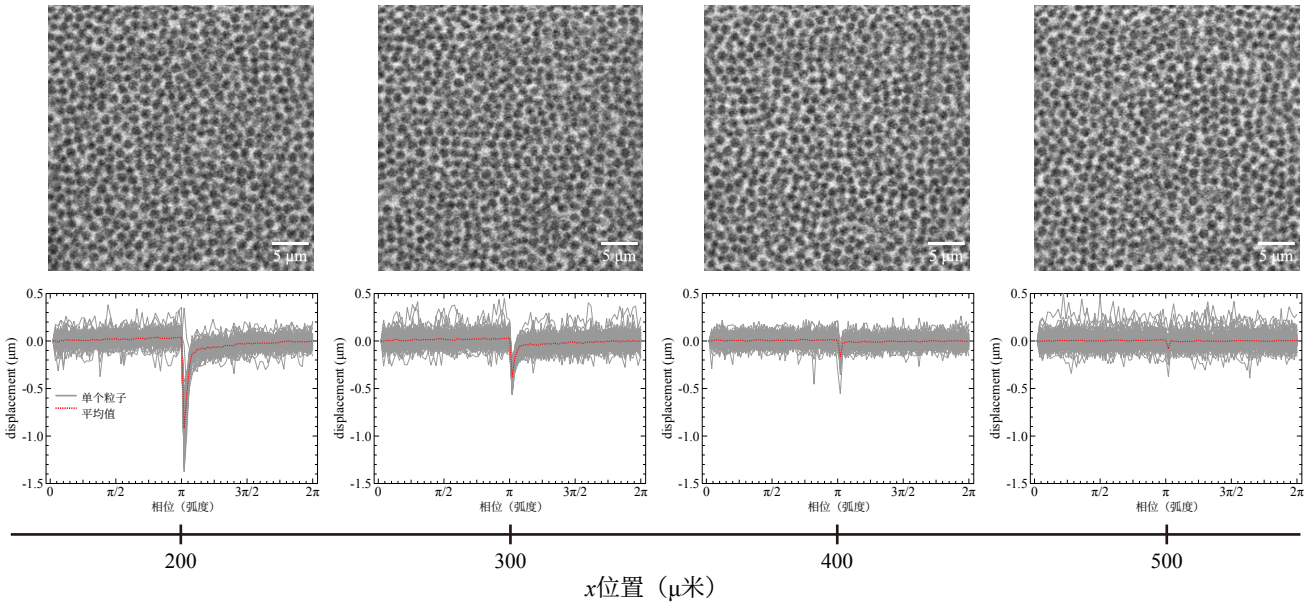


图 3。在不同x位置处，单个粒子沿 x轴在一个脉冲波生成周期内的位移。虚线表示各相位下的平均位移。每个图上方显示了初始相位下对应的快照。多媒体内容可在线获取。

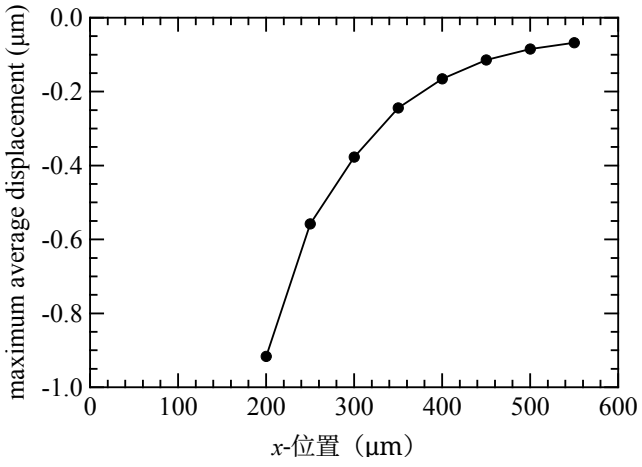


图 4. 脉冲波传播过程中，胶体颗粒的最大平均位移随其 x-位置的变化。