

高定位精度三维动态追踪成像系统研究及应用

李恒^{1,2}, 陈丹妮^{1*}, 于斌¹, 郭宝平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, 广东 深圳 518060;

²深圳大学信息工程学院, 广东 深圳 518060

摘要 在活体细胞内研究其亚细胞结构以及细胞器和分子之间或不同分子之间的相互作用过程是目前生命科学研究的主要挑战, 而发展一种能够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中的分子机制具有重要意义。设计并搭建了基于变形光栅和双螺旋点扩展函数的显微成像系统, 实现了在三维空间内扩展景深和纳米定位功能, 极大地扩展了成像深度。通过模拟分析, 该系统在高定位精度下可实现 12 μm 厚样品的动态探测, 并实现了完整活细胞中动态粒子的实时定位和追踪。

关键词 生物光学; 动态追踪; 定位精度; 景深; 活细胞

中图分类号 Q63; O437

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0307017

Research and Application of Three-Dimensional Dynamic Tracking Imaging System with High Localization Accuracy

Li Heng^{1,2}, Chen Danni¹, Yu Bin¹, Guo Baoping¹

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

²College of Information Engineering, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China

Abstract One major challenge of the life-science research is to study the subcellular structure and the interactions among organelles and molecules or different molecules *in vivo*. To develop a single molecule detection and tracking technology, which can real-time detect multiple biomolecules in living cells, is significant to the study on the molecular mechanism of the life process. We design and establish a microscopy imaging system based on the distorted grating and the double helix point spread function technologies, which can extend the depth of field and reach nano-positioning in three-dimensional space. The simulational results show that the system can achieve dynamic detection the 12 μm -depth sample with high localization accuracy. And the real-time positioning and tracking of dynamic biomolecules in living cells is achieved experimentally.

Key words biotechnology; dynamic tracking; localization accuracy; depth of field; living cell

OCIS codes 170.0110; 170.6900; 180.2520

1 引 言

细胞内外生物大分子间的相互作用是细胞参与生命活动的基础, 只有理解细胞生命过程中分子机制的交互作用才能更深入地了解生命活动的本质^[1]。随着人们对细胞内蛋白质等生物大分子功能

的探索研究, 利用离体表征方式已经无法满足研究需求, 这主要是由于脱离了实际微环境, 细胞检测很难反映细胞内部真实的相互运作的关系, 不利于信息的提取。因此, 对活细胞成像方法的研究是揭秘细胞内分子运转以及亚细胞结构变化必不可少的工具^[2]。

收稿日期: 2017-06-22; 收到修改稿日期: 2017-07-31

基金项目: 国家 973 计划(2012CB825802)、国家自然科学基金(61605127, 61235012, 61178080, 61335001)、广东省自然科学基金(2014A030312008)、深圳市科技计划项目(JCYJ20160308104404452)

作者简介: 李恒(1985—), 男, 博士后, 主要从事荧光超分辨成像方面的研究。E-mail: liheng@email.szu.edu.cn

* 通信联系人。E-mail: dannyc007@163.com

由于细胞内大分子处于纳米级别,因此对于成像的分辨率要求非常高^[3]。目前可用于细胞成像的纳米分辨方法已有多种,比如随机光学重建显微、受激发射损耗显微成像、结构光照明显微成像等^[4-6],这些方法可以将分辨率提高到几十纳米,这对于活细胞成像而言至关重要。而在此基础上,由于其轴向深度不够,扫描时间过长等问题限制了活体细胞的实时监测,因此对于理解活细胞内分子间的交互作用以及分子的动态追踪而言具有很大局限性^[7],由此发展了多种具有轴向分辨能力的方法,如柱面镜散、双焦面成像、双螺旋点扩展函数法、荧光干涉方法等^[8-11],这些方法可以很大程度地提高轴向分辨率,进一步推动了细胞三维成像的发展。

三维成像方法突飞猛进,实现厚度达到 $10\ \mu\text{m}$ 的完整活细胞探测也有了一定的进展,比如基于多焦面衍射光栅方法的多焦面成像(MFM)技术,通过引入一个特殊设计的光学元件—多焦面衍射光栅(MFG)将样品分割为 $N \times N$ 个图像阵列,通常分割为 9 等份,但因此成像范围会缩小,分光后光能利用率太低。而另一种 MFM 方法则是利用多个成像探测器来完成,成本太高,系统过于复杂。因此这些方法不能完全满足现实要求^[12-13]。

为了满足生物学家研究完整细胞内的动态状态以及胞内分子间交互作用的需求,自主设计和搭建了基于双螺旋点扩展函数(DH-PSF)与变形光栅 DG 相结合的三维动态追踪荧光成像 DDC-FT 系统。该方法利用双螺旋点扩展函数的三维纳米定位能力以及变形光栅扩展景深的能力,不需要扫描层析即可实时获取轴向 $12\ \mu\text{m}$ 深度的动态分子的三维空间信息,该精度在目前的成像系统当中都是非常少见的。

2 DDC-FT 系统原理

双螺旋点扩展函数基于自成成像原理,通过拉盖尔-高斯(LG)模式的特定排序叠加所获得,具有随轴发生连续旋转且模式不变的特性^[14-15]。该函数利用相位变换将点扩展函数变换成两个围绕光轴旋转的旁瓣,通过旁瓣的旋转角度和相对位置信息计算得到相应的三维位置信息,使得三维成像具有纳米级的定位能力^[16-18]。

而变形光栅^[19-20]本质上就是离轴的二元菲涅耳波带片,它同时具有普通光栅的分光效果以及菲涅耳波带片聚焦的能力,使得入射光发生衍射后按

照不同衍射级分束传播和聚焦,将不同轴向深度的信息进行分割后同时并行成像到同一个像面,具有扩展景深的能力。

通过将上述方法进行相位函数级联和优化,获得了同时具有 DH-PSF 和 DG 功能的复合型相位函数,即 $\varphi = \varphi_{\text{DG}} + \varphi_{\text{DH}}$,所形成的相位模式具有 DH-PSF 和 DG 的双重特性,即同时具有 DH-PSF 三维纳米定位的能力和 DG 扩展景深的能力。前期工作中已经实现了该相位模板的理论设计与研制^[16,21-23]。按照具体的成像深度进行设计,其中 DH-PSF 的三维成像范围设定为 $4\ \mu\text{m}$;结合变形光栅,将厚样品按照 0 级和 ± 1 级衍射级次分层,并同时成像于同一个像面上的不同横向位置,成像系统的有效景深扩展至传统的 3 倍,每一个级次经过 DH-PSF 效应实现高精度定位,最终形成具有 $12\ \mu\text{m}$ 成像深度的高精度探测,如图 1 所示。

利用所制备的复合相位片搭建成像系统,其设计参数如下:成像系统通过 Olympus $81\times$ 显微镜实现,其中浸油物镜数值孔径为 1.4,放大倍数为 100;激发光波长为 $488\ \text{nm}$ 。激光光束经过扩束准直光路后由物镜激发样品产生荧光,由物镜收集后经过管镜 TL2(焦距 $f_{\text{TL2}} = 180\ \text{mm}$),然后再通过一组 $4f$ 系统,其中复合型相位片放置于傅里叶面位置,最终信号经过 $4f$ 系统成像到探测器(EMCCD)(DU897, Andor 公司,美国)上,如图 1(a)所示。其中图 1(c)所示为 $12\ \mu\text{m}$ 成像深度下的荧光微球成像结果,按照变形光栅的分层形成三级次并行显示 $4\ \mu\text{m}$ 成像空间,每一个级次利用 DH-PSF 获得三维空间定位。

首先对系统进行标定以获得该系统的定位精度信息。利用 $100\ \text{nm}$ 荧光微球(T8872, ThermoFisher 公司,美国)作为标准具进行标定实验,激发光波长为 $488\ \text{nm}$,发射光波长为 $560\ \text{nm}$,发射谱宽为 $30\ \text{nm}$,探测器曝光时间为 $30\ \text{ms}$,增益为 10。将三维纳米位移台固定在显微镜载物台上,荧光微球通过纳米位移台进行高精度位移,同时纳米位移台与探测器相结合,通过位移台的步进触发探测器进行曝光采集,如图 1(c)所示。每一个步进位置采集 100 幅,步进量设定为 $100\ \text{nm}$,由此得到不同级次上的荧光信号。步进量与荧光微球成像所形成的双螺旋点的旋转角度一一对应,通过拟合可以获得轴向位置与角度相应的标定曲线,如图 1(d)所示。

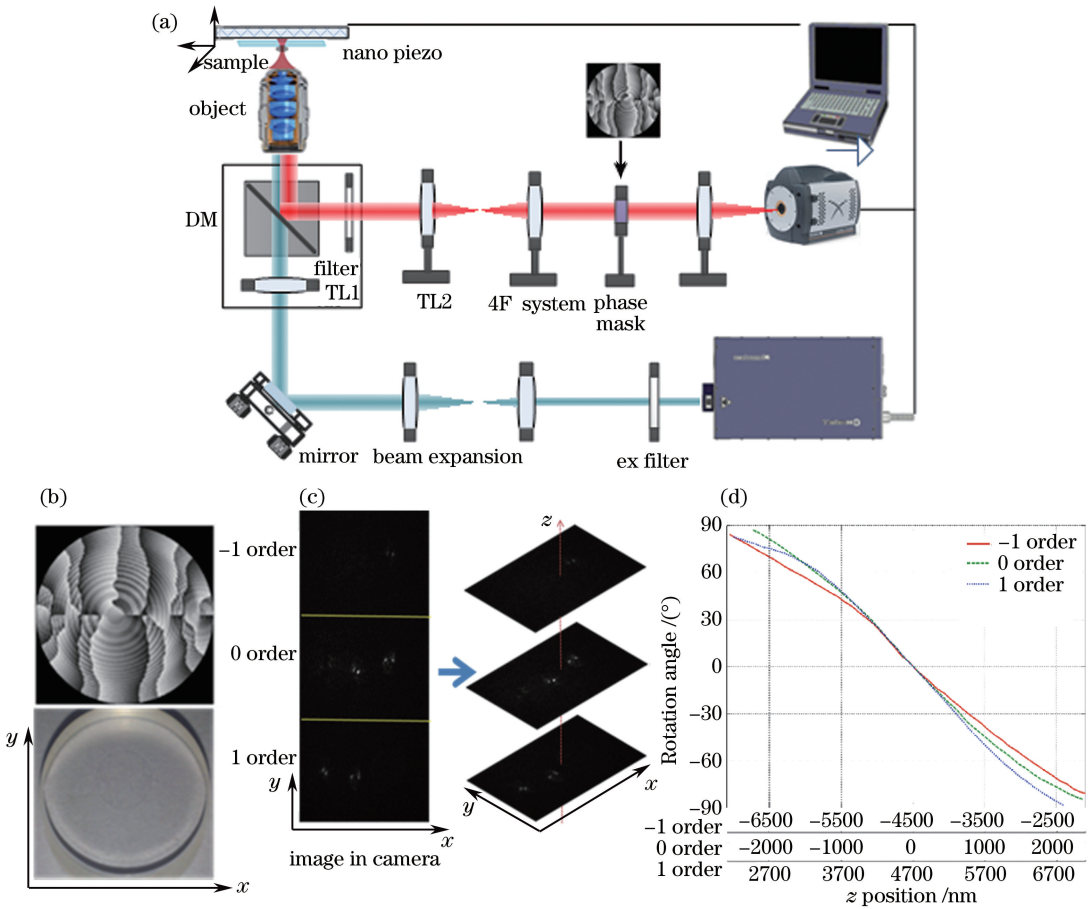


图 1 (a) DDC-FT 动态追踪成像系统图; (b) 复合相位片模拟结果及光刻制版结果; (c) 荧光微球成像显示图; (d) 不同级次下荧光信号经过系统形成的双螺旋点旋转角度随 z 轴连续移动的对应该曲线

Fig. 1 (a) Schematic diagram of DDC-FT system; (b) simulational image of the composite phase plate and image of photolithography plate; (c) images of fluo-spheres; (d) calibration curves of DH-PSF rotating angle versus the depth of the sample for the 0th and the ± 1 st diffraction orders

相同曝光条件下,同时不同级次中各轴向位置处 (x, y, z) 所对应的定位精度如图 2 所示,在 30 ms 曝光时间下,荧光微球移动到 0 级和 ± 1 级空间旋转角度为 0 级位置处时总光子数分别为 4100 和 3500。0 级位置的精度要高于 ± 1 级,这是由于变形光栅的衍射效率所引起。计算得到所对应级次的平均定位精度

(单位为 nm) 分别为 $\sigma_{-1st}(x, y, z) = (6.5, 9.2, 23.4)$, $\sigma_{0th}(x, y, z) = (3.7, 2.8, 10.3)$, $\sigma_{+1st}(x, y, z) = (5.8, 6.9, 18.4)$ 。当 0 级总光子数降低到 1000 时,0 级位置的定位精度分别会降低到 $(20, 28, 48)$ 。系统定位精度和理论定位精度之间的差异,主要来自样品台在成像过程中的微小漂移及系统噪声。

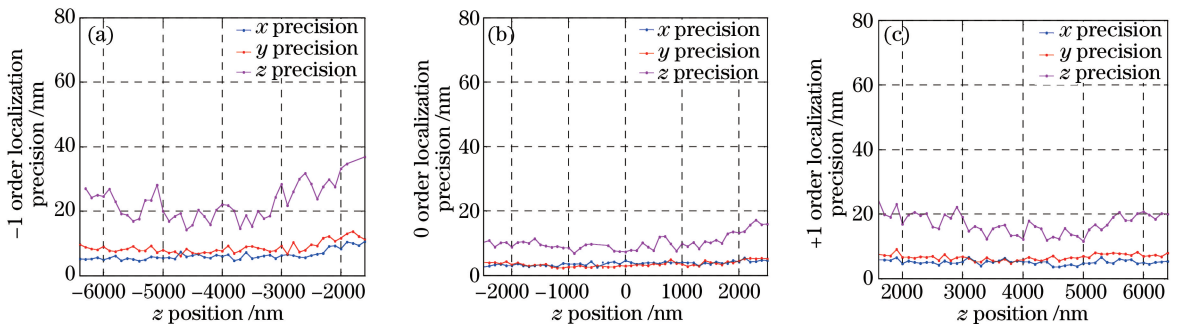


图 2 DDC-FT 系统定位精度标定

Fig. 2 Localization precision calibration of DDC-FT system

为进一步验证成像方法适用于动态追踪实验,利用三维纳米位移台设计追踪模型,验证动态追踪的精确度。同样利用 100 nm 荧光微球作为样品并固定,以纳米位移台为载体,通过程序写入既定轨迹曲线控制纳米位移台,进而带动荧光微球按照指定轨迹移动,同时进行步进相机的采集。纳米位移台的移动轨迹按照直角坐标系定义参数 $\{100t, 100t, 100t\}$, 步进起始位置需通过双螺旋图像来确定,因此对纳米位移台 (x, y, z) 总步进量的设置需要大于成像范围,程序设定为 $14 \mu\text{m}$, 样品随位移台移动,时间 t 随相机的采集频率而定。为了避免纳米位移台步进中发生抖动引起采集数据产生偏差,每一组步进位置采集 5 幅,以中间数据作为结果,得到不同时序的动态图像,如图 3 所

示。图 3(a)所示为不同时序下荧光微球采集图像,上排为样品在 -1 级次位置处的运动轨迹,随三轴方向逐步移动, x, y 为平面运动, z 轴由图像显示为双螺旋形式。荧光微球在 -1 级移动 $4 \mu\text{m}$ 量程时双螺旋点旋转 180° ,继而在 0 级位置显示,依次旋转 180° 后在 1 级位置显示并移动,整个过程通过相机同步记录和存储。采集数据处理结果如图 3(b)和图 3(c)所示,其中红色线条表示样品台轨迹移动的原始路线,蓝色点表示荧光微球沿轨迹移动获得图像并重构后所得到的结果。计算结果显示与既定轨迹匹配,标准差为 $0.014 \mu\text{m}$,成像深度满足理论计算的 $12 \mu\text{m}$ 轴向范围。该实验验证了系统的准确性,证明了能够将其用于实际的活细胞动态追踪实验中。

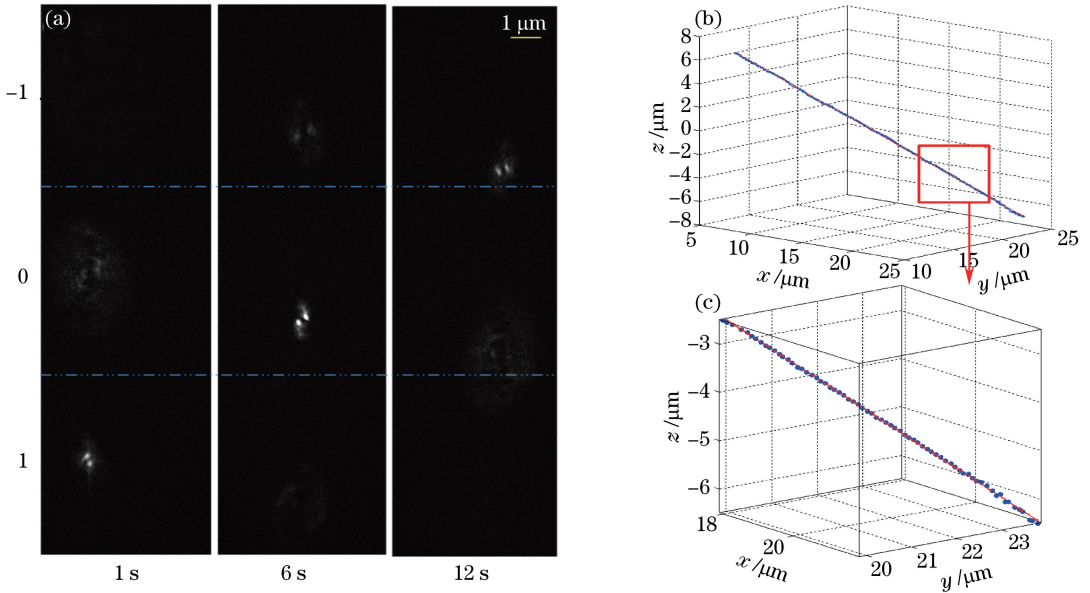


图 3 荧光微球移动轨迹。(a)不同时刻的采集图像;(b)荧光微球的程序给定轨迹和实际轨迹;(c)截取轨迹部分的图像对比

Fig. 3 Track of the fluo-spheres. (a) Images captured at different time; (b) tracks of the fluo-spheres (the designed track is red and the captured track is blue); (c) zoom in the red box area in Fig. (b)

3 实验结果

根据上述结果将系统应用于活细胞的实时监测当中。实验对象为巨噬细胞。巨噬细胞属于免疫细胞,具有免疫调节的作用,可通过吞噬杀灭微生物。当细胞遇到外源异物时所触发的生物信号能使其在异物局部形成板状伪足将其包围,巨噬细胞表面膜发生内陷,可摄入异物到细胞后形成吞噬体,在动力蛋白作用下吞噬体与溶酶体靠近并融合,异物在胞内被杀灭和分解,而最终不能消化的病原或者异物则通过胞吐作用被排出胞外。实验将通过动态系统实时观测巨噬细胞的吞噬过程。

实验系统以倒置荧光显微镜 (IX81, OLYMPUS 公司, 日本) 为基础,物镜放大倍率为 100,数值孔径为 1.4;激发波长为 488 nm,发射波长为 560 nm;探测器采用 EMCCD,其有效像元大小为 $16 \mu\text{m}$,制冷温度为 -80°C 。源图像采集时,单幅曝光时间为 40 ms,使用 40 nm 荧光微球作为标记物来观察巨噬细胞的吞噬过程。为了精确控制荧光微球的吞噬时间,采用温控方式改变细胞的活性,先在 10°C 下让细胞处于休眠状态,将稀释的荧光微球加入培养液让其布朗扩散,微球贴附在细胞上又不发生吞噬,细胞冷却 5 min 后换液,去除培养液悬浮的荧光微球,重新加入培养液后成像,成像过程中样

品台保持 37 °C,以保证细胞的活性状态,每个细胞成像时间约 20 min。

DDC-FT 系统的成像结果如图 4 所示。图 4(a)图像是白光照明下巨噬细胞的轮廓,说明细胞状态良好;图 4(b)是暗场情况下巨噬细胞的荧光图像,此时荧光分子被激发后成像,并按照不同的成像深度同时显示在探测器的不同区域,由图像可以看出在不同的轴向范围内均有荧光分子发光;图 4(c)即为探测器采集 1000 幅图像后重构得到的三维轨迹图,采集时间为 3 min,将重构后的荧光分子坐标位置按照时序进行标注,得到不同时序下荧光分子的轨迹路线;在图 4(b)中用箭头指示不同位置处

的荧光微球,与图 4(c)对应颜色箭头所指示的轨迹一一对应,其中用黄色框图框出红色箭头标记的荧光微球进行放大,经过图像处理得到该微球的大范围运动轨迹,如图 4(d)所示,能够清晰查看到该荧光微球的运动情况,通过数据分析得到荧光微球在细胞内的平均运动速率为 $1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$,最大速率为 $3 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ 。从实验结果不难看出,显微成像系统实现了将 3 个不同深度的空间信息同时呈现在同一平面上,每个平面具有 $4 \mu\text{m}$ 景深的成像深度,结合变形光栅景深达到 $12 \mu\text{m}$ 。该系统成功实现了活细胞内的三维纳米精度的分子追踪,为研究厚样品三维纳米精度的单粒子追踪和定位提供了便利条件。

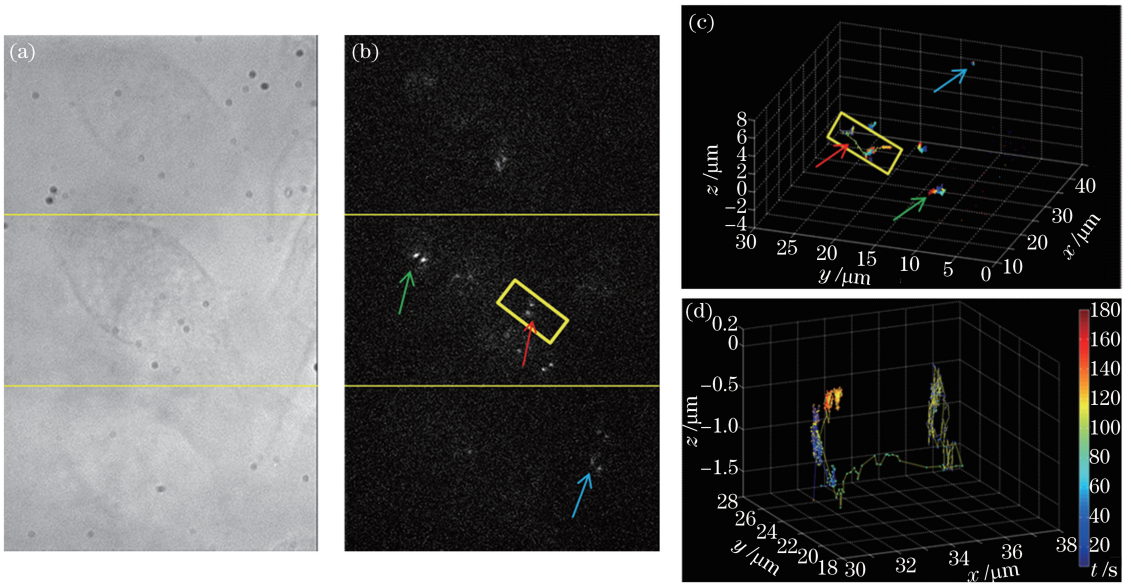


图 4 巨噬细胞的动态追踪成像。(a)白光照明下巨噬细胞的轮廓;(b)暗场情况下巨噬细胞的荧光图像;(c)重构得到的三维轨迹图;(d)放大(c)黄色方框

Fig. 4 Dynamic tracking of macrophage. (a) Profile of macrophage under white light illumination; (b) fluorescent image of macrophage; (c) dynamic tracking reconstruction of fluo-spheres; (d) zoom in the yellow box area in Fig. (c)

4 结 论

设计具有高定位精度的三维动态追踪成像系统来实现目前暂未解决的全细胞内多粒子动态追踪的问题。利用双螺旋点扩展函数的三维纳米定位能力实现 $4 \mu\text{m}$ 的三维小范围空间的高精度定位,同时结合变形光栅的分层成像方式,能够将成像深度扩展到 3 倍即达到 $12 \mu\text{m}$ 的成像深度,能够实现完整细胞内荧光分子的动态追踪探测。通过实验验证了系统的定位精度以及所能达到的成像深度,与理论设计相吻合,验证了该方法的可行性;同时初步对巨噬细胞内吞行为进行动态追踪成像,利用荧光微球实现在细胞内的动态捕捉,并最终利用重构算法获得

在细胞内粒子的运动轨迹以及在细胞内的动态细节,数据分析可以获取荧光微球在细胞内的运动速率以及运动量,对研究细胞内部作用关系的变化差异、细胞衰老等问题提供便利的手段,为研究其他各项生命活动和癌细胞的药理研究等工作奠定一定基础。

参 考 文 献

- [1] Tuan V D, Barry R M. Biomedical photonics handbook[J]. Journal of Biomedical Optics, 2004, 9 (5): 1110-1111.
- [2] Xie X S, Yu J, Yang W Y. Perspective - living cells as test tubes [J]. Science, 2006, 312 (5771): 228-230.
- [3] Ober R J, Ram S, Ward E S. Localization accuracy

- in single-molecule microscopy [J]. *Biophysical Journal*, 2004, 86(2): 1185-1200.
- [4] 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.
- [5] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-795.
- [6] Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy [J]. *Journal of Microscopy-Oxford*, 2000, 198(2): 82-87.
- [7] Dupont A, Lamb D C. Nanoscale three-dimensional single particle tracking[J]. *Nanoscale*, 2011, 3(11): 4532-4541.
- [8] Huang B, Wang W Q, Bates M, *et al.* Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy[J]. *Science*, 2008, 319(5864): 810-813.
- [9] Juette M F, Gould T J, Lessard M D, *et al.* Three-dimensional sub - 100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples [J]. *Nature Methods*, 2008, 5(6): 527-529.
- [10] Shtengel G, Galbraith J A, Galbraith C G, *et al.* Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, 2009, 106(9): 3125-3130.
- [11] sri Pavani R P, Piestun R, Thompson M A, *et al.* Three-dimensional super-resolution imaging with a double-helix microscope [J]. *Proceedings of 2009 Optical Society of America*, 2009: NMA5.
- [12] Ram S, Kim D, Ober R J, *et al.* 3D single molecule tracking with multifocal plane microscopy reveals rapid intercellular transferrin transport at epithelial cell barriers[J]. *Biophysical Journal*, 2012, 103(7): 1594-1603.
- [13] Abrahamsson S, Chen J J, Hajj B, *et al.* Fast multicolor 3D imaging using aberration-corrected multifocus microscopy[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(1): 60-80.
- [14] Piestun R, Schechner Y Y, Shamir J. Propagation-invariant wave fields with finite energy[J]. *Journal of the Optical Society of American A-Optics Image Science and Vision*, 2000, 17(2): 294-303.
- [15] Schechner Y Y, Piestun R, Shamir S. Wave propagation with rotating intensity distributions[J]. *Physical Review E*, 1996, 54(1): R50-R53.
- [16] Li H, Yu B, Chen D N, *et al.* Design and experimental demonstration of high-efficiency double-helix point spread function phase plate [J]. *Acta Physica Sinica*, 2013, 62(12): 124201.
李恒, 于斌, 陈丹妮, 等. 高效双螺旋点扩展函数相位片的设计与实验研究 [J]. *物理学报*, 2013, 62(12): 124201.
- [17] sri Pavani R P, Piestun R. High-efficiency rotating point spread functions[J]. *Optics Express*, 2008, 16(5): 3484-3489.
- [18] Grover G, Quirin S, Fiedler C, *et al.* Photon efficient double-helix PSF microscopy with application to 3D photo-activation localization imaging [J]. *Biomedical Optics Exoress*, 2011, 2(11): 3010-3020.
- [19] Blanchard P M, Greenaway A H. Simultaneous multiplane imaging with a distorted diffraction grating[J]. *Applied Optics*, 1999, 38(32): 6692-6699.
- [20] Blanchard P M, Fisher D J, Woods S C, *et al.* Phase-diversity wave-front sensing with a distorted diffraction grating [J]. *Applied Optics*. 2000, 39(35): 6649-6655.
- [21] Yu B, Li H, Chen D N, *et al.* Design, fabrication, and experimental demonstration of a diffractive optical element with long depth of field for nanoscale three-dimensional multi-molecule tracking [J]. *Acta Physina Sinica*, 2013, 62(15): 154206.
于斌, 李恒, 陈丹妮, 等. 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 [J]. *物理学报*, 2013, 62(15): 154206.
- [22] Chen D N, Yu B, Li H, *et al.* Approach to multiparticle parallel tracking in thick samples with three-dimensional nanoresolution[J]. *Optics Letters*, 2013, 38(19): 3712-3715.
- [23] Li H, Chen D N, Xu G X, *et al.* Three dimensional multi-molecule tracking in thick samples with extended depth-of-field [J]. *Optics Express*, 2015, 23(2): 787-794.