

用于大景深三维纳米分辨多分子追踪的衍射光学元件的设计制备和实验研究*

于斌¹⁾ 李恒¹⁾ 陈丹妮¹⁾²⁾ 牛憨笨^{1)†}

1) (深圳大学光电工程学院, 光电子器件与系统 (教育部/广东省) 重点实验室, 深圳 518060)

2) (清华大学, 精密测试技术及仪器国家重点实验室, 北京 100084)

(2013年3月8日收到; 2013年4月25日收到修改稿)

发展能实时检测完整细胞内多个生物分子随时空变化的单分子探测和追踪技术, 对于研究生命过程的分子机理具有重要意义. 在变形光栅多阶成像和双螺旋点扩散函数成像方法的基础上, 基于波前编码的原理, 提出将二者优化结合, 获得全新的衍射光学元件, 该器件同时具有多重平面成像和双螺旋点扩散函数成像的功能, 旨在解决活细胞内单分子探测和追踪技术中的大景深探测难题. 设计和制备了该器件, 并基于该器件搭建了显微成像系统, 实验模拟证明该衍射光学元件同时可实现轴向 12 μm 的探测范围, 与理论设计结果相符合, 从而有效扩大了显微镜系统的景深, 证明了设计的可行性.

关键词: 多分子追踪, 衍射光学元件, 变形光栅, 双螺旋点扩散函数

PACS: 42.30.-d, 42.30.Kq, 42.30.Va, 87.64.M-

DOI: 10.7498/aps.62.154206

1 引言

细胞是生物体及生命活动的基本单元, 对细胞的深入研究是揭开生命奥秘, 改造生命和征服疾病的关键. 细胞参与生命活动的基础是细胞内外大量的生物大分子相互作用, 发展能实时检测多个生物分子随时空变化的单分子探测和追踪技术, 可以加深人们对这些交互过程的理解, 研究生命过程的分子机理.

近年来, 单分子定位显微术 (single-molecule localization microscopy, SMLM) 的发展, 如光敏定位显微术 (photoactivated localization microscopy, PALM)^[1]、随机光学重建显微术 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)^[2]、荧光光敏定位显微技术 (fluorescence photoactivation localization microscopy, FPALM)^[3] 等, 利用荧光标记本身的开

关效应, 通过稀疏激发、分时成像、质心定位以及图像合成, 突破了光学衍射极限的限制, 空间分辨率达到 10—20 nm 左右, 已经接近或达到了单个生物大分子尺度, 可以真正实现单个生物分子的探测, 使得人们能够在分子水平下对细胞内精细结构、功能和某些动态过程进行观察, 有力地推进了生命科学等诸多领域的发展^[4-8]. 然而, 要实现细胞内同时追踪多个分子, 这就要求成像手段能在三维空间以纳米精度快速探测十几微米景深范围内的多个目标分子^[9]. 目前的单分子追踪 (single particle tracking, SPT) 方法, 既可以通过对样品中只包含目标分子的区域进行局部探测来实现 1 nm 精度的荧光成像 (Fluorescence Imaging with One Nanometer Accuracy, FIONA)^[10], 也可以采用宽场成像的方法, 同时实现追踪多个分子. 目前, 宽场探测的 SPT 方法主要有图像堆栈^[11]、离焦成像^[12]、用聚焦激光束环绕粒子运动^[13]、菲涅耳粒子追踪法 (Fresnel

* 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (批准号: 2012CB825802)、国家自然科学基金 (批准号: 61178080, 61235012, 11004136, 60878053)、国家重大科学仪器设备开发专项 (批准号: 2012YQ15009203) 和深圳市科技计划项目 (批准号: JCYJ20120613173049560, GJHS20120621155433884, ZYC201105170233A) 资助的课题.

† 通讯作者. E-mail: hbniu@szu.edu.cn

particle tracking, FPT)^[14]、柱面镜像散法^[15]、双螺旋点扩散函数法 (double-helix PSF, DH-PSF)^[16]、双层平面探测法^[17]等. 虽然, 这些方法已经可以实现单分子的三维的纳米分辨追踪, 但是, 其成像深度仅仅为 3 μm 左右, 而一般来说, 完整细胞的厚度大约有十几微米, 因此, 现有的方法还不能满足多分子追踪时的大景深要求.

本文提出和发展了一种可对整个细胞范围内多个分子同时追踪的大景深三维纳米分辨单分子成像的新方法. 该方法将变形光栅多阶成像和双螺旋点扩散函数成像结合起来, 提高显微镜的成像深度. 理论和实验研究表明, 利用这一方法建立的纳米分辨多分子追踪系统, 可获得至少 12 μm 的成像深度.

2 原理与方法

2.1 双螺旋点扩散函数

DH-PSF 是一种三维光学响应, 具有随离焦量不断旋转的圆形不对称横截面轮廓. 实现 DH-PSF 的主要方法是通过位于拉盖尔高斯 (Laguerre-Gauss, LG) 模式平面上特定直线上的 LG 模式的线性叠加^[16]. LG 光束模式为^[18,19]

$$u_{n,m}(r) = G(\hat{\rho}, \hat{z})R_{n,m}(\hat{\rho})\Phi_m(\phi)Z_n(\hat{z}), \quad (1)$$

式中 $r = (\rho, \phi, z)$ 为空间点的柱坐标, $\hat{\rho} = \rho/\omega(\hat{z})$ 是高斯光斑的径向坐标, $\omega(\hat{z}) = \omega_0[1 + \hat{z}^2]^{1/2}$, ω_0 为束腰半径, $\hat{z} = z/z_0$ 纵向坐标, $z_0 = \pi\omega_0^2/\lambda$ 为瑞利长度,

$u_{n,m}(r)$ 的组成为

$$G(\hat{\rho}, \hat{z}) = \frac{\omega_0}{\omega(\hat{z})} \exp(-\hat{\rho}^2) \exp(i\hat{\rho}^2\hat{z}) \times \exp[-i\psi(\hat{z})], \quad (2)$$

$$R_{n,m}(\hat{\rho}) = (\sqrt{2}\hat{\rho})^{|m|} L_{(n-|m|)/2}^{|m|}(2\hat{\rho}^2), \quad (3)$$

$$\Phi(\phi) = \exp(im\phi), \quad (4)$$

$$Z_n(\hat{z}) = \exp[-in\psi(\hat{z})], \quad (5)$$

式中 $\psi(\hat{z}) = \arctan(\hat{z})$ 为古伊相位, $L_{(n-|m|)/2}^{|m|}$ 为广义的拉盖尔多项式, 整数 n, m 应当满足

$$n = |m|, |m| + 2, |m| + 4, |m| + 6, \dots \quad (6)$$

例如, 将 LG 模式 (m, n) 中的 $(1,1), (3,5), (5,9), (7,13), (9,17)$ 进行等权重叠加, 形成一个新的光场分布函数, 即双螺旋旋状光束 (图 1(a)). 基于 LG 函数的傅里叶变换不变特性, DH-PSF 与其傅里叶变换也具有相同的函数形式. 我们之所以能用 DH-PSF 获得目标的轴向位置是由于离焦量与 DH-PSF 旋转角度成正比, 而其旋转速度与 LG 模式平面上所选取的直线斜率成正比, 在聚焦区速度最大 (图 1(c)). 一个 DH-PSF 系统是在标准成像系统的傅里叶平面处引入一块特殊设计的相位板, 此相位板使系统的点扩展函数变成双螺旋点扩散函数, 并且它呈现了两个围绕着光轴旋转的旁瓣. 利用 DH-PSF 对单分子进行三维纳米定位的主要原理是, 分子的横向位置通过两个旁瓣的中点来估计, 而其轴向位置则根据两个旁瓣中心连线的旋转角度 (图 1(b)) 来确定^[20].

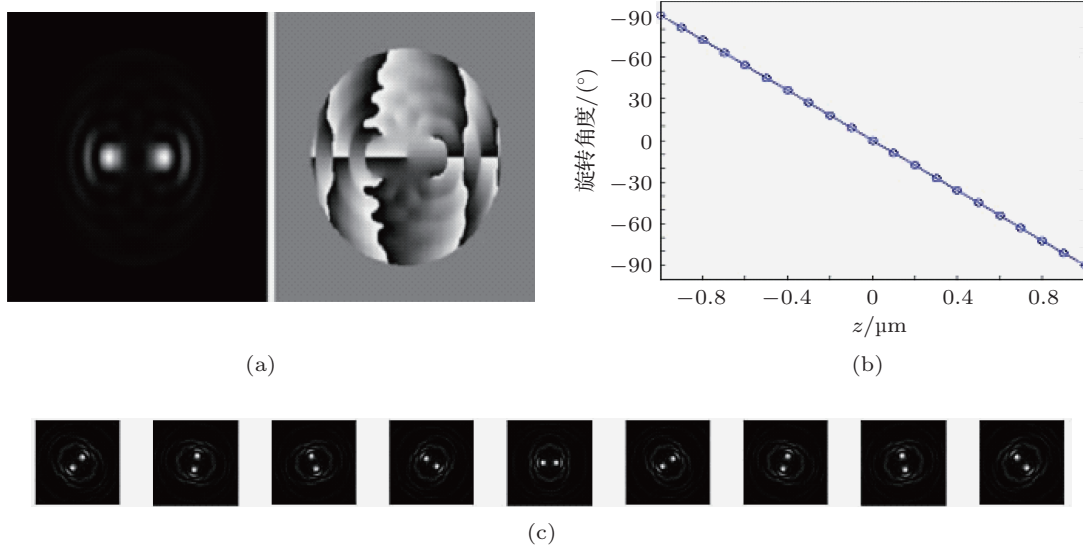


图 1 DH-PSF (a) DH-PSF 的强度与相位分布; (b) DH-PSF 两个旁瓣的旋转角度与 Z 轴位置的关系曲线图举例; (c) DH-PSF 在不同轴向位置处的图形

2.2 变形光栅

变形光栅 (图 2) 实质上是一个离轴的二元相位菲涅耳波带片, 一方面, 它具有普通光栅的分光作用, 通过衍射使入射光按不同的衍射级次方向分束传播; 另一方面, 它也具有菲涅耳波带片的透镜作用, 在不同的衍射级上引入不同的透镜效应. 基于光栅衍射原理, 其在不同衍射级次上引入的二次相位因子为^[21]

$$\phi_m(x,y) = m \frac{2\pi W_{20}}{\lambda R^2} (x^2 + y^2), \quad (7)$$

式中, R 为光栅的孔径半径; m 为光栅衍射级次, $W_{20} = \frac{R^2}{2mf_m}$ 表示光栅散焦能力的量, 是散焦的标准系数, f_m 为不同衍射级次上等效透镜的焦距.

当变形光栅与短焦距透镜 f 密接组合使用时, 短焦距透镜提供主要的聚焦能力, 其复合系统的焦距 f_c 为

$$f_c = \frac{fR^2}{R^2 + 2fmW_{20}}. \quad (8)$$

从上式可以看出, 在 ± 1 级衍射光轴上, 变形光栅对透镜聚焦能力进行微调, 使得透镜在 ± 1 级衍射光方向上具有不同的焦距, 分别稍短于和稍长于透镜焦距. 短焦距透镜的焦平面在 ± 1 级衍射光焦平面的中间位置, 因此变形光栅能够将不同深度的物体成像在同一像平面上的不同区域, 其成像原理如图 3 所示. 因此, 变形光栅在波前曲率传感、粒子追踪等方面具有广阔的应用前景.

2.3 基于波前编码技术的相位板设计理论

波前编码一般是通过设计一个或多个相位掩模来创建诸如透镜之类的光学组件. 基于波前编码技术, 我们可将 DH-PSF 与变形光栅相组合, 形成一个新的相位模板, 该相位模板同时具有多焦面成像和 DH-PSF 的功能. 相位模板的相位函数:

$$\phi_h = \phi_{db} + \phi_g, \quad (9)$$

式中, ϕ_{db} 选择 LG 模式中的 (1,1), (3,5), (5,9), (7,13), (9,17) 模式等权重叠加形成双螺旋旋转光束的傅里叶变换的相位作为初始值, 然后通过优化^[22], 获得高效率的双螺旋光束复振幅分布. ϕ_g 为方程 (7) 所描述的变形光栅的相位形式. 相位片可采用微光学元件的加工方法制作或者直接利用空间光调制器 (SLM) 来实现. 将此相位片用于如图 5 所示的光路中, 使其 0 级及 ± 1 级衍射图像来自样品的不同深

度, 并成像于同一像面上不同的横向位置, 从而可以用同一个探测器在一次曝光过程中同时实现样品不同深度处的多焦平面并行成像, 将光学成像系统的有效景深扩展至传统的三倍. 此外, 每一级衍射又具有双螺旋点扩散函数的性质, 可以实现对约 $4 \mu\text{m}$ 厚度范围内的分子进行纳米定位. 因此上述复合元件和系统可同时对多个分子进行多重平面的双螺旋成像, 扩大了成像深度, 提高了单分子的定位精度, 可以在不改变成像光路的条件下, 对完整细胞深度范围内任意位置的分子进行纳米定位.

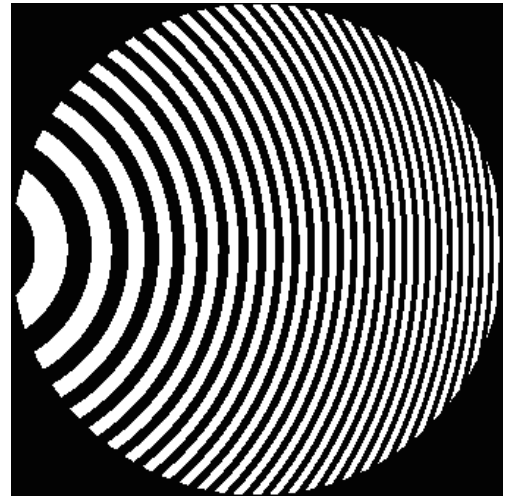


图 2 变形光栅示意图

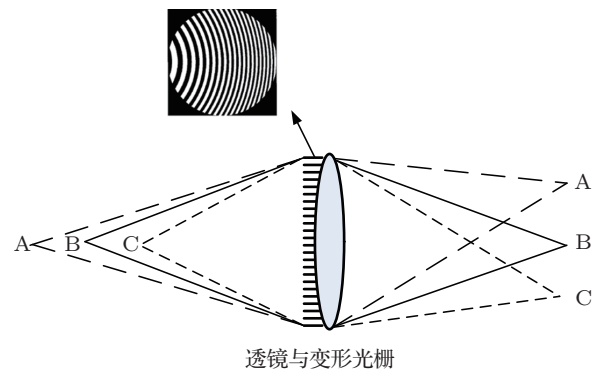


图 3 变形光栅成像原理示意图

3 实验及结果

为了验证该方法的有效性, 基于上述理论基础, 我们设计了该复合相位片, 首先, 实现双螺旋点扩散函数功能的相位 ϕ_{db} 通过选择 LG 模式中的 (1,1), (3,5), (5,9), (7,13), (9,17) 模式等权重叠加形成双螺旋旋转光束的傅里叶变换的相位作为初始值, 然后通过双螺旋点扩散函数在空域、频域

和 LG 模式面等三个不同域中进行约束优化, 利用相位恢复算法获得高效率的双螺旋光束相位分布 [16,22], 其次, 实现变形光栅功能的相位 ϕ_g 选择方程 (7) 所描述的变形光栅的相位形式, 最终将二者组合即可实现如图 5 所示器件的相位函数, 在此基础上, 借用微细加工手段在融石英基底上制备了该复合相位片, 相位片的设计加工参数如下, 通光直径 $D = 5 \text{ mm}$, 像素大小 $\Delta = 15 \text{ }\mu\text{m}$, 像素数 336×336 , 工作波长 $\lambda = 670 \text{ nm}$, 双螺旋点扩散函数中双螺旋点旋转 180° 对应的轴向距离范围为 $4 \text{ }\mu\text{m}$, 结合变形光栅, 则复合相位片的整个轴向探测范围为 $12 \text{ }\mu\text{m}$. 为了测试相位片的性能, 我们搭建了相应的成像显微系统 (图 6) 并进行了相关验证实验. 实验中采用数值孔径 NA 为 1.4 的 $100\times$ 油浸物镜, 管镜焦距 180 mm , 一组焦距 180 mm 透镜 L_1, L_2 构成的 $4f$ 系统, 在 L_2 透镜前焦面即 $4f$ 系统傅里叶面放置复合相位片, 在 $4f$ 系统的最后焦面上的不同位置形成 0 级和 ± 1 级衍射双螺旋点扩散函数. 我们利用波长 670 nm 的半导体激光器通过空间滤波器后形成点光源, 该点光源经过上述

系统成像到 CCD 上. 将显微物镜置于一维纳米微位移平台上, 通过移动微位移平台以得到不同位置处点光源产生的双螺旋点扩散函数的分布, 如图 7 所示. 由实验结果可以看出, 复合相位片同时实现了变形光栅和双螺旋点扩散函数的功能, 点光源在轴向不同位置时, 成像在探测器的不同区域, 而且在每个区域都以双螺旋点扩散函数的形式呈现, 实现了 $12 \text{ }\mu\text{m}$ 的成像探测范围, 与理论设计结果相一致. 在此基础上, 我们可结合基于 DH-PSF 的单分子定位算法 (如双高斯拟合算法), 拟合出该点光源的横向位置 (x, y) ; 基于 DH-PSF 中两个旁瓣的中心连线的旋转角度来确定点光源的轴向位置 z , 精度可达 $\pm 10 \text{ nm}$ 左右 [20]. 因此, 我们如将上述衍射光学元件与高灵敏探测器 (EMCCD) 和高亮度荧光探针 (半导体聚合物量子点) [23] 相结合, 再结合荧光分子的稀疏激发策略, 使目标分子稀疏分布, 就可实现对完整细胞内的多个分子同时进行追踪, 而且不需要移动任何元器件, 这是目前的单分子追踪方法不能做到的.

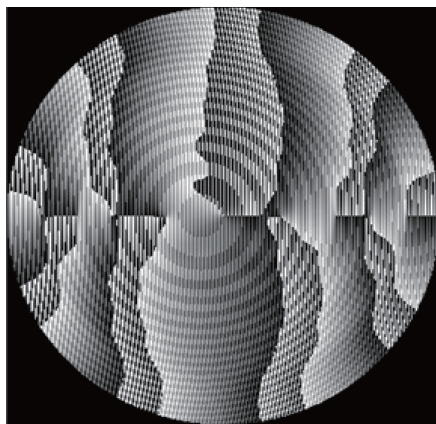


图 4 理论设计和实际加工的复合相位片

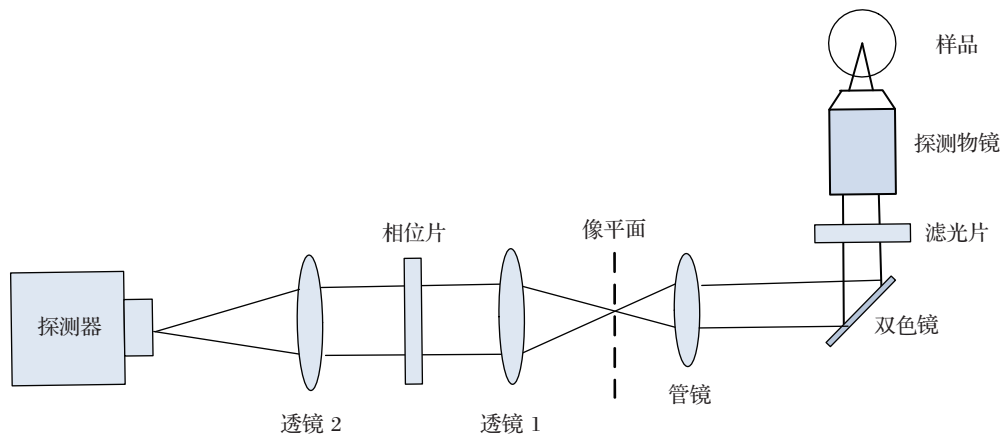


图 5 基于复合相位片的大景深三维纳米分辨荧光显微成像探测系统



图6 点光源处于轴向不同位置时的成像结果

4 结 论

在变形光栅多阶成像和双螺旋点扩散函数成像方法的基础上, 基于波前编码原理, 将二者相结合, 获得全新的衍射光学元件, 该器件同时具有多重平面成像和双螺旋点扩散函数的成像性质, 理论和实验结果表明, 利用这一方法建立的纳米分辨荧光显微成像系统, 成像深度可达 $12\ \mu\text{m}$, 大大改善了已有超分辨成像技术的景深范围, 解决了多分子

定位中的大景深探测难题, 为实现完整细胞内多个生物分子随时空变化的探测和追踪提供一条技术途径, 既可获得细胞内任意深度亚细胞的动态结构图像, 又可获得多个运动分子的动态功能图像, 对于研究生命过程的分子机理具有重要意义.

感谢中国科学院光电技术研究所微加工光学技术国家重点实验室的杜春雷研究员, 邓启凌研究员, 史立芳博士在复合相位板加工方面给予的支持.

- [1] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, Lindwasser O W, Olenych S, Bonifacino J S, Davidson M W, Lippincott-Schwartz J, Hess H F 2006 *Science* **313** 1642
- [2] Rust M J, Bates M, Zhuang X 2006 *Nat. Methods* **3** 793
- [3] Hess S T, Girirajan T P K, Mason M D 2006 *Bio. Phys. J* **91** 4258
- [4] Xie X S, Yu J, Yang W Y 2006 *Science* **312** 228
- [5] Chen D N, Liu L, Yu B, Niu H B 2010 *Acta Phys. Sin.* **59** 6948 (in Chinese) [陈丹妮, 刘磊, 于斌, 牛憨笨 2010 物理学报 **59** 6948]
- [6] Herbert S, Soares H, Zimmer C, Henriques R 2012 *Microsc. Microanal.* **18** 1419
- [7] Jones S A, Shim S H, He J, Zhuang X 2011 *Nat. Methods* **8** 499
- [8] Ober R J, Ram S, Ward E S 2004 *Bio. Phys. J* **86** 1185
- [9] Dupont A, Lamb D C 2011 *Nanoscale* **3** 4532
- [10] Yildiz A, Tomishige M, Vale R D, Selvin P R 2004 *Science* **303** 676
- [11] Arhel N, Genovesio A, Kim K A, Miko S, Perret E, Olivo-Marin J C, Shorte S, Charneau P 2006 *Nat. Methods* **3** 817
- [12] Speidel M, Jonas A, Florin E L 2003 *Opt. Lett.* **28** 69
- [13] Levi V, Ruan Q Q, Gratton E 2005 *Bio. Phys. J.* **88** 2919
- [14] Park Y, Popescu G, Badizadegan K, Dasari R R, Feld M S 2007 *Opt. Lett.* **32** 811
- [15] Kao H P, Verkman A S 1994 *Bio. Phys. J.* **67** 1291
- [16] Pavani S R, Piestun R 2008 *Opt. Express* **16** 22048
- [17] Ram S, Prabhat P, Chao J, Ward E S, Ober R J 2008 *Bio. Phys. J.* **95** 6025
- [18] Piestun R, Schechner Y Y, Shamir J 2000 *J. Opt. Soc. Am. A* **17** 294
- [19] Liu M, Chen X Y, Li H X, Song H S, Teng S Y, Cheng C F 2010 *Acta Phys. Sin.* **59** 8490 (in Chinese) [刘曼, 陈小艺, 李海霞, 宋洪胜, 滕树云, 程传福 2010 物理学报 **59** 8490]
- [20] Pavani S R P, Greengard A, Piestun R 2009 *Appl. Phys. Lett.* **95** 021103
- [21] Blanchard M P, H Greenaway A 1999 *Appl. Opt.* **38** 6692
- [22] Li H, Yu B, Chen D N, Niu H B 2013 *Acta Phys. Sin.* **62** 124201 (in Chinese) [李恒, 于斌, 陈丹妮, 牛憨笨 2013 物理学报 **62** 124201]
- [23] Wu C, Chiu D T 2013 *Angew. Chem. Int. Ed.* **11** 3086

Design, fabrication, and experimental demonstration of a diffractive optical element with long depth of field for nanoscale three-dimensional multi-molecule tracking*

Yu Bin¹⁾ Li Heng¹⁾ Chen Dan-Ni¹⁾²⁾ Niu Han-Ben^{1)†}

1) (Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, College of Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

2) (State Key Laboratory of Precision Measurement Technology and Instruments, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

(Received 8 March 2013; revised manuscript received 25 April 2013)

Abstract

The development of real-time single-molecule detection and tracking technology in time and space for multiple bio-molecules in intact cells has important significance for the study on molecular behaviors in life processes. However, limited depth of field is the main drawback of conventional microscopy that prevents observation and tracking of multiple molecules in intact cells. Based on the principle of wavefront coding, the design and fabrication of a novel diffractive optical element (DOE) which combines a distorted diffraction grating with a double-helix point spread function (PSF) phase plate so that it can simultaneously perform multi-plane imaging with double-helix PSF and realize an extended depth of field is presented. Experiments have been carried out on a self-built microscopic system based on the novel DOE, showing that a depth of field can be up to 12 μm . Experimental results are in good agreement with the theoretical predictions, thus proving the feasibility of this method.

Keywords: multi-molecule tracking, diffractive optical element, distorted diffraction grating, double helix point spread function

PACS: 42.30.-d, 42.30.Kq, 42.30.Va, 87.64.M-

DOI: 10.7498/aps.62.154206

* Project supported by the National Basic Research Program of China (Grant No. 2012CB825802), the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 61178080, 61235012, 11004136, 60878053), the Special Funds of the Major Scientific Instruments Equipment Development of China (Grant No. 2012YQ15009203), and the Science and Technology Planning Project of Shenzhen, China (Grant Nos. JCYJ20120613173049560, GJHS20120621155433884, ZYC201105170233A).

† Corresponding author. E-mail: hbniu@szu.edu.cn