

荧光偏振调制显微成像技术研究进展

许志兵, 周文霞, 徐东东, 王潇, 尹建华, 王慧捷*

南京航空航天大学自动化学院生物医学工程系, 江苏 南京 211106

摘要 传统荧光显微成像技术以荧光强度为成像对比度, 在获取生物分子位置和浓度信息中具有重要作用, 为分子层面的生物医学研究提供了成像工具。而偏振作为荧光的另一重要特性, 可以在另一维度提供分子的方向和结构信息, 已被广泛应用于荧光偏振显微成像技术中。除此之外, 荧光偏振调制也可以通过增强荧光图像稀疏性进而增强图像对比度来获取超分辨尺度的生物分子的位置和方向信息。从物理基础、技术原理、基本实现装置和生物应用等方面, 总结了基于荧光偏振特性的不同荧光偏振调制成像技术在分子方向结构成像、超分辨显微成像以及二者的结合方面的发展概况, 并对该技术未来的发展方向进行了展望。

关键词 荧光偏振显微成像; 偏振调制; 超分辨显微; 线性二向色性; 荧光各向异性

中图分类号 O439

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202158.2400006

Research Progress of Fluorescence Polarization Modulation Microscopy Imaging Technology

Xu Zhibing, Zhou Wenxia, Xu Dongdong, Wang Xiao, Yin Jianhua, Wang Huijie*

Department of Biomedical Engineering, College of Automation Engineering, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing, Jiangsu 211106, China

Abstract The traditional fluorescence microscopy imaging technique takes fluorescence intensity as imaging contrast, which plays an important role in obtaining the position and concentration information of biomolecules and provides an imaging tool for biomedical research at the molecular level. As another important characteristic of fluorescence, polarization can provide the orientation and structural information of biomolecules in another dimension and has been widely used in the fluorescence polarization microscopy imaging technique. In addition, fluorescence polarization modulation can also be used to obtain the position and orientation information of biomolecules at the super-resolution scale by enhancing the sparsity of fluorescence images and thus enhancing the image contrast. In this paper, as for the different fluorescence polarization modulation imaging techniques based on fluorescence polarization characteristics, their developments in the molecular orientation structure imaging, super-resolution microscopy imaging and the combination of the two aspects are summarized from the physical bases, technical principles, basic implementation devices, and biological applications. Moreover, the future of these techniques is prospected.

Key words fluorescence polarization microscopy imaging; polarization modulation; super-resolution microscopy; linear dichroism; fluorescence anisotropy

OCIS codes 110.5405; 180.2520; 110.0180

收稿日期: 2020-12-14; 修回日期: 2021-01-23; 录用日期: 2021-03-03

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(62105147)、中央高校基本科研业务费专项资金(NS2020021)、南京航空航天大学研究生创新基地(实验室)开放基金(kfj20190303)

通信作者: *wanghuijie@nuaa.edu.cn

1 引 言

荧光现象最早由 Herschel 等^[1]发现,其具有特异性标记跟踪能力,被应用于显微成像领域。近年来基于荧光的超分辨光学显微成像技术取得了突破性进展,如受激发射损耗显微成像(STED)技术^[2-3]、光激活定位显微成像(PALM)技术^[4-5]、随机光学重构显微成像(STORM)技术^[6-7]以及结构光照明显微成像(SIM)技术^[8-11]等突破了衍射极限^[12],实现了纳米尺度的成像分辨率。

上述荧光显微成像技术都是以荧光辐射强度作为成像对比度来实现分子位置和浓度信息的成像。除此之外,作为荧光吸收和辐射过程的重要特性,寿命和偏振可以在另外的维度提供成像对比度。荧光寿命的测量不受荧光浓度、激发光强度、光漂白等因素的影响,荧光寿命能够十分灵敏地反映荧光分子与周围环境的相互作用以及能量转移^[13],常被用来定量测量细胞内的一些生化参量^[14-17],在生物医学研究中具有重要意义。

偏振作为荧光的另一重要特性,可以反映荧光偶极子的取向信息。当生物分子被极性荧光分子标记时,荧光偶极子的取向则可以直接反映被标记生物分子的取向信息。荧光的偏振特性表现在荧光吸收和辐射两个过程中,因此基于荧光偏振特性获取生物分子取向的荧光偏振显微成像(FPM)技术根据其物理基础大致可分为两类:一类是基于荧光分子发射光的偏振特性^[18]开发的荧光各向异性(FA)分析法,另一类是基于荧光分子吸收效率对激发光偏振方向的敏感性提出的线性二向色性(LD)方法。

上述两种荧光偏振成像方法被成功应用于单光子^[19-23]、双光子^[24-29]荧光激发显微成像技术中。相比于单光子,双光子荧光偏振显微成像可以获取更准确的分子取向分布信息^[26]。在成像装置上,可用于普通宽光场显微成像以获取薄样本的分子方向信息^[30],而基于共聚焦的荧光偏振显微更适用于获取厚样本的分子方向信息^[31]。在此基础上,研究人员采用并行共聚焦成像系统,进一步提高了成像速度,为动态样本分子取向分布的监控提供了技术支持^[32]。

但上述 FPM 技术,无论是结合单光子荧光偏振激发还是多光子荧光偏振激发,无论成像模式是宽光场成像还是共聚焦扫描成像,其本质都是通过处理荧光偏振调制响应来获取分子簇整体取向分布的统计模型参数。而上述显微成像技术都受限于衍

射极限,因此获取的分子取向分布的精确度受到限制。

近年来基于荧光偏振调制的超分辨显微成像技术打破了这一限制,该方法基于偏振调制增强荧光图像的稀疏性来获取荧光辐射图像序列,进而通过算法重构超分辨图像^[33]。这种超分辨显微成像技术与 FPM 技术都采用相同的偏振调制激发机制,在理论上可以实现超分辨尺度下的分子方向分布成像。基于此,席鹏课题组提出了超分辨偶极取向映射(SDOM)技术,可以获取超越衍射极限空间分辨率下的分子取向分布信息^[34]。此外,FPM 技术与其他超分辨显微成像技术相结合^[35-38],可以提供更精确的分子取向分布信息,对生物分子结构和功能研究具有重要意义。

本文首先介绍了荧光的偏振特性,并从荧光吸收和辐射两个角度介绍了相关的成像方法;其次在此基础上,详细论述了荧光偏振显微成像相关技术及其在生物分子方向获取中的应用;然后阐述了基于荧光偏振调制的超分辨显微成像,以及超分辨成像技术与 FPM 技术相结合的方法;最后对荧光偏振调制显微成像的研究和应用进行了总结,并展望了该技术未来发展的方向。

2 荧光的偏振特性

荧光是一种光致发光的现象。当荧光分子受到激发时,其核外电子吸收能量从基态跃迁到激发态,处于激发态的电子由于能量较高且不稳定,通过辐射跃迁回到基态并以光子的形式释放能量,产生荧光^[39]。而偏振是荧光吸收和辐射过程的一个重要特性,可以用跃迁偶极矩来解释荧光吸收和辐射过程^[40]。跃迁偶极矩是描述荧光在基态和激发态之间跃迁的向量,其大小取决于荧光分子跃迁前后偶极矩的改变量,方向从跃迁前指向跃迁后,是荧光过程的固有特性。当荧光分子吸收或发射光子时,可以将其看作为一个荧光偶极子,并分别用 μ_{abs} 和 μ_{em} 表示其吸收偶极矩和发射偶极矩。

根据经典量子力学扰动理论,荧光偶极子的吸收效率 P_{abs} 与激发光的电场 \mathbf{E} 和吸收跃迁偶极矩 μ_{abs} 的乘积的平方成正比^[40-41]:

$$P_{\text{abs}} \propto |\mathbf{E} \cdot \mu_{\text{abs}}|^2. \quad (1)$$

将(1)式展开,计算可得,荧光偶极子受激后的吸收效率正比于 $\cos^2 \delta$,其中 δ 是 μ_{abs} 和 \mathbf{E} 之间的夹角,如图 1(a)所示。即当激发光的偏振方向与荧光偶极子的吸收偶极矩方向平行时,分子吸收光子

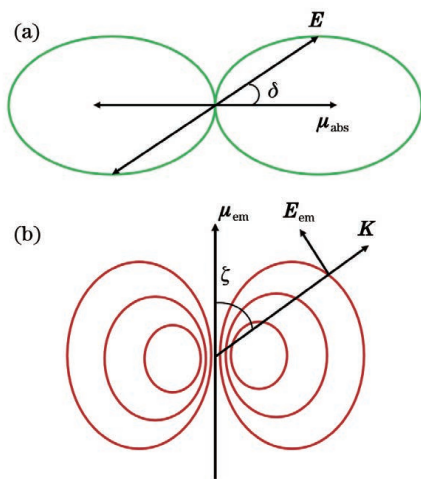


图 1 荧光偶极子的吸收和辐射偶极矩。(a) 荧光偶极子吸收几率取决于吸收偶极矩和激发光的电场的夹角; (b) 荧光偶极子的发射强度图

Fig. 1 Absorption and radiative dipole moments of fluorescence dipole. (a) Dependence of fluorescence dipole absorption probability on angle between absorption dipole moment and electric field of exciting light; (b) emission intensity pattern of fluorescence dipole

发生跃迁的概率最大。反之,当偏振激发光的偏振方向与吸收偶极矩的方向垂直时,吸收概率为零,荧光分子无法吸收光子发生跃迁。

而在发射过程中,荧光分子被看作是发射跃迁偶极子,远场辐射荧光的电场^[42]表示为

$$E_{\text{em}} \propto \mathbf{K} \times (\mathbf{K} \times \boldsymbol{\mu}_{\text{em}}), \quad (2)$$

式中 \mathbf{K} 表示光的传播方向。(2)式表明,荧光偶极子辐射荧光的强度 $|E_{\text{em}}|^2$ 正比于 $\sin^2 \zeta$, 其中, ζ 为 $\boldsymbol{\mu}_{\text{em}}$ 和 \mathbf{K} 之间的夹角,如图 1(b)所示。该辐射光场经过显微物镜后呈线性偏振,偏振方向与辐射偶极矩相同。在荧光偏振显微镜中,物镜后的辐射光场探测效率(P_{em})取决于偏振记录方向 \mathbf{u}_i 和辐射光场偏振方向 E_{em} 的点乘,即

$$P_{\text{em}} \propto |E_{\text{em}} \cdot \mathbf{u}_i|^2. \quad (3)$$

3 荧光偏振显微成像技术

生物分子的取向分布可以反映生物分子的组织结构信息,不同生物分子间的组织结构通过分子相互作用机制,与很多生物功能密切相关。因此在生命科学和医学领域,定量获取生物分子的取向分布信息,对从分子层面揭示生命活动中的分子结构和功能等具有十分重要的意义。

3.1 荧光偏振各向异性方法

基于荧光辐射偏振特性的荧光各向异性法是从

20 世纪 50 年代开始的一种早期荧光偏振分析技术,通过分析被标记样本受圆偏振光激发后沿两个正交方向的偏振发射荧光光强 I_X 、 I_Y , 可获取受激发荧光偶极子的方向信息。FA 法作为一种被广泛应用的技术,最初主要被用于研究溶液中分子旋转运动相关的动态特性^[43]。荧光的各向异性可表示为

$$A_{\text{anisotropy}} = \frac{I_X - I_Y}{I_X + I_Y}. \quad (4)$$

FA 的典型测量装置如图 2 所示,利用圆偏振光激发样本,其辐射光经显微物镜反射后通过偏振分光装置,分为偏振方向相互垂直的两束光 I_X 、 I_Y , 并被对应的探测器接收。偏振分光装置通常采用偏振分束器^[44]、沃拉斯顿棱镜^[36]、汤普森棱镜^[45]。

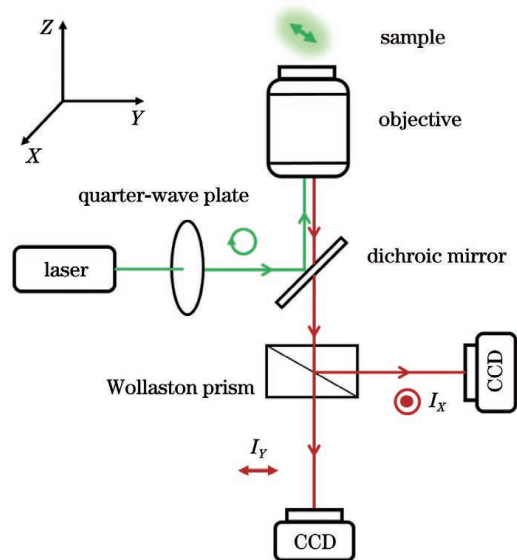


图 2 分子 FA 的测量系统示意图

Fig. 2 Schematic for measuring FA of molecules

上述基于 FA 的设备可以用于生物分子方向信息的获取,通常生物分子的密度很高,激发光场内大量高速运动的荧光偶极子形成了荧光偶极子簇,因此需根据样本构建分子簇整体取向分布的几何模型,并利用几何模型的特征参数统计性地描述激发光斑内荧光分子簇的取向分布信息^[32, 46]。最简单的模型是锥状模型,有中心方向和锥角两个参数,其中中心方向描述激发光斑内所有分子的平均方向,锥角描述激发光斑分子簇内分子取向与中心方向的偏差。由(4)式可知,利用单一荧光各向异性参数无法准确获取荧光偶极子簇几何模型中两个未知的取向分布参数的值。因此,这类技术通常只用于研究一些对平均取向分布有先验信息的样品。1979 年, Axelrod^[47]利用荧光偏振显微镜观察红细胞血影膜

上的荧光探针[diI-C18-(3)],获得了辐射偶极子的分子取向和在膜中垂直于膜轴方向的旋转速度信息。在此基础上,1990年,Florine-Casteel^[46]获得了巨型单膜囊泡的荧光图像,并解析了其膜上的部分脂质排列,这对监测与质膜有关的细胞活动有重要意义。上述研究都是利用荧光分子沿径向分布的圆形样本,其平均方向是已知的。此后,研究人员将FA技术与全内反射荧光显微成像(TIRFM)^[22]、光漂白后的恢复(FRAP)^[19, 48]等技术结合以检测生物分子方向。Mehta等^[49]通过结合FA,提出了瞬时荧光偏振显微成像技术,实现了单分子位置和方向的追踪。

FA技术是基于荧光辐射的偏振分析方法,因此辐射信号的去极化会影响其准确度,比如分子的旋转和分子间荧光能量的共振转移等都会导致样品辐射荧光去极化,从而各向异性减弱,FA技术在生物分子样本的实际应用中受到一定的限制。

3.2 荧光偏振线性二向色性方法

为了克服FA方法的限制,研究人员提出利用荧光吸收偶极子对激发光偏振方向的敏感性来获取荧光偶极子方向信息的荧光线性二向色性方法(LD)。该方法利用偏振方向相互垂直的两束线性偏振激发光依次激发样本,通过分析偏振调制荧光信号来获取样本中分子的方向信息。其系统装置如图3所示,出射的激发光被偏振调制模块调制为偏振方向相互垂直的线偏光,调制过的线性偏振光依次经过显微物镜并激发样本,辐射光经相同显微物镜反射后被探测器接收。通过分析两种激发光对应的辐射荧光强度之比,可以获取被测样本中分子的方向信息。该方法基于荧光吸收的偏振敏感性,不受能量共振转移的影响,相比于FA方法,更适合于研究荧光分子密度较高的生物样本。

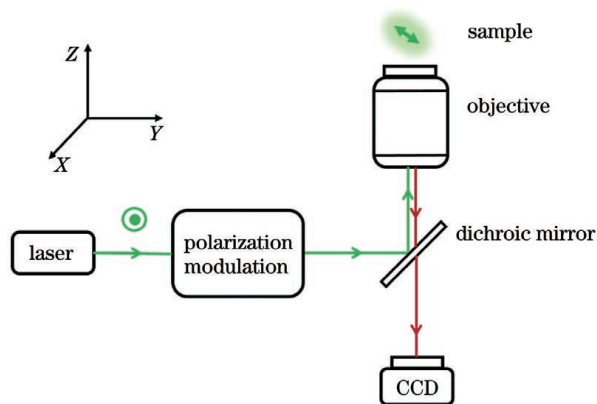


图3 分子LD的测量系统示意图

Fig. 3 Schematic for measuring LD of molecules

最初LD方法主要用在宽场(WF)荧光显微镜中。2006年,Vrabioiu等^[30]利用该方法揭示了在细胞分裂过程中,隔膜蛋白细丝在膜平面内旋转 90° 的事实,这对于研究活酵母中隔膜蛋白细丝组织和动力学具有重要意义。此外,通过结合多焦点成像技术,Abrahamsson等^[50]利用多焦点偏振显微镜实现了活体生物样品的三维快速成像,并研究了出芽酵母细胞的蛋白质组装动力学的荧光偏振各向异性,对秀丽隐杆线虫胚胎细胞分裂也进行了透射偏振成像。

但该方法仅获取了两个偏振方向上的辐射光强的比值,因此面临FA方法相同的问题,只适用于仅有一个未知参数的模型,其在复杂样本中的应用受到限制。为了拓展LD方法的应用范围,研究人员用液晶相位可变延迟器调制出具有4个偏振方向的激发光,并用其依次照射样本,通过分析对应偏振调制的荧光图像序列,获得了活酵母中隔膜蛋白细丝的方位角和偏振比^[51-52]。为了克服LD方法的局限性,获取样本任意区域全面的分子取向分布信息,研究者提出了角分辨线性二向色性(ARLD)方法,利用多个不同方向的线偏振光依次激发样本,通过分析辐射荧光对入射偏振方向的响应曲线来获取生物分子取向分布的几何模型统计参数,并将其应用到具有更高轴向分辨率的激光扫描共聚焦显微(LSCM)成像系统中,成功检测到药物处理引起的细胞膜亚波长尺度的形变、胆固醇含量变化引起的细胞膜内部张力的改变^[31]。为了进一步获取动态样本的分子结构,Wang等^[32]提出了高帧率荧光共焦角分辨显微镜,利用并行共聚焦显微成像模块,并结合电光器件的偏振调制模块,实现了高帧频的分子取向分布成像。该技术为动态样本中分子取向的实时监测提供了可能。

3.3 基于双光子荧光激发的荧光偏振显微成像(TP-FPM)技术

以上FPM技术都是采用单光子荧光激发,分子对激发光的吸收效率正比于激发光偏振方向与荧光偶极子方向夹角的余弦值的平方。对于双光子激发,其吸收效率正比于偏振方向和偶极子方向之间夹角的余弦的四次方,这从数学上决定了双光子荧光偏振成像技术可以解析具有复杂分子取向分布模型的样本。2014年,Ferrand等^[26]针对双光子激发的LD偏振成像技术进行了理论分析,从理论层面证明了双光子荧光偏振激发可以解析更为准确的具有四阶对称参数的分子分布模型。图4展示了在不

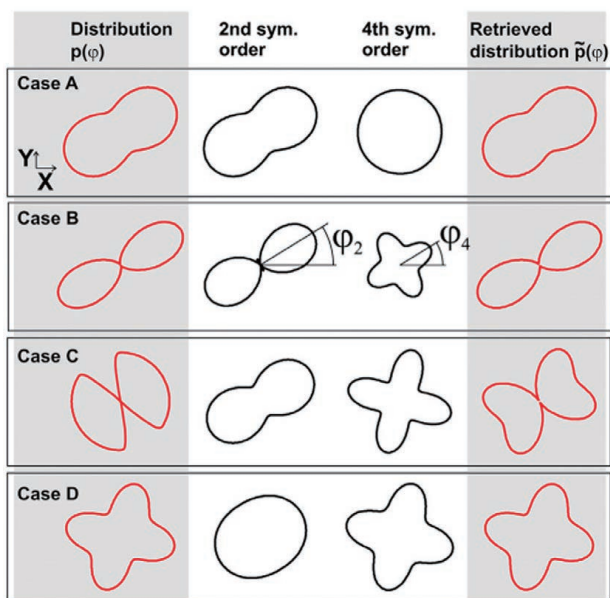


图 4 TP-FPM 方法获取的具有不同偶极子取向分布的几何模型^[26]

Fig. 4 Geometrical models with different dipole orientation distributions obtained by TP-FPM method^[26]

同二阶和四阶模型参数下对应的分子取向分布的几何模型和重建模型,其中第一列为荧光偶极子簇角分布几何模型,第二列和第三列分别为分解后的二阶和四阶分布,第四列为利用双光子荧光线性二色性法重建的分子取向分布。

此外,Lazar 等^[24]提出了基于双光子荧光激发的 LD 显微成像技术,利用该技术成功监测了荧光蛋白标记的细胞膜蛋白分子的方向信息,这对定量研究蛋白质之间的相互作用和构象变化并深入了解膜蛋白的结构和功能具有重要意义。双光子荧光激发也可以与 FA 技术结合以测量体内药物分布,可实现细胞水平上体内与体外靶向药物结合情况的实时监测,为体内药物靶向结合和治疗功效提供了新的监测方法^[53-54]。

在上述的 FA 和 LD 技术中,FA 技术的实现装置更简单一些,可同时探测 X、Y 两个偏振方向的辐射光强,从而实现了分子方向分布的快速监测,但易受能量共振转移造成的去极化影响。相比较而言,LD 技术和 ARLD 技术不受分子间能量共振转移的去极化影响,但需对激发光的偏振方向进行旋转,而不同方向偏振光经过光学系统时会引起激发光的偏振发生畸变,从而对结果造成影响。针对这一问题,研究者通常利用光学器件对光路中的偏振畸变进行补偿或在数据处理中进行预校正^[31-32]。

经过研究人员不断的努力,基于偏振特性的

FPM 技术在基础分析理论、数据处理方法和实际成像系统等方面得到了比较充分的研究,并取得了丰硕的成果。然而,上述所有方法都受限于光学显微成像的衍射极限,只能通过分析衍射受限激发光斑内所有荧光分子对激发光偏振方向的总光强响应来获得分子的整体取向分布。因此为了进一步获取荧光偶极子更准确的取向信息和更精细的生物结构信息,提高 FPM 技术的空间分辨率并减少激发光斑内的荧光分子是关键。

4 基于荧光偏振调制的超分辨显微成像技术

4.1 荧光偏振解调超分辨显微成像 (SPoD) 技术

根据上述荧光吸收敏感性可知,当不同取向的荧光偶极子受到同一线偏振光激发时,荧光偶极子在同一时刻发射出强度不同的荧光信号,从而增加了荧光辐射图像的稀疏性。基于上述理论基础,德国 Walla 课题组^[33]将偏振调制引入超分辨显微成像中,提出了偏振解调超分辨显微成像技术。该技术通过周期性地改变激发光偏振方向来获取对应的荧光辐射图像序列,并结合重建算法获得超分辨图像,其实验装置如图 5 所示。当吸收偶极矩方向与激发光偏振方向的夹角处于一定范围内时,荧光偶极子均可被有效激发。研究者通过利用激发光束和垂直于激发光束偏振方向的第二个去激发偏振光束同时照射样本,进一步增加了荧光辐射图像的稀疏性(ExPAN 技术),将空间分辨率提高至宽场成像的两倍。

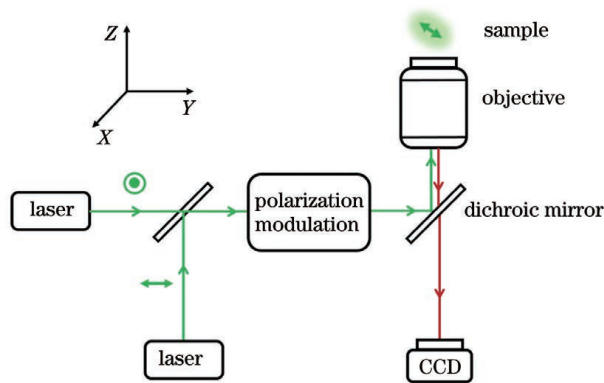


图 5 SPoD 的实验装置示意图

Fig. 5 Schematic of experiment setup of SPoD

图 6(a)、(b)分别展示了海马神经元树突的 WF 成像和 SPoD 重建结果,其中白色方框区域的放大图显示在顶部左侧,顶部右侧为点状虚线位置处的轮廓线图。可以看出,SPoD 技术可以清晰地分辨

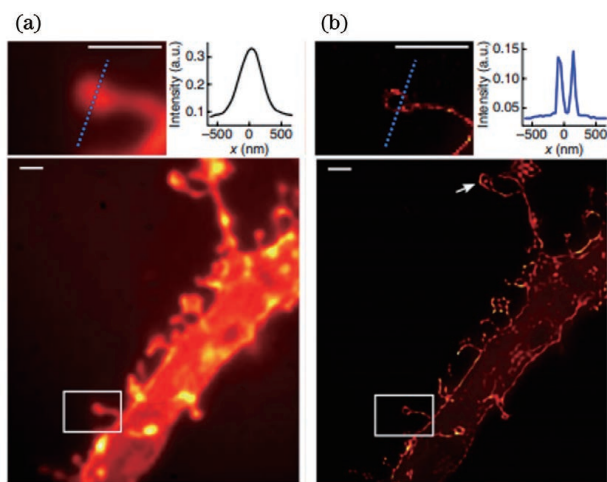


图 6 海马神经元成像(比例尺为 $1 \mu\text{m}$)^[33]。(a)WF 图像;
(b)SPoD 图像

Fig. 6 Images of hippocampal neurons (scale bar:
 $1 \mu\text{m}$)^[33]. (a) WF images; (b) SPoD images

出海马神经元树突状结构,大幅地提升了分辨率。

SPoD 重建算法是通过偏振调制荧光图像序列进行稀疏增强解调来实现的,在引入了噪声相关的稀疏约束正则项的极大似然估计优化模型上,通过快速迭代阈值收缩算法(FISTA)求解超分辨图像。其重建结果受正则化参数 λ_1 和 λ_2 的影响,只有当参数取值合适时,重建图像才能具有最好的分辨率。2016年,德国 Frahm 等^[55]提出,SPoD 技术中的超分辨来自于稀疏惩罚算法的解调制作用以及 ExPAN 技术对辐射图像的稀疏性增强。Walla 课题组利用实际样本数据和仿真计算展示了激发光偏振调制带来的荧光分子辐射信号的周期性变化差异,利用这种差异可以实现荧光分子超衍射极限分辨率下的分离识别,进而可以重构出超越衍射极限的显微图像^[56]。Wazawa 等^[57]将 SPoD 技术与快速光开关荧光蛋白 Kohinoor 相结合,并利用改进的重建算法,获得了低功率下的更精确的超分辨图像,大大拓展了该技术在活细胞成像中的应用范围。

4.2 基于荧光偏振调制的超分辨偶极子方向映射技术

上述 SPoD 技术与获取分子取向分布的 FPM 技术都采用相同的偏振调制激发机制,因此二者结合在理论上可获取超分辨尺度下荧光偶极子的方向信息。2016年,北京大学席鹏课题组与清华大学张奇伟课题组开展了超分辨分子取向分布成像方法的研究,并提出了基于偏振解调的超分辨偶极取向映射方法^[34]。该方法在 SPoD 方法的基础上,利用最小二乘曲线拟合方法,获取了相应空间分辨率下的

荧光偶极子方向分布信息,其获取偏振调制图像装置与 SPoD 方法相似,只是去掉了用于去激发的 ExPAN 光路,且二者均基于 LD 原理获取了 10 幅不同偏振方向下的荧光强度图像。

席鹏课题组利用该技术对活酵母细胞中被绿色荧光蛋白标记的隔膜蛋白进行成像,图 7(a)、(b)所示分别为俯视视野和横截面视野的方向映射图,每幅图中左上部分均为宽场图像,右下部分为 SDOM 定向映射重建图像,图像中的短线用于映射偶极子方向。在 SDOM 图像中可以看到,荧光偶极子在隔膜蛋白的沙漏结构中呈放射状分布。进一步,席鹏课题组利用该技术首次发现海马神经元树突棘颈部的偶极子取向在不同边界上呈不均匀分布,且哺乳动物肾脏细胞中荧光团的偶极子取向大部分垂直于肌动蛋白丝。

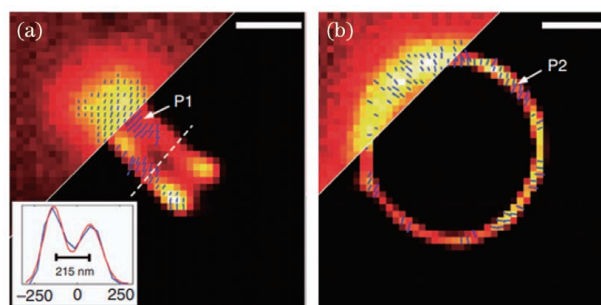


图 7 活酵母细胞中隔膜蛋白的 SDOM 成像(比例尺为 500 nm)^[34]。(a)隔膜蛋白俯视视野的 WF(左上)和 SDOM(右下)的方向映射图;(b)横截面视野的方向映射图

Fig. 7 SDOM images of septin in live yeast cells (scale bar: 500 nm)^[34]. (a) Orientation mapping images of septin with WF (upper-left) and SDOM (lower-right) under top view; (b) orientation mapping images under cross-sectional view

在此基础上,基于组稀疏 SDOM 的 GS-SDOM 技术可以在 SDOM 相同分辨率的条件下,获得更精准的局部偶极子分布情况^[58]。然而,与 SPoD 技术一样,SDOM 和 GS-SDOM 技术采用的超分辨重建算法同样引入了噪声相关的稀疏约束正则项,所以其重建结果也受正则化参数 λ_1 和 λ_2 的影响。 λ_1 和 λ_2 在很多研究中也称为经验参数,即要通过多次实验选取合适的取值,且对于不同的样本, λ_1 和 λ_2 的取值范围也可能有所不同,这增加了这些算法的复杂性和不确定性,限制了它们的应用。

为了避免引入与噪声相关的正则项,Wang 等^[59]提出了超分辨-分子取向映射(SR-OM)联合重

建算法。该算法首先引入荧光偶极子簇取向分布模型,然后利用该模型和偏振调制显微成像理论建立最小均方差的优化模型,并用共轭梯度最小二乘法对优化模型中的关键参数进行重建。仿真实验证明,该算法可以同时获取四分之一波长的成像分辨率以及相应分辨率下的荧光偶极子簇取向分布信息。进一步,蒙特卡罗仿真实验证明,该联合重建算法对偶极子取向分布参数重建结果的误差很小,对偶极子分布相对有序的样本具有良好的重建能力。

4.3 荧光偏振显微技术与超分辨成像技术的结合

在上述荧光偏振调制显微成像技术获取超分辨尺度分子取向信息的基础上,2019年,Zhanghao等^[35]将荧光偏振调制与结构光照明显微成像(SIM)技术相结合,提出了偏振结构光照明显微成像(pSIM)技术。其中,SIM技术可以提供超分辨显微图像,在此基础上结合LD技术,可以获取超分辨尺度下生物分子的方向和结构信息。其实现装置如图8所示,基本结构与SIM系统相同,光栅图像的相干叠加产生了干涉照明条纹,通过旋转光栅方向获取不同取向的干涉照明条纹,从而重构超分辨图像。研究者在此基础上加入偏振调制模块,进一步重建了超分辨尺度下生物分子方向的分布图像。

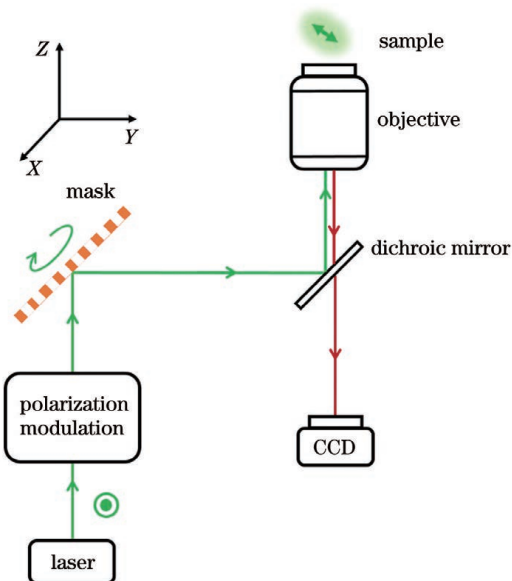


图 8 典型的 SIM 实验装置示意图

Fig. 8 Schematic of experiment setup of typical SIM

图 9 所示为利用 pSIM 技术对 BAPE 细胞中的肌动蛋白丝进行成像的结果,图 9(a)、(b)显示了相应的 WF、SIM、偏振调制(PM)和 pSIM 成像结果。其中,图 9(b)是偶极子方向的伪彩色图像,左下方的色轮揭示了颜色与偶极子方向之间的关系,

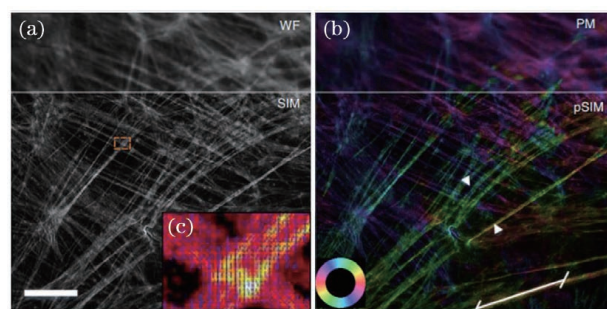


图 9 BAPE 细胞中肌动蛋白丝的 pSIM 成像结果(比例尺为 $5 \mu\text{m}$)^[35]。(a) WF 和 SIM 的强度图;(b) PM 和 pSIM 中偶极子方向的伪彩图;(c)图 9(a)中方框的放大图

Fig. 9 pSIM imaging results of actin in BAPE cells (scale bar: $5 \mu\text{m}$)^[35]. (a) Intensity images by WF and SIM; (b) pseudocolored images in dipole direction by PM and pSIM; (c) magnified view of boxed region in Fig. 9(a)

图 9(c)是图 9(a)中方框的放大图,短线表示偶极子方向。分析结果可得,pSIM 能够实现与 SIM 相同的空间分辨率,相当于 WF 的两倍,并获得了两倍 PM 分辨率下偶极子的方向信息。此外,pSIM 技术适用于不同类型的样本以及多种 SIM 设备。研究者还利用该技术对细胞骨架网络和一系列生物丝状系统进行成像,揭示了肌动蛋白和肌球蛋白之间的相互作用、神经元的膜相关周期性骨架中肌动蛋白环结构的并排组织模型,并对活 U2OS 细胞中绿色荧光蛋白标记的微管进行了动态成像。

进一步,Valades Cruz 等^[36]将偏振调制 FA 计算与单分子定位显微成像技术相结合,提出了荧光偏振分析随机光学重构显微(Polar-dSTORM)技术。该技术基于 STORM 系统,通过在探测光路中加入偏振分光元件,利用两个电子倍增探测器(EMCCD)探测了偏振方向相互垂直的荧光辐射图像。针对每个偏振方向的辐射图像,利用 STORM 重建算法获取该偏振方向对应的超分辨显微图像,之后利用 FA 分析方法获取单分子的取向分布信息。Polar-dSTORM 被应用于生物纤维(比如细胞微管)、体外双链 DNA 以及肌动蛋白应力纤维等的成像中,获取了精细的分子取向结构信息。Polar-dSTORM 技术的成像时间较长,更适用于静止样本,且荧光分子需同时满足偏振分析的极性要求和 STORM 的开关条件,这限制了其应用范围。

自偏振调制引入超分辨领域之后,FPM 技术得到了迅速的发展^[38, 60-61],可以基于不同的成像模式

(宽场成像^[34-35]、3D 点扫描显微成像^[62]、多角度全内反射显微成像^[63]), 激发机制(单光子激发^[34,64]、多光子激发^[65-66])以及信号记录方式(单分子定位^[36-37])实现超分辨尺度下不同分子结构的方向信息测量。

5 总结与展望

荧光探针的特异性标记能力使得显微成像可以聚焦于感兴趣的分子, 进而对生物分子结构进行针对性研究。FPM 技术基于荧光的偏振特性, 在揭示生物分子的功能和结构信息方面发挥了不可替代的作用。随着基于荧光偏振调制的超分辨显微技术的发展以及 FPM 与其他超分辨显微成像技术的结合, FPM 技术的应用范围从取向均匀的生物分子结构扩展到相对复杂的生物结构, 检测精度也实现了从衍射受限光斑内偶极子簇整体取向分布到单偶极子的精确检测的跨越。

虽然基于荧光偏振调制的显微成像技术在获取超分辨图像和分子方向信息两个维度上取得了很大的成功, 但都存在一些局限性。比如, 基于荧光偏振调制的 FPM 技术发展不成熟。在未来, 进一步提高荧光偏振显微成像的时间和空间分辨率, 并发展基于荧光偏振调制的 FPM 技术是该领域亟需解决的问题, 最终实现三维超分辨空间尺度下分子三维信息的成像是研究的主要目标。

参 考 文 献

- [1] Herschel J F W. No. I.: on a case of superficial colour presented by a homogeneous liquid internally colourless[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1845, 135: 143-145.
- [2] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy[J]. Optics Letters, 1994, 19(11): 780-782.
- [3] Hell S W. Microscopy and its focal switch [J]. Nature Methods, 2009, 6(1): 24-32.
- [4] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. Science, 2006, 313 (5793): 1642-1645.
- [5] Fu Y, Wang T L, Zhao S. Imaging principles and applications of super-resolution optical microscopy [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2019, 56 (24): 240002.
付芸, 王天乐, 赵森. 超分辨光学显微的成像原理及应用进展[J]. 激光与光电子学进展, 2019, 56(24): 240002.
- [6] Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. Nature Methods, 2006, 3 (10): 793-795.
- [7] Pan W H, Chen B L, Zhang J G, et al. Compressed sensing STORM super-resolution image reconstruction based on noise correction-principal component analysis preprocessing algorithm[J]. Chinese Journal of Lasers, 2020, 47(2): 0207024.
潘文慧, 陈秉灵, 张建国, 等. 基于噪声校正主成分分析的压缩感知 STORM 超分辨图像重构[J]. 中国激光, 2020, 47(2): 0207024.
- [8] Gustafsson M G. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy [J]. Journal of Microscopy, 2000, 198 (2): 82-87.
- [9] Kner P, Chhun B B, Griffis E R, et al. Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination [J]. Nature Methods, 2009, 6(5): 339-342.
- [10] Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(37): 13081-13086.
- [11] Zhao T Y, Wang Z J, Feng K, et al. High-speed structured illumination microscopy and its applications [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2020, 57(24): 240001.
赵天宇, 汪召军, 冯坤, 等. 高速超分辨结构光照明显微的关键技术及应用 [J]. 激光与光电子学进展, 2020, 57(24): 240001.
- [12] Abbe E. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung [J]. Archiv Für Mikroskopische Anatomie, 1873, 9(1): 413-468.
- [13] Liu X B, Lin D Y, Wu Q Q, et al. Recent progress of fluorescence lifetime imaging microscopy technology and its application [J]. Acta Physica Sinica, 2018, 67(17): 178701.
刘雄波, 林丹樱, 吴茜茜, 等. 荧光寿命显微成像技术及其应用的最新研究进展 [J]. 物理学报, 2018, 67 (17): 178701.
- [14] Liu C, Zhou Y, Wang X W, et al. Fluorescence lifetime imaging microscopy and its research progress [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2011, 48 (11): 111102.
刘超, 周燕, 王新伟, 等. 荧光寿命成像技术及其研究进展 [J]. 激光与光电子学进展, 2011, 48(11): 111102.
- [15] Levchenko S M, Pliss A, Qu J L. Fluorescence

- lifetime imaging of fluorescent proteins as an effective quantitative tool for noninvasive study of intracellular processes[J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2018, 11(1): 1730009.
- [16] Liu L X, Qu J L, Lin Z Y, et al. Fluorescence lifetime imaging and its biomedical applications[J]. *Shenzhen University Journal*, 2005, 22(2): 133-141. 刘立新, 屈军乐, 林子扬, 等. 荧光寿命成像及其在生物医学中的应用[J]. *深圳大学学报*, 2005, 22(2): 133-141.
- [17] Qu J L, Niu H B, Guo B P. Fluorescence lifetime imaging microscopy[J]. *Applied Laser*, 1997, 17(3): 100-104. 屈军乐, 牛憨笨, 郭宝平. 荧光寿命成像显微技术[J]. *应用激光*, 1997, 17(3): 100-104.
- [18] Valeur B. *Molecular fluorescence: principles and applications*[M]. Weinheim: Wiley-VCH, 2001.
- [19] Fooksman D R, Edidin M, Barisas B G. Measuring rotational diffusion of MHC class I on live cells by polarized FPR[J]. *Biophysical Chemistry*, 2007, 130(1/2): 10-16.
- [20] Sun Y, Sato O, Ruhnaw F, et al. Single-molecule stepping and structural dynamics of myosin X[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010, 17(4): 485-491.
- [21] Shroder D Y, Lippert L G, Goldman Y E. Single molecule optical measurements of orientation and rotations of biological macromolecules[J]. *Methods and Applications in Fluorescence*, 2016, 4(4): 042004.
- [22] Forkey J N, Quinlan M E, Alexander Shaw M, et al. Three-dimensional structural dynamics of myosin V by single-molecule fluorescence polarization[J]. *Nature*, 2003, 422(6930): 399-404.
- [23] Sun Y J, Schroeder H W III, Beausang J F III, et al. Myosin VI walks "wiggly" on actin with large and variable tilting[J]. *Molecular Cell*, 2007, 28(6): 954-964.
- [24] Lazar J, Lazar J, Bondar A, et al. Two-photon polarization microscopy reveals protein structure and function[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(8): 684-690.
- [25] Duboisset J, Ferrand P, He W, et al. Thioflavine-T and Congo red reveal the polymorphism of insulin amyloid fibrils when probed by polarization-resolved fluorescence microscopy[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2013, 117(3): 784-788.
- [26] Ferrand P, Gasecka P, Kress A, et al. Ultimate use of two-photon fluorescence microscopy to map orientational behavior of fluorophores[J]. *Biophysical Journal*, 2014, 106(11): 2330-2339.
- [27] Benninger R K, Onfelt B, Neil M A A, et al. Fluorescence imaging of two-photon linear dichroism: cholesterol depletion disrupts molecular orientation in cell membranes[J]. *Biophysical Journal*, 2005, 88(1): 609-622.
- [28] Gasecka A, Han T J, Favard C, et al. Quantitative imaging of molecular order in lipid membranes using two-photon fluorescence polarimetry[J]. *Biophysical Journal*, 2009, 97(10): 2854-2862.
- [29] Li W, Wang Y, Shao H, et al. Probing rotation dynamics of biomolecules using polarization based fluorescence microscopy[J]. *Microscopy Research and Technique*, 2007, 70(4): 390-395.
- [30] Vrabioiu A M, Mitchison T J. Structural insights into yeast septin organization from polarized fluorescence microscopy[J]. *Nature*, 2006, 443(7110): 466-469.
- [31] Kress A, Wang X, Ranchon H, et al. Mapping the local organization of cell membranes using excitation-polarization-resolved confocal fluorescence microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2013, 105(1): 127-136.
- [32] Wang X, Kress A, Brasselet S, et al. High frame-rate fluorescence confocal angle-resolved linear dichroism microscopy[J]. *Review of Scientific Instruments*, 2013, 84(5): 053708.
- [33] Hafi N, Grunwald M, van den Heuvel L S, et al. Fluorescence nanoscopy by polarization modulation and polarization angle narrowing[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(5): 579-584.
- [34] Zhanghao K, Chen L, Yang X S, et al. Super-resolution dipole orientation mapping via polarization demodulation[J]. *Light: Science & Applications*, 2016, 5(10): e16166.
- [35] Zhanghao K, Chen X, Liu W, et al. Super-resolution imaging of fluorescent dipoles via polarized structured illumination microscopy[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 4694.
- [36] Valades Cruz C A, Shaban H A, Kress A, et al. Quantitative nanoscale imaging of orientational order in biological filaments by polarized superresolution microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(7): E820-E828.
- [37] Backer A S, Lee M Y, Moerner W E. Enhanced DNA imaging using super-resolution microscopy and simultaneous single-molecule orientation measurements[J]. *Optica*, 2016, 3(6): 659-666.
- [38] Sigal Y M, Zhou R, Zhuang X. Visualizing and discovering cellular structures with super-resolution microscopy[J]. *Science*, 2018, 361(6405): 880-887.
- [39] Jabłoński A. Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren[J].

- Zeitschrift Für Physik, 1935, 94(1/2): 38-46.
- [40] Lakowicz J R. Principles of fluorescence spectroscopy [M]. Boston: Springer, 2006.
- [41] Borejdo J, Burlacu S. Orientation of actin filaments during motion in *in vitro* motility assay[J]. Biophysical Journal, 1994, 66(5): 1319-1327.
- [42] Bidault S. Manipulation optique de l'organisation de chromophores non-linéaires et luminescents [D]. Cachan: École normale supérieure de Cachan, 2004.
- [43] Weber G. Rotational Brownian motion and polarization of the fluorescence of solutions [J]. Advances in Protein Chemistry, 1953, 8: 415-459.
- [44] Kinoshita K, Itoh H, Ishiwata S, et al. Dual-view microscopy with a single camera: real-time imaging of molecular orientations and calcium [J]. The Journal of Cell Biology, 1991, 115(1): 67-73.
- [45] Forkey J N, Quinlan M E, Goldman Y E. Protein structural dynamics by single-molecule fluorescence polarization[J]. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2000, 74(1/2): 1-35.
- [46] Florine-Casteel K. Phospholipid order in gel- and fluid-phase cell-size liposomes measured by digitized video fluorescence polarization microscopy[J]. Biophysical Journal, 1990, 57(6): 1199-1215.
- [47] Axelrod D. Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization[J]. Biophysical Journal, 1979, 26(3): 557-573.
- [48] Velez M, Axelrod D. Polarized fluorescence photobleaching recovery for measuring rotational diffusion in solutions and membranes[J]. Biophysical Journal, 1988, 53(4): 575-591.
- [49] Mehta S B, McQuilken M, la Riviere P J, et al. Dissection of molecular assembly dynamics by tracking orientation and position of single molecules in live cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2016, 113(42): E6352-E6361.
- [50] Abrahamsson S, McQuilken M, Mehta S B, et al. MultiFocus Polarization Microscope (MF-PolScope) for 3D polarization imaging of up to 25 focal planes simultaneously[J]. Optics Express, 2015, 23(6): 7734-7754.
- [51] DeMay B S, Bai X, Howard L, et al. Septin filaments exhibit a dynamic, paired organization that is conserved from yeast to mammals[J]. The Journal of Cell Biology, 2011, 193(6): 1065-1081.
- [52] DeMay B S, Noda N, Gladfelter A S, et al. Rapid and quantitative imaging of excitation polarized fluorescence reveals ordered septin dynamics in live yeast[J]. Biophysical Journal, 2011, 101(4): 985-994.
- [53] Dubach J M, Vinegoni C, Mazitschek R, et al. *In vivo* imaging of specific drug-target binding at subcellular resolution [J]. Nature Communications, 2014, 5: 3946.
- [54] Vinegoni C, Dubach J M, Feruglio P F, et al. Two-photon fluorescence anisotropy microscopy for imaging and direct measurement of intracellular drug target engagement [J]. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 2016, 22(3): 179-185.
- [55] Frahm L, Keller J. Polarization modulation adds little additional information to super-resolution fluorescence microscopy[J]. Nature Methods, 2016, 13(1): 7-8.
- [56] Hafi N, Grunwald M, van den Heuvel L S, et al. Reply to "polarization modulation adds little additional information to super-resolution fluorescence microscopy" [J]. Nature Methods, 2016, 13(1): 8-9.
- [57] Wazawa T, Arai Y, Kawahara Y, et al. Highly biocompatible super-resolution fluorescence imaging using the fast photoswitching fluorescent protein Kohinoor and SPoD-ExPAN with Lp-regularized image reconstruction[J]. Microscopy, 2018, 67(2): 89-98.
- [58] Chen L, Wang M Y, Zhang X, et al. Group-sparsity-based super-resolution dipole orientation mapping[J]. IEEE Transactions on Medical Imaging, 2019, 38(11): 2687-2694.
- [59] Wang X, Zhang Y X, Zhou W X, et al. Mapping the dipole orientation distribution within a super-resolution scale via fluorescence polarization modulation[J]. Journal of the Optical Society of America A, 2020, 37(3): 353-360.
- [60] Camacho R, Täuber D, Scheblykin I G. Fluorescence anisotropy reloaded: emerging polarization microscopy methods for assessing chromophores' organization and excitation energy transfer in single molecules, particles, films, and beyond[J]. Advanced Materials, 2019, 31(22): 1805671.
- [61] Chandler T, Shroff H, Oldenbourg R, et al. Spatio-angular fluorescence microscopy I basic theory [J]. Journal of the Optical Society of America A, 2019, 36(8): 1334-1345.
- [62] Zheng C, Zhao G Y, Kuang C F, et al. 3D point scanning super-resolution microscopy via polarization modulation[J]. Optics Letters, 2017, 42(19): 3734-3737.
- [63] Zheng C, Zhao G Y, Liu W F, et al. 3D super-resolved multiangle TIRF via polarization modulation [EB/OL]. (2018-01-03)[2020-12-10]. <https://arxiv.org/abs/1801.00882>.

- [64] Backer A S, Biebricher A S, King G A, et al. Single-molecule polarization microscopy of DNA intercalators sheds light on the structure of S-DNA [J]. *Science Advances*, 2019, 5(3): eaav1083.
- [65] Artigas D, Merino D, Polzer C, et al. Sub-diffraction discrimination with polarization-resolved two-photon excited fluorescence microscopy[J]. *Optica*, 2017, 4(8): 911-918.
- [66] Vinegoni C, Weissleder R, Dubach M, et al. System and method for determination of ligand-target binding by multi-photon fluorescence anisotropy microscopy: US20170045521[P]. 2017-02-16.