

基于稀疏数据的液-液相分离凝聚物形态快速分析方法

贾希宇, 龚凌冉, 徐媛媛, 季颖*

江苏大学物理与电子工程学院, 江苏 镇江 212013

摘要 细胞内液-液相分离现象与细胞内的多种生物过程有关,分析研究相分离的现象及机理可为调控细胞生理过程和药物研发提供参考和策略。相位成像技术因在无色透明物体的非接触、免标记定量观测方面具有巨大优势而被用于液-液相分离的研究中;但是,在该技术中,样本厚度与其折射率耦合一起,形态分布需经相应算法反演获得,其分析效率很大程度上取决于数据采集量、计算处理时间和精度等。为满足生命科学研究领域对实时获取相分离凝聚物形态信息的需求,本文提出了一种仅需两幅相位图的三维形态快速反演方法,相应设计了一种由单个图像传感器实现双路光信息采集的干涉相位成像系统。提出的形态重构算法对数据采集要求宽泛,通过布置控制点,运用数学变换解算其沿两个非正交方向投影的平面像素坐标与其三维空间坐标的映射关系,由此计算反演得到像素点对应的三维坐标从而实现凝聚物形态的分离重建。

关键词 生物光学; 干涉成像; 液-液相分离; 边缘提取; 投影映射; 三维空间坐标

中图分类号 O436 文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL230447

1 引言

生物细胞内包含多种细胞器,不同的细胞器将细胞分成不同的隔室,以确保以时空受控的方式发生各种各样的细胞活动^[1-2]。有些隔室需要通过膜与外界隔开,有些则是无膜的,被称为无膜细胞器^[3],如能够形成核糖体的核仁^[4]等。理解这些无膜隔室之间如何共存以及其与细胞质如何共存是非常重要的生物物理问题^[5-6]。最近的实验研究表明无膜细胞器具有可融合、流动与形变的液态特征,无膜隔室通过多价相互作用驱使的“液-液相分离”(LLPS)进行组装^[7-11]。液体表面张力决定了液-液相分离产生的凝聚物呈球形结构且具有固定的尺寸,但目前尚不清楚这些尺寸是如何保持的^[12-14]。基于无膜液滴的特性,显微成像技术、光调控技术等常被用来探究其结构以及融合、裂变和阻断等物理性质^[15-16]。相位成像技术因能无损、免标记地获取透明样本的内部结构信息,在生命科学、材料学等领域得到了越来越多的关注与应用^[17-19]。Zeng 等^[20]采用微分干涉显微技术在体外观察了 SynGAP CC-PBM/PSD-95 PSG 混合物是如何形成液滴的。该类技术提供的相位信息是透射介质厚度与折射率沿光入射方向的累积,包含了样本的结构信息。正是由于累积的叠加,各介质在入射方向的厚度无法从该方向的相位分布中获得,至少需要两个方向的相位图进行计算反演才能得样本亚结构形貌,因而多种解耦反演算法及其相应的成像方法被提出,以探究样本的物

理结构等^[21]。目前的层析定量检测^[22]、数字全息显微成像^[23]等方法可以测量生物细胞的三维折射率分布。Tang 等^[24]采用数字全息显微系统,通过融合 9 个以上重构平面图像有效消除了散斑噪声,进而对尺寸为 5~100 μm 的微型浮游生物进行了三维成像和准确识别,该方法耗时 352.41 s。郑南南等^[25]采用活体三维成像发现了小鼠肿瘤目标点,通过多组滤光片得到了三个方向 (coronal view、sagittal view 和 transaxial view) 的图像并对肿瘤样本进行了三维重建,该算法耗时 1.25 s。以上技术虽然可以获得较高的成像精度,但操作复杂、所需数据量大、耗时长,而且对实验装置和操作的要求较高。本课题组从降低成像光路搭建难度与成本、减小采集和运算数据量出发,探究了基于双路相位信息快速获取样本亚结构界面三维形貌的方法,以期为相分离凝聚物形态的定量分析提供参考。

2 数据采集及三维形貌反演算法原理

三维形貌重建的过程是建立二维数据到三维数据映射关系的过程。从建立映射的计算反演来看,由正交方向采集二维投影数据较为常见,本课题组前期围绕正交采样开展了重建工作^[21],但正交成像对光路搭建、调试的要求较为严苛:或受到数值孔径对收光角度的限制,或物光和参考光各自光臂的布置较难符合要求,而且双路采集信号在增加成本的同时也可能引入更复杂的噪声和误差。为降低信号采集难度和成本,本团队提出了一种由两幅非正交相位图反演液-液

收稿日期: 2023-01-09; 修回日期: 2023-02-10; 录用日期: 2023-02-21; 网络首发日期: 2023-03-05

通信作者: *jy@ujs.edu.cn

相分离样本亚结构界面形貌的算法以及相应的干涉相位成像光路设计。

成像光路基于马赫-曾德尔干涉原理,由单个相机采集双路非正交的光干涉信息,如图 1 所示。一束入射光从激光器发出,通过分光棱镜 BS₁后分为物光和参考光;物光经 Wollaston 棱镜后分离为两束偏振分量,可以通过调节对称分布的全反射镜 M₄、M₅的角度来改变两束偏振分量与样本平面之间的夹角;透射过样本后,两束物光再通过孔径光阑进入物镜,以减小斜入射引起的像散。一般来说,细胞内

部成分、厚度并非对称均匀分布,故对称入射的两束物光将仅因为样本的物理厚度及折射率不同而产生不同程度的相位延迟;经过物镜后,携带不同相位信息且振动方向相互垂直的偏振分量经过分光棱镜 BS₂分别与参考光相遇,并分别与参考光中相应的分量干涉得到两组不同的干涉条纹;使用电控偏振片选择不同的偏振分量通过,这样不需要移动装片就可经由一个摄像头分别采集同一样本在不同方向入射光下的两幅干涉图,之后经相位恢复运算可得到两幅非正交相位图。

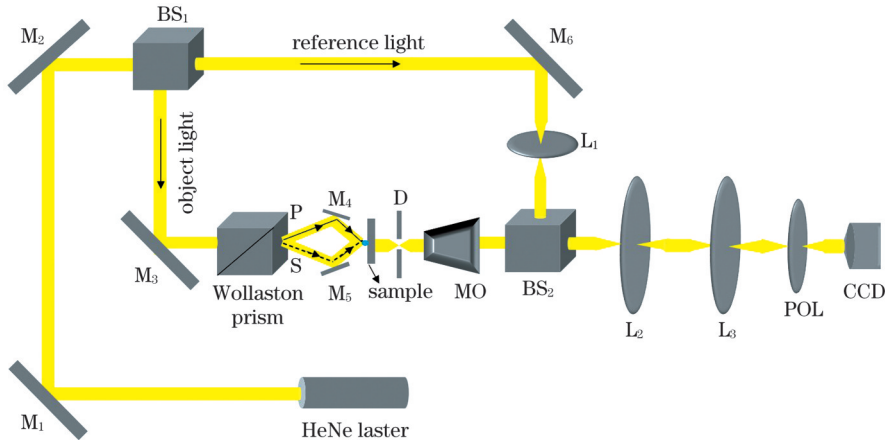


图 1 非正交干涉相位成像装置光路图(M:全反射镜;BS:分光棱镜;L:透镜;D:光阑;MO:物镜;POL:电动旋转偏振片;P:平行分量;S:垂直分量)

Fig. 1 Optical path diagram of non-orthogonal interference phase imaging device (M: total reflective mirror; BS: beam splitter prism; L: lens; D: diaphragm; MO: microscope objective; POL: electric rotating polarizer; P: parallel component; S: vertical component)

接下来基于两幅非正交方向获得的相位图进行样本三维形貌的反演。为方便阐述算法的原理及步骤,以细胞核模型为例提取其与内部核仁这样的液-液相分离凝聚物的表面形貌,并建立双介质相位体模型,以模拟细胞核的内部结构。为考察算法在非理想实验条件下对不同面型的反演效果,在考虑样本实际物理特征(相分离凝聚物呈球形,各介质并非理想均匀且存在噪声等)的基础上,以同心球和椭球体分别模拟核仁和胞核[如图 2(a)所示],椭球与球的球心坐标均为(0,0,0),其中:模拟胞核的椭球体的半主轴长分别为 14、16、18 μm ,折射率 n_c 在 1.429~1.431 之间随机分布;模拟无膜凝聚物核仁的同心球的内球半径为 4 μm ,折射率 n_n 在 1.4485~1.4515 之间随机分布;周围环境液(即细胞质,其形态分布可通过双波长法^[26]计算获取)的折射率为 n_0 。由于各介质折射率主要以相对差值的形式体现在相位信息中[如式(1)所示],上述待重建样本的折射率已根据模拟实验场景以随机分布进行了设置。为简便起见,本文设环境液折射率为一定值,即 $n_0=1.358$;以高斯白噪声模拟信号采集过程中的噪声。设非正交的两个入射方向分别为 X 方向和 I 方向,其夹角为 60° ,入射光波长为 632 nm。两个方向得到的相位图的性质和作用均相同,因而本文仅以 X 方向

入射相位信息[如图 2(b)所示]为例展开分析。

根据相位产生的机理和定义,样品引起的相移量可表示为

$$\phi(y, z) = \frac{2\pi}{\lambda} \int_0^{h(y, z)} [n_c^z(x, y, z) - n_n^z(x, y, z)] dx, \quad (1)$$

式中: $\phi(y, z)$ 表示入射光沿 X 轴方向时,样品在 YOZ 面内引起的相移分布; λ 表示入射光波的波长; $h(y, z)$ 表示 YOZ 面内不同坐标点处样品的物理厚度; $n_c^z(x, y, z)$ 表示核仁内的折射率分布; $n_n^z(x, y, z)$ 表示细胞核区域的折射率分布^[27]。

本课题组此前关于相位图边缘检测的工作表明,梯度类算子可以有效地从相位分布数据中提取出样本亚结构在垂直于入射光方向上的投影边界,但是对于不同种类的样本,各算子的效果不尽相同。由于噪声极易影响到图像边界,因此,在进行边缘检测前就要对图像进行平滑滤波。高斯滤波[滤波函数 $G(y, z)$ 如式(2)所示]在水平和垂直方向上呈高斯分布,更突出了中心点在像素平滑后的权重,因此相比均值滤波具有更好的平滑效果。Canny 边缘检测应用高斯滤波去除噪声的影响,利用 Sobel 算子与相位信息卷积计算 d_y 、 d_z [如式(3)、(4)所示, $\text{Sobel}_y(y, z)$

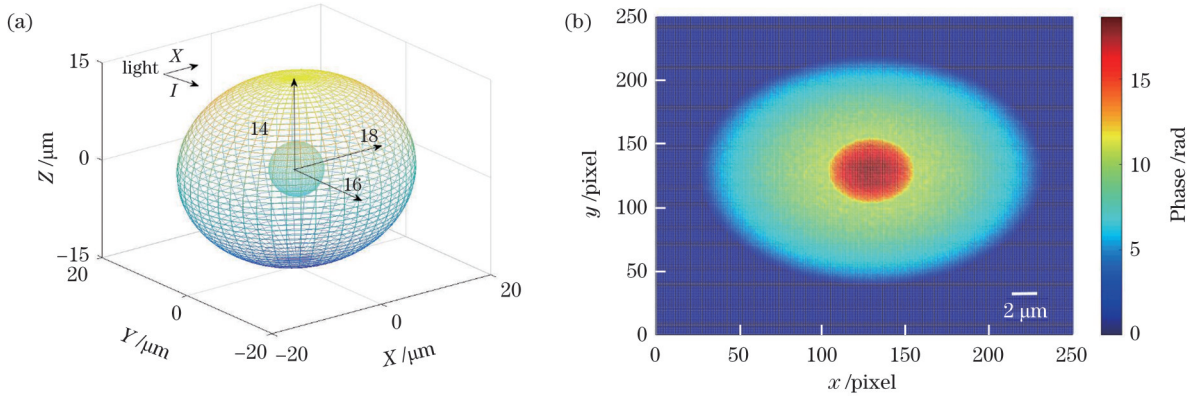


图 2 双介质同心椭球模型。(a)模型的三维空间示意图;(b)模型在 X 方向的相移分布图

Fig. 2 Two-medium concentric ellipsoid model. (a) Three-dimensional space diagram of the model ; (b) phase shift distribution of the model in X direction

和 Sobel_z(y, z) 分别为水平和垂直算子]进而得到梯度方向信息[如式(5)所示, $M(y, z)$ 为梯度幅值, θ_M 为梯度方向角], 同时采用非极大抑制以及双阈值技术, 且函数返回值为二值图像, 以便于提取边界信息。基于上述考虑, 本文采用 Canny 算子对图 2(b) 所示的相位图进行边缘提取, 其中 Canny 边缘检测阈值设为 0.3, LOG 边缘检测阈值设为 0.012, 提取结果如图 3(a) 所示。

$$G(y, z) = \frac{1}{2\pi\delta^2} \exp\left(-\frac{y^2 + z^2}{2\delta^2}\right), \quad (2)$$

$$d_y = \phi(y, z) * \text{Sobel}_y(y, z), \quad (3)$$

$$d_z = \phi(y, z) * \text{Sobel}_z(y, z), \quad (4)$$

$$\begin{cases} M(y, z) = \sqrt{d_y^2(y, z) + d_z^2(y, z)} \\ \theta_M = \arctan\left[\frac{d_y(y, z)}{d_z(y, z)}\right] \end{cases} \quad (5)$$

该边界较原模型存在一些偏差, 这可能是由于 Canny 算子易在图像纹理较为丰富的地方(如边缘处)出现偏移, 检测出的边缘点与原始图像的位置就有了一定误差。因此, 又采用对边缘位置检测准确的 LOG 算子对原相位图像进行处理, 结果如图 3(b) 所示。通过对图 3(a)、(b) 进行对比及整合, 可以剔除噪声像素点并获取较完整准确的样品边界, 这样获得的模型在 YOZ 平面以及与之成 60° 角平面上的投影边界分别如图 3(c) 和图 3(d) 所示。

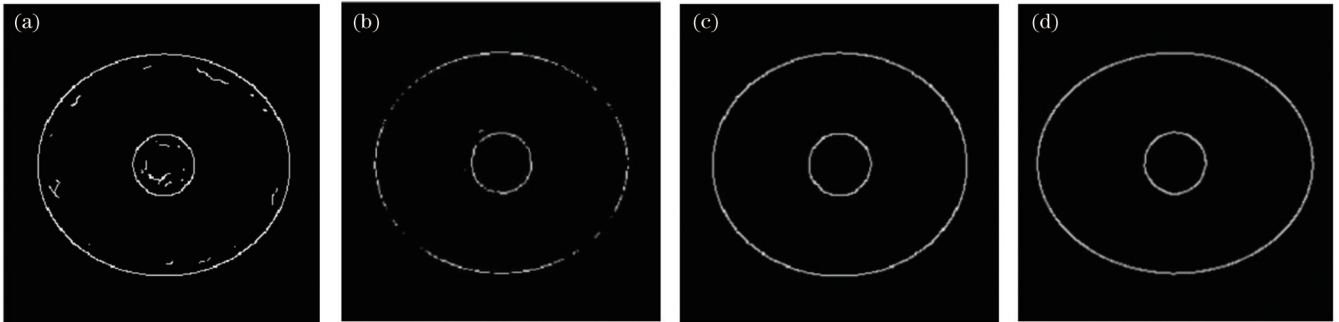


图 3 同心椭球模型边缘检测结果。(a)模型在 YOZ 平面上的 Canny 边缘算子检测图;(b)模型在 YOZ 平面上的 LOG 边缘算子检测图;(c)模型在 YOZ 平面上的投影边界;(d)模型在另一平面上的投影边界

Fig. 3 Concentric ellipsoid model edge detection results. (a) Canny edge operator detection map of the model in YOZ plane; (b) LOG edge operator detection diagram of the model in YOZ plane; (c) projection boundary of the model in YOZ plane; (d) projection boundary of the model in the other plane

这两个方向的边缘反映的是同一样本在不同平面上的投影, 不考虑样本动态形变时, 其二维坐标之间以及各面二维坐标与对应点三维坐标之间分别有着确定的、一一对应的映射关系, 若能获得部分点之间的映射便可推广到全部点的三维坐标, 即反演得到样本结构形貌。为获取上述映射关系, 本文采用直接线性变换(DLT), 选取参考点(即控制点)解算空间坐标和投影平面坐标间的定量关系, 进而基于这一关系由各投影

点二维坐标反演得到其同一空间坐标系下对应的三维坐标, 如图 4 所示。设 P 点为控制点, M 点为待定点, 空间坐标系中 P 点的空间坐标 (2.8284, 2, -2) 和投影点像素坐标 $P_x(120, 142)$ 、 $P_i(142, 142)$ 均已知, 通过 P 点的空间坐标和投影坐标建立 DLT 关系; 待定点 M 的像素点坐标 $M_x(72, 61)$ 、 $M_i(142, 61)$ 已知, 但其空间坐标 $M(X, Y, Z)$ 未知, 通过 DLT 关系反演即可得到待定点 M 的空间坐标。

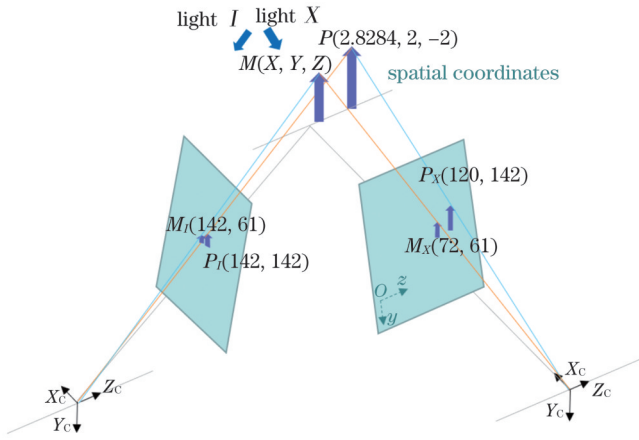


图 4 DLT 算法原理示意图

Fig. 4 Principle diagram of direct linear transformation algorithm

由上述原理可知,控制点的选取对结果的准确性具有决定性影响,以分布广泛和均匀作为原则选取控制点为宜。在实验条件下,各类样本在投影面上的边界点呈不同程度的离散杂乱分布,如图 5 局部边界放大图所示,部分边界点(如像素点 A 以及与其相邻的 A₁、A₂等)的分布趋势是光滑的,但由于介质分布非理想均匀和信号噪声的影响,部分投影边界点(如像素点 B)的分布趋势是非光滑非均匀的。数值计算结果表明,由于后续解算迭代过程中的误差累积,取分布趋势非光滑跳变点(如 B 点)进行解算的结果非常不稳定,而且解算结果跟与其很靠近的光滑连接点(如 A 点)反演得到的解算结果相比差别也会很大。为了获得较为准确的三维重建结果,结合亚结构面型的几何特征对这些边界点进行预处理,选择合适的曲线对这些点进行拟合筛选。由液-液相分离凝聚物的形成机理和分布特征可知,样品内层核仁是球体,其平面投影理论上应为圆,采样分布也基本符合预期,故用圆形曲线对核仁的边界投影点进行拟合(如图 5 中红色曲线所示)。需要说明的是,图 5 中两个曲线方程都是对离散点逼近计算的结果,并非事先设定的,而且也不需要事先设定,相应参数在实际操作中也是无法预知的。图中给

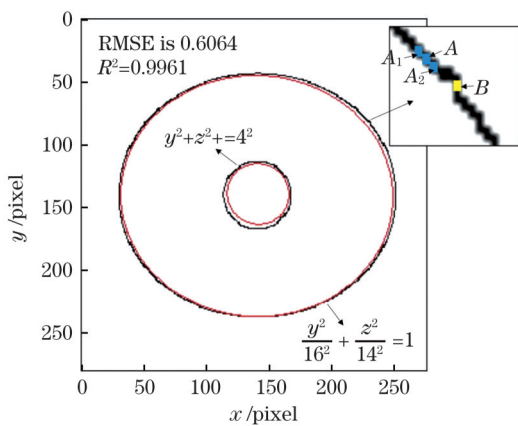


图 5 模型在 YOZ 平面的投影边界及局部边界放大图

Fig. 5 Projection boundary and enlarged local boundary of the model in YOZ plane

出的确定系数(R^2)和均方根误差(RMSE)在一定程度上表明了曲线与离散边界点分布的一致性。在此基础上选取与拟合曲线吻合较好的点作为控制点,这样就可以依据可定量的标准选取合适的控制点。

接下来确定控制点的数量。根据成像的共线性条件建立空间坐标与像素坐标之间的关系,共线条件方程式为

$$\begin{cases} x + \frac{l_1 X + l_2 Y + l_3 Z + l_4}{l_9 X + l_{10} Y + l_{11} Z + 1} = 0 \\ y + \frac{l_5 X + l_6 Y + l_7 Z + l_8}{l_9 X + l_{10} Y + l_{11} Z + 1} = 0 \end{cases}, \quad (6)$$

式中: (x, y) 表示像素坐标; (X, Y, Z) 表示该投影点对应的空间坐标; l_i 表示像素坐标和空间坐标之间的关系系数。由式(6)可知共有 11 个系数,由一个控制点的像素坐标 (x, y) 可以列出 2 个关于 l_i 的方程,因此至少需要布置 6 个控制点。通过实际操作发现仅使用 6 个控制点的误差非常大。控制点的位置及数量是影响重建精度的最主要因素,在一定程度上增加控制点的数量,重建精度也会增大。为满足控制点均匀分布的要求,增加一个控制点后,与之对称的点也要作为控制点,故共选取了 156 个点作为控制点。根据控制点的像素点坐标和空间坐标可以得到近似的 l_i 系数,然后对 l_i 系数进行精准解算。按上述原则选取的控制点像素坐标和空间坐标如表 1 所示。

表 1 双介质同心椭球模型非正交方向控制点的坐标

Table 1 Coordinates of non-orthogonal direction control points of two-medium concentric ellipsoid model

Serial number	X direction projection		I direction projection		Three dimensional coordinates		
	y / pixel	z / pixel	i' / pixel	z / pixel	X / μm	Y / μm	Z / μm
1	142	142	120	142	2.8284	2	2
2	142	116	120	116	2.8284	2	-2
3	116	142	107	142	2.8284	-2	2
4	116	116	107	116	2.8284	-2	-2
5	142	142	151	142	-2.8284	2	2
6	142	116	151	116	-2.8284	2	-2
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

接着对待定点的空间坐标进行解算。首先对待定点空间坐标的近似值进行解算,以空间坐标作为未知数,因 l_i 系数已经解算确定,由已知待定点的像素坐标 (x, y) 通过式(6)可以得到待定点的空间坐标。空间坐标有 X、Y、Z 三个未知数,由一张投影平面图片可以列出一组[如(6)式中的 2 个方程]像素坐标和空间坐标的关系式,而三个未知数需要三个方程,因此至少需要两幅不同方向的投影图片才可以解算出像素坐标对应的空间坐标。该解算原理对投影图片是否正交并无特殊要求,故从方便实验采集的角度出发选择了两幅

非正交相位图来获取相应的投影平面图(即投影边界),并以图 5 为依据按上述选取控制点的方法执行解

算。以上述双介质同心椭球模型为例,反演得到的同心椭球的三维分布如图 6(a)所示。

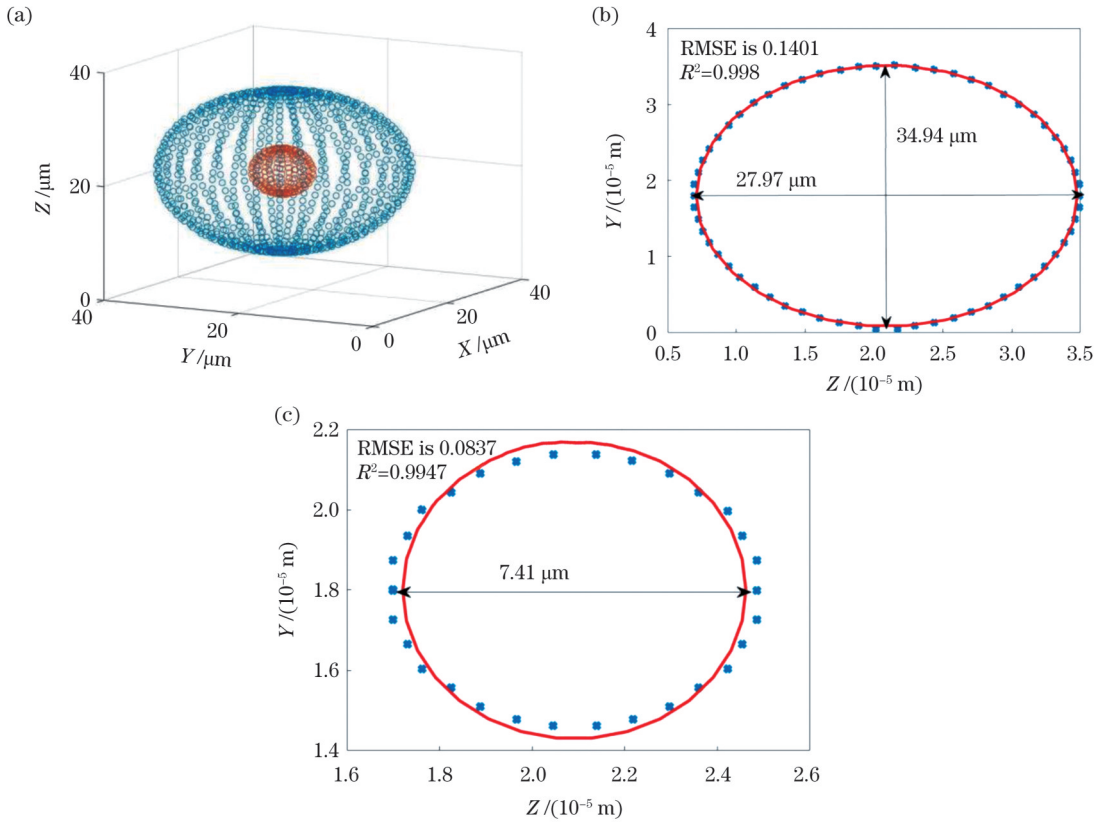


图 6 双介质同心椭球模型的重建结果。(a)模型重建结果的三维分布;(b)外部椭球轴向截面的边界点分布;(c)内球轴向截面的边界点分布

Fig.6 Reconstruction results of two-medium concentric ellipsoid model. (a) Three-dimensional distribution of model reconstruction result; (b) boundary point distribution of axial section of external ellipsoid; (c) boundary point distribution of axial section of inner sphere

由图 6(a)可以直观地看出,重建结果与图 2(a)所示的原模型具有良好的一致性。为评估重建效果,提取轴向截面边界与原模型通过拟合对比的方式进行误差分析,如此不仅可以给出长、短轴及半径这些特征参数的误差,还可以定量考察重建的整体分布效果。对于外层的椭球轴向截面,其边界点拟合椭圆曲线的确

定系数为 0.998,均方根误差为 0.1401;内部核仁区域的轴向截面与圆形曲线的拟合确定系数为 0.9947,均方根误差为 0.0837;各轴长的相对误差如表 2 所示。上述误差分析证明了本算法对不同特征面型应用的有效性。反演计算耗时 0.0689 s,处理速度可以满足实时分析的要求。

表 2 双介质同心椭球模型的重建数据

Table 2 Reconstruction data of two-medium concentric ellipsoid model

Item		Theoretical value /	Calculate value /	Relative error /	Time /s
		μm	μm	%	
Axial distribution of ellipsoidal outer layer	Major axis	36	34.94	2.94	0.0689
	Minor axis	28	27.97	0.11	
Axial distribution of spherical inner	Diameter	8	7.41	7.37	

3 实验验证

为了验证所提算法在实际应用中的可行性,本课题组基于血细胞、聚苯乙烯微球等样本进行多次实验来考察边缘检测、逼近拟合提取控制点的方案对不同相态、不同介质分界面的实施效果。结果表明,该方

法主要对折射率变化敏感,对液-液和液-固分界面同样有效。出于方便对照的考虑,本文用标准聚苯乙烯微球和环境液来模拟不同介质的相分离状态。以一个直径为 $8\ \mu\text{m}$ 的聚苯乙烯微球为例,根据厂商数据,其折射率为 1.588,尺寸误差在 3% 以内;以 Cargille 折射率匹配液作为环境液,其在 $23\ ^\circ\text{C}$ 下的实测折射率

为 1.4218 (采用阿贝折射仪测量)。入射光波长为 632.8 nm, 分别从夹角为 60° 的两个方向入射, 获得的两幅相位图如图 7(a)、(b) 所示, 其中右上方是对应提取的边缘分布 (白色曲线) 及其拟合曲线 (红色曲

线)。根据上述步骤反演得到的微球的三维表面形貌 (即不同相位体的界面) 如图 7(c) 所示, 基本体现了球形特征, 相互垂直的两个轴向截面直径分别为 $7.87 \mu\text{m}$ 和 $7.95 \mu\text{m}$ 。

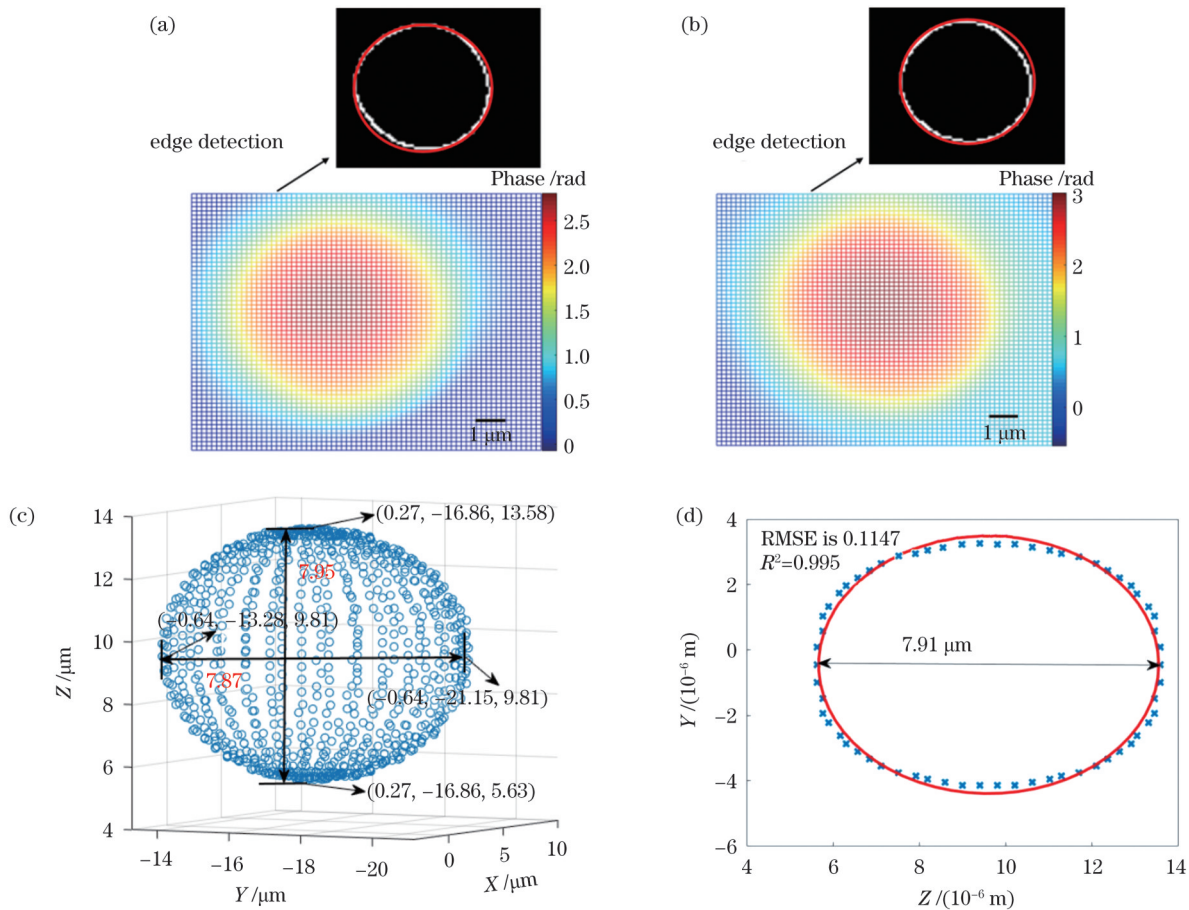


图 7 聚苯乙烯微球的相位分布及反演形貌分布。(a)~(b) 入射方向夹角为 60° 的两束入射光的相位图;(c) 重建的三维形态分布;(d) 轴向截面边界点分布及拟合评估

Fig. 7 Phase diagrams and inversion morphology of polystyrene micro-sphere. (a)–(b) Phase diagrams of two incident beam with an angle of 60° in incidental direction; (c) reconstructed three-dimensional morphological distribution; (d) axial section boundary point distribution and fitting evaluation

上述界面的反演仅需 0.0415 s 即可完成。图 7(d) 给出了重建得到的微球轴向截面分布 (图中一系列蓝色离散点), 对这些点进行逼近拟合, 可得到一直径为 $7.91 \mu\text{m}$ 的圆曲线, 拟合确定系数为 0.995, 均方根误差仅为 0.1147。从图 7(c)、(d) 所示的定量评估数据来看, 重建结果与原模型吻合得较好, 验证了基于两幅非正交相位图提取对应投影像素点之间的关系进而快速反演样本三维形态的可行性。

4 结 论

本文提出一种适用于液-液相分离凝聚物形态分析的方法。采用单个传感器基于干涉相位成像技术获得两幅样本的相位分布图, 对相位图按像素点逐点检测凝聚物亚结构在投影面上的边界点坐标, 由此分别获得样本投影在两个成像面上的结构轮廓。基于

相位体几何特征, 通过逼近拟合的方式选取和布置控制点, 建立三维空间坐标与其对应的平面投影坐标之间的映射关系, 进而通过平面投影坐标反演获得相位体的三维空间坐标, 实现相位体的三维形态重建。该形态分析方法仅需采集两幅相位图, 计算处理耗时 0.05 s 左右, 可为液-液相分离这类无色透明物体的原态实时检测研究提供参考。同时也注意到, 所提方法简便快速, 对于液-液相分离球形或类球形相位体可以较好地实时反演其三维形态, 但是对于不规则相位体的重建尚需提高计算精度, 其中建立二维-三维映射的控制点的提取是一个关键因素, 后续拟考虑引入机器学习算法来确定控制点的坐标及数量。如何在实验条件下针对不同特征的样本, 根据不同的检测要求, 配置合适数量和位置的控制点是本课题组正在积极探索的课题。

参 考 文 献

- [1] Brangwynne C P. Phase transitions and size scaling of membraneless organelles[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2013, 203(6): 875-881.
- [2] Hyman A A, Weber C A, Jülicher F. Liquid-liquid phase separation in biology[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2014, 30: 39-58.
- [3] Molliex A, Temirov J, Lee J H, et al. Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization[J]. *Cell*, 2015, 163(1): 123-133.
- [4] Banani S F, Lee H O, Hyman A A, et al. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, 18(5): 285-298.
- [5] Alberti S, Gladfelter A, Mittag T. Considerations and challenges in studying liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates[J]. *Cell*, 2019, 176(3): 419-434.
- [6] 吴荣波, 李丕龙. 液-液相分离与生物分子凝集体[J]. *科学通报*, 2019, 64(22): 2285-2291.
Wu R B, Li P L. Liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2019, 64(22): 2285-2291.
- [7] Li P L, Banjade S, Cheng H C, et al. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins[J]. *Nature*, 2012, 483(7389): 336-340.
- [8] Mehta S, Zhang J. Liquid-liquid phase separation drives cellular function and dysfunction in cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2022, 22(4): 239-252.
- [9] Banani S F, Rice A M, Peeples W B, et al. Compositional control of phase-separated cellular bodies[J]. *Cell*, 2016, 166(3): 651-663.
- [10] Langdon E M, Gladfelter A S. A new lens for RNA localization: liquid-liquid phase separation[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2018, 72: 255-271.
- [11] Schmidt H B, Görlich D. Transport selectivity of nuclear pores, phase separation, and membraneless organelles[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2016, 41(1): 46-61.
- [12] Wegmann S, Eftekharzadeh B, Tepper K, et al. Tau protein liquid-liquid phase separation can initiate tau aggregation[J]. *The EMBO Journal*, 2018, 37(7): e98049.
- [13] Boulay G, Sandoval G J, Riggi N, et al. Cancer-specific retargeting of BAF complexes by a prion-like domain[J]. *Cell*, 2017, 171(1): 163-178.e19.
- [14] Luby-Phelps K. The physical chemistry of cytoplasm and its influence on cell function: an update[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2013, 24(17): 2593-2596.
- [15] 关苑君, 马显才. 光学显微成像技术在液-液相分离研究中的应用[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2022, 43(3): 504-510.
Guan Y J, Ma X C. Application of optical microscopic imaging technology in liquid-liquid separation research[J]. *Journal of Sun Yat-Sen University (Medical Sciences)*, 2022, 43(3): 504-510.
- [16] Setru S U, Gouveia B, Alfaro-Aco R, et al. A hydrodynamic instability drives protein droplet formation on microtubules to nucleate branches[J]. *Nature Physics*, 2021, 17(4): 493-498.
- [17] Bai C, Peng T, Min J W, et al. Dual-wavelength in-line digital holography with untrained deep neural networks[J]. *Photonics Research*, 2021, 9(12): 2501-2510.
- [18] Park J, Brady D J, Zheng G A, et al. Review of bio-optical imaging systems with a high space-bandwidth product[J]. *Advanced Photonics*, 2021, 3(4): 044001.
- [19] 杨泽文, 张璐, 吕宁, 等. 生物折射率三维无标记定量成像研究进展[J]. *中国激光*, 2022, 49(5): 0507201.
Yang Z W, Zhang L, Lü N, et al. Progress of three-dimensional, label-free quantitative imaging of refractive index in biological samples[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(5): 0507201.
- [20] Zeng M L, Shang Y, Araki Y, et al. Phase transition in postsynaptic densities underlies formation of synaptic complexes and synaptic plasticity[J]. *Cell*, 2016, 166(5): 1163-1175.
- [21] 季颖, 黄锦槟, 李响, 等. 基于正交采样的相位体三维形态快速重建算法[J]. *光学学报*, 2021, 41(23): 2312006.
Ji Y, Huang J B, Li X, et al. Fast three-dimensional morphological reconstruction algorithm of phase objects based on orthogonal sampling[J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(23): 2312006.
- [22] 李婷婷, 冯大伟, 李琦, 等. 基于显微镜数字图像的荧光免疫层析定量检测方法[J]. *中国激光*, 2020, 47(11): 1107001.
Li T T, Feng D W, Li Q, et al. Quantitative detection method of fluorescence immunochromatography based on microscopic digital image[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(11): 1107001.
- [23] He W L, Dou J T, Yang Z M, et al. Sequential shift absolute phase aberration calibration in digital holographic phase imaging based on Chebyshev polynomials fitting[J]. *IEEE Photonics Journal*, 2019, 12(1): 6900111.
- [24] Tang M, Liu C, Wang X P. Autofocusing and image fusion for multi-focus plankton imaging by digital holographic microscopy[J]. *Applied Optics*, 2020, 59(2): 333-345.
- [25] 郑南南, 黄钢. 小动物活体光学三维成像系统及其对乳腺癌的定量分析[J]. *激光生物学报*, 2022, 31(3): 215-223.
Zheng N N, Huang G. Small animal living three-dimensional optical imaging system and its quantitative analysis of breast cancer [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2022, 31(3): 215-223.
- [26] 龚凌冉, 贾希宇, 徐媛媛, 等. 基于正交双波长测量的有核细胞三维形态重建[J]. *中国激光*, 2022, 49(20): 2007206.
Gong L R, Jia X Y, Xu Y Y, et al. Three-dimensional morphological reconstruction of nucleated cell based on orthogonal dual-wavelength measurement[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(20): 2007206.
- [27] Majeed H, Sridharan S, Mir M, et al. Quantitative phase imaging for medical diagnosis[J]. *Journal of Biophotonics*, 2017, 10(2): 177-205.

Rapid Analysis Method for Liquid-Liquid Phase Separation Condensate Morphology Based on Sparse Data

Jia Xiyu, Gong Lingran, Xu Yuanyuan, Ji Ying*

School of Physics and Electronic Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China

Abstract

Objective Intracellular liquid-liquid phase separation is related to various biological processes in cells. Analysis of the phenomenon and the phase separation mechanism can provide a reference and strategy for regulating cell physiological processes and drug development. Phase imaging technology is used in the study of liquid-liquid phase separation because it is highly advantageous for contactless and label-free quantitative observation of colorless transparent objects. However, in this technique, the sample thickness

is coupled to its refractive index, and the morphological distribution must be inverted using the corresponding algorithm. The efficiency of the analysis depends largely on the amount of data acquired, time required for calculation and processing, and accuracy. To meet the demand for the real-time acquisition of morphological information of phase-separated condensates in the field of life science research, this study proposes a fast inversion method for three-dimensional morphology using only two phase images and a design of an interferometric phase imaging system with dual optical information acquisition using a single image sensor.

Methods A method for the morphological analysis of liquid-liquid phase separation aggregates is proposed in this paper. The first step in this method is to use a single sensor based on interferometric phase imaging technology to collect two sample phase distribution maps incident in the nonorthogonal directions. The second step is to extract the edges of these phase images. The boundary point coordinates of the agglomerate substructure on the projection surface were detected point-by-point according to the pixel points of each phase image to obtain the structural contours of the sample projection on the two imaging surfaces. The next step is to select and arrange the obtained control points using approximation fitting based on the geometric characteristics of the phase volume. A direct linear transformation was used to select the control points to solve the quantitative relationship between the spatial and projection plane coordinates. Based on this correlation, the corresponding three-dimensional coordinates in the same spatial coordinate system were calculated from the two-dimensional coordinates of the undetermined points. Thus, the three-dimensional shape reconstruction of the phase volume was realized.

Results and Discussions To elaborate the principles and steps of the algorithm, this study uses the nucleus model as an example to extract the surface morphology of the liquid-liquid phase separation condensate, such as the internal nucleolus, and establishes a two-medium concentric ellipsoid model (Fig. 2) to simulate the internal structure of the nucleus and design polystyrene microspheres [Fig. 7 (c)]. This reconstruction algorithm yielded better reconstruction results for the two-medium concentric ellipsoid model and polystyrene microspheres [Figs. 6 and 7 (d)]. The reconstruction of the sphere and ellipsoid demonstrated the effectiveness of the algorithm for different feature surfaces and the time efficiency of inversion calculation (Table 2). The processing speed satisfied the requirements of real-time analysis. The rapid reconstruction of the polystyrene microspheres also shows the feasibility of first extracting the relationship between the corresponding projection pixels based on two non-orthogonal phase maps and then quickly inverting the three-dimensional shape of the sample.

Conclusions A method for the morphological analysis of liquid-liquid phase separation condensates was proposed. A single sensor was used to obtain the phase distribution diagrams of the two samples based on interferometric phase imaging technology. The boundary point coordinates of the condensate substructure on the projection plane were detected point-by-point based on the pixel points of the phase diagram, and the structural contours of the sample projection on the two imaging planes were obtained. Based on the geometric characteristics of the phase volume, the control points were selected and arranged using approximation fitting, and a mapping relationship between the three-dimensional space coordinates and the corresponding plane projection coordinates was established. Subsequently, the three-dimensional space coordinates of the phase volume were obtained through plane projection coordinate inversion, and a three-dimensional shape reconstruction of the phase volume was realized. The proposed morphological analysis method only needs to collect two phase diagrams, which requires a calculation time of approximately 0.05 s, which can provide a reference for the real-time detection of transparent objects such as liquid-liquid phase separation. It should be noted that this algorithm is simple and rapid. For the liquid-liquid phase separation of such spherical or spheroid phase bodies, the three-dimensional shape can be efficiently inverted in real time, but the reconstruction of irregular phase bodies still requires improvement in terms of calculation accuracy. The selection of control points to establish two-dimensional-three-dimensional mapping is a key factor. In the future, machine-learning algorithms can be considered to determine their coordinates and numbers. To address the difficulty in selecting control points under experimental conditions, this study proposes an operation scheme for the fitting approximation. The configuration of the appropriate number and location of control points for different feature samples under experimental conditions, according to different detection requirements, is a problem that we are currently exploring.

Key words bio-optics; interferometric imaging; liquid-liquid phase separation; edge extraction; projective mapping; three-dimensional coordinates