无标记单纳米颗粒识别与表征，包括新发传染性病毒

Minh-Chau Nguyen [1]、Peter Bonnaud [1]、Rayane Dibsy [2]、Guillaume Maucort [3]、Sébastien Lyonnais [4]、Delphine Muriaux [2,4]、Pierre Bon [1,*]

1 – 利摩日大学、法国国家科学研究中心、XLIM，UMR 7252，法国利摩日 F-87000

2 – 蒙彼利埃传染病研究所（蒙彼利埃传染病研究所）、蒙彼利埃大学、法国国家科学研究中心 UMR 9004，法国蒙彼利埃

3 - 数字光子学与纳米科学实验室、波尔多大学，法国塔朗斯 F-33400，法国；***LP2N UMR 5298***，法国国家科学研究中心，***F-33400*** 塔朗斯，法国

4 – CEMIPAI，蒙彼利埃大学，法国国家科学研究中心 UAR 3725，法国蒙彼利埃

* 通讯作者：pierre.bon@cnrs.fr

对未知粒子（包括病毒和纳米颗粒）进行筛查，是医学、工业和污染物测定的关键。然而，现有技术需要预先了解样品，或对样品进行改造（例如加入荧光标记）。在此，我们介绍RYtov纳米颗粒识别显微术（RYMINI），这是一种无创、无损的光学方法，将全息无标记三维追踪与高灵敏度定量相位成像结合于紧凑型光学装置中。该方法专用于溶液中纳米物体的表征，能够适用于三级生物安全实验室等要求严苛的环境。我们对吸收性和透明颗粒，以及溶液中的感染性HIV-1、SARS-CoV-2和细胞外囊泡，均在单个对象层面进行了计量学表征。我们展示了RYMINI测定每个单颗粒的种类、浓度、尺寸、复

折射率和质量的能力。我们探讨了该方法在未知溶液中的应用，无需了解或建立粒子响应模型。它为在未知领域实现无标记纳米物体识别铺平了道路。

Main

获取单个纳米颗粒（NP）的计量参数，是表征食品、工业和生物医学领域生产过程的关键[1–3]，也有助于识别粒子之间相关的本质差异[4]。在这一探索中，一些测量方法有望让我们前所未有地了解每个独立纳米物体，包括其分子含量和物质密度；这需要同时掌握每个粒子在其天然环境中的尺寸和重量。已有研究提出采用动态光散射（DLS）进行整体测量[5,6]，以获取粒子的尺寸——即使是在多分散溶液中——但测量信号固有的特异性不足，使得当尺寸分布相同但本质不同的纳米颗粒共存于同一溶液中时（例如空载和满载的细胞外囊泡），这种方法难以应用。

在单颗粒水平上，已有多种技术被提出，可在不改动样品的情况下测量物体尺寸（例如，不进行荧光标记）。基于光散射[7]或单颗粒追踪（SPT）[8–15]，这些技术还可以提取与颗粒折射率和溶剂之间失配相关的信号。随后需要预先了解颗粒的光-物质相互作用，才能对颗粒进行分类，因此这些方法在用于吸收性和透明纳米物体时都极具挑战性。此外，在处理囊泡或病毒等纳米尺寸生物物体时，能够获取

颗粒折射率还不足以作出准确的生物学解释，而且在光学领域之外，这项技术的发展仍鲜为人知。在微观尺度上，研究已于 20 世纪 50 年代证明[16] ，光-物质相互作用可以转化为生物样品的质量测量。这种方法已广泛应用于可通过光学方式分辨的样品，包括真核细胞[17,18] 和细菌[19]。此外，研究者还提出了几种只需有限先验知识的纳米颗粒或病毒质量测量方法，包括电子显微镜[20,21], 、质谱法[22,23], 和纳米级孔[24]。然而，这些方法要么具有破坏性，要么仅适用于固定颗粒。

我们提出 RYtov 纳米颗粒识别显微术（RYMINI），这是一种新工具，无需预先了解粒子的光学响应，即可识别溶液中的每个纳米颗粒，并表征其尺寸、浓度、光衰减和分子质量。它使检测和表征未知物体成为可能，包括新出现的病毒或污染物。我们结合了全息术的能力：（i）在单幅二维图像中对大体积三维体积成像；（ii）对每个自由扩散的粒子进行数值再聚焦[25,26], ，并兼具自参考干涉测量的高稳定性、紧凑性和灵敏度[27,28]。由此可以获取每个粒子的尺寸 d（通过 SPT分析）、复折射率 $\tilde{n} = n + i \cdot k$ （以及由此得出的电极化率$\chi = \tilde{n}^2 - 1$ ）和质量 m（以道尔顿或克为单位）。此外，成像体积是单次拍摄测量粒子浓度的关键要素，也可以在事后精确确定。由于该装置旨在表征具有传染性的病毒，因此其设计完全兼容在苛刻环境中进行采集，包括在生物安全柜内采集。

采集与处理方法

我们方法的核心思想是同时测量每个纳米物体的尺寸以及光强和相位响应。这三项相互独立的测量提供了信号特异性，可用于确定关键计量信息，进而识别每个纳米颗粒。为此，我们使用光学显微镜对处于原生溶液中的自由扩散纳米颗粒（遵循布朗运动）进行成像。照明具有受控的空间相干性与时间相干性（超连续谱激光器，见方法和 SI.2），每个粒子——即使远离成像平面——都会在传感器上形成图像（图 1.a）。通过使用同时对光的相位φ 和强度I 敏感的探测器，可以根据单幅二维全息图以数值方式计算三维图像堆栈。唯一的要求是已知照明波长 λ 和显微镜参数（物空间中的像素尺寸和数值孔径）。为使我们的定位方法不受粒子性质（即吸收性、透明或介于两者之间）的影响，我们将强度 I 和相位信号 φ 融合为一种称为 Rytov 强度的新型观测量：

$$I_{Rytov} = \left|E_{Rytov}\right|^2 = \left|\frac{i\,\lambda \cdot n_m}{\pi}\left[\frac{\ln(I)}{2} + i \cdot \varphi\right]\right|^2,$$

其中 E_{Rytov} 为 Rytov 场（由极化率张量[29]推广而来），n_m 为周围介质的折射率。Rytov 场的实部（或虚部）与粒子和介质之间折射率差的实部（或虚部）相关。尽管采用的是无标记技术，但 Rytov 强度图像看起来与单个荧光粒子的图像非常相似（见图 1.b）。因此，可以应用常规且稳健的定位算法，将粒子超分辨定位至三维空间（高斯拟合，见方法），而无需预先了解样品的性质。

（例如，对于 SARS-CoV-2 病毒，精度可达 λ/10），成像体积通常为 20 pL（~28×28×25 μm3；完整表征见图 2.k 和补充信息 SI.6）。通过统计该数值可调重建体积内检测到的对象数量，即可无偏地测量粒子浓度。随后连续记录全息图，并提取每个粒子随时间变化的三维位置，以及各时间点的 Rytov 场图像。虽然粒子在移动，但可通过数值方法对其图像重新聚焦，使其在最佳焦平面上保持静止。因此，可对每个粒子的图像进行时间平均，从而获得每个自由扩散粒子的高信噪比（SNR）强度图像和相位图像（见视频 SI.1）。我们将这种方法称为动态平均成像（DAI）。经过 DAI 处理后，图像信噪比理论上会提高 √N 倍（N 为跟踪帧数），从而大幅改善粒子的表征。由于纳米颗粒遵循布朗运动进行扩散，根据斯托克斯–爱因斯坦定律[30]，，粒子直径 d 可通过以下公式求得：

$$d = \frac{k_B T}{3\pi\eta D},$$

其中，k_B 是玻尔兹曼常数，T 是流体温度，η 是流体的黏度，D 是扩散系数。测量 D 的经典方法是计算每个纳米颗粒的均方位移（MSD）。我们的全息方法能够获取三维位置，因此，与定位精度相当的二维方法相比，均方位移（MSD）的测量精度更高[31]。我们以高帧率（400 Hz）进行跟踪，以确保通过 MSD 准确评估扩散系数，并尽量降低环境不稳定性的影响

（热扰动、振动……）。我们甚至能够在三级生物实验室受限区域内的生物安全柜中进行测量（见图 3.e）。为了提高基于 MSD 的尺寸评估精度，我们利用了本方法的一项独特特性：Rytov 场同时取决于粒子的性质和尺寸，因此我们可以对具有相似 Rytov 场的粒子进行相关性分析（见补充信息 4）。此外，我们的方法无需预先知道粒子类型即可测定浓度：数值重建的成像体积会根据检测到的粒子的信噪比自动调整。

值得注意的是，分别测量直径 d 和对整个粒子图像积分得到的 Rytov 场E_{Rytov}，即可获取每个纳米颗粒的有用生物物理参数。这些参数包括纳米颗粒的质量 m（单位为克或道尔顿）及其复折射率 $\tilde{n} = n + i \cdot n'$，如下所示：

$$m = -\frac{\rho_{obj}}{2\, n_m \left(n - \mathrm{Re}(n_m)\right)} \iint_{x,y} \mathrm{Re}\left(E_{Rytov}\right) \mathrm{d}x\mathrm{d}y$$

$$= -\frac{\lambda\ \mathrm{Re}(n_m)\ \rho_{obj}}{2\pi\left(n - \mathrm{Re}(n_m)\right)} \iint_{x,y} \varphi \cdot \mathrm{d}x\mathrm{d}y = -\beta \iint_{x,y} \varphi \cdot \mathrm{d}x\mathrm{d}y,$$

$$\tilde{n} = \sqrt{1+\chi} = n_m + \frac{3\,\lambda\,\mathrm{Re}(n_m)}{\pi^2 d^3} \iint_{x,y} \left(-\varphi + \boldsymbol{i}\frac{\ln(I)}{2}\right) \mathrm{d}x\mathrm{d}y,$$

其中 n_m 为介质的（复）折射率，λ 为成像波长，ρ_{obj} 为块体材料密度（完整讨论见 SI.1）。图1.b 和影片 SI.1 概述了图像处理和信息提取过程。

结果与讨论

纳米颗粒溶液的表征

首先，我们使用 RYMINI 研究了含有介电粒子（聚苯乙烯、二氧化硅、金刚石）或等离激元粒子（金、银）的单分散溶液。其统计数据汇总于表1。

图 2.a-c 展示了对含有 100 nm 聚苯乙烯（PS）纳米颗粒的溶液进行成像的结果，并给出了每个粒子的复折射率和尺寸。测得纳米颗粒直径 d = 105 ± 13 nm，这与制造商提供的信息一致：平均尺寸为 102 ± 3 nm，分散度为 7.6 nm。采用相同方法研究了尺寸范围为 60 nm 至 200 nm 的聚苯乙烯纳米颗粒（图 2.d、e 和影片 SI.2），结果显示测得的折射率和密度均稳定。测得的复折射率中位数为 $\tilde{n} = (1.543^{+0.094}_{-0.063}) + i \cdot (0.005^{+0.081}_{-0.086})$，接近 $\lambda = 450nm$ [32] 下聚苯乙烯块体的折射率 $\tilde{n}_{PS} = 1.6104 + i \cdot 6.33 \cdot 10^{-7}$，证实这些粒子不存在等离激元效应。可以注意到，所分析的 100 nm 聚苯乙烯纳米颗粒批次在密度方面表现出具有统计学意义的差异，表明其精细组成可能存在差异。除聚苯乙烯粒子外，图 2.f-i 和影片 SI.3 还研究了二氧化硅（Si）和金刚石（C）介电纳米颗粒，以及包括金（Au）和银（Ag）在内的金属纳米颗粒。

对于等离激元粒子，光-物质相互作用在很大程度上取决于粒子的尺寸和性质，以及工作波长[29]。考虑图2.f-i中研究的金属粒子（60 nm和100 nm的金纳米颗粒，以及100 nm的银纳米颗粒），它们表现出等离子体

共振；根据米氏理论[33]，当照明波长分别为530 nm、570 nm和480 nm时，它们会发生共振。当照明波长处于等离子体共振波长时，复折射率的模达到最大值；当照明波长远离共振时，复折射率则趋近于块体材料的折射率。对于观察到的两种尺寸相同（100 nm）的粒子——金和银，在450 nm照明下测得的折射率分别为$\tilde{n}_{Au_{100}} = (1.333^{+0.159}_{-0.345}) + i \cdot (2.014^{+0.799}_{-0.950})$和$\tilde{n}_{Ag_{100}} = (1.338^{+0.101}_{-0.268}) + i \cdot (4.748^{+1.491}_{-1.497})$。这证实，在该照明波长下，银粒子的等离子体效应强得多，因为块体金和银的折射率表列为[34] $\tilde{n}_{Au_{bulk}@450\text{nm}} = 1.38 + i \cdot 1.92$和$\tilde{n}_{Ag_{bulk}@450\text{nm}} = 0.04 + i \cdot 2.65$。

粒子浓度测量需要同时了解成像体积以及其中的物体数量。二维视场（FOV）由放大倍率和传感器尺寸决定，而成像体积的深度则通过全息处理来选择。因此，FOV 的最大深度与系统的信噪比有关，并且与 Rytov场振幅呈良好的线性关系，如图 2.k 所示。因此，无需了解粒子的性质，即可事后调整并最大化三维体积（关于三维体积随不同粒子 Rytov 强度变化的讨论，见 SI.6）。对于明亮的粒子，例如 100 纳米银纳米颗粒，景深可达 50 μm（从 -25 到 +25 μm）。我们独特的数值设定成像体积的能力，使我们能够进行单次拍摄、无偏的粒子浓度测量。图 2.j 展示了对 100 纳米聚苯乙烯储备液的不同稀释液进行浓度测量的结果，该储备液的浓度为 1×10^{11} 粒子/毫升（由

商用 Videodrop（Myriade，法国）测得）。在 20 pL 的全息成像体积中（28×28×25 μm^3），通过在单时间序列采集中对纳米粒子轨迹进行计数，得出浓度（~300 以 400 Hz 采集的图像）。测得的浓度低至 0.5×10^8 粒子/毫升，或 ≈**0**。08 皮摩尔（约每个全息体积含 1 个粒子），精度为 0.4×10^8 粒子/毫升（0.06 皮摩尔）；结果与根据稀释比例估算的理论值吻合良好。

单颗粒水平的病毒识别与表征

接下来，我们让 RYMINI 分析溶液中的生物纳米粒子：(i) 人工 HIV-1 Gag病毒样颗粒（病毒样颗粒）以及富含病毒 RNA 的病毒样颗粒（HIV-1 Gag 病毒样颗粒+RNA）[35] (ii) 具有感染性的 HIV-1 粒子（HIV-1 野生型）以及表面缺少包膜糖蛋白的 HIV-1 粒子（HIV-1 ΔEnv），(iii) 具有感染性的 SARS-CoV-2，以及 (iv) 在未添加病毒样颗粒或未发生病毒感染的细胞培养中分泌的细胞外囊泡（细胞外囊泡）（图 3.a）。细胞外囊泡和病毒样颗粒可在无生物危害的条件下处理和测量，而 HIV-1 和 SARS-CoV-2 等具有感染性的三级病毒，则必须在三级安全防护的封闭生物环境中进行测量。因此，感染性样品的采集是在封闭的三级生物实验室（法国蒙彼利埃 CEMIPAI）的生物安全柜内进行的，如图 3.e 所示（为拍摄照片，已移除激光束安全挡板）。

对于我们认为适合进行测量的生物样品，我们测定了每个粒子的尺寸和质量（单位：道尔顿）。在一阶近似下，可以根据光学相位图像及其尺寸推断病毒干质量（见补充信息5）。病毒样颗粒、病毒和细胞外囊泡的结果如图3.b-d所示，并列于表2中。HIV-1 Gag病毒样颗粒的尺寸分析首先验证了我们方法的能力，其测得直径为141^{+35}_{-17}-nm，这

是高等真核细胞产生的HIV-1 Gag病毒样颗粒的预期尺寸[36,37]。富含病毒 RNA 的 HIV-1 Gag 病毒样颗粒（HIV-1 Gag VLP+RNA）显示出增大的尺寸，为179^{+25}_{-26}-nm，这与病毒 RNA 对病毒样颗粒组装的尺寸调控作用相吻合 [35]。转而考察天然的野生型感染性HIV-1粒子时，测得的直径（171^{+25}_{-17}-nm）大于此前通过冷冻电镜报道的直径（145 ± 25- nm）[38]。然而，这一结果是一致的，因为冷冻电镜测定的粒子尺寸仅限于脂质双层外侧，因此忽略了高度糖基化的$Gp160^{Env}$外壳；后者应当显著参与此处测得的流体动力学半径。这一点也得到了测量结果的证实：缺失表面$Gp160^{Env}$三聚体的HIV-1 Δ_{5}Env，其尺寸为（139^{+23}_{-14}-nm）。SARS-CoV-2的尺寸约为85.2^{+6}.−9 4.-nm，这与目前冷冻电镜（91 ± 11- nm）[39]和原子力显微镜（89 ± 19-nm）[40]报道的尺寸一致。最后，细胞外囊泡样品显示出更宽的尺寸范围（233^{+54}_{-39} nm），这符合此类异质性生物粒子的预期[41]。所有这些生物纳米粒子之间的质量变化与其尺寸和内容物的变化相关，其中HIV-1 Gag 病毒样颗粒 + RNA > HIV-1 野生型 > HIV-1 ΔEnv > HIV-1 Gag 病毒样颗粒 > SARS-CoV-2。细胞外囊泡可包含多种生物材料，例如蛋白质和核酸，因此其质量表现出显著异质性。有趣的是，粒子的有效密度（单位：$Da^{1/3}$/nm）证实，HIV-1 Gag 病毒样颗粒和细胞外囊泡的堆积程度较低，而HIV-1 VLP Gag + RNA、HIV-1 野生型、HIV-1 ΔEnv和SARS-CoV-2显示出相近的密度，这可能反映了病毒在直径为80-140 nm的范围内充分填充粒子的适应性。总之，这些结果表明，RYMINI是一种评估病毒尺寸、质量和密度的强大方法；

也可在高等级生物安全实验室中用于快速、简便地进行感染性病毒分析。

纳米颗粒自动识别

我们开发了一种基于卷积神经网络（CNN）的架构[42]，用于自动进行颗粒分类。该架构示意图见图 4.a，详细内容见方法和补充信息 7。为了识别每个颗粒，算法以复数里托夫图像作为输入，并按颗粒体积进行归一化，从而获得与复折射率成正比的信号。由于输入具有复数值，CNN 分类器采用了深度复数层架构[43,44]。

图 4.b 展示了归一化混淆矩阵，反映了该算法识别单个纳米颗粒性质的能力。我们的卷积神经网络能够准确分类介电纳米颗粒、病毒样颗粒和金属纳米颗粒：大多数介电颗粒和病毒样颗粒标签的准确率约为 80%，金属颗粒标签的准确率则为 95%。主要错误归因于未清理的异常输入（见补充信息 SI.7 ）。对于病毒，准确度取决于病毒类型：SARS-COV-2 的准确度约为 86%，但 HIV-1 野生型与 HIV-1 ΔEnv 之间容易发生混淆。这是可以理解且可预见的，因为 HIV-1 ΔEnv 包含两个群体：一个较小的群体被判定为未成熟颗粒（其尺寸和质量特征与 HIV-1 野生型相近），另一个较大的群体则被视为成熟颗粒[36]。正如预期，细胞外囊泡这一异质性类别也只能以中等置信度进行分类[45]。

结论

据我们所知，我们完整的光学 RYMINI 方法首次实现了在单颗粒水平上对任意纳米颗粒溶液进行识别和计量学表征，且无需预先了解样品性质。该方法能够确定每个检测到的粒子（包括病毒类对象）的类型，并通过单次拍摄测得其浓度、尺寸、复折射率和质量（以克和道尔顿为单位）。我们已在金属和介电纳米颗粒的单分散溶液，以及未经纯化的病毒溶液中证明了该方法的能力；后者是在三级防护实验室（BSL3）的生物安全柜内直接进行的。样品制备和采集都十分简便，因为 RYMINI 技术能够通过单次拍摄获得大体积成像。检测亚皮摩尔浓度溶液仅需不到一秒，并且只需 10µL 溶液。目前的灵敏度足以识别并完整表征小至 SARS-COV-2（~88 nm）的病毒，以及尺寸小至 40 nm 的金属颗粒和 60 nm 的介电颗粒（聚苯乙烯）。通过改变照明方案，可以进一步提高检测灵敏度，但代价是可访问的成像体积会缩小。此外，每个粒子的无标记固有特征可用于以非侵入且具有生物安全保障的方式量化粒子的均一性。借助机器学习工具，可以自动识别每个检测到的粒子。我们认为，这种方法可成为常规污染分析、简便快速的生物风险判定、生产过程中的纳米颗粒计量，以及基础生物与非生物颗粒研究的重要工具。

方法

光学装置。该装置基于一台自制显微镜，使用四波横向剪切干涉仪[27,46] 测量光束的相位和强度。样品由超连续谱光纤激光器（Leukos，法国）照明，激光经短通700 nm二向色滤光片和450 ± 10 nm光学滤光片（Thorlabs）滤光后，照明功率达到10 mW。采用一个消色差透镜（75 mm，Thorlabs）和一个非球面透镜（50 mm，Thorlabs）实现柯勒照明。图像由Nikon Plan Fluor 100×、NA 1.30油浸物镜和一个400 mm消色差透镜（Thorlabs）构成的筒镜成像。使用分辨率测试靶（R3L1S4P，Thorlabs）测得显微镜总放大倍数为205×。干涉仪由改进型哈特曼掩模[47]，、一个中继透镜和一台2Me⁻ 满阱容量CMOS相机（Q-2HFW-hm，Adimec）组成。系统搭建在40×50-cm光学平台上，总高度为50 cm，便于操作并放入通风橱或生物安全柜中。

样品制备。将穿孔封口膜置于1.5号圆形盖玻片上，形成一个10μL的成像室。首先将封口膜加热至80°C，使其略微熔化并粘封在载玻片上。加入溶液后，再用第二片载玻片封闭成像室，以避免操作过程中可能发生的蒸发或泄漏。

病毒制备。为制备 HIV-1 和细胞外囊泡，在转染前一天，将 1250 万个人胚肾细胞（293THEK细胞）接种于 10 ml DMEM生长培养基中。细胞汇合度达到 50-70% 时，采用磷酸钙沉淀法转染，质粒总量为 8 μg，分别使用 pcDNA3.1（Mock）、p HIV-1Gag[48], pHIV-Psi-viralRNA[49,50]、pHIV-1(NL43) 和 pHIV-1GagΔEnv[36]。转染 48 小时后，收集含有病毒颗粒的细胞培养上清液。将上清液通过 0.45 μm 滤膜过滤，然后在 25% 蔗糖-TNE 缓冲液垫层上进行超速离心纯化（10 mM Tris-HCl [pH

7.4], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA）at 100000 g, for 1 h, 30 minutes at 4°C, in SW32Ti Beckman Coulter 转子。将干燥的沉淀在 4°C 下用 TNE 缓冲液重悬过夜。为制备我们的 SARS-CoV-2 粒子，菌株 BetaCoV/France/IDF0372/2020 由巴斯德研究所（法国巴黎）所属的国家呼吸道病毒参考中心提供，该中心由 Sylvie van der Werf 教授领导。分离出菌株 BetaCoV/France/IDF0372/2020 的人类样品由法国巴黎比沙医院的 X. Lescure 博士和 Y. Yazdanpanah 教授提供。此外，BetaCoV/France/IDF0372/2020 菌株通过欧洲病毒档案全球计划（EVAg）平台提供。该项目获得了欧盟地平线 2020 研究与创新计划的资助，资助协议编号为 653316。SARS-COV-2 在 VeroE6 细胞中扩增，培养基为含 2.5% 胎牛血清的 DMEM，于 37°C、5% CO_2 条件下培养，并在接种后 72 小时收获。病毒库存于 -80°C，并按照先前所述方法[40] 采用噬斑测定进行滴定，由 CEMIPAI 设施提供。

数据采集与分析。我们开发了一款基于 LabView 的自制程序，用于采集和处理数据。每个样品以 400 Hz 的频率采集 200–300 帧，积分时间约为 1.0 ms（总采集时间为 ≈700 ms），随后对数据进行单粒子追踪分析。分析算法在离线状态下按以下流程执行：(1) 从每幅干涉图（原始相机图像）中计算相位和强度；(2) 通过数值传播，利用每组强度/相位图像生成三维图像堆栈；(3) 计算每个堆栈中各图像的 Rytov 强度；(4) 沿 Rytov 强度堆栈的传播轴进行最大强度投影，以预检测各粒子；(5) 根据预检测结果，对 Rytov 强度堆栈中的各粒子进行三维超定位，采用三维高斯拟合；(6) 利用测得的三维位置，为每个粒子提取亚像素配准的焦平面强度/相位图像；(7) 根据配准后的图像计算 DAI，并利用颗粒时间轨迹计算均方位移（MSD），进而确定粒径。为确保粒径和 DAI 测量准确，分析数据中删除了长度少于 20 幅图像的轨迹。

正文和表格中的所有统计数据均以中位数及第 25/75 百分位数表示。

机器学习架构与超参数。我们的卷积神经网络使用 Adam优化器进行训练，由两个不同部分组成：先是 4 个特征提取阶段，随后是 2 个全连接阶段。前两个特征提取阶段由复数卷积层、复数批归一化层和复数 ReLU激活[43,44]组成。前两个特征提取阶段使用 3×3 卷积核，不进行空间降维（采用对称填充以避免边缘效应）。后两个特征提取阶段使用 3×3 卷积核，并通过卷积步幅将输入的空间尺寸缩小一半（卷积核每隔 2 个像素应用一次，而非每个像素都应用）。学习率初始设为 0.01，之后每经过 3 个训练轮次便乘以 0.95，以改善训练收敛性。模型使用包含 200 张、尺寸为 $N = 50 \times 50$ 像素的 Rytov 图像的批次和交叉熵损失函数，训练了 50 个轮次。初始数据集中的 80% 用作训练集，其余 20% 用于测试该算法。

单分散纳米颗粒溶液制备。实验中使用了多种单分散溶液：60、80、100 和 150 nm 的常规聚苯乙烯（Thermofisher），以及 100 和 200 nm 的聚苯乙烯校准标准品（3K/4K系列粒子计数器标准品，Thermofisher Duke Standards）、二氧化硅（Sigma Aldrich）、金纳米颗粒（Sigma Aldrich）、银纳米颗粒（Alfa Aesar）和金刚石（Sigma Aldrich）。需要时，使用去离子水（18 MΩ m^{-1}）进行稀释。

致谢

本研究得到法国国家科学研究中心（CNRS）的支持。本项目部分经费由法国国家艾滋病和肝炎研究署（ANRS）提供。RD 获得了 SIDACTION 奖学金资助。本项目获得了欧洲研究委员会（ERC）根据欧盟地平线 2020 研究与创新计划提供的资助（资助协议编号：[848645]）。

作者贡献

MCN 和 PBon 设计了实验，编写了采集和分析代码。MCN 搭建了光学装置，并完成了采集和分析。PBonnaud 和 GM 编写了深度学习算法。RD 完成了细胞培养、感染以及病毒的样品制备。SL 负责监督 BSL3 中设备的搭建；SL、DM、MCN 和 PBon 在 BSL3 中开展了实验。MCN、SL、DM 和 PBon 撰写了稿件。DM 和 PBon 筹集了资金。所有作者均讨论了数据，并同意最终稿件。

利益冲突

MCN 的薪酬由法国公司 Myriade 在2020年1月至2021年5月期间资助。

参考文献

1. Naseer, B. 等. 纳米颗粒在食品工业中的重要性及其健康危害。Nanotechnology Reviews 7, 623–641（2018年）。2. Mourdikoudis, S., M. Pallares, R. & K. Thanh, N. T. 纳米颗粒的表征技术：研究纳米颗粒性质时的比较与互补。Nanoscale 10, 12871–12934（2018年）。3. Chugh, H. 等. 金和银纳米颗粒在癌症纳米医学中的作用。Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology 46, 1210–1220（2018年）。

4. Trueb, J. T., Avci, O., Sevenler, D., Connor, J. H. & Ünlü, M. S. 通过干涉成像稳健地可视化并区分纳米颗粒。IEEE《量子电子学精选主题期刊》23, 394–403（2017年）。

5. Pecora, R. 液体中纳米级颗粒的动态光散射测量。《纳米颗粒研究期刊》2, 123–131 (2000).

6. Stetefeld, J., McKenna, S. A. & Patel, T. R. 动态光散射：生物医学科学中的实用指南与应用。《生物物理学评论》8, 409–427 (2016).

7. Zhu, S. 等. 低于单个荧光分子检测水平的光散射检测，用于高分辨率表征功能性纳米颗粒。ACS Nano 8, 10998–11006 (2014).

8. Lee, S.-H. 等. 利用视频全息显微术表征并追踪单个胶体颗粒。Opt. Express, OE 15, 18275–18282 (2007).

9. Martinez-Marrades, A., Rupprecht, J.-F., Gross, M. & Tessier, G. 通过全息定位布朗散射体实现随机三维光学映射。Opt. Express 22, 29191–29203 (2014).

10. Roose-Amsaleg, C. 等. 利用干涉光学显微术快速分析河流中的病毒丰度。《微生物学研究》168, 413–418 (2017)。

11. Midtvedt, B. 等. 利用深度学习增强的离轴全息术快速、准确地表征纳米颗粒。ACS Nano 15, 2240–2250 (2021)。

12. Kashkanova, A. D., Blessing, M., Gemeinhardt, A., Soulat, D. & Sandoghdar, V. 多分散体系中弱散射纳米颗粒的精确尺寸与折射率分析。《自然·方法》19, 586–593 (2022)。

13. Lin, Y.-H., Chang, W.-L. & Hsieh, C.-L. 在微秒内以纳米级空间精度实现对单个 20 nm 金颗粒的散粒噪声限制定位。Opt. Express, OE 22, 9159–9170 (2014)。

14. Turkki, V., Alppila, E., Ylä-Herttuala, S. & Lesch, H. P. 干涉光显微粒子计数器用于病毒制剂滴度测定和表征的实验评估。《病毒》13, 939 (2021)。

15. Ortiz-Orruño, U., Quidant, R., van Hulst, N. F., Liebel, M. & Ortega Arroyo, J. 非均一纳米颗粒悬浮液的同步尺寸测量与折射率分析。ACS Nano (2022) doi:10.1021/acsnano.2c06883。

16. Barer, R. 干涉显微术与质量测定。Nature 169, 366–367 (1952)。

17. Rappaz, B. 等. 通过数字全息显微术监测干质量，对裂殖酵母细胞周期进行无创表征。Journal of Biomedical Optics 14, 034049 (2009)。

18. Aknoun, S. 等。利用结合四波横向剪切干涉术的定量相位成像测量活细胞干质量：对准确度和灵敏度的讨论。Journal of Biomedical Optics 20，126009（2015）。

19. Mir, M. 等。细胞周期依赖性生长的光学测量。美国国家科学院院刊 108(32)，13124–13129（2011）。

20. Lampert, F.、Bahr, G. F. 和 Rabson, A. S. 单纯疱疹病毒：干质量。Science 166，1163–1165（1969）。

21. Bahr, G. F., Foster, W. D., Peters, D. & Zeitler, E. H. 以痘苗病毒粒子为例展示干质量变异这一基本生物学特性。Biophysical Journal 29, 305–314 (1980).

22. Hoffmann, E. de & Stroobant, V.《质谱：原理与应用》。（John Wiley & Sons, 2007）。

23. Nie, Z. 等. 在圆柱形离子阱中对单个完整病毒进行基于显微镜的质量测量。Angewandte Chemie 118, 8311–8314 (2006)。

24. Arjmandi, N., Van Roy, W. & Lagae, L. 利用纳米级孔测量液体中纳米颗粒和病毒的质量。分析化学 86, 4637–4641 (2014)。

25. Langehanenberg, P., von Bally, G. & Kemper, B. 数字全息显微术中的自动对焦。3D Res 2, 4 (2011)。

26. Bon, P. 等. 纳米颗粒的三维纳米级定位，以提升超分辨率显微术。自然通讯 6, 7764- (2015)。

27. Bon, P., Maucort, G., Wattellier, B. & Monneret, S. 用于活细胞定量相位显微术的四波横向剪切干涉术。Opt. Express 17, 13080–13094 (2009)。

28. Bon, P., Lécart, S., Fort, E. & Lévêque-Fort, S. 活体哺乳动物细胞中细胞骨架网络的快速无标记成像。《生物物理学杂志》106, 1588–1595 (2014).

29. Khadir, S. 等. 使用定量相位成像对单个纳米颗粒进行全面光学表征。Optica, OPTICA 7, 243–248 (2020).

30. Qian, H., Sheetz, M. P. & Elson, E. L. 单粒子追踪：二维系统中扩散和流动的分析。Biophysical Journal 60, 910–921 (1991).

31. Brasiliense, V. 等。《相关电化学与光学检测揭示了单个银纳米颗粒的化学反应性》。美国化学会志 138, 3478–3483 (2016)。

32. Zhang, X. 等。《可见光和近红外波段聚合物复折射率的测量》。《应用光学》，AO 59, 2337–2344 (2020)。

33. Mie, G. 《浑浊介质光学，特别是胶体金属溶液的光学研究》。《物理年鉴》330，377–445（1908）。

34. Johnson, P. B. & Christy, R. W. 贵金属的光学常数。《物理评论B》6, 4370–4379（1972）。

35. Faivre-Moskalenko, C. 等。RNA对HIV-1粒径多分散性的调控。《PLOS ONE》9，e83874（2014）。

36. Floderer, C. 等。单分子定位显微术揭示HIV-1 Gag蛋白如何感知活体宿主CD4 T细胞中的膜病毒组装位点。《科学报告》8，16283（2018）。

37. Smith, A. J., Cho, M. I., Hammarskjöld, M. L. & Rekosh, D. 由猿猴病毒40晚期替换载体表达的人类免疫缺陷病毒1型Pr55gag和Pr160gag-pol可被有效加工并组装成类病毒颗粒。《病毒学杂志》64，2743–2750（1990）。

38. Briggs, J. A. G., Wilk, T., Welker, R., Kräusslich, H.-G. & Fuller, S. D. 成熟的天然HIV-1病毒粒子及其核心的结构组织。EMBO J 22, 1707–1715 (2003).

39. Ke, Z. 等。完整病毒粒子上SARS-CoV-2刺突蛋白的结构与分布。Nature 588, 498–502 (2020).

40. Lyonnais, S. 等. 原子力显微镜对天然感染性和灭活的SARS-CoV-2病毒粒子的分析。《科学报告》11, 11885（2021年）。

41. Willms, E., Cabañas, C., Mäger, I., Wood, M. J. A. & Vader, P. 细胞外囊泡异质性：癌症进展中的亚群、分离技术及多种功能。《免疫学前沿》9, （2018年）。

42. Lecun, Y., Bottou, L., Bengio, Y. & Haffner, P. 应用于文档识别的基于梯度的学习。《IEEE论文集》86, 2278–2324 (1998)。

43. Trabelsi, C. 等. 深度复数网络. in (2018年)。

44. Matthès, M. W., Bromberg, Y., de Rosny, J. & Popoff, S. M. 在多模光纤中学习并避免无序。《物理评论X》11, 021060 (2021)。

45. Cocozza, F., Grisard, E., Martin-Jaular, L., Mathieu, M. & Théry, C. 快照：细胞外囊泡。《细胞》182, 262-262.e1 (2020)。

46. Primot, J. & Sogno, L. 消色差三波（或更多波）横向剪切干涉仪。《美国光学学会杂志A辑》, JOSAA 12, 2679–2685 (1995)。

47. Primot, J. & Guérineau, N. 基于哈特曼掩模伪导引特性并结合相位棋盘的扩展哈特曼测试。《应用光学》39, 5715–5720 (2000)。

48. de Poret, A. 等。含有 I-BAR蛋白 IRSp53 的细胞外囊泡以 Arp2/3 依赖的方式从细胞质膜释放。《细胞生物学》114, 259–275 (2022)。

49. Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L. & Trono, D. 多重减毒慢病毒载体可在体内实现高效基因递送。《自然·生物技术》15, 871– 875 (1997)。

50. Naldini, L. 等。慢病毒载体在非分裂细胞中的体内基因递送和稳定转导。Science 272, 263–267 (1996)。

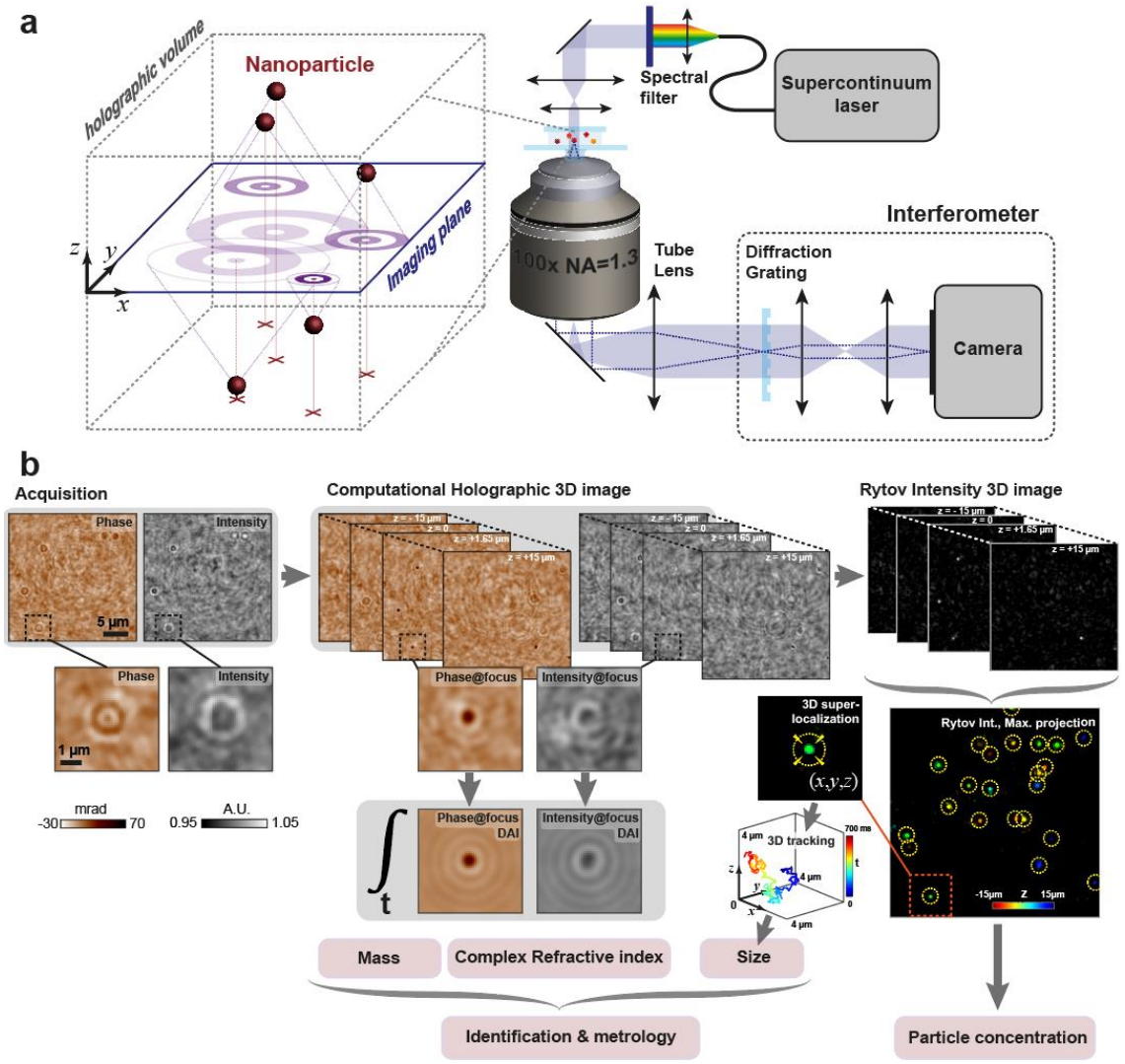


图1：实验原理。(a) 实验用高灵敏度全息装置。

（b）分析流程。根据单次拍摄获取的一对强度/相位图像，通过计算生成三维图像堆栈。计算 Rytov 场强度，以实现每个粒子在三维空间中的定位。在不同时间点重复这一过程，即可进行单粒子追踪和信号平均，从而识别并表征溶液中的每个粒子。DAI 代表动态平均图像（通过对重新聚焦图像进行时间平均来提高图像信噪比）。

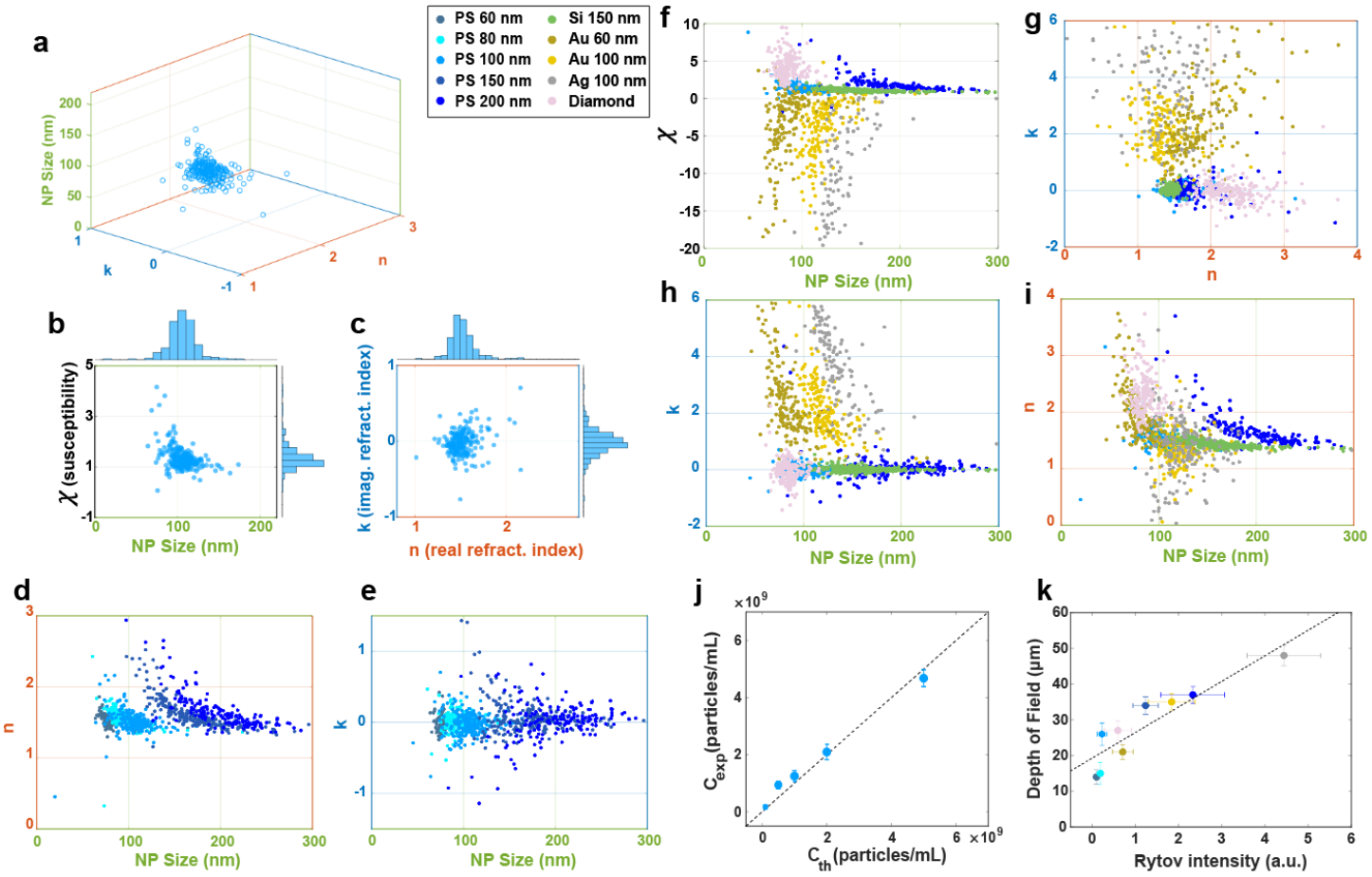


图2：溶液中单个纳米颗粒的定量分析。(a、b、c) 对 100 nm 聚苯乙烯的分析溶液可揭示尺寸、复折射率和电极化率。结果以三维形式（a）或两幅二维图（b、c）呈现。（d、e）不同尺寸的聚苯乙烯纳米颗粒及其实部和虚部折射率测量结果。（f、g、h、i）不同类型纳米颗粒的测量结果：介电纳米颗粒（聚苯乙烯、二氧化硅、金刚石）和金属纳米颗粒（金、银）。它们的响应簇在光学性质和尺寸图中彼此分离，从而能够识别纳米颗粒的种类。（j）100 纳米聚苯乙烯溶液的单次拍摄浓度测量（C_{exp}）——该溶液由初始溶液稀释制得——与理论浓度（C_{th}）的比较。（k）不同类型粒子的景深随 Rytov 强度变化的测定。

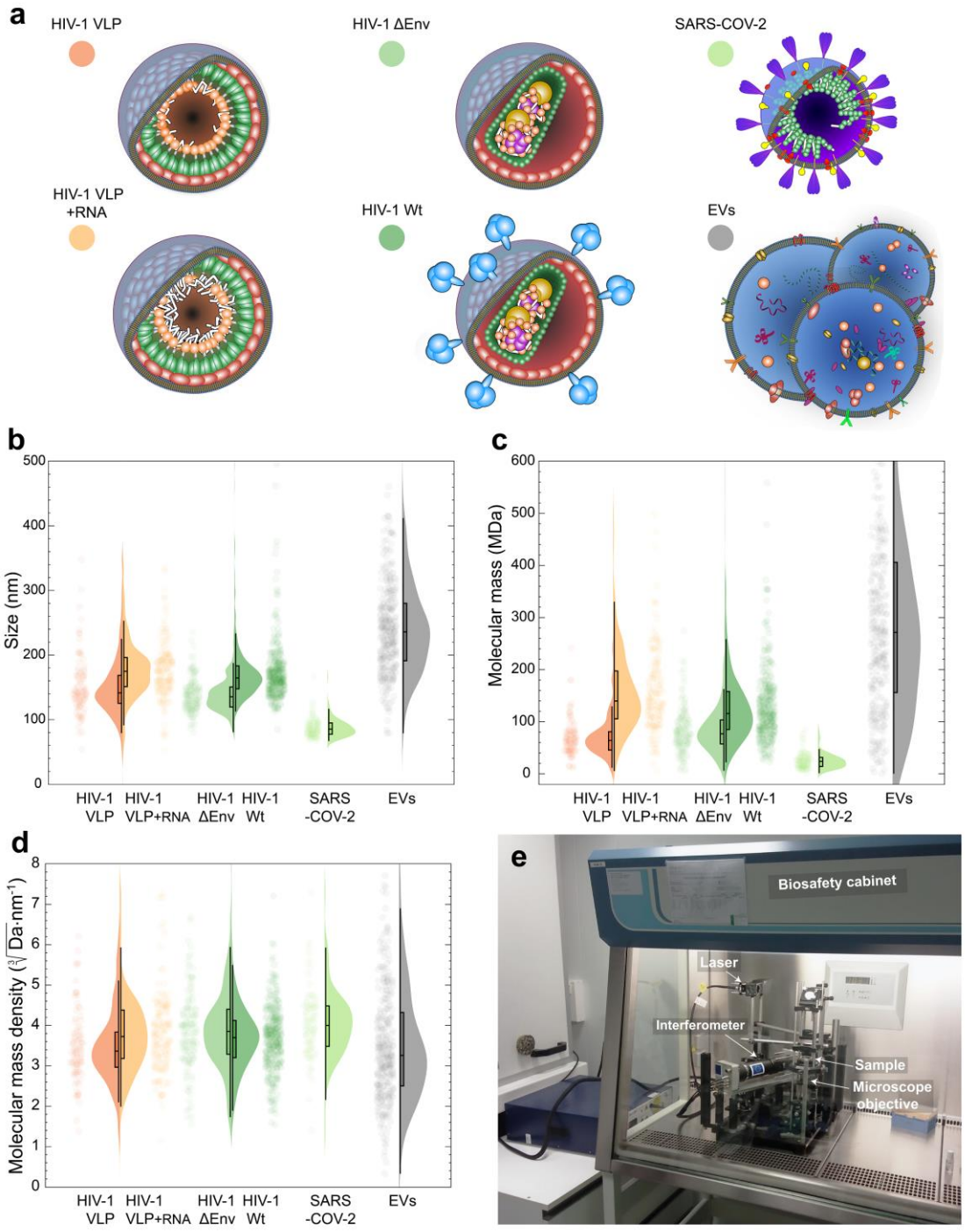
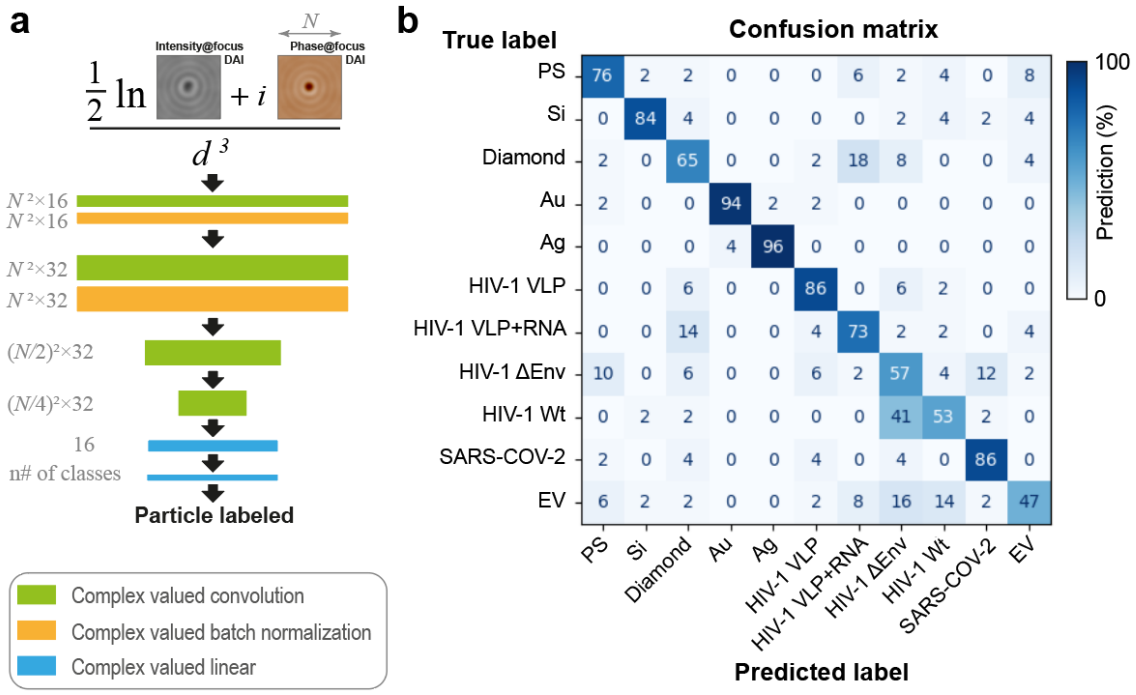


图3：病毒和有机纳米颗粒的生物物理参数定量分析

对象。(a) 实验中分析的不同病毒和病毒样颗粒（VLP）示意图。(b、c、d) 生物样品的表征：尺寸、分子干质量（MDa）和有效干质量密度（$kDa^{1/3}\cdot nm^{-1}$）。(e) 实际 RYMINI

显微镜在三级生物安全实验室（CEMIPAI 法国国家科学研究中心 蒙彼利埃）的生物安全柜中的布置。



Fig图 4：复值卷积神经网络对粒子进行分类 .

(a) 卷积层架构示意图，包含 卷积层。 **(b)** 训练后表示分类准确率的混淆矩阵（单位：%）。

粒子 Nature	颗粒数量 粒子	流体动力学 尺寸（nm）	折射率 n	吸收 系数 k	磁化率
PS	123	$76.9^{+2.6}_{-2.2}$	$1.526^{+0.039}_{-0.040}$。	$-0.034^{+0.060}_{-0.055}$。	$1.312^{+0.121}_{-0.125}$。
	170	$91.9^{+8.3}_{-6.4}$。	$1.552^{+0.073}_{-0.057}$。	$0.009^{+0.071}_{-0.057}$。	$1.402^{+0.239}_{-0.196}$.
	221	$105.1^{+8.2}_{-9.0}$.	$1.504^{+0.072}_{-0.060}$.	$-0.020^{+0.089}_{-0.087}$.	$1.252^{+0.219}_{-0.187}$.
	228	$167.8^{+20.3}_{-23.6}$.	$1.568^{+0.140}_{-0.083}$.	$0.025^{+0.089}_{-0.081}$.	$1.443^{+0.413}_{-0.244}$.
	181	$200.4^{+28.1}_{-28.0}$.	$1.602^{+0.137}_{-0.103}$.	$0.039^{+0.098}_{-0.121}$.	$1.539^{+0.416}_{-0.327}$.
Si	105	$124.9^{+15.7}_{-10.2}$.	$1.476^{+0.053}_{-0.046}$.	$0.046^{+0.064}_{-0.058}$.	$1.174^{+0.148}_{-0.140}$.
	393	$158.8^{+15.3}_{-13.0}$.	$1.428^{+0.039}_{-0.029}$.	$0.001^{+0.039}_{-0.035}$.	$1.032^{+0.114}_{-0.084}$.
金刚石	208	$84.6^{+4.0}_{-6.2}$.	$2.241^{+0.223}_{-0.205}$.	$-0.052^{+0.201}_{-0.175}$.	$3.943^{+0.967}_{-0.881}$.
Au	201	$79.6^{+12.1}_{-7.8}$.	$1.805^{+0.304}_{-0.188}$.	$2.136^{+1.032}_{-0.629}$.	$-2.440^{+1.993}_{-4.529}$.
	194	$117.8^{+11.4}_{-7.1}$.	$1.332^{+0.139}_{-0.101}$.	$2.014^{+0.799}_{-0.491}$.	$-3.287^{+2.016}_{-3.702}$.
Ag	191	$121.9^{+13.3}_{-14.0}$.	$1.338^{+0.345}_{-0.268}$.	$4.748^{+1.950}_{-1.497}$.	$-20.980^{+10.834}_{-22.129}$.

表1：各种纳米粒子的数量、尺寸、实部和虚部折射率以及电极化率。

粒子性质	数量 颗粒	流体动力学 尺寸（纳米）	质量（兆道尔顿）	$\sqrt[3]{\textbf{Density}}$（道尔顿$^{1/3}$。纳米$^{-1}$）
HIV-1 Gag 病毒样颗粒	90	141^{+35}_{-17}	57^{+15}_{-17}	$3.41^{+0.27}_{-0.37}$
HIV-1 Gag 病毒样颗粒 + RNA	162	179^{+25}_{-26}	131^{+54}_{-32}	$3.59^{+0.44}_{-0.32}$
HIV-1 野生型	337	171^{+25}_{-17}	108^{+40}_{-29}	$3.48^{+0.38}_{-0.34}$
HIV-1 ΔEnv	147	139^{+23}_{-14}	68^{+24}_{-17}	$3.76^{+0.39}_{-0.35}$
SARS-COV-2	88	$85.2^{+6.5}_{-9.4}$	$18.0^{+5.7}_{-7.4}$	$3.91^{+0.38}_{-0.63}$
细胞外囊泡	357	233^{+54}_{-39}	262^{+130}_{-114}	$3.50^{+0.50}_{-0.60}$

表2：各类生物纳米物体（包括病毒）的尺寸、分析的粒子数量、质量和密度。