
可变相位板实现简单稳定的三维MINFLUX激发

作者：writer 来源：科学网

本文原地址：<https://www.iikx.com/news/progress/29093.html>

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

可变相位板实现简单稳定的三维MINFLUX激发。 导读

近日，欧洲分子生物学实验室及维也纳大学的Jonas Ries等人开发了一种基于可变相位板的MINFLUX激励模块，该模块可实现具有高时空分辨率的三维多色MINFLUX激发且具有稳定、简单和低成本的特性。该模块可生成高对比度的MINFLUX点扩散函数，并实现对荧光团的快速扫描。本研究首先通过实验证明了在低数值孔径(NA)的系统下优化MINFLUX点扩展函数的生成和快速扫描荧光团的可行性，然后通过模拟仿真表明同样的系统参数可以直接转移到高NA的显微镜中且不会造成性能损失，最后讨论了可能限制点扩散函数质量的实验缺陷以及克服缺陷的方案。

该成果发表在《Light: Science Application》，题为《Simple and robust 3D MINFLUX excitation with a variable phase plate》。欧洲分子生物学实验室的Takahiro Deguchi为论文第一作者，欧洲分子生物学实验室及维也纳大学的Jonas Ries为论文通讯作者。

研究背景

MINFLUX是一种结合了单分子定位技术和点扩展函数高速时空调控的超分辨荧光显微技术，其利用一个甜甜圈图案的环状点扩展函数中央零强度位置，来激发并探测单个荧光团周围的光子信号，利用统计学模型对收集的光子进行分析最终给出定位。MINFLUX是一种具有精确和超高光子效率特点的荧光分子定位方式，它的两大特性为：单一时间只激活单个荧光分子发射，以获得最佳分子分辨效果；执行定位时荧光激发的光分布采用中心零强度（而非最大强度）。MINFLUX在定位精度方面已经优于基于相机的传统单分子定位显微镜，因此其被广泛应用于活细胞的超分辨率成像，且在跟踪荧光团的应用中具有超高的时空分辨率。

为了获得最佳性能，MINFLUX显微镜需要对图案进行快速和重复扫描。在普通显微镜中，甜甜圈形状的光束由涡旋相位模式产生，并通过光电偏转器实现横向扫描。而对于3D MINFLUX显微镜，3D甜甜圈图案的光束由顶帽相位模式产生，并使用电光驱动的变焦透镜进行轴向扫描。而所有快速的3D扫描解决方案都需要昂贵的组件。

通过插入涡旋相位板，可以将标准共聚焦显微镜升级到MINFLUX模式，但其分辨率和扫描速度远不如专业的商用MINFLUX显微镜。此外，也可以利用电光调制器改变干涉相位，通过两束光束的干涉创建双叶激发模式，该模式可以实现对单个荧光团的快速扫描。然而，生成具有亚纳米精度和高稳定性的快速扫描的多色3D MINFLUX模式仍然具有挑战性且成本高昂。

创新研究

1、创建简单的相位图案实现一维MINIFLUX定位

先前研究表明，在每个维度上使用不同的点扩散函数实现MINIFLUX比由涡旋相位模式产生的甜甜圈形光束实现MINIFLUX更具优势。因此，本研究采用如图1(a)所示的3种简单的二元相位模式产生紧凑的MINIFLUX光束。这些双叶点扩散函数(PSF)不仅实现了与环形光束相当的定位精度，还具有更紧凑的尺寸。由于其紧凑性，它们需要较低的激光功率，这有效减少了由不完美PSF最小值、样品自发荧光和焦外荧光引起的背景干扰，从而提高了定位精度。与环形PSF相比，双叶PSF具有更大的有效视场：随着荧光团距离扫描模式中心的距离增加，其定位精度降低得更慢。这一特性使得双叶PSF在初始粗定位过程中需要更少的迭代次数，从而提高了扫描速度，减少了光子损失，降低了系统复杂性，并提高了实时反馈的速度。

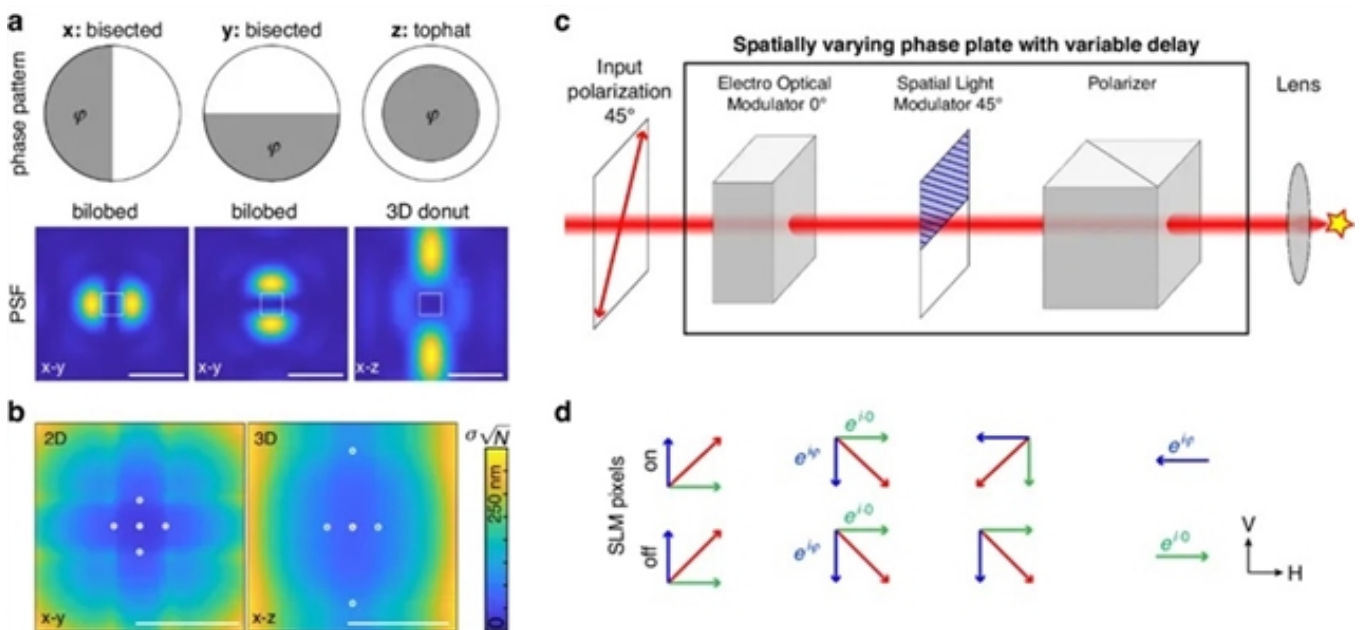


图1. 基于可变相位板的MINIFLUX激励模块设计想法

2、基于偏振光学的快速可变相位板

在光轴上或在物镜的焦点上利用光束相消干涉产生最小的对称图案，这需要存在 的相位差。相位模式的产生可以用空间光调制器，其可以通过改变相位来扫描强度最小的位置。然而，对于MINIFLUX所需的快速扫描，使用空间光调制器产生连续相位的延迟太慢，因此仍然需要电光偏转器实现快速扫描。如图1(c)所示，本研究通过结合电光调制器、空间光调制器和偏振器来产生具有可变相位延迟的二元相位图。入射激发光以45°偏振角进入偏振轴垂直方向为0°的电光调制器。因此，电光调制器可以在光束的垂直偏振分量和水平偏振分量之间产生相位延迟。

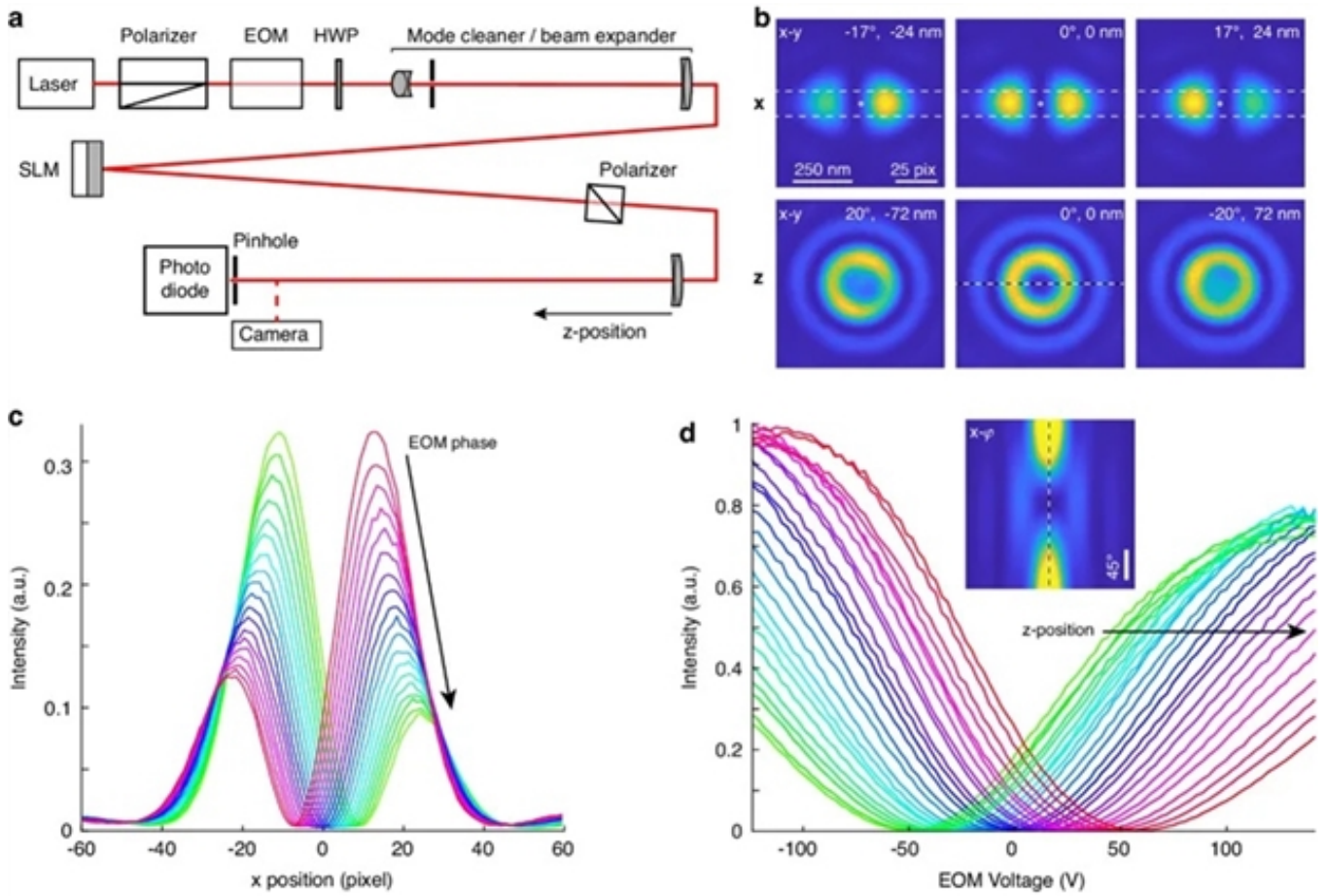


图2. 使用相机检测的实验演示

本研究设计了如图2所示的光路进行实验验证。等分相位图案产生高对比度的预期双叶点扩展函数。通过改变电光调制器相位，可以横向扫描这些图案，且对比度损失极小。为了模拟单个荧光团看到的激发信号，本研究在消色差透镜的焦点上放置了一个微小的针孔，该针孔传输点扩展函数中心部分的强度如图3(a)所示。此外，通过重复利用电光调制器产生三个不同的相位来测试MINFLUX激励模块的生成速度。在每个位置激发时间低至 $1\ \mu\text{s}$ 的情况下，可以可靠地检测到具有高对比度的三种不同强度值。使用共路多波长激光束作为入射光，即可在相同的系统下实现多色MINFLUX激发。由于在激光器之间切换的所需时间不到 $1\ \mu\text{s}$ ，因此在一个MINFLUX定位时间内，颜色可以多次交替切换，从而实现两个或多个荧光团的准同时定位。

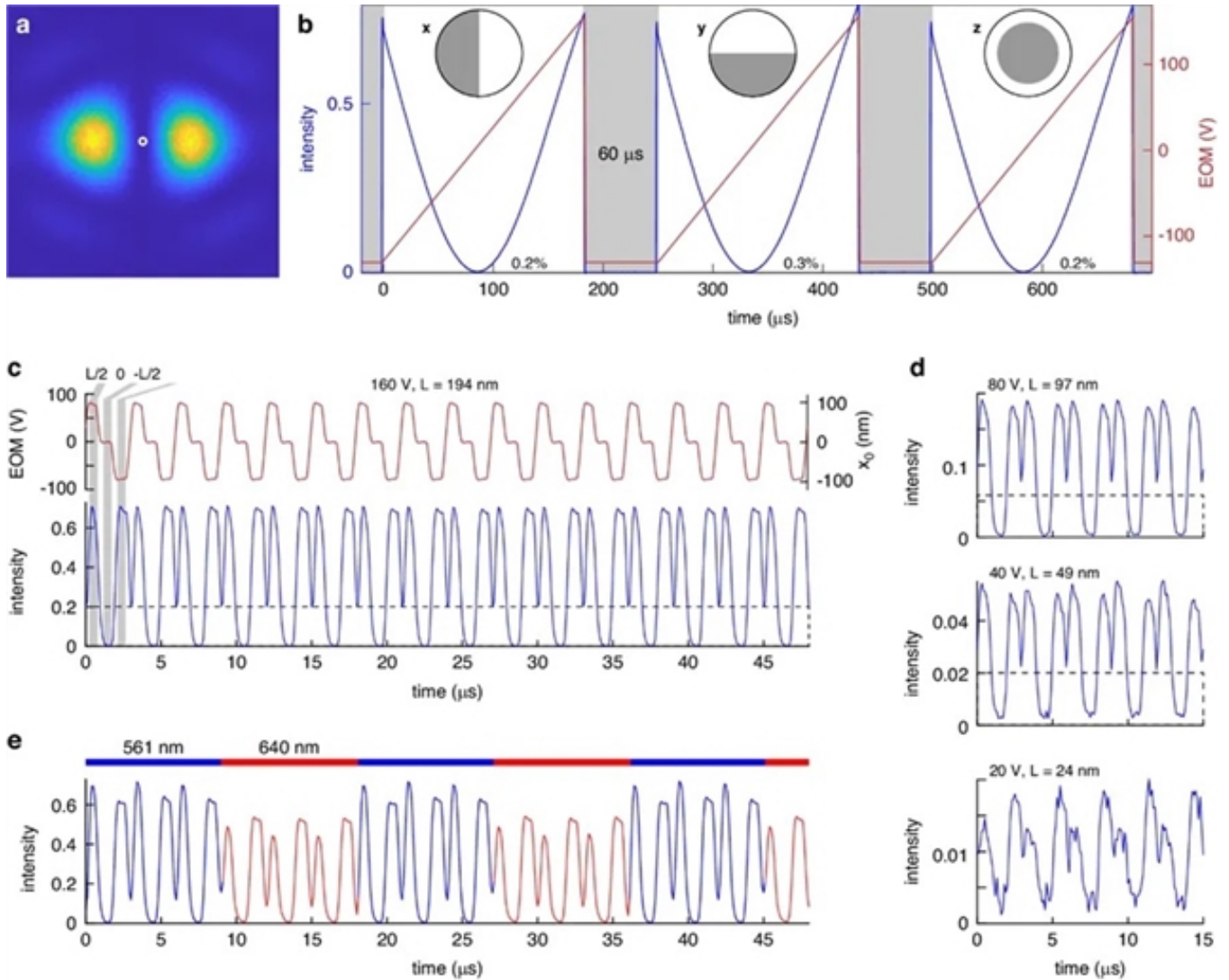
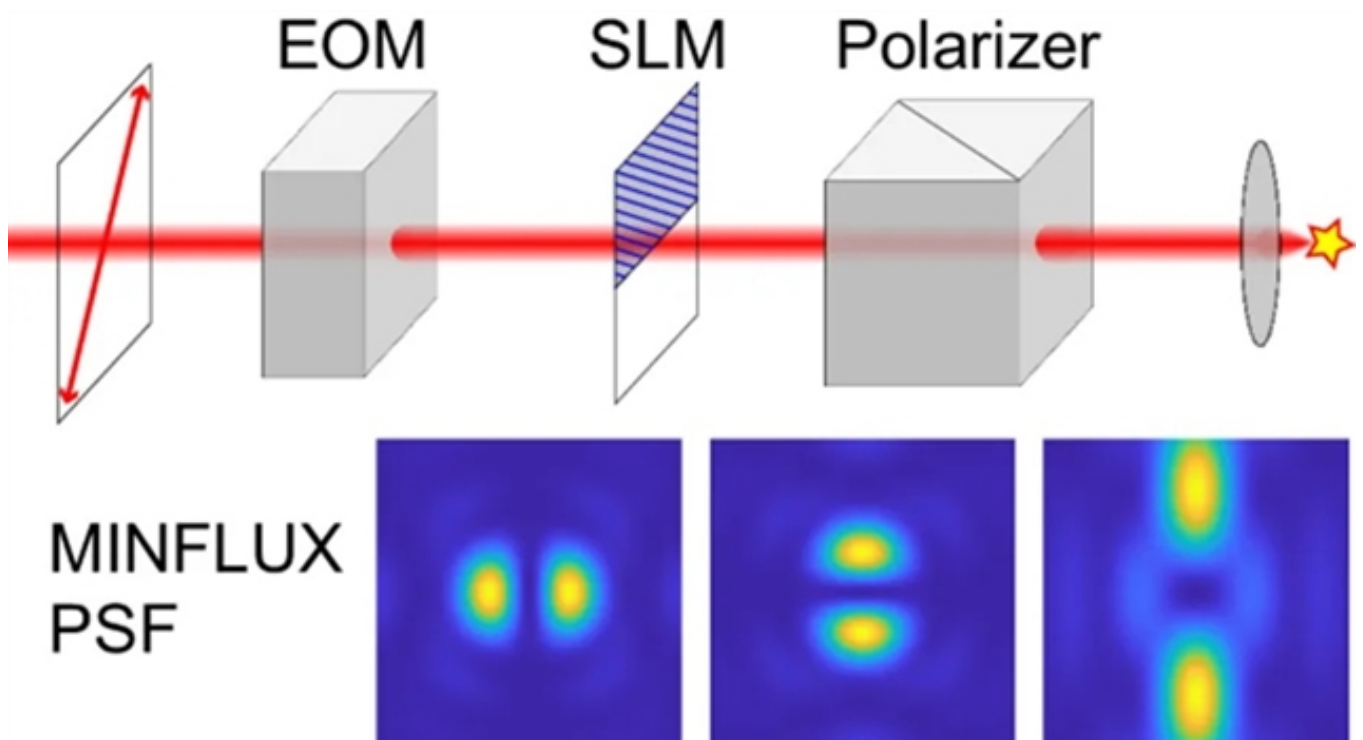


图3. 利用针孔进行快速扫描的实验演示，波束路径见图2

总结展望

本研究成功开发出一种为MINFLUX技术创建激发光束强度图案的新方法。这种方法结合了两个更简单的器件:空间光调制器和电光调制器。空间光调制器用于操纵光的模式，而电光调制器控制光的强度。

这种新方法的优点如下：首先，使用更简单的组件可以更快地完成扫描，直接提高了测量的准确性，从而获得了更清晰、更详细的分子定位图像。其次，更简单的系统大大降低了MINFLUX所需的成本。最后，此方法更容易集成到普通的显微镜中，简化了研究过程。这一研究为创造更易获得的MINFLUX显微镜铺平了道路，并可能在分子水平的生物研究中发挥更多的作用。（来源：LightScienceApplications微信公众号）



相关论文信息：<https://doi.org/10.1038/s41377-024-01487-1>

特别声明：本文转载仅仅是出于传播信息的需要，并不意味着代表本网站观点或证实其内容的真实性；如其他媒体、网站或个人从本网站转载使用，须保留本网站注明的“来源”，并自负版权等法律责任；作者如果不希望被转载或者联系转载稿费事宜，请与我们联系。

作者：Jonas Ries 来源：《光：科学与应用》

更多 科学进展 请访问 <https://www.iikx.com/news/progress/>

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，[爱科学iikx.com](https://www.iikx.com)转发