

酵母菌偏振衍射特征的定量仿真与实验研究

王文进^{1,2*}, 张玉霞³, 撒昱⁴, 闵力^{1,2}, 田芃^{1,2}¹湖南理工学院物理与电子科学学院, 湖南 岳阳 414006;²湖南理工学院信息光子学与空间光通信湖南省重点实验室, 湖南 岳阳 414006;³湖南理工学院化学化工学院, 湖南 岳阳 414006;⁴天津大学精密仪器与光电子工程学院, 天津 300072

摘要 偏振光衍射成像技术可以提供丰富的与细胞结构及组成成分相关的信息,在生物细胞无损检测领域具有重要的研究和应用价值。本文对酵母菌结构特征参数与其偏振衍射特征之间的定量关系进行了深入分析,分析结果表明:酵母菌单体短轴尺寸与偏振衍射条纹空间频率之间存在定量关系,基于偏振衍射实验测量图像可以实现酵母菌单体短轴尺寸分布的快速统计,并且酵母菌单体长短轴之比与退偏系数之间成高斯线性相关($R^2=0.9986$)。此外,结合偏振衍射图像纹理特征与支持向量机聚类模型可以实现酵母菌发芽率的快速统计,准确率为 98.1%。利用多元线性回归模型可以预测出酵母菌母体和芽体的短轴比,模型调整后的决定系数为 0.86。本研究结果可为基于偏振衍射特征的细胞结构参数反演研究提供借鉴。

关键词 生物光学; 非球形生物细胞; 偏振光散射; 衍射成像; 定量分析

中图分类号 Q63

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL230942

1 引言

细胞散射光检测是一种基于光与细胞相互作用的测量技术,通过分析光在细胞上的散射特性,可以获得有关细胞形态、结构和功能的信息。相比于传统的细胞观察方法,细胞散射光检测具有非破坏性、无需标记、实时性等优势,已成为研究细胞的重要工具^[1-5]。目前,国内外针对不同散射角下细胞散射光强的一维分布特征进行了大量的理论和实验研究,但是鉴于散射光场分布特征与散射体结构特征之间极其复杂的对应关系,再加上一维散射特征缺乏详细的空间信息,无法捕捉复杂的形态特征,所以利用一维散射特征只能对细胞的形态、结构、功能差异进行定性的聚类分析,并且研究结果的有效性往往高度依赖于研究者对研究条件的设置以及对实验数据的解释,大大降低了其实用性^[6-9]。与一维散射特征相比,偏振散射光的衍射图像数据维度更高、信息更丰富,可以从中获得更多的关于散射体三维结构特征的信息^[10-12]。因此,随着研究的深入以及实际应用的需要,细胞光散射研究的侧重点逐渐由一维散射光强分布的定性分析转向二维衍射图像的定量分析,并且相关研究充分考虑了散射光场的偏振特性^[13-16]。然而,目前基于偏振衍射图像的细胞结构参数定量分析主要集中在理论仿真研究方面,

并且以细胞的球形简化光学模型为主,在实际应用中存在一定的局限性^[17-21]。因此,有必要对非球形细胞的偏振衍射特征进行理论和实验研究,以促进基于光散射理论的细胞检测技术的进一步发展。

笔者基于 DDA^[19]理论建立了酵母菌的非球形偏振光散射模型,并对其偏振衍射图像进行了模拟仿真,研究了酵母菌形态特征以及出芽对偏振衍射特征的影响,建立了偏振衍射特征与椭球形酵母菌单体短轴尺寸、纵横比以及双椭球形出芽酵母菌母体和芽体短轴比之间的定量关联关系,实现了基于偏振衍射图像的酵母菌形态分析以及出芽率的快速统计,并通过偏振衍射成像式细胞流式仪对本研究结果进行了实验验证。

2 研究方法

2.1 理论基础

入射光沿着波矢 k_i 方向传播时,由于微粒的折射率与周围介质不同,会发生光散射现象。散射光沿着波矢 k_s 方向上的空间分布可以利用琼斯矢量和琼斯矩阵表示为

$$\begin{cases} \begin{pmatrix} E_{//s} \\ E_{\perp s} \end{pmatrix} = \frac{\exp(ik_s r) \exp(ik_i z)}{-ikr} \bar{J} \begin{pmatrix} E_{//i} \\ E_{\perp i} \end{pmatrix}, \\ \bar{J} = \begin{pmatrix} J_1 & J_4 \\ J_3 & J_2 \end{pmatrix} \end{cases}, \quad (1)$$

收稿日期: 2023-06-21; 修回日期: 2023-07-19; 录用日期: 2023-07-29; 网络首发日期: 2023-08-15

基金项目: 湖南省教育厅重点研究项目(21A0404)、湖南省科技计划(2019TP1014)

通信作者: *wangwenjin1987@126.com

式中:下标 \perp 、 \parallel 代表散射光的偏振状态; r 为散射体中心到观测点的距离矢量; \bar{J} 为琼斯矩阵; J_1, J_2, J_3, J_4 为琼斯矩阵元; k 为沿 r 方向的波矢; $E_{\parallel s}$ 为散射光场平行于散射平面的电场分量; $E_{\perp s}$ 为散射光场垂直于散射平面的电场分量; $\begin{pmatrix} E_{\parallel s} \\ E_{\perp s} \end{pmatrix}$ 为琼斯矢量。这里,入射光场和散射光场被分解成平行于散射平面和垂直于散射平面的两个分量,如图 1 所示。琼斯矩阵完整地描述了入射光场与散射光场之间的关系,但是它的 4 个矩阵元不

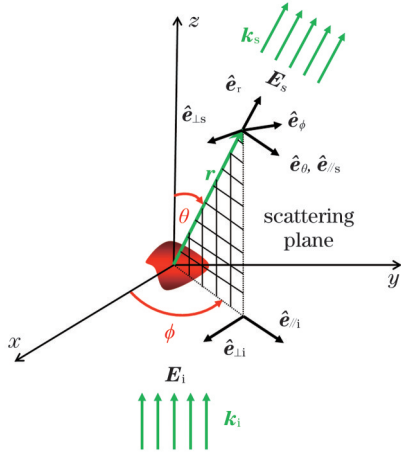


图 1 光散射示意图

Fig. 1 Light scattering diagram

能直接与可测量的光强信号联系起来。所以,在 DDA 算法中利用斯托克斯矢量结合穆勒矩阵 \bar{S} 来研究光散射问题。斯托克斯矢量由 4 个可测量的强度信号组成,可以表示任意偏振的相干光波场。式(2)中的*表示共轭, I 代表偏振光的总强度, Q 代表平行线偏振光强与垂直线偏振光强的差值, U 代表 45° 线偏振光强与 -45° 线偏振光强的差值, V 代表右旋圆偏振光强与左旋圆偏振光强的差值^[20]。DDA 认为连续的散射体是由大量离散的偶极子阵列组成的,通过求解入射光场下偶极子的极化度可以获得散射体的散射、吸收特性,这些特性都被记录在穆勒矩阵 \bar{S} 中,通过不同的矩阵组合可以实现散射光特定偏振分量的分析。

$$\begin{pmatrix} I \\ Q \\ U \\ V \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \langle E_{\parallel} E_{\parallel}^* + E_{\perp} E_{\perp}^* \rangle \\ \langle E_{\parallel} E_{\parallel}^* - E_{\perp} E_{\perp}^* \rangle \\ \langle E_{\parallel} E_{\perp}^* + E_{\perp} E_{\parallel}^* \rangle \\ i \langle E_{\parallel} E_{\perp}^* - E_{\perp} E_{\parallel}^* \rangle \end{pmatrix}, \quad (2)$$

$$\begin{pmatrix} I_s \\ Q_s \\ U_s \\ V_s \end{pmatrix} = \frac{1}{k^2 r^2} \begin{pmatrix} S_{11} & S_{12} & S_{13} & S_{14} \\ S_{21} & S_{22} & S_{23} & S_{24} \\ S_{31} & S_{32} & S_{33} & S_{34} \\ S_{41} & S_{42} & S_{43} & S_{44} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_i \\ Q_i \\ U_i \\ V_i \end{pmatrix}. \quad (3)$$

首先通过斯托克斯矢量的定义确定琼斯矩阵 \bar{J} 和穆勒矩阵 \bar{S} 的关系,即

$$\begin{cases} I_s = \frac{1}{2} [(J_1 J_1^* + J_3 J_3^*)(I_i + Q_i) + (J_4 J_4^* + J_2 J_2^*)(I_i - Q_i) + (J_1 J_4^* + J_3 J_2^*)(U_i - iV_i) + (J_1 J_4^* + J_3 J_2^*)(U_i + iV_i)] \\ Q_s = \frac{1}{2} [(J_1 J_1^* - J_3 J_3^*)(I_i + Q_i) + (J_4 J_4^* - J_2 J_2^*)(I_i - Q_i) + (J_1 J_4^* - J_3 J_2^*)(U_i - iV_i) + (J_1 J_4^* - J_3 J_2^*)(U_i + iV_i)] \\ U_s = \frac{1}{2} [(J_1 J_3^* + J_3 J_1^*)(I_i + Q_i) + (J_4 J_2^* + J_2 J_4^*)(I_i - Q_i) + (J_1 J_2^* + J_3 J_4^*)(U_i - iV_i) + (J_4 J_3^* + J_2 J_1^*)(U_i + iV_i)] \\ V_s = \frac{1}{2} [(J_1 J_3^* - J_3 J_1^*)(I_i + Q_i) + (J_4 J_2^* - J_2 J_4^*)(I_i - Q_i) + (J_1 J_2^* - J_3 J_4^*)(U_i - iV_i) + (J_4 J_3^* - J_2 J_1^*)(U_i + iV_i)] \end{cases}, \quad (4)$$

由式(3)和式(4)可以得出

$$\bar{S} = \begin{pmatrix} S_{11} & S_{12} & S_{13} & S_{14} \\ S_{21} & S_{22} & S_{23} & S_{24} \\ S_{31} & S_{32} & S_{33} & S_{34} \\ S_{41} & S_{42} & S_{43} & S_{44} \end{pmatrix} = \bar{T} \begin{pmatrix} J_1 J_1^* & J_1 J_4^* & J_4 J_1^* & J_4 J_4^* \\ J_1 J_3^* & J_1 J_2^* & J_4 J_3^* & J_4 J_2^* \\ J_3 J_1^* & J_3 J_4^* & J_2 J_1^* & J_2 J_4^* \\ J_3 J_3^* & J_3 J_2^* & J_2 J_3^* & J_2 J_2^* \end{pmatrix} \bar{T}^{-1}, \quad (5)$$

其中

$$\bar{T} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & i & -i & 0 \end{pmatrix}, \quad \bar{T}^{-1} = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -i \\ 0 & 0 & 1 & i \\ 1 & -1 & 0 & 0 \end{pmatrix}. \quad (6)$$

由式(5)和式(6)可以得出,当研究偏振方向与散射截面成任意角度 α 的线偏振光分量时,

$$\bar{J}_\alpha = \begin{pmatrix} \cos^2 \alpha & \sin \alpha \cos \alpha \\ \sin \alpha \cos \alpha & \sin^2 \alpha \end{pmatrix} \bar{J}, \quad (7)$$

$$\bar{S}_\alpha = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 & \cos(2\alpha) & \sin(2\alpha) & 0 \\ \cos(2\alpha) & \cos^2(2\alpha) & \cos(2\alpha) \sin(2\alpha) & 0 \\ \sin(2\alpha) & \sin(2\alpha) \cos(2\alpha) & \sin^2(2\alpha) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \bar{S}, \quad (8)$$

式中: α 为偏振方向与散射截面的夹角。此时, 通过斯托克斯矢量规定入射光的偏振状态, 就可以实现特定偏振状态入射光场下特定散射光偏振分量的分析。

采用波长为 532 nm 的 45° 线偏振光作为入射光, 分析散射光的平行和垂直偏振分量沿散射角 θ 和方位角 ϕ 的光强分布。结合式 (2)、(7)、(8) 可以得出

$$\begin{pmatrix} I_s(\theta, \phi) \\ Q_s(\theta, \phi) \\ U_s(\theta, \phi) \\ V_s(\theta, \phi) \end{pmatrix}_{\perp, 45^\circ} = \frac{1}{2k^2 r^2} \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & 0 \\ -1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \bar{S}(\theta, \phi) \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \end{pmatrix}, \quad (9)$$

$$\begin{pmatrix} I_s(\theta, \phi) \\ Q_s(\theta, \phi) \\ U_s(\theta, \phi) \\ V_s(\theta, \phi) \end{pmatrix}_{\parallel, 45^\circ} = \frac{1}{2k^2 r^2} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \bar{S}(\theta, \phi) \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \end{pmatrix}, \quad (10)$$

式中: 45° 代表入射光的偏振状态。入射光场的斯托克斯矢量采用了归一化光强。

2.2 实验设计及仿真模型

首先在固体培养基中培养拉格酵母和艾尔酵母的单菌落, 然后将其接种在液体培养基中, 再将培养基置于恒温摇床上以 160 r/min 的转速培养 21 h。取 10 支 10 mL 离心管, 将其分成两组, 并分别编号为 A1~A5 和 B1~B5, 向两组离心管中分别移入艾尔酵母、拉格酵母的菌液 0.1 mL 和培养液 3 mL, 剩余的菌液放入

4 °C 冰箱内备用。将 1~5 号管置于恒温摇床上以 160 r/min 的转速继续培养 3.3 h, 然后取出 1 号管以 3000 r/min 的转速离心 3 min, 倒去培养基, 使用 PBS (磷酸盐缓冲液) 吹打、冲洗 2 次, 再使用 PFA (4 g 多聚甲醛溶于 100 mL 浓度为 0.1 mol/L 的 PBS 溶液中配制而成) 固定、重悬, 然后置于超声波振荡器中振荡 3 min, 以防止酵母菌粘连。最后, 从离心管中分 5 次每次取样 2 μ L, 在显微镜下拍照, 观测形态, 统计出芽率。同时, 取样品配制数密度为 10^6 mL^{-1} 的酵母菌溶液, 采用本团队自主研发的偏振衍射成像式流式细胞仪^[20]采集偏振衍射图像对(垂直、平行偏振)。在采集过程中, 首先进样 4 μ L, 运行流式细胞仪至衍射图像信号稳定; 然后持续进样并开始采集图像, 采集图像的曝光时间为 1 ms, 每支离心管采集 5000 对图像并利用光电探测器测量其对应的侧向散射光强; 最后利用 PBS 冲洗流式细胞仪。通过预处理^[22]去除杂质和破碎细胞的衍射图像, 然后随机选取 2500 对图像, 待后续分析。此后, 每间隔 45 min 依次取出 2~5 号管, 重复上述处理过程。图 2 为 2 号管内酵母菌的显微图像, 通过显微镜观测发现酵母菌单体的短轴尺寸和长轴尺寸分别在 4.0~7.5 μm 和 5.0~9.0 μm 范围内。拉格酵母菌的单菌体多呈椭球形, 纵横比(长短轴之比)在 1.0~1.5 之间, 出芽生殖时芽体为单个, 如图 2(a) 所示。艾尔酵母菌的单菌体近似呈球形, 纵横比在 1.0~1.2 之间, 出芽生殖时芽体既有可能为单个, 如图 2(b) 所示, 也有可能为芽簇, 如图 2(c) 所示。

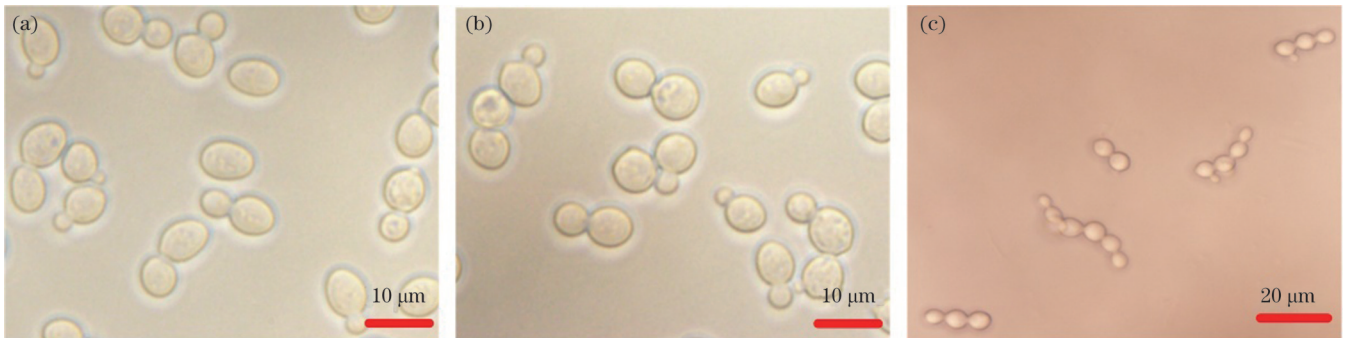


图 2 酵母菌的显微图像。(a)拉格酵母;(b)艾尔酵母;(c)艾尔酵母的芽簇

Fig. 2 Micro-image of yeasts. (a) Lager yeast; (b) Ale yeast; (c) bud cluster of Ale yeast

图 3 是根据酵母菌的显微图像建立的酵母菌光学模型。由于椭球形酵母菌的两个短轴长度非常相似^[23], 所以将文中酵母菌单体的光学模型做了一个理想假设, 即假设模型关于 y 轴旋转对称, 中心点为 o , 长轴长度为 a (沿 y 轴方向), 短轴长度为 b (沿 x 轴方向), 纵横比 $A(a/b)$ 为 1.0~1.5。出芽酵母菌的光学模型分为单芽体模型和芽簇模型。单芽体模型中母体和芽体的短轴比 b_r 为 0.1~1.0, 中心间距 d 为两者长半轴之和的 0.9 倍, 两者中心连线以锐角 γ 转向芽体长轴, 顺时针为正, 逆时针为负。芽簇模型分为两种: 第一种由单芽体模型与酵母菌单体组成, 其中酵母菌单体的结构

参数与单芽体模型中的母体相同; 第二种是在第一种芽簇模型的基础上增加了一个与单芽体模型中芽体结构参数相同的酵母菌单体模型, 如图 3(d) 所示。表 1 为本文所用到的所有酵母菌光学模型的参数变化范围以及对应模型的数量。

通过 DDA 算法可以计算得到表 1 中所有酵母菌光学模型的穆勒矩阵 $\bar{S}(\theta, \phi)$, 其中 $\theta \in [60^\circ, 120^\circ]$, $\phi \in [150^\circ, 210^\circ]$ 。 $I_s(\theta, \phi)_{\perp, 45^\circ}$ 和 $I_s(\theta, \phi)_{\parallel, 45^\circ}$ 分别被投射到图 4(a) 的物方平面 Γ_m 上。图 4(a) 所示为偏振衍射流式细胞仪的光学系统, 波长为 532 nm 的 45° 线偏振激光沿着 z 轴的正方向(垂直指向纸面外)入射。散射体

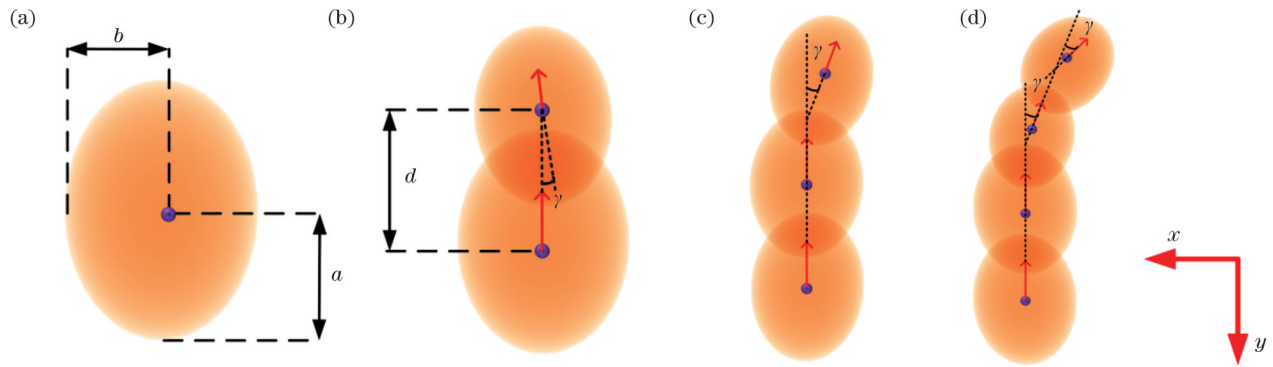


图 3 酵母菌的光学模型。(a)酵母菌单体;(b)出芽酵母菌;(c)(d)酵母菌芽簇

Fig. 3 Optical models of yeasts. (a) Yeast monomer; (b) budding yeast; (c)(d) yeast cluster

表 1 酵母菌光学模型的参数变化范围以及对应模型的数量

Table 1 Parameters range of yeast optical model and the number of the corresponding model

Class ^(a)	Short axis ^(b) / μm	Aspect ratio	Short axis ratio	Angle of central axis /($^\circ$)	Number
Yeast monomer	3 to 8 (step of 0.25)	1.0 to 1.5 (step of 0.025)			441
Budding yeast	5 to 7 (step of 1)	1.1 to 1.5 (step of 0.2)	0.1 to 1 (step of 0.1)	0, -5 to 5 (step of 2)	630
Yeast cluster	5 to 7 (step of 1)	1.1 to 1.5 (step of 0.2)	0.8	0, -5 to 5 (step of 2)	126

Notes: ^a the yeast cluster model includes two types as shown in Fig. 3; ^b the short axis size in the budding yeast model refers to the short axis size of the yeast mother cell.

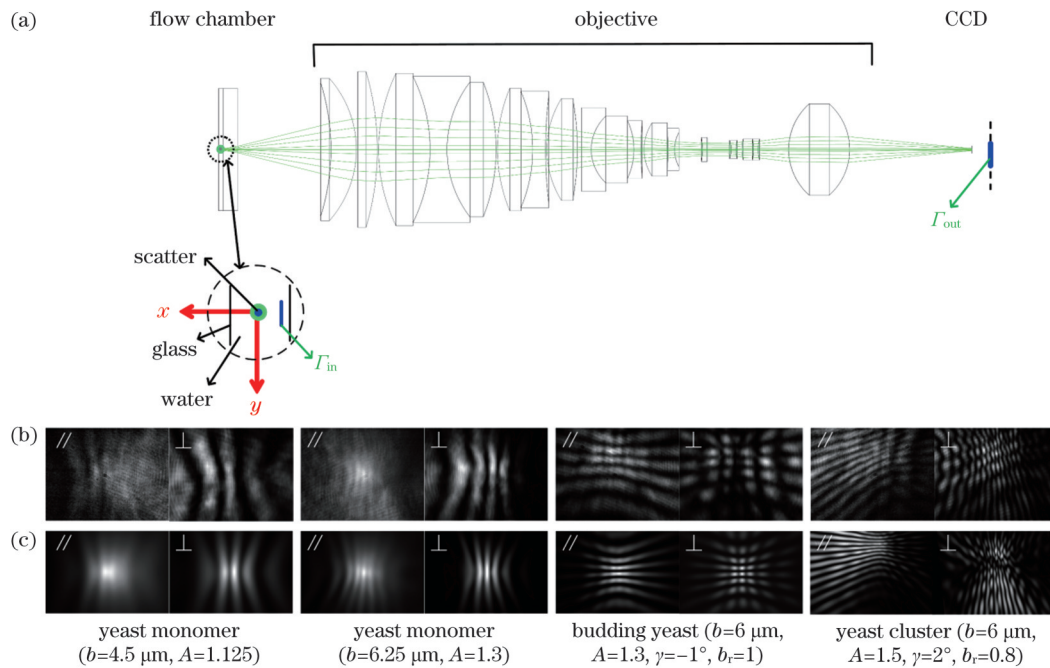


图 4 实验原理示意图。(a)偏振衍射流式细胞仪的光学系统,入射光沿 z 轴方向(垂直纸面向外);(b)实验测量图像,散射光的偏振方向标识在图像左上方;(c)模拟仿真图像,散射光的偏振方向和光学模型的参数分别标识在图像左上方和图像下面

Fig. 4 Schematic diagram of experimental principle. (a) Configuration of optical system of the DIFC with incident light along the z -axis (perpendicular to the flat page, outward); (b) experimental images with polarization direction of scattered light marked at upper left; (c) simulated images with polarization direction of scattered light marked at upper left and the parameters of optical models marked below the images, respectively

沿着 y 轴的正方向流动,当散射体经过聚焦光斑区域时发生散射,散射光被放置在 x 轴负方向且数值孔径为0.55的显微物镜收集。最后,在显微物镜的像方平面 Γ_{out} 上进行成像。为了增强图像的对比度,采用了非共轭成像,将 Γ_{out} 沿 x 轴正方向移动了 $150\ \mu\text{m}$ ^[22]。

图4(b)所示为酵母菌的偏振衍射实验测量图像,图像的纹理类型大致分为两种——长条纹和网格状条纹,且具有明显的周期性。通过调整光学模型参数可以获得与实验图像高度相似的仿真图像,如图4(c)所示,这说明本文所采用的理论仿真模型是合理的。

3 结果分析

图 5 是不同参数酵母菌光学模型所对应的伪彩色偏振衍射图像。伪彩色偏振衍射图像为双通道图像,其中红通道和绿通道图像分别是按照光强归一化之后的垂直和平行偏振衍射图像。从图中可以看出,偏振衍射图像随着酵母菌光学模型参数的变化而变化,并且具有明显的规律性。图 5(a)为纵横比相同、大小不同的酵母菌单体模型的偏振衍射图像,可见:随着酵母菌单体体积的增加,衍射条纹的长度和宽度均变短,沿方位角 ϕ 方向的空间频率增加,并且关于散射角 θ 方向的轴对称性逐渐变差。图 5(b)是短轴长度为 $7.5 \mu\text{m}$ 、纵横比不同的酵母菌单体模型的偏振衍射图

像,可见:随着纵横比的增加,红通道纹理变化规律与图 5(a)基本一致;但是,纵横比的增加对衍射图像沿方位角 ϕ 方向的空间频率基本没有影响,而平行偏振衍射条纹沿方位角 ϕ 减小方向的曲率逐渐增大。图 5(c)和图 5(d)是酵母菌芽体的偏振衍射图像,可见:与酵母菌单体相比,其最明显的变化是垂直偏振衍射条纹由条状变成了网格状,并且母体与芽体的体积越接近,垂直偏振衍射条纹的网格状特征越明显;同时,平行偏振衍射条纹的延伸方向也逐渐由 θ 方向变为 ϕ 方向。另外,从图 5(d)中还可以看出,芽体长轴方向与母体长轴方向的夹角 γ 对偏振衍射条纹的空间频率基本没有影响,它只会影响偏振衍射条纹的方向,但在 $\gamma \in [-5^\circ, 5^\circ]$ 时对偏振衍射条纹的影响不明显。

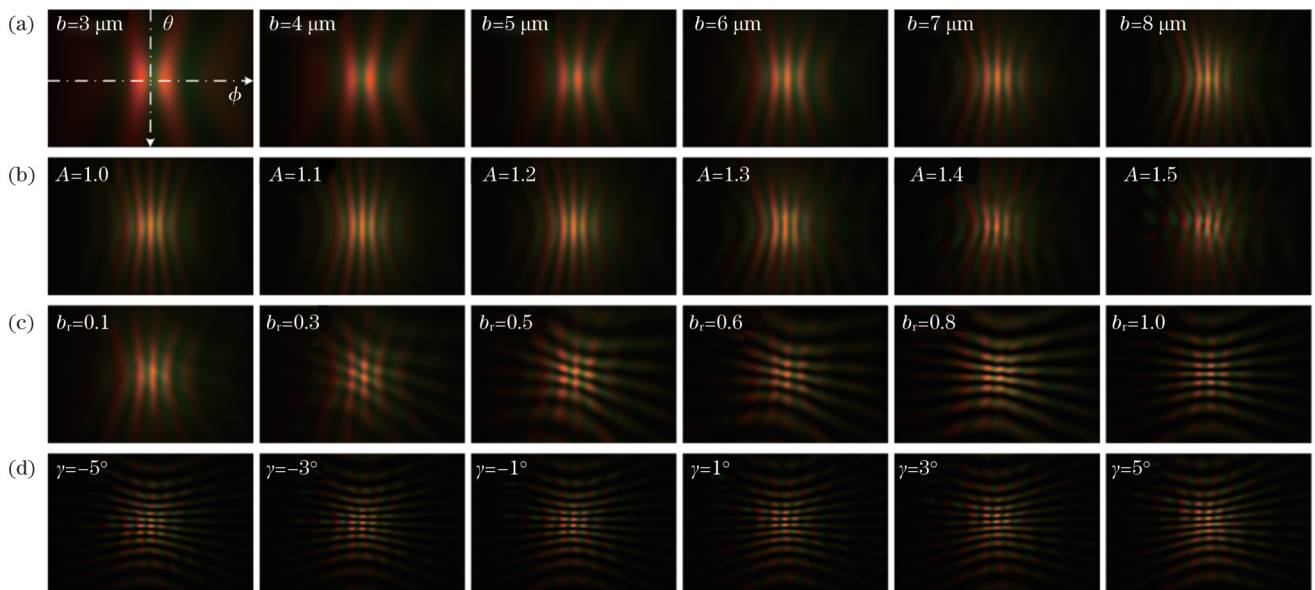


图 5 不同酵母菌光学模型的归一化偏振衍射图像,参数变量标识在图像左上方。(a)酵母菌单体, $A=1.25$,虚线箭头标识了 θ 和 ϕ 增大的方向;(b)酵母菌单体, $b=7.5 \mu\text{m}$;(c)单芽体, $b=6 \mu\text{m}$, $A=1.3$, $\gamma=90^\circ$;(d)单芽体, $b=7 \mu\text{m}$, $A=1.3$, $b_r=1$

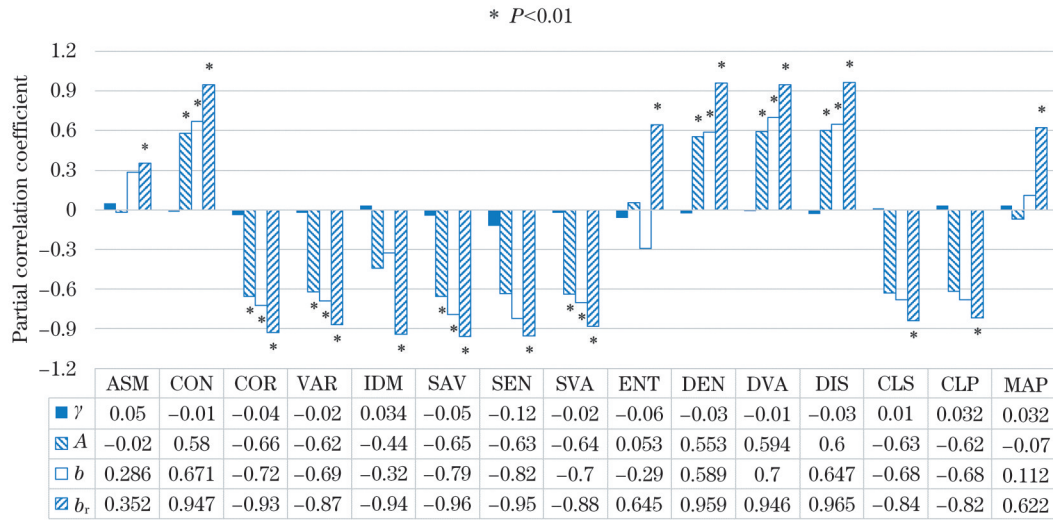
Fig. 5 Variation of normalized polarized diffraction image (p-DI) of optical models of different yeasts, each p-DI is marked with its parameter variable at upper left. (a) Yeast monomer with same A value of 1.25, the dashed arrows indicate the direction of increase of θ and ϕ ; (b) yeast monomer with same b value of $7.5 \mu\text{m}$; (c) budding yeast with same b value of $6 \mu\text{m}$, same A value of 1.3, same γ value of 90° ; (d) budding yeast with same b value of $7 \mu\text{m}$, same A value of 1.3, same b_r value of 1

3.1 酵母菌出芽对偏振衍射特征的影响

酵母菌单体和出芽酵母菌偏振衍射图像的纹理具有很明显的区别,由此可以实现基于偏振衍射图像的酵母菌单体和出芽酵母菌的快速自动统计。为了将偏振衍射图像的纹理特征进行量化,利用灰度共生矩阵(GLCM)计算了 0° 、 45° 、 90° 和 135° 等 4 个方向上 15 个统计量的平均值,各统计量的符号和具体定义见图 6。影响出芽酵母菌偏振衍射图像量化纹理特征的结构参数主要有 4 个,分别为酵母菌母体短轴尺寸 b 、纵横比 A 以及母体与芽体的短轴比 b_r 和出芽方向 γ 。图 6 是利用统计分析软件 SPSS 对出芽酵母菌结构参数和 GLCM 参数进行偏相关分析的结果,其中星号标识代表变量间相关的显著性水平小于 1%,

即变量间的相关具有高度统计学意义。从图 6 中可以看出:出芽方向 γ 与 GLCM 参数之间基本不存在相关关系;与酵母菌母体短轴尺寸 b 和纵横比 A 存在显著相关关系的 GLCM 参数基本都相同;母体与芽体的短轴比 b_r 与所有的 GLCM 参数都存在显著的相关关系。

首先以偏振衍射仿真图像为样本,训练支持向量机(SVM)聚类模型,训练过程中采用了 5 折交叉验证,以避免出现过拟合,保证模型的泛化能力。图 7(a)是利用该模型在 GLCM 参数空间内对酵母菌光学模型进行聚类分析的结果,其中标签“1”表示酵母菌单体模型,标签“2”表示短轴比 $b_r \in [0.1, 0.5]$ 的出芽酵母菌模型和芽簇模型,标签“3”表示 $b_r \in [0.6, 1]$ 的出芽酵母



Notes: ASM denotes angular second moment (or energy or homogeneity), CON denotes contrast (inertia), COR denotes correlation, VAR denotes variance (sum of squares), IDM denotes inverse difference moment (local homogeneity), SAV denotes sum average, SEN denotes sum entropy, SVA denotes sum variance, ENT denotes entropy, DEN denotes difference variance, DVA denotes difference variance, DIS denotes dissimilarity, CLS denotes cluster shade, CLP denotes cluster prominence, MAP denotes maximum probability.

图 6 出芽酵母菌结构参数和偏振衍射图像纹理特征参数的偏相关分析

Fig. 6 Partial correlations analysis of the structural parameters of budding yeast and texture feature parameters of polarized diffraction image

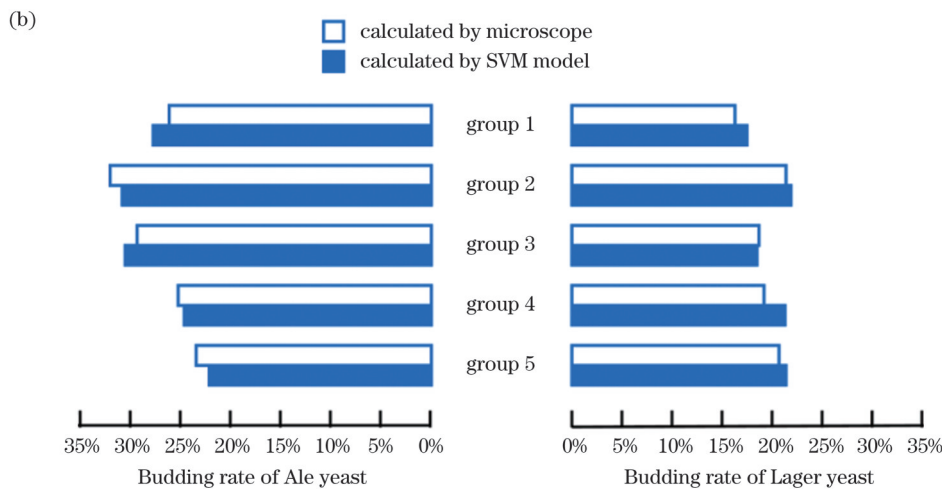
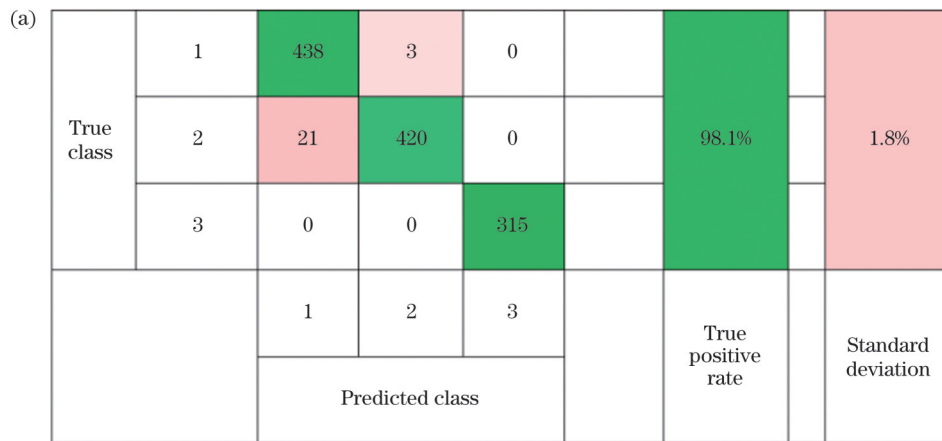


图 7 酵母菌发芽率的统计。(a)SVM分类模型的混淆矩阵;(b)5组酵母菌样品出芽率统计结果对比

Fig. 7 Budding rate statistic of yeasts. (a) Confusion matrix of SVM classifiers; (b) result comparison of budding rate of five groups of yeast samples

菌模型,正确率定义为正确聚类的酵母菌数量与总数的比值。从图 7(a)中可以看出 SVM 聚类模型的正确率非常高,为 98.1%。分析 21 个被 SVM 模型错误聚类为酵母菌单体的出芽酵母菌样本可以发现,其全部为单芽体模型,母体短轴尺寸为 5 μm 和 6 μm,短轴比 $b_r=0.1$ 。以上结果说明偏振衍射图像对酵母菌芽体大小的变化非常敏感,对芽体短轴尺寸的分辨率约为 0.6 μm。

在利用训练好的 SVM 聚类模型对实验培养酵母菌的出芽率进行统计之前,采用给训练样本添加高斯噪声的方法评估了模型的鲁棒性。结果表明:当样本图像的高斯噪声标准差在 0.1 以下时,模型的准确率基本没有变化;当噪声标准差为 0.2 时,准确率仍大于 95%。所以模型具有较好的鲁棒性。在统计酵母菌出芽率时,短轴比 $b_r \in [0.1, 0.5]$ 的出芽酵母菌和芽簇作为芽体计数,单体作为酵母菌计数,短轴比 $b_r \in [0.6, 1]$ 的出芽酵母菌不作为芽体计数而作为两个酵母菌计数。图 7(b)是利用 SVM 聚类模型和显微镜分别统计的 5 组艾尔酵母和拉格酵母样品的出芽率对比图,可以看出 SVM 模型统计的出芽率与利用显微镜统计的出芽率基本一致。因此,基于偏振衍射特征的 SVM 聚类模型是一种高效的酵母菌出芽率统计方法。

随后对基于 GLCM 参数的出芽酵母菌短轴比 b_r 的多元线性回归模型进行了初步研究。首先对 GLCM 参数进行归一化,将各个 GLCM 特征缩放到同一范围内;然后选取与短轴比 b_r 相关系数大于 0.9 的 8

个 GLCM 参数,利用 SPSS 进行多重共线性分析,从中选取 COR、SAV、SEN、DEN 等 4 个方差膨胀因子(VIF)小于 5 的 GLCM 参数(这 4 个参数在公式中分别记为 C_{OR} 、 S_{AV} 、 S_{EN} 、 D_{EN}),建立这 4 个 GLCM 参数与短轴比 b_r 的多元线性回归模型,即

$$b_r = 0.703C_{OR} - 0.606S_{AV} + 1.254S_{EN} + 0.613D_{EN} - 0.42. \quad (11)$$

模型调整后的决定系数 R^2 为 0.86,各变量在模型中的显著性均小于 0.01。这表明选取的 GLCM 参数对出芽酵母菌短轴比的变化具有非常高的解释度,并且回归模型具有显著的统计学意义,同时证明了偏振衍射成像技术具有定量分析双椭球形酵母菌模型结构参数的潜力。

3.2 酵母菌单体结构参数变化对偏振衍射特征的影响

酵母菌单体的主要结构参数有短轴尺寸和纵横比。根据图 5(a)和图 5(b)的分析可知垂直偏振衍射图像中的条纹沿方位角 ϕ 方向的空间频率与短轴尺寸密切相关,而且纵横比的变化对其没有明显影响。因此,利用傅里叶算法对酵母菌单体模型的垂直偏振衍射图像进行功率谱变换,以研究酵母菌短轴尺寸变化对偏振衍射图像纹理特征的影响。图 8 是长短轴比为 1.25、短轴尺寸不同的酵母菌单体的垂直偏振衍射图像的功率谱图,图中以空心圆标识了振幅的峰值位置,并用虚线标出了振幅峰值位置对应的频率。可以看出酵母菌单体模型的短轴尺寸与垂直偏振衍射条纹沿方位角 ϕ 方向的空间频率之间具有明显的正向关联。

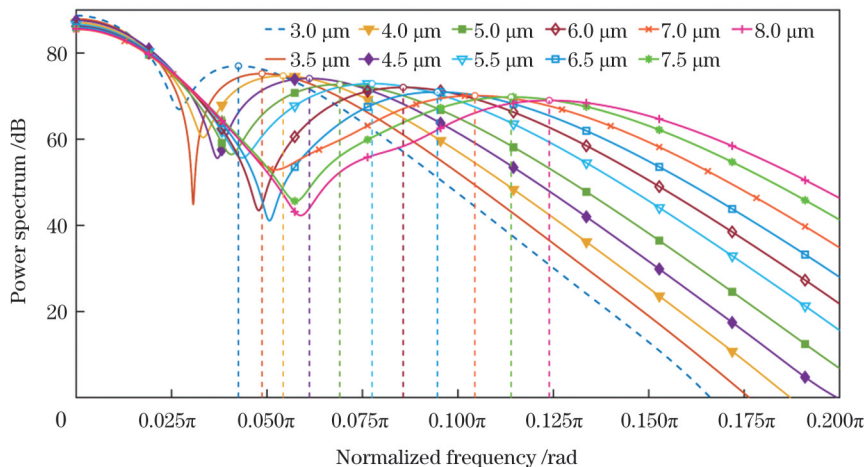


图 8 $A=1.25$ 且短轴尺寸不同的酵母菌模型的偏振衍射图像的功率谱图
Fig. 8 Power spectra of p-DI of yeasts with different b values at $A=1.25$

为了实现基于偏振衍射图像的酵母菌单体短轴尺寸的反演,利用非线性最小二乘法拟合振幅峰值对应的归一化频率与短轴尺寸之间的幂函数关系曲线,如图 9(a)中的实线所示。其具体函数关系为

$$f_{nor} = 0.002958b^{1.704} + 0.0234, \quad (12)$$

式中: f_{nor} 表示归一化频率。模型的决定系数 R^2 为 0.9996。

图 9(a)中两条虚线标识了拟合模型的 95% 预测区间,填充区域为纵横比变化时归一化频率的波动。从图中可以看出模型的预测区间非常小,而且只有当短轴尺寸在 5.5~6.0 μm 和 6.5~7.0 μm 范围内时,由纵横比变化造成的归一化频率波动稍稍超出了预测区间,其他完全在预测区间内。利用预测模型对 SVM

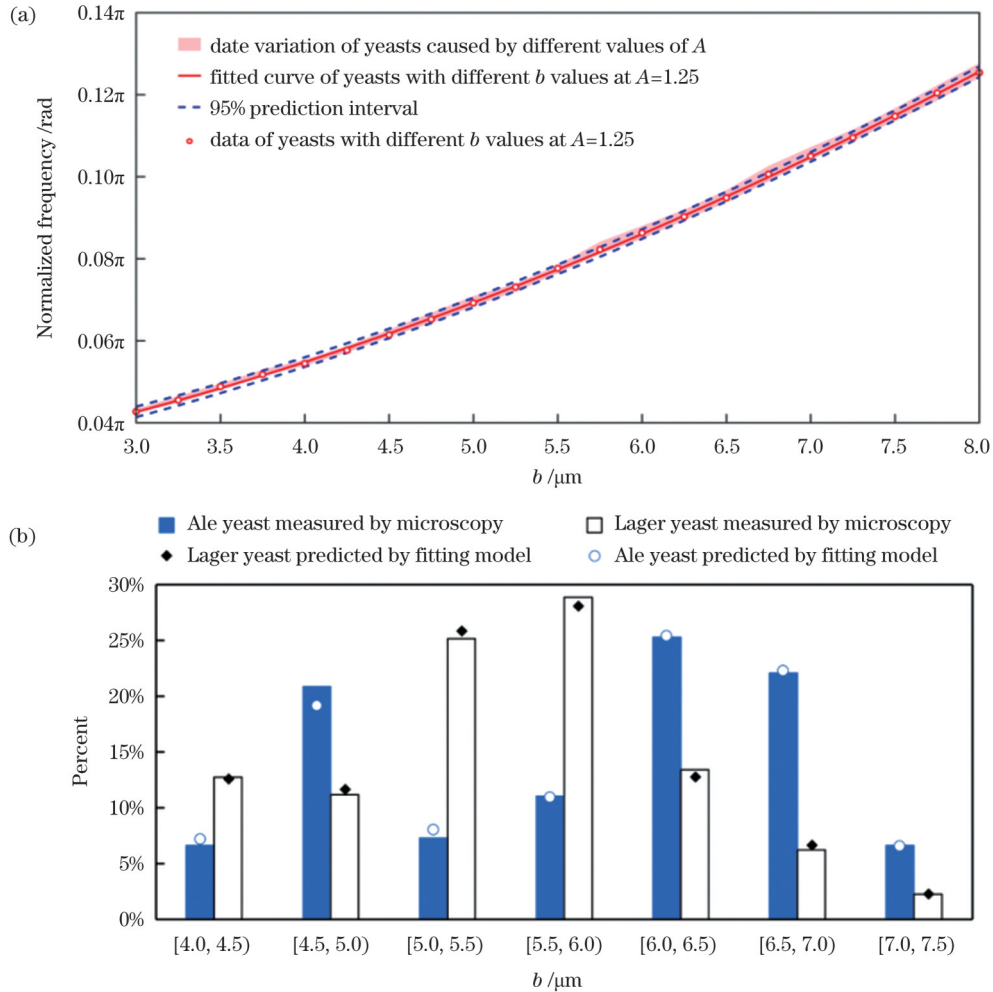


图 9 酵母菌单体短轴尺寸分析。(a)短轴尺寸 b 与归一化频率的幂函数拟合关系;(b)酵母菌短轴尺寸分布统计图
Fig. 9 Short-axis size analysis of yeast monomer. (a) Power fit of short-axis size b and normalized frequency; (b) statistical histogram of short-axis size distribution of yeast

模型聚类出的酵母菌单体的偏振衍射实验图像进行了分析。图 9(b)是基于偏振衍射图像预测的 11000 个酵母菌单体的短轴尺寸分布与显微镜人工统计的 1500 个酵母菌单体短轴尺寸分布的对比,误差为 7.4%,两者基本一致,说明拟合模型对酵母菌单体短轴尺寸有较高的预测精度。

进一步,计算了 $\theta \in [115^\circ, 120^\circ]$ 时散射光的偏振退偏系数 $p(\theta)$,计算公式为

$$p(\theta) = \frac{I_s(\theta)_{-45^\circ, 45^\circ}}{I_s(\theta)_{45^\circ, 45^\circ}} = \frac{S_{11}(\theta) + S_{13}(\theta) - S_{31}(\theta) - S_{33}(\theta)}{S_{11}(\theta) + S_{13}(\theta) + S_{31}(\theta) + S_{33}(\theta)}, \quad (13)$$

并研究了酵母菌纵横比对退偏系数的影响,如图 10 所示。从图 10 中可以看出酵母菌单体短轴尺寸和纵横比都对退偏系数有显著影响:当纵横比大于 1.175 时,酵母菌单体的短轴尺寸和纵横比都与偏振退偏系数存在明显的正相关关系;当 $b \in [3 \mu\text{m}, 5 \mu\text{m}]$ 时,不同短轴尺寸酵母菌单体的退偏系数随纵横比的变化具有显著差异;当 $b \in [5 \mu\text{m}, 8 \mu\text{m}]$

时,不同短轴尺寸酵母菌单体的退偏系数随纵横比的变化趋势基本相同且呈高斯变化规律。图 10 中给出了酵母菌短轴尺寸为 5、6、7、8 μm 时退偏系数与纵横比的高斯拟合曲线 (R^2 为 0.9986),具体的表达式为

$$\begin{cases} p(\theta)_{5\mu\text{m}} = 0.03889 \exp \left[-\left(\frac{A - 1.558}{0.2814} \right)^2 \right] \\ p(\theta)_{6\mu\text{m}} = 0.06881 \exp \left[-\left(\frac{A - 1.528}{0.2517} \right)^2 \right] \\ p(\theta)_{7\mu\text{m}} = 0.1201 \exp \left[-\left(\frac{A - 1.517}{0.235} \right)^2 \right] \\ p(\theta)_{8\mu\text{m}} = 0.2122 \exp \left[-\left(\frac{A - 1.515}{0.2329} \right)^2 \right] \end{cases}. \quad (14)$$

综上所述可知,偏振衍射图像中包含了丰富的散射体的结构信息,对非球形生物细胞的形态参数反演具有重要意义。

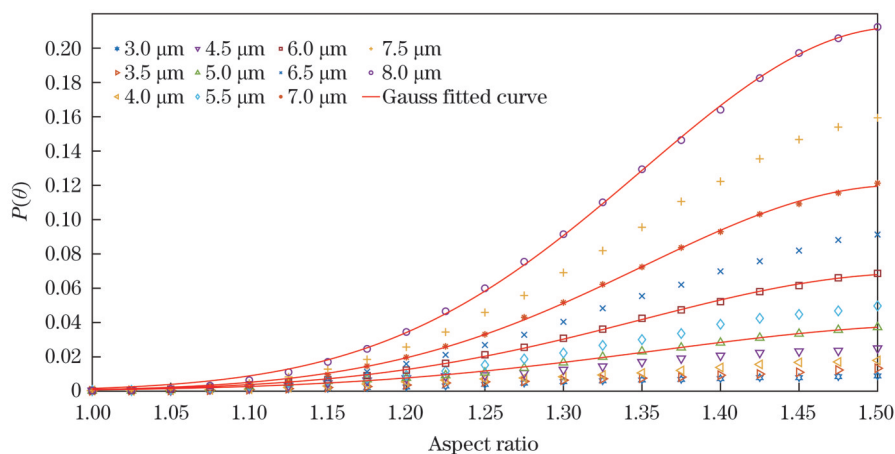


图 10 酵母菌纵横比对退偏系数的影响

Fig. 10 Influence of aspect ratio of yeast on depolarization coefficient

4 结 论

采用离散偶极子近似法通过仿真研究了酵母菌单体和出芽酵母菌的偏振衍射特征,并利用偏振衍射成像式流式细胞仪开展了拉格酵母菌和艾尔酵母菌的偏振衍射图像测量实验研究。结果表明:偏振衍射图像对酵母菌的结构参数变化非常敏感,利用偏振衍射图像不仅可以实现酵母菌出芽率的快速统计,还可以实现椭球形酵母菌单体短轴尺寸和纵横比以及双椭球形出芽酵母菌短轴比的定量分析。本研究结果可为基于偏振衍射成像技术的微米量级非规则散射微粒的快速识别和分析提供理论和实验参考。

参 考 文 献

- [1] Su X T, Yuan T, Wang Z W, et al. Two-dimensional light scattering anisotropy cytometry for label-free classification of ovarian cancer cells via machine learning[J]. *Cytometry. Part A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 2020, 97(1): 24-30.
- [2] Wang W J, Min L, Tian P, et al. Analysis of polarized diffraction images of human red blood cells: a numerical study[J]. *Biomedical Optics Express*, 2022, 13(3): 1161-1172.
- [3] 朱亮, 董理, 陈晋, 等. 光散射光谱在生物医学领域的发展和应用[J]. *光散射学报*, 2022, 34(2): 103-115.
- [4] 卜敏, 胡双双, 陶兆禾, 等. 白细胞对偏振光的散射特性及散射特性与细胞结构的关系[J]. *中国激光*, 2017, 44(10): 1007001.
- [5] Zhang L, Xie Y H, Tu Y Z, et al. Clinical lymphocytes construction for light scattering inversion study: a three-dimensional morphology constructed method from defective confocal images[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2018, 23(8): 085003.
- [6] Draham R L, Dunn K J, Berger A J. Phase-sensitive, angle-resolved light-scattering microscopy of single cells[J]. *Optics Letters*, 2020, 45(24): 6775-6778.
- [7] Qiu L, Zhang L, Horowitz G L, et al. Rapid detection and identification of bacteria directly from whole blood with light scattering spectroscopy based biosensor[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 346: 130489.
- [8] Liu J, Xu Y H, Wang W J, et al. Machine learning of diffraction image patterns for accurate classification of cells modeled with different nuclear sizes[J]. *Journal of Biophotonics*, 2020, 13(9): 202000036.
- [9] Rossi D, Dannhauser D, Telesco M, et al. CD4+ versus CD8+ T-lymphocyte identification in an integrated microfluidic chip using light scattering and machine learning[J]. *Lab on a Chip*, 2019, 19(22): 3888-3898.
- [10] Silva R, Araújo F, Rezende M, et al. Searching for cell signatures in multidimensional feature spaces[J]. *International Journal of Biomedical Engineering and Technology*, 2021, 36(3): 236-256.
- [11] Wang S T, Liu J, Lu J Q, et al. Development and evaluation of realistic optical cell models for rapid and label-free cell assay by diffraction imaging[J]. *Journal of Biophotonics*, 2019, 12(4): 201800287.
- [12] Yuan S Q, Sa Y, Sun P P, et al. A flow cell imaging system combined diffraction and bright field microscopy[J]. *Proceedings of SPIE*, 2020, 11434: 1143405.
- [13] Li S Y, Li Y, Yao J N, et al. 2D light scattering images analyzed by deep learning algorithm for label-free differentiation of dead and live colonic adenocarcinoma cells[J]. *Journal of Physics: Conference Series*, 2021, 1914(1): 012007.
- [14] Wohlfeil S, Hengoju S, Munser A S, et al. Optical fiber based light scattering detection in microfluidic droplets[J]. *Proceedings of SPIE*, 2019, 10875: 1087516.
- [15] Wang W J, Wen Y H, Lu J Q, et al. Rapid classification of micron-sized particles of sphere, cylinders and ellipsoids by diffraction image parameters combined with scattered light intensity [J]. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 2019, 224: 453-459.
- [16] Zhu D, Feng C T, Huan J, et al. Simulation of light scattering by two nano-sized circular cylinders using NS-FDTD method and interference analysis[J]. *Optical Review*, 2020, 27(4): 321-331.
- [17] Romanov A V, Yurkin M A. Rigorous analysis of the spectral sizing of single particles based on light scattering patterns[J]. *Optics & Laser Technology*, 2022, 151: 108047.
- [18] Romanov A V, Maltsev V P, Yurkin M A. Retrieving refractive index of single spheres using the phase spectrum of light-scattering pattern[J]. *Optics & Laser Technology*, 2023, 161: 109141.
- [19] Wang W J, Liu J, Lu J Q, et al. Resolving power of diffraction imaging with an objective: a numerical study[J]. *Optics Express*, 2017, 25(9): 9628-9633.

- [20] Feng Y M, Zhang N, Jacobs K M, et al. Polarization imaging and classification of Jurkat T and Ramos B cells using a flow cytometer [J]. *Cytometry Part A*, 2014, 85(11): 986.
- [21] 徐佳星, 夏珉, 杨克成, 等. 非球形颗粒系粒径分布的机器学习反演算法[J]. *光学学报*, 2023, 43(9): 0929002.
- Xu J X, Xia M, Yang K C, et al. Machine learning-based inversion algorithm for particle size distribution of non-spherical particle system[J]. *Acta Optica Sinica*, 2023, 43(9): 0929002.
- [22] Zhao L, Tang L W, Greene M S, et al. Deep learning of morphologic correlations to accurately classify CD4+ and CD8+ T cells by diffraction imaging flow cytometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(3): 1567-1574.
- [23] Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular biology of the cell* [M]. 6th ed. New York: Garland Science, 2014.

Quantitative Simulation and Experimental Study of Polarized Diffraction Characteristics of Yeast Cells

Wang Wenjin^{1,2*}, Zhang Yuxia³, Sa Yu⁴, Min Li^{1,2}, Tian Peng^{1,2}

¹*School of Physics & Electronic Science, Hunan Institute of Science and Technology, Yueyang 414006, Hunan, China;*

²*Key Laboratory of Hunan Province on Information Photonics and Free-Space Optical Communications, Hunan Institute of Science and Technology, Yueyang 414006, Hunan, China;*

³*School of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Institute of Science and Technology, Yueyang 414006, Hunan, China;*

⁴*School of Precision Instrument and Opto-Electronics Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China*

Abstract

Objective Polarized diffraction images (p-DIs) can provide a wealth of information about the morphologies of scatterers, making them a valuable tool for use in a variety of applications, including the characterization of biological cells and tissues. However, most studies on biological cells have chiefly relied on qualitative analysis, which is achieved through the analysis of patterns of p-DIs for cell clustering. Although qualitative analysis can provide major insights into the morphologies and characteristics of cells, it may not always provide accurate quantitative data about the sizes and shapes of cells, which is critical for some applications. Although quantitative studies on the refractive indices and sizes of cells have been conducted, these investigations have typically been based on the assumption that cells are perfectly spherical. Accordingly, this assumption may not hold true for many types of cells that exhibit non-spherical shapes. Based on a texture analysis of p-DIs, this study conducted quantitative analyses on the characteristic parameters of yeast monomers and budding yeast, where the results are shown to be consistent with those obtained using traditional microscopy methods. This approach can provide insights into the quantitative analysis of non-spherical cells based on light-scattering techniques.

Methods A systematic study on p-DIs with scattering angles of 60° – 120° and azimuth angles of 150° – 210° of 1197 yeast monomers and budding yeast was conducted using optical models established based on the discrete dipole approximation theory (DDA). Excluding the assumption that the two short axes of yeast cells are equal, all parameters of these optical models were obtained through microscopy. The experimental p-DIs of 25000 Ale and Lager yeasts were obtained using polarization diffraction imaging flow cytometry. The Fourier spectrum and gray-level co-occurrence matrix (GLCM) parameters of all p-DIs, including those derived from a simulation and experiment, and the depolarization coefficient of p-DIs of yeast monomer were calculated. A regression model was used to establish the quantitative relationship between image feature and cellular structural parameters, such as the sizes of the short axes of yeasts, the aspect ratio of yeast monomer under different short axis sizes, and short axis ratio of bud yeast to mother yeast. In addition, a statistical correlation between characteristic parameters of yeast cells and GLCM parameters was investigated, and a support vector machine (SVM) classifier was trained based on simulated p-DIs to classify the yeast monomers and budding yeasts in the GLCM parameter space.

Results and Discussions This study finds a significant statistical correlation between GLCM parameters and short axis ratio of bud yeast to mother yeast (Fig. 6). Therefore, for a statistical analysis of budding rates, the SVM model shows an accuracy of as high as 98.1% [Fig. 7(a)]. Moreover, the budding rates of yeasts as calculated by the SVM classifier and microscopic count method are found to be highly consistent [Fig. 7(b)]. Further analysis shows that the adjusted R^2 as determined by the multiple regression equation is 0.86, indicating that the regression model has very high statistical significance and good predictability. In addition, a power law relationship derived from the nonlinear least squares fit between the normalized spatial frequency along the θ direction and short axis of yeasts is obtained with an R^2 value of 0.9986 and narrow 95% prediction interval, indicating that the precision and reliability are satisfactory [Fig. 9(a)]. With the aid of this power law relationship, the statistics of the short axis size distribution of yeast monomer based on experimental p-DIs are realized with an error of 7.4% [Fig. 9(b)]. The correlations between the aspect ratio of yeast monomer under different short axis sizes and the depolarization coefficients were also analyzed. We find that when the short axis sizes vary in the range of 5–8 μm , the changing trends of the depolarization coefficient with the aspect ratio of yeast monomer under

different short axis sizes are consistent and assumed to be a Gaussian function (Fig. 10). These results indicate that polarized diffraction imaging technology has promise in terms of quantitative analysis of the structural parameters of non-spherical cell models.

Conclusions A comprehensive numerical and experimental study on the polarized diffraction characteristics of yeast cells is conducted. We develop a yeast cell structural parameter prediction model based on texture features extracted from p-DIs. This prediction model can accurately and rapidly predict yeast cell structural parameters such as short axis size, aspect ratio, and bud size based on given p-DIs. The accuracy and reliability of the model were validated through comparison with actual measurement data. The ability to predict yeast cell structural parameters in a fast and accurate manner is of great significance for the study of cellular morphology and may have major implications for the development of new diagnostic and therapeutic tools.

Key words bio-optics; non-spherical biological cells; polarized light scattering; diffraction imaging; quantitative analysis