

高光谱干涉重构的非标记定量显微成像技术

符荣鑫^{1*}, 艾昕¹, 张书豪², 费捷³, 覃珊¹, 胡汉奇¹, 周天启¹, 张帅龙⁴, 李航¹¹北京理工大学医学技术学院, 北京 100081;²北京理工大学自动化学院, 北京 100081;³中国船舶集团有限公司系统工程研究院, 北京 100094;⁴北京理工大学集成电路与电子学院, 北京 100081

摘要 长时程细胞成像及分析在生物医学研究中具有重要意义。然而,由于荧光显微镜存在光漂白和光毒性等问题,其应用受到一定限制。非标记成像技术为克服这些限制提供了可行的解决方案。研究了干涉光谱分析技术作为解决非标记长时程活细胞监测问题的潜在方法,并提出了一种基于高光谱干涉重构的非标记定量显微成像技术。通过建立描述干涉信号的数学模型,设计样本定量重构算法,从而获取活细胞纳米结构和干质量分布的定量信息。系统采用自反射式干涉结构,不依赖复杂的光学调制元件,结构简单、操作便捷。此外,本文还在光学显微成像的基础上集成了具有细胞培养能力的微型细胞培养箱,实现了原位长时程成像。利用该系统,研究了不同细胞全细胞周期内的纳米结构定量和干质量变化,展示了本工作在生物医学领域的应用潜力。

关键词 计算成像; 定量干涉; 非标记成像; 纳米级精度; 原位细胞监测

中图分类号 O438

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL231463

1 引言

长时程细胞成像与分析在生物医学研究和临床诊断中扮演着不可或缺的角色。活细胞的有效、持续纳米级成像能够揭示微观尺度上的天然、动态、亚细胞水平变化,对于掌握长时程细胞形态学信息和代谢情况至关重要^[1]。为了实现有效和连续的细胞成像,超分辨率的荧光显微镜已成为广泛使用的成像手段^[2-4]。然而,荧光成像固有的光毒性和光漂白限制了荧光显微镜对活细胞的长时间稳定成像^[5]。而且,将荧光基因导入活细胞的样品制备过程通常非常复杂。同样,荧光标记问题也阻碍了共聚焦显微镜和双光子显微镜的广泛应用^[6]。为了解决这些问题,非标记成像技术提供了一种可行的解决方案。其中,相衬(PC)成像和微分干涉差(DIC)显微镜是两种典型方法。然而,这两种技术都只能提供定性的图像,定量的非标记成像技术则需要进一步的开发。

干涉光谱分析可揭示样品表面的纳米级波动,近年来在分子检测领域受到了广泛关注^[7-9]。该技术无需精密仪器产生可解析的相干信号,不需要昂贵的光学配置或组件,通过对采集的干涉光谱数据进行算法重构便可得到定量成像结果^[10]。此外,该技

术不依赖显微物镜自身的片层选择能力,这就使得物镜无需过于接近样品表面,为微型细胞培养装置提供了装配空间^[11-12]。因此,干涉光谱分析是一种解决非标记活细胞原位分析现存问题的极有发展潜力的方法。

本文提出了一种高光谱干涉成像系统来实现非标记活细胞长时程原位分析,该系统实现了纳米结构的定量成像和飞克级干质量的测量。细胞生长基底的反射光和细胞内的散射光产生相干信号,隐含着样品的三维结构和干质量分布信息^[13-15]。本文的核心创新点在于提出了高光谱干涉重构的非标记定量显微成像技术,通过建立描述干涉信号的数学模型,设计了样本定量重构算法,同时获得活细胞定量的纳米结构和干质量分布。相比于同类工作,本研究中的成像系统采用自反射式干涉结构,不依赖复杂的光学调制元件。本文还在光学显微成像基础上构建了具有细胞培养能力的集成式微型细胞培养箱,能够实现原位长时程成像,同时利用该系统研究了不同细胞全细胞周期内的定量纳米结构与干质量动态变化,展示了所提出的方法与系统在生物医学领域的潜在应用。

收稿日期: 2023-12-01; 修回日期: 2024-01-29; 录用日期: 2024-02-05; 网络首发日期: 2024-02-20

基金项目: 国家自然科学基金(62105177, 62103050)、国家重点研发计划(2023YFE0112400, 2022YFA1207100, 2023YFF0721501)、中国科协青年人才托举计划(2023QNRC001)

通信作者: *furongxin@bit.edu.cn

2 基本原理

2.1 高光谱干涉重构的非标记定量成像方法

如图 1(a) 所示, 活细胞培养在单晶硅片基底上, 宽带光源 $U_1(\lambda)$ (λ 为波长) 经物镜透过培养液垂直照射于细胞表面, 被细胞器、生物大分子散射, 用 $U_1(\lambda)$ 表示。宽带光透过细胞被基底反射, 用 $U_2(\lambda)$ 表示。设培养液折射率为 n_0 , 细胞内 (x, y, z) 处的折射率为 $n_1[1 + n_\Delta(x, y, z)]$, 其中 n_1 为细胞质基质平均折射率, $n_\Delta(x, y, z)$ 为细胞内 (x, y, z) 处折射率相对 n_1 的变化率。

依散射光的傅里叶光学描述, 像素 (x, y) 处被物

镜收集到的散射信号^[16]可表示为

$$U_1(\lambda) = \frac{4n_0n_1}{i(n_0 + n_1)^2} U(\lambda) \int_{\lambda_0}^{2\pi} n_\Delta(z) \exp\left(-\frac{4\pi n_1 z}{\lambda}\right) dz, \quad (1)$$

式中: i 表示虚数运算符; λ_0 为中心波长。若细胞厚度为 D , 则依照菲涅耳系数与远场光传播理论^[17], 可得

$$U_2(\lambda) = -\frac{2n_1}{n_0 + n_1} \exp\left(-\frac{4\pi n_1 D}{\lambda}\right) U(\lambda). \quad (2)$$

光谱仪采集到的反射光谱^[18]可以表示为

$$R(\lambda) = \frac{|U_1(\lambda) + U_2(\lambda)|^2}{U^2(\lambda)} = \frac{4n_1^2}{(n_0 + n_1)^2} + \frac{8in_0n_1^2}{(n_0 + n_1)^3} \int_{\lambda_0}^{2\pi} n_\Delta(z) \exp\left[-\frac{4\pi n_1(z + D)}{\lambda}\right] dz. \quad (3)$$

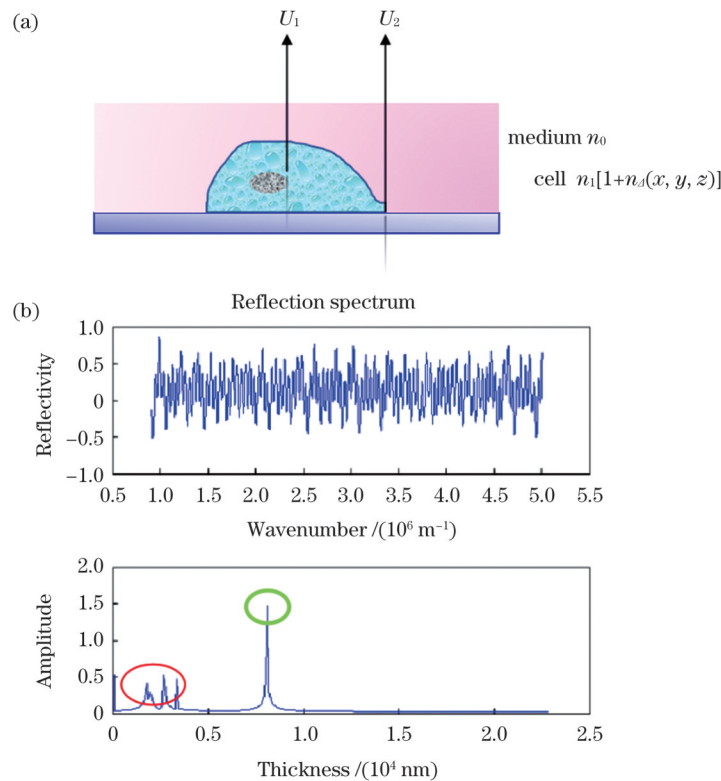


图 1 高光谱干涉信号的(a)模型示意图及(b)重构算法示例

Fig. 1 (a) Schematic diagram of hyperspectral interference signals and (b) reconstruction algorithm example

依参考文献^[15], 平均折射率与密度呈近似线性关系, 由此可计算细胞的干质量分布。本文中干质量是通过体素的平均密度乘以实际物理尺寸得到的。根据 Gladstone-Dale 公式, 平均密度近似等于平均折射率减去水的折射率, 再除以 0.18 mL/g 得到。折射率参量 $n_\Delta(z)$ 与轴向位置 z 分别通过快速傅里叶变换 (FFT) 后的强度和频率求得^[19], 带有干涉信息的反射光谱通过 FFT 变换, 得到空域最大的峰, 对应的横坐标为 $2n_1D$, 其他的峰横坐标为 $2n_1z$, 空域最大的峰对应的纵坐标为 $\frac{8n_0n_1^2}{(n_0 + n_1)^3} \times \frac{2\pi n_\Delta(z)}{\lambda_0}$, 除以相应的系数

便可获得折射率与轴向位置, 二者间没有串扰, 可同时获得轴向超分辨率的结构成像, 也可获得细胞内定量的干质量分布。

2.2 高光谱干涉的显微成像系统

系统的机电结构如图 2(a) 所示, 整体结构是一套正置显微结构, 在此基础上安置有扫描台、培养箱、光谱仪、自行研发的电路板等结构, 同时还有光纤接口、储液瓶等配件。机械结构设计通过 SolidWorks 软件完成, 关键元件包括: 海洋公司的 Maya2000 光谱仪, 范围可达 185~1100 nm, 光谱分辨率达到 0.44 nm, 光源选用卤素灯, 压电扫描平台选用美国 PI 公司的二维压电陶瓷, 最小步进仅 0.6 nm。

如图 2(b) 所示, 高光谱干涉成像系统的主体是宽场反射式显微成像结构。宽带光源通过光纤导入系统, 放置在聚焦透镜的焦点处。透过聚焦透镜的光束被准直为平行光, 再通过场镜和孔径光阑。场镜用于限制成像范围, 而孔径光阑用于将平行光截取一部分进入物镜。物镜对高光谱白光干涉成像系统内的样品进行显微成像, 样品可以是活细胞样品, 也可以是 DNA 微阵列芯片样品。如若样品是活细胞, 则需要培养箱来保持细胞的活性, 使得原位长时程的细胞成像得以实现。但无论是哪种样品, 均需要将硅片基底放置在扫描平台之上, 根据实际实验需求设置扫描平台的扫描范围与扫描步进。分束镜将物镜

形成在无穷远的像反射到成像透镜处, 成像透镜再将物镜所成的无穷远处显微图像聚焦到图像传感器 (CCD) 和光纤之上。图像传感器与光纤通过分束镜同时处于成像透镜的焦点处, 使得二者所得到的像是一致的。成像透镜将物镜所成的像进一步放大, 本系统的总放大倍数能够达到 400 倍以上, 这样的放大倍数能够弥补光纤内径较粗的缺点, 使得成像的分辨率不会被光纤削弱。针对光纤无法实时反映成像效果的问题, 本系统在采集光谱之前使用图像传感器确定样品处于物镜焦点之上, 以防止扫描后的重构图像出现失焦情况。计算机则用于采集光谱并处理光谱。

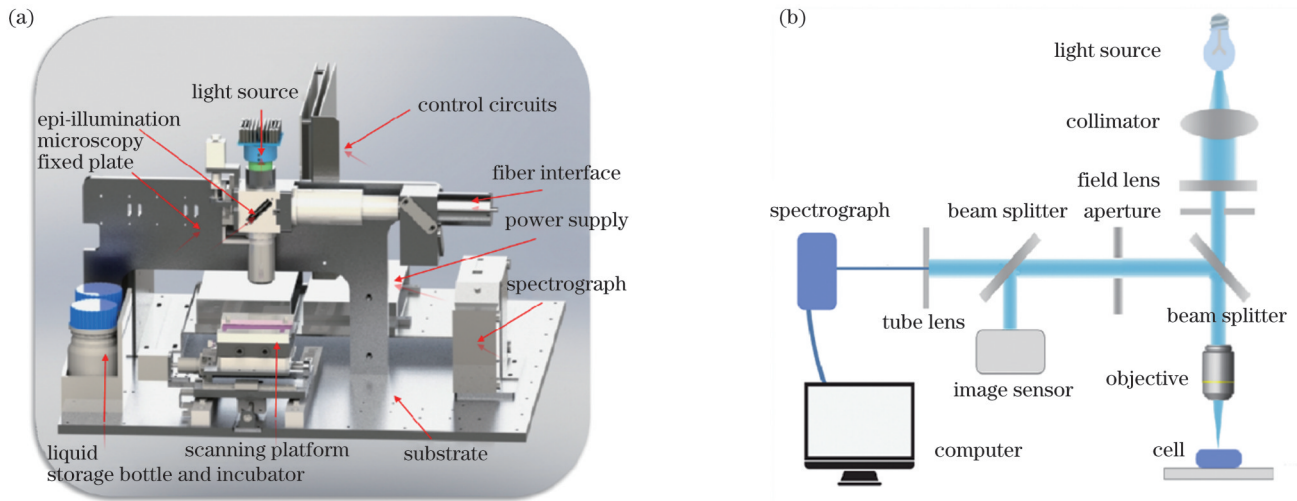


图 2 高光谱干涉成像系统的 (a) 机电与 (b) 光学结构

Fig. 2 (a) Electromechanical and (b) optical structure of hyperspectral interferometric imaging system

与常规的正置宽场光学显微镜相比, 本系统的主要特点在于: 1) 成像单元不再是常见的成像相机, 而是采用了光纤-光谱仪结构实现高光谱的成像。这一配置使得系统可以采集 200~1100 nm 的光谱数据, 能够对干涉重构算法提供有力支持; 2) 在样品下方配置了亚纳米级步进精度的二维扫描平台, 用于逐点扫描样品, 可以实现最小 0.16 nm 的扫描步进; 3) 配有集成的活细胞培养箱, 不同于常规显微镜配有的培养箱, 本系统配置的培养箱具备液体输送功能。该功能使得细胞培养液可以不断输送, 甚至可以对细胞进行药物或其他化学物质的定量加入, 实现长时间的活细胞原位成像。因此该系统在长时间活细胞实验中, 无需对细胞样品定期手动更换培养液, 从而避免细胞因外界干扰而影响生长代谢。更重要的是, 该液体输送功能同样可以应用于对细胞施加定量的药物或其他成分作用, 而不中断对细胞的成像, 从而完整记录细胞在加药情况下的动态变化。在后续实验中, 成像系统选用了 40× 的放大倍数, 数值孔径为 0.6 的物镜, 光纤为多模态光纤, 范围覆盖紫外到近红外波段, 内芯直径 200 μm。

系统的控制设计如图 3(a) 所示, 单片机负责扫描

控制、传感器读取与培养箱控制, 计算机负责图像传感器的读取、光谱的采集与成像。扫描控制如右上角所示, 包括三维电机的二相四拍控制和用于控制压电平台的 0~10 V 的 16 位数字-模拟转换器 (DAC) 信号。传感器读取如右下角所示, 包括温度传感器和 CO₂ 浓度传感器, 模拟-数字转换器 (ADC) 用于读取压电平台反馈信号, 光电开关用于定位, 以便将样品放入培养装置。培养箱控制如左下角, 包括冷凝保护、温湿度控制和 CO₂ 浓度控制等功能。系统的软件部分如图 3(b) 所示, 软件采用 C# 开发, 通过串口实现与单片机的通信, 调用图像传感器与光谱仪的二次开发接口实现软件设计。

2.3 微型原位活细胞培养装置

微型活细胞培养装置结构如图 4(a) 所示, 从左至右依次展示装置外观结构、内部结构和立体装配图。装置内可放置各规格标准培养皿, 可同时控制 CO₂ 浓度与温湿度。CO₂ 浓度传感器采用英国 GSS 红外传感器, 精度可达 20×10^{-6} , 预热时间仅 120 s。温度传感器采用 Pt100 搭配惠斯通电桥, 精度可达 0.1 °C。控制算法使用自适应比例-积分-微分 (PID) 算法, 采用加热

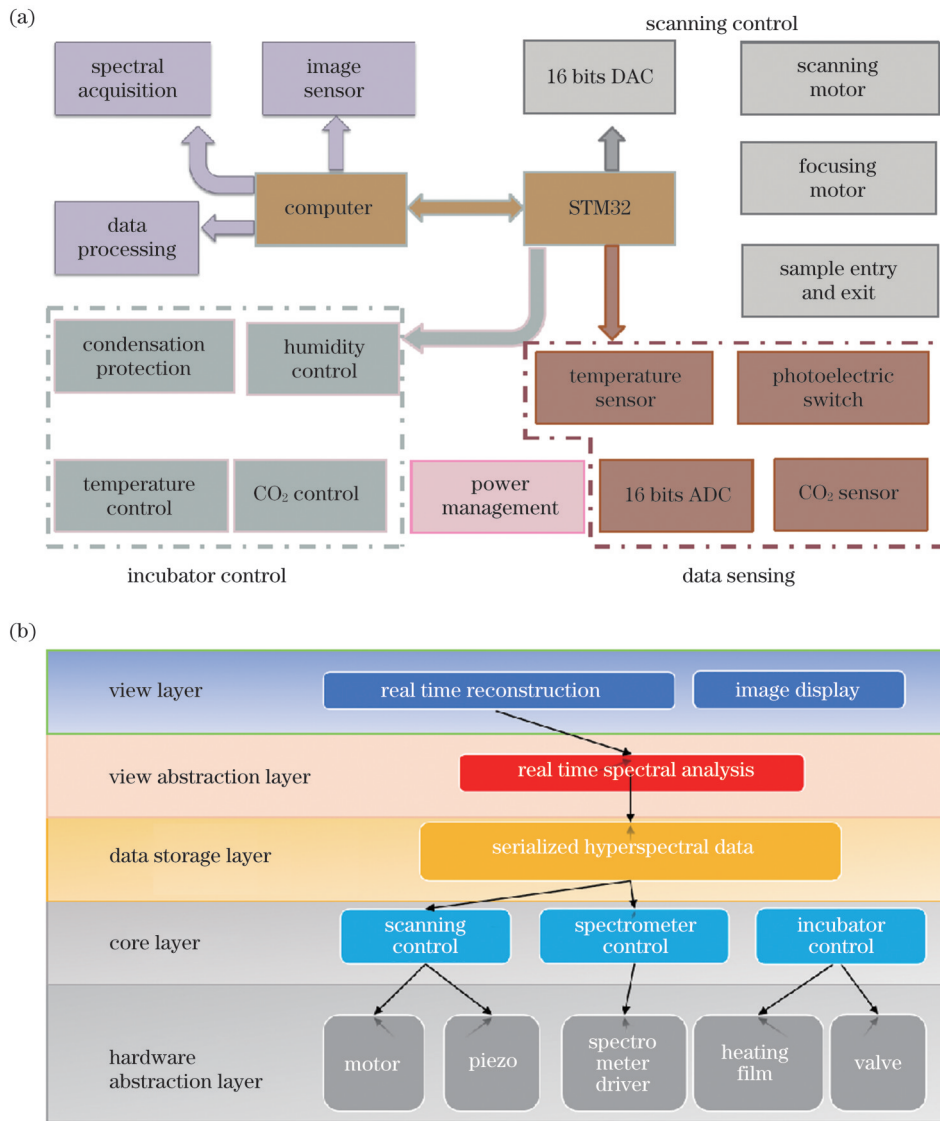


图 3 高光谱干涉成像系统的(a)控制设计和(b)软件设计

Fig. 3 (a) Control and (b) software design of the hyperspectral interferometric imaging system

膜与氧化铟锡(ITO)双面加热,通过加热超纯水保障湿度,通过加热 ITO 玻璃防止玻璃出现冷凝液珠。 CO_2 浓度传感器前放置冷凝器防止相对湿度过大影响浓度检测。装置设有用来连通气瓶、液体瓶的硅胶接口,密封程度较高。加热膜用于保持培养箱内部环境的温度在 $37\text{ }^\circ\text{C}$,与此同时,加热膜还可以对加湿盒进行加热,当培养箱内部的温度控制在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 时,由于加湿盒为金属材质且直接接触加热膜,其温度高于培养箱内部的气体,因此加湿盒表面的高温可以加热加湿盒内部的水,使其加速蒸发,以保障培养箱内部的相对湿度足够培养细胞。载物台放置在加湿盒上方,用于放置细胞样品。在载物台与加湿盒之间夹有一层保温石棉,用于隔离载物台与加湿盒,避免加湿盒表面的高温加热载物台。通过进水口对加湿盒加水,通过二氧化碳入口对培养环境通入事先配好的体积分数 5% 的二氧化碳。电气连接接口用来将加热膜和温度传感器

的导线通过该接口接到电路板之上,完成温度的测量和控制。培养液进出口共有两个,一个用来抽取已经使用过的旧培养液,一个用来通入新鲜培养液体。图 4(b)展示了制备的培养装置的温度、 CO_2 体积分数控制效果,与培养 40 h 后细胞的生长状态。可以看出,温度控制的超调小于 $1\text{ }^\circ\text{C}$ 、稳态误差小于 $0.5\text{ }^\circ\text{C}$, CO_2 体积分数控制的稳态误差仅 0.3% ,细胞在原位培养了 40 h 后可保持良好的贴壁形态,部分细胞从图像上看,进入分裂过程,显示了较好的细胞活性。

3 分析与讨论

如图 5 所示,本文对加工过的三维二氧化硅仿体和培养状态的单个 HeLa 细胞进行了显微成像与高光谱干涉重构成像。关于三维二氧化硅仿体,其扫描电子显微镜照片、高光谱干涉重构图及其三维重构效果分别如图 5(a)~(c)所示,颜色表示厚度信息。对于二

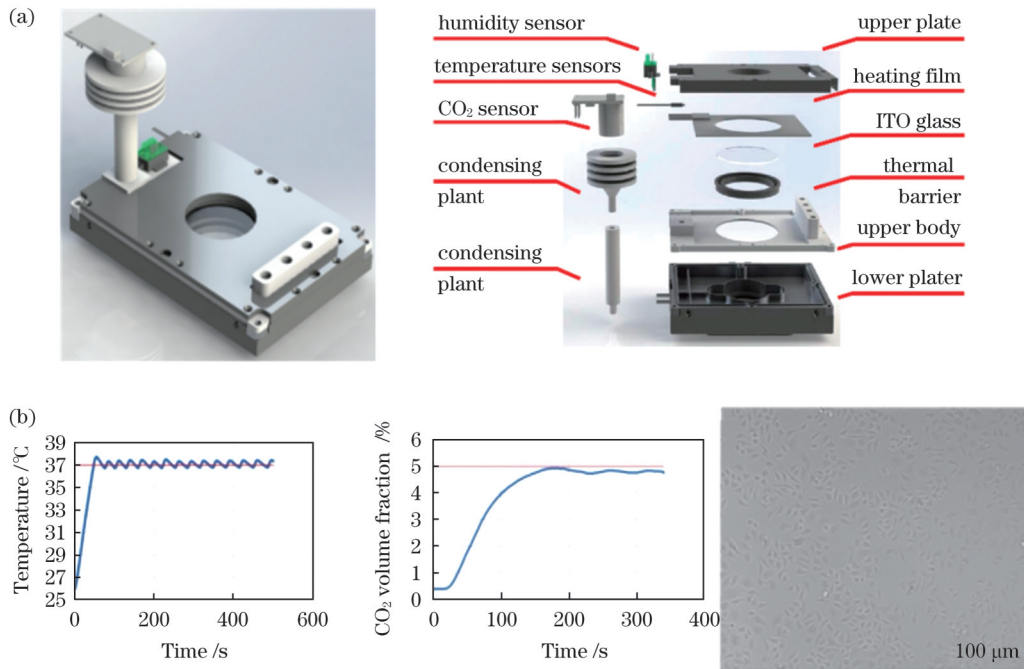


图 4 微型活细胞培养装置(a)结构图与(b)性能效果
Fig. 4 (a) Structure and (b) performance of the miniature live cell incubator

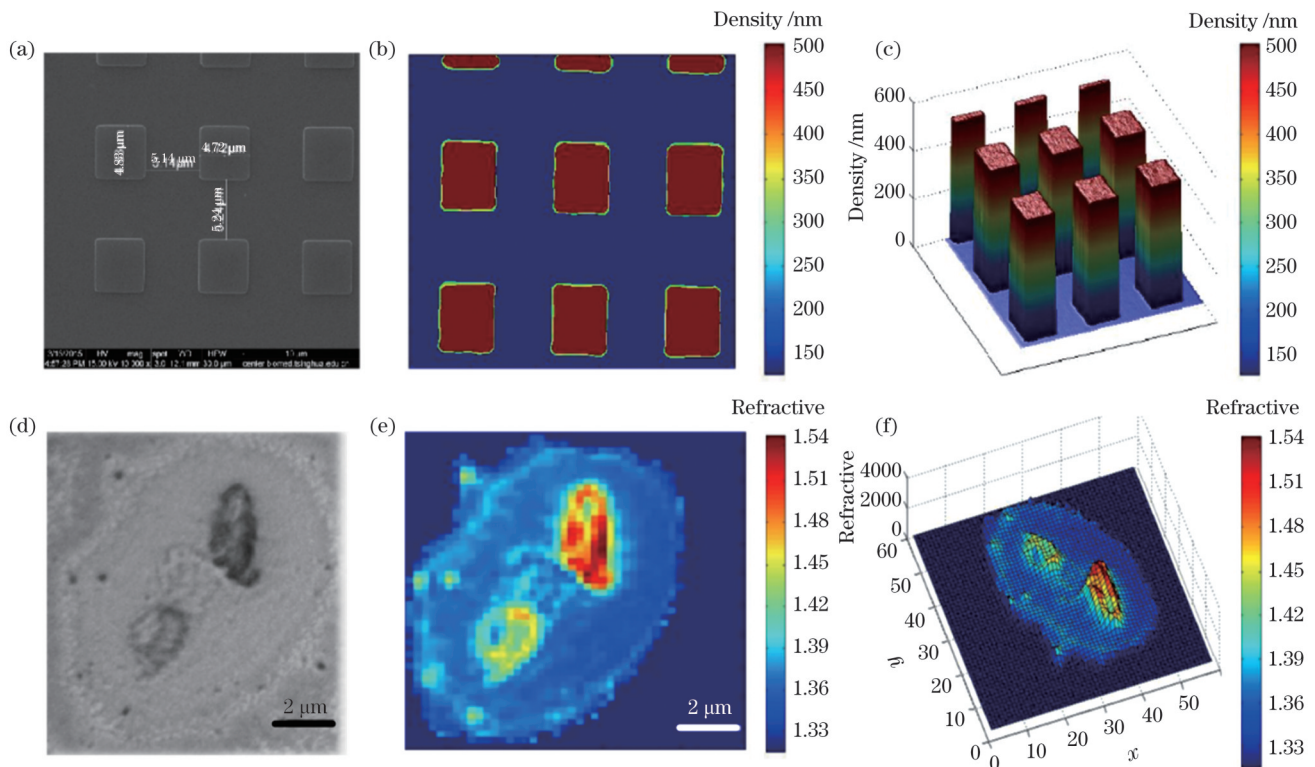


图 5 高光谱干涉重构结果。(a)仿体的扫描电镜成像结果;(b)仿体的高光谱干涉成像;(c)仿体的三维重构图;(d)单个HeLa细胞的明场显微成像;(e)同一细胞的高光谱干涉的成像;(f)同一细胞的伪三维重构图

Fig. 5 Hyperspectral interferometric reconstruction results. (a) Scanning electron microscopic imaging of the phantom; (b) hyperspectral interference imaging of the phantom; (c) three-dimensional reconstruction of the phantom; (d) bright-field microscopic imaging of a single HeLa cell; (e) hyperspectral interferometric imaging of the same cell; (f) pseudo three-dimensional reconstruction of the cell

氧化硅仿体,制备的参数为折射率 1.46,高度 500 nm。实验中,将折射率 1.46 作为已知参数,测量仿体的厚

度信息。实验中选用 100 nm 的扫描步进,在二维平面逐点采集干涉高光谱并计算高度。得到的实测结果,

高度的平均值为 501.27 nm。干涉重构的厚度误差仅 1.27 nm,且可还原仿体的三维结构。对于培养状态的单个 HeLa 细胞,明场显微成像结果如图 5(d)所示,利用高光谱干涉重构的同一个 HeLa 细胞如图 5(e)所示,颜色表示折射率信息。高光谱干涉成像技术不仅能解析细胞内的折射率分布,更能够得到细胞内物质在厚度上的分布信息,可根据重构得到的折射率数值形成样品断层的伪三维成像结果,如图 5(f)所示。结合上文介绍的沿波数做 FFT 即可映射到轴向空域上,得到轴向上的细胞折射率分布与细胞整体厚度信息,图 5(e)、(f)为细胞折射率分布结果,受限于细胞整体厚度难以用其他非标记方法表征,采用标准氧化层厚度的硅片作为仿体,展示了本文提出的高光谱干涉成像技术对样品厚度信息的定量检测能力,该实验结果如图 5(b)、(c)所示。在图 5(c)、(f)中,二维成像面上的坐标表示扫描时的采样点,图 5(c)纵轴的坐标表示重构得到的仿体厚度,图 5(f)纵轴的坐标表示重构得到的折射率。不同于明场显微成像,高光谱干涉成像结果的颜色信息表示成像面对应像素的折射率信息,能够提供样品本征的物理信息,而不受照明、曝光等条件影响。对于二氧化硅仿体与单个 HeLa 细胞成像效果的差异问题,本文所提出的高光谱干涉成像技术在成像原理上,依然受到光学成像系统在二维平面上衍射极限的限制。值得注意的是,对于仿体样品,标准氧

化层部分的高度近似均一,这部分在二维成像平面上的显微结果也是相对均匀的,不涉及样品像素之间异质致性带来的衍射干扰,因此可以将扫描步进精细到几十纳米甚至更低,在图 5(b)实验中,选择 100 nm 作为扫描步进。对于生物样品,成像面的各个像素之间折射率不同,由于衍射作用,图像相邻像素之间会有一定相互影响。由于选用的光源是宽带可见光,系统的理论分辨率约为 500 nm,因此对图 5(e)中的生物样品选用 500 nm 作为扫描步进,该参数的选择是为了提升成像速度,动态获取细胞图像。这样的差异造成了图像采样率的不同,所以二氧化硅仿体的高光谱干涉成像结果清晰且图像光滑,细胞的高光谱干涉成像结果呈现出明显的像素化。进一步地,本文通过实验进行了 HeLa 细胞与 HCerEpiC 细胞全细胞周期的定量成像,比较了两种细胞的干质量变化,如图 6(a)所示,点状标注的曲线表示多颗细胞的平均情况,三角标注的曲线表示单颗细胞的数据。可以看到对于 HeLa 这种肿瘤细胞,细胞的干质量增长是几乎不受限制的多倍增长。而对于 HCerEpiC 细胞这种正常上皮细胞,细胞的干质量在一个细胞周期内近似翻倍增长,表明不同细胞呈现了不同的生长模式。HeLa 细胞的干质量在 M 期之前持续增加,而 HcerEpiC 的干质量先增加后略微减少。干质量生长曲线在有丝分裂前有两个典型阶段。对于 HeLa 细胞,第一阶段的平均生长率为

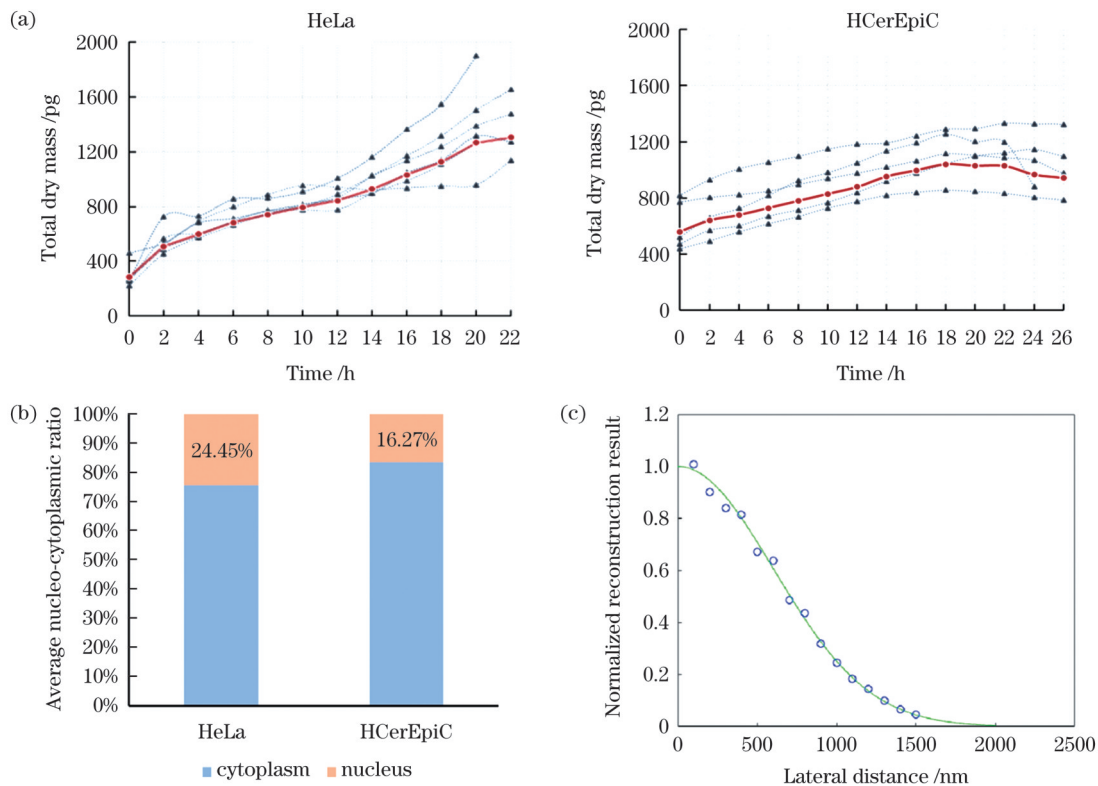


图 6 两种不同细胞的干质量及其分布对比。(a)两种不同细胞全细胞周期的总干质量变化;(b)两种不同细胞的核质比比较;(c)系统横向分辨率验证

Fig. 6 Comparison of the dry mass and distribution of two different cells. (a) Total dry mass changes across the entire cell cycle of the two cells; (b) comparison of the nucleo-cytoplasmic ratio of the two different cells; (c) lateral imaging resolution test

5.3%，这是相对平坦的；第二阶段的平均生长率为 19.7%，这表明由于合成了大量用于细胞分裂的物质而快速生长。然而，HCerEpiC 的生长模式却大不相同。在第一阶段，平均细胞生长率为 8.0%。在第二阶段，细胞的干物质减少，生长率为 -6.9%。图 6(b) 展示了两种不同细胞在全细胞周期范围内的核质比，可以看到相比于 HCerEpiC 细胞的 16.27%，HeLa 细胞的核质比提升为 24.45%，核内干质量占比更重。对于干质量测量，由于细胞的干质量难以用金标准方法表征，本文中选择利用间接的方法计算测量精度。系统的二维扫描步进为 500 nm。即该成像系统中生物样品每个像素的实际物理面积为 500 nm×500 nm。本文中干质量是通过体素的平均密度乘以实际物理尺寸得到的。根据 Gladstone-Dale 公式，平均密度近似等于平均折射率减去水的折射率后，再除以 0.18 mL/g 得到。对于干涉重构，厚度与折射率是共轭关系，本文在图 5(b)、(c) 中证明了系统对二氧化硅仿体的厚度测量精度达到 1.27 nm。相应地，系统对二维区域的平均密度测量精度可计算为 $1.27 \times 1.46 / 0.18 = 10.3 \text{ g/mL} \cdot \text{nm}$ 。因此每个像素的干质量测量精度为 $500 \times 500 \times 10.3 = 25.75 \times 10^{-18} \text{ g}$ 。

本文研究的高光谱干涉成像技术可以实现活细胞的非标记定量成像。作为一种非标记方法，该系统可用于揭示整个细胞的纳米结构，也可以分辨活细胞不同层的干涉信号，这些特点使得该方法可用于厚样品或散射较强样品的定量成像^[20-22]。这种高光谱白光干涉成像系统不依赖昂贵且精确的光学元件，常见的落射式照明显微设备即可满足成像要求。同时，本研究将细胞培养箱整合到活细胞成像过程中，可以实现长时程的动态成像。为评估系统成像分辨率，利用 500 nm 标准氧化层厚度的硅片，归一化重构结果沿着横向的分布展示在图 6(c) 中。实验中实测的蓝色数据为距离边缘 0~15 μm 范围，以 100 nm 为采样步进得到的归一化重构结果。绿色曲线为利用高斯部分对蓝色点拟合得到的扩散分布曲线。结合绿色曲线与半峰全宽的分辨率判定标准可以得出，系统成像的分辨率为 708.1 nm，即横向距离超过样品实际边缘 708.1 nm 时，样品的重构信号在该像素点处产生的扩散影响为自身信号的一半以下。而对于轴向分辨率，不同于常规光学显微技术，轴向分辨率由三维点扩散函数决定，空间上的一个点会在轴向产生扩散影响成像分辨率。本文所提出方法的轴向分布是通过 FFT 计算得到的，FFT 的分辨率即为成像的轴向分辨率，即 91.89 nm。当空间上两个点的轴向光学高度差超过 91.89 nm，高光谱干涉经过 FFT 会变成两个不同位置的峰，成像方法便可分辨出这是两个点，该指标并无理论和实际的差异。这样的高轴向分辨率是因为光谱范围覆盖了紫外到近红外段，波数范围越大该指标越优异。

成像时间问题上，活肿瘤细胞即使在贴壁状态下

的大小通常也在 20 μm×100 μm 范围内，因此对于活细胞的单向扫描范围可控制在该数值下。扫描步进通常可选用 500 nm，因此实际上的扫描点在 40×200 的范围内。按照 10 ms 的单次光谱曝光时间计算，扫描的总时长为 80 s，光谱处理时间约为 3.4 s，即约 1.5 min 可以得到单个细胞的完整光谱数据。而对于更大的样品，如受精卵样品，控制扫描步进和曝光时间一致时，该方法的成像总时间更长。因此，根据不同的样品大小和成像要求，扫描步进可做适当调整。

对于定量干涉成像来说，轴向信息与折射率是彼此相关的，只有预先已知其中一个参数，才能得到另外一个参数。对于二氧化硅仿体样品，折射率 1.46 是已知的，通过测量厚度来表征该方法对干涉相位的测量能力，这样的处理更加直观接近样本实际情况，即材料固定，三维分布基本均一但略有波动。对于细胞样品，已知的参数是 FFT 算法 91.89 nm 的轴向分辨能力，测量的是在每一个 91.89 nm 轴向切片内，每个像素点轴向的平均折射率信息。平均折射率又与平均质量呈近似线性关系，使得该参数既能用于定量成像，又具备一定生物学意义，如动态干质量分布。最后，值得说明的是，系统并未使用相机直接对样品成像，而是利用光谱仪采集了轴向所有的反射信号或散射信号的总和，再通过算法还原样品不同厚度的反射信号。对于本文中的仿体样品，其本身为均质的二氧化硅层，高光谱干涉信号经过 FFT 变换后仅有一个峰，无论对焦是否精确，只要采集到该峰，便可得到重构结果。但是对于生物样品，该假设并不成立，样品的多层散射使得 FFT 后的峰更加复杂。不精确的对焦或轴向色差会使得峰的强度发生变化，导致对断层下折射率分布测量产生误差。因此，在系统搭建过程中，为了降低色差，本工作在光学系统中的透镜采用了消色差双胶合透镜，物镜也选用了色差修正效果较好的 Nikon ELWD 物镜，且使其工作在色差最小的无限共轭状态。

4 结 论

细胞作为生命活动的基本单位，在各种应用场景下都有着非常重要的意义，包括临床医学诊断、生命科学、基础医学研究等。基于 CO₂ 恒温培养箱、显微技术和荧光标记的细胞形态结构与功能的检测方法，已经不能满足人们对活细胞生长发育、迁移运动、分裂分化、凋亡与癌变，细胞的免疫耐受与反应，细胞吞噬，细胞相互之间、细胞与基质、细胞与可溶性分子的相互作用等复杂细胞行为和功能分析的使用要求。电镜、近场光学、随机光重建显微技术等高分辨率测量方法和色谱、质谱、分光光度测量等分离提纯测量方法，均不适合用于活细胞培养原位在线测量。本文提出的高光谱白光干涉活细胞显微成像技术，采集样品的干涉高光谱信息，通过设计算法实现三维重构，并搭建了配套的自动化集成仪器。该仪器包含反射式光学显微成

像结构、干涉光谱采集与处理模块、样品纳米级精度扫描模块和活细胞培养模块,在一定程度上弥补了当前测量方法的不足,能够实现同时获得活细胞定量的纳米结构和干质量分布的目标。系统采用的自反射式干涉结构,不依赖复杂的光学调制元件,结构简单、操作便捷,为生物医学领域提供了一种新的成像手段。

参 考 文 献

- [1] Skylaki S, Hilsenbeck O, Schroeder T. Challenges in long-term imaging and quantification of single-cell dynamics[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34: 1137-1144.
- [2] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3: 793-796.
- [3] Holden S J, Uphoff S, Kapanidis A N. DAOSTORM: an algorithm for high-density super-resolution microscopy[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(4): 279-280.
- [4] Shroff H, Galbraith C G, Galbraith J A, et al. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(5): 417-423.
- [5] Hoebe R A, van Oven C H, Gadella T W J, Jr, et al. Controlled light-exposure microscopy reduces photobleaching and phototoxicity in fluorescence live-cell imaging[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(2): 249-253.
- [6] Tao X D, Fernandez B, Azucena O, et al. Adaptive optics confocal microscopy using direct wavefront sensing[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(7): 1062-1064.
- [7] Lopez C A, Daaboul G G, Vedula R S, et al. Label-free multiplexed virus detection using spectral reflectance imaging[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2011, 26(8): 3432-3437.
- [8] Ozkumur E, Needham J W, Bergstein D A, et al. Label-free and dynamic detection of biomolecular interactions for high-throughput microarray applications[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(23): 7988-7992.
- [9] Fu R X, Su Y, Wang R L, et al. Single cell capture, isolation, and long-term *in situ* imaging using quantitative self-interference spectroscopy[J]. *Cytometry Part A*, 2021, 99(6): 601-609.
- [10] Fu R X, Su Y, Wang R L, et al. Label-free tomography of living cellular nanoarchitecture using hyperspectral self-interference microscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2019, 10(6): 2757-2767.
- [11] Yi J, Liu W Z, Chen S Y, et al. Visible light optical coherence tomography measures retinal oxygen metabolic response to systemic oxygenation[J]. *Light, Science & Applications*, 2015, 4(9): e334.
- [12] Cherkezyan L, Capoglu I, Subramanian H, et al. Interferometric spectroscopy of scattered light can quantify the statistics of subdiffractive refractive-index fluctuations[J]. *Physical Review Letters*, 2013, 111(3): 033903.
- [13] Uttam S, Liu Y. Fourier phase based depth-resolved nanoscale nuclear architecture mapping for cancer detection[J]. *Methods*, 2018, 136: 134-151.
- [14] Bhaduri B, Pham H, Mir M, et al. Diffraction phase microscopy with white light[J]. *Optics Letters*, 2012, 37(6): 1094-1096.
- [15] Mir M, Wang Z, Shen Z, et al. Optical measurement of cycle-dependent cell growth[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(32): 13124-13129.
- [16] Ma Y, Guo S Y, Pan Y, et al. Quantitative phase microscopy with enhanced contrast and improved resolution through ultra-oblique illumination (UO-QPM) [J]. *Journal of Biophotonics*, 2019, 12(10): e201900011.
- [17] Shan M G, Kandel M E, Popescu G. Refractive index variance of cells and tissues measured by quantitative phase imaging[J]. *Optics Express*, 2017, 25(2): 1573-1581.
- [18] Su Y, Fu R X, Du W L, et al. Label-free and quantitative dry mass monitoring for single cells during *in situ* culture[J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1635.
- [19] Fu R X, Du W L, Jin X Y, et al. Microfluidic biosensor for rapid nucleic acid quantitation based on hyperspectral interferometric amplicon-complex analysis[J]. *ACS Sensors*, 2021, 6(11): 4057-4066.
- [20] 赵晖, 吴腾飞, 周强, 等. 非合作目标光频扫描干涉信号快速检测方法[J]. *光学学报*, 2023, 43(7): 0712001.
- [21] Zhao H, Wu T F, Zhou Q, et al. Fast detection method for frequency scanning interference signals of non-cooperative targets [J]. *Acta Optica Sinica*, 2023, 43(7): 0712001.
- [22] 朱锋, 安军社, 施海亮, 等. 干涉成像光谱仪空谱信息同步复原方法[J]. *光学学报*, 2022, 42(24): 2430001.
- [23] Zhu F, An J S, Shi H L, et al. Simultaneous spatial and spectral information recovery for interferometric imaging spectrometer[J]. *Acta Optica Sinica*, 2022, 42(24): 2430001.
- [24] 赵英然, 闫克丁, 李佳一, 等. 便携式定量相位显微成像系统设计[J]. *激光与光电子学进展*, 2023, 60(22): 2211005.
- [25] Zhao Y R, Yan K D, Li J Y, et al. Design of portable quantitative phase microscopy imaging system[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2023, 60(22): 2211005.

Label-free Quantitative Microscopic Imaging Technique Based on Hyperspectral Interferometric Reconstruction

Fu Rongxin^{1*}, Ai Xin¹, Zhang Shuhao², Fei Jie³, Qin Shan¹, Hu Hanqi¹,
Zhou Tianqi¹, Zhang Shuailong⁴, Li Hang¹

¹*School of Medical Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China;*

²*School of Automation, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China;*

³*CSSC Systems Engineering Research Institute, Beijing 100094, China;*

⁴*School of Integrated Circuits and Electronics, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China*

Abstract

Objective Long-term cellular imaging and analysis are pivotal for biomedical research and clinical diagnosis. Effective and continuous nanoscale imaging of living cells reveals natural, dynamic, and subcellular alterations at the microscale, which are crucial for understanding long-term cellular morphology and metabolism. Interferometric spectroscopy, which has garnered considerable

attention for molecular detection, elucidates nanoscale fluctuations on the sample surfaces. This technology dispenses with the need for precise instruments for generating analytically coherent signals or costly optical setups. The algorithmic reconstruction of the collected interferometric spectral data yields quantitative imaging outcomes. Furthermore, it obviates the reliance on the lens selection ability of the microscope objective, thereby allowing space for the integration of microcell culture devices. Consequently, interferometric spectroscopy analysis has emerged as a highly promising method for addressing the extant challenges in the *in situ* analysis of unlabeled live cells. A hyperspectral interferometric imaging system for long-term *in situ* analysis of unlabeled live cells is introduced in this paper, facilitating the quantitative imaging of nanostructures and measurements of the dry mass. Moreover, the system is employed in investigating the quantitative nanostructure and dry mass dynamics of various cells throughout the entire cell cycle, which showcases a potential application of the proposed method and system in the biomedical realm.

Methods The coherent signals generated by light reflected from a substrate and the scattered light within a cell provide valuable insights into the three-dimensional structure and dry mass distribution of the sample. A pivotal innovation in this study is the proposal for a label-free quantitative microscopy imaging technique for hyperspectral interferometric reconstruction. By formulating a mathematical model to characterize the interferometric signal, a sample quantitative reconstruction algorithm was devised, enabling the acquisition of quantitative nanostructures and the dry mass distribution of live cells. In the methodology section, we first establish a hyperspectral interference model for adherent cells on silicon wafers, and subsequently propose a label-free quantitative imaging approach based on this model. The phase distribution in the spatial domain, derived from the reflection spectrum containing the interference information, was converted into refractive index and dry mass information. Subsequently, a microscopic imaging system for hyperspectral interference is introduced. Unlike conventional wide-field optical microscopes, this system features a fiber-optic spectrometer structure for hyperspectral imaging. Additionally, a two-dimensional scanning platform with sub-nanometer-level step accuracy was positioned beneath the sample, facilitating point-by-point scanning with a minimum step of 0.16 nm. An integrated live-cell culture incubator was incorporated into this system. Unlike conventional microscope-equipped incubators, the incubator in this system included a liquid delivery function. Finally, a comprehensive overview of the microscale *in situ* live cell culture device is provided and the performance of the incubator is demonstrated.

Results and Discussions Microscopic imaging and hyperspectral interferometric reconstruction imaging of processed three-dimensional silica photon and individually cultured HeLa cells (Fig. 5) are demonstrated in this study. The interferometric reconstruction exhibits a thickness error of merely 1.27 nm, accurately restoring the three-dimensional structure of the phantom. Each pixel achieves a dry mass measurement accuracy of 25.75×10^{-18} g. Moreover, quantitative imaging of the entire cell cycle of HeLa cells and HCErEpiC cells is conducted with a comparison of the stem mass changes between the two cell types (Fig. 6). Subsequently, the nuclear-to-cytoplasmic ratios of the two different cell types throughout the cell cycle are determined. Notably, the nuclear-to-cytoplasmic ratio of HeLa cells increases to 24.45% compared with 16.27% in HCErEpiC cells, indicating a relatively higher proportion of nuclear dry mass. The lateral resolution of the imaging system is 708.1 nm, and the axial resolution can achieve 91.89 nm. The complete spectral data of a single cell can be obtained in approximately 1.5 min.

Conclusions As the fundamental building blocks of life, cells hold significant importance across various application domains, including in clinical medical diagnosis, life science research, and basic medical investigations. However, high-resolution measurement techniques such as electron microscopy, near-field optics, and stochastic optical reconstruction microscopy, as well as separation and purification methods such as chromatography, mass spectrometry, and spectrophotometry, are not conducive to *in situ* real-time measurements of live cell cultures. The novel hyperspectral white-light interference live-cell microscopy imaging technology proposed in this study captures interferometric hyperspectral data from samples, accomplishes three-dimensional reconstruction using an algorithmic design, and constructs a corresponding automated integrated instrument. This instrument comprises a reflective optical microscopy imaging setup, an interference spectrum acquisition and processing module, a sample nanoscale precision scanning module, and a live cell culture module. To some extent, it addresses the limitations of current measurement techniques and achieves the objective of simultaneously acquiring the quantitative nanostructures and dry mass distribution of live cells. The self-reflective interference structure employed by the system eliminates the need for intricate optical modulation components, exhibiting a straightforward design and convenient operation, thereby introducing a novel imaging approach to the biomedical field.

Key words computational imaging; quantitative interference; label-free imaging; nanoscale precision; *in situ* cell monitoring