高通量快速傅里叶叠层显微成像技术研究进展

潘 安[1,2],姚保利[1,3*]

(1. 中国科学院西安光学精密机械研究所 瞬态光学与光子技术国家重点实验室,陕西 西安 710119;
2. 中国科学院大学,北京 100049;
3. 山西大学 极端光学协同创新中心,山西 太原 030006)

摘 要: 傅里叶叠层显微术(Fourier ptychographic microscopy,FPM)是一极具前景的计算成像技术,它具有高分辨率、大视场、无标记和定量相位等优势。由于它灵活的系统、高对比度的成像结果、无需干涉装置和光源机械扫描部件,在数字病理学、体外细胞无标记观察和实时监测等方面得到了大量的研究和应用。文中主要介绍了 FPM 技术的系统误差校正方法、基于 FPM 的高通量显微成像和高速显微成像技术研究的基本原理、研究现状和最新进展,提出了目前面临的问题以及未来的发展趋势。

关键词: 傅里叶叠层显微术; 高通量成像; 相位恢复; 计算成像

中图分类号: TN911.74 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3788/IRLA201948.0603012

High-throughput and fast-speed Fourier ptychographic microscopy: A review

Pan An[1,2], Yao Baoli[1,3*]

(1. State Key Laboratory of Transient Optics and Photonics, Xi′an Institute of Optics and Precision Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Xi′an 710119, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
3. Collaborative Innovation Center of Extreme Optics, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Fourier ptychographic microscopy (FPM) is a promising label-free computational imaging technique with high resolution, wide field-of-view (FOV) and quantitative phase recovery. Due to its flexible setup, promising high-contrast performance without mechanical scanning and interferometric measurements, FPM has wide applications in the digital pathology, observation and dynamic imaging of label-free cells in vitro. In this review, the principle, research status and the latest advances were introduced in several aspects of FPM such as the system calibration methods, high-throughput imaging and high-speed imaging. The current problems and future trends were also presented.

Key words: Fourier ptychographic microscopy; high throughput imaging; phase retrieval; computational imaging

收稿日期: 2019-01-05; **修订日期:** 2019-02-03

基金项目: 国家自然科学基金(61377008,81427802)

作者简介: 潘安(1993-),男,博士生,主要从事定量相位成像和计算光学显微成像方面的研究。Email:panan@opt.cn

导师简介: 姚保利(1968-),男,研究员,博士生导师,博士,主要从事超分辨光学显微成像、光学微操纵、数字全息显微成像和新型光学成像方面的研究。Email:yaobl@opt.ac.cn

0 引 言

得益于显微镜的发明,人类得以探索微观世界,追寻生命的起源,洞悉疾病的根本,解密基因的密码。由于光学波段具有非侵入式、无损伤的优点,非常适合进行生物体、组织或细胞的动态成像。然而生物细胞对光学波段的吸收系数很小,几乎无色透明,因此在传统显微镜下对比度很低,不便于观察。尽管细胞对振幅的改变较小,但由于这类样本具有空间结构和不均匀的折射率分布,因而这类样本的主要信息通常集中在相位之中[1-2]。与基于微波的合成孔径雷达不同[3-4],天线可以直接测量到相位信息,而光波段具有更高的频率,现有探测器还不足以直接探测到相位信息。为了克服这一困难,常用的方法是对样本进行染色,利用细胞内不同组分对不同化学或荧光染料(2008 年诺贝尔化学奖)的不同亲和性,形成足够大的光强反差或产生不同的光谱,从而达到成像目的。基于此类原理诞生了宽场荧光成像技术[1,5-7]、激光共聚焦显微技术(Confocal Microscopy)[8-9]、荧光共振转移显微术(Fluorescence Resonance Energy Transfer,FRET)[10-12]、荧光寿命显微术(Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy,FLIM)[13-14]、全内反射显微术(Total Internal Reflection Fluorescence,TIRF)[15-16]、结构光照明显微术(Structured Illumination Microscopy,SIM)[17-27]、光激活定位显微术(Photo-Activation Localization Microscopy,PALM)[28-29]、随机光学重构显微术(Stochastic Optical Recons-truction Microscopy,STORM)[30-32]、受激发射损耗技术(Stimulated Emission Depletion,STED)[33-34]、多光子显微术(Multi-photon Microscopy)[35-36]、光学切片显微术(Light Sheet Microscopy,LSM)[37-39]等等。其中STED 和 PALM 获得了 2014 年诺贝尔化学奖。然而无论是传统染色方法还是荧光标记染色方法,都存在一定局限性。首先,标记样品需要一定时间的制备过程,许多标记手段需要杀死细胞,而许多活细胞染色方法也不可避免产生光毒性或者对细胞的正常生理活动产生不利影响[40];第二,荧光基团还存在光漂白问题,影响长时间观察[41];最后,一些重要物质如细胞内的小分子和脂类等、细胞的形态结构、与人类相关的生理过程如受精过程等很难或者无法被荧光标记[42]。

因此在研究活细胞的动态过程及生理活动时,无标记显微是一种最为理想的探测手段,也是未来的发展趋势。根据提取相位信息的技术手段不同,相位成像技术可以大致分为两类,一类以相位观测为目的的定性成像,诸如泽尼克相衬显微(1953 年诺贝尔物理奖)[43] 与微分干涉相衬显微技术(Differential Interference Contrast,DIC)[44]。另一类以相位的精确量化测量为目的的定量成像 (Quantitative Phase Imaging,QPI),包括基于干涉的数字全息(1971 年诺贝尔物理奖)[45-51]和电子散斑干涉(Electronic Speckle Pattern Interferometry,ESPI)[52] 与基于几何光学原理的夏克-哈特曼波前传感器(Shack-hartman Wavefront Sensor)[53]。相位恢复的本质是数学上的一个求反问题[54-57]。近年来,得益于计算机和探测器的发展,提出了一系列基于非干涉强度图像的计算成像(Computational Imaging) 方法,如基于直接估算的光强传输方程(Transport of Intensity Equation,TIE)[58-62]和基于迭代计算的相干衍射成像(Coherent Diffraction Imaging,CDI)[63]。2004 年 Rodenburg 等人[64-65]提出一种鲁棒的 CDI 方法——叠层衍射成像算法(Ptychographic Iterative Engine,PIE),使用多张强度图样取代传统 CDI 单张强度图样,大大提高了迭代相位恢复算法收敛速度和抗噪能力,同时所恢复的结果具有高对比度、高分辨率、大视场和定量相位等特点。Maiden 等人[66-70]继而提出 ePIE 和 rPIE 算法以及针对三维厚样品的 3ePIE 算法,进一步提高了算法鲁棒性、收敛速度和应用范围。Pfeiffer 和 Thibault 等人将 PIE 应用在基于 X 射线的三维断层扫描术上,实现了高分辨率层析成像[71-75],同时已经广泛地应用于第五代 X 射线同步回旋加速器[76]。Thibault 等人从量子角度提出混合态模型[77],有效地处理了包括部分相干光源照明等一系列多态混合问题,极大地降低了实验条件。中国科学院上海光学精密机械研究所刘诚课题组[78-81]将该技术推广到宽场显微和应力测量当中,实现了高分辨率大视场成像及 λ/100 精度测量。中国科学院西安光学精密机械研究所姚保利课题组[82-85]则专注于近场 PIE 的研究,解决了近场 PIE 分辨率和衍射距离受限问题,优化了近场三维成像效果。中国科学院大学史祎诗课题组[86-89]将该技术推广应用到光学图像加密领域,提高了秘钥空间和安全性。类似这一类的相位恢复方法统称为“相位多样

性”(phase diversity)，包括侧向多样性，离焦多样性(轴向多样性)，波长多样性等[90-91]。

传统显微成像除了相位丢失外，还存在像差、景深狭小和低时空带宽积(Space-bandwidth-time product，SBP-T)等问题。时空带宽积用以定量分析视场与时空分辨率的权衡关系。传统上要实现高分辨率大视场需要用高倍物镜成像配合视场拼接技术，一方面是高倍物镜和高精密的电动平移台很昂贵。另一方面，拼接可能会有伪影，电动平移台会有像素级的漂移，且视场扫描和重聚焦很耗时[92-93]，导致时空带宽积很有限。得益于发光二极管(LED)的发展，近些年来还有一类“角度多样性”(angular diversity) 的计算成像方案可以有效解决上述问题，受到了更多地关注，包括 2006 年由 Changhuei Yang 和 Demetri Psaltis 等人[94-102]提出的基于近场扫描的无透镜片上显微术——光流控技术(Optofluidic Microscopy)，2010 年由 Ozcan 等人[103-106]提出的基于远场衍射的无透镜片上显微术(Diffraction-based Lenless On-chip Microscopy)，2013 年 Guoan Zheng 和 Changhuei Yang 等人[107-128]提出了傅里叶叠层显微成像术 (Fourier Ptychographic Microscopy，FPM)，以及 2014 年 Lei Tian 和 Laura Waller 等人[129-133]提出的定量差分像衬显微成像术(Differential Phase Contrast Microscopy，DPC)。其中最具代表性的就是 FPM。它巧妙地将 PIE 相位恢复方法与多角度照明相结合，通过用 LED 阵列替代传统聚光镜，逐点扫描，有效规避机械扫描造成的迟滞效应或者回程误差。通过使用低倍物镜获得大视场，采集多幅不同角度的低分辨图像，在空域中利用记录的光强信息作为振幅约束，在频域中利用系统的截止频率作为约束，通过空域和频域的交替迭代，将这些图像在频谱中融合从而获得一张高分辨、大视场和定量相位的图像。该方法与结构光照明显微术、相干合成孔径成像和积分成像有所类似。不同的是，传统结构光照明需要精确已知条纹分布，需要通过移相来解调条纹编码信息，且线性区只能得到两倍分辨率提升。相比于合成孔径成像，FPM 不需要记录相位信息，但是需要不同频谱位置相互交叠，利用冗余信息恢复相位。积分成像不能提高分辨率，成像分辨率仍然受限制于成像透镜孔径尺寸且是非相干成像。值得一提的是，物镜有一定的收集光的能力，称之为数值孔径(Numerical Aperture，NA)。当没有样品的时候，物镜确实只能收集特定角度的光，但是当有生物样品的时候，光与物质(细胞器)作用，会发生瑞利或者米散射，从而有部分散射光也会被收集，因此 FPM 技术就是利用这一现象获得携带高分辨信息的暗场图像，实现了2×/0.08NA 获得 20×/0.4NA 的成像效果[105]。

自从 2013 年 FPM 技术提出以来，该技术在系统误差、成像通量、成像效率和应用范围这四大方面都获得了较大的发展。Ou 等人[108]提出了 EPRY-FPM 算法能够同时恢复相干传递函数和物函数，有效解决了空间变化的像差问题。Laura Waller 和 Lei Tian 等人[134-137]提出了基于 FPM 的三维成像和高速体外活细胞成像方法，极大地扩大了 FPM 的应用范围。Guoan Zheng 等人[138-140]则将 FPM 技术推广至基于结构光照明的荧光成像，实现线性区下超两倍成像分辨率。清华大学戴琼海课题组[141-143]提出了维尔丁格流(Wirtinger flow)等优化算法，优化了照明图样，提高了成像速度。南京理工大学左超课题组[144-159]提出了基于油浸聚光镜的高通量成像方法，基于 10×/0.4 NA 物镜实现了 60×/1.35 NA 油浸物镜的成像效果，和波长复用的单次曝光 FPM 成像方法，实现了 25 Hz 动态成像。中国科学院西安光学精密机械研究所姚保利课题组[150-154]提出了系统误差矫正方法(SC-FPM)和基于半球形数字聚光镜的高通量成像方法，基于 4×/0.1 NA 实现了 40×/0.6 NA 物镜的成像效果，有效空间带宽积高达 2 亿 4 500 万像素。

文中系统地回顾了显微成像技术的发展历程，传统显微成像存在的问题，计算显微成像的光学编码原理和研究成果，特别是傅里叶叠层显微成像术。综述了系统误差校正方法(第 2 节)，高通量(第 3 节)和高速傅里叶叠层显微成像术(第 4 节)的基本原理、算法流程和最新进展，并给出了相关的实验结果。对未来傅里叶叠层显微成像术的发展做出了详细的讨论(第 5 节)并总结全文(第 6 节)。

1 系统误差校正方法

FPM 的原理和光路图可以参见参考文献[107-109]，这里就不再过多赘述。从 FPM 技术提出至今，先后共有五种主要的系统误差陆续提出，包括像差[110]、噪声[124,134,141-142,145-146,151]、LED 亮度不均匀[111,150]、LED 位置

未校准[144,150]和渐晕效应[153]。本节将着重介绍 LED 亮度不均匀、LED 位置未校准、渐晕效应和多种混合误差[150]。

1.1 LED 照明强度不均匀

2013 年 Bian 等[111]首先提出了 LED 亮度不均匀导致的伪影问题,进而 Bian 等人提出一种自适应强度校正算法，通过若干次迭代可以有效恢复出各 LED 对应的归一化强度系数。但是当系统误差不只有 LED 亮度不均匀问题时,该方法可能会失效。因此 Pan 等人提出了另外一种实用的基于硬件的 LED 强度校正方法[152]。在放置样品之前,通过使用高倍的物镜(大于所设计的照明 NA)采集不同角度 LED 照明下的明场图像，平均每一张图像的亮度从而估算出各 LED 对应的归一化强度系数,从而可以在实验中根据该系数矩阵对 LED 亮度进行数字补偿,或者直接线性地调整 LED 的照明亮度，进行硬件补偿。比较而言,硬件补偿在高角度照明下具有更好的信噪比。

1.2 LED 位置未校准

类似于 PIE 中的探针位置不精确 [155-157],Yeh[134]和 Sun[144]等先后提出了 LED 位置未校准所带来的系统误差问题,并提出了基于模拟退火的优化算法,从而有效地解决了 LED 位置误差所来带的伪影。不同的是,Yeh 等人的模型里每一个 LED 都拥有单独的 Δx 和 Δy，从而优化每一个 LED 的位置 (局部变量)。而 Sun 等人的模型里则考虑是整个 LED 阵列的高度 h、位移 $\Delta x,\Delta y$,和旋转角 θ,共四个全局变量。无论 LED 分布是否存在局部的位置不均匀,使用一个全局变量都可以等效地补偿系统误差，因此 Sun 等人的模型相对而言更为稳定。

1.3 渐晕效应

在通常的 FPM 模型里,相干显微系统是近似看做线性空不变的(Linear space-invariant,LSI)成像系统,相干传递函数(Coherent transfer function,CTF)由物镜的出瞳函数(Pupil function)决定。然而,在实际中可以明显发现半亮半暗的过渡区域，这些图像具有很强的渐晕效应，显然与 LSI 系统的只有亮暗场图不同。第二,实际中分辨率从视场中央逐渐向视场边缘降低。Horstmeyer 等人[158]也发现类似现象。第三,这些不理想的原始图像(全视场)直接带入 FPM 算法中会导致最终重构出现伪影，特别是视场边缘出现剧烈的褶皱。以上现象均表明,FPM 的模型不是理想的 LSI 模型,而是线性空变模型。

Pan 等人[153]分别基于光线追迹和严格的波动光学理论分析研究了模型不匹配的成因和影响。分析表明对于实际 FPM 显微系统,物镜往往由多个透镜构成,其中的某一个透镜扮演了渐晕光阑的作用,截断了部分光线，从而导致线性空不变的模型遭到破坏。故而推导了线性空变模型如下[153]：

$$U_i(x,y)=\iint \frac{1}{|M|}U_0\left(\frac{\xi'}{M},\frac{\eta'}{M}\right)\exp\left[\frac{jk}{2z_1}\left(\frac{\xi'^2+\eta'^2}{M^2}\right)\right]\cdot h_p(x-\xi',y-\eta')\mathrm{d}\xi'\mathrm{d}\eta' \tag{1}$$

式中:$U_i(x,y)$为相面光场分布;$U_0(\xi,\eta)$为物函数;k 为波矢;z_1 为物距;M 为放大倍率。根据公式(1)的定量分析发现如果假设出瞳大小不变的话,公式(1)可以修改为：

$$U_i(x,y)=F^{-1}\{F\{\frac{1}{|M|}U_0\left(\frac{x}{M},\frac{y}{M}\right)\cdot \exp\left[\frac{jk}{2z_1}\left(\frac{x^2+y^2}{M^2}\right)\right]\}P(-\lambda z_2 f_\tau,-\lambda z_2 f_\upsilon)\} \tag{2}$$

式中:$f_\tau=\tau/\lambda z_2$,$f_\upsilon=\upsilon/\lambda z_2$,常数项已忽略。物体的频谱意外地被二次相位因子调制、放大。

尽管该模型一定程度上能够解释所观察的实验现象,但是(1) 仿真的原始数据中明暗场过渡区域有明显的吉布斯现象(Gibb′s phenomena[159]);(2)物镜通常是由一系列透镜组成,不能简单看成单透镜,因此显微系统不能简单地看作 4f 系统;(3) 不确定的像差、杂散光、噪声和部分相干光源无法被估计。以上这些因素都会模糊过渡区域，从而产生异于仿真的实验观察结果。因此直接使用空变模型来重构图像是不太可能的,Pan 等人[153]提出了两个对应策略来绕过或者消除渐晕引入的伪影。一是将原先的大视场分割为若干个小视场。事实上,FPM 由于采用 LED 照明，为了保持空间相干性，也会进行图像分割,从而保持空间相干性,另一方面,减少了存储负担,有利于进行并行计算。但是这意味着图像分割是不得不执行的策略,而不是可选择的策略。如图 1(a)和图 1(c)所示,经过分割后物体放在视场正中央不会产生任何伪影,原始数据与理想模型相同,算法很快就收敛如图 1(e)所示。但是当把物体放在视场边缘时,如图 1(b1)所示,仍会有伪影,尽管已经比原先全视场恢复下的伪影小得多。这是因为在分块过程

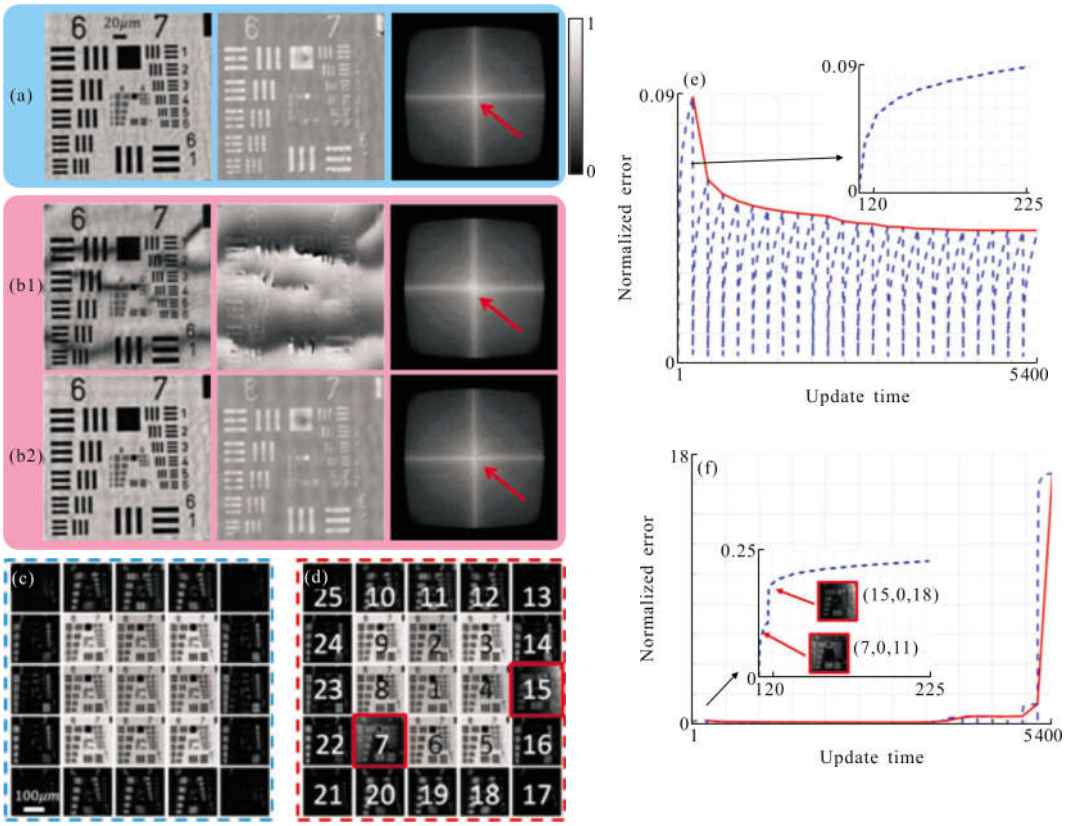

图 1 (a),(b1),(b2) 分辨率板分块下的重构结果(150 pixel×150 pixel);(a) 视场中央; (b) 视场边缘;(c), (d) 图 1(a)和(b)分块后对应的原始数据,红框:与理想线性空不变模型不匹配的小块;序数:更新顺序;(e),(f) 图 1(a)和(b)对应的误差曲线, 红线:迭代曲线,蓝线:每次迭代更新曲线,一次迭代包含 225 次更新[153]

Fig.1 (a), (b1), (b2) Reconstructions of resolution target with block processing (150 pixel×150 pixel); (a) center of FOV; (b) edge of FOV; (c), (d) corresponding segments of Figs.1(a) and 1(b), respectively, red boxes: segments that do not match the ideal LSI model; Sequence number: update order; (e), (f) error matrix of Fig.1(a) and Fig.1(b) respectively, red: error curves with iterations, Blue line: error curves with sub-iterations for each segment, a full iteration contains 225 updates (sub-iterations)[153]

中渐晕效应仍然会影响分块后的原始数据如图1(d)红框所示,算法迭代收敛曲线如图 1(f)所示,这两个不匹配的子图在每次迭代中都会急剧增大误差，甚至导致算法不收敛。因此策略二是根据强度判别并舍弃这些不匹配 LSI 模型的图像，当舍弃这两个不匹配的图像之后的重构结果如图 1(b2)所示,伪影消除。

1.4 系统混合误差

不同误差尽管机理不同，但是由于它们都是对原始数据的灰度或者理想模型造成影响，伪影都非常相似[134]。一方面,在无先验信息的情况下,虽然已经提出了一些针对不同系统误差的校准算法，但是很难根据图像恢复的结果判断系统的主要误差来源是什么，因而采用哪种校准算法通常只能依赖反复测试,成像效果只能凭主观选择。另一方面,系统误差往往是由多种误差混合而成，单一机理的误差校正算法可能会失效。因此发展一个实用的无先验的混合误差校正算法是非常迫切的。Pan 等人[150]首先研究了不同误差模型的兼容性问题,发现 LED 亮度校正算法[111]不能与像差恢复算法[110](EPRY-FPM)兼容,否则算法无法收敛;针对噪声的自适应步长算法[145](Adaptive-FPM)与 LED 位置校正算法[144](pcFPM)存在不兼容问题等。通过分析不同系统误差之间的相互作用关系，从全局的角度融合了不同的先进算法与模型，使其合理有效地校准系统误差并获得好的结果,该方法称为 SC-FPM。现有的系统误差除了渐晕效应以外的误差,均可以由一个数学模型表示如下

$$I_i(r)=w_i|F_{[O(k-k_i-\Delta k_i)P(k)e^{j\Phi}]}(r)|^2+I_{n,i} \tag{3}$$

式中：i 为图像序数；权重因子 w_i 表示 LED 强度不均匀误差；相位项 $e^{j\Phi}$ 代表了像差；强度项 $I_{n,i}$ 由噪声引入。LED 位置误差则使得 k_i 不再精确，引入位置误差项 Δk_i。SC-FPM 的算法流程如下：

首先，采用受噪声影响较小的低频图像(明场图像)进行 10 次迭代，迭代过程中采用模拟退火和非线性回归拟合 4 个全局实验参数，同时更新光瞳函数；固定这 4 个全局参数和光瞳函数，使用 LED 强度校正算法对所有图像迭代 3 次，由于这个过程偏差较大，所以每次迭代都需要初始化；之后停止 LED 强度校正方法，使用全部图像采用模拟退火和非线性回归进一步拟合 4 个全局实验参数，同时更新光瞳函数；待 4 个全局参数稳定后，停止模拟退火和非线性回归算法，使用自适应步长策略，伴随光瞳函数更新，直到步长收敛到零，算法收敛停止。

分辨率板的实验结果如图 2 所示。相比于其他算法，采用 SC-FPM 能够无先验地得到比较好的恢复结果，背景较为干净，通过把 SC-FPM 恢复的 4 个全局参数带入原始算法中进行补偿，重构后的结果如图 2(b6)~(d6)所示，结果也略好于 pcFPM 算法的结果，说明 SC-FPM 算法恢复的系统全局参数比 pcFPM 更为准确稳定。SC-FPM 算法的相关代码可供非商业使用[160]。

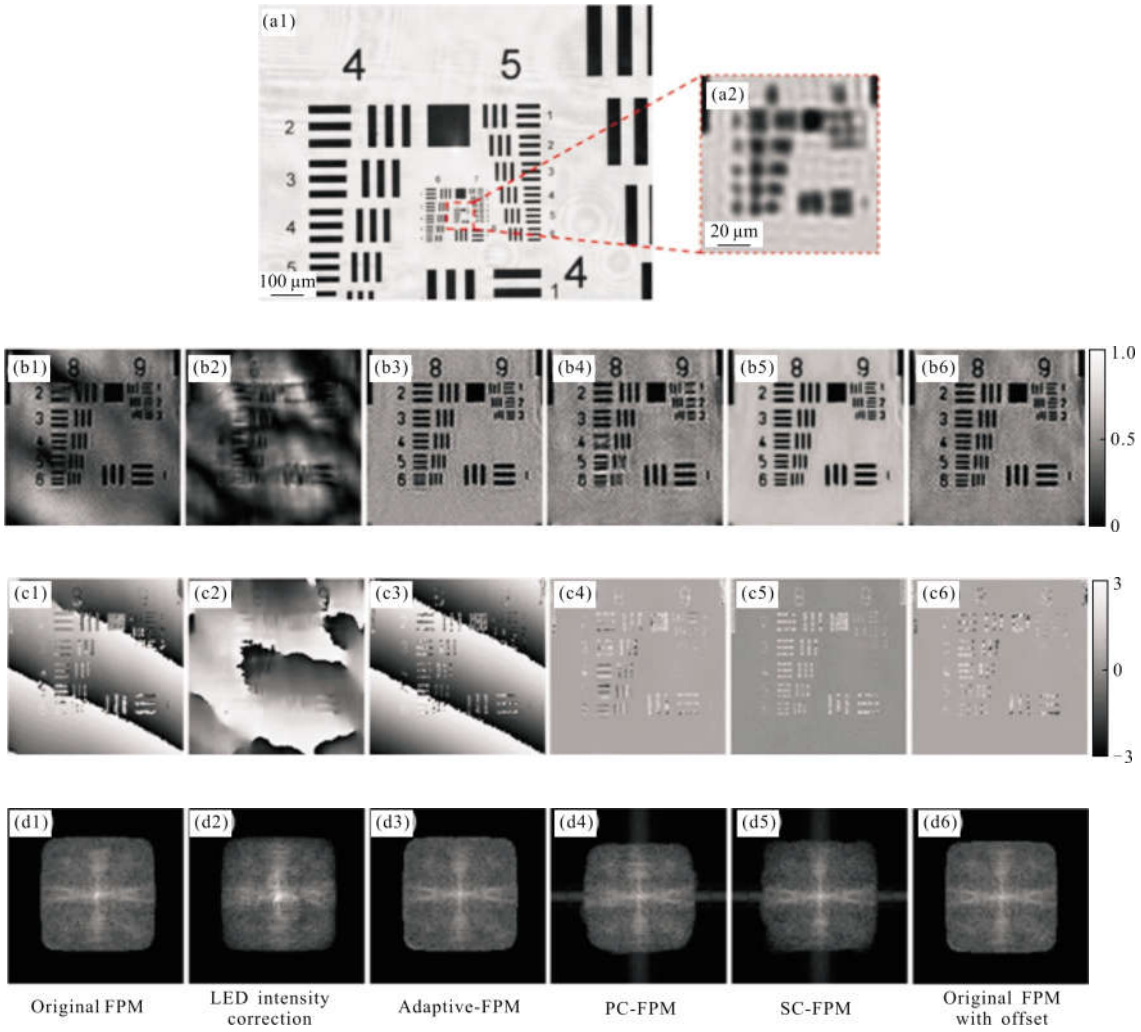

图 2 不同算法下分辨率板实验结果。(a1) 4×/0.1 NA 物镜下的采集的全视场图；(a2) 子视场放大图(90 pixel×90 pixel)；(b)，(c)，(d) 不同算法恢复下的强度、相位和傅里叶谱的恢复结果[150]

Fig.2 Experimental results of resolution target with different algorithms. (a1) full FOV captured with a 4×/0.1 NA objective; (a2) enlargement of a sub-region (90 pixel×90 pixel); (b), (c), (d) recovery results of intensity, phase and Fourier spectrum[150]

2 基于 FPM 的高通量成像

由于 LED 尺寸往往大于聚光镜，传统 FPM 需要把聚光镜替换为 LED 阵列。根据上述 1.1 节 LED 亮度不均匀分析可知，由于平板 LED 的平面几何限制，LED 的实际照明亮度会随着角度增大而衰减。使用商业 LED 平板基于 4×/0.1 NA 物镜所能实现的有效 NA 仍然限制在 0.3~0.7 范围内[152]。因此可实现最高的分辨率通常限制在 500~1 000 μm，这远不能满足高分辨生物医学成像的需求。尽管可以使用高倍高数值孔径物镜来提升分辨率，例如 Ou 等人[109]就使用了 40×/0.75 NA 物镜实现 1.45 的合成 NA，但是所牺牲的视场将会远超过分辨率的提升，这使得 FPM 丧失了原本的优势。本节将着重介绍两种基于 FPM 的高通量成像方法。

2.1 基于油浸聚光镜的高通量成像

由于缺乏聚光镜，导致 LED 照明随着角度的增加能量损失严重，照明效率极低。Sun 等人[147]提出了基于油浸聚光镜和紧密的 LED 平板阵列的 FPM 平台，称为 REFPM 平台，实现了基于 10×/0.4 NA 物镜合成至 1.6 NA，波长 435 nm，视场 2.34 mm²，对应空间带宽积为 9 800 万像素，成像装置如图 3 所示，成像结果(图 4)可媲美 60×/1.35 NA 油浸物镜，达到

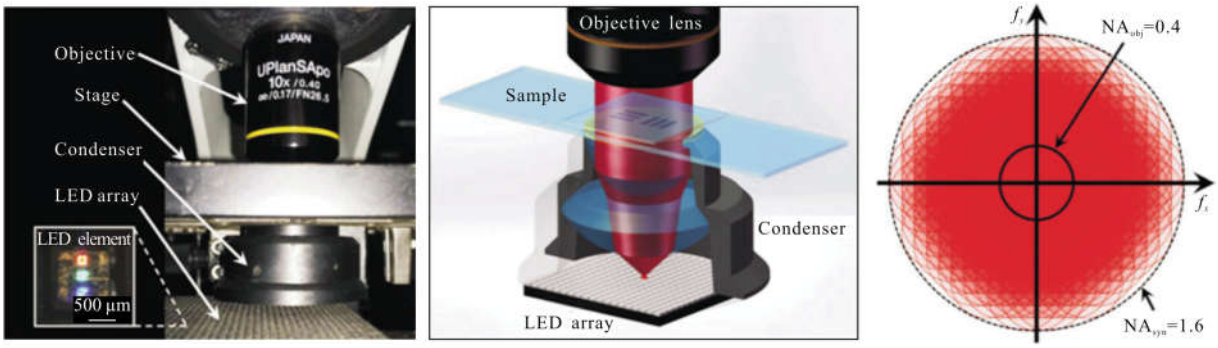

图 3 基于油浸聚光镜和紧密的 LED 平板阵列的 REFPM 光路图。(a) 实验装置包括 LED 阵列，油浸聚光镜(1.2 NA)和奥林巴斯物镜(10×/0.40 NA)；(b) REFPM 平台照明系统原理模型；(c) REFPM 平台在频域中的合成孔径情况[147]

Fig.3 Optical path of REFPM platform based on oil-immersed condenser and dense LED array. (a) Experimental setup involves an LED array, an oil-immersion condenser (1.2 NA) and an Olympus 10×/0.40 NA objective lens; (b) schematic diagram of the illumination system in REFPM platform; (c) synthesized apertures in the Fourier space using REFPM platform[147]

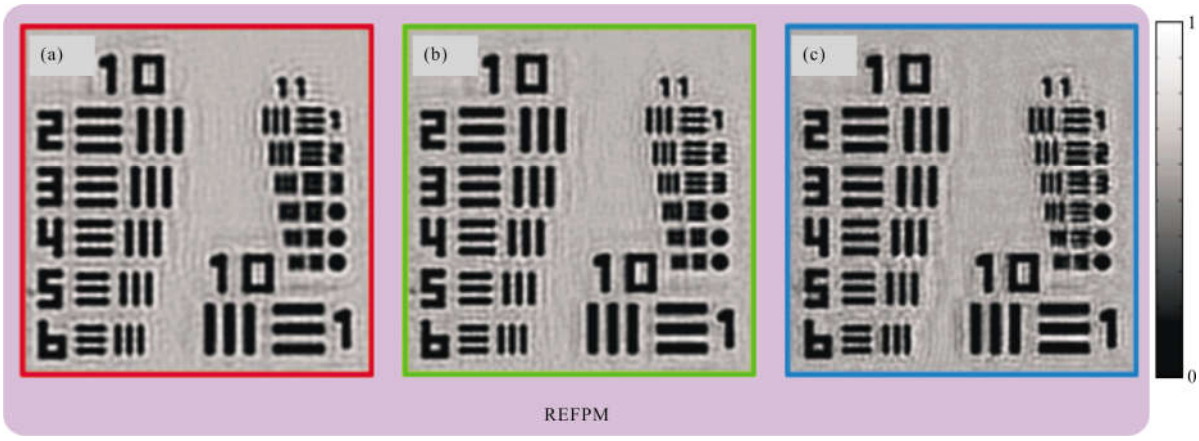

图 4 不同波长下的 REFPM 平台重构结果[147]

Fig.4 Reconstructions with different wavelengths via REFPM platform[147]

154 nm 半截距分辨率(11 组 5)。

2.2 基于半球形数字聚光镜的高通量成像

由于采样率的限制,Sun 等人[147]的系统最低倍率可使用的物镜为 10×物镜，然而不能使用更低倍的物镜视场的损失仍然很明显。Pan 等人[152]提出一种使用半球形数字聚光镜实现亚波长分辨率的 FPM 平台，称为 SRFP 平台如图 5 所示。这一聚光镜是由两块 3D 打印的四分之一球形聚光镜相拼合而成,半径为 80 mm 的内壁上沿轴向均匀镶有 415 颗(20 圈,24 列)可调节亮度的蓝光 LED(465 nm),可实现 0.95 的照明 NA,打破了传统的平面型 LED 阵列限制(图 6)。单颗 LED 的电功率可达 3.5 W,光功率可达 500 mW。实际使用中,电功率只需要 465 mW,曝光时间 10 ms。由于光学窗口的投影,半球形聚光镜光强正比于 $\cos\theta$ 如图 6(d)所示。与平板 LED 相比(正比于 $\cos^4\theta$ 如图 6(c)所示),能量效率上有了巨大的提升。这两种照明方式有着 $\cos^3\theta$ 的能量差别,这意味着在 40°入射角时平面 LED 相比半球形聚光镜能量低 50%,77°入射角时能量低至 99%,几乎无光。

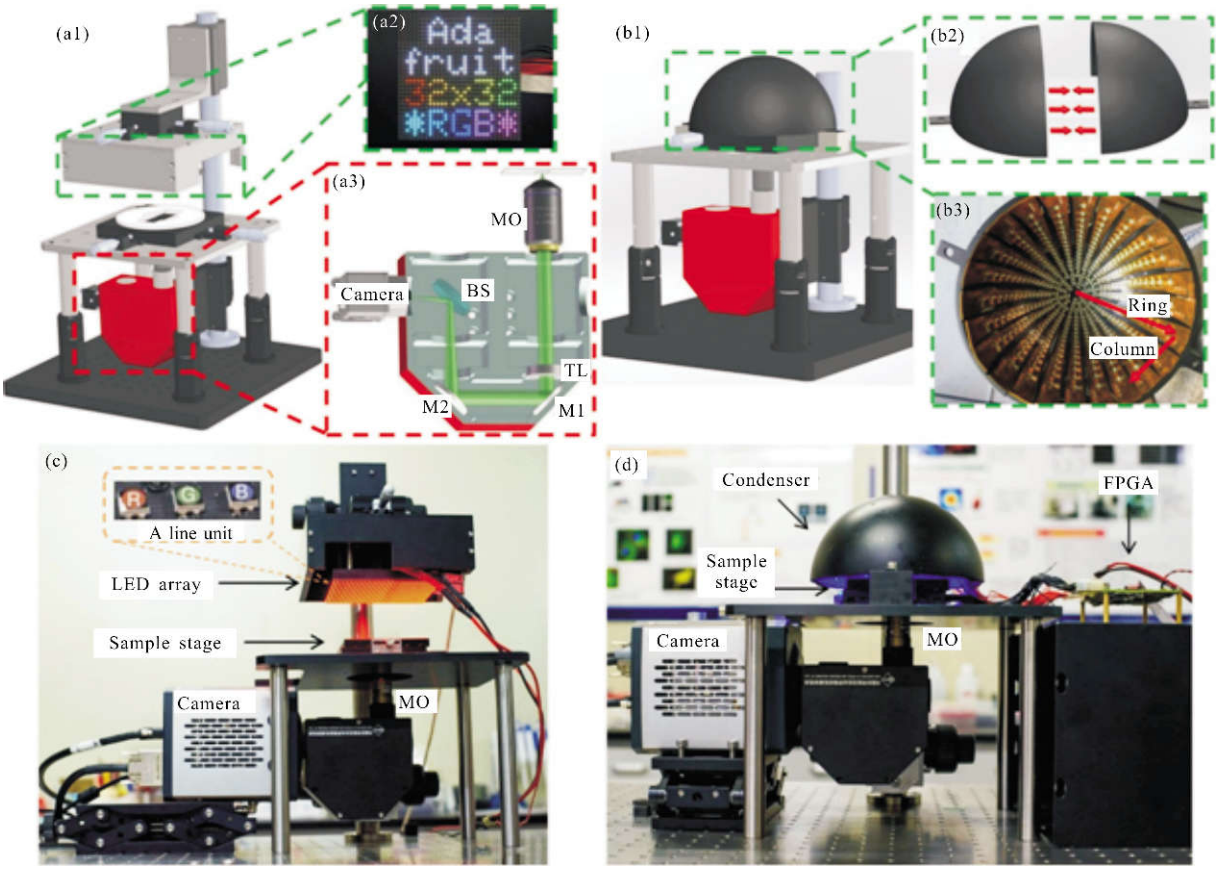

图 5 (a1) 基于平板 LED 的传统 FPM;(a2) 32×32 可编程 LED 阵列;(a3) 倒置显微镜光路图;MO: 物镜; TL: 筒镜; M1 和 M2:反射镜; BS:分束镜;(b1) 基于半球形数字聚光镜的 SRFP 平台原理图;(b2) 该半球形数字聚光镜由两个 3D 打印的四分之一球形聚光镜胶合而成;(b3) 半球形数字聚光镜的实物图;(c),(d) 对应系统的实物图[152]

Fig.5 (a1) Schematic of traditional FPM platform with LED board; (a2) 32×32 programmable LED matrix; (a3) light path diagram of an inverted microscope; MO: microscope objective; TL: tube lens; M1 and M2: mirrors; BS: beam splitter; (b1) schematic of the SRFP platform with hemispherical digital condensers; (b2) assembly of two 3D-printed quarter-spherical condensers; (b3) photography of the hemispherical digital condensers; (c) and (d) photographs of the corresponding optical setups, respectively[152]

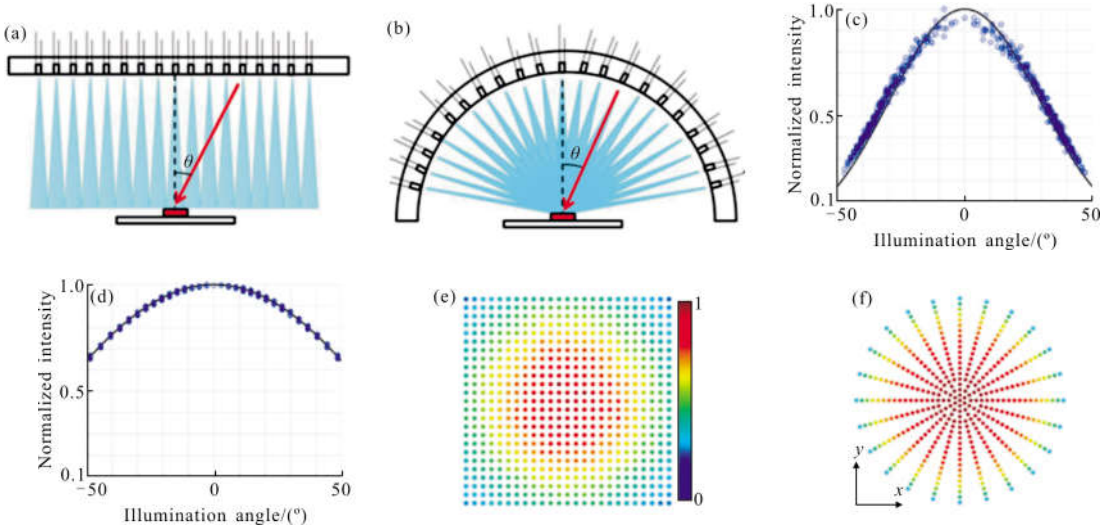

图 6 LED 强度校正方法。(a),(b) 平面 LED 和数字半球形聚光镜的模型;(c),(d) 实测平面 LED 和数字半球形聚光镜模型下相对于入射角的归一化强度分布,理论上平面 LED 强度分布正比于 $\cos^4\theta$,数字半球形聚光镜强度正比于 $\cos\theta$(黑色实线);(e),(f) 平面 LED 和数字半球形聚光镜的归一化强度分布俯视图[152]

Fig.6 LED intensity correction method. (a), (b) Model of planar LED array and hemispherical digital condenser respectively; (c), (d) normalized intensity falloff as a function of incident angle with the LED board and the condenser respectively. Falloff is proportional to $\cos^4\theta$ for the LED board and $\cos\theta$ for the condenser (black line); (e) and (f) top view of the normalized intensity of each LED element for the planar LED array and the condenser respectively[152]

根据设计，对于 4×/0.1 NA 物镜交叠率为 68.5%,满足了 FPM 所需要的采样要求[161]和图案设计优化[117]。对于不同的应用,可以使用更高 NA 的物镜获得更高的分辨率,相应的交叠率也会更高,但是视场和计算效率会有所牺牲。与传统的聚光镜不同,不需要透镜，反射镜或者机械扫描部件来控制照明 NA。SRFP 平台最终实现了基于 4×/0.1 NA 物镜合成至 1.05 NA，使用 465 nm 光波实现分辨率达到 244 nm (11 组 1)，视场 14.6 cm²，对应空间带宽积为 24 500 万像素(见图 7),相比于传统明场成像,SRFP 扩宽了数十倍的 SBP(比较结果见表 1),成像效果超过 40×/0.6 NA 物镜。相比于基于平板 LED 的传统 FPM,

表 1 不同照明光源和物镜下的半截距分辨率、视场及空间带宽积比较[152]

Tab.1 Comparison of the measured half-pitch resolution, FOV, and SBP with different illuminators and objectives[152]

	Objective lens	FOV/mm²	NA_{illu}	Theoretical NA_{syn}	Theoretical half-pitch resolution/nm	Theoretical SBP /megapixel	Measured half-pitch resolution/nm	Measured SBP /megapixel
Conventional incoherent microscopy	4×/0.1	14.60	0.10	0.20	1163	10.8	1740	4.8
	10×/0.3	2.34	0.30	0.60	388	15.5	775	3.9
	20×/0.45	0.58	0.45	0.90	258	8.7	548	1.9
	40×/0.6	0.15	0.60	1.20	194	3.9	388	1.0
Conventional FP with LED board	4×/0.1	14.60	0.53	0.63	369	107.2	488	61.3
			0.58	0.68	342	124.8	435	77.2
			0.63	0.73	318	144.4	388	97.0
			0.67	0.77	302	160.1	388	97.0
			0.70	0.80	291	172.4	388	97.0
			0.73	0.83	280	186.2	388	97.0
SRFP	4×/0.1	14.60	0.95	1.05	221.4	297.9	244	245.2

SBP 也提高了两倍以上。此外,结合 LED 亮度校正方法(硬件补偿)和 LED 位置校准算法(SC-FPM),进一步提升了成像质量(如图 7 所示)。其中 LED 位置校准算法的模型与 SC-FPM 略有不同, 共 3 个系统参数,平移因子 Δx,Δy,旋转因子 φ[152]。

$$\begin{cases} x_{m,n}=r_m\sin(\delta_n+\varphi)+\Delta x \\ y_{m,n}=r_m\cos(\delta_n+\varphi)+\Delta y \end{cases} \tag{4}$$

式中:r_m 为每一圈的横向半径;δ_n 为相对于 x 轴的夹角。

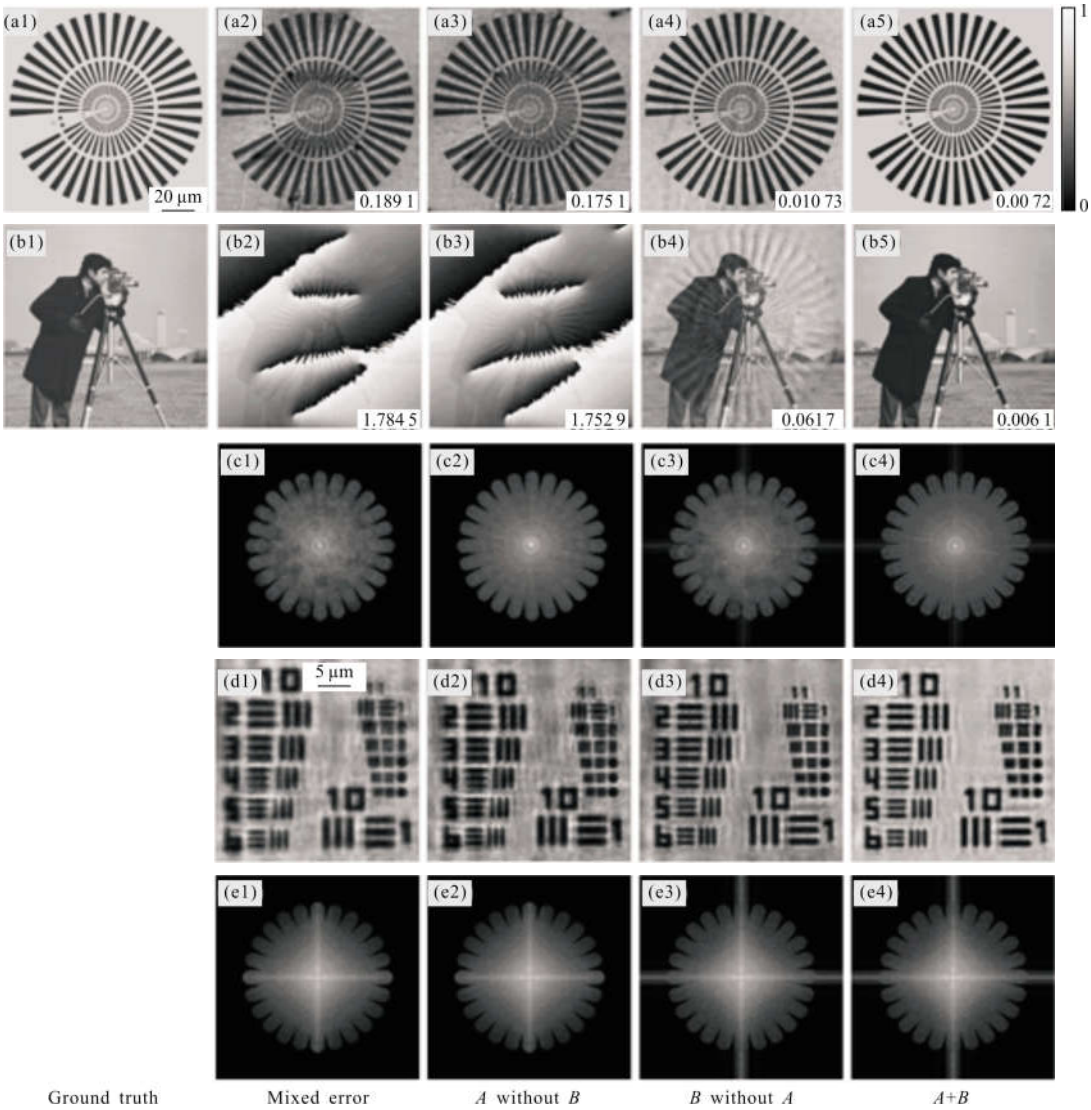

图 7 采用系统误差校正算法后 SRFP 系统下的仿真和实验结果。(a1),(b1) 仿真原始强度和相位;(a2)~(a5),(b2)~(b5)和 (c1)~(c4) 不同算法下仿真恢复的强度、相位和傅里叶谱,右下角的数字表示恢复结果相对原始结果的均方误差;(d1)~(d4)和(e1)~(e4) 分辨率板强度和傅里叶谱的实验恢复结果;A:LED 强度校正方法,B:LED 位置校准算法[152]

Fig.7 Simulations and experimental results in SRFP platform. (a1) and (b1) Simulated original intensity and phase; (a2)-(a5), (b2)-(b5) and (c1)-(c4) recovered results of intensity, phase and spectrum with different processing procedures in simulations. The numbers listed in the bottom right indicate the RMSE relative to the simulation ground truth. (d1)-(d4) and (e1)-(e4) The recovered results of intensity and spectrum of USAF resolution target with different processing procedures in experiments. A: LED intensity correction method; B: LED position correction method[152]

3 基于 FPM 的高速动态成像

如何提高数据采集速度,实现动态样品成像,是目前 FPM 的一大难点。针对这一问题,一系列的解决方法相继提出,包括自适应频谱更新法[162-163]、LED 多路复用法[136]、稀疏照明法[161],定量差分像衬

成像法(DPC)[129-133,148]、单次曝光法[149,164-165]、相机阵列法[166-167]等等,这里着重介绍一下体外无标记动态成像[137]、单次曝光波长复用成像[149]两种高速成像方法。

3.1 体外无标记细胞动态监测(成像)

不同于以往傅里叶叠层衍射成像术中逐行逐列地点亮 LED 的照明方式,Tian 等人[137]提出一种结合多路复用[136]和 DPC[131]方法的照明编码方法(source-coded FPM)。通过采集 4 幅不对称照明的明场图像和 17 幅随机 8 个暗场 LED 同时点亮的暗场图像,对照明光源进行编码,共采集 21 幅图,提高了照明功率,缩短了曝光时间,极大地减少了采集图像数量,使用 4×/0.2 NA 物镜合成至 0.8 NA, 实现了 1.25 Hz 动态成像(如图 8 所示)。对应地,算法上也需要进行相应的修改, 首先根据 4 幅不对称的亮场图像计算

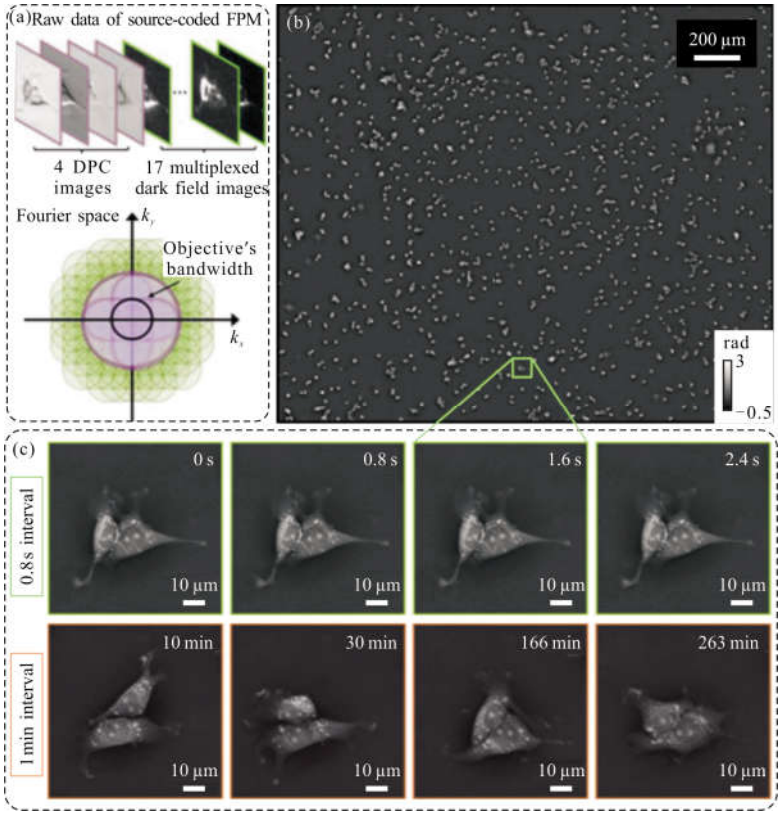

图 8 体外小鼠神经干细胞多尺度大空间带宽积的相位重构视频,获取速度 0.8 s 每帧。(a) 照明编码 FPM 采集 4 幅明场图像和 17 幅多路复用暗场图;(b) 4 倍物镜下全视场相位重构结果,分辨率合成至 0.8 NA;(c)子视场放大图,上面一行为连续帧的重构结果(1.25 Hz);下面一行为长时间监测下的时间反演结果(每帧 1 min,共 4.5 h)[137]

Fig.8 Large-SBP phase video reconstructions for observing multiscale temporal dynamics of in vitro NSCs with a high SBP and an acquisition time of 0.8 s per frame. (a) Our source-coded FPM captures four bright-field images and 17 multiplexed dark-field images; (b) full-FOV phase reconstruction using a 4× objective and achieving 0.8 NA resolution; (c) sample frames of reconstructed video for a zoom-in of one small area, top: successive frames at the maximum frame rate (1.25 Hz); bottom: sample frames across the longer time lapse (4.5 h at 1 min intervals)[137]

沿 x,y 轴的差分像衬图像, 沿 y 轴差分像衬图像计算如下[131]:

$$I^{\mathrm{DPC}}(r)=\frac{I_{\mathrm{T}}(r)-I_{\mathrm{B}}(r)}{I_{\mathrm{T}}(r)+I_{\mathrm{B}}(r)} \tag{5}$$

式中: 下标 T、B 表示照明模式上半部和下半部。同理可得沿 x 轴像衬图像。接着通过去卷积[131]的方式得到定量差分相位图,该图像具有两倍分辨率。

$$\phi(r)=F^{-1}\left\{\frac{\sum_j \mathrm{H}_j^*(u)I_{\mathrm{DPC},j}(u)}{\sum_j |H_j(u)|^2+\alpha}\right\} \tag{6}$$

式中:j 为差分像衬图的数量;H 为相位传递函数;α

为常数防止分母为零。使用 DPC 模型恢复的定量相位图像作为初始猜测，之后类似于传统 PIE 的混合态模型[77]，迭代恢复 8 个 LED 对应的频谱区域[136]，这里就不再过多赘述。多路复用算法能够有效地同时减少采集的图像数量以及算法重建时间，但其本质还是降低了冗余信息量，这意味着采用相同数量的图像使用稀疏照明[148,161]的方法也能实现同样的结果。

3.2 单次曝光波长复用成像

相比于 Tian 等人提出的照明编码方法，Sun 等人提出了单次曝光波长复用成像方法，称为 SFPM 系统，如图 9 所示，原理与波长复用的 DPC 相同[133]。但是由于不同波长下分辨率不相同，Sun 等人提出采用两幅图交替照明的模式来平衡分辨率的差异，因此最终的成像速度可以达到 25 Hz。相比于 Tian 等人的方案，Sun 等人的方案具有更快的速度，但是同时由于没有采集暗场图像，分辨率只能提高两倍。图 10 展示了体外宫颈癌细胞的单次曝光定量相位成像结果，可以动态观察到细胞前中后期的分裂情况。

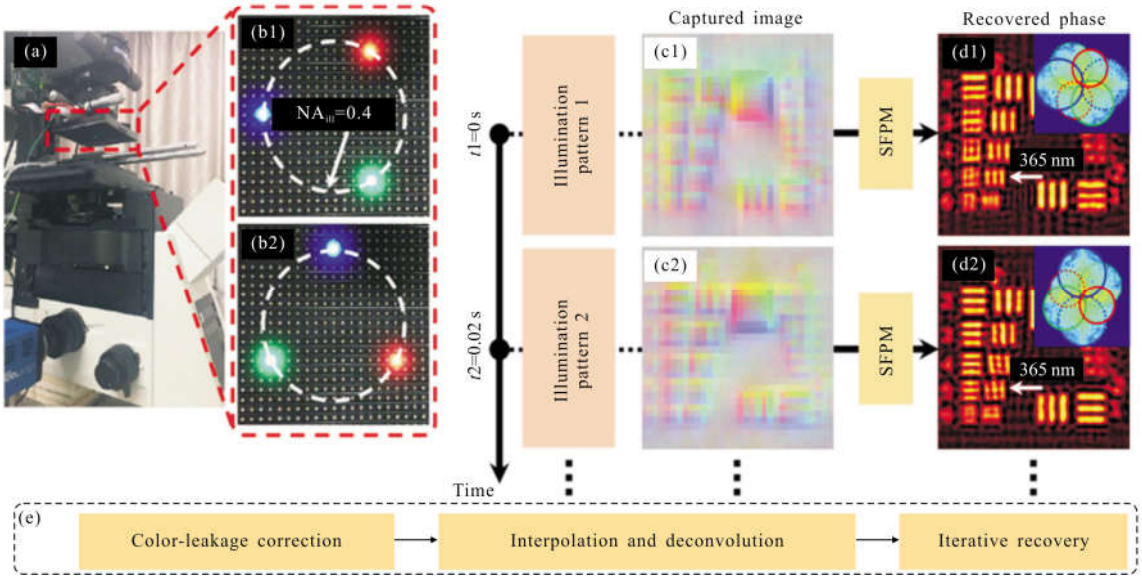

图 9 彩色复用照明和 SFPM 技术流程图。(a) SFPM 系统；(b1), (b2) 彩色照明图样；(c1)，(c2) 在 $t1-t2$ 时刻采集的两张彩色图样；(d1)，(d2) 对应恢复的相位图像；(e) SFPM 流程图[149]

Fig.9 Color-multiplexed illumination patterns and the flowchart of SFPM technique. (a) SFPM system; (b1),(b2) color-illumination patterns; (c1), (c2) captured color images at $t1-t2$; (d1), (d2) recovered phase maps corresponding to each color image; (e) flowchart of SFPM[149]

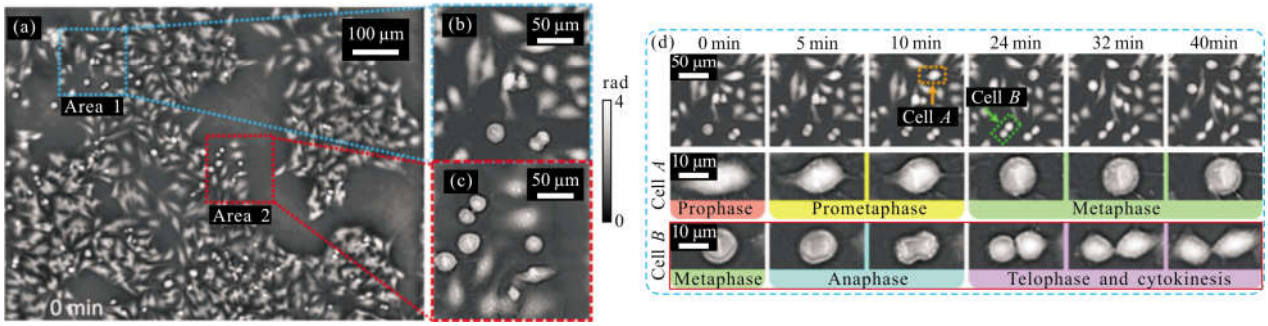

图 10 使用 SFPM 技术下体外宫颈癌细胞的单次曝光定量相位成像结果，0.02 s 每帧。(a) 某一帧的全视场相位恢复图；(b)，(c) 图(a)中蓝色和红色区域子视场放大图；(d) 蓝色区域重构的视频帧放大图，共采集 40 min，展示了每帧 5~8 min 间隔的情况[149]

Fig.10 Single-shot QPI of HeLa cells in vitro using SFPM with an acquisition time of 0.02 s per frame; (a) one frame of the full-FOV phase reconstruction; (b), (c) enlarged images of the blue-boxed and red-boxed regions in (a); (d) sample frames of a reconstructed video for a zoom-in view of blue-boxed regions in (a) at 5–8 min intervals across 40 min[149]

4 当前问题和发展趋势

自从 2013 年 FPM 技术提出以来，该技术在系统误差、成像通量、成像效率和应用范围这 4 大方面都获得了较大的发展，也已日趋完善。

首先，现有的 5 种系统误差中，像差、LED 亮度不均匀和 LED 位置未校准已经得到了很好的解决，但是噪声和渐晕效应仍然有研究的空间。现有的探测器所得到的暗场图像还不能够在不做噪声预处理的情况下直接使用，因此针对噪声的估计和抑制方法包括两方面。一方面是提出更鲁棒的迭代算法，已经提出的方法有最大似然估计法(MLE)[168]，维尔丁格优化法(WFP)[142]，序列高斯牛顿法[134]，自适应步长算法[145]，凸优化[124]，截断泊松维尔丁格优化法(TPWFP)[169]，自适应降噪法[146]，系统误差校正算法(SC-FPM)[150]等。当前主要使用序列高斯牛顿法，但是该方法仍然无法从数学上证明所恢复的结果为非凸优化的最优解。另一方面则是对原始数据进行操作，称为数据预处理方法。现有的方法经验因素很多，比如选取合适区域估算背景噪声[151]等。因此，针对噪声，特别是数据预处理方法仍然有探索的空间。当前针对渐晕效应所采用的两个策略——视场分割和舍弃不匹配子图，只是能够保证将原有的空变模型退化为空不变模型，从而使原先的算法能够收敛。然而这个过程中可能伴随着一定信息量的丢失（舍弃不匹配子图），且视场分割带来了硬件上 GPU 并行加速的要求。一个基于空变模型的空域重构算法有待提出。

第二，基于 FPM 的高通量成像中，无论是油浸物镜方案还是半球形数字聚光镜方案，在切换样品时都需要重新校准系统，这个过程比较费时。未来能够自动更换样品的高通量成像装置有待提出。

第三，现有的高速成像方法在无损失情况下最快可以达到 1.25 Hz[137]，但是要想进一步提速，要么牺牲视场大小[164-165]，要么牺牲空间分辨率(只用明场图像)，或者变相牺牲通量，同时单次曝光成像[149]要求样品对不同波长吸收相同。采用相机阵列[166-167]看似可以圆满解决这一问题，但是带来的是相机阵列间对应的频谱交叠率不够（反之限制了探测器尺寸)、系统成本急剧增加等问题。归根结底，视场、空间分辨率和时间分辨率之间存在不可调和的矛盾关系。高速成像方法仍有待完善。未来一种根据应用场景(参数要求)自动匹配成像方案的多模态成像系统有待提出。

第四，针对当前生物细胞的无标记动态培养监测需求[126]，一套无菌全封闭的基于 FPM 动态监测的多通道细胞培养装置有待提出。

第五，现有的基于 FPM 的三维成像方法，无论是采用多层切片模型还是光学断层模型，所重构的三维图像轴向分辨率都不够高，远低于横向分辨率。这也与相干成像的原理相关，相干成像的光学传递函数类似于“球冠”，无法像非相干成像一样具有很好的“光切片”能力。未来具有更高的轴向分辨率的三维成像方法有待提出。

第六，将 FPM 技术与荧光技术相结合，实现协同的多模态相位与荧光成像系统是未来的一种应用方向。尽管类似的系统已经被提出，但是相关的技术细节，诸如分辨率最高可提高到多少，FPM 三维成像不需要轴向扫描而三维荧光成像需要轴向扫描，所带来的不协同问题等等都有待解决。

5 结 论

随着高性能计算机、探测器及光源的发展，计算成像极大地改变了传统“所见即所得”的成像模式，通过对光学照明与成像系统进行光学编码(如：结构光照明、孔径编码、光学传递函数调制、探测器可控可移等)，这时由于额外引入的光学编码，所拍摄的图像已经经过调制，往往不能直接使用，但是通过与之相配合的数字解码过程，就可以重构理想场景。计算成像赋予传统光学诸多难以获得甚至无法获得的革命性优势，如提高显微成像的质量(信噪比、对比度、动态范围)，简化成像系统(无透镜、缩小体积、降低成本)，突破光学系统与图像采集设备的物理限制(成像维度、分辨率、视场尺寸)，使显微成像系统在信息获取能力、功能、性能指标(相位、相干度、三维形貌、景深延拓、模糊复原、重聚焦)等方面显著提升。FPM 技术便是其中最具代表性的技术之一。文中综述了 FPM 技术中系统误差的校正方法，高通量和高速傅里叶叠层显微成像术的基本原理、算法流程和最新进展，并给出了相关的实验结果。当前 FPM 技术已经日趋完善，未来则是发掘更多的潜在应用。

致 谢

感谢史祎诗教授(中国科学院大学)、左超教授(南京理工大学)长期指导与讨论,感谢姚保利课题组同仁富有成效的组会和日常讨论,感谢 Changhuei Yang 教授 (美国加州理工学院) 提供的学习机会和耐心指导,及课题组同仁富有远见的组会讨论。

参考文献:

[1] Thorn K. A quick guide to light microscopy in cell biology [J]. ***Molecular Biology of the Cell***, 2016, 27(2): 219-222.

[2] Murphy D B, Davidson M W. Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging [M]. Hoboken: John Wiley & Sons, 2012.

[3] Turpin T, Gesell L, Lapides J, et al. Theory of the synthetic aperture microscope [C]//SPIE, 1995, 2566: 230-240.

[4] Holloway J, Wu Y, Sharma M K, et al. SAVI: Synthetic apertures for long-range, subdiffraction-limited visible imaging using Fourier ptychography [J]. ***Science Advances***, 2017, 3(4): e1602564.

[5] Fischer R S, Wu Y, Kanchanawong P, et al. Microscopy in 3D: a biologist's toolbox [J]. ***Trends in Cell Biology***, 2011, 21(12): 682-691.

[6] Day R N, Davidson M W. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging [J]. ***Chemical Society Reviews***, 2011, 40(12): 5923.

[7] Dean K M, Palmer A E. Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic cellular imaging [J]. ***Nature Chemical Biology***, 2014, 10(7): 512-523.

[8] Pawley J B. Handbook of Biological Confocal Microscopy [M]. Madison: Springer, 2006.

[9] Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope [J]. ***Scanning***, 1988, 10(4): 128-138.

[10] Sekar R B, Periasamy A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations [J]. ***The Journal of Cell Biology***, 2003, 160 (5): 629-633.

[11] Heim R, Tsien R Y. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer [J]. ***Current Biology***, 1996, 6(2): 178-182.

[12] Selvin P R. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer [J]. ***Nature Structural & Molecular Biology***, 2000, 7(9): 730-734.

[13] Bastiaens P I, Squire A. Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell [J]. ***Trends in Cell Biology***, 1999, 9(2): 48-52.

[14] Digman M A, Caiolfa V R, Zamai M, et al. The phasor approach to fluorescence lifetime imaging analysis [J]. ***Biophysical Journal***, 2008, 94(2): L14-L16.

[15] Axelrod D. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology[J]. ***Traffic***, 2011, 2(11): 764-774.

[16] Maire G, Giovannini H, Talneau A, et al. Phase imaging and synthetic aperture super-resolution via total internal reflection microscopy[J]. ***Optics Letters***, 2018, 43(9): 2173-2176.

[17] Gustafsson M G. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structed illumination microscopy [J]. ***Journal of Microscopy***, 2000, 198(Pt2): 82-87.

[18] Neil M A, Juškaitis R, Wilson T. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in aconventional microscope [J]. ***Optics Letters***, 1993, 22(24): 1905-1907.

[19] York A G, Parekh S H, Dalle Nogare D, et al. Resolution doubling in live, multicellular organisms via multifocal structured illumination microscopy [J]. ***Nature Methods***, 2012, 9(7): 749-754.

[20] Mudry E, Belkebir K, Girard J, et al. Structuredillumination microscopy using unknown speckle patterns [J]. ***Nature Photonics***, 2012, 6: 312-315.

[21] Gao P, Pedrini G, Osten W. Phase retrieval with resolution enhancement by using structured illumination [J]. ***Optics Letters***, 2013, 38(24): 5204-5207.

[22] Gao P, Pedrini G, Osten W. Structured illumination for resolution enhancement and autofocusing in digital holographic microscopy[J]. ***Optics Letters***, 2013, 38(8): 1328-1330.

[23] Qian J, Lei M, Dan D, et al. Full-color structured illumination optical sectioning microscopy [J]. ***Scientific Reports***, 2015, 5: 14513.

[24] Dan D, Lei M, Yao B, et al. DMD-based LED-illumination super-resolution and optical sectioning microscopy [J]. ***Scientific Reports***, 2013, 3: 1116.

[25] Zhou X, Lei M, Dan D, et al. Image recombination transform algorithm for superresolution structured illumination microscopy [J]. ***Journal of Biomedical Optics***, 2016, 21(9): 096009.

[26] Yeh L H, Tian L, Waller L. Structured illumination microscopy with unknown patterns and a statistical prior [J]. ***Biomedical Optics Express***, 2017, 8(2): 695-711.

[27] Qian J, Dang S, Wang Z, et al. Large-scale 3D imaging of insects with nature color [J]. ***Optics Express***, 2019, 27(4):

4845-4857.

[28] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. ***Science***, 2006, 313(5793): 1642-1645.

[29] Hess S T, Girirajan T P, Mason M D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy[J]. ***Biophysical Journal***, 2006, 91(11): 4258-4272.

[30] Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy(STORM) [J]. ***Nature Methods***, 2005, 3(10): 793-795.

[31] Huang B, Babcock H, Zhuang X. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells [J]. ***Cell***, 2010, 143 (7): 1047-1058.

[32] Sigal Y M, Zhou R, Zhuang X. Visualizing and discovering cellular structures with super-resolution microscopy [J]. ***Science***, 2018, 361(6405): 880-887.

[33] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy [J]. ***Optics Letters***, 1994, 19(11): 780-782.

[34] Gao P, Prunsche B, Zhou L, et al. Background suppression in fluorescence nanoscopy with stimulated emission doubledepletion [J]. ***Nature Photonics***, 2017, 11: 163-169.

[35] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy [J]. ***Science***, 1990, 348 (4951): 73-76.

[36] Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy [J]. ***Nature Method***, 2005, 2(12): 932-940.

[37] Keller P J, Schmidt A D, Wittbrodt J, et al. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy[J]. ***Science***, 2008, 322(5904): 1065-1069.

[38] Chen B C, Legant W R, Wang K, et al. Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution[J]. ***Science***, 2014, 346(6208): 1257998.

[39] Keller P J, Ahrens M B. Visualizing whole-brain activity and development at the single-cell level using light-sheet microscopy [J]. ***Neuron***, 2015, 85(3): 462-483.

[40] Hoebe R A, Van Oven C H, Gadella T W Jr, et al. Controlled light-exposure microscopy reduces photobleaching and phototoxicity in fluorescence live-cell imaging [J]. ***Nature Biotechnology***, 2007, 25(2): 249-253.

[41] Gordeon M P, Ha T, Selvin P R. Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching [J]. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, 2004, 101(17): 6462-6465.

[42] Ferrara M A, Di Caprio G, Managò S, et al. Label-free imaging and biochemical characterization of bovine sperm cells [J]. ***Biosensors***, 2015, 5(2): 141-157.

[43] Zernike F. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects [J]. ***Physica***, 1942, 9(7): 686-698.

[44] Nomarski G. Differential microinterferometer with polarized waves[J]. ***Journal de Physique et le Radium***, 1955, 16: 9-13.

[45] Gao P, Yao B, Min J, et al. Parallel two-step phase-shifting point-diffraction interferometry for microscopy based on a pair of cubebeamsplitters [J]. ***Optics Express***, 2011, 19(3): 1930-1935.

[46] Gao P, Yao B, Lindlein N, et al. Phase-shift extraction for generalized phase-shifting interferometry [J]. ***Optics Letters***, 2009, 34(22): 3553-3555.

[47] Gao P, Harder I, Nercissian V, et al. Phase-shifting point-diffraction interferometry with common-path and in-line configuration formicroscopy [J]. ***Optics Letters***, 2010, 35(5): 712-714.

[48] Guo R, Yao B, Gao P, et al. Off-axis digital holographic microscopy with LED illumination based on polarization filtering[J]. ***Applied Optics***, 2013, 52(34): 8233-8238.

[49] Zheng J, Gao P, Shao X, et al. Refractive index measurement of suspended cells using opposed-view digital holographic microscopy [J]. ***Applied Optics***, 2017, 56(32): 9000-9005.

[50] Guo R, Wang F. Compact and stable real-time dual-wavelength digital holographic microscopy with a long-working distance objective [J]. ***Optics Express***, 2017, 25 (20): 24512-24520.

[51] Mico V, Ferreira C, Garcia J. Surpassing digital holography limits bylensless object scanning holography [J]. ***Optics Express***, 2012, 20(9): 9382-9395.

[52] Creath K. Phase-shifting speckle interferometry [J]. ***Applied Optics***, 1985, 24(18): 3053-3058.

[53] Rao C, Jiang W, Ling N. Measuring the power-law exponent of an atmospheric turbulence phase power spectrum with a Shack-Hartmann wave-front sensor [J]. ***Optics Letters***, 1999, 24(15): 1008-1010.

[54] Klibanov M V, Sacks P E, Tikhonravov A V. The phase retrieval problem [J]. ***Inverse Problems***, 1995, 11(1): 1-28.

[55] Teague M R. Deterministic phase retrieval: A Green′s function solution [J]. ***Journal of the Optical Society of America***, 1983, 73(11): 1434-1441.

[56] Fienup J R. Phase retrieval algorithms: a comparison [J]. ***Applied Optics***, 1982, 21(15): 2758-2769.

[57] Fienup J R. Reconstruction of an object from the modulus of

its Fourier transform[J]. ***Optics Letters***, 1978, 3(1): 27-29.

[58] Zuo C, Chen Q, Asundi A. Boundary-artifact-free phase retrieval with the transport of intensity equation: fast solution with use of discrete cosine transform [J]. ***Optics Express***, 2014, 22(8): 9220-9244.

[59] Zuo C, Chen Q, Huang L, et al. Phase discrepancy analysis and compensation for fast Fourier transform based solution of the transport of intensity equation [J]. ***Optics Express***, 2014, 22(14): 17172-17186.

[60] Huang L, Zuo C, Idir M, et al. Phase retrieval with the transport-of-intensity equation in an arbitrarily shaped aperture by iterative discrete cosine transforms [J]. ***Optics Letters***, 2015, 40(9): 1976-1979.

[61] Li J, Chen Q, Sun J, et al. Optimal illumination pattern for transport-of-intensity quantitative phase microscopy[J]. ***Optics Express***, 2018, 26(21): 27599-27614.

[62] Zuo C, Chen Q, Qu W, et al. High-speed transport-of-intensity phase microscopy with an electrically tunable lens [J]. ***Optics Express***, 2013, 21(20): 24060-24075.

[63] Zuo J, Vartanyants I, Gao M, et al. Atomic resolution imaging of a carbon nanotube from diffraction intensities [J]. ***Science***, 2003, 300(5624): 1419-1421.

[64] Faulkner H M L, Rodenburg J M. Movable aperture lenless transmission microscopy: a novel phase retrieval algorithm [J]. ***Physical Review Letters***, 2004, 93(2): 023903.

[65] Rodenburg J M, Faulkner H M L. A phase retrieval algorithm for shifting illumination [J]. ***Applied Physics Letters***, 2004, 85(20): 4795-4797.

[66] Maiden A M, Rodenburg J M. An improved ptychographical phase retrieval algorithm for diffractive imaging [J]. ***Ultramicroscopy***, 2009, 109(10): 1256-1262.

[67] Thibault P, Dierolf M, Bunk O, et al. Probe retrieval in ptychographic coherent diffractive imaging [J]. ***Ultramicroscopy***, 2009, 109(4): 338-343.

[68] Maiden M, Humphry J, Rodenburg J. Ptychographic transmission microscopy in three dimensions using a multi-slice approach[J]. ***Journal of the Optical Society of America A***, 2012, 29(8): 1606-1614.

[69] Li P, Batey D, Edo T, et al. Separation of three-dimensional scattering effects in tilt-series Fourier ptychography [J]. ***Ultramicroscopy***, 2015, 158:1-7.

[70] Maiden A, Johnson D, Li P. Further improvements to the ptychographical iterative engine[J]. ***Optica***, 2017, 4(7): 736-745.

[71] Pfeifer M, Williams G, Vartanyants I, et al. Three-dimensional mapping of a deformation field inside a nanocrystal [J]. ***Nature***, 2006, 442: 63-66.

[72] Thibault P, Dierolf M, Menzel A, et al. High-resolution scanning x-ray diffraction microscopy[J]. ***Science***, 2008, 321 (5887): 379-382.

[73] Humphry M J, Kraus B, Hurst A C, et al. Ptychographic electron microscopy using high-angle dark-field scattering for sub-nanometre resolution imaging[J]. ***Nature Communications***, 2012, 3: 730.

[74] Holler M, Diaz A, Guizar-sicairos M, et al. X -ray ptychographic computed tomography at 16 nm isotropic 3D resolution[J]. ***Scientific Reports***, 2014, 4: 3857.

[75] Dierolf M, Menzel A, Thibault P, et al. Ptychographic X-ray computed tomography at the nanoscale[J]. ***Nature***, 2010,467: 436-440.

[76] Wang H, Liu C, Pan X, et al. The application of ptychography in the field of high power laser [C]//SPIE, 2015, 9255: 925534.

[77] Thibault P, Menzel A. Reconstructing state mixtures from diffraction measurements[J]. ***Nature***, 2013, 494(7435): 68-71.

[78] Liu C, Walther T, Rodenburg J M. Influence of thick crystal effects on ptychographic image reconstruction with moveable illumination[J]. ***Ultramicroscopy***, 2009, 109(10): 1263-1275.

[79] Yao Yudong, Liu Cheng, Pan Xingchen, et al. Research status and development trend of PIE imaging method [J]. ***Chinese Journal of Lasers***, 2016, 43 (6): 0609001. (in Chinese)

[80] Chen Wen, Jiang Zhilong, Liu Cheng, et al. Depth resolved imaging by 3PIE with dual-beam illumination [J]. ***Acta Optica Sinica***, 2016, 36(8): 0811002. (in Chinese)

[81] Yu W, Wang S, Veetil S, et al. High-quality image reconstruction method for ptychography with partially coherent illumination [J]. ***Physical Review B***, 2016, 93: 241105.

[82] Pan An, Wang Dong, Shi Yishi, et al. Incoherent ptychography in Fresnel domain with simultaneous multi-wavelength illumination[J]. ***Acta Physica Sinica***, 2016, 65(12): 124201. (in Chinese)

[83] Pan An, Zhang Xiaofei, Wang Bin, et al. Experimental study on three-dimensional ptychography for thick sample[J]. ***Acta Physica Sinica***, 2016, 65(1): 014204. (in Chinese)

[84] Pan A, Zhou M, Zhang Y, et al. Adaptive-window angular spectrum algorithm for near-field ptychography [J]. ***Optics Communications***, 2019, 430: 73-82.

[85] Pan A, Yao B. Three-dimensional space optimization for near-field ptychography [J]. ***Optics Express***, 2019, 27(4): 5433-5446.

[86] Shi Y, Li T, Wang Y, et al. Optical image encryption via ptychography[J]. ***Optics Letters***, 2013, 38(9): 1425-1427.

[87] Shi Y, Wang Y, Li T, et al. Ptychographical imaging algorithm with a single random phase encoding [J]. ***Chinese Physics Letters***, 2013, 30(7): 074203.

[88] Gao Q, Wang Y, Li T, et al. Optical encryption of unlimited-size images based on ptychographic scanning digital holography [J]. ***Applied Optics***, 2014, 53(21): 4700-4707.

[89] Li T, Shi Y. Security risk of diffractive-imaging-based optical cryptosystem [J]. ***Optics Express***, 2015, 23(16): 21384-21391.

[90] Liu Zhenjun, Guo Chen, Tan Jiubin. Lensfree computational imaging based on multi-distance phase retrieval [J]. ***Infrared and Laser Engineering***, 2018, 47(10): 1002002. (in Chinese)

[91] Zhou M, Min J, Gao P, et al. Single-beam phase retrieval with partially coherent light illumination [J]. ***Journal of Optics***, 2016, 18(1): 015701.

[92] Redondo R, Bueno G, Valdiviezo J C, et al. Autofocus evaluation for brightfield microscopy pathology [J]. ***Journal of Biomedical Optics***, 2012, 17(3): 036008.

[93] Wang Z, Lei M, Yao B, et al. Compact multi-band fluorescent microscope with an electrically tunable lens for autofocusing [J]. ***Biomedical Optics Express***, 2015, 6(11): 4353-4364.

[94] Heng X, Erickson D, Baugh L R, et al. Optofluidic microscopy: a method for implementing high resolution optical microscope on a chip [J]. ***Lab on a Chip***, 2006, 6(10): 1274-1276.

[95] Psaltis D, Quake S R, Yang C. Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics [J]. ***Nature***, 2006, 442(7101): 381-386.

[96] Heng X, Hsiao E, Psaltis D, et al. An optical tweezer actuated, nanoaperture-grid based optofluidic microscope implementation[J]. ***Optics Express***, 2007, 15(25): 16367-16375.

[97] Lew M, Cui X, Heng X, et al. Interference of a four-hole aperture for on-chip quantitative two-dimensional differential phase imaging [J]. ***Optics Letters***, 2007, 32(20): 2963-2965.

[98] Cui X, Lee L M, Heng X, et al. Lensless high-resolution on-chip optofluidic microscopes for Caenorhabditis elegans and cell imaging [J]. ***Proceedings of the National Academy of Science***, 2008, 105(31): 10670-10675.

[99] Wu J, Cui X, Lee L M, et al. The application of Fresnel zone plate based projection in optofluidic microscopy [J]. ***Optics Express***, 2008, 16(20): 15595-15602.

[100] Pang S, Cui X, DeModena J, et al. Implementation of a color-capable optofluidic microscope on a RGB CMOS color sensor chip substrate [J]. ***Lab on a Chip***, 2010, 10(4): 411-414.

[101] Zheng G, Lee S A, Yang S, et al. Sub-pixel resolving optofluidic microscope for on-chip cell imaging [J]. ***Lab on a Chip***, 2010, 10(22): 3125-3129.

[102] Zheng G, Lee S A, Antebi Y, et al. The ePetri dish, an on-chip cell imaging platform based on subpixel perspective sweeping microscopy (SPSM) [J]. ***Proceedings of the National Academy of Science***, 2011, 108(41): 16889-16894.

[103] Bishara W, Su T W, Coskun A F, et al. Lensfree on-chip microscopy over a wide field-of-view using pixel super-resolution [J]. ***Optics Express***, 2010, 18(11): 11181-11191.

[104] Greenbaum A, Luo W, Su T W, et al. Imaging without lenses: achievements and remaining challenges of wide-field on-chip microscopy [J]. ***Nature Methods***, 2012, 9(9): 889-895.

[105] Luo W, Greenbaum A, Zhang Y, et al. Synthetic aperture-based on-chip microscopy[J]. ***Light: Science & Applications***, 2015, 4: e261.

[106] Zhang J, Sun J, Chen Q, et al. Adaptive pixel-super-resolved lensfree in-line digital holography for wide-field on-chip microscopy [J]. ***Scientific Reports***, 2017, 7(1): 11777.

[107] Zheng G, Horstmeyer R, Yang C. Wide-field, high-resolution Fourier ptychographic microscopy [J]. ***Nature Photonics***, 2013, 7(9): 739-745.

[108] Ou X, Horstmeyer R, Yang C, et al. Quantitative phase imaging via Fourier ptychographic microscopy [J]. ***Optics Letters***, 2013, 38(22): 4845-4848.

[109] Zheng G, Ou X, Horstmeyer R, et al. Characterization of spatially varying aberrations for wide field-of-view microscopy[J]. ***Optics Express***, 2013, 21(13): 15131-15143.

[110] Ou X, Zheng G, Yang C. Embedded pupil function recovery for Fourier ptychographic microscopy [J]. ***Optics Express***, 2014, 22(5): 4960-4972.

[111] Bian Z, Dong S, Zheng G. Adaptive system correction for robust Fourier ptychographic imaging [J]. ***Optics Express***, 2013, 21(26): 32400-32410.

[112] Zheng G. Breakthroughs in photonics 2013: Fourier ptychographic imaging[J]. ***IEEE Photonics Journal***, 2014, 6(2): 1-7.

[113] Dong S, Nanda P, Shiradkar R, et al. High-resolution fluorescence imaging via pattern-illuminated Fourier ptychography [J]. ***Optics Express***, 2014, 22(17): 20856–20870.

[114] Dong S, Shiradkar R, Nanda P, et al. Spectral multiplexing and coherent-state decomposition in Fourier ptychographic imaging[J]. ***Biomedical Optics Express***, 2014, 5(6): 1757–1767.

[115] Horstmeyer R, Ou X, Zheng G, et al. Digital pathology with Fourier ptychography [J]. ***Computerized Medical Imaging and Graphics***, 2015, 42: 38–43.

[116] Guo K, Liao J, Bian Z, et al. Instant scope: a low-cost whole slide imaging system with instant focal plane detection [J]. ***Biomedical Optics Express***, 2015, 6(9): 3210–3216.

[117] Guo K, Dong S, Nanda P, et al. Optimization of sampling pattern and the design of Fourier ptychographic illuminator [J]. ***Optics Express***, 2015, 23(5): 6171–6180.

[118] Horstmeyer R, Chung J, Ou X, et al. Diffraction tomography with Fourier ptychography [J]. ***Optica***, 2016, 3(8): 827–835.

[119] Pacheco S, Zheng G, Liang R. Reflective Fourier ptychography [J]. ***Journal of Biomedical Optics***, 2016, 21(2): 026010.

[120] Chung J, Kim J, Ou X, et al. Wide field-of-view fluorescence image deconvolution with aberration-estimation from Fourier ptychography [J]. ***Biomedical Optics Express***, 2016, 7(2): 352–368.

[121] Zheng G, Ou X, Yang C. 0.5 gigapixel microscopy using a flatbed scanner [J]. ***Biomedical Optics Express***, 2013, 5(1): 1–8.

[122] Guo K, Bian Z, Dong S, et al. Microscopy illumination engineering using a low-cost liquid crystal display [J]. ***Biomedical Optics Express***, 2015, 6(2): 574–579.

[123] Dong S, Horstmeyer R, Shiradkar R, et al. Aperture-scanning Fourier ptychography for 3D refocusing and super-resolution macroscopic imaging [J]. ***Optics Express***, 2014, 22(11): 13586–13599.

[124] Horstmeyer R, Chen R Y, Ou X, et al. Solving ptychography with a convex relaxation[J]. ***New Journal of Physics***, 2015, 17(5): 053044.

[125] Horstmeyer R, Yang C. A phase space model of Fourier ptychographic microscopy [J]. ***Optics Express***, 2014, 22(1): 338–358.

[126] Kim J, Henley B M, Kim C H, et al. Incubator embedded cell culture imaging system (emsight) based on fourier ptychographic microscopy [J]. ***Biomedical Optics Express***, 2016, 7(8): 3097–3110.

[127] Ou X, Chuang J, Horstmeyer R, et al. Aperture scanning Fourier ptychographic microscopy [J]. ***Biomedical Optics Express***, 2016, 7(8): 3140–3150.

[128] Mico V, Zheng J, Garcia J, et al. Resolution enhancement in quantitative phase microscopy [J]. ***Advances in Optics and Photonics***, 2019, 11(1): 135–214.

[129] Tian L, Wang J, Waller L. 3D differential phase-contrast microscopy with computational illumination using an LED array[J]. ***Optics Letter***, 2014, 39(5): 1326–1329.

[130] Liu Z, Tian L, Liu S, et al. Real-time brightfield, darkfield, and phase contrast imaging in a light-emitting diode array microscope [J]. ***Journal of Biomedical Optics***, 2014, 19(10): 106002.

[131] Tian L, Waller L. Quantitative differential phase contrast imaging in an LED array microscope [J]. ***Optics Express***, 2015, 23(9): 11394–11403.

[132] Chen M, Tian L, Waller L. 3D differential phase contrast microscopy [J]. ***Biomedical Optics Express***, 2016, 7(10): 3940–3950.

[133] Phillips Z F, Chen M, Waller L. Single-shot quantitative phase microscopy with color-multiplexed differential phase contrast (cDPC) [J]. ***PloS One***, 2017, 12(2): e0171228.

[134] Yeh L H, Dong J, Zhong J, et al Experimental robustness of Fourier ptychography phase retrieval algorithms [J]. ***Optics Express***, 2015, 23(26): 33214–33240.

[135] Tian L, Waller L. 3D intensity and phase imaging from light field measurements in an LED array microscope [J]. ***Optica***, 2015, 2(2): 104–111.

[136] Tian L, Li X, Ramchandran K, et al. Multiplexed coded illumination for Fourier ptychography with an LED array microscope [J]. ***Biomedical Optics Express***, 2014, 5(7): 2376–2389.

[137] Tian L, Liu Z, Yeh L H, et al. Computational illumination for high-speed in vitro fourier ptychographic microscopy [J]. ***Optica***, 2015, 2(10), 904–911.

[138] Guo K, Zhang Z, Jiang S, et al. 13–fold resolution gain through turbid layer via translated unknown speckle illumination [J]. ***Biomedical Optics Express***, 2018, 9(1): 260–274.

[139] Yilmaz H, Putten E, Bertolotti J, et al. Speckle correlation resolutionenhancement of wide-field fluorescence imaging [J]. ***Optica***, 2015, 2(5): 424–429.

[140] Yeh L H, Chowdhury S, Waller L. Computational structured illumination forhigh-content fluorescence and phase microscopy [J]. ***Biomedical Optics Express***, 2019, 10(4): 1978–1998.

[141] Zhang Y, Jiang W, Dai Q. Nonlinear optimization approach

for Fourier ptychographic microscopy [J]. ***Optics Express***, 2015, 23(26): 33822-33835.

[142] Bian L, Suo J, Zheng G, et al. Fourier ptychographic reconstruction using Wirtinger flow optimization [J]. ***Optics Express***, 2015, 23(4): 4856-4866.

[143] Bian L, Zheng G, Guo K, et al. Motion-corrected Fourier ptychography [J]. ***Biomedical Optics Express***, 2016, 7(11): 4543-4553.

[144] Sun J, Chen Q, Zhang Y, et al. Efficient positional misalignment correction method for fourier ptychographic microscopy [J]. ***Biomedical Optics Express***, 2016, 7(3): 1336-1350.

[145] Zuo C, Sun J, Chen Q. Adaptive step-size strategy for noise-robust Fourier ptychographic microscopy [J]. ***Optics Express***, 2016, 24(18): 20724-20744.

[146] Fan Y, Sun J, Chen Q, et al. Adaptive denoising method for Fourier ptychographic microscopy[J]. ***Optics Communications***, 2017, 404: 23-31.

[147] Sun J, Zuo C, Zhang L, et al. Resolution-enhanced Fourier ptychographic microscopy based on high-numerical-aperture illuminations [J]. ***Scientific Reports***, 2017, 7(1): 1187.

[148] Sun J, Zuo C, Zhang J, et al. High-speed fourier ptychographic microscopy based on programmable annular illuminations [J]. ***Scientific Reports***, 2018, 8(1): 7669.

[149] Sun J, Chen Q, Zhang J, et al. Single-shot quantitative phase microscopy based on color-multiplexed Fourier ptychography [J]. ***Optics Letters***, 2018, 43(14): 3365-3368.

[150] Pan A, Zhang Y, Zhao T, et al. System calibration method for Fourier ptychographic microscopy [J]. ***Journal of Biomedical Optics***, 2017, 22(9): 096005.

[151] Zhang Y, Pan A, Lei M, et al. Data preprocessing methods for robust Fourier ptychographic microscopy [J]. ***Optics Engineering***, 2017, 56(12): 123107.

[152] Pan A, Zhang Y, Wen K, et al. Subwavelength resolution Fourier ptychography with hemispherical digital condensers [J]. ***Optics Express***, 2018, 26(18): 23119-23131.

[153] Pan A, Zuo C, Xie Y, et al. Vignetting effect in Fourier ptychographic microscopy [J]. ***Optics and Lasers in Engineering***, 2019, 120: 40-48.

[154] Pan A, Wen K, Yao B. Linear space-variant optical cryptosystem via Fourier ptychography [J]. ***Optics Letters***, 2019, 44(8): 2032-2035.

[155] Maiden A M, Humphry M J, Sarahan M C, et al. An annealing algorithm to correct positioning errors in ptychography [J]. ***Ultramicroscopy***, 2012, 120: 64-72.

[156] Zhang F, Peterson I, Vila-Comamala J, et al. Translation position determination in ptychographic coherent diffraction imaging [J]. ***Optics Express***, 2013, 21(11): 13592-13606.

[157] Horstmyer R, Ou X, Chuang J, et al. Overlapped Fourier coding for optical aberration removal [J]. ***Optics Express***, 2014, 22(20): 24062-24080.

[158] Horstmeyer R, Heintzmann R, Popescu G, et al. Standardizing the resolution claims for coherent microscopy [J]. ***Nature Photonics***, 2016, 10: 68-76.

[159] Gibbs J W. Fourier series [J]. ***Nature***, 1898, 59: 200.

[160] Pan A, Zhang Y, Zhao T, et al. https://www.sites.google.com/site/dranpanblog/publications.

[161] Sun J, Chen Q, Zhang Y, et al. Sampling criteria for Fourier ptychographic microscopy in object space and frequency space [J]. ***Optics Express***, 2016, 24(14): 15765-15781.

[162] Bian L, Suo J, Situ G, et al. Content adaptive illumination for Fourier ptychography [J]. ***Optics Letters***, 2014, 39(23): 6648-6651.

[163] Zhang Y, Jiang W, Tian L, et al. Self-learning based Fourier ptychographic microscopy [J]. ***Optics Express***, 2015, 23(14): 18471-18486.

[164] He X, Liu C, Zhu J. Single-shot fourier ptychography based on diffractive beam splitting [J]. ***Optics Letters***, 2018, 43(2): 214-217.

[165] Lee B, Hong K, Yoo D, et al. Single-shot phase retrieval via Fourier ptychography [J]. ***Optica***, 2018, 5(8): 976-983.

[166] Konda P, Taylor J M, Harvey A R. Scheimpflug multi-aperture Fourier ptychography: coherent computational microscope with gigapixels/s data acquisition rates using 3D printed components[C]//SPIE, 2017, 10076: 100760R.

[167] Konda P, Taylor J M, Harvey A R. Parallelized aperture synthesis using multi-aperture Fourier ptychographic microscopy [J]. arXiv preprint arXiv, 2018: 1806.02317.

[168] Thibault P, Guizar-Sicairos M. Maximum-likelihood refinement for coherent diffraction imaging [J]. ***New Journal of Physics***, 2012, 14(6): 063004.

[169] Bian L, Suo J, Chung J, et al. Fourier ptychographic reconstruction using poisson maximum likelihood and truncated Wirtinger gradient [J]. ***Scientific Reports***, 2016, 6: 27384.