

用于三维单颗粒示踪的多焦面双螺旋点扩散函数显微研究*

马光鹏¹⁾ 龚振权¹⁾ 聂梦娇¹⁾ 曹慧群²⁾
屈军乐¹⁾ 林丹樱^{1)†} 于斌^{1)‡}

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

2) (深圳大学化学与环境工程学院, 深圳 518060)

(2024年2月17日收到; 2024年3月14日收到修改稿)

双螺旋点扩散函数 (double-helix point spread function, DH-PSF) 显微可实现纳米尺度的三维单颗粒示踪 (three-dimensional single particle tracking, 3D SPT), 被广泛应用于生命科学等领域, 但 DH-PSF 显微的成像景深和定位精度有限, 限制了其在活体厚样品中的应用. 为了解决此问题, 本文提出了一种基于轴向分光棱镜的多焦面 DH-PSF 显微 (z-splitter prism-based multifocus DH-PSF microscopy, ZPMDM) 方法和系统, 通过将基于轴向分光棱镜的多焦面显微与 DH-PSF 相结合, 在无需扫描的情况下提高 DH-PSF 显微的轴向定位范围和定位精度, 解决完整活细胞内 3D SPT 的大景深探测难题. 通过系统标定, ZPMDM 中 3 个通道的平均三维定位精度分别为 $\sigma_{L(x, y, z)} = (4.4 \text{ nm}, 4.6 \text{ nm}, 10.5 \text{ nm})$, $\sigma_{M(x, y, z)} = (4.3 \text{ nm}, 4.2 \text{ nm}, 8.2 \text{ nm})$, 以及 $\sigma_{R(x, y, z)} = (4.8 \text{ nm}, 4.4 \text{ nm}, 10.3 \text{ nm})$, DH-PSF 的有效景深扩展至 $6 \mu\text{m}$, 实现了大景深范围内的甘油-水混合溶液中的荧光微球示踪, 并初步研究了活巨噬细胞的吞噬现象, 进一步验证了该方法的有效性, 对于 3D SPT 的发展和具有重要应用意义.

关键词: 三维单颗粒示踪, 双螺旋点扩散函数, 多焦面显微

PACS: 87.64.M-, 87.64.kv, 42.30.-d, 87.85.Pq

DOI: 10.7498/aps.73.20240271

1 引言

随着纳米技术和荧光显微技术的发展, 单颗粒示踪 (single particle tracking, SPT) 技术已成为解析活细胞内分子行为和相互作用、揭示生物过程机制以及药物研发等的强有力工具^[1-4]. 传统的二维 SPT 只能在一个薄焦平面上追踪粒子, 因此, 这种方法通常仅限于研究分子平面运动^[5,6]. 然而, 活

细胞中的分子运动具有时空多样性的特点, 分子在细胞内的动态变化遍及整个细胞内三维空间, 这使得在大三维空间和长时程内, 同时监测多个分子的运动具有较强的挑战性. 近年来, 纳米尺度三维 (three-dimensional, 3D) SPT 技术的出现, 使得研究人员可以以高时空分辨率研究多分子的动力学行为, 极大促进了生命科学等领域的发展. 实现 3D SPT 最直接的方法就是利用共聚焦显微镜或双光子显微镜在样品的不同轴向位置处采集一系列二

* 国家重点研发计划 (批准号: 2022YFF0712500)、国家自然科学基金 (批准号: 62175166, 61975131, 62235007, 62275165, 62127819)、深圳市科技计划项目 (批准号: JCYJ20200109105411133, JCYJ20220818100202005) 和深圳市光子学和生物光子学重点实验室 (批准号: ZDSYS20210623092006020) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: dylin@szu.edu.cn

‡ 通信作者. E-mail: yubin@szu.edu.cn

维图像形成图像堆栈 (Z-stacks)^[7,8], 进而实现粒子的 3D 示踪, 虽然这个方法具有较高的成像对比度, 但由于需要进行轴向扫描, 其时间分辨率受到很大限制. 使用转盘式共聚焦显微镜或带有共振扫描器的共聚焦显微镜可以改善这种限制, 但其时间分辨率仍保持在秒的数量级. 为了进一步提高时间分辨率和轴向成像深度, 研究人员提出了多种基于双螺旋点扩散函数 (double-helix point spread function, DH-PSF) 的宽场、无扫描 3D SPT 方法^[9]. 2009 年, Pavani 等^[10] 首次通过特殊设计的相位片, 利用空间光调制器 (spatial light modulator, SLM), 将显微系统的 PSF 调控为 DH-PSF, 实现了高达 14 nm 的横向和 37 nm 的轴向定位精度, 成像深度达 2 μm . 2010 年, Thompson 等^[11] 利用 DH-PSF 显微实现了活细胞内量子点的示踪, 三维定位精度达 10 nm. 同年, Thompson 等^[12] 又使用 DH-PSF 显微成功实现了活芽接酵母细胞中单个信使核糖核酸的三维示踪, 研究了其蛋白 mRNPs 颗粒的动力学行为. 随后, 基于 DH-PSF 的纳米尺度 3D SPT 在细胞生物学、纳米材料研究中获得了广泛的应用^[13-18]. 尽管基于 DH-PSF 的 3D SPT 具有很好的应用效果, 但成像深度仅有 2 μm 左右, 限制了其在完整细胞中的进一步应用, 需要设计新的大深度编码的 PSF. 2013 年, Li 等^[19] 在经过优化的 DH-PSF 的基础上利用同时具有 DH-PSF 调制与变形光栅成像功能的复合相位板, 进一步扩展了原有 DH-PSF 系统的探测深度, 构建了一套大景深无扫描纳米分辨三维多分子示踪成像系统 (DDCM), 其三维定位精度达到 5.3, 6.3 和 17.4 nm, 成像深度达到 14 μm , 但该方法受光栅高阶衍射和色差的影响, 需要光栅色差补偿校正元件, 能量利用率低且系统相对复杂. 2021 年, Li 等^[20] 提出了一种名为 2π -DH-PSF 的新方法, 它使用菲涅耳区方法实现了 2π 角度范围的旋转, 并在 2π -DH-PSF 的基础上结合离焦相位, 旋转角可以达到 4π 弧度, 其成像深度达到 20 μm , 是传统 DH-PSF 的 4 倍. 然而, 该方法基于 SLM 光能利用率低、系统复杂和成本较高, 能够示踪的粒子密度和成像深度是相互矛盾的. 虽然上述大景深 3D SPT 方法提高了 DH-PSF 的探测深度, 但降低了其定位密度, 更适合于研究稀疏运动的分子动态过程.

为进一步提高定位密度和定位精度, 需要发展新的基于 DH-PSF 的 3D SPT 方法, 进一步拓展

其在活体厚样品动态过程研究中的应用. 本文提出了一种基于轴向分光棱镜的多焦面 DH-PSF 显微 (z-splitter prism-based multifocus DH-PSF microscopy, ZPMDM) 方法和系统, 将具有 DH-PSF 调制功能的双螺旋相位模板 (DH phase mask, DH-PM) 与具有多焦面成像能力的轴向分光棱镜 (z-splitter prism)^[21] 相结合, 进一步扩展 DH-PSF 的探测景深并提高其定位精度. 利用 ZPMDM 系统对甘油中进行布朗运动的多个荧光微球进行了三维追踪, 计算所得的三维扩散系数与理论值基本一致, 证明了系统能够对轴向深度 6 μm 以内的荧光微球进行追踪. 同时对巨噬细胞中的荧光微球进行追踪, 进一步验证了该方法在活细胞中对粒子的追踪能力.

2 系统与方法

2.1 ZPMDM 系统设计与搭建

所搭建的 ZPMDM 系统示意图如图 1 所示, 主要包括激发光路、探测光路和防漂移光路. 在激发光路中, 波长为 656 nm 的固体激光器 (MRL-N-656.5, CNI) 发出的激光束先经过中性密度衰减片 ND 对激光功率进行调节, 再经透镜 L1 ($f_1 = 200$ mm) 和 L2 ($f_2 = 200$ mm) 组成的 $4f$ 系统准直扩束后, 经反射镜 M、管镜 TL2 ($f_{\text{TL2}} = 300$ mm)、二向色镜 DM2 和 DM1、油浸物镜 OL (1.45 NA, 100 \times , Nikon) 后垂直照射至样品进行激发. 在探测光路中, 同时使用 z-splitter prism 和 DH-PM 实现多焦面 DH-PSF 成像. 样品发出的荧光经物镜 OL, DM1 和 DM2、管镜 TL3 ($f_{\text{TL3}} = 200$ mm) 收集后, 经过 z-splitter prism 被分为 3 束光, 然后经过一个由透镜 L5 ($f_5 = 150$ mm) 和 L6 ($f_6 = 75$ mm) 组成的 $4f$ 系统后, 同时成像在科学级 sCMOS 探测器 (ORCA-Fusion BT, 像素数为 2304×2304 , 像素尺寸为 $6.5 \mu\text{m} \times 6.5 \mu\text{m}$, Hamamatsu) 上. 同时, 在探测光路的 $4f$ 系统的频谱面上加入 DH-PM 来对系统的探测点扩散函数进行调制, 实现多焦面 DH-PSF, 其中相位片 DH-PM 的通光孔径为 5 mm, 工作波长为 670 nm, DH-PSF 对应的有效轴向距离范围约为 3.3 μm . 同时 DH-PM 与物镜的后焦面呈共轭关系. 为克服由物镜自身重力引起的轴向漂移, 采取主动防漂移策略^[22] 以增强系统稳定性. 此防漂移方法基于全内反射原理, 结合四

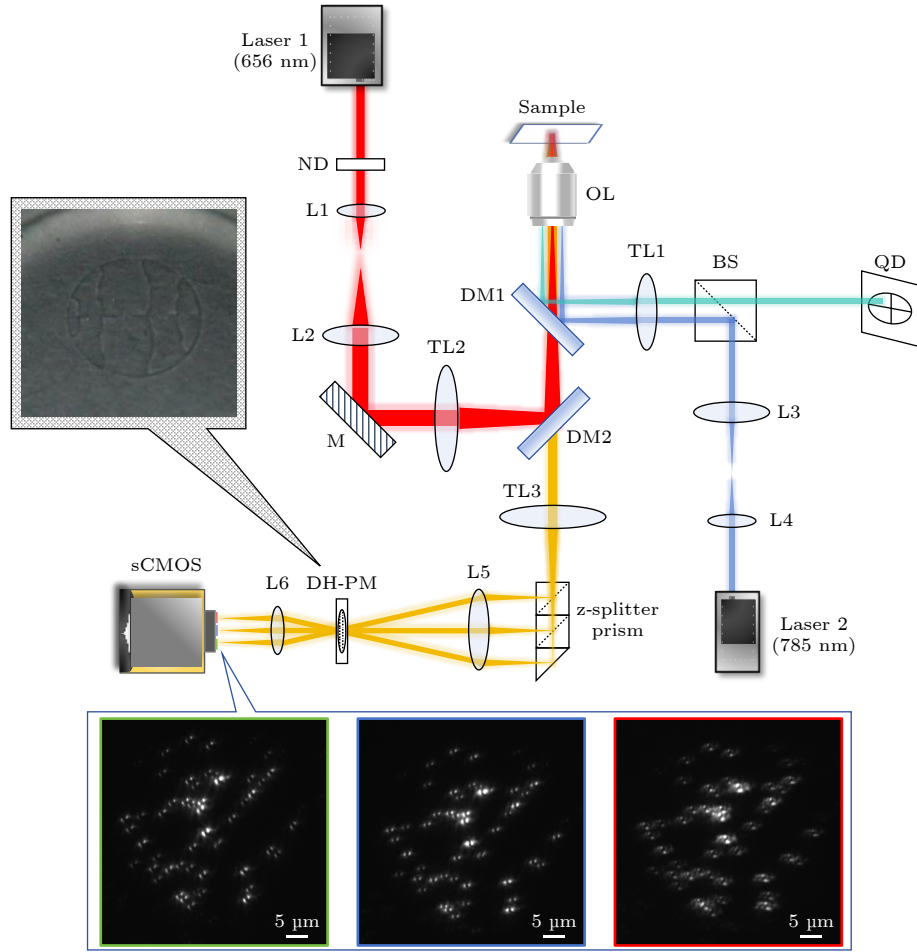


图 1 ZPMDM 系统光路示意图. Laser1—Laser2, 激光器; ND, 中性密度衰减片; L1—L6, 透镜; M, 反射镜; TL1—TL3, 管镜; DM1, DM2, 二向色镜; OL, 物镜; BS, 分束棱镜; QD, 四象限探测器; DH-PM, 双螺旋相位模板; z-splitter prism, 轴向分光棱镜; sCMOS, 科研级互补金属氧化物半导体相机

Fig. 1. Schematic diagram of the ZPMDM system. Laser1—Laser2, lasers; ND, neutral density attenuator; L1—L6, lens; M, mirror; TL1—TL3, tube lens; DM1, DM2, dichroic mirrors; OL, objective lens; BS, beam splitter; QD, four-quadrant detector; DH-PM, double-helix phase mask; z-splitter prism, axial beam splitter prism; sCMOS, scientific complementary metal oxide semiconductor camera.

象限探测器实现. 首先, 将激光器 (MDL-LLL-785 L, CNI) 发出的一束波长为 785 nm 的激光引入显微镜作为参考光源, 经透镜 L4 和 L3 扩束准直后的激光经 50/50 分束棱镜和管镜 TL1 ($f_{TL1} = 300 \text{ mm}$) 进入显微镜. 通过调节棱镜位置使得激光在物镜出射后在盖玻片与样品面之间全内反射并沿原路径平行返回, 然后通过分束棱镜重新成像至四象限探测器. 一旦物镜出现轴向漂移, 全内反射光束位置将产生横向偏移, 横向偏移量可由四象限探测器测量, 根据横向偏移量与物镜轴向漂移量之间的对应关系, 计算得到轴向漂移量并将其反馈给高精度压电纳米位移台 (FOC100, Piezoconcept) 使其进行位移反馈, 位移台移动相应的偏移量便可使物镜回到漂移前的位置. 该防漂移系统可以实现

优于 10 nm 的轴向防漂移精度.

2.2 轴向分光棱镜

探测系统中所用的轴向分光棱镜由一个反射/透射比为 30:70 的立方棱镜, 一个反射/透射比为 50:50 的立方棱镜以及一块直角反射棱镜组成. 不同分光比的选择是为了确保每束光的功率大致等于总光功率的 1/3. 从棱镜表面出来的每束光的光程在通过每个棱镜时都增加了 $n_g L$, 其中 n_g 是棱镜材质的折射率, L 为每个棱镜的尺寸 (尺寸都为 10 mm). 三束荧光最终成像在探测器的左、中、右 3 个不同区域, 分别对应样品中不同轴向位置的 3 个焦平面. 根据几何光学物像关系, 物方相邻焦面间的轴向间隔 ΔL 为

$$\Delta L = \frac{Ln_s}{M^2n_g}, \quad (1)$$

其中, L 为各棱镜的尺寸, M 为物镜的放大倍数, n_s 和 n_g 分别为样品和棱镜的折射率. 由 (1) 式求得, $\Delta L = 0.9 \mu\text{m}$. 同时, 其理论视场 $\text{FOV}_{(x,y)}$ 大小为

$$\text{FOV}_{(x,y)} = \frac{L^2}{M^2}. \quad (2)$$

为了标定样品中相邻两个焦面之间的轴向间距, 本实验采用标准荧光微球作为荧光探针. 首先, 调整物镜确保荧光微球在探测器左平面的成像最清晰, 并记录此时的轴向位置; 然后, 调整 z 轴位移台, 并以 50 nm 的步进长度移动荧光微球样品, 使其在中间平面及右平面依次聚焦, 并分别记录各自的轴向位置. 实验结果表明, 左平面与中间平面对应焦面间的间距为 $0.6 \mu\text{m}$, 右平面与中间平面对应焦面间的间距为 $1.2 \mu\text{m}$. 此结果与理论值 $0.9 \mu\text{m}$ 存在偏差, 此偏差主要源于轴向分光棱镜中棱镜间黏合平整度的不一致造成的光程改变, 最终导致焦平面间距产生差异.

2.3 三通道图像配准及校准

由于 z -splitter prism 存在加工误差, 3 个通道间的成像会产生不可避免的差异, 因此, 在成像实验之前, 需要对 3 个通道进行图像配准. 首先, 从 ZPMDM 系统探测光路中移除 DH-PM. 此时, 探测器上 3 个面分别对应样品中 3 个不同深度. 使用随机分布的荧光微球样品作为基准, 使荧光微球在左、中、右 3 个面依次成像清晰, 进而通过基于局部加权平均的二阶多项式拟合方法, 结合基于基准配准误差监测的误匹配点剔除算法^[23] 对 3 个通道的成像平面进行图像配准, 配准结果如图 2 所示.

鉴于棱镜黏合的平整度和探测光路中透镜引起的像差, 棱镜产生的 3 个平面上的 DH-PSF 两旁瓣连线的夹角随其离焦距离的变化率可能不同. 因此, 在数据采集前需对系统进行标定校准, 以获取不同平面上 DH-PSF 的旋转角度与离焦量间的精确关系, 从而得到 DH-PSF 旋转角度与轴向深度的标定曲线. 使用荧光微球 (TetraSpeck™ Microspheres, $0.1 \mu\text{m}$, fluorescent blue/green/orange/dark red) 对 3 个平面的 DH-PSF 进行标定. 首先, 为消除荧光珠布朗运动导致的位置偏差, 取 $5 \mu\text{L}$ 荧光珠原液加入浓度约 0.5% 的低熔点琼脂糖溶液

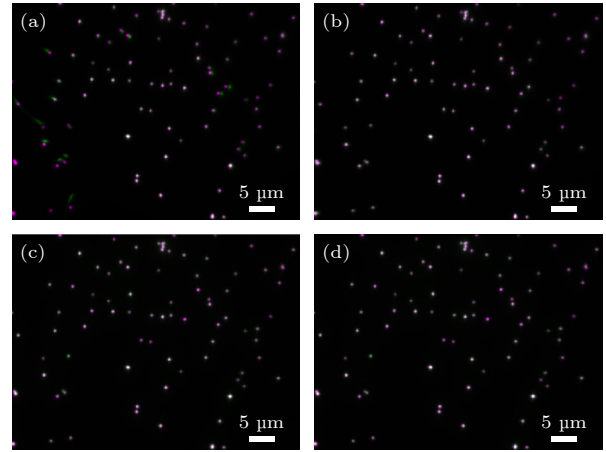


图 2 三通道荧光微球图像配准 (a) 左通道与中间通道荧光微球图像叠加的伪彩图; (b) 配准后的左通道与中间通道荧光微球图像叠加的伪彩图; (c) 右通道与中间通道荧光微球图像叠加的伪彩图; (d) 配准后的右通道与中间通道荧光微球图像叠加的伪彩图; 伪彩色: 紫色代表中间通道荧光微球图像, 绿色代表左(右)通道荧光微球图像, 两者准确重合时荧光微球图像为灰白色

Fig. 2. Three-channel fluorescent microsphere image registration: (a) Pseudo-color image superimposed with fluorescent microsphere images in the left channel and middle channels; (b) pseudo-color image superimposed with fluorescent microsphere images of the left and middle channels after registration; (c) pseudo-color image superimposed with fluorescent microsphere images in the right middle channels; (d) pseudo-color image superimposed with fluorescent microsphere images of the right channel and middle channels after registration; pseudo-color: purple represents fluorescent microsphere image in the middle channel, green represents fluorescent microsphere image in the left (right) channel, and the fluorescent microsphere image is greyish-white when the two accurately overlap.

中进行稀释, 稀释倍数为 50 倍. 随后将混合液放入超声机中进行振荡防止荧光微球团聚. 在高温下, 琼脂糖为液态, 加热琼脂糖至液态后, 迅速滴至盖玻片并封闭. 待冷却至室温, 琼脂糖固化, 荧光微球随之固定. 然后, 将样品放置在高精度轴向纳米位移载物台 (P-561.3 cd, PI 公司) 上, 在确保载物台稳定性的前提下, 物镜沿 z 轴步进, 同时相机采集图像. 实验时, 设定 z 轴移动步长为 100 nm , 每个 z 轴位置采集 100 帧图像. 成像结果如图 3(b) 所示, 荧光微球的轴向有效成像深度为 $6 \mu\text{m}$. 当荧光微球从 $z = -3 \mu\text{m}$ 移动至 $z = 3 \mu\text{m}$, DH-PSF 的两旁瓣将依次显现于图像的左、中、右 3 个区域. 这对应于样品中的 3 个不同焦面位置, 从而确定 3 个面 DH-PSF 旁瓣角度与轴向位置的对应关系. 绿色线条表示左平面的标定曲线, 红色

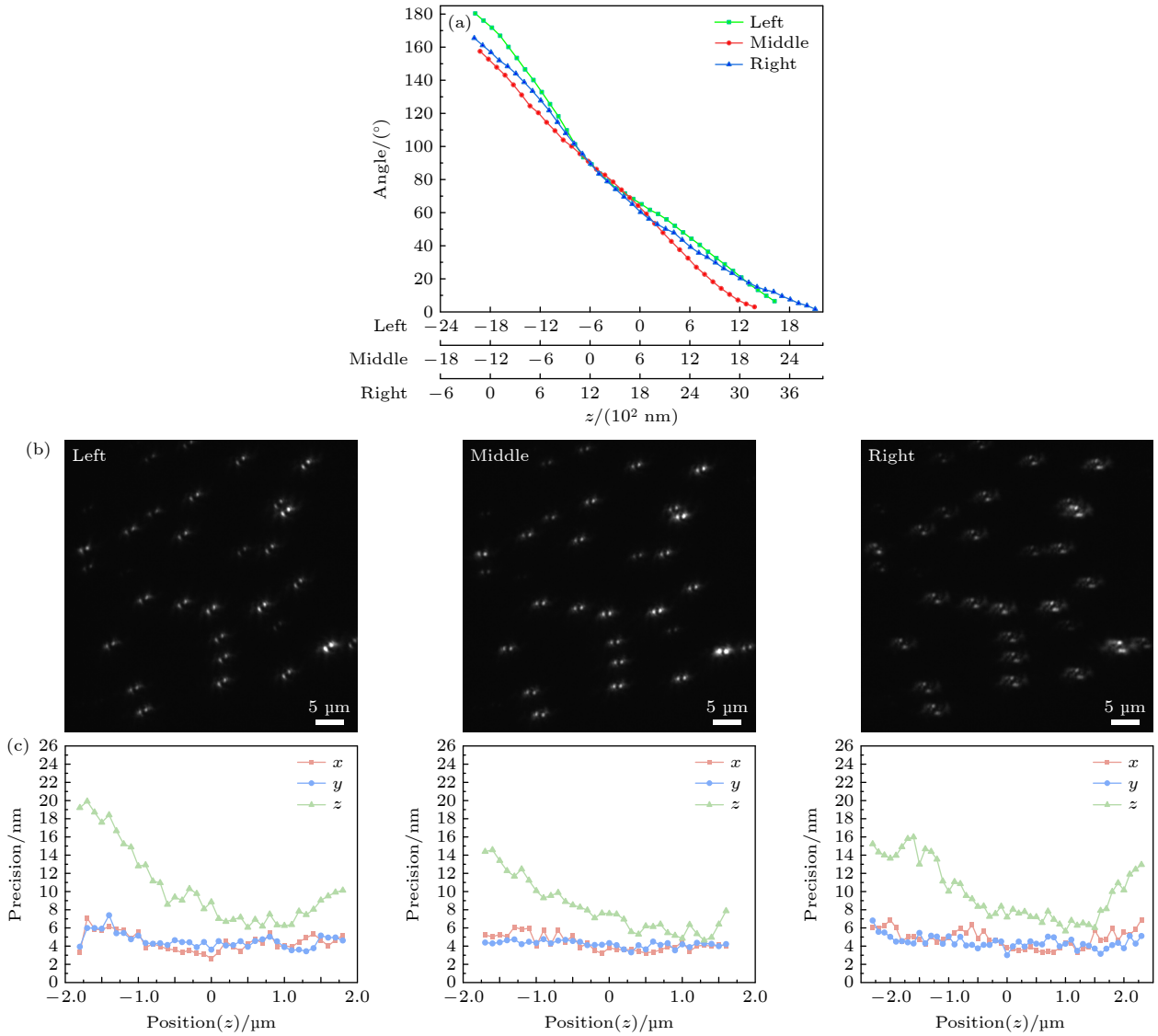


图3 左、中、右三通道的标定 (a) 3个通道的标定曲线; (b) 同一深度下左、中、右3个通道对应的双螺旋成像结果; (c) 左、中、右3个通道的三维定位精度

Fig. 3. Calibration of the left, middle and right channels: (a) Calibration curves for the three channels; (b) the corresponding double-helix imaging results of the left, middle and right channels at the same depth; (c) 3D localization accuracy of the left, middle and right channels.

线条对应中间平面, 蓝色线条对应右平面. 图中所示的曲线差异是由于系统本身像差所引起的 DH-PSF 变形.

为了量化 ZPMDM 系统的三维定位精度, 本文获取并分析了各轴向位置处的 100 帧荧光微球图像. 定位精度由 100 个荧光微球位置坐标的标准差来表示. 为了确保每个平面的 DH-PSF 旁瓣的总光子数接近 5000 的同时保持较快的采集速度, 相机的曝光时间设置为 20 ms. 对每个通道在不同 z 轴位置处 DH-PSF 旁瓣的总光子数进行计算, 并求得平均值, 最终得到左、中、右三通道的光子数. 拟合计算表明, 当左、中、右三通道的 DH-PSF 总

光子数分别约为 4900, 4400, 4700 时, 每个通道在 x, y, z 方向上的平均定位精度分别为: $\sigma_{L(x, y, z)} = (4.4 \text{ nm}, 4.6 \text{ nm}, 10.5 \text{ nm})$, $\sigma_{M(x, y, z)} = (4.3 \text{ nm}, 4.2 \text{ nm}, 8.2 \text{ nm})$, $\sigma_{R(x, y, z)} = (4.8 \text{ nm}, 4.4 \text{ nm}, 10.3 \text{ nm})$. 结果表明, 3 个通道在 x, y, z 方向上的平均定位精度相当, 其中, 中间通道的定位精度最高, 而左、右通道的定位精度略低. 其主要原因如下, 一方面是由于透镜像差引起左右通道 DH-PSF 形状变化, 导致定位精度下降; 另一方面, 在光路搭建过程中是以中间面为参考调整 DH-PM 位置的, 因此棱镜间黏合的平整度也会对左右通道的 DH-PSF 形状产生影响.

3 结果与讨论

3.1 荧光微球示踪

首先, 通过荧光微球的追踪实验验证 ZPMDM 系统的性能. 样品的制备方式不同于前述实验, 此次是将荧光微球与浓度 20% 的甘油水溶液混合以提升迁移率. 在实验过程中, 曝光时间设置为 50 ms, 在此条件下获得了一系列图像 (图 4(a)). 利用 DH-PSF 定位算法对荧光微球进行三维定位, 当荧光微球在 3 个焦面都出现时, 则选择定位精度

较高的面进行定位. 荧光微球的三维追踪轨迹如图 4(b) 所示, 荧光微球在不同的时刻位于不同的位置, 轴向的探测深度达到 6 μm .

为进一步验证 ZPMDM 系统在 3D SPT 方面的可靠性, 本文探究了直径 200 nm 的荧光微球在浓度为 20% 和 60% 的甘油-水混合溶液中的布朗运动. 当甘油-水混合溶液中的粒子只发生布朗运动, 则发生布朗运动的粒子的均方位移和扩散系数具有如下关系:

$$\text{MSD}(t) = 2nD_t t_i, \quad (3)$$

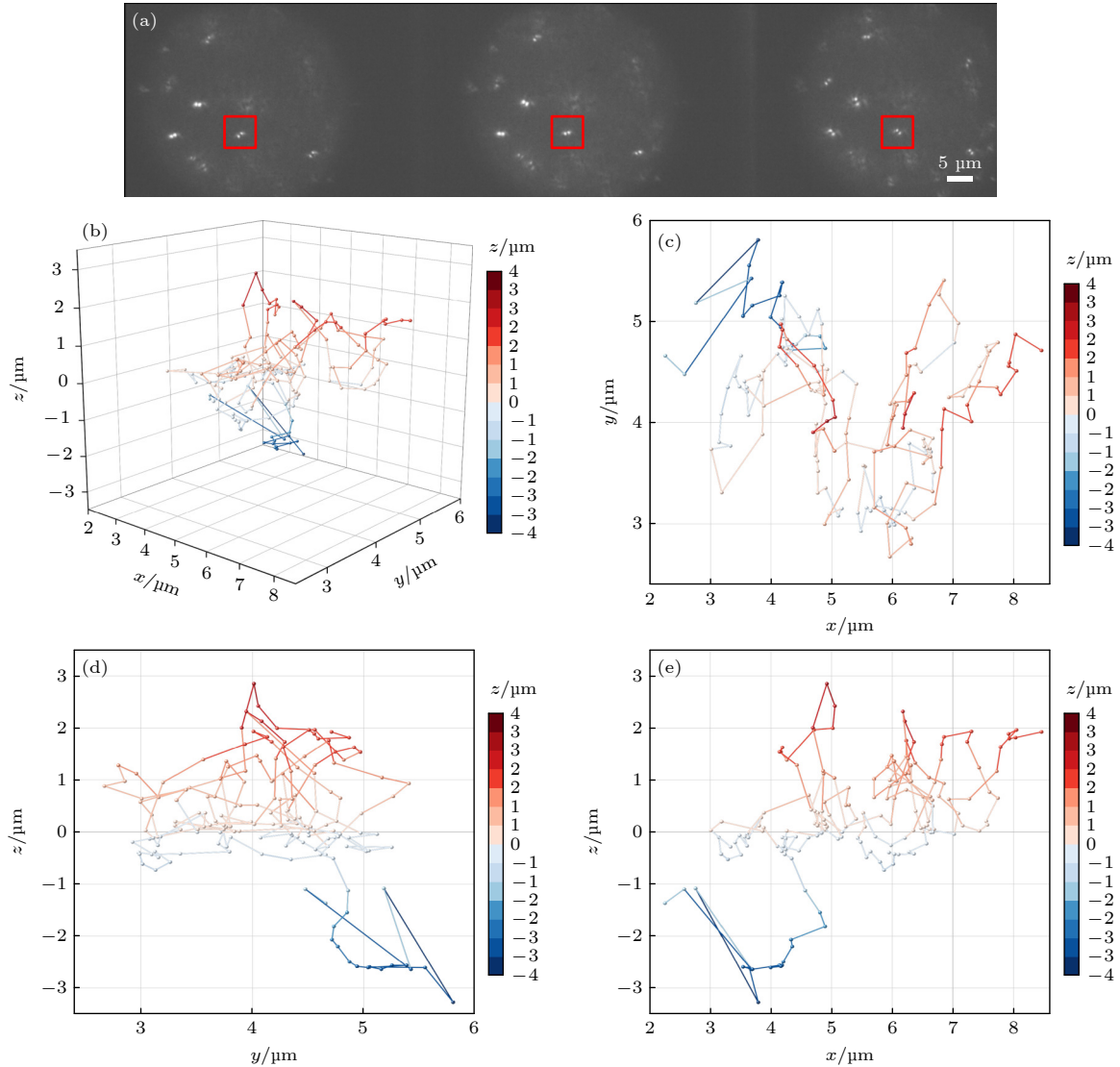


图 4 20% 浓度甘油水溶液中的荧光微球的三维追踪 (a) 200 nm 荧光微球在 20% 甘油水溶液中扩散时的动态变化图像; (b) 对图 (a) 红框中的荧光微球的运动轨迹进行图像重构所得到的三维追踪轨迹; (c)–(e) 图 (b) 中荧光微球的运动轨迹分别投影在 xy 面、 yz 面、 xz 面的投影

Fig. 4. 3D tracking of fluorescent beads in a 20% glycerol aqueous solution: (a) Image of the dynamics of a 200 nm fluorescent bead during diffusion in a 20% glycerol aqueous solution; (b) 3D tracking trajectory obtained by image reconstruction of the motion trajectory of the fluorescent microspheres in the red box in panel (a); (c)–(e) projections of the trajectories of the fluorescent microspheres in panel (b) onto the xy , yz and xz planes.

其中 D_r 是扩散系数, n 是维数, t_i 是相应的时间间隔, 而在三维的情况下 $n = 3$. 荧光微球轨迹的均方位移 (mean square displacement, MSD) 随时间间隔变化的数据如图 5(a) 所示. 对时间间隔与相应 MSD 的关系曲线进行拟合, 拟合结果表明 MSD 与时间间隔呈线性关系, 如图 5(a) 所示. 将得到的拟合曲线斜率除以 6, 计算出荧光微球在 20% 和 60% 甘油-水混合溶液中的实际扩散系数 D_r 分别为 $0.9349 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 和 $0.1314 \mu\text{m}^2/\text{s}$. 利用斯托克斯-爱因斯坦关系可以计算得到荧光微球在浓度分别为 20% 和 60% 的甘油-水溶液中的理论扩散系数为

$$D_t = \frac{k_B T}{6\pi \eta R}, \quad (4)$$

其中, k_B 代表玻尔兹曼常数, T 是温度 (单位为 K), η 是液体的黏滞系数, R 是荧光微球的半径. 通过对浓度为 20% 和 60% 甘油水溶液的黏滞系数在不

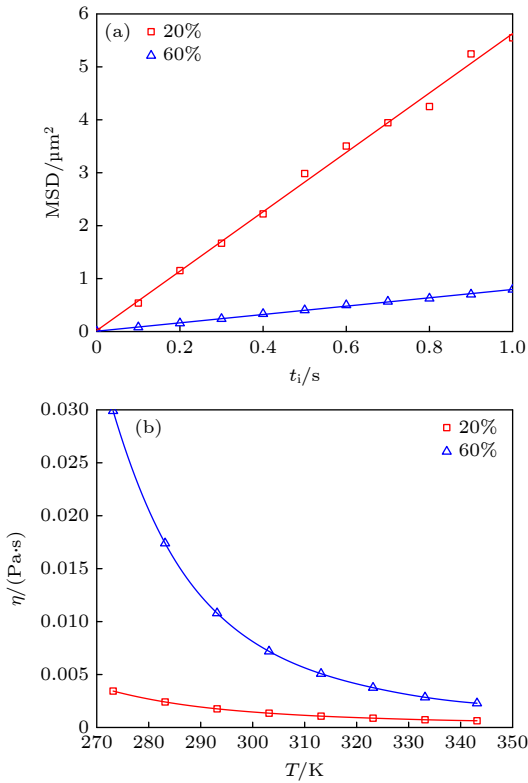


图 5 (a) 200 nm 荧光微球在 20% 及 60% 浓度甘油水溶液中扩散时的均方位移曲线; (b) 20% 及 60% 浓度下甘油水溶液的黏度随温度变化曲线图

Fig. 5. (a) Mean square displacement curves for the diffusion of 200 nm fluorescent beads in aqueous glycerol solutions at 20% and 60% concentrations; (b) viscosity versus temperature plots for aqueous glycerol solutions at 20% and 60% concentrations.

同温度下的拟合分析, 获得了相应的拟合曲线. 从图 5(b) 拟合曲线中, 确定了 20% 和 60% 甘油水溶液在实验室温度为 286.15 K 时的黏滞系数分别为 $9.3488 \times 10^{-7} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ 和 $1.4948 \times 10^{-6} \text{ Pa}\cdot\text{s}$. 进一步使用斯托克斯-爱因斯坦方程, 计算出直径 200 nm 荧光微球在 20% 和 60% 甘油-水溶液中的理论扩散系数分别为 $0.9607 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 和 $0.1402 \mu\text{m}^2/\text{s}$. 其中, 实际值与理论值误差分别为 2.68% 和 6.28%, 均在 10% 以内. 实验结果显示, 获得的荧光微球扩散系数接近但低于理论预测值, 这表明该方法可以准确地确定纳米颗粒的扩散系数. 实际扩散系数低于理论值可能与荧光微球在接近甘油水溶液与盖玻片界面时的受限布朗运动有关. 因此, ZPMDM 系统能够准确且有效地测量纳米颗粒的三维扩散系数, 表明其在 3D SPT 应用中的可行性.

3.2 细胞内示踪

为了验证 ZPMDM 系统在活细胞环境中对粒子的示踪能力, 选择巨噬细胞作为实验对象进行观察. 巨噬细胞是一种免疫细胞, 其主要功能是吞噬和消化病原体、细菌等异物. 当巨噬细胞感知到有病原体或异物存在时会通过伪足将其包围, 其细胞膜变形将其包围吞噬并形成囊泡将病原体包裹形成吞噬体. 吞噬体与溶酶体融合形成吞噬体溶酶体复合体, 同时溶酶体中的酶会被释放出来消化分解吞噬体内的病原体, 而最终消化后的产物、废物或未消化的物质会被包裹在囊泡中, 并被推出细胞膜, 最终与细胞外融合, 释放出去. 本实验通过 ZPMDM 系统对巨噬细胞内荧光微球的三维动态过程进行实时观测. 选用直径为 100 nm 的荧光微球 (TetraSpeck™ microspheres, 0.1 μm , fluorescent blue/green/orange/dark red) 作为追踪对象. 首先, 取 2 μL 荧光微球原液到离心管中, 加入磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 进行稀释, 稀释倍数为 50 倍, 将配制好的荧光微球混合液放入超声机中进行振荡防止荧光微球团聚; 其次, 将培养好的巨噬细胞用 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 缓冲液进行清洗后加入 2 mL 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 缓冲液, 再加入 10 μL 配制好的荧光微球混合液后立刻成像; 最终, 通过定位成功得到了巨噬细胞中荧光微球的三维动态轨迹 (图 6(c)). 从轨迹中可以看出荧光微球被巨噬细胞吞后显示出的各种扩散和线性输运特性, 证实了 ZPMDM 系统在活细胞中的 3D 示踪能力.

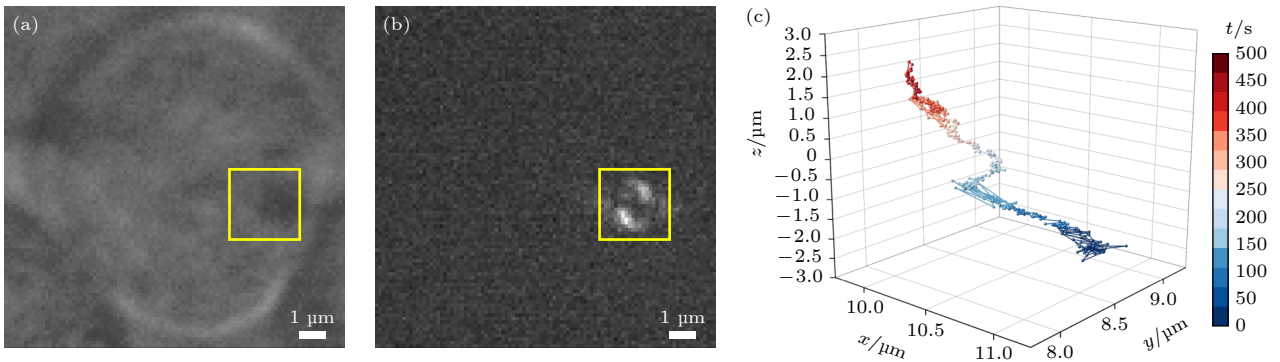


图 6 活细胞中荧光微球的三维示踪 (a) 巨噬细胞 Raw-264.7 的明场图像; (b) 荧光微球 DH-PSF 图像; (c) 巨噬细胞中荧光微球的三维运动轨迹

Fig. 6. 3D tracking of fluorescent beads in live cells: (a) White light image of the Raw-264.7 cell; (b) DH-PSF fluorescence image of a bead; (c) 3D trajectory of the bead in Raw-264.7 cell.

4 结 论

本文将具备 DH-PSF 功能的相位掩模和具备多焦面成像功能的轴向分光棱镜相结合, 发展了一种多焦面双螺旋点扩散函数显微, 实现了大景深纳米尺度 3D SPT. 实验结果表明, 利用所搭建的系统, 成像深度可达到 $6\ \mu\text{m}$, 改善了原 DH-PSF 显微系统的景深范围, 同时利用轴向分光棱镜实现多焦面成像, 与其他扩展景深的方法相比, 极大减少了光能损失, 保证了在同样光照条件下获得较高的定位精度. 另一方面, 该方法运用灵活, 应用场景广泛, 研究人员可根据具体应用场景选用不同放大倍数的物镜、不同尺寸的棱镜及不同 DH-PSF 相位掩模参数来获得所需成像深度和视场, 为实现完整细胞内多个生物分子的追踪和定位提供新的思路, 具有重要的应用价值.

参考文献

- [1] Dupont A, Lamb D C 2011 *Nanoscale* **3** 4532
- [2] Kusumi A, Tsunoyama T A, Hirose K M, Kasai R S, Fujiwara T K 2014 *Nat. Chem. Biol.* **10** 524
- [3] Gal N, Lechtman-Goldstein D, Weihs D 2013 *Rheol. Acta* **52** 425
- [4] Cognet L, Leduc C, Lounis B 2014 *Curr. Opin. Chem. Biol.* **20** 78
- [5] Kubitschek U, Kuckmann O, Kues T, Peters R 2000 *Biophys. J.* **78** 2170
- [6] Carter B C, Shubeita G T, Gross S P 2005 *Phys. Biol.* **2** 60
- [7] Arhel N, Genovesio A, Kim K A, Miko S, Perret E, OlivoMarin J C, Shorte S, Charneau P 2006 *Nat. Methods* **3** 817
- [8] Bacher C P, Reichenzeller M, Athale C, Herrmann H, Eils R 2004 *BMC. Cell Biol.* **5** 45
- [9] Greengard A, Schechner Y, Piestun R 2006 *Opt. Lett.* **31** 181
- [10] Pavani S R P, DeLuca J G, Piestun R. 2009 *Opt. Express* **17** 19644
- [11] Thompson M A, Lew M D, Badieirostami M 2010 *Nano Lett.* **10** 211
- [12] Thompson M A, Casolari J M, Badieirostami M 2010 *PNAS* **107** 17864
- [13] Wang D P, Agrawal A, Piestun R 2017 *Appl. Phys. Lett.* **110** 211107
- [14] Gahlmann A, Moerner W E 2014 *Nat. Rev. Microbiol.* **12** 9
- [15] Wang D P, Wu H C, Schwartz D K 2017 *Phys. Rev. Lett.* **119** 268001
- [16] Wu H C, Sarfati R, Wang D P 2020 *J. Am. Chem. Soc.* **142** 4696
- [17] Lasker K, von Diezmann L, Zhou X 2020 *Nat. Microbiol.* **5** 418
- [18] Rocha J M, Gahlmann A 2019 *Jove-J. Vis. Exp.* **151** 59387
- [19] Li H, Chen D N, Xu G X, Yu B, Niu H B 2015 *Opt. Express* **23** 787
- [20] Li H F, Wang F M, Wei T D, Miao X, Cheng Y, Pang X P, Jiang K M, Huang W, Zhang Y H 2021 *Opt. Lett.* **46** 5088
- [21] Xiao S, Gritton H, Tseng H A, Zemel D, Han X, Mertz J 2020 *Optica* **7** 1477
- [22] Huo Y D, Cao B, Yu B, Chen D N, Niu H B 2015 *Acta Phys. Sin.* **64** 028701 (in Chinese) [霍英东, 曹博, 于斌, 陈丹妮, 牛慈笨 2015 物理学报 **64** 028701]
- [23] Lin D Y, Gong Z Q, Huang L, Nie M J, Yu B, Qu J L 2024 *Acta Phys. Sin.* **73** 068701 (in Chinese) [林丹樱, 龚振权, 黄黎琳, 聂梦娇, 于斌, 屈军乐 2024 物理学报 **73** 068701]

Multifocus double-helix point spread function microscopy for 3D single particle tracking*

Ma Guang-Peng¹⁾ Gong Zhen-Quan¹⁾ Nie Meng-Jiao¹⁾ Cao Hui-Qun²⁾

Qu Jun-Le¹⁾ Lin Dan-Ying^{1)†} Yu Bin^{1)‡}

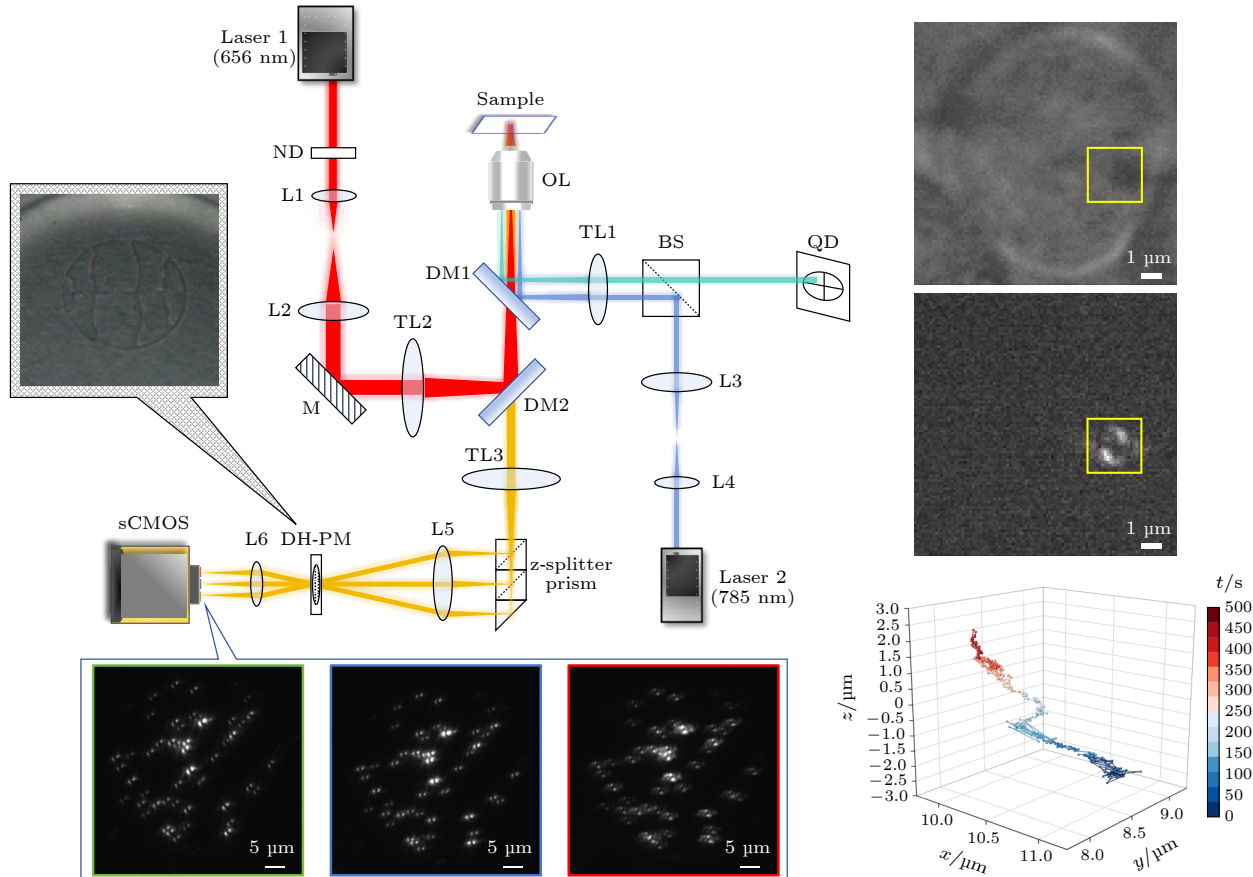
1) (Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems, Ministry of Education and Guangdong Province, College of Physics and Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

2) (College of Chemistry and Environmental Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

(Received 17 February 2024; revised manuscript received 14 March 2024)

Abstract

Double-helix point spread function (DH-PSF) microscopy can realize three-dimensional single particle tracking (3D SPT) on a nanoscale, and is widely used in life sciences and other fields. However, its imaging depth-of-field (DOF) and localization accuracy are limited, which hinders its application in thick samples in vivo. To address this issue, this paper proposes a z-splitter prism-based multifocus DH-PSF microscopy (ZPMDM) method and system to improve the DOF and localization accuracy of DH-PSF microscopy without scanning. It solves the problem of large DOF detection of 3D SPT in whole living cells. By means of systematic calibration, the average 3D localization accuracies of three channels of ZPMDM are determined to be $\sigma_{L(x, y, z)} = (4.4 \text{ nm}, 4.6 \text{ nm}, 10.5 \text{ nm})$, $\sigma_{M(x, y, z)} = (4.3 \text{ nm}, 4.2 \text{ nm}, 8.2 \text{ nm})$, and $\sigma_{R(x, y, z)} = (4.8 \text{ nm}, 4.4 \text{ nm}, 10.3 \text{ nm})$.



And the effective DOF of the system is extended to 6 μm . Furthermore, the ZPMDM system is used to track fluorescent microspheres in a glycerol-water mixture across a large depth-of-field range. The Brownian motion of the fluorescent microspheres in the mixture solution is also investigated. The experimental results demonstrate that the errors between the experimentally obtained diffusion coefficients and the theoretically calculated diffusion coefficients are all within 10%. The reliability of the ZPMDM system in achieving single-particle 3D tracking imaging is verified in this study. The validity of the method is further verified by preliminarily investigating the phagocytosis phenomenon of live macrophages. It is of significance for the development and application of nanoscale 3D SPT. The ZPMDM system is shown in the attached figure.

Keywords: 3D single particle tracking, double-helix point spread function, multifocus microscopy

PACS: 87.64.M-, 87.64.kv, 42.30.-d, 87.85.Pq

DOI: [10.7498/aps.73.20240271](https://doi.org/10.7498/aps.73.20240271)

* Project supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No. 2022YFF0712500), the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 62175166, 61975131, 62235007, 62275165, 62127819), the Science and Technology Program of Shenzhen, China (Grant Nos. JCYJ20200109105411133, JCYJ20220818100202005), and the Key Laboratory of Photonics and Biophotonics of Shenzhen, China (Grant No. ZDSYS20210623092006020).

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

‡ Corresponding author. E-mail: yubin@szu.edu.cn

用于三维单颗粒示踪的多焦面双螺旋点扩散函数显微研究

马光鹏 龚振权 聂梦娇 曹慧群 屈军乐 林丹樱 于斌

Multifocus double-helix point spread function microscopy for 3D single particle tracking

Ma Guang-Peng Gong Zhen-Quan Nie Meng-Jiao Cao Hui-Qun Qu Jun-Le Lin Dan-Ying Yu Bin

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 73, 108701 (2024) DOI: 10.7498/aps.73.20240271

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.73.20240271>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于双螺旋点扩散函数工程的多焦点图像扫描显微

Multifocal image scanning microscopy based on double-helix point spread function engineering

物理学报. 2021, 70(3): 038701 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20200640>

用于大景深单分子定位显微的多功能全息相位片的设计及数值模拟

Design and numerical simulation demonstration of multi-functional holographic phase plate for large depth of field single molecular localization microscopy

物理学报. 2018, 67(17): 174202 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180569>

基于螺旋相位调制的非相干全息点扩散函数研究

Point spread function of incoherent digital holography based on spiral phase modulation

物理学报. 2018, 67(1): 014203 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20171442>

正交像散高密度三维单分子定位显微的数值模拟

Numerical simulation study of three-dimensional high-density single molecule localization microscopy based on orthogonal astigmatism

物理学报. 2022, 71(12): 128701 <https://doi.org/10.7498/aps.71.20212091>

基于光子计数激光雷达的自适应门控抑噪及三维重建算法

Noise reduction and 3D image restoration of single photon counting LiDAR using adaptive gating

物理学报. 2022, 71(10): 104202 <https://doi.org/10.7498/aps.71.20211697>

三维漏斗中颗粒物质堵塞问题的数值实验研究

Numerical experiment studies of clogging during the discharge of granular matter in a three-dimensional hopper

物理学报. 2018, 67(4): 044501 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20171813>