

基于近场光纤探针的活细胞无损测温方法研究

李韶颖*, 陈娜*, 刘真民, 陈振宜, 刘书朋, 商娅娜, 王廷云

上海大学通信与信息工程学院, 特种光纤与光接入网重点实验室, 特种光纤与先进通信国际合作联合实验室, 上海 200444

摘要 高精度的单细胞温度分布检测对于研究生命活动具有重要意义。为了实现高空间分辨率、高温度灵敏度的细胞测温,本研究团队基于原子力显微镜的扫描成像原理,将对温度敏感的量子点与音叉驱动的近场光纤探针相结合,提出了一种无损伤测量活细胞表面温度分布的方法;并以人脑星形胶质母细胞瘤细胞为研究对象,利用该方法检测了吞金纳米颗粒的固定细胞和未内吞金纳米颗粒的活细胞的温度分布。结果表明:在无金纳米颗粒作为附加热源的情况下,由活细胞内部产热引起的细胞表面最大温差超过 $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$,而细胞与其外部环境间的温差大于 $2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。所提活细胞无损测温方法的空间分辨率小于 $0.2\text{ }\mu\text{m}$,温度分辨率为 $0.16\text{ nm}/^{\circ}\text{C}$,为活细胞温度分布成像提供了新思路。

关键词 生物光学; 光纤传感器; 近场光纤探针; 量子点; 测温; 活细胞

中图分类号 TN253 **文献标志码** A

doi: 10.3788/CJL202249.0307002

1 引言

温度是反映生物自身机能的一项基本物理参数。细胞作为生命体结构和功能的最基本单元,其每一次温度变化都表示细胞内部进行着产生或消耗能量的生命活动。在真核细胞中,线粒体及植物中的叶绿体负责产生细胞能量^[1-3],并释放热量。当细胞受到外界的强刺激时就会出现应激反应,细胞的温度就会发生特异性变化^[4-5]。此外,与非肿瘤细胞相比,肿瘤细胞具有更高的新陈代谢,温度普遍较高,所以温度也是判断肿瘤细胞恶性程度的重要依据^[6]。因此,在微纳米尺度下对单细胞的在体温度进行检测,对于全面理解生命活动机制具有重要意义。

现有的细胞测温方法可以分为光学测温与非光学测温两大类。非光学测温方法通常使用电信号反馈温度信息。以热电偶为例,其探头由两种不同性质的导体或半导体相互接触构成闭合回路,因此在温度变化时可以得到塞贝克电势^[7]。热电偶的主要材料包括硅^[8]、钨^[9]、铂^[9]、钽^[10]等,探头尺寸多在

微米级别。使用热电偶进行细胞测温时,需要将热电偶刺入细胞内部,这一操作会对细胞造成不可逆转的损伤,影响细胞的正常生理功能,而且常规热电偶只能单点测温,不具有测量温度分布的功能。扫描热场显微镜(SThM)依赖于原子力显微镜(AFM)的成像模式,弥补了常规热电偶单点测温的不足,而且SThM将原有硅基探针替换为具有温度敏感特性的微纳米级别热电偶探针。与常规热电偶相比,SThM探针尺寸更小,具有更高的空间分辨率。此外,SThM探针与样品间距可由分子间作用力反馈得到,通过压电传感器进行控制,探针能够在不损坏样品的情况下扫描,实现温度分布成像^[11]。但是这类基于电信号的细胞测温方法在液体环境中会受到较大的噪声干扰,从而降低了测量精度。因此,尽管SThM能够实现高空间分辨率的无损温度成像,但其在生物领域更多地被用于检测蛋白质^[12]、植物细胞^[13]、灭活的动物细胞^[14]等,在活细胞检测方面的应用较少。与电信号测温方法相比,光学测温方法具有噪声干扰更小的优势。用于细胞测温的光学方法以荧光测温为主,发光分子通过胞

收稿日期: 2021-04-15; 修回日期: 2021-05-26; 录用日期: 2021-06-21

基金项目: 国家自然科学基金(62027818)、高等学校学科创新引智计划(111)资助项目(D20031)

通信作者: *na.chen@shu.edu.cn

吞等过程进入细胞内部,温度变化使其荧光寿命、荧光光谱等随之改变。常用发光物质包括有机荧光团^[15-17]、金属配合物^[18-21]、大分子(聚合物^[22]、荧光蛋白^[23]、DNA^[24])、量子点^[25-26]等。虽然荧光测温方法不会破坏细胞的基本结构,但发光分子进入细胞后对细胞生理活动的影响依然无法忽视。例如,与其他发光分子相比,量子点具有更优越的光稳定性,但其在细胞内部释放的毒性物质会影响细胞功能,甚至导致细胞丧失活性。因此,在不影响细胞正常生理状态的前提下,寻找高精度、高空间分辨率的测温方法,成为细胞温度研究的重点。

针对以上问题,本研究团队提出了一种基于量子点近场光纤探针的细胞测温方法。该方法将锥形光纤探针与具有温度特性的 CdSe 量子点相结合,得到了可用于扫描探针显微镜(SPM)的近场光学测温探针。这一方法能够突破远场光学的衍射极限,实现基于近场光学技术的高空间分辨率温度分布检测。同时,CdSe 量子点的温度传感特性决定了这一方法的高温度灵敏度。本文提出的近场光纤测温探针在原子力反馈的驱动下靠近细胞表面,探针针尖处的量子点通过与细胞热交换来测量细胞表面的温度信息。近场光纤测温探针收集包含温度信息的量子点荧光光谱,对光谱进行解调即可得到细胞温度。采用压电传感器控制的样品台可以实现探针与细胞表面恒间距扫描,进而实现无损细胞检测。本研究团队使用该探针对活体人脑星形胶质母细胞瘤(U87MG)细胞进行了温度分布测量实验,实现了对活细胞高温

灵敏度、高空间分辨率的无损温度成像。

2 实验系统与方法

2.1 工作原理

传统的光学显微镜能够探测远场光学信号,探测物体与被测物体之间的距离通常远大于照明波长。受衍射极限限制,传统光学显微镜能够实现的光学分辨率总是大于波长的一半^[27]。扫描近场光学显微镜(SNOM)将纳米探针与样品表面的距离缩短至纳米尺度,探针与样品表面的隐失场相互作用产生携带样品亚波长结构信息的传播场,进而被远场收集。SNOM 探针包括孔径型探针和散射型探针等。近场光纤探针是一种典型的孔径型探针,它既可以使激发光从孔径出射后激发样品,又可以收集近场光信号并将其传输至探测器。实验中,本研究团队使用孔径型近场光纤探针传输激发光并同时收集背向散射光。如图 1(a)所示,激光器出射的激光经过空间耦合,进入近场光纤探针尾端,沿光纤传输至探针尖端出射。之后,包含温度信息的荧光信号被探针尖端收集并在光纤中传输,经过空间耦合进入光谱仪,得到荧光光谱。与 AFM 原理相似,SNOM 探针通过针尖与样品表面的作用力控制两者的间距。孔径型探针粘在石英晶体音叉上,通过剪切力测控探针与样品的间距。在扫描过程中,探针随样品表面起伏,与样品发生热交换,但不会损坏样品。图 1(a)插图展示了 100 倍物镜下,锥形光纤探针针尖的光学显微图像。

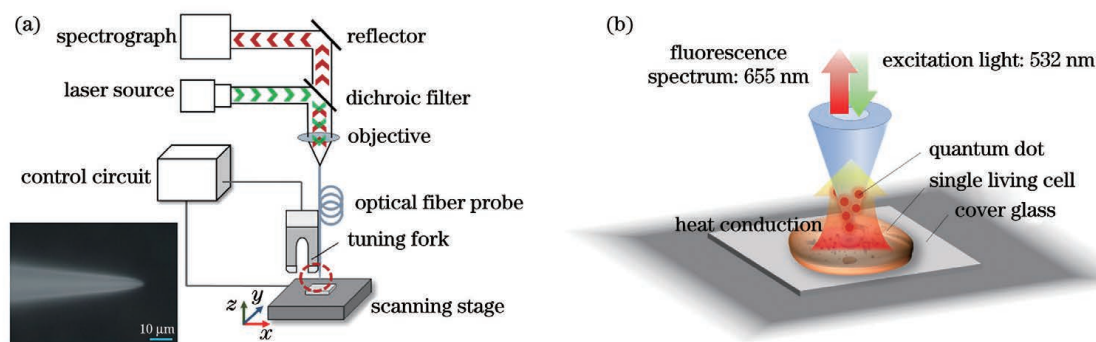


图 1 近场光纤探针测温系统。(a)整体系统图,插图为 100 倍物镜下探针的显微图像;(b)局部示意图

Fig. 1 Near-field optical fiber probe temperature measuring system. (a) Entire system, the inset is a micrograph of a probe with a 100 \times objective lens; (b) local sketch

为了使近场光纤探针具备测温能力,本研究团队将 CdSe 量子点与近场光纤探针相结合。量子点是被广泛应用于细胞测温的发光分子,当温度升高时,量子点会发生晶格膨胀,改变电子与晶格的相互作用,进而改变其荧光光谱。如图 1(b)所示,量子

点被涂覆在近场光纤探针针尖表面,并被探针针尖出射的激光激发,其受激产生的荧光被探针收集,并传输至光谱仪。随着样品中的热量传导至探针,探针表面的量子点响应温度的变化,进而荧光光谱发生变化。因此,可以通过解调荧光光谱得到温度

信息。

2.2 近场光纤测温探针的制备

近场光纤测温探针由光纤熔融拉锥结合化学自组装方法制备得到^[28]。首先,利用以二氧化碳激光为热源的激光微电极拉制仪(P-2000/F 型)将多模光纤局部加热至熔融状态,在熔融光纤表面张力以及光纤纵向拉力的作用下,光纤断开,并在末端形成锥形探针。为了获得高精度的样品局域温度,量子点应低密度地均匀分布在探针针尖尖端位置。因此,选择使用化学自组装方法在锥形探针针尖偶联量子点。先用食人鱼溶液处理锥形光纤探针,使其表面携带负电荷;然后使用 5% APTMS(3-氨丙基三甲基硅氧烷,硅烷偶联剂)处理探针,使光纤表面重新带上一层正电荷。这些正电荷将量子点吸附到锥形光纤探针针尖表面,从而保证量子点均匀分布;最后,将探针与音叉结合,得到能够趋近至样品表面微纳米区域的近场光纤测温探针。

2.3 细胞样品的制备

使用所提方法检测了两类细胞样品——内吞金纳米颗粒的固定细胞贴片和不含金纳米颗粒的活细胞贴片。U87MG 细胞使用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素溶液的 DMEM 培养液进行培养,培养环境为 37 °C,培养箱是含 CO₂ 体积分数为 5% 的恒温培养箱。细胞汇合度达到 80% 后,进行细胞传代。实验前,所有实验器材均采用紫外线消毒 1 h。将旧培养液吸出,使用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次;加入 0.25% 胰蛋白酶使细胞悬浮,加入培养基使细胞终止消化;将细胞悬浮液在室温下离心 5 min,转速为 1000 r/min;将上清液吸出,加入新鲜培养基重悬细胞,并按 1:3 比例传代。制备细胞贴片样品时需要将盖玻片放置在重悬后的细胞液中,使细胞在盖玻片上贴壁生长。制备活细胞贴片样品时,将细胞贴片从培养皿中取出,使用 PBS 冲洗后即可进行检测。在制备内吞金纳米颗粒的固定细胞贴片时,使用氯金酸和柠檬酸三钠制备得到金溶胶^[29],离心后得到浓缩金溶液;U87MG 细胞传代后,将浓缩金溶液加入到细胞悬浮液中,金纳米颗粒通过胞吞作用进入细胞;24 h 之后,用 PBS 冲洗掉培养基和细胞外的金纳米颗粒,然后将细胞浸入体积分数为 4% 的多聚甲醛溶液中进行固定。

2.4 实验条件及参数

本文提出的近场光纤测温探针系统是基于 HORIBA 公司的 AFM-Raman(AFM-HR Evolution) 仪器搭建的。通过显微镜的光学物镜(20×,数值孔

径为 0.4),将激光从近场光纤测温探针尾端耦合至光纤。制备锥形光纤探针的多模光纤的直径为 50 μm/125 μm,数值孔径为 0.22。由于使用的 CdSe 量子点(Life Technologies 公司)的中心波长为 655 nm,因此选择波长为 532 nm 的激发光,激光器的最大出光功率为 23 mW。在测温过程中,为了避免激光加热的干扰,使用了透过率为 0.01% 的衰减滤光片,此时物镜耦合进光纤的光功率为 2.3 μW。实验中选择了 600 line/mm 的光栅,其对应的光谱分辨率为 0.05 nm。在样品扫描成像过程中,单点光谱的曝光时间设置为 0.5 s,以获得高信噪比的荧光光谱。

3 实验结果与讨论

3.1 近场光纤测温探针的温度标定

将本文提出的量子点近场光纤测温探针用作生物细胞温度传感器时,首先需要确定其温度特性,即通过温度标定,确定探针的荧光光谱与温度之间的关系。在本文使用的温度标定系统中,将近场光纤测温探针与标准热电偶密封在同一空气域中,以保证探针与热电偶处在同一温度场下,利用水浴加热的方法控制温度的变化。不同温度下近场光纤测温探针收集的荧光光谱如图 2(a)所示。

室温下,波长为 532 nm 的激光激发出的 CdSe 量子点荧光光谱的中心波长在 655.1 nm 处;随着温度升高,CdSe 量子点纳米晶体发生晶格膨胀,改变了电子与晶格的相互作用,导致荧光光谱发生红移,荧光峰强度下降^[30]。由于近场荧光信号的峰强除了与样品温度相关外,样品表面的反射率同样会对其产生影响,因此,本文重点关注量子点的荧光峰位与温度的关系。为了获得荧光信号的光谱峰位,需要将原始信号去噪并进行高斯拟合,拟合后的数据峰值确定为荧光峰值。标定结果如图 2(b)所示。离散点为不同温度下的荧光峰位,将这些离散点用最小二乘法进行线性拟合,得到的拟合曲线如图 2(b)中的直线所示,线性拟合方程为 $\lambda = 656.4408 + 0.1626 \times T$,其中 λ 为荧光光谱的峰位(nm), T 为温度(°C),拟合优度为 0.9943。在小于 70 °C 的温度环境下,近场光纤测温探针的荧光峰位与温度保持着良好的线性关系。线性拟合方程的斜率(即探针的温度灵敏度)为 0.16 nm/°C。实验中使用的光谱分辨率为 0.05 nm,因此,理论上探针能够检测的最低温差为 0.3 °C。

在以往的报道中,以 CdSe 量子点的荧光峰位

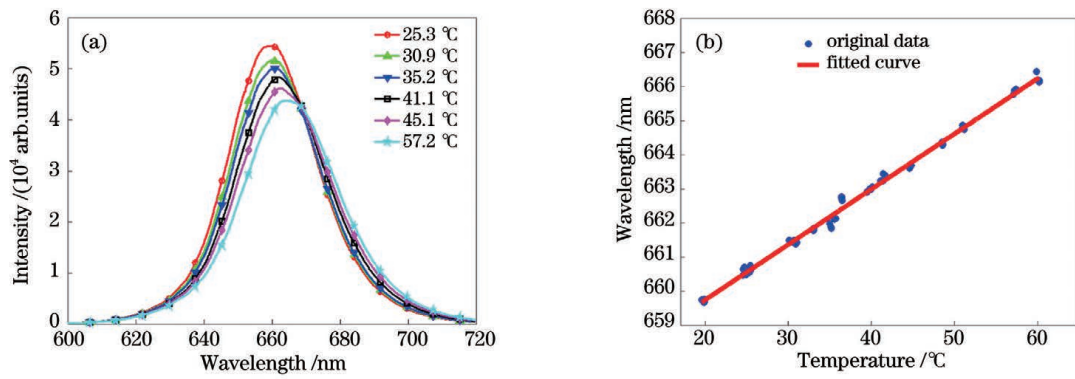


图 2 近场光纤测温探针采集的温度特性。(a)不同温度下探针采集的荧光光谱;(b)荧光峰位与温度的拟合结果

Fig. 2 Temperature characteristics of near-field optical fiber temperature probe. (a) Fluorescence spectra collected by the probe at different temperatures; (b) fitted result of fluorescence peak position and temperature

表征温度的方法较为常用,但这一方法得到的温度灵敏度并不相同,如:陈振宜等^[31]基于 CdSe 量子点偶联羟基磷灰石纳米颗粒进行测量的温度灵敏度为 0.09 nm/°C, Li 等^[32]将 CdSe 量子点涂覆在电子器件上进行测量的单量子点的温度灵敏度为 0.105 nm/°C, Pugh-Thomas 等^[33]将 CdSe(ZnS)量子点置于 SiO₂ 基质内进行测量的温度灵敏度为 0.11 nm/°C。实际上,除了量子点的尺寸、结构等因素外,量子点所在的基质也会影响其发光特性^[34],进而影响测量的温度灵敏度。细胞是一种复杂的结构体,量子点进入细胞后会被不同成分、结构的大分子包覆,因此其所在的生物环境同样会影响其发光特性。将发光分子作为纳米温度计引入细胞内部,这种细胞温度分布检测的方法需要考虑上述因素对荧光与温度之间关系的影响,以还原细胞真实的温度分布。对于本文提出的基于近场光纤探针的测温方法,量子点被固定在近场光纤探针表面,在温度成像过程中,当近场光纤测温探针扫描样品表面时,探针在反馈电路

控制下不会刺破细胞膜,并能保证 CdSe 量子点作用在细胞表面,不会与细胞内的分子发生化学反应并释放 Cd²⁺ 等有毒物质^[35],同时避免了不同基质对量子点荧光温度特性的影响。

3.2 吞金固定细胞的温度检测

单细胞作为一种复杂的生命结构体,其内部温度分布尚不明确。在确定量子点近场光纤测温探针的温度灵敏度后,为了证明探针研究温度分布的能力,在对活细胞进行检测之前,先对内吞金纳米颗粒的固定细胞进行了温度分布成像。固定后的细胞样品由于失去了活性,不应存在明显的温度分布。但预先胞吞了金纳米颗粒的细胞被固定之后,在激光的作用下,其内部的金颗粒因对激光具有强吸收效应而成为局部热源,从而在固定细胞内部产生稳定的梯度温度场。样品扫描范围为 30 μm × 30 μm, AFM 的采样点数为 300 × 300, 光谱的采样点数为 30 × 30。图 3 展示了内吞金纳米颗粒细胞样品的扫描成像结果。图 3(a)为细胞形貌图,左下角插图为

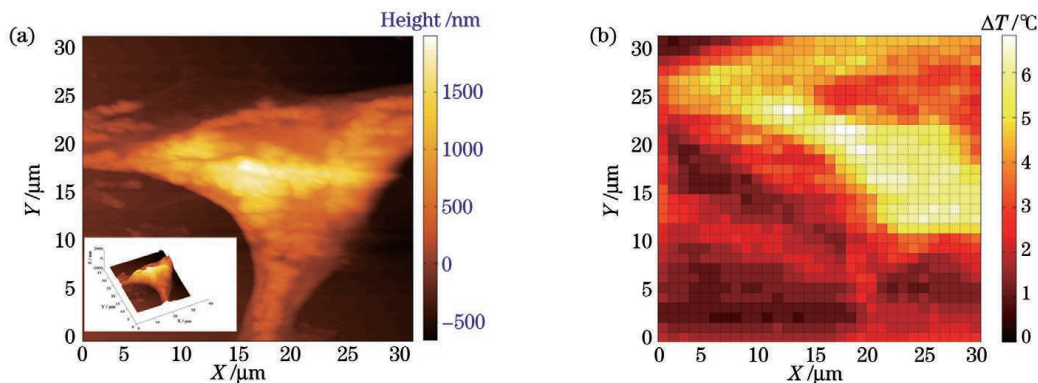


图 3 细胞内吞金纳米颗粒并固定后的测温结果。(a)单细胞形貌图,插图为对应的三维结果;(b)细胞样品内部的温差分布

Fig. 3 Temperature measurement results after the cells containing gold nanoparticles were immobilized. (a) Single cell topographic map, illustrated with corresponding three-dimensional results; (b) temperature difference distribution within the cell sample

对应的三维形貌。图像中较亮的部分为高度更大的区域。由于金的毒性较小,金纳米颗粒进入细胞内部后,短时间内不会影响细胞的活性。根据 AFM 的结果,使用多聚甲醛固定之前,细胞依然维持其基本形态。细胞表面的起伏表征了固定后的细胞膜上的大分子形态,图像中间更高区域对应细胞核所在位置。Shukla 等^[36]使用悬臂梁式 AFM 探针检测到了相似的细胞特征,与本研究结果相互验证。本文方法的 AFM 空间分辨率($<100\text{ nm}$)取决于近场光纤测温探针针尖的曲率半径。

近场光纤测温探针出射的激光激发细胞内部聚集的金纳米颗粒,由于等离子体共振效应,金纳米颗粒吸收光子后会产生一个强吸收峰,并将光能迅速转化为热能,从而在细胞内部以及细胞与周围环境之间产生温差,如图 3(b)所示。扫描区域与图 3(a)区域相同,图像中每个大小为 $1\text{ }\mu\text{m}$ 的像素点对应该点荧光光谱中的温度信息。溶酶体是参与细胞内吞物质消化的重要细胞器,在金纳米颗粒进入细胞的内吞过程中,含有金纳米颗粒的溶酶体更多地聚集在细胞核周围,在细胞质中分散得较少^[36]。因此,图 3(a)所示 AFM 图像中表征的细胞核区域,对应在图 3(b)所示温度分布图像中表现出了更高的温度,此时细胞内由于金纳米颗粒分布不均匀而导致细胞表面的最大温差超过了 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 。细胞以外区域的盖玻片上不存在金纳米颗粒,与细胞所在区域相比产生了超过 $7\text{ }^\circ\text{C}$ 的温差。这一实验结果证明了

本文所提近场光学测温探针用于生物样品的可行性。

3.3 活细胞温度检测

本研究团队在对具有较大温度梯度的胞吞金纳米颗粒固定细胞进行温度分布检测之后,进一步研究了不含金纳米颗粒的活细胞的温度分布。此时,细胞内不存在外部引入的热源,扫描得到的温度分布能够反映细胞内的真实温度分布。用 PBS 清洗后的细胞贴片表面存在一层水膜,细胞浸润在 PBS 中能够保持 $1\sim 2\text{ h}$ 的活性。图 4(a)展现了 10 倍物镜下细胞贴片的光学图像,从该图中可以看出,细胞表面含有水分,形态圆润,并且单次扫描结束后,细胞维持形态不变,基本结构未被损坏,可判断此时细胞未失活。选择红色方框处的单细胞作为近场光纤测温探针的扫描对象,测得其温度分布如图 4(b)所示。扫描区域大小为 $20\text{ }\mu\text{m}\times 20\text{ }\mu\text{m}$,光谱采样点数为 100×100 ,温度图像像素为 $200\text{ nm}\times 200\text{ nm}$ 。与吞金纳米颗粒的细胞样品结果相似,细胞所在盖玻片上不存在产热物质,因此温度分布图中右上角区域温度低于细胞所在区域,两区域间的最大温差达到了 $2.5\text{ }^\circ\text{C}$ 。在活细胞区域内,由于不同细胞器代谢时的活跃程度不同,因此细胞内部存在温差,进而细胞表面也会存在温差,并可被近场光纤测温探针检测到。图 4(b)中间较亮的位置表明这一区域内的生命活动释放出了更多的热量,并与周围区域的温度差超过了 $0.5\text{ }^\circ\text{C}$ 。

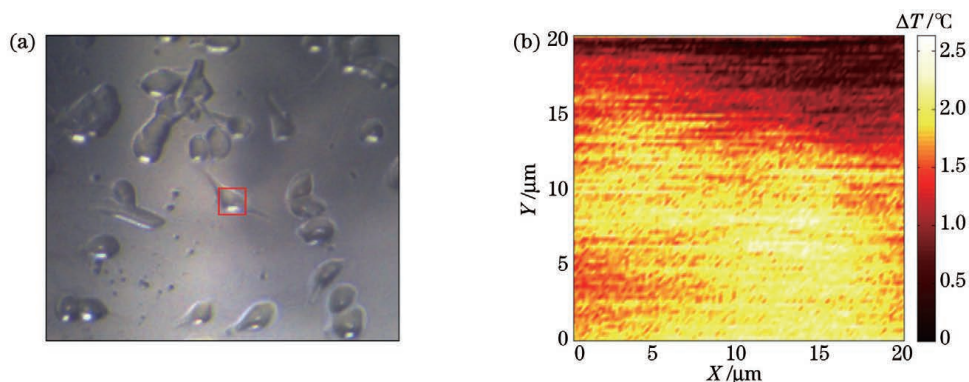


图 4 活细胞测温结果。(a)细胞光学图像;(b) $20\text{ }\mu\text{m}\times 20\text{ }\mu\text{m}$ 区域内的温度分布

Fig. 4 Temperature measurement results of living cells. (a) Optical image of cells; (b) temperature distribution in $20\text{ }\mu\text{m}\times 20\text{ }\mu\text{m}$ area

事实上,在无外部刺激的情况下,细胞内部由于正常生命活动带来的温度分布差异的大小一直存在争议。Baffou 等^[37]在 2014 年提出,如果将葡萄糖作为引起细胞能量波动的主要成分,那么理论上其消耗带来的最大温差不超过 10^{-5} K 。2017 年,东南

大学的田文娟^[38]从该结论进一步分析得出,假设直径为 $10\text{ }\mu\text{m}$ 的细胞内存在 n 个线粒体,则其内部产生的温度差可以达到 $n\times 10^{-2}\text{ K}$ 。多数研究团队使用不同的方法,通过实验测得的细胞内部温度差异大于 $2\text{ }^\circ\text{C}$ ^[19,39]。因此,细胞内部真实的温度差异范

围依旧无法确认。不过,能够达成共识的观点是,作为细胞代谢控制中心的细胞核,以及作为能量转换主要场所的线粒体,两者的代谢活动更剧烈,因此在其附近区域能够产生更高的热量。本文的实验结果表征了细胞内部温度更高、代谢活动更剧烈的区域,并在单细胞表面展示出了明显的温度梯度。由于影响因素众多,使用近场光纤测温探针测得的活细胞样品内部存在的温度差异,无法明确其是否来源于单细胞正常的生理活动。但相比热电偶等破坏性的侵入式测温方法,以及胞吞量子点等影响细胞正常活动的半侵入式测温方法,本研究团队提出的基于近场光纤探针的活细胞无损温度测量方法,在细胞内引入的干扰因素更少,得到的实验结果更贴近细胞内的真实温度分布,为细胞内部温度分布的研究提供了重要的测量手段及实验依据。

4 结 论

基于近场光纤测温探针及其系统,本研究团队提出了一种无损伤的细胞测温方法。固定在锥形光纤探针尖端的 CdSe 量子点作为高灵敏度的纳米温度传感器,在小于 70 °C 的温度范围内,其荧光峰位偏移对温度的灵敏度为 0.16 nm/°C。在音叉的驱动下,探针与样品在纳米尺度下保持恒定间距,并与样品进行热交换,通过扫描可得到样品的温度分布。使用该近场光纤测温探针分别对吞金纳米颗粒的 U87MG 固定细胞和未吞金纳米颗粒的 U87MG 活细胞进行了检测。对于吞金纳米颗粒的固定细胞样品,其内部聚集的金纳米颗粒在激光作用下迅速升温,成为局部热点,从而产生比细胞自身更稳定且温差更大的温度分布。分散在细胞内部的局域热点产生的热量通过热传导到达细胞表面,进而被探针检测到。此时,盖玻片上含细胞区域与无细胞区域之间的温差大于 7 °C。由于金纳米颗粒在细胞内的聚集程度不同,细胞区域表面测得的最大温差大于 4 °C。对于未吞金纳米颗粒的活细胞样品,在没有金纳米颗粒作为外部引入热源的情况下,测得的结果真实地表征了细胞自身产热并传导至细胞表面后的温度分布。此时,细胞与其附近盖玻片的温差超过 2.5 °C,细胞区域表面的最大温差超过 0.5 °C。在扫描前后,活细胞维持了相同的形态,表明该方法未对细胞造成侵入式损伤。

本文所提温度测量方法结合了量子点荧光的温度敏感性和液体环境稳定性,以及近场光学显微镜的非侵入特性,为无损伤的活细胞研究提供了一种

新思路。未来可以通过调整荧光材料和近场光纤探针的锥尖尺寸,实现更高温度灵敏度和空间分辨率的细胞温度分布研究。

参 考 文 献

- [1] Sitia R, Braakman I. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory [J]. *Nature*, 2003, 426(6968): 891-894.
- [2] Yoshida M, Muneyuki E, Hisabori T. ATP synthase: a marvellous rotary engine of the cell [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001, 2(9): 669-677.
- [3] Crowley L C, Christensen M E, Waterhouse N J. Measuring mitochondrial transmembrane potential by TMRE staining [J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016, 2016(12): 087361.
- [4] He W N, Yan S, Gu N. Cellular temperature measurement and its application prospect in drug development [J]. *Journal of Pharmaceutical Research*, 2019, 38(8): 435-442.
何伟男, 严森, 顾宁. 细胞测温技术及其在药物研发中的应用前景 [J]. *药学研究*, 2019, 38(8): 435-442.
- [5] Wang D Q, Huang H, Zhou M X, et al. A thermoresponsive nanocarrier for mitochondria-targeted drug delivery [J]. *Chemical Communications*, 2019, 55(28): 4051-4054.
- [6] Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer [J]. *Cell*, 2000, 100(1): 57-70.
- [7] Liu Y, Wu S, Zhao Y G. Research and developing status on temperature sensor of thermocouple [J]. *China Instrumentation*, 2003(11): 1-3.
刘洋, 吴双, 赵永刚. 热电偶温度传感器的研究与发展现状 [J]. *中国仪器仪表*, 2003(11): 1-3.
- [8] Rajagopal M C, Valavala K V, Gelda D, et al. Fabrication and characterization of thermocouple probe for use in intracellular thermometry [J]. *Sensors and Actuators A*, 2018, 272: 253-258.
- [9] Wang J Q, Bai T T, Tian W J, et al. Design and realization of batch preparation system for W-Pt micro-nano thermocouple [J]. *Journal of Southeast University (Natural Science Edition)*, 2015, 45(4): 673-677.
汪建清, 柏婷婷, 田文娟, 等. W-Pt 微纳热电偶批量制备装置的设计与实现 [J]. *东南大学学报(自然科学版)*, 2015, 45(4): 673-677.
- [10] Yang N N, Wang Z H, Xu J J, et al. Multifunctional freestanding microprobes for potential biological applications [J]. *Sensors*, 2019, 19(10): E2328.
- [11] Zhang Y, Zhu W K, Hui F, et al. A review on

- principles and applications of scanning thermal microscopy (SThM)[J]. *Advanced Functional Materials*, 2020, 30(18): 1900892.
- [12] Haeberle W, Pantea M, Hoerber J K H. Nanometer-scale heat-conductivity measurements on biological samples[J]. *Ultramicroscopy*, 2006, 106(8/9): 678-686.
- [13] Xu D L, Fu X, Xu C Y, et al. Micro characteristics of biomass investigated by scanning thermal microscopy[J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2015, 35(4): 1-7.
徐德良, 付鑫, 徐朝阳, 等. 扫描热显微镜技术在生物质微观特性研究中的应用[J]. *林产化学与工业*, 2015, 35(4): 1-7.
- [14] Nakanishi K, Kogure A, Kuwana R, et al. Development of a novel scanning thermal microscopy (SThM) method to measure the thermal conductivity of biological cells[J]. *Biocontrol Science*, 2017, 22(3): 175-180.
- [15] Chapman C F, Liu Y, Sonck G J, et al. The use of exogenous fluorescent probes for temperature measurements in single living cells[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1995, 62(3): 416-425.
- [16] Hu X L, Li Y, Liu T, et al. Intracellular cascade FRET for temperature imaging of living cells with polymeric ratiometric fluorescent thermometers[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(28): 15551-15560.
- [17] Meng L C, Jiang S, Song M Y, et al. TICT-based near-infrared ratiometric organic fluorescent thermometer for intracellular temperature sensing[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(24): 26842-26851.
- [18] Zohar O, Ikeda M, Shinagawa H, et al. Thermal imaging of receptor-activated heat production in single cells[J]. *Biophysical Journal*, 1998, 74(1): 82-89.
- [19] Oyama K, Takabayashi M, Takei Y, et al. Walking nanothermometers: spatiotemporal temperature measurement of transported acidic organelles in single living cells[J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(9): 1591-1593.
- [20] Li G J, Zhu Z Q, Chen Q D, et al. Metal complex based delayed fluorescence materials[J]. *Organic Electronics*, 2019, 69: 135-152.
- [21] Xie Y L, Shen B, Zhou B S, et al. Progress in research on rare-earth upconversion luminescent nanomaterials and bio-sensing[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207017.
谢荧玲, 沈博, 周兵帅, 等. 稀土上转换发光纳米材料及生物传感研究进展[J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207017.
- [22] Okabe K, Inada N, Gota C, et al. Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy[J]. *Nature Communications*, 2012, 3: 705.
- [23] Savchuk O A, Silvestre O F, Adão R M R, et al. GFP fluorescence peak fraction analysis based nanothermometer for the assessment of exothermal mitochondria activity in live cells[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 7535.
- [24] Xie N L, Huang J, Yang X H, et al. Scallop-inspired DNA nanomachine: a ratiometric nanothermometer for intracellular temperature sensing[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(22): 12115-12122.
- [25] Zhang H L, Han W X, Cao X Z, et al. Gold nanoclusters as a near-infrared fluorometric nanothermometer for living cells[J]. *Microchimica Acta*, 2019, 186(6): 1-6.
- [26] Sehrawat P, Abid A, Islam S S. An ultrafast quantum thermometer from graphene quantum dots[J]. *Nanoscale Advances*, 2019, 1(5): 1772-1783.
- [27] Rayleigh L. On the theory of optical images, with special reference to the microscope[J]. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 1896, 42(255): 167-195.
- [28] Chen Z Y, Zheng X, Chen N, et al. Study of near-field Raman spectroscopy detection based on SERS fiber probe[J]. *Optical Communication Technology*, 2019, 43(8): 55-58.
陈振宜, 郑潇, 陈娜, 等. 基于 SERS 光纤探针近场喇曼光谱检测研究[J]. *光通信技术*, 2019, 43(8): 55-58.
- [29] Yu H H, He M C, Zhou L D, et al. SERS-activity of electrostatically self-assembled films of gold nanoparticles[J]. *Chinese Journal of Colloid and Polymer*, 2003, 21(2): 10-12.
余海湖, 何谋春, 周灵德, 等. 自组装金纳米粒子薄膜 SERS 研究[J]. *胶体与聚合物*, 2003, 21(2): 10-12.
- [30] Yang J M, Yang H, Lin L. Quantum dot nano thermometers reveal heterogeneous local thermogenesis in living cells[J]. *ACS Nano*, 2011, 5(6): 5067-5071.
- [31] Chen Z Y, Wang J T, Chen N, et al. Temperature characteristics of fluorescence spectra of cadmium selenide quantum dots coupled with hydroxyapatite[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(10): 1006002.
陈振宜, 王锦添, 陈娜, 等. 硒化镉量子点偶联羟基磷灰石荧光光谱的温度特性[J]. *中国激光*, 2020, 47

- (10): 1006002.
- [32] Li S, Zhang K, Yang J M, et al. Single quantum dots as local temperature markers[J]. *Nano Letters*, 2007, 7(10): 3102-3105.
- [33] Pugh-Thomas D, Walsh B M, Gupta M C. CdSe (ZnS) nanocomposite luminescent high temperature sensor[J]. *Nanotechnology*, 2011, 22(18): 185503.
- [34] Lin Y, Zhong Y, Liu H T. Modification of single photon fluorescence emission of single quantum dots with different substrates[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45(6): 0606005.
林雨, 钟莹, 刘海涛. 不同基片对单量子点单光子荧光发射的调控[J]. *中国激光*, 2018, 45(6): 0606005.
- [35] Song E Q, Wei H, Song Y. Progress in quantum dots cytotoxicity research[J]. *Environmental Chemistry*, 2011, 30(3): 585-590.
宋尔群, 魏宏, 宋杨. 量子点细胞毒性效应研究进展[J]. *环境化学*, 2011, 30(3): 585-590.
- [36] Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, et al. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview[J]. *Langmuir*, 2005, 21(23): 10644-10654.
- [37] Baffou G, Rigneault H, Marguet D, et al. A critique of methods for temperature imaging in single cells[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(9): 899-901.
- [38] Tian W J. Study of single cell temperature changing and its detection device[D]. Nanjing: Southeast University, 2017.
田文娟. 单细胞温度变化及其检测器件的研究[D]. 南京: 东南大学, 2017.
- [39] Qiao J, Chen C F, Shanguan D H, et al. Simultaneous monitoring of mitochondrial temperature and ATP fluctuation using fluorescent probes in living cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(21): 12553-12558.

Nondestructive Temperature Measurement Method for Living Cells Based on Near-Field Optical Fiber Probe

Li Shaoying, Chen Na^{*}, Liu Zhenmin, Chen Zhenyi, Liu Shupeng, Shang Yana, Wang Tingyun

Key Laboratory of Specialty Fiber Optics and Optical Access Networks, Joint International Research Laboratory of Specialty Fiber Optics and Advanced Communication, School of Communication and Information Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China

Abstract

Objective Temperature reflects vital life characteristics, and high precision measurement for single living cell temperature distribution is critical for studying living activities. Currently, the methods for measuring cell temperature are primarily divided into optical and nonoptical methods. In nonoptical methods, the temperature of the sample is characterized by an electrical signal. As a common nonoptical method, a thermocouple inserts the tip into a cell, causing cell damage. Furthermore, the tip's large size results in low spatial resolution. Scanning thermal microscopy (SThM), which is based on the principle of atomic force microscopy (AFM), implements a smaller thermocouple probe to achieve nondestructive scanning with high spatial resolution. However, in a liquid environment, the electrical noise generated by the probe of the method prevents development in living cell temperature measurement. Optical temperature methods are mainly based on the traditional far-field optical detection technology, which obtains low spatial resolution. Furthermore, the fluorescence method, as the most common optical temperature measurement method, introduces luminescent molecules into the cell. However, the effect of molecules on the cell cannot be neglected. In this study, to achieve cell temperature measurement of high spatial resolution and high-temperature sensitivity, based on the scanning probe principle of AFM, we propose a nondestructive method for measuring the cellular surface temperature distribution *in vivo*.

Methods The method proposed in this study for cell temperature measurement is based on near-field optics and the temperature characteristics of quantum dots fluorescence (Fig. 1). Near-field optics, in contrast to far-field optics, resolves the diffraction limit and achieves optical resolution of less than half the illumination wavelength. Near-field optical detection is primarily based on the probe. The probe used in this study is an aperture near-field optical fiber probe. Under the feedback control of the tuning fork, the probe approaches the near-field region of the sample, and

the distance between the probe and the sample is constant to realize nondestructive scanning. Furthermore, to enable temperature measurement, CdSe quantum dots with stable luminescence and temperature characteristics are combined with the near-field optical probe. During the scanning, the laser is transmitted to the tip of the probe through the optical fiber, and the quantum dots on the probe are excited to emit fluorescence. Heat transfers from the sample's local contact point to the quantum dots on the probe as the probe approaches the sample surface, changing the fluorescence signal. The fluorescence signal is collected by the same near-field optical fiber probe and transmitted to the spectrometer, and the temperature information of the sample is obtained through demodulation.

Results and Discussions The fluorescence peak collected by the near-field optical fiber probe shows a redshift with the increase of the temperature. The slope of the linear fitting equation is obtained after linear fitting of the fluorescence peak position and temperature, indicating that the probe's temperature sensitivity is $0.16 \text{ nm}/^{\circ}\text{C}$ (Fig. 2). The spatial resolution determined by the size of the tip of the probe is $<100 \text{ nm}$, and the theoretical temperature resolution determined by the spectral resolution is $0.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$. The temperature distribution of the fixed U87MG cell containing gold nanoparticles is first detected using the near-field fiber probe to confirm the probe's ability to study the temperature distribution of biological samples. The result shows that because of the heating effecting of laser on the intracellular gold nanoparticles, the temperature difference between the cell and environment is $>7 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Meanwhile, because of the nonuniform distribution of gold nanoparticles in cells, the maximum temperature difference is $>4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ measured on the cell surface (Fig. 3). Then, the temperature distribution of living U87MG cells without gold nanoparticles is measured. The maximum temperature difference on the cell surface is $>0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, and the temperature difference between cells and the environment is $>2.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 4). At this time, because there is no external heat source introduced into the cell, the temperature difference obtained by the near-field optical fiber probe can reflect the real temperature distribution of the cell.

Conclusions Based on the near-field optical fiber temperature probe, a nondestructive cell temperature measurement method is proposed. The probe has a temperature sensitivity of $0.16 \text{ nm}/^{\circ}\text{C}$. To achieve nondestructive scanning, the distance between the probe and the sample surface is maintained constant during scanning via feedback control of the tuning fork. At the same time, the probe measures the sample temperature through the response of fluorescence collected by the probe to the temperature change. Both the fixed U87MG cell with gold nanoparticles and the living U87MG cell without gold nanoparticles are measured using the near-field optical fiber probe. A maximum temperature difference of $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ is measured on the fixed cell surface, and $0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ is measured on the living cell surface. The cells have the same morphology before and after scanning, indicating that the probe has caused nondestructive damage. The temperature measurement method proposed in this study, when combined with the temperature sensitivity and liquid environment stability of quantum dots fluorescence, as well as the nondestructive property of near-field optical technology, presents a better method for the nondestructive study of living cells.

Key words biotechnology; fiber optics sensors; near-field fiber probe; quantum dot; temperature measurement; living cell