·技术进展·

结构光照明显微成像系统中的偏振控制及成像应用

王文熠[1] 席鹏[1,2] 李美琪[3] 乔良[1*]

（1.北京艾锐精仪科技有限公司，北京100086；2.北京大学未来技术学院，北京100871；
3.北京大学生命科学学院，北京100871）

【摘要】 由于荧光偏振方向求解需要旋转激发光束偏振方向，而传统结构光照明显微镜需要3个方向的结构光照明来实现超分辨，因此，偏振结构光照明显微成像技术（polarized structured illumination microscopy, Polar–SIM）作为两种技术的有机结合能够在更高精度上去探究细胞内各种亚细胞器的精确空间取向与结构。本文通过理论公式探究了干涉条纹对比度与偏振调制的关系，对比了使用Pizza波片、圆偏振与可变液晶相位延迟器进行偏振调制的优缺点，同时通过仿真模拟了在不同的偏振调制情况下偏振解析结果的准确性。最后，通过多种生物实验结果证明了Polar–SIM具有独特的偶极子超分辨方向解析能力，在解决相关生物问题方面具有广阔的应用前景。

【关键词】 结构光照明显微镜；荧光偏振显微镜；偶极子取向解析；荧光超分辨成像

【中图分类号】 TH74; O43 【文献标识码】 A 【DOI】 10.11876/mimt202504006

Polarization control and applications in structured illumination microscopy

Wang Wenyi[1], *Xi Peng*[1,2], *Li Meiqi*[3], *Qiao Liang*[1*]

(1. Airy Technologies Co., Ltd., Beijing 100086, China; 2. College of Future Technology, Peking University, Beijing 100871, China; 3. School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

【Abstract】 Fluorescence polarization analysis requires rotating the excitation beam's polarization direction, while conventional structured illumination microscopy (SIM) relies on three illumination orientations to achieve super–resolution. Polarized structured illumination microscopy (Polar–SIM), as an integrated approach combining these two techniques, enables high–precision investigation of the spatial orientation and structure of various subcellular organelles. This study theoretically investigates the relationship between the contrast of interferometric fringes and polarization modulation, compares the advantages and disadvantages of employing a pizza waveplate, circular polarization, and a variable liquid crystal phase retarder for polarization modulation, and further simulates the accuracy of polarization analysis under different modulation conditions. Finally, our experimental results demonstrate Polar–SIM's unique capability for super–resolution directional analysis of molecular dipoles, highlighting its broad potential for addressing diverse biological questions in future research.

【Key words】 Structured illumination microscopy; Fluorescence polarization microscopy; Dipole orientation analysis; Super–resolution fluorescence imaging

在荧光显微镜中，生物结构中的荧光信号具有4种基本属性：荧光强度[1]、荧光波长[2]、荧光寿命[3]与偏振方向[4]。针对荧光信号的前3种性质的研究起步较早，而对偏振的研究目前仍处于初级阶段[5]。荧光偏振显微镜是利用偏振光调制的方式，探测生物样本内荧光偶极子在细胞内的排布方向的技术，在研究药物作用位点、蛋白结构与连接方式等领域发挥着重大作用[6–7]。其原理为

基金项目：国家自然科学基金（62025501，92150301，62335008，62405010）；国家重点研发计划（2022YFC3401100）

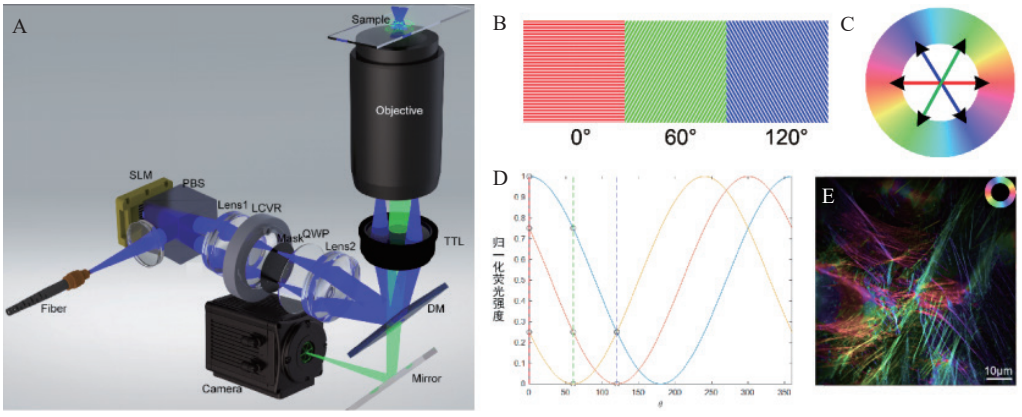
第一作者：王文熠，男，本科，研究方向：超分辨显微成像

通信作者：乔良，男，硕士研究生，研究方向：超分辨显微成像

使用线偏振光激发偶极子时，吸收概率与偶极子和激发光偏振方向的夹角成余弦平方的关系[8]。由于阿贝衍射极限的存在，传统荧光偏振显微镜只能以较低的空间分辨率观察偶极子的平均响应。随着激光技术的出现和突破，出现了多种打破衍射极限的成像技术，其中应用最广泛的包括单分子定位显微技术（single-molecule localization microscopy, SMLM）[9]、结构光照明显微技术（structured illumination microscopy, SIM）[10]以及受激发射损耗显微技术（stimulated emission depletion microscopy, STED）[11]。在以上的所有技术中，结构光照明显微技术具有速度快、光毒性小、标记简单且样本适用性强等优点，因此在活细胞成像领域得到了广泛的使用[12-13]。由于荧光偏振方向求解需要旋转激发光束偏振方向，而传统结构光照明显微镜需要旋转 3 个激发光照明方向来实现超分辨，因此，将两种技术有机结合的偏振结构光照明显微（polarized structured illumination microscopy, Polar-SIM）能够在更高精度上去探究细胞内各种亚细胞器的精确空间取向与结构[14]。为了验证其在生物学应用上的广阔前景，使用细胞骨架、DNA 分子与乳脂球展示了 Polar-SIM 系统解析细胞中亚细胞器结构取向的能力。

1 偏振结构光照明显微原理

偏振结构光照明显微技术是在 SIM 技术基础上的重要创新，在一系列生物学问题上，例如短肌动蛋白包被表面上的滑动动力学问题得到了广泛的应用，其原理如图 1 所示。



注：Polar-SIM 为偏振结构光照明显微；TTL 为套筒透镜；DM 为二向色镜；QWP 为四分之一波片；LCVR 为液晶可变相位延迟器；PBS 为偏振分束立方；SLM 为液晶空间光调制器。

图 1 偏振结构光照明显微镜探测偶极子方位角原理[14] A 为 Polar-SIM 系统光学设计示意图；B 为 3 个角度进行结构光调制示意图；C 为 B 图中结构光照明条纹方向对应的偏振方向；D 为荧光偶极子被结构光调制产生的响应；E 为 Polar-SIM 系统解析的细胞微丝偏振结果

如图 1A 所示，激发偏振方向随照明方向（蓝色光束）旋转，使激光束保持 s 偏振，从而获得高对比度干涉条纹。偶极子在结构光照明中被线偏振光激发照亮，平行于偏振方向的偶极子吸收效率最高，而垂直于偏振方向的偶极子则完全不被激发。由于在 SIM 重建中照明光方向通过参数估计步骤已知，因此可以结合偶极子在不同偏振方向上的强度响应与偏振角度来求解偶极子的偏振方向。如图 1B 所示，Polar-SIM 系统利用结构光照明实现 0° 、60° 和 120° 3 个方向的偏振结构光调制。利用图 1C 的色环可以对偶极子的方向对应的颜色赋予 SIM 的每个像素；图 1D 为偏振光对于特定偶极子将产生不同的荧光激发强度，从 3 个方向的照明中可以解析偶极子方向；图 1E 为 Polar-SIM 解析得到的鬼笔环肽标记的细胞骨架结果，可以看出，微丝荧光分子排列方向与其延伸方向平行。

1.1 照明条纹生成

由于 SIM 通过提取不同方向的莫尔条纹来实现频域拓展，生成高密度、高对比度的条纹照明是结构光超分辨能够产生超分辨解析的关键所在[15]。液晶空间光调制器（spatial light modulator, SLM）是一种利用液晶分子的双折射效应，通过施加外部的电场或磁场来控制液晶分子的取向从而调控光束能量分布的光束调制器件。由于 SLM 具有切换速度

高、对波长不敏感、无需通过机械平移来改变相位以及易于调节条纹周期等优点，在SIM中得到了广泛的使用[16]。在偏振光结构照明显微镜中，我们使用SLM来生成与切换结构光照明所需要的条纹。

1.2 偏振控制与条纹对比度

不同于投影式结构光照明显微镜[17]，干涉式结构光照明显微镜产生结构光的原理来源于杨氏双缝干涉：当两束光满足频率相同、位相差恒定和振动方向相同时可以发生干涉，即使用相干光源或者同一光源产生的多束光也可以发生干涉。光束的偏振方向也影响着干涉条纹的明暗对比度，对比度将影响图像重建的结果，因此对条纹对比度与照明光束偏振方向的关系进行分析是结构光照明显微镜优化的重要环节[18]。

假设强度相同并且关于z轴对称入射的两束相干平面波在空间xz平面相干叠加，其电场的复振幅矢量可以分别表示为：

$$\boldsymbol{E}_1=\boldsymbol{e}_1\exp(i\boldsymbol{k}_1\cdot\boldsymbol{r}) \tag{1}$$

$$\boldsymbol{E}_2=\boldsymbol{e}_2\exp(i\boldsymbol{k}_2\cdot\boldsymbol{r}) \tag{2}$$

其中，$\boldsymbol{e}_1,\boldsymbol{e}_2$分别表示$\boldsymbol{E}_1,\boldsymbol{E}_2$振动方向的单位矢量，$\boldsymbol{k}_1,\boldsymbol{k}_2$为波矢，且$|\boldsymbol{k}_1|=|\boldsymbol{k}_2|=\frac{2\pi}{\lambda}=\boldsymbol{k}$，$\boldsymbol{r}$为位矢，因此干涉场光强$I$的分布为：

$$I=|\boldsymbol{E}_1+\boldsymbol{E}_2|^2=\left|\boldsymbol{e}_1\exp\left[i\boldsymbol{k}_1\cdot\left(x\sin\varphi+z\cos\varphi\right)\right]+\boldsymbol{e}_2\exp\left[i\boldsymbol{k}_2\cdot\left(-x\sin\varphi+z\cos\varphi\right)\right]\right|^2 \tag{3}$$

其中，φ为$\boldsymbol{k}$与z轴的夹角，$\varphi\in(0,\pi/2)$。

若考虑光束的偏振特性，设θ为$\boldsymbol{e}$与xz平面的夹角，$\theta\in(0,\pi)$；$\boldsymbol{e}_x,\boldsymbol{e}_y,\boldsymbol{e}_z$分别为$x$、$y$、$z$轴的单位矢量，可将式（1）和式（2）写为：

$$\boldsymbol{E}_1=\left(\cos\theta\cos\varphi\boldsymbol{e}_x+\sin\theta\boldsymbol{e}_y+\cos\theta\sin\varphi\boldsymbol{e}_z\right)\times\exp\left[i\frac{2\pi}{\lambda}\left(-x\sin\varphi+z\cos\varphi\right)\right] \tag{4}$$

$$\boldsymbol{E}_2=\left(\cos\theta\cos\varphi\boldsymbol{e}_x-\sin\theta\boldsymbol{e}_y+\cos\theta\sin\varphi\boldsymbol{e}_z\right)\times\exp\left[i\frac{2\pi}{\lambda}\left(x\sin\varphi+z\cos\varphi\right)\right] \tag{5}$$

当两束光波发生干涉叠加时，其干涉场的复振幅分布为：

$$\boldsymbol{E}=\boldsymbol{E}_1+\boldsymbol{E}_2=2\cos\left(\frac{2\pi}{\lambda}x\sin\varphi\right)\cos\theta\cos\varphi\exp\left(i\frac{2\pi}{\lambda}z\cos\varphi\right)\boldsymbol{e}_x+2\cos\left(\frac{2\pi}{\lambda}x\sin\varphi\right)\sin\theta\exp\left(i\frac{2\pi}{\lambda}z\cos\varphi\right)\boldsymbol{e}_y-2i\sin\left(\frac{2\pi}{\lambda}x\sin\varphi\right)\cos\theta\sin\varphi\exp\left(i\frac{2\pi}{\lambda}z\cos\varphi\right)\boldsymbol{e}_z \tag{6}$$

由干涉光强分布的表达式即式（6）可得，带偏振的两束光波干涉光强分布为：

$$I=|\boldsymbol{E}|^2=4\left(\cos^2\theta\cos2\varphi+\sin^2\theta\right)\cos^2\left(\frac{2\pi}{\lambda}x\sin\varphi\right)+4\cos^2\theta\sin^2\varphi \tag{7}$$

干涉条纹周期$d=\lambda/2\sin\varphi$，两束光的夹角φ越大，周期d越小，在SIM系统中能够采集到的高频成分越多，分辨率提升越高，相反，两束光的夹角φ越小，周期d越大，SIM系统中能够采集到的高频成分越小，分辨率提升越低。因此通过干涉的方法能够得到最小的干涉周期理论值为波长的一半。干涉对比度m的公式如下：

$$m=\frac{I_{\max}-I_{\min}}{I_{\max}+I_{\min}} \tag{8}$$

根据式（6）和式（8）可得，干涉条纹对比度m与偏振方向角θ以及双光束夹角φ的关系如下：

$$m=\frac{I_{\max}-I_{\min}}{I_{\max}+I_{\min}}=\left|\sin^2\theta+\cos^2\theta\cos2\varphi\right| \tag{9}$$

通过仿真得到模拟结果如图2所示。

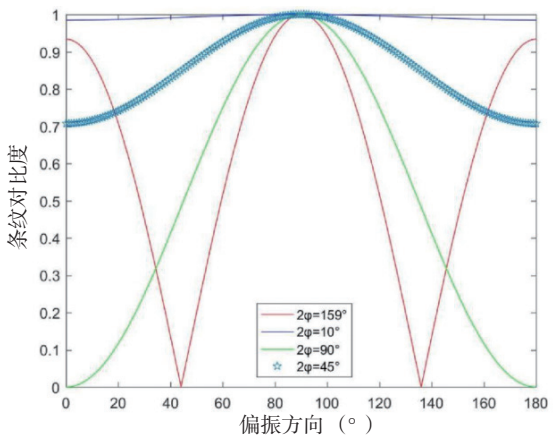


图2 偏振方向与干涉条纹对比度的关系[18]

由图2可知，无论两束光的夹角φ为多少，都在偏振方向为90° 即s偏振时存在最大的对比度。因

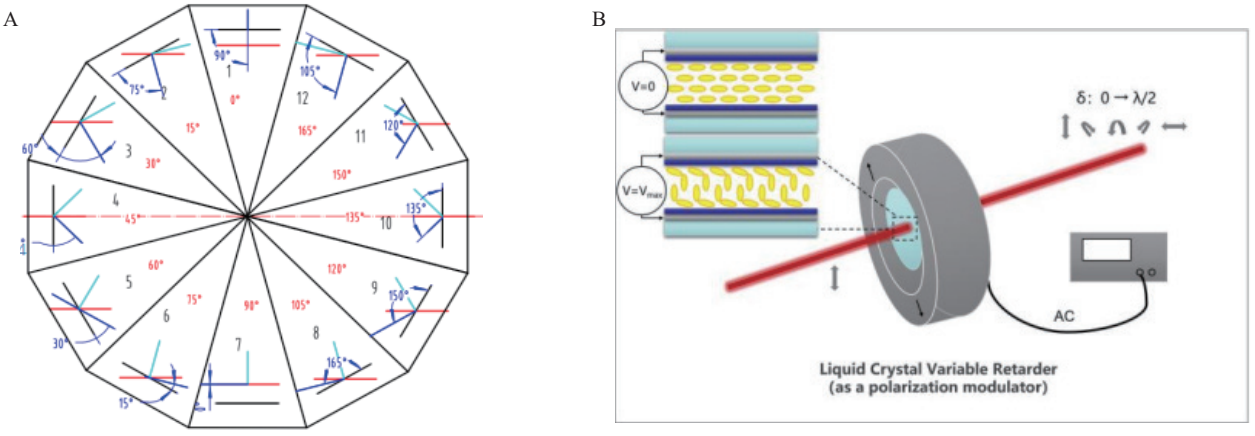
此要想获得高对比度的成像结果，就必须确保两束光的偏振方向为 s 偏振。

在 SIM 照明中，通常需要旋转 3 个方向来获得各向同性的分辨率提升效果，因此往往需要在 3 个方向上旋转激发光束的偏振方向以保证在每个方向上都维持 s 偏振以获得最大的条纹对比度。二维结构光照明超分辨（two–dimensional structured illumination microsopy, 2D–SIM）中，每个方向的条纹由双光束（ ± 1 级）干涉生成，三维结构光照明超分辨（three–dimensional structured illumination microsopy, 3D–SIM）中，由于 *z* 轴方向也需要调制，每个方向的条纹由三光束（0， ± 1 级）干涉生成。这就需要对它们进行对应的偏振调整，从而产生高对比度条纹。目前在主流的 SIM 系统中，照明条纹有以下几种偏振调制方案。

（1）圆偏振调制：即双光束和三光束均使用圆偏振。其优势在于无需额外的偏振调制器件，缺点是每个方向上都有部分未能干涉的光束，降低了条纹对比度。同时，由于圆偏振照明光束在各个方向上偏振强度均相等，因此偶极子强度在各个方向上强度恒定，无法进行偏振取向求解。

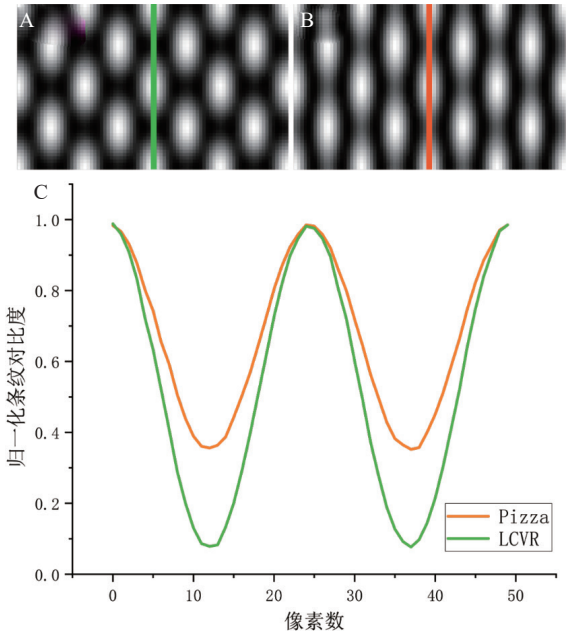
（2）2D–SIM 位置–偏振调制：在 SIM 中，由于 ± 1 级的空间位置随着条纹角度变化而变化，可以通过在不同位置放置不同的波片来实现不同角度对应的偏振调制。使用 Pizza 样式的半波片，由 6 片或者 12 片半波片拼接成为一个整体，不同方向的光通过不同快轴方向的半波片进而有效地改变光束的偏振方向。如图 3A 所示，光束沿红色偏振角度入射，经过以浅蓝色表示的快轴方向的半波片后，其偏振方向将被更改为颜色图中黑色示意的方向。其优势在于成本较低且易于实现；其缺点在于，由于零级光的位置不随条纹方向变化而变化，其无法改变零级光束的偏振方向，造成 3D–SIM 的条纹对比度低、分辨率下降，无法求解偏振角度。图 4A 仿真了 Pizza 波片形成的 3D–SIM 条纹的 *xoz* 截面示意图，从图中可以看出，由于 Pizza 波片无法对零级光束进行偏振调制，其干涉对比度相比图 4B 差。同时，由于波片对不同方向入射光的偏振旋光度非 100%，造成与 Pizza 波片安装方向正交的光束偏振度较高，其他两个方向偏振度较低（图 5C）。

（3）主动偏振调制：使用四分之一波片联合液晶可变相位延迟器（liquid crystal variable retarder, LCVR）来对入射光进行高速主动偏振调控，如图 3B 所示。其优势在于能够按需调节光束偏振方向且在每个方向上都能实现较高的偏振比；缺点在于其成本较高，同时，LCVR 作为有源器件，其需要与 SLM 和相机进行同步，引入了额外的控制逻辑，以及在每次选择波长后需要对 LCVR 进行初始化，其等待时间较长，如果考虑外部信号控制 LCVR 的状态变换，则需要十分复杂的电压信号。除此之外，一般显微镜中的二向色镜会给偏振带来畸变，而 Pizza 波片只能保证通过它之后的偏振态，由于二向色镜都是在 Pizza 波片之后安装，因此无法弥补二向色镜带来的偏振畸变，而 LCVR 能够通过调节电压来提前矫正这部分二向色镜引起的偏振畸变，所以 LCVR 能够实现较高的偏振度，完全满足 Polar–SIM 系统对偏振激发调制的要求。因此，为了最大化条纹对比度，并实现 2D/3D–SIM 与偏振成像，我们选择了 LCVR 的主动偏振调制方案，保证每个方向的偏振比均大于 200。



注：LCVR 为液晶可变相位延迟器。

图 3 偏振调制方式示意图 A 为常见的 12 分区的 Pizza 波片设计图[16]；B 为 LCVR 调制激发光束偏振方向示意图



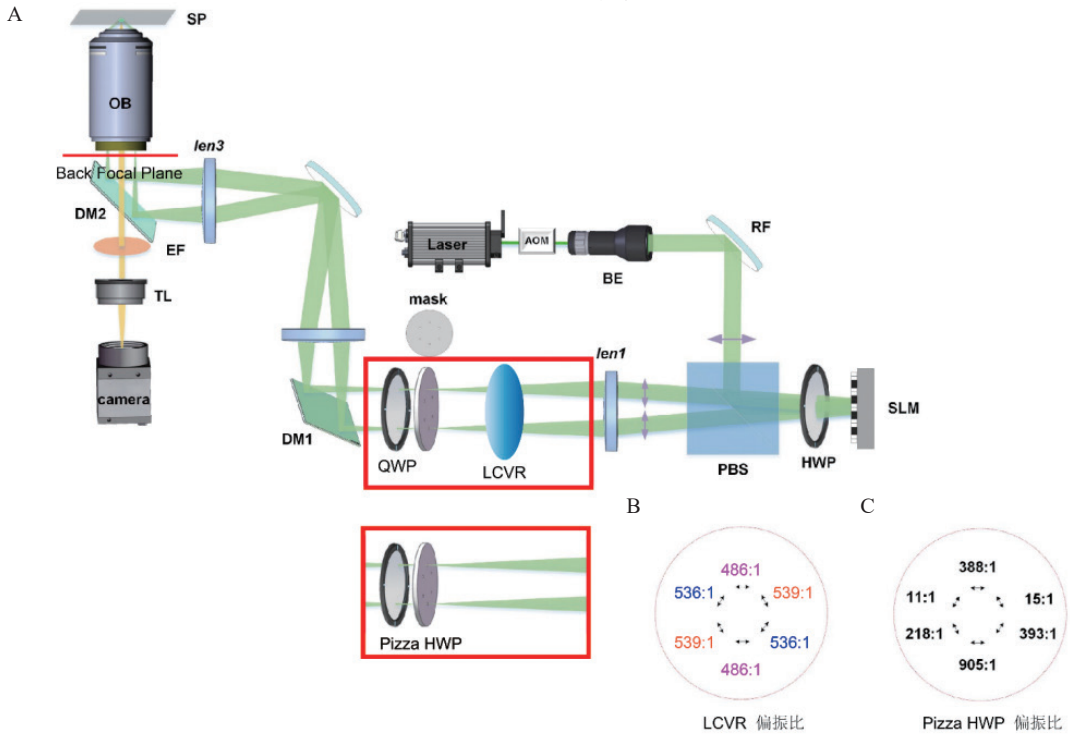
注：SIM为结构光照明显微；LCVR为液晶可变相位延迟器。

图4 不同偏振调制方案形成的3D-SIM条纹 A为Pizza波片偏振调制方案形成的3D-SIM条纹；B为LCVR偏振调制方案形成的3D-SIM条纹；C为对A图、B图中画线区域条纹对比度的统计

使用偏振片置于物镜后焦面，如图5A所示，分别将偏振片置于平行于照明条纹方向，记录出光功率I_{par}；与照明条纹正交的方向，记录出光功率I_{vec}。则此时照明偏振比（polarization extinction ratio, PER）可以被简单定义为$PER=\frac{I_{par}}{I_{vec}}$。图5分别展示了使用Pizza波片进行偏振调制以及使用LCVR方案进行偏振调制的光路图。如图5B、图5C所示，经过偏振比测量，LCVR方案偏振比更高，LCVR方案偏振比测量原始数据如表1所示。

2 偏振调制对系统的影响

为了获得高质量的结构光超分辨图像以及偏振求解结果，需要对照明光束的偏振状态进行精确的调控。照明光束的偏振比不仅直接影响光束干涉形成的条纹质量，而且在偏振结构光照明显微镜中，其与偶极子方位信息的正确求解直接相关。在1.2节中我们分析了偏振调制对条纹形成的影响，在这里我们分析偏振调制对偶极子方向解析质量的影响。



注：Polar-SIM为偏振结构光照明显微；LCVR为液晶可变相位延迟器；mask为光学掩膜板；AOM为声光调制器；BE为激光扩束；RF为反射镜；SLM为空间光调制器；HWP为半波片；PBS为偏振分束立方；QWP为四分之一波片；DM为二向色镜；TL为透镜套筒；EF为滤光片；OB为物镜；SP为载物台。

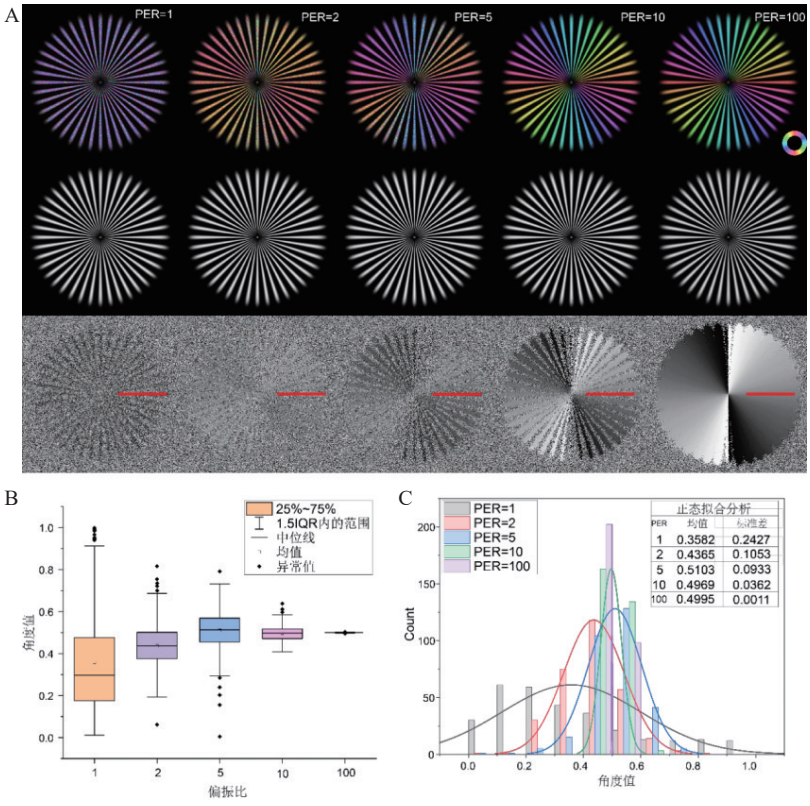
图5 Polar-SIM系统结构[14] A为Polar-SIM系统结构；B为LCVR方案物镜后焦面处561 nm激光测量得到的p偏振和s偏振的偏振比；C为Pizza波片物镜后焦面处561 nm激光测量得到的p偏振和s偏振的偏振比

表 1 LCVR 方案偏振比测量原始数据

波长（nm）	0°			60°			120°		
	I_{par}（mW）	I_{vec}（mW）	*PER*	I_{par}（mW）	I_{vec}（mW）	*PER*	I_{par}（mW）	I_{vec}（mW）	*PER*
405	1.70	0.01	170	1.70	0.03	67	1.70	0.07	25
488	8.30	0.02	400	8.30	0.02	405	8.30	0.07	126
561	12.30	0.03	486	12.30	0.02	539	12.30	0.02	536
640	10.20	0.02	500	10.20	0.07	150	10.20	0.03	300

注：LCVR 为液晶可变相位延迟器；I_{par} 为偏振片置于平行于照明条纹方向时的出光功率；I_{vec} 为偏振片置于垂直于照明条纹方向时的出光功率；*PER* 为测量所得的偏振比。

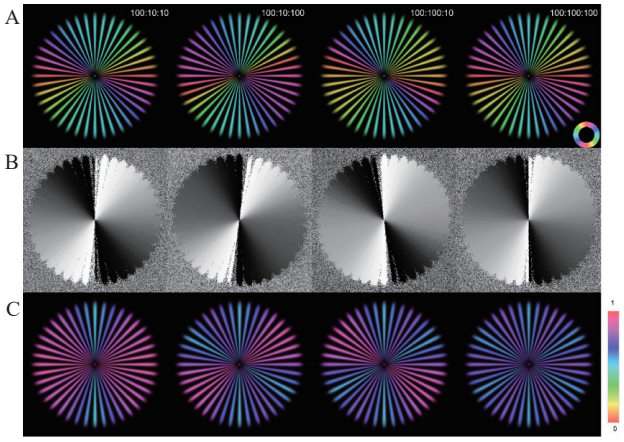
我们对不同偏振比下干涉形成的条纹照明西门子星样本进行了仿真，使用超分辨偏振解析算法对原始图进行重建。如图 6 所示，图 6A 从左到右依次展示了 PER 为 1、2、5、10、100 时的 Polar–SIM 角度解析结果（第 1 行）、SIM 结果（第 2 行）和偏振角度求解结果（第 3 行）。图 6B 是针对角度求解结果的统计，选取了图 6A 中角度求解结果的画红线区域进行统计，该角度的真实值被设置为 0.5。可以看出随着照明光束 PER 的增加，Polar–SIM 角度求解精度依次提升。图 6C 是对统计结果的正态拟合分析，从正态拟合分析得到的均值可以看出，照明光束 PER 在 10 以上的时候，偏振求解均值为 0.496 9，与设置的真实值 0.500 0 比较，误差已经小于 0.010 0，基本达到了定量偏振取向分析的需求。因此在偏振结构光照明成像中，应尽可能地保持照明光束 PER 大于 10。如果小于 10 则极易出现假阴性结果，导致无法判断样本偏振取向。在偏振结构光照明显微镜 Polar–SIM 中，利用 LCVR，可以在 3 个方向上都保持偏振比大于 100，进而保证偏振求解精度准确可靠。



注：Polar–SIM 为偏振结构光照明显微；PER 为仿真的偏振比；SIM 为结构光照明显微。

图 6 不同偏振比下 Polar–SIM 求解结果对比 A 为 PER 为 1、2、5、10、100 时的 Polar–SIM 角度解析结果（第 1 行）、SIM 超分辨结果（第 2 行）与偏振角度求解结果（第 3 行）；B 为 A 图中偏振角度求解结果箱线图；C 为 A 图中偏振角度求解结果正态拟合分析结果

除了照明光束的 PER 值以外，由于 SIM 需要旋转激发条纹方向，因此需要控制 3 个方向上的 PER 接近。通过 Pizza 波片后光束往往在垂直方向上 PER 较高而在其他方向上 PER 较低；而 LCVR 可以矫正 3 个方向的偏振比达到接近一致。我们通过仿真来研究 PER 差异对最终重建的影响，如图 7 所示。



注：PER为照明光偏振比；Polar–SIM为偏振结构光照明显微；OUF为偶极子取向一致性。

图7 不同照明方向PER差异对偏振求解结果的影响 A为3个方向的PER分别为100:10:10、100:10:100、100:100:10和100:100:100时的Polar–SIM角度解析结果；B为A图中对应PER下的偏振角度求解结果；C为A图中对应PER下的OUF结果

图7A、图7B、图7C分别描述了不同PER下Polar–SIM角度解析结果、偏振角度求解结果和偶极子取向一致性（orientation uniform factor, OUF）结果的对比。从左至右分别为3个方向的PER为100∶10∶10、100∶10∶100、100∶100∶10和100∶100∶100时的情况。从图中可以看出，在PER较强的方向上偏振角度与OUF求解结果均较为精确，但PER较弱的方向上求解存在较大误差。对比图6中PER为10:10:10的情况可以发现，虽然100:100:10的PER均较高，但是在求解逆矩阵得到偶极子角度的过程中会存在误差，导致角度求解偏差。因此，在偏振结构光照明显微镜Polar–SIM中，偏振控制使用了LCVR方案，通过精细调节电压值来消除各个角度偏振比的差异。

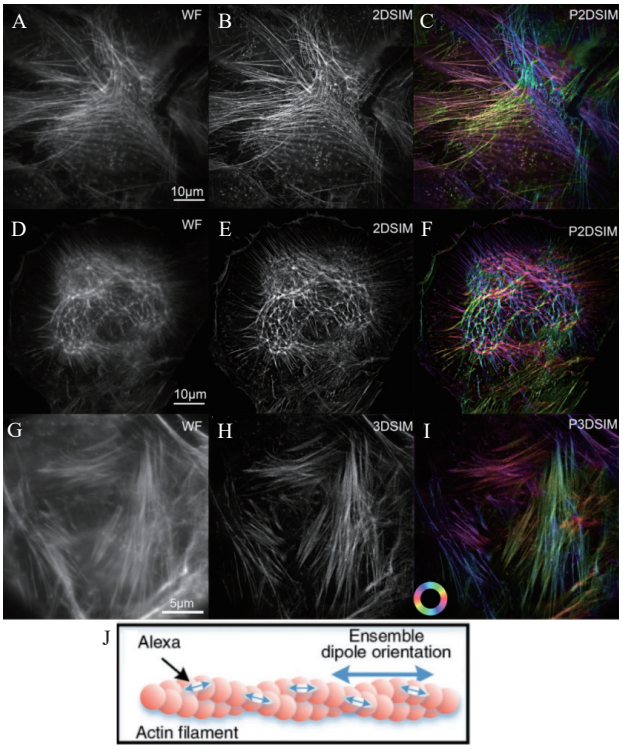
3 生物实验结果

3.1 肌动蛋白微丝偏振解析结果

肌动蛋白在细胞形态维持与有丝分裂中扮演着重要的角色[19]，同时为多种细胞器互作提供了位点[20]。

当U–2 OS细胞达到75%汇合度时，使用4%甲醛溶液（Invitrogen，R37814）于室温固定15 min。随后用含0.1% Triton™ X–100（Invitrogen，HFH10）的磷酸盐缓冲生理盐水（phosphate buffered saline, PBS）处理细胞5 min，随后用PBS冲洗以去除残留的Triton™ X–100。为标记肌动蛋白丝，使用AF488–鬼笔环肽（Invitrogen，A12379）染料于室温染色1 h。染色后用PBS洗涤样品2次以去除多余染料，将带有染色细胞的盖玻片在暗处风干。最后，向每个盖玻片滴加30 μL ProLong封片剂（Invitrogen，P36984），于4 ℃避光风干过夜。

图8展示了Polar–SIM拍摄的肌动蛋白微丝结果。图8A、图8D为二维结构光照明超分辨2D–SIM模态宽场（wide field, WF）结果；图8B、图8E为2D–SIM模态结构光照明超分辨（SIM）结果；图8C、图8F为2D–SIM模态偏振结构光照明显微成像（Polar–SIM）结果。从图中可以看出，相比WF成像结果，Polar–SIM求解结果准确度更高、光学层切效果更好，从而能够更加清晰地分辨细丝的方向。图8G、图8H、图8I分别为使用Polar–SIM计算得到的WF、3D–SIM与三维偏振结构光照明显微成像（polarized three–dimensional structured illumination microscopy, P3D–SIM）结果的最大强度投影，其数据来源于Open–3DSIM公开数据集[21]。从以上偏振求解结果可以看出，在细胞内，鬼笔环肽分子以平行的方式插入到肌动蛋白微丝中，其结构如图8J所示。



注：U–2 OS为人骨肉瘤细胞；WF为宽场成像；2D–SIM为二维结构光照明超分辨成像；Polar–SIM为偏振结构光照明超分辨成像；3D–SIM为三维结构光照明超分辨成像；P3D–SIM为三维偏振结构光照明超分辨成像。

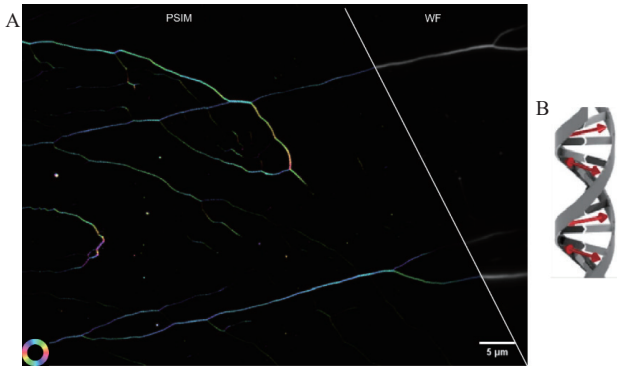
图8 鬼笔环肽标记的U–2 OS肌动蛋白 A、D为肌动蛋白微丝WF结果；B、E为肌动蛋白微丝2D–SIM结果；C、F为肌动蛋白微丝Polar–SIM结果；G、H、I为肌动蛋白微丝的WF、3D–SIM与P3D–SIM结果的最大强度投影；J为鬼笔环肽在肌动蛋白微丝中插入方式示意图

3.2 λDNA偏振解析结果

小分子药物在药物研发、基因编辑等方面发挥着至关重要的作用[22]，因此有必要深入了解其与DNA的结合模式。

将0.5 g聚甲基丙烯酸甲酯（Solarbio，M9810）溶解于10 mL义齿清洁水中，提取上清液并滴加至载玻片形成薄膜。取0.3 μL λ–DNA（Invitrogen，SD0021）与32 μL 1000×SYTOX™橙色核酸染色剂（Invitrogen，S11368）混匀，用968 μL PBS稀释后，取1 μL溶液滴加至载玻片并晾干。使用ProLong封片剂（Invitrogen，P 36965）将盖玻片密封于载玻片上。

图9A展示了Polar–SIM在2D–SIM模态下拍摄的λDNA的Polar–SIM与WF结果。从图像中可以看出，SYTOX以垂直方向插入DNA双螺旋中，其可能的结果如图9B所示，此结果也通过三维偶极子取向结果得到验证[23]。



注：Polar–SIM为偏振结构光照明超分辨成像；WF为宽场成像。

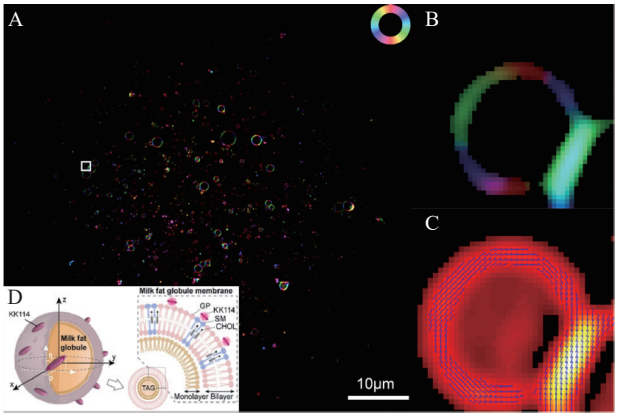
图9 SYTOX™橙色核酸染色剂标记的λDNA A为λDNA的Polar–SIM与WF结果；B为SYTOX在DNA双链中插入方式示意图

3.3 乳脂肪球偏振解析结果

乳制品中的乳脂肪球（milk fat globule, MFG）作为重要的营养成分之一[24]，在婴幼儿大脑的发育过程中发挥着重要的作用[25]。

使用新鲜牛奶。将牛奶与双蒸水（ddH_2O）按1:20的比例制备稀释液。随后将KK114（Abberior，STRED–0199–1MG）与双蒸水按1∶16的比例混合，再将稀释后的牛奶与染色液按1∶1的比例混合，于25 ℃反应15 min。接下来，将低熔点琼脂糖按质量体积比1∶100与水混合，加热至75 ℃直至琼脂糖颗粒完全融化。取2片洁净载玻片叠放，保持约1 mm的厚度，将33 μL 75 ℃的1%琼脂糖凝胶滴加至玻片之间，静置30 min固化，之后用镊子轻轻分离。最后，将5 μL液体样品滴加至成像皿中，覆盖凝胶垫并用指甲油固定。

图10展示了Polar–SIM在2D–SIM模态下拍摄的MFG偏振成像结果。与色环进行比对发现MFG偏振方向与其结构走向平行。对图10A中白色方框区域进行放大如图10B所示，对其偶极子取向进行分析如图10C所示，其走向使用蓝色箭头表明。由Polar–SIM结果可知，MFG中具有亲水性的荧光胆固醇类似物KK114以平行的结果插入到结构中，如图10D所示。



注：MFG为乳脂肪球；Polar–SIM为偏振结构光照明超分辨成像。

图10 MFG的Polar–SIM结果与偶极子取向分析 A为Polar–SIM解析得到的MFG偏振排列方向结果；B为A图中白色方框区域的放大；C为A图中白色方框区域的偶极子排布方向解析结果；D为MFG中荧光胆固醇类似物KK114排布的结构示意图

4 结语

作为探索生命科学的重要工具，超分辨率显微镜克服了共聚焦和荧光显微镜的分辨率局限。其中偏振结构光照明显微成像技术（Polar–SIM）可以说是SIM的新面貌，而且在超分辨成像的基础上实现了测量荧光偶极子取向的功能，通过解调荧光偏振信息分析出细胞结构、DNA偏振信息或神经元相关蛋白骨架结构等，为传统SIM成像提供了新范式。本文介绍了Polar–SIM对于偏振角度的解析原理，并对不同偏振调制方式进行了系统的对比。要获得高质量的偏振成像结果，需要保证结构光照明的偏振度较高且各项均一性好。我们通过精准调制SIM的照明偏振，获得了各个方向大于200:1的高偏振比，这对于精准的偏振角度与偏振自由度探测具有重要

意义。通过仿真，我们对比了不同的偏振比对于偏振角度和偏振自由度探测的影响。进一步，对细胞内的肌动蛋白微丝、λDNA、乳脂肪球等结构进行了偏振超分辨成像，结果展现了多模态偏振结构光照明超分辨显微成像系统解析生物大分子取向的巨大潜力。

未来，我们希望通过Polar-SIM技术解决更多的生物学问题，例如以偏振结构光照明超分辨成像为基础的分子力显微镜[26]有望为细胞迁移中伪足的形成以及巨噬细胞的变形研究带来新的研究手段。同时，Polar-SIM在细胞的脂膜的成分研究中表现出了惊人的潜力，借助Polar-SIM可以进一步研究脂膜在生物过程中的有序性变化[27]。更进一步地，借助尼罗红（Nile Red）在极性与非极性环境中光谱偏移的特性与卷积神经网络（convolutional neural network, CNN），Polar-SIM能够同时分辨细胞内部15种细胞器，实现活细胞的全景成像[28]。

[参 考 文 献]

[1] Zunino A, Garrè G, Perego E, et al. Structured detection for simultaneous super-resolution and optical sectioning in laser scanning microscopy [J]. Nature Photonics, 2025, 19(8): 888-897.

[2] Wang L, Chen Y, Guo J, et al. Phasor-FSTM: a new paradigm for multicolor super-resolution imaging of living cells based on fluorescence modulation and lifetime multiplexing [J]. Light: Science & Applications, 2025, 14: 32.

[3] Scipioni L, Rossetta A, Tedeschi G, et al. Phasor S-FLIM: a new paradigm for fast and robust spectral fluorescence lifetime imaging [J]. Nature Methods, 2021, 18(5): 542-550.

[4] Zhanghao K, Chen L, Yang X S, et al. Super-resolution dipole orientation mapping via polarization demodulation [J]. Light: Science & Applications, 2016, 5: e16166.

[5] 杨子仪,李世晗,刘芷如,等.荧光偏振成像技术及其生物学应用[J].激光与光电子学进展, 2024, 61(18): 1-15.

[6] Hall M D, Yasgar A, Peryea T, et al. Fluorescence polarization assays in high-throughput screening and drug discovery: a review [J]. Methods and Applications in Fluorescence, 2016, 4(2): 022001.

[7] Jameson D M, Croney J C. Fluorescence polarization: past, present and future [J]. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 2003, 6(3): 167-176.

[8] Masters B R. Book review: principles of fluorescence spectroscopy, third edition [J]. Journal of Biomedical Optics, 2008, 13(2): 029901.

[9] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. Science, 2006, 313(5793): 1642-1645.

[10] Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy [J]. Journal of Microscopy, 2000, 198(2): 82-87.

[11] Liu Y, Lu Y, Yang X, et al. Amplified stimulated emission in upconversion nanoparticles for super-resolution nanoscopy [J]. Nature, 2017, 543(7644): 229-233.

[12] York A G, Parekh S H, Nogare D D, et al. Resolution doubling in live, multicellular organisms via multifocal structured illumination microscopy [J]. Nature Methods, 2012, 9(7): 749-754.

[13] Rego E H, Shao L. Practical structured illumination microscopy [M]//Verveer P J. Advanced fluorescence microscopy: methods and protocols. New York: Springer, 2015: 175-192.

[14] 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.

[15] Wang H, Wang W, Xu X, et al. High-spatiotemporal-resolution structured illumination microscopy: principles, instrumentation, and applications [J]. Photonics Insights, 2025, 4(1): R01.

[16] Huang X, Fan J, Li L, et al. Fast, long-term, super-resolution imaging with Hessian structured illumination microscopy [J]. Nature Biotechnology, 2018, 36: 451-459.

[17] Li Y, Cao R, Ren W, et al. High-speed autopolarization synchronization modulation three-dimensional structured illumination microscopy [J]. Advanced Photonics Nexus, 2024, 3(1): 016001.

[18] 赵天宇,周兴,但旦,等.结构光照明显微中的偏振控制[J].物理学报, 2017, 66(14): 288-299.

[19] Duarte S, Viedma-Poyatos Á, Navarro-Carrasco E, et al. Vimentin filaments interact with the actin cortex in mitosis allowing normal cell division [J]. Nature Communications, 2019, 10: 4200.

[20] Gatti P, Schiavon C, Cicero J, et al. Mitochondria- and ER-associated actin are required for mitochondrial fusion [J]. Nature Communications, 2025, 16: 451.

[21] Cao R, Li Y, Chen X, et al. Open-3DSIM: an open-source three-dimensional structured illumination microscopy reconstruction platform [J]. Nature Methods, 2023, 20: 1183-1186.

[22] Xu J, Wang G A, Gao L, et al. Enabling programmable dynamic DNA chemistry using small-molecule DNA binders [J]. Nature Communications, 2023, 14: 4248.

[23] Zhong S, Qiao L, Ge X, et al. Three-dimensional dipole orientation mapping with high temporal-spatial resolution using polarization modulation [J]. PhotoniX, 2024, 5: 12.

[24] Liu Q, Liu Y, Zhao J, et al. Impact of manufacturing processes on glycerolipid and polar lipid composition and ultrastructure in infant formula [J]. Food Chemistry, 2024, 444: 138623.

[25] Liu Y, Liu Y, Liu Q, et al. Comparison of phospholipid composition and microstructure of milk fat globules contained in human milk and infant formulae [J]. Food Chemistry, 2023, 415: 135762.

[26] Blanchard A, Combs J D, Brockman J M, et al. Turn-key mapping of cell receptor force orientation and magnitude using a commercial structured illumination microscope [J]. Nature Communications, 2021, 12: 4693.

[27] Zhanghao K, Liu W, Li M, et al. High-dimensional super-resolution imaging reveals heterogeneity and dynamics of subcellular lipid membranes [J]. Nature Communications, 2020, 11: 5890.

[28] Zhanghao K, Li M, Chen X, et al. Fast segmentation and multiplexing imaging of organelles in live cells [J]. Nature Communications, 2025, 16: 2769.