

专题: 华南师范大学建校暨物理学科建立 90 周年

双通道结构光照明超分辨定量荧光 共振能量转移成像系统*

罗泽伟¹⁾²⁾ 武戈¹⁾²⁾ 陈挚¹⁾²⁾ 邓驰楠¹⁾²⁾ 万蓉¹⁾²⁾
杨涛¹⁾²⁾ 庄正飞¹⁾²⁾ 陈同生^{1)2)†}

1) (华南师范大学生物光子学研究院, 教育部激光生命科学重点实验室, 广州 510631)

2) (华南师范大学生物光子学研究院, 广东省激光生命科学重点实验室, 广州 510631)

(2023 年 5 月 25 日收到; 2023 年 6 月 28 日收到修改稿)

基于结构光照明 (structured illumination, SI) 的超分辨荧光共振能量转移 (super resolution fluorescence resonance energy transfer, SR-FRET) 成像技术 (SISR-FRET) 可以通过解析活细胞内亚衍射区域的 FRET 信号来研究细胞器精细结构上的分子结构与功能. SISR-FRET 成像中激发发射通道切换导致成像速度较慢, 限制了 SISR-FRET 在快速成像中的应用. 针对此问题, 本文提出一种双通道结构光照明超分辨定量 FRET 成像系统和方法, 通过在成像光路中加入 FRET 双通道成像和配准模块, 实现了 SISR-FRET 激发发射通道的空分切换以及通道复用. 结合通道亚像素配准校正的图像重建算法, 双通道 SISR-FRET 可以在保持定量超分辨 FRET 分析的同时提升了 3.5 倍时间分辨率. 利用搭建的多色 SIM 系统进行了活细胞表达靶向线粒体外膜 FRET 标准质粒的超分辨成像实验, 验证了双通道 SISR-FRET 的时空分辨率增强和 FRET 定量分析的保真度.

关键词: 荧光共振能量转移, 结构光照明, 超分辨, 活细胞**PACS:** 87.64.M-, 87.64.kv, 42.30.-d**DOI:** 10.7498/aps.72.20230853

1 引言

荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 显微成像术在活细胞中原位定量检测生物大分子间动态相互作用及空间分布方面具有独特优势. 在细胞生命活动中, 蛋白质与其他生物分子形成复杂相互作用和调节网络, 原位研究蛋白质-蛋白质相互作用的时空分布和功能关系是目前生命科学的重要课题之一^[1,2]. 尽管荧光显微成像技术和荧光标记技术的发展为研究蛋白质-蛋白质相互作用提供了有利的条件, 目前已有的蛋白间互作研究方法仍无法在活细胞内同时

实现蛋白结构功能和空间分布动态变化的解析^[3]. FRET 利用分子间共振能量转移速率与距离 6 次方反比的关系来度量 1—10 nm 尺度分子的接近程度, 该物理过程非常适合于表征分子构象变化和分子间相互作用^[4]. 通过定量计算 FRET 表观效率 (E_D , E_A) 和总受体与供体的浓度比 (R_C), 定量 FRET 实现了活细胞内动态蛋白互作的“可视化”, 并为揭示蛋白复合物形成过程中亲和力和化学计量比的测量提供了独特见解^[5,6]. 以上优势使得定量 FRET 显微成像技术正成为研究蛋白质调控网络和信号转导途径、疾病机制和药物筛选的重要工具^[7-9].

超分辨 FRET 显微成像术 (super resolution FRET, SR-FRET) 为研究亚细胞器精细结构上的

* 国家自然科学基金 (批准号: 62135003) 和广东省重点领域研发计划 (批准号: 2022B0303040003) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: chentsh@scnu.edu.cn

分子结构及其功能开辟了新道路. 受限于衍射极限对显微成像空间分辨率的约束, FRET 显微成像分辨能力存在瓶颈, 这使得传统 FRET 显微成像在观测亚细胞区域内蛋白分子相互作用及空间定位时只能解析常规荧光显微镜分辨率约束下多分子事件的平均行为^[10]. 近年来超分辨荧光显微成像技术的发展极大提升了亚细胞器精细结构动态变化的解析力, 因此将超分辨显微与 FRET 成像功能融合并实现 SR-FRET 显微成像获得了学界的广泛关注^[11,12]. 实现超分辨 FRET 显微成像的难点主要包括: 1) 如何从重新分布的超分辨光场中定量解析出 FRET 信号; 2) 如何在有限光通量和光漂白条件下平衡时空分辨率提升与 FRET 定量计算保真度. 目前, 基于单分子定位显微术 (single molecule localization microscopy, SMLM) 和受激发射耗尽显微术 (stimulated emission depletion microscopy, STED) 的 SR-FRET 成像技术利用有机荧光染料标记的 FRET 固定样品实现了 FRET 信号的超分辨解析^[13–15]. 然而基于 SMLM 的 SR-FRET 需要收集供体和受体分子同时处于光激发活化状态时的 FRET 信号, 这对于互相独立闪烁的供受体对来说十分困难, 极长的成像时间也使得该技术与研究活细胞中发生的动态过程很难兼容^[10]. 对于基于 STED 的 SR-FRET, STED 损耗光改变了供体的激发态寿命并导致供体和受体分子的不均匀光漂白, 这种调制过程使得 STED FRET 只能得到半定量的 FRET 指数而不能完成定量 FRET 测量^[15]. 针对以上问题, 本课题组开展了结构光照明显微术 (structured illumination microscopy, SIM) 和定量 FRET 融合的探索^[16]. 由于 SIM 显微术相比其他 SR 成像技术具有照明光强度低、成像速度快的优势, 融合 SIM 和 FRET 技术可能实现目前最佳平衡时空分辨率和光漂白影响的 SR-FRET 成像术^[17–22]. 为了消除 SIM 重建伪影对定量 FRET 的影响, 本课题组设计了一种基于结构光照明超分辨 FRET 两步重建方法 (SISR-FRET), 该方法依次完成三通道 SIM 图像的线性重建和基于共同定位掩模滤波的 FRET 定量解析. 两步过程可以确保重建的 SR-FRET 信号的保真度, 同时可以精确去除由 SIM 伪影引起的假阳性 FRET 信号. 与传统的宽场 FRET 成像相比, SISR-FRET 保持了定量特性并实现了活细胞中 120 nm 空间分辨率解析亚细胞器精细结构上的 FRET 信号^[23].

实现快速结构光照明超分辨定量 FRET 成像是目前活细胞 SR-FRET 研究的迫切需要. 对于 SISR-FRET, 完成一次成像需要采集结构光调制下的三通道 27 张原始图像组, 如果被成像的 FRET 样本在拍摄总时间内移动距离超出了系统点扩散函数 (point spread function, PSF) 范围, 则重建的超分辨图像就会出现运动伪影并导致 FRET 结果失真^[24]. 尽管传统基于滤光片转轮的时分 FRET 三通道切换方案具有切换灵活、无需通道对准等优点, 机械转盘切换速度慢的缺点限制了 SISR-FRET 快速成像^[25]. 针对以上问题, 本文提出一种双通道结构光照明超分辨定量 FRET 成像系统和方法, 通过在成像光路中引入 FRET 双通道探测和对准模块, 双通道 SISR-FRET 系统实现了 FRET 通道的空分切换. 进一步地, 通过优化系统时序控制以及加入通道亚像素对准算法, 双通道 SISR-FRET 系统实现了快速三通道成像并保持通道亚像素精度对准, 最终相比于基于滤光片转轮的时分 FRET 三通道切换方案有效提升了 3.5 倍的时间分辨率. 利用该系统对活细胞表达靶向线粒体外膜的 FRET 标准质粒进行成像, 验证了双通道 SISR-FRET 的时空分辨率增强和 FRET 定量分析的保真度.

2 双通道 SISR-FRET 系统与方法

2.1 成像系统设计与搭建

完成一次 SISR-FRET 成像首先需要收集供体激发供体发射 (DD 通道)、供体激发受体发射 (DA 通道) 和受体激发受体发射 (AA 通道) 3 个通道结构光照明调制的原始图像组. 每一个激发发射通道的原始图像组由 3 个不同结构光方向角, 每个结构光方位角包含 3 个不同相位差的余弦结构光调制的宽场荧光图像构成. 三通道原始数据 $D_{\theta,n}^X(r)$ 的强度分布可以由下式表示:

$$D_{\theta,n}^X(r) = \left\{ S(r) \cdot \left[1 + m_{\theta}^X \cdot \cos(k_{\theta}^X \cdot r + \phi_{\theta}^X + \frac{2\pi(n-1)}{3}) \right] \right\} \otimes H^X(r), \quad (1)$$

其中下标 $\theta (= 1, 2, 3)$ 和 $n (= -1, 0, 1)$ 表示余弦照明的方向角和相位差, 上标 $X (= DD, DA, AA)$ 表示 FRET 通道, $S(r)$ 表示样本荧光信号的空间分布, m_{θ}^X , k_{θ}^X , ϕ_{θ}^X 分别是余弦结构光场的调制深

度、照明频率矢量和初相位, $H^X(r)$ 表示不同 FRET 通道 X ($=$ DD, DA, AA) 对应的点扩散函数 (PSF).

为了获得三通道原始数据 ($D_{\theta,n}^{DD}(r) / D_{\theta,n}^{DA}(r) / D_{\theta,n}^{AA}(r)$), 我们搭建了一个套双通道同时探测的多色干涉式 SIM 系统. 系统光路如图 1 所示. 该系统的激发光由波长为 488 nm (EX1, 供体激发) 和 561 nm (EX2, 受体激发) 激光通过多色合束光源生成 (L4cc, Oxxius). 为了使定量 FRET 计算时系统参数和 FRET 效率不受到激光器的照明功率波动的影响, 在光源耦合到系统光路之前需要先通过激发光强度自动校准装置进行光强校正, 激发光强度自动校准装置由分束器 (BS, BS037, Thorlabs) 和激光功率计 (PM400K1, Thorlabs) 构成. 校正后的光源光束用两个消色差透镜组成的扩束系统完成照明光的扩束和准直. 而后准直光束入射到由偏振分束器 (PBS)、消色差半波片 (HWP) 和铁电液晶空间光调制器 (SLM, QXGA-3DM-STR, forth dimension displays) 组成的等效相位光栅进行衍射, 这样产生的调制衍射光束由消色差透镜 (L1, AC254-300, Thorlabs) 聚焦后, 通过定制的空间掩模滤波器 (Mask, 1 mm 铝片, 孔径为 0.5 mm) 过滤 0 阶和其他高阶衍射光, 最终保

留 ± 1 阶衍射光束. 为了最大化照明图案的调制深度, 照明光的偏振由四分之一波片 (QWP) 和定制的结构化偏振片 (PP, VIS 038BC3CW01, Codixx) 调制并保持 S 偏振. 而后经过偏振调制的双光束通过由消色差透镜 2 (L2, AC254-125, Thorlabs) 和消色差透镜 3 (L3, AC254-200, Thorlabs) 组成的 4f 系统, 将相干光束中继到显微镜物镜的后焦面上 (L4, Apo TIRF 60 \times NA1.49, Nikon). 最终经过物镜重新准直的两束光束在焦平面发生干涉并在样本上产生二维余弦调制光场. 样品的发射荧光经过二向色镜 1 (DM1, DI03-R405/488/561/635, Semrock) 和二向色镜 2 (DM2, DI03-R561, Semrock) 以及供体发射滤光片 1 (EM1, ET530/30x, Chroma) 和受体发射滤光片 2 (EM2, BA570-625, Olympus) 的滤光片组实现 FRET 供体发射光和受体发射光的空域分离, 发射荧光经过管镜 (L5, AC508-300, Thorlabs) 汇聚后由两台科研级 cmos 相机收集 (camera1&2, Fusion BT, Hamamatsu). 为了实现双相机通道的像素级对准, 竖直放置的相机加装了配准模块, 配准模块由 X-Y 平移调整架 (ST1XY, Thorlabs) 以及旋转调整架 (LCP16R1, Thorlabs) 构成, 该配准模块可以为双相机对准提供高精度的旋转、平移调整自由度.

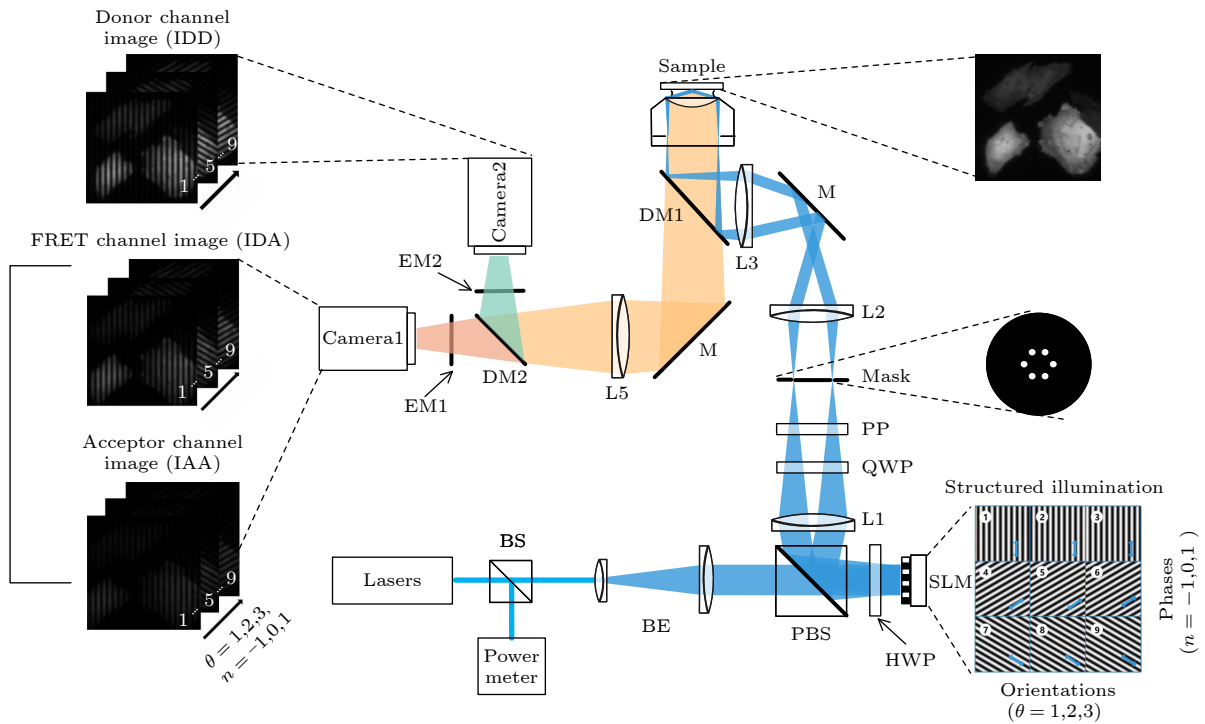


图 1 双通道 SISR-FRET 系统光路示意图

Fig. 1. Schematic diagram of dual-channel SISR-FRET system.

2.2 双通道 SISR-FRET 重构方法

采集三通道原始数据 $D_{\theta,n}^X(r)$ 后, 需要对数据进行重建来获取超分辨结构信息. 为了确保每个重建的 SR 图像在 3 个 FRET 通道中保持荧光强度保真, 使用线性维纳重建算法, 该线性重建过程包括频率分离、频谱搬移和广义维纳反卷积. 每个通道的重建 SR 图像 ($I_{\text{SIM}}^{\text{DD}}(r) / I_{\text{SIM}}^{\text{DA}}(r) / I_{\text{SIM}}^{\text{AA}}(r)$) 通过以下公式实现:

$$\begin{aligned} & \begin{bmatrix} \tilde{S}_{\theta,0}^X(k) \\ \tilde{S}_{\theta,-1}^X(k - p_{\theta}^X) \\ \tilde{S}_{\theta,1}^X(k + p_{\theta}^X) \end{bmatrix} \\ &= \begin{bmatrix} 1 & m_{\theta}^X e^{-i(\phi_{\theta}^X)/2} & m_{\theta}^X e^{i(\phi_{\theta}^X)/2} \\ 1 & m_{\theta}^X e^{-i(\phi_{\theta}^X + \frac{2\pi}{3})/2} & m_{\theta}^X e^{i(\phi_{\theta}^X + \frac{2\pi}{3})/2} \\ 1 & m_{\theta}^X e^{-i(\phi_{\theta}^X + \frac{4\pi}{3})/2} & m_{\theta}^X e^{i(\phi_{\theta}^X + \frac{4\pi}{3})/2} \end{bmatrix}^{-1} \\ & \times \begin{bmatrix} \tilde{D}_{\theta,0}^X(k) \\ \tilde{D}_{\theta,-1}^X(k) \\ \tilde{D}_{\theta,1}^X(k) \end{bmatrix}, \quad (2) \\ & I_{\text{SIM}}^X(r) = \text{iff}t \left[\frac{\sum_{\theta,n} \tilde{S}_{\theta,n}^X \tilde{H}^{*X}(k + np_{\theta}^X)}{\sum_{\theta,n} |\tilde{H}^X(k + np_{\theta}^X)|^2 + w^2} \tilde{A}(k) \right], \quad (3) \end{aligned}$$

其中 $\tilde{D}_{\theta,n}^X(k)$ 表示三通道原始数据的 $D_{\theta,n}^X(r)$ 傅里叶频谱, $\tilde{S}_{\theta,0}^X(k)$ 和 $\tilde{S}_{\theta,\pm 1}^X(k)$ 是频谱分离后包含 0 阶中低频谱和 ± 1 阶含高频频谱, $\tilde{H}^X(k)$ 是不同 FRET 通道的光学传递函数 (optical transfer function, OTF), 实验中使用 100 nm 荧光微球 (0.1 μm Tetra-Speck, T7279, Thermofisher) 对 OTF 进行了实验标定. $\tilde{A}(k)$ 是切趾函数, w 是维纳系数, 为了重建信号在 FRET 三通道之间仍然能保持灰度强度关系一致, 三通道 SR 图像重建采用统一的维纳系数和高斯型切趾函数, 维纳参数根据经验选取 0.2, 高斯型切趾函数选取为 $\tilde{A}(k) = \exp[-0.5(k\sqrt{2\ln 2})^2]$.

在进一步 FRET 计算之前, 需要对三通道 SR-FRET 图像进行预处理. 由于双通道成像系统存在通道配准的问题, 除了在系统硬件配准模块上进行像素级别的通道对准, 还需要通过配准算法实现 FRET 三通道进一步的亚像素级对准, 以保证 FRET 逐像素计算时的精度. DA 和 AA 通道图像由于通

道的复用关系不需要额外对准, 因此配准算法以 DD 通道 SR 重建图像为基准, 通过将 DA, AA 通道图像与仿射变换相乘来实现与 DD 通道图像的亚像素级对准. 仿射变换矩阵 T 通过以下最优化方法获得:

$$\arg \min_T \|T[I_{\text{SIM}}^{\text{AA}}(r)] - I_{\text{SIM}}^{\text{DD}}(r)\|_2^2, \quad (4)$$

$$T = \begin{bmatrix} s \cos(\theta) & -s \sin(\theta) & x_t \\ s \sin(\theta) & s \cos(\theta) & y_t \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}, \quad (5)$$

其中 x_t, y_t 为仿射变换矩阵的平移参数, θ, s 分别表示旋转和缩放补偿参数.

另一方面, FRET 定量计算需要考虑背景灰度的影响. 实验中对每个 FRET 成像通道的超分辨图像进行逐像素灰度值统计, 并以灰度值直方图中第 1 个峰值对应的灰度值作为该视野的背景灰度值 I_{bg}^X ($X = \text{DD}, \text{DA}, \text{AA}$). 接着对图像进行背景修正并将负的像素灰度值置零, 得到每个成像通道的修正图像. 具体过程表示为

$$I'_{\text{SIM}}^X = \begin{cases} I_{\text{SIM}}^X - I_{\text{bg}}^X, & I_{\text{SIM}}^X - I_{\text{bg}}^X > 0, \\ 0, & \text{otherwise,} \end{cases} \quad (6)$$

$X = \text{DD}, \text{DA}, \text{AA}.$

FRET 三通道原始图像组在采集过程中不可避免产生噪声, 这些噪声会经过 SR-SIM 线性重建放大产生重建伪影并严重影响 FRET 定量分析. 由于噪声伪影是随机叠加在 FRET 三通道图像上, 其空间分布彼此独立, 因此这种伪影在三通道图像间具有非常低的相关性. 相反, 当 FRET 发生的必要条件是供受体荧光分子靠近到 10 nm 尺度内, 这样供体和受体分布将展现出极强的共定位特征, 即超过随机噪声图像间的强相关性. 因此可以利用以上先验信息设计共同定位掩模来抑制重建伪影的干扰. 为了定量表征 FRET 信号和噪声在不同成像通道之间差异, 逐像素的共定位分析可以表示如下:

$$\begin{aligned} \text{PCC}_{\text{map}}(r) = & \frac{[I_{\text{SIM}}^{\text{DD}}(r) - I_{\text{AVG}}^{\text{DD}}] \cdot \{T[I_{\text{SIM}}^{\text{AA}}(r) - I_{\text{AVG}}^{\text{AA}}]\}}{\sqrt{\sum_r [I_{\text{SIM}}^{\text{DD}}(r) - I_{\text{AVG}}^{\text{DD}}]^2 \cdot \sum_r \{T[I_{\text{SIM}}^{\text{AA}}(r) - I_{\text{AVG}}^{\text{AA}}]\}^2}}, \quad (7) \end{aligned}$$

$$\text{MOC}_{\text{map}}(r) = \frac{I_{\text{SIM}}^{\text{DD}}(r) \cdot T[I_{\text{SIM}}^{\text{AA}}(r)]}{\sqrt{\sum_r [I_{\text{SIM}}^{\text{DD}}(r)]^2 \cdot \sum_r \{T[I_{\text{SIM}}^{\text{AA}}(r)]\}^2}} \quad (8)$$

其中 $\text{PCC}_{\text{map}}(r)$ 是供体和受体图像中每个像素对皮尔逊相关系数 (PCC) 的权重分布图, $\text{MOC}_{\text{map}}(r)$ 是供体和受体图像中每个像素对曼德斯相关系数 (MOC) 的权重分布图. $I_{\text{AVG}}^{\text{DD}}$ 是经过背景扣除后的 DD 通道图像的灰度平均值, $I_{\text{AVG}}^{\text{AA}}$ 是经过背景扣除后的 AA 通道图像的灰度平均值. 将 $\text{PCC}_{\text{map}}(r)$ 和 $\text{MOC}_{\text{map}}(r)$ 相乘得到混合共定位权重矩阵, 并通过自适应阈值处理算法进行混合共定位权重矩阵的分割生成二值化掩膜板 $B_{\text{colocalmask}}(r)$, 可以如下表示:

$$B_{\text{colocalmask}}(r) = \begin{cases} 1, & \text{PCC}_{\text{map}}(r) \cdot \text{MOC}_{\text{map}}(r) > \text{th}, \\ 0, & \text{otherwise.} \end{cases} \quad (9)$$

经过以上图像预处理后, SISR-FRET 计算供体为中心的 FRET 表观效率 E_{D} 和总受体与供体的浓度比 R_{C} 由如下公式得到:

$$E_{\text{D}} = \frac{\text{Fc}_{\text{SIM}}}{\text{Fc}_{\text{SIM}} + G \cdot I_{\text{SIM}}^{\text{DD}}} \cdot B_{\text{colocalmask}}, \quad (10)$$

$$R_{\text{C}} = \frac{K \cdot T(I_{\text{SIM}}^{\text{AA}})}{\text{Fc}_{\text{SIM}}/G + I_{\text{SIM}}^{\text{DD}}} \cdot B_{\text{colocalmask}}, \quad (11)$$

$$\text{Fc}_{\text{SIM}} = T(I_{\text{SIM}}^{\text{DA}}) - a [T(I_{\text{SIM}}^{\text{AA}}) - c I_{\text{SIM}}^{\text{DD}}] - d [I_{\text{SIM}}^{\text{DD}} - b T(I_{\text{SIM}}^{\text{AA}})], \quad (12)$$

其中, Fc_{SIM} 为受体敏化发射荧光强度, G 为敏化淬灭转化因子, K 为供受体浓度转化因子, a, b, c, d 为系统串扰系数.

总结双通道 SISR-FRET 算法流程图如图 2 所示, 实施 SISR-FRET 需要以下 3 个步骤: 1) 使用三通道原始数据 $D_{\theta,n}^X(r)$ 重建三通道 SR 图像 $I_{\text{SIM}}^X(r)$ ($X = \text{DD}, \text{DA}, \text{AA}$); 2) 通过图像预处理过程, 对重建的三通道 SR 图像进行背景扣除, 通道对准和共定位掩膜滤波模板生成; 3) 对预处理后的三通道 SR 图像中定量计算 FRET 效率 (E_{D}) 和受供体浓度比 (R_{C}).

2.3 控制系统的设计与优化

根据 2.1 和 2.2 节的内容, 完成一次 SISR-FRET 成像需要采集结构光调制下的三通道 27 张原始图像组. 其中一组典型的 FERT 三通道原始数据采集时序如图 3 所示. 采集过程首先由上位机发送指令给下位机, 随后下位机发出精确同步控制

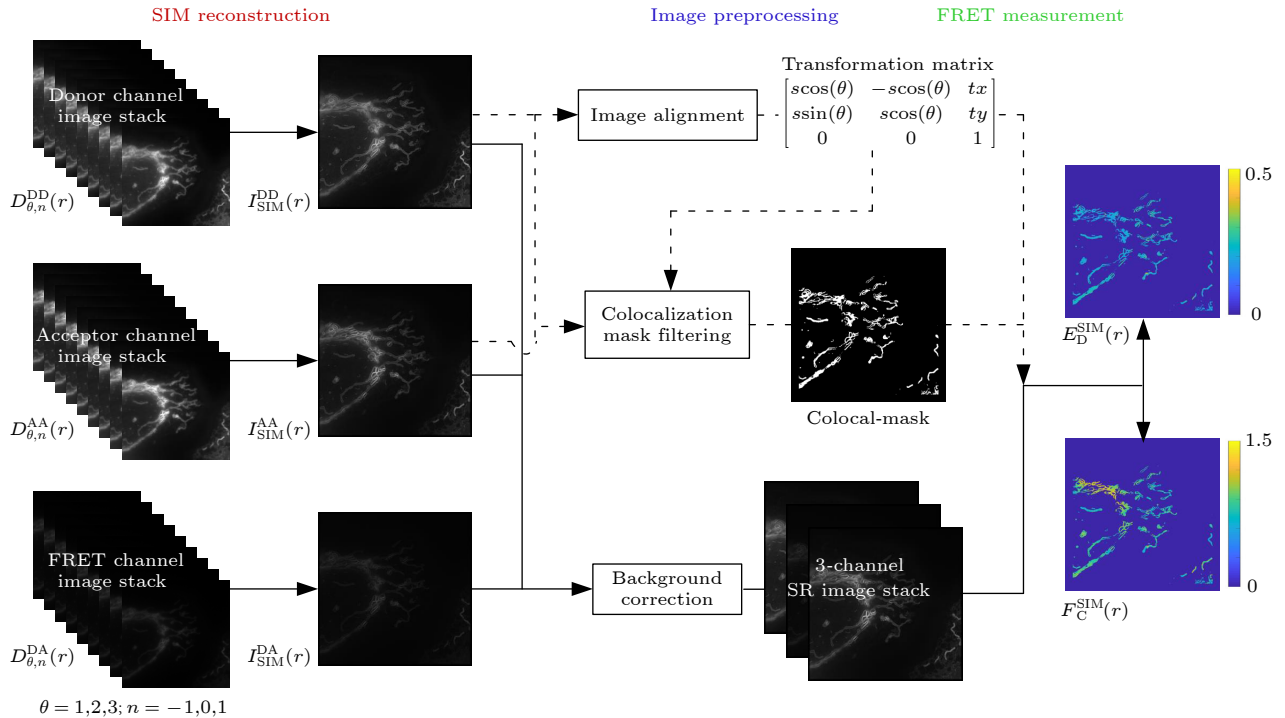


图 2 双通道 SISR-FRET 的算法流程图

Fig. 2. Flow chart of dual-channel SISR-FRET algorithm.

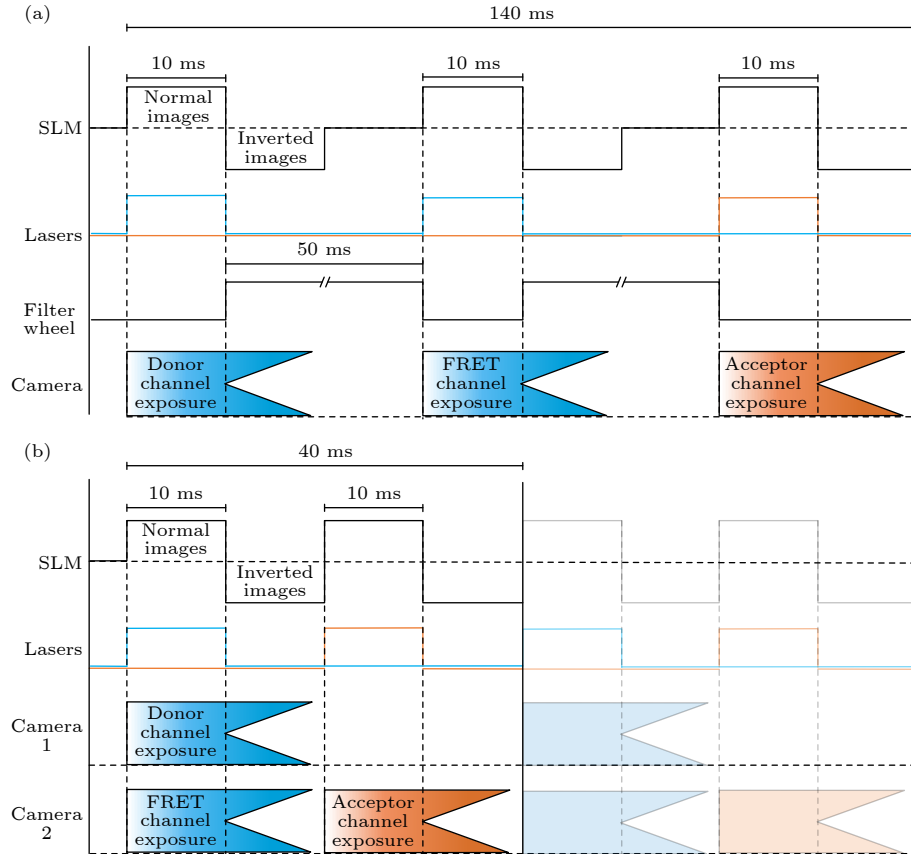


图 3 双通道 SISF-FRET 与单通道 SISF-FRET 时序图对比 (a) 单通道 SISF-FRET 在一个 FRET 采集周期的时序图; (b) 双通道 SISF-FRET 相同周期的时序图

Fig. 3. Comparison of timing sequence of dual-channel SISF-FRET and single-channel SISF-FRET: (a) Timing sequence of single-channel SISF-FRET in one FRET acquisition cycle; (b) timing sequence of dual-channel SISF-FRET in the same cycle.

信号给 SLM、激光器、机械转盘以及两台 sCMOS 相机. 对于单通道 SISF-FRET, 下位机发出同步信号给 SLM 进行结构化图案显示, 同时开启激光器并打开相机曝光完成一次拍摄. 在等待相机读出以及 SLM 暗图像刷新的时间内, 下位机发送触发信号关闭激光器并使能机械转盘完成 FRET 通道切换, 重复以上过程 3 次, 即可完成一组 FRET 原始数据采集并将数据传输给上位机. 为了加快转盘切换速度, 单通道 SISF-FRET 采用快速机械转盘 (FW103, Throlabs), 该器件的最小通道的切换时间为 50 ms. 根据经验设定相机典型单帧曝光时间为 10 ms, 图像采集区域大小为 $512 \times 512 @ 16 \text{ bit}$, 此时转盘完成切换的时间制约了整个系统成像速度, 该方案可实现的一组 FRET 三通道原始数据采集时间为 140 ms (图 3(a)). 由于双通道 SISF-FRET 将基于滤光片转轮的时分 FRET 三通道切换方案替换为基于二项色镜分光的空分方案, 期间无需转动机械转轮来切换不同波长的发射滤光片, 此时制约成像系统进行下一组曝光的等待时间则

由相机的读出时间和 SLM 的负图像显示时间来确定. 另一方面, 由采用双通道方案, 一次激发可以在两个发射通道实现同时成像 (DD&DA). 相比传统基于滤光片转轮的时分 FRET 三通道切换方案需要切换 3 次才能完成图像采集, 双通道 FRET 成像系统只需两次成像即可完成, 从而将相机曝光读出时间占比进一步减少了 $1/3$. 在此方案下, 双通道方案在曝光时间相同的情况下完成一组 FRET 三通道原始数据采集时间为 40 ms, 相应系统时间分辨率从原来的约 1 帧/s 提升为 3 帧/s, 实现了约 3.5 倍的时间分辨率提升.

3 成像结果与讨论

为了验证双通道 SISF-FRET 系统在活细胞中超分辨 FRET 成像能力, 使用表达靶向线粒体外膜的 FRET 标准质粒 (ActA-G17M) 的 MCF-7 细胞样本进行系统测试. ActA-G17M 融合了线粒体外膜靶向蛋白 ActA 和 FRET 标准质粒 G17M,

其中 G17M 由 GFP 和 mCherry 之间连接 17 个氨基酸构成. 该质粒的理论 FRET 表观效率 (E_D) 为 0.2, 受体与供体的浓度比 (R_C) 为 1.

利用该样本首先对系统双相机超分辨成像结果的通道对准进行标定, 结果如图 4 所示. 图 4(a) 为样本在 DD 和 AA 通道超分辨成像的伪彩图, 图 4(b) 为 DD 和 AA 通道超分辨成像只经过系统硬件进行通道对准时的叠加效果图, 可以明显观察到 AA 通道对比 DD 通道图像像素的整体向下的错位. 经过双通道 SISR-FRET 图像对准算法处理后, 可计算得到最优对准效果的仿射变换矩阵 T 为 $[1, 0, -0.85], [0, 1, -3.32], [0, 0, 1]$. 此时经过仿射变换矩阵校正后的 DD&AA 叠加效果图如图 4(c) 所示, 其相比于图 4(b) 对准效果明显提升, 在整个视野内 DD&AA 通道线粒体外膜精细结构表现出很好的重合, 证明了对准算法在进行亚像素精度对准的有效性以及 SISR-FRET 成像系统的成像质量.

为了测试双通道 SISR-FRET 系统的超分辨成像能力, 对表达 ActA-G17M 质粒的 MCF7 细胞进行了定量超分辨 FRET 成像. 为获得采样速度和收集光子计数之间的最佳平衡, 单帧图像的曝光时间设置为 10 ms, 相应总的双通道 SISR-FRET 测量时间分辨率约 360 ms. 在此参数设置下, 三通道超分辨图像重建结果如图 5 所示. 图 5(a)—(c)

分别为 DD, DA, AA 通道对 ActA-G17 M 宽场成像结果, 图 5(d)—(f) 分别为 DD, DA, AA 通道对 ActA-G17M 超分辨成像结果. 一些在宽场成像中无法区分的相邻线粒体外膜精细结构在超分辨图像得到清晰解析. 证明当前系统进行 FRET 三通道超分辨成像时分辨率提升的有效性.

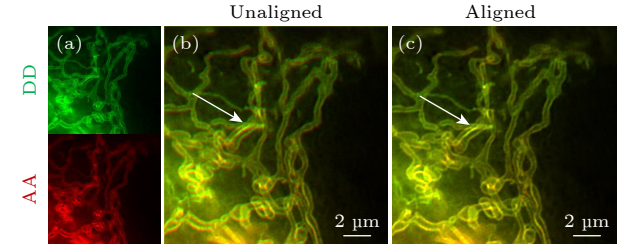


图 4 双通道 SISR-FRET 通道对准效果 (a) DD 通道和 AA 通道成像结果的伪彩图, 绿色为 DD 通道, 红色为 AA 通道; (b) 未经过算法对准的 DD 通道和 AA 通道成像结果叠加图; (c) 经过仿射变换矩阵对准的 DD 通道和 AA 通道成像结果叠加图. 比例尺: 2 μm

Fig. 4. Dual-channel SISR-FRET alignment results: (a) Pseudo-color image of DD channel and AA channel imaging results, green is DD channel, red is AA channel; (b) overlay of the imaging results of DD channel and AA channel without algorithm alignment; (c) overlay of DD channel and AA channel imaging results after affine transformation matrix alignment. Scale bar: 2 μm .

为了测试双通道 SISR-FRET 系统的超分辨定量 FRET 分析能力, 对图 5 中三通道超分辨 FRET 图像进一步进行定量 FRET 分析, 结果如图 6 所示.

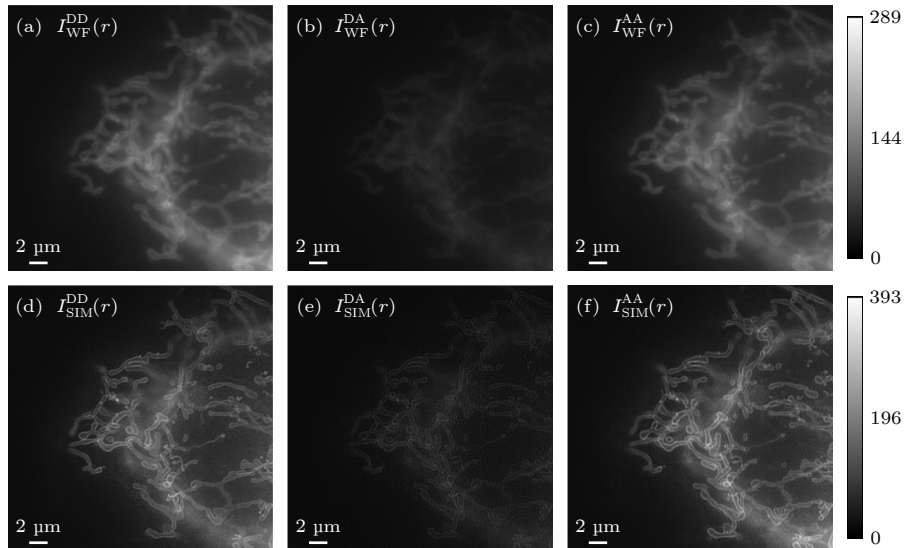


图 5 双通道 SISR-FRET 成像系统对 ActA-G17 M 样本成像结果 (a)—(c) DD, DA, AA 通道宽场成像结果; (d)—(f) DD, DA, AA 通道超分辨成像结果. 比例尺: 2 μm

Fig. 5. Imaging results of the dual-channel SISR-FRET imaging system for the ActA-G17M sample: (a)—(c) Wide-field imaging results in the DD, DA, and AA channels; (d)—(f) super-resolution imaging results in the DD, DA, and AA channels. Scale bar: 2 μm .

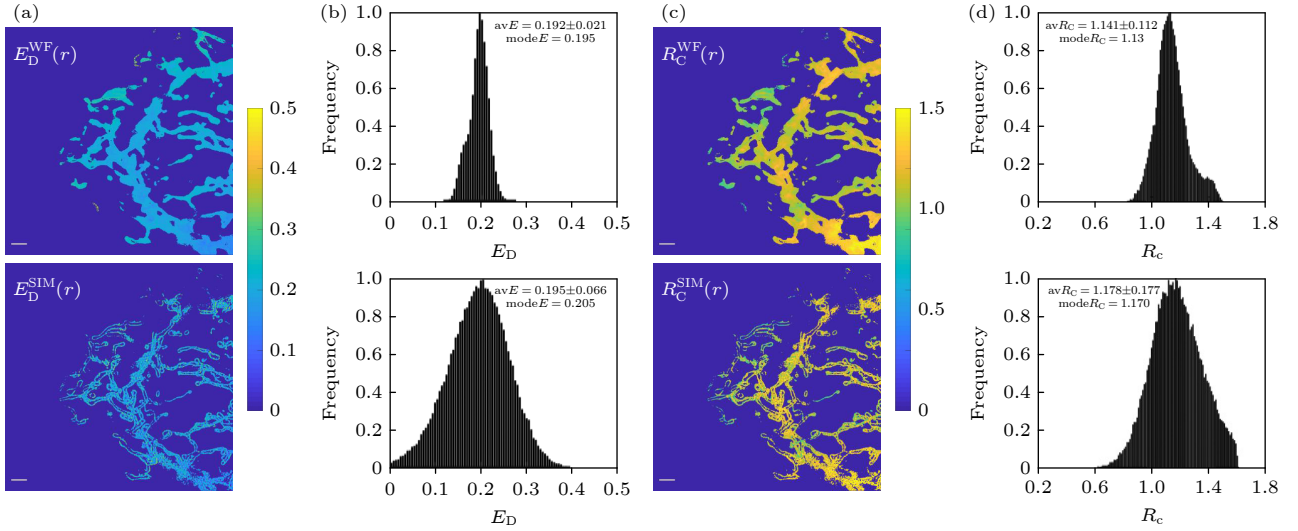


图 6 双通道 SISF-FRET 成像定量 FRET 分析结果对比 (a) 宽场 FRET 和超分辨率 FRET 效率 E_D 的伪彩图; (b) 图 (a) 中结果的统计直方图; (c) 宽场 FRET 和超分辨率 FRET 受供体浓度比 R_C 的伪彩图; (d) 图 (c) 中结果的统计直方图. 比例尺: 2 μm

Fig. 6. Comparison of quantitative FRET analysis results from dual-channel SISF-FRET imaging: (a) Pseudo-color map of E_D for wide-field FRET and super-resolution FRET; (b) corresponding statistical histograms; (c) pseudo-color plot of R_C for wide-field FRET and super-resolution FRET; (d) corresponding statistical histograms. Scale bars: 2 μm .

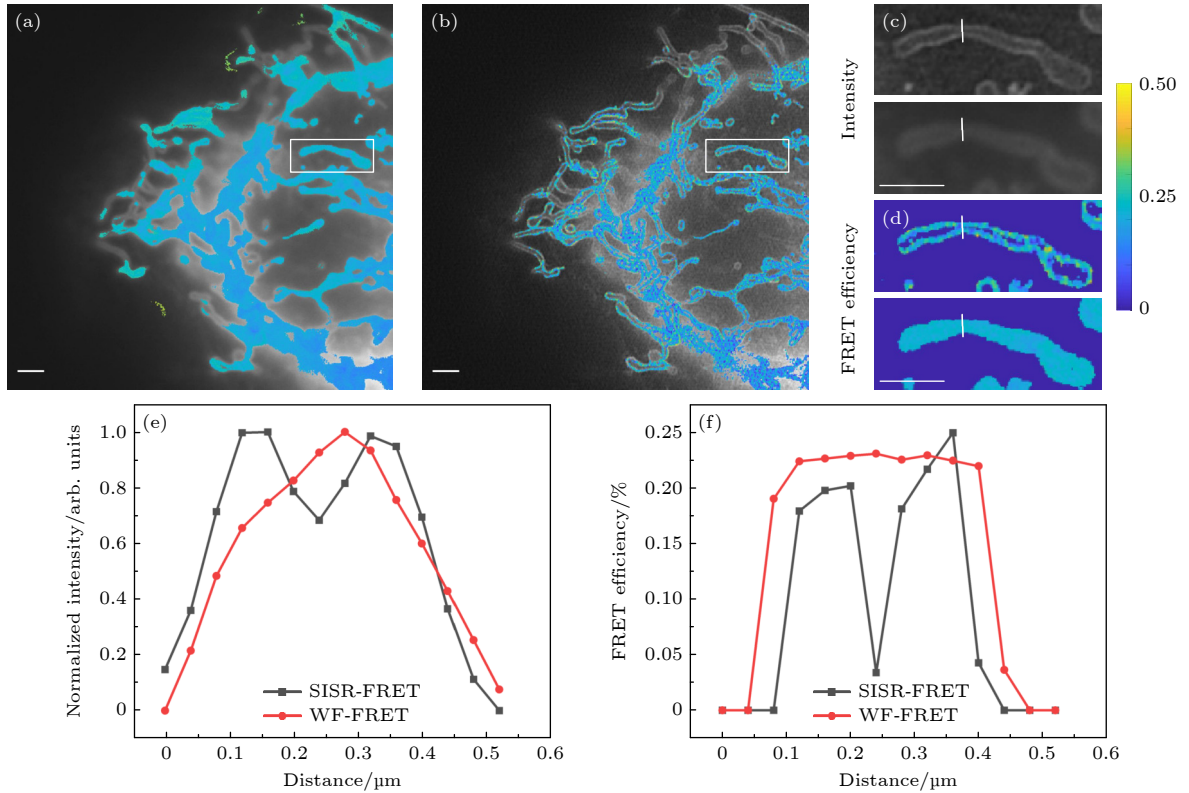


图 7 双通道 SISF-FRET 分辨率提升的定量分析 (a) 宽场 FRET 效率 E_D 的伪彩图和 DD 通道灰度图像的重叠结果; (b) SISF-FRET 效率 E_D 的伪彩图和 DD 通道灰度图像的重叠结果; (c) 宽场 FRET 与 SISF-FRET 中 DD 通道灰度图像的局部细节对比; (d) 宽场 FRET 与 SISF-FRET 中效率 E_D 的伪彩图的局部细节对比; (e), (f) 图 (c) 和图 (d) 中划线位置的横切面强度图. 比例尺: 2 μm

Fig. 7. Quantitative analysis of dual-channel SISF-FRET resolution enhancement: (a) The merge of intensity and E_D map images of wide-field FRET; (b) the merge of intensity and E_D map images of SISF-FRET; (c) partly enlarged view of intensity images of wide-field FRET and SISF-FRET in the DD channel; (d) partly enlarged view of E_D map images of wide-field FRET and SISF-FRET; (e), (f) normalized intensity and FRET profiles along the marked lines in (c) and (d). Scale bars: 2 μm .

图 6(a) 和图 6(c) 分别展示了宽场 FRET 和超分辨 FRET 效率 E_D 和受供体浓度比 R_C 的空间分布, 可以清晰看到双通道 SISR-FRET 重建算法对 FRET 空间分辨能力的提升. 另一方面图 6(b), (d) 分别展示了宽场 FRET 和超分辨 FRET 效率 E_D 和受供体浓度比 R_C 的逐像素统计结果, 可以看出 SISR-FRET 和宽场 FRET 一样可以正确解析 ActA-G17 M 质粒的 E_D 和 R_C , 但是由于 SISR-FRET 组 DA 通道的信噪比较低, 最终导致 SISR-FRET 统计直方图的半高全宽相比传统宽场 FRET 结果得到了展宽.

为了定量比较双通道 SISR-FRET 成像分辨率对比宽场 FRET 的提升, 现将图 5 和图 6 结果进行了重叠比较, 结果如图 7(a), (b) 所示, 线粒体外膜的结构分布和经过共定位掩膜滤波的 FRET 效率空间分布有着良好的重合, 证明 SISR-FRET 具备在活细胞中定量解析精细结构上 FRET 信号的能力. 其中图 7(a), (b) 局部放大的线粒体外膜结构 FRET 信号在宽场 FRET 成像下无法分辨, 而在 SISR-FRET 成像下可以清晰区分 (图 7(c)—(f)).

4 结 论

本文提出和搭建了一套双通道结构光照明超分辨定量 FRET 成像系统. 该系统实现了 SISR-FRET 激发发射通道的空分切换以及通道复用, 提升了约 3.5 倍的时间分辨率. 相比传统的宽场 FRET 技术, 双通道 SISR-FRET 具有更高的时空分辨率, 能够更准确地定位和解析供受体之间的 FRET 信号, 从而提高解析活细胞内精细结构上分子互作的能力. 通过将双通道 SISR-FRET 技术应用于亚细胞器尺度的蛋白相互作用过程的精确定量检测中, 可以直观地展示亚细胞器的空间结构变化以及蛋白的定位关系. 这对于揭示活细胞中细胞核、线粒体和内质网等生物大分子生成和执行功能的场所精细结构上的分子结构及其功能具有重要意义. 通过这项技术, 能更深入地了解细胞内复杂的分子动态过程, 为研究生物体的功能和机制提供有力的工具.

参考文献

- [1] Rao V S, Srinivas K, Sujini G N, Kumar G N S 2014 *Int. J. Proteomics* **2014** 1
- [2] Acuner Ozbabacan S E, Engin H B, Gursay A, Keskin O 2011 *Protein Eng. Des. Sel.* **24** 635
- [3] Xing S, Wallmeroth N, Berendzen K W, Grefen C 2016 *Plant Physiol.* **171** 727
- [4] Algar W R, Hildebrandt N, Vogel S S, Medintz I L 2019 *Nat. Methods* **16** 815
- [5] Jares-Erijman E A, Jovin T M 2003 *Nat. Biotechnol.* **21** 1387
- [6] Ben-Johny M, Yue D N, Yue D T 2016 *Nat. Commun.* **7** 13709
- [7] Chen H C, Sun B N, Sun H, Xu L J, Wu G H, Tu Z, Cheng X C, Fan X H, Mai Z H, Tang Q L, Wang X P, Chen T S 2021 *Cell Death Discov.* **7** 363
- [8] Sun B N, Chen H C, Wang X P, Chen T S 2023 *Cell Death Discov.* **9** 37
- [9] Yang F F, Qu W F, Du M Y, Mai Z Y, Wang B, Ma Y Y, Wang X P, Chen T S 2020 *Cell. Mol. Life Sci.* **77** 2387
- [10] Szalai A M, Zaza C, Stefani F D 2021 *Nanoscale* **13** 18421
- [11] Szabó Á, Szendi-Szatmári T, Szöllösi J, Nagy P 2020 *Methods Appl. Fluoresc.* **8** 032003
- [12] Grecco H E, Verveer P J 2011 *ChemPhysChem* **12** 484
- [13] Deußner-Helfmann N S, Auer A, Strauss M T, Malkusch S, Dietz M S, Barth H D, Jungmann R, Heilemann M 2018 *Nano Lett.* **18** 4626
- [14] Tardif C, Nadeau G, Labrecque S, Côté D, Lavoie-Cardinal F 2019 *Neurophotonics* **6** 1
- [15] Szalai A M, Siarry B, Lukin J, Giusti S, Unsain N, Cáceres A, Steiner F, Tinnefeld P, Refojo D, Jovin T M, Stefani F D 2021 *Nano Lett.* **21** 2296
- [16] Liu Z, Luo Z W, Chen H C, Yin A, Sun H, Zhuang Z F, Chen T S 2022 *Cytom. Part A* **101** 264
- [17] Zhao T Y, Wang Z J, Cai Y N, Liang Y S, Wang SW, Zhang J X, Chen T S, Lei M 2023 *Opt. Lasers Eng.* **167** 107606
- [18] Zhao W S, Zhao S Q, Li L J, et al. 2022 *Nat. Biotechnol.* **40** 606
- [19] Huang X S, Fan J C, Li L J, Liu H S, Wu R L, Wu Y, Wei L S, Mao H, Lal A, Xi P, Tang L Q, Zhang Y F, Liu Y M, Tan S, Chen L Y 2018 *Nat. Biotechnol.* **36** 451
- [20] Li D, Shao L, Chen B C, Zhang X, Zhang M, Moses B, Milkie D E, Beach J R, Hammer J A, Pasham M, Kirchhausen T, Baird M A, Davidson M W, Xu P, Betzig E 2015 *Science* **349** aab3500
- [21] Kner P, Chhun B B, Griffis E R, Winoto L, Gustafsson M G L 2009 *Nat. Methods* **6** 339
- [22] Wen G, Li S M, Wang L B, et al. 2021 *Light Sci. Appl.* **10** 70
- [23] Luo Z W, Wu G, Kong M, Chen Z, Zhuang Z F, Fan J C, Chen T S 2023 *Photonics Res.* **11** 887
- [24] Fan J C, Huang X S, Li L, Tan S, Chen L 2019 *Biophys. Rep.* **5** 80
- [25] Sun H, Zhang C, Ma Y, Du M, Chen T S 2019 *Biomed. Signal Process. Control* **53** 101585

SPECIAL TOPIC — The 90th Anniversary of South China Normal University and Physics Discipline

Dual-channel structured illumination super-resolution quantitative fluorescence resonance energy transfer imaging^{*}

Luo Ze-Wei¹⁾²⁾ Wu Ge¹⁾²⁾ Chen Zhi¹⁾²⁾ Deng Chi-Nan¹⁾²⁾ Wan Rong¹⁾²⁾Yang Tao¹⁾²⁾ Zhuang Zheng-Fei¹⁾²⁾ Chen Tong-Sheng^{1)2)†}

1) (*Key Laboratory of Laser Life Science, Ministry of Education, College of Biophotonics,
South China Normal University, Guangzhou 510631, China*)

2) (*Guangdong Key Laboratory of Laser Life Science, College of Biophotonics,
South China Normal University, Guangzhou 510631, China*)

(Received 25 May 2023; revised manuscript received 28 June 2023)

Abstract

The Structured illumination (SI)-based super resolution fluorescence resonance energy transfer (SR-FRET) imaging technique, known as SISR-FRET, enables the investigation of molecular structures and functions in cellular organelles by resolving sub-diffraction FRET signals within living cells. The FRET microscopy offers unique advantages for quantitatively detecting dynamic interactions and spatial distribution of biomolecules within living cells. The spatial resolution of conventional FRET microscopy is limited by the diffraction limit, and it can only capture the average behavior of these events within the resolution limits of conventional fluorescence microscopy. The SISR-FRET performs sequential linear reconstruction of the three-channel SIM images followed by FRET quantitative analysis by using a common localization mask-based filtering approach. This two-step process ensures the fidelity of the reconstructed SR-FRET signals while effectively removing false-positive FRET signals caused by SIM artifacts. However, the slow imaging speed resulting from the switching of excitation-emission channels in SISR-FRET imaging limits its application in fast imaging scenarios. To address this issue, this study proposes a dual-channel structured illumination super-resolution quantitative FRET imaging system and method. By incorporating an FRET dual-channel imaging and registration module into the imaging pathway, the spatial switching and channel multiplexing of the SISR-FRET excitation-emission channels are achieved. Combining the image reconstruction algorithm with channel sub-pixel registration correction, the dual-channel SISR-FRET technique enhances the temporal resolution by 3.5 times while preserving the quantitative super-resolution FRET analysis. Experimental results are obtained by using a multi-color SIM system to perform super-resolution imaging of living cells expressing mitochondria outer membrane FRET standard plasmids. These experiments validate the improved spatial and temporal resolution of dual-channel SISR-FRET and the fidelity of FRET quantification analysis. In summary, this research presents a novel dual-channel structured illumination super-resolution FRET imaging system and method. It overcomes the limitations of slow imaging speed in SISR-FRET by realizing the spatial switching and channel multiplexing of excitation-emission channels. The proposed technique enhances the temporal resolution while maintaining quantitative analysis of super-resolution FRET. Experimental validation demonstrates the increased spatial and temporal resolution of dual-channel SISR-FRET and the accuracy of FRET quantification analysis. This advancement contributes to the study of molecular structures and functions in cellular organelles, providing valuable insights into the intricate mechanisms of living cells.

Keywords: fluorescence resonance energy transfer, structured illumination, super-resolution, living cells**PACS:** 87.64.M-, 87.64.kv, 42.30.-d**DOI:** 10.7498/aps.72.20230853

^{*} Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 62135003) and the Key-Area Research and Development Program of Guangdong Province, China (Grant No. 2022B0303040003).

[†] Corresponding author. E-mail: chentsh@scnu.edu.cn

双通道结构光照明超分辨定量荧光共振能量转移成像系统

罗泽伟 武戈 陈挚 邓驰楠 万蓉 杨涛 庄正飞 陈同生

Dual-channel structured illumination super-resolution quantitative fluorescence resonance energy transfer imaging

Luo Ze-Wei Wu Ge Chen Zhi Deng Chi-Nan Wan Rong Yang Tao Zhuang Zheng-Fei Chen Tong-Sheng

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 72, 208701 (2023) DOI: 10.7498/aps.72.20230853

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.72.20230853>

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

结构光照明相位/荧光双模式显微技术

Phase/fluorescence dual-mode microscopy imaging based on structured light illumination

物理学报. 2022, 71(24): 244203 <https://doi.org/10.7498/aps.71.20221518>

聚二甲基硅氧烷微流道中光流控荧光共振能量转移激光

Optofluidic fluorescence resonance energy transfer lasing in a polydimethylsiloxane microfluidic channel

物理学报. 2019, 68(5): 054203 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20181696>

基于希尔伯特变换的结构光照明快速三维彩色显微成像方法

Fast structured illumination three-dimensional color microscopic imaging method based on Hilbert-transform

物理学报. 2020, 69(12): 128701 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200352>

平场复用多焦点结构光照明超分辨显微成像

Flat-field multiplexed multifocal structured illumination super-resolution microscopy

物理学报. 2022, 71(4): 048704 <https://doi.org/10.7498/aps.71.20211712>

受激辐射损耗超分辨显微成像系统研究的新进展

New advances in the research of stimulated emission depletion super-resolution microscopy

物理学报. 2020, 69(10): 108702 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200168>

结构光照明技术在二维激光诱导荧光成像去杂散光中的应用

Structured illumination for two-dimensional laser induced fluorescence imaging to eliminate stray light interference

物理学报. 2019, 68(21): 218701 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20190977>