通过中红外光热光学衍射断层成像实现视频速率体积化学成像

Masato Fu kushima[1], 户田圭一郎[2*], 菅原雄生[1], 川野翔太郎[2], 和井手口拓郎[1,2,3] [**]

[1] 日本东京东京大学物理系

[2] 日本东京东京大学光子科学与技术研究所

[3] 日本理化学研究所先进光子学中心理化学研究所光学生命计量研究团队

[*] keiichiro--toda@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

[**] ideguchi@ipst.s.u-tokyo.ac.jp

摘要

无标记振动显微镜能够以化学特异性的方式观察细胞结构，但活细胞中的定量体积化学动态仍难以获取，尤其是在与细胞内运输和结构重组相关的亚秒时间尺度上。这一局限源于大多数高速振动技术依赖光栅扫描，使体积成像通量受限于每秒约一个体积（vps）。尽管中红外光热（MIP）成像为实现空间并行化学检测提供了途径，现有技术距离视频速率体积成像仍相去甚远，反映出成像速度与信噪比之间存在根本性权衡。在此，我们克服了MIP断层成像中的这一权衡，并利用中红外光热光学衍射断层成像（MIP-ODT）实现视频速率体积化学成像，在保持定量测量保真度的同时获得了高光热灵敏度。每个角度的高可检测性使得无需时间平均即可进行体积重建，在视频速率采集条件下，信噪比超过70。因此，我们实现了每秒19.2个体积（vps）的体积成像，较此前方法提升近400倍。利用这一能力，我们对活细胞中的脂滴进行视频速率三维追踪，并依据完整的体积轨迹量化反常扩散，揭示了二维测量无法观察到的异质性细胞内运输行为。我们进一步展示了高速高光谱体积化学成像：通过快速中红外波数扫描，在1秒内覆盖300 cm^{-1}的光谱窗口，为实时三维细胞器特异性化学表型分析铺平了道路。这些结果确立了MIP-ODT作为实时无标记体积化学成像平台的地位，并使人们能够在具有生物学意义的时间尺度上，定量研究异质性细胞环境中的动态细胞内组织结构。

引言

在生命科学中，体积成像可对亚细胞结构和动态过程进行三维（3D）观测，为从细胞器运输到组织微环境描绘等各种生物医学研究提供支持[1,2]。在现有的活细胞成像技术中，三维荧光显微镜因其高图像对比度和分子特异性而被广泛视为金标准[3]。然而，基于荧光的方法依赖外源性标记，这些标记可能扰乱天然生物状态、增加样品制备的复杂性，并限制可同时检测的分子种类数量。无标记振动显微镜则提供了一种互补途径，可直接从内源性分子振动中提取具有化学特异性的信息。其中，相干拉曼显微镜已得到广泛应用，因为它能够以高空间分辨率快速进行二维（2D）成像，非常适用于活细胞化学成像[4]。通过加入轴向扫描，相干拉曼显微镜已扩展至体积成像，可在多种场景中实现三维化学可视化，例如脂滴组织结构[5], 、富含髓鞘的神经组织[6], 以及多细胞组装体中的代谢异质性[7]。尽管取得了这些进展，体积拉曼成像的通量仍受到根本性限制。

为获得足够的信噪比（SNR），通常必须采用点扫描采集，这使成像速度与采样体积之间存在根本性的权衡。因此，即使是目前报道的最快实现方案，全细胞体积成像速率也仅约为每秒一个体积（vps），不足以分辨许多发生在亚秒时间尺度上的细胞内动态[8,9]。

近年来，中红外光热（MIP）显微成像已成为一种强大的高速化学成像方法，能够突破中红外（MIR）光的衍射极限[10-19]。在 MIP 显微成像中，MIR 吸收会引起局部折射率（RI）变化，并由可见光探测光束检测，从而实现具有可见光衍射极限分辨率的键选择性化学成像。由于 MIR 吸收是线性过程，MIP 显微成像既可采用点扫描配置，也可采用宽场配置；近期的进展已在这两种模式下实现视频速率二维中红外光热成像[17,18]。在宽场 MIP 中，单次相机曝光即可捕获整个视场内的光热对比度。这种空间并行性使宽场 MIP 原则上非常适合进一步提升成像速度，也为实现视频速率体积成像展现了前景。通过将宽场 MIP 与衍射层析成像技术相结合，可以获取三维信息，例如光学衍射层析（ODT）[14] 或强度衍射层析成像（IDT）[16],；这些技术通过在多个可见光照明角度下采集振幅与相位或仅强度测量值，重建三维 RI 分布。衍射层析成像的一大优势是能够灵活权衡成像通量与重建保真度。降低角度采样密度可以提高成像速度，同时不减少采样体积，因此这一框架对于高速体积化学成像尤具吸引力。尽管潜力巨大，先前报道的宽场 MIP 层析成像方案所实现的体积成像速率仍低于 0.05 vps[14,16]。这一局限源于现有方法在每个照明角度下的单帧信噪比不足，因而需要进行帧平均，或者受限于可见光照明角度的切换速度。因此，当前基于中红外光热的层析成像方法与视频速率体积化学成像之间仍存在显著差距。

在本研究中，我们通过同步提升逐帧中红外光热检测灵敏度和角度切换速度，在 MIP 断层成像中开创了一种全新的性能区间，从而突破传统的速度与灵敏度权衡，实现视频速率体积化学成像。我们在中红外光热光学衍射层析框架中实现了这一策略。通过采用由光学参量振荡器（OPO）产生的高功率纳秒脉冲中红外光源，我们实现了高中红外光热检测灵敏度，可在每个照明角度下通过单次相机曝光获得足够的信噪比。通过高速空间光调制器（SLM）进行快速波前调制，实现了快速角度扫描。在数值孔径（NA）为 0.85、采用 11 个照明角度的条件下，我们的系统实现了 19.2 vps 的体积成像速率，可对活细胞中的脂滴进行视频速率三维追踪，并定量分析其反常扩散。此外，集成快速中红外波数扫描模块后，系统可实现三维高光谱成像，约一秒内即可采集覆盖 300 cm^{-1} 波数范围的 20 个光谱点。借助这一能力，我们分辨出了与亚细胞结构相关的不同振动光谱特征，包括核仁和脂滴。总之，这些进展建立了一个可在单细胞水平实现实时、无标记体积化学成像的平台，并为观测动态细胞内分子过程开辟了新机遇，包括药物积累、脂滴形成与融合，以及细胞内聚集体的出现。

结果

视频速率 MIP-ODT 系统。我们首先概述

MIP-ODT。在该方法中，宽场 MIR 照射通过 MIR 吸收在整个视场 内产生局部加热，并通过热光效应引发瞬态 RI 变化。ODT 可对这些诱导的 RI 变化进行定量测量：在多个可见光照明角度下，分别于中红外激发开启和关闭时，以干涉方式采集二维光波前（图1a）。为了根据测得的波前图像重建 MIP 诱导的 RI 变化的三维分布，我们通过比较 MIR 开启和 MIR 关闭时的测量结果，提取每个照明角度下的波前调制。在弱散射近似下，将这一差分波前映射到样品的三维傅里叶空间中对应的 RI 变化空间频率分量。汇集所有照明角度下的空间频率信息后，即可重建 MIP 诱导 RI 变化的三维分布（详见方法中的“RI 重建流程”）。

随后，我们设计了用于视频速率体积成像的 MIP-ODT系统。为确定成像速度与重建保真度之间的适当平衡，我们评估了采用不同数量可见光照明角度获得的 RI 重建图像（图1b，详见方法中的“采用可变照明数量进行 ODT 测量”）。 根据这项分析，我们将照明角度数量设为 11，以在保持足够图像质量、能够捕捉整体细胞形态的同时，最大限度地提高体积采集速度。图1c展示了视频速率 MIP-ODT 系统的时序图。通过以 422.4 Hz 运行的高速 SLM 进行快速波前控制，实现可见光照明的高速角度扫描，对应的角度更新周期为 2.3 ms。在此条件下，体积MIP采集速率为 $v_{ps} = 422.4/(2 \cdot 11)$=19.2 vps，对应的有效体积采集时间为 52 ms。其中，系数 2 用于计入 MIR 开启帧与 MIR关闭帧交替采集的情况。该系统支持两种不同的工作模式（图1d）。在视频速率单波数模式下，体积成像以全视频速率采集速度进行。在高速高光谱模式下，通过快速中红外波数扫描，每秒可采集 19.2 个光谱点。鉴于中红外激发的固有光谱线宽约为 10 cm^{-1} [18]，该配置可在一秒内扫描数百 cm^{-1} 的光谱窗口。

图1e展示了视频速率 MIP-ODT 系统的光学布局。中红外脉冲和可见光脉冲由两台电子同步的调Q Nd:YAG激光器产生（波长：1.064 nm；脉宽：10 ns；重复频率：422.4 Hz；NL202，Ekspla）。可见光探测光束通过二次谐波产生[illegible]，获得，所用晶体为一块长15 mm的LBO晶体。中红外泵浦光束由光学参量振荡器（OPO）的闲频光输出提供，该振荡器采用扇出式周期性极化铌酸锂（PP[illegible]）晶体作为非线性介质（HC Photonics Corporation）。通过电动平移台（LNR25ZFS/M，Thorlabs）横向移动扇出式PPLN晶体，可连续调谐中红外输出波数，使其覆盖 2,400–3,600 cm^{-1} 的范围；该操作可选择性地利用晶体上不同的极化周期。OPO在样品平面处提供的脉冲能量为 ~3 μJ，比以往MIP断层成像实现中使用的量子级联激光器（QCL）光源高出一个数量级以上[14,16]。这显著提高了单帧 MIP检测灵敏度。短至10 ns的中红外脉冲有效抑制了热扩散引起的空间模糊，将热致分辨率下降限制在~10 nm[19]。此外，亚千赫兹重复频率确保相邻激发脉冲之间有充分的热弛豫时间，从而尽可能减少热累积。这降低了长时间活细胞成像期间发生热损伤的风险，并保持了所测折射率变化信号的定量准确性。

可见光探测光束被导入基于离轴数字全息术（DH）的单物镜光学衍射层析（ODT）系统，该系统通过马赫-曾德尔干涉仪实现[19]。在样品臂中，使用高速空间光调制器（SLM）（1920 × 1152 XY Phase Series 空间光调制器，Meadowlark Optics）快速调制可见光探测光束的照明角度（参见“方法”中的“使用 SLM 进行倾斜照明”）。探测光束透过样本后，经硅基底反射，并由同一物镜（UPlanSApo60x，奥林巴斯）重新收集，从而形成反射式配置。这种几何结构使中红外激发能够从另一侧穿过基底引入。可见光照明和探测的数值孔径分别为 0.85 和 1.2。随后，反射的可见光束以离轴角与参考光束发生干涉，所得全息图由高速图像传感器（VLXT-17M.I，Baumer）以 422.4 fps 的帧率记录。相机采集与空间光调制器调制同步，以确保精确的角度采样。时序同步方案的详细信息见补充说明1。

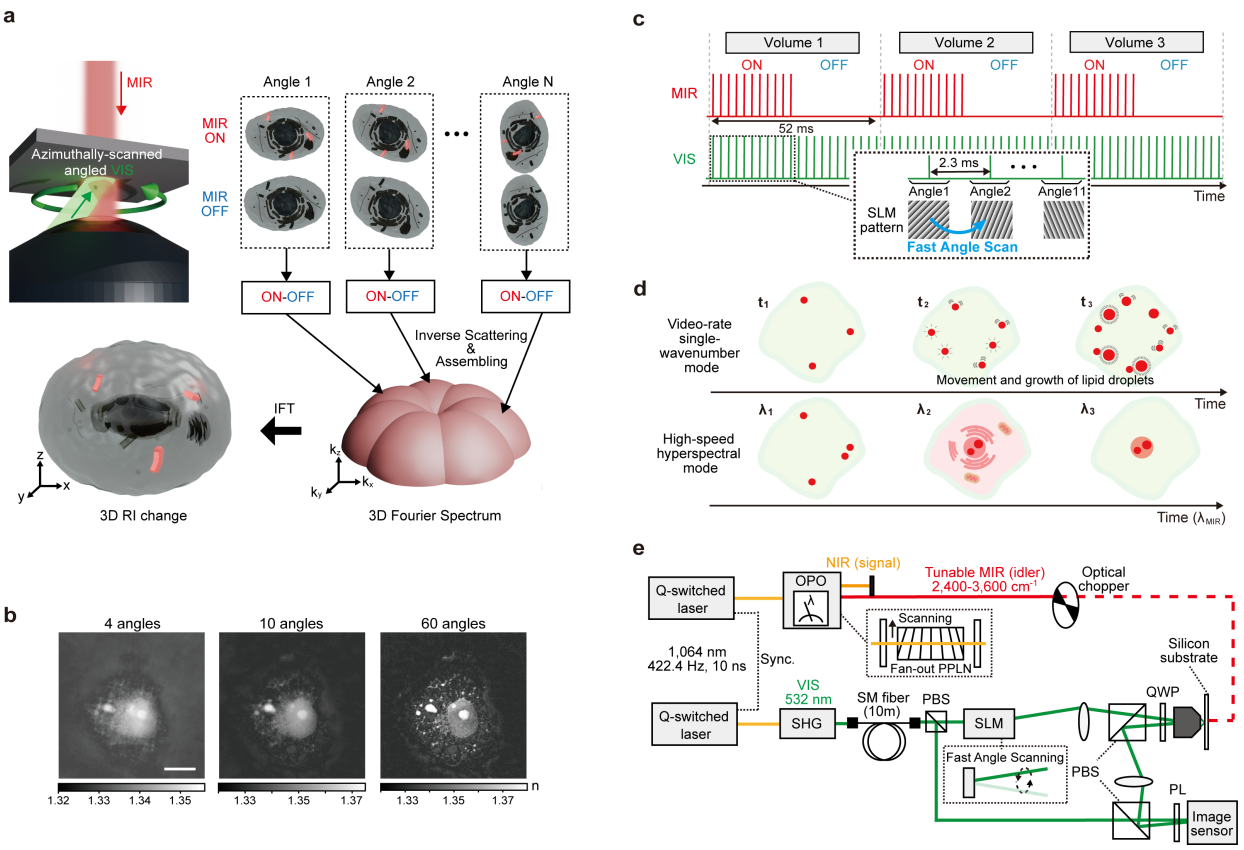

图 **1** | 视频帧率MIP-ODT系统。a MIP-ODT原理示意图。IFT，逆傅里叶变换。b 使用不同照明角度数量获得的重建RI图像。比例尺，10 μm。c 视频帧率体积图像采集的时序图。d 系统的工作模式：视频帧率单波数模式和高速高光谱模式。e 视频帧率 MIP-ODT 系统的光学布局。中红外光束通过光学斩波器进行开关调制。VIS，可见光；NIR，近红外；SM，单模；PBS，PBS；QWP，四分之一波片；PL，偏振片。

空间分辨率和信噪比（SNR）的验证。为验证视频帧率MIP-ODT的空间分辨率和信噪比，我们

对活体 COS- 7 细胞进行了体积成像（参见“方法”中的“生物样本制备”）。图 2a 展示了折射率层析图中具有代表性的深度分辨切片（上）及对应的 MIP图像（下），采集时的体积成像速率为 19.2 vps。对于 MIP-ODT，采用 2,920 cm^{-1} 的中红外泵浦波数激发 CH_2 不对称伸缩振动，该振动在富脂细胞结构中含量丰富。在 ODT 和 MIP-ODT 中，深度分辨切片均呈现随轴向位置变化的平面特异性三维细胞特征，证实了在视频速率采集条件下成功实现体积重建。

首先对测量噪声进行了量化，以确定信噪比。我们从在MIR 关闭状态下采集的ODT数据中测量了折射率时间波动。在整个视场内对体素标准差进行平均，得到有效噪声水平为 $4\ 2 \times 10^{-}$ 2 $3\ 0 \times$ 。5 10^{-} 2 $71\ 4$ （补充说明）。以图 a 中具有代表性的峰值MIP诱导的折射率变化 . 3 作为信号幅度，我们得到信噪比为 . 。该数值表明，在视频帧率体积采集过程中仍能保持较高的信噪比。

接下来，通过分析从图 2a 中白色箭头所示的小型细胞内颗粒提取的横截面轮廓的半高全宽（FWHM），分别对重建的 RI 和

MIP诱导的折射率变化进行了空间分辨率评估。图 2b 展示了沿横向（x 和 y）及轴向（z）方向的横截面轮廓。对每条轮廓均采用高斯函数进行拟合，以提取相应的半高全宽值。对于 ODT，沿 x、y 和 z 轴测得的半高全宽分别为 358 nm、339 nm 和 957 nm。对于 MIP-ODT，相应数值分别为 361 nm、337 nm 和 1.15 μm。这些数值被视为本系统具有代表性的横向和轴向空间分辨率。数值模拟预测，点扩散函数在横向和轴向上的理论半高全宽分别为 230 nm 和 870 nm。实验值略大的原因可能是用于评估的细胞内颗粒尺寸有限，这表明光学系统的本征空间分辨率可能略优于测得的估计值。

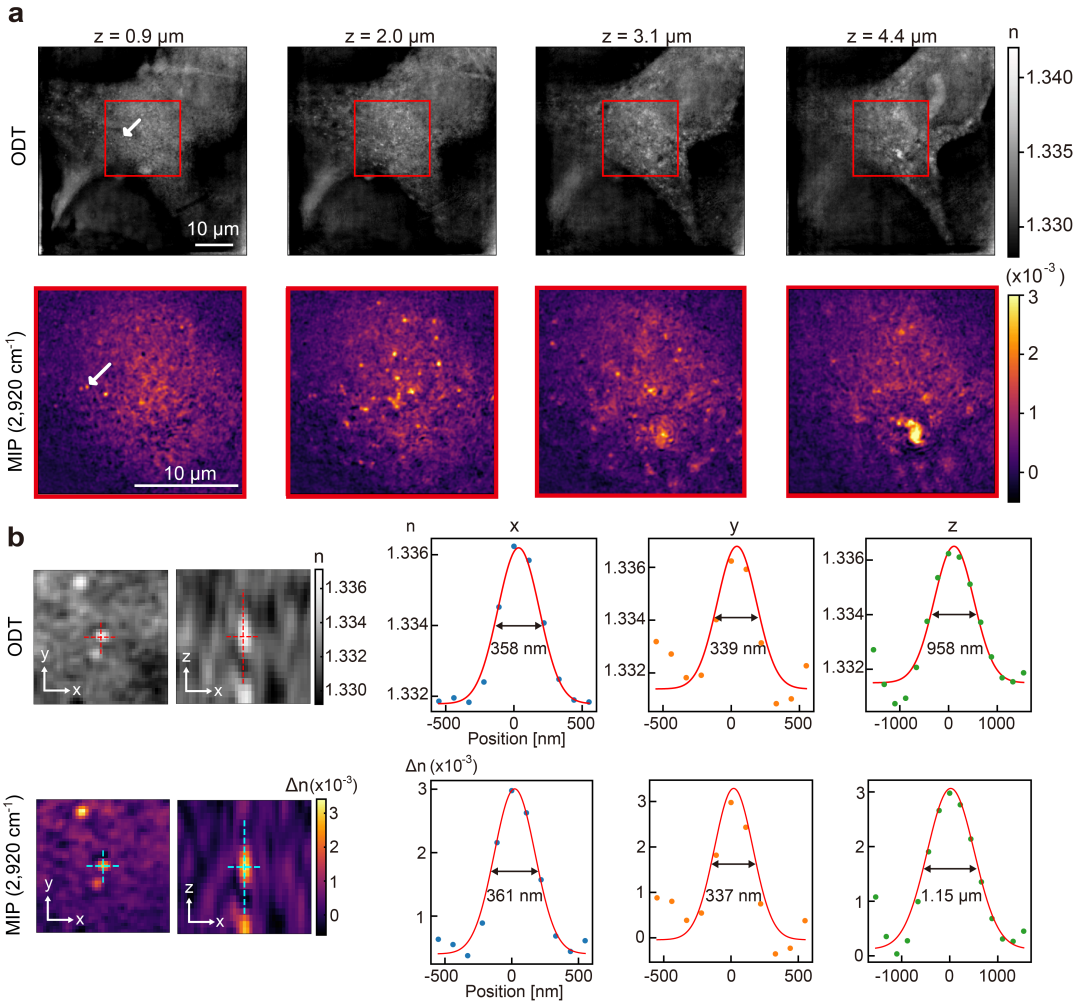

图 **2** | 活细胞中的视频速率体积MIP光学衍射层析成像及空间分辨率表征。a 从活COS-7细胞的重建折射率层析图中提取的深度分辨切片（上）。从红色方框区域采集的相应MIP诱导的折射率变化图像，使用调谐至2,920 cm^{-1}的中红外泵浦光、以19.2 vps的体积成像速率获得（下）。白色箭头标示选定用于空间分辨率分析的一个小细胞内颗粒。z轴与光轴对齐，原点定义为硅基底表面。光学衍射层析与MIP-ODT的视场分别为55 × 55 μ m^2 和20 × 20 μm^2, 。MIP-ODT的样品范围沿轴向估计为10.1 μm。b 左，所选颗粒在重建折射率（上）和MIP诱导的折射率变化（下）中的放大视图。右，沿左图虚线提取的相应横向（x、y）和轴向（z）横截面轮廓。红色实线表示用于确定半高全宽的高斯拟合。

实时高光谱体积成像。接下来，我们将展示实时高光谱体

积成像：将视频帧率MIP-ODT平台与中红外激发的快速波数扫描相结合。该实现能够在选定的光谱窗口内，以每秒最多19.2个光谱采样点的速率进行采集。在本实验中，我们聚焦于2,800–3,100 cm^{-1}区域，其中包含脂质和蛋白质所特有的CH_2 和CH_3 伸缩振动。在每个体积中，通过使用光谱仪（C11482GA，滨松）测量对应 近红外（NIR）信号光束的波长，确定与OPO闲频光输出相对应的瞬时中红外激发波数。该方法可在系统完全同步控制下实现逐体积光谱归属（参见方法中的“高光谱体积分析”）。补充说明3总结了根据测得的近红外光谱推断出的中红外波数轨迹，涵盖单向快速扫描和连续扫描模式。测量结果证实，在单向和连续扫描模式下，分别可在1秒内覆盖约300 cm^{-1}和200 cm^{-1}的光谱窗口。

为验证细胞中三维、位置依赖的光谱读出，我们对浸泡在以重水为基础的磷酸盐缓冲盐水（PBS）中的固定COS-7细胞进行了高光谱体积成像。图3a和3b分别展示了具有代表性的折射率层析图深度分辨切片及其对应的MIP图像。图3b所示的MIP图像是在2,932 cm^{-1}和2,962 cm^{-1}的激发波数下采集的，这些波数主要探测CH2和CH3伸缩振动，因此可提供与富脂区域和富蛋白区域相关的化学对比度。根据体积重建结果，我们选取了三个具有代表性的亚细胞感兴趣区域：一个小型胞质颗粒、一个核周结构和核仁。从各区域提取的局部振动光谱如图3c所示。小型颗粒的光谱在约2,860 cm^{-1}和2,920 cm^{-1}处呈现明显的CH2相关峰，与富脂区室相符，并支持将其鉴定为脂滴。相比之下，与小型颗粒相比，核周结构在2,962 cm^{-1}处的CH3信号相对增强，表明其在脂质成分之外还含有更高比例的蛋白质。核仁提取光谱的主要特征是在接近2,962 cm^{-1}处的峰，这与其广为人知的富蛋白质分子组成[14]相符。总之，这些结果表明，高光谱MIP-ODT能够分辨三维空间中不同细胞区室各自的振动特征。通过结合体积成像与快速光谱采集，该方法可在数秒内实现胞内结构的化学表型分析。

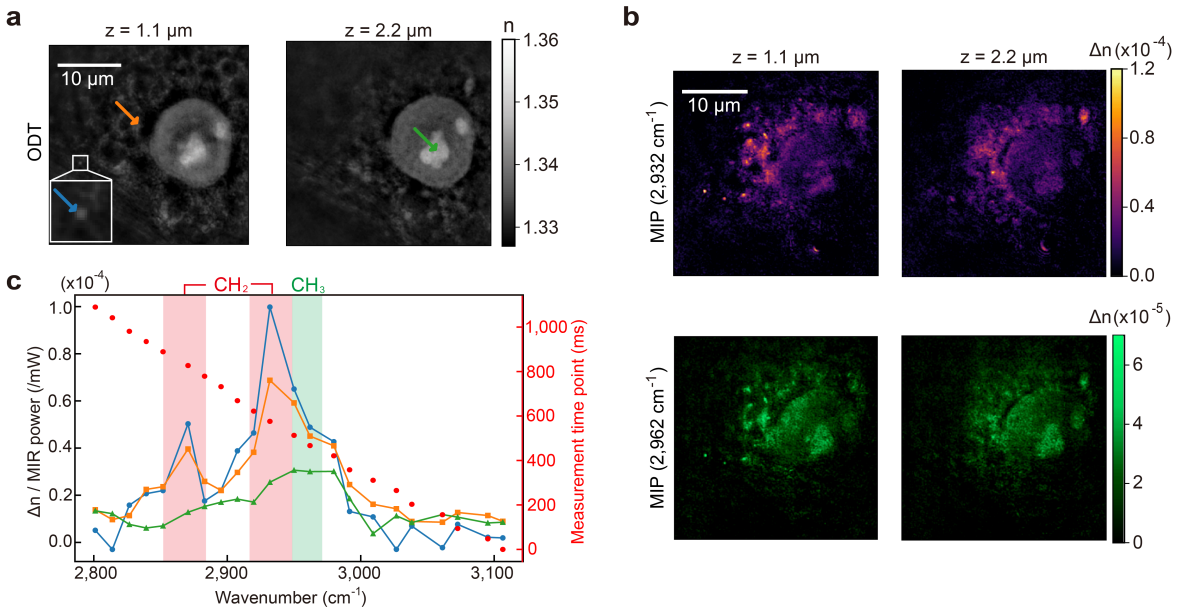

图 **3** | 亚细胞化学异质性的实时高光谱体积 MIP-ODT 成像。a 固定 COS-7细胞在两个轴向位置处的折射率层析图中的代表性深度分辨切片。b 在 2,932 cm^{-1}（上）和 2,962 cm^{-1}（下）处采集的对应 MIP图像。光学衍射层析和 MIP-ODT 的视场为 44 × 44 μm^2。MIP-ODT 的样品范围估计为沿轴向 2.4 μm。c 提取的局部振动光谱

来自a中以不同颜色箭头标记的三个具有代表性的亚细胞区域：一个小型胞质颗粒（蓝色）、一个核周结构（橙色）和核仁（绿色）。阴影带表示CH2和CH3伸缩振动区域。红点表示波数扫描过程中每个测量时间点的瞬时中红外激发波数。

活细胞中脂滴的视频帧率三维追踪。为展示活细胞中脂滴的视频帧率三维追踪

，我们对经油酸处理的活COS-7细胞进行了体积MIP光学衍射层析成像；已知油酸处理能够强效诱导脂滴形成[20]。以19.2 vps的速率连续采集体积数据集，时长约为3.6 s，并将中红外激发调谐至2,920 cm^{-1}，以选择性探测富含脂质的结构。代表性的深度分辨切片如图4a所示。利用该数据集，我们分析了一个在采集期间发生明显位移的单个脂滴的运动，如橙色箭头所示（详情请参见《方法》中的“视频速率 MIP-ODT 成像中的运动分析”）。我们追踪了该脂滴的质心位置随时间的变化，以重建其完整的三维轨迹（图4b）。叠加在MIP-ODT数据上的追踪结果见补充视频1。该脂滴沿x、y和z轴的位移均约为200至300 nm。这种轴向运动无法通过传统二维成像捕获，因此会导致对细胞内运输动态的系统性低估。相比之下，我们的体积成像能够直接定量细胞环境中的完整三维运动。此前已有研究使用光学衍射层析对脂滴进行三维追踪[21]，，并根据高折射率 puncta 识别脂滴。然而，这种对比机制本身不具备化学特异性，因此可能需要正交验证。相比之下，MIP-ODT通过振动对比直接追踪富含脂质的结构，从而能够以化学特异性和体积解析方式表征脂滴动态。

为定量表征所观察到的运动，我们在反常扩散框架下分析了质心轨迹。在3.6 s的观测窗口内，根据三维轨迹计算均方位移（MSD），并对τ 最长1.1 s的时间间隔进行评估，结果显示其与τ 呈幂律关系（图4c）。对MSD进行拟合得到反常扩散指数 $\alpha = 0.32$ （95%自助法置信区间（CI）：0.23–0.42，500个自助重采样），该值显著低于自由扩散的预期值（$\alpha = 1$），表明存在明显的亚扩散行为。这种亚扩散现象在活细胞中的内源性货物中较为常见，通常归因于阻碍长程运输的分子拥挤和黏弹性约束[22]。

接下来，我们将这一分析扩展到同一视场内的多个脂滴。图4d总结了根据50个追踪粒子估算得到的广义扩散系数D_α 和扩散指数α 的分布。扩散系数约跨越10^{-3} 至10^{-2} $\mu m^2\ s^{-\alpha}$，揭示出细胞内脂滴运动性的显著异质性。此前的一项研究报道，细胞内脂滴的反常扩散指数分布范围较广，约为0至2[21]。相比之下，此处观察到的α 值局限于0.0至0.4这一较窄范围内。逐粒子估计的不确定性适中（α的95%自助法置信区间宽度中位数：0.17；D_α的相对95%自助法置信区间宽度中位数：0.17；500个自助重采样）。这种受限的分布可能反映了实验条件下细胞相对较低的代谢活性，从而抑制ATP依赖性主动过程，使亚细胞运动偏向于局部约束性更强的动力学。

最后，为探究细胞内运动性的空间组织，我们绘制了视场内扩散指数的空间分布α （图4e）。图4a和图4e中由绿色和橙色箭头标记的一部分脂滴表现出局部升高的α 值，揭示了细胞内扩散行为显著的空间异质性。这些颗粒位于远离细胞核的位置（图4a中的红色虚线圆），与富含内质网和其他细胞器的核周区域相比，这里的细胞内拥挤程度较低。这些观察结果表明，脂滴在这些区域受到的运动约束较少。 总体而言，这些结果表明，视频帧率MIP-ODT能够对化学分辨的细胞内结构进行实时三维追踪，从而定量获取活细胞中具有异质性且可能呈各向异性的粒子动力学信息。

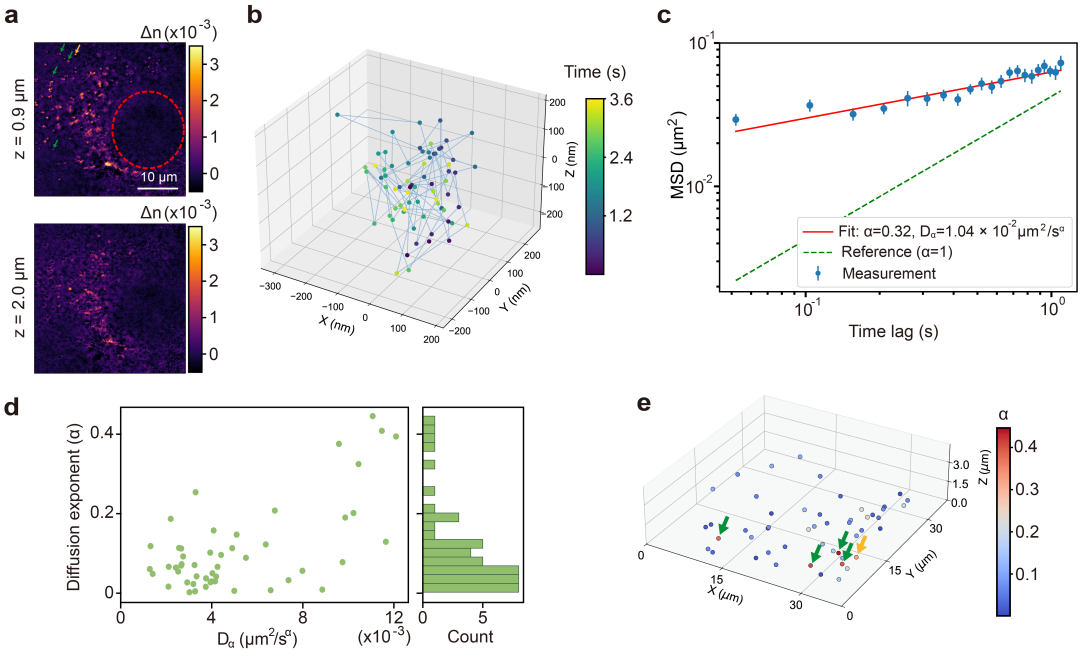

图 **4** | 活细胞中脂滴的视频速率三维追踪及反常扩散。a 在中红外激发波长调谐至 2,920 $^{-}$ 37 4 × 37 4 μ ^{2} 6 4 cm 1 时，μ 3 以每秒 19.2 个体积的速率采集的油酸处理 COS-7细胞的代表性深度分辨 MIP-ODT 切片。MIP-ODT 的视场为 . . m。MIP-ODT 的样品范围沿轴向估计为 . m。b 重建的脂滴三维轨迹，该脂滴在 a 中以橙色箭头标示，追踪时间为 3.6 s。c 根据三维轨迹计算的均方位移随时间间隔 τ 的变化。d 散点图显示视场内单个脂滴轨迹的均方位移分析所得广义扩散系数 D_α 与反常扩散指数 α 的关系。右侧直方图显示各轨迹中 α 的分布（每个区间的计数）。e 反常扩散指数的空间分布图 α。每个颜色（绿色/橙色）的箭头均与 a 中同色箭头对应。

讨论 还有一

MIP-ODT的进一步技术发展可以从多个方向展开。一个重要机遇是将基于SLM的波前控制拓展至完全可编程照明。在当前实现中，视频帧率体积成像采用固定的11个照明角度。可编程照明将能够根据所研究动力学的特征时间尺度，自适应地控制角度采样密度。这种灵活性可在重建保真度与采集速度之间实现可调节的权衡，如图1b所示。例如，在观察以秒为时间尺度演变的生物过程时，可将照明角度数量增加约一个数量级，从而获得与图1b中采用60个照明角度时相当的重建保真度，前提是不要求严格的视频速率采集。

可编程照明还可实现更先进的采集策略。SLM能够生成复杂的照明模式，在适当的前向模型和基于模型的反演[24]配合下，于单次相机曝光内实现角度复用。将多个照明角度编码到单个测量中，可扩展每次曝光的傅里叶空间覆盖范围，从而在保持体积成像速率的同时，提高重建MIP诱导的折射率变化的保真度。或者，角度复用也可以在保持相同等效角度密度的同时，减少测量帧总数。该策略能够在不影响重建保真度的情况下，使体积采集速度提高数倍。

我们进一步探讨了本文采用的反射式ODT几何结构所带来的分辨率提升。与传统的透射式实现相比，这种几何结构能够实现更高的照明数值孔径[19]。预计将照明数值孔径和收集数值孔径分别提高至 1.2 和 1.3，可将横向空间分辨率提升至 168 nm

轴向分辨率提升至 242 nm。缩短探针波长还能进一步改善分辨率。采用 400 nm 探针，预计横向和轴向分辨率分别可达到 126 nm 和 181 nm，从而实现对亚 200 nm 结构的三维分辨。这一分辨率范围可对常规三维化学成像难以观察的细胞内纳米结构进行无标记成像，包括小型囊泡区室和膜相关纳米结构。

最后，我们讨论其潜在应用。该平台能够以亚秒至秒级时间尺度对细胞内动态进行具有化学特异性的三维成像。这一能力可直接用于研究脂滴生物发生的早期阶段：新生脂滴从内质网中形成，并在脂肪酸装载后生长；也可研究活细胞中的后续过程，例如液滴生长和融合[25]。更广泛地说，高速三维化学成像为探究液-液相分离驱动的生物分子凝聚体形成与重塑提供了一种强有力的方法，包括核仁重组和应激诱导组装体；这些过程中的分子组分会在数秒至数分钟的时间尺度上发生交换[26]。总而言之，这些展望表明，MIP-ODT 是一个用途广泛的平台，可用于实时、无标记体积化学成像，并支持对动态细胞内组织结构和运输进行定量研究。

参考文献

1. Chen, B.-C. 等. 晶格光片显微镜：以高时空分辨率对从分子到胚胎进行成像。Science 346, 1257998 (2014). 2. Pittet, M. J. 等. 活体成像。Cell 147, 983–991 (2011). 3. Lichtman, J. W. 等. 荧光显微镜。Nat. Methods 2, 910–919 (2005). 4. Saar, B. G. 等. 利用受激拉曼散射进行活体视频速率分子成像。Science 330, 1368–1370 (2010). 5. Rinia, H. A. 等. 利用多重相干反斯托克斯拉曼散射显微镜对单个细胞脂滴的脂质组成与堆积进行定量无标记成像。Biophys. J. 95, 4908–4914 (2008). 6. Fu, Y. 等. 利用相干反斯托克斯拉曼散射显微镜对小鼠脑中髓鞘纤维进行离体与活体成像。Opt. Express 16, 19396–19409 (2008). 7. Wei, M. 等. 利用透明化增强受激拉曼散射显微镜进行体积化学成像。Proc. Natl Acad. Sci. USA 116, 6608–6617 (2019). 8. Lin, P. 等. 利用远程聚焦受激拉曼散射显微镜进行活体体积化学成像。Opt. Express 28, 30210–30221 (2020). 9. Wang, W. 等. 用于细胞和组织快速三维化学成像的受激拉曼散射断层成像。Adv. Photonics 6, 026001 (2024). 10. Zhang, D. 等. 以亚微米空间分辨率对活细胞和生物体进行深度分辨中红外光热成像。Sci. Adv. 2, 1600521 (2016). 11. Toda, K. 等. 相衬显微镜上的分子衬度。Sci. Rep. 9, 9957 (2019). 12. Bai, Y. 等. 通过对红外吸收的宽场光热传感实现超快化学成像。Sci. Adv. 5, 1- 24 (2019). 13. Zhang, D. 等. 通过传感红外光热效应实现键选择性瞬态相位成像。Light Sci. Appl. 8, 116 (2019). 14. Tamamitsu, M. 等. 利用中红外光热效应进行无标记生化定量相位成像。Optica 7, 359-366 (2020). 15. Toda, K. 等. 自适应动态范围偏移（ADRIFT）定量相位成像。Light Sci. Appl. 10, 1 (2021). 16. Zhao, J. 等. 键选择性强度衍射断层成像。Nat. Commun. 13, 7767 (2022). 17. Yin, J. 等. 通过每像素单脉冲光热检测实现视频速率中红外光热成像。Sci. Adv. 9, eadg8814 (2023). 18. Ishigane, G. 等. 超越视频速率的无标记中红外光热活细胞成像。Light Sci. Appl. 12,

174 (2023). 19. Tamamitsu, M. 等. 中红外宽视场纳米成像。Nat. Photonics 18, 738-743 (2024). 20. Granneman, J. G. 等. 脂 方甘油三酯脂肪酶（Atgl）的相互作用来控制脂解。J. Biol. Chem. 284, 34538–34544 (2009). 21. Kim, K. 等. 活肝细胞中脂滴的三维无标记成像与定量。Sci. Rep. 6, 36815 (2016). 22. Jeon, J.-H. 等. 脂质颗粒的活体反常扩散与弱遍历性破缺。Phys. Rev. Lett. 106, 048103 (2011). 23. Weber, S. C. 等. 非热ATP依赖性涨落促成染色体位点的活体运动。Proc. Natl Acad. Sci. USA 109, 7338–7343 (2012). 24. Brown, P. T. 等. 用于千赫兹速率体积成像的傅里叶合成光学衍射层析。Sci. Adv. 11, eadr8004 (2025). 25. Olzmann, J. A. 等. 脂滴的动力学与功能。Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 20, 137–155 (2019). 26. Shin, Y. 等. 细胞生理学与疾病中的液相凝聚。Science 357, eaaf4382 (2017). 27. Sung, Y. 等. 用于高分辨率活细胞成像的光学衍射层析。Opt. Express 17, 266–277 (2009). 28. Berg S. 等. ilastik：用于（生物）图像分析的交互式机器学习。Nat. Methods 16, 1226-1232 (2019). 29. Allan, D. B. 等. soft-matter/trackpy：v0.7。Zenodo, 10.5281/zenodo.16089574 (2025).

方法

RI 重建步骤。三维 RI 重建的实施

采用标准光学衍射层析工作流程，并使用 Rytov近似[27]。相较于传统方法，我们对 MIP-ODT重建工作流程进行了修改。在传统实现中，分别根据以无细胞区域测得的背景图像为参照的复光场，重建中红外开启和中红外关闭状态下的 RI 分布。随后，将中红外关闭状态下重建的分布从中红外开启状态下的分布中减去，以得到 MIP诱导的折射率变化。

本研究提出了一种直接差分重建方法，可根据中红外开启和中红外关闭状态之间的差分复光场，直接估算 MIP诱导的折射率变化。该策略无需在无细胞区域单独进行背景采集，从而减少实验开销，并支持实时 MIP 成像。重建方法的详细公式见补充说明4。

重建得到的光学衍射层析和 MIP-ODT 层析图像范围为 (X) 58.7 × (Y) 58.7 × (Z) 29.3 μm^3。为聚焦于中红外照射区域，我们对每项实验分析了裁剪后的子体积。裁剪后的体积在相应图注中列出。样品范围估算为可观察到脂滴对比度的表观轴向范围，该范围从硅基底表面测得。

使用可变照明数量进行光学衍射层析测量

ng 为空间光调制器。为评估角度采样密度对重建性能的影响，我们使用可变数量的照明角度进行了光学衍射层析测量，如图1b所示。尽管该数据集采用的光学配置与图1e中的配置不同，但这些修改并不影响本分析的结论。在此配置中，使用了1 ns可见光脉冲光源，而不是图1e中使用的10 ns激光器。此外，空间光调制器被安装在旋转台上的楔形棱镜所取代。照明数值孔径固定为1.0。对棱镜进行受控的方位旋转，可在保持照明数值孔径恒定的同时，精确调节照明角度。

使用空间光调制器进行倾斜照明。倾斜照明是通过使用

通过编程空间光调制器（SLM），使其生成 闪耀相位光栅图案。该光栅可将入射光功率高效地导向一级衍射级次，并将其用作倾斜照明光束。为

抑制不需要的衍射分量（包括零级和高阶），我们在傅里叶平面放置孔径掩模进行空间滤波。因此，只有所需的相干倾斜照明被传递至样本，从而实现用于体积成像的可控角度照明（补充说明5）。

由于空间光调制器（SLM）采用交流电压驱动，调制波前中不可避免地会引入微小的周期性相位波动。为减轻由此产生的相位噪声，中红外泵浦脉冲、可见光探测脉冲和相机曝光的时序均与 SLM 的交流驱动周期同步。

生物样本制备。COS-7细胞培养于硅质

基底上，基底厚度为 675 μm（6.675P1UMM，AKD，日本）。细胞在含有 L-谷氨酰胺、酚红和 HEPES 的高

。

成像前，将玻璃盖玻片直接放置在培养于硅基底上的细胞上方，以固定样品。对于图3所示的实验，使用4%多聚甲醛对细胞进行化学固定，随后将样品置于含有0.1% Triton X-100的PBS中进行处理。对于图4所示的活细胞实验，通过在培养基中添加100–200 μM油酸和牛血清白蛋白复合物，并过夜孵育，制备富含脂质的细胞。

高光谱体积分析。高光谱MIP-ODT数据集

通过采用基于索引的配对方案，将体积图像采集与光谱仪读数同步，获取了这些数据。计时图的详细说明见补充说明6中的图S5a。测量开始时，使用机械快门挡住中红外光束，并由相机和光谱仪记录基线MIR 关闭信号。短暂延迟后，快门打开，使中红外诱导信号呈阶跃式上升。后处理中识别出快门开启的时间点，并将其定义为高光谱测量的时间原点。将时间原点之后采集的体积数据集与相应的光谱仪记录进行配对，配对依据是匹配其顺序采集索引。

根据光学参量振荡器的能量守恒关系，利用测得的近红外信号波数计算与各体积对应的中红外闲频光波数，$\omega_{pump} = \omega_{signal} + \omega_{idler}$。为校正高光谱重建过程中中红外激发功率随波数变化产生的差异，使用对应波数处测得的中红外脉冲能量对每个MIP-ODT体积进行归一化。 由于在每次体积采集过程中，中红外波数会连续扫描，因此即使在单个体积内，中红外脉冲能量也可能略有变化。然而，在扫描的光谱范围内，中红外功率随波数平滑变化，由此导致的体积内相对强度变化最多为4.6%（图S5b）。因此，我们预计这种归一化引入的光谱失真可以忽略不计。

视频速率 MIP-ODT 成像中的运动分析。使用一种 s 检测并追踪脂滴。

监督式图像分析流程，使用 ilastik 库中的像素分类功能识别脂滴候选目标[28]。分类器基于人工筛选的内部

割。对阈

识进行二维

接事件。最大允许

可位移限制为 0.5 μm，为确保均方位移估计稳健，从总计 70

外这

对于每条三维轨迹，均方位移按 $MSD(\ )$ $|r($ [illegible] 对所有有效时间点 进行时间平均。为 [illegible] 成的偏差并确保统计稳健性，滞后时间 限制为总采集时长的 30%。通过在双对数空间 [illegible] 的百分位数分布，获得异常指数 α 和广义扩散系数D_α 的置信区间。在图4e中，将每条轨迹估计得到的异常扩散指数映射至粒子的初始位置，该位置定义为粒子在首次采集帧中的所在位置。

数据、材料和软件可用性 稿件中提供的数据可获 [illegible] 得。如有合理请求，可向通讯作者索取。

致谢 本工作获得了经 [illegible] 费支持，资助机构为日本学术振兴会（23H00273、25H01386，T.I.）、JST FOREST计划（JPMJFR236C，T.I.）、精密测量技术振兴基金会（T.I.）、UTEC-UTokyo FSI研究基金（T.I.）以及理研TRIP倡议（T.I.）。M.F.得到日本学术振兴会青年科学家研究奖学金（DC1，25KJ1144）、东京大学MERIT-WINGS计划和JSR奖学金的支持。

作者贡献 M.F.、Y.S.和S. K.开 [illegible] 发了显微成像系统。M.F.开展了实验并分析了数据。M.F.、K.T.和T. I.讨论了对结果的解释。K.T.和T.I.指导了本工作。M.F.、K.T.和T.I.撰写了稿件，并采纳了其他作者的意见。

利益冲突：K.T. 和 T.I. 是相关专利的发 [illegible] 明人，专利涉及 MIP-ODT系统。