



基于单分子量子相干调制的细胞温度成像技术*

周海涛^{1)**} 秦成兵²⁾ 肖连团²⁾ 武志芳¹⁾ 李思进¹⁾

⁽¹⁾ 山西医科大学第一医院核医学科, 山西医科大学分子影像精准诊疗省部共建协同创新中心, 太原 030001;

⁽²⁾ 山西大学量子光学与光量子器件国家重点实验室, 激光光谱研究所, 极端光学省部共建协同创新中心, 太原 030006)

摘要 目的 细胞温度成像可以帮助科学家研究和理解细胞内部的温度分布, 揭示细胞代谢和生物化学过程的关键信息。目前, 基于荧光温度探针的细胞温度成像技术存在低温度分辨率和有限测量范围等限制。本文旨在利用单分子量子相干过程依赖温度的特性, 开发一种单细胞温度成像和实时检测技术。**方法** 基于飞秒脉冲激光制备延时和相位可调的飞秒脉冲对, 调制的脉冲通过对显微系统激发细胞内标记的荧光单分子, 之后收集并记录每个荧光光子的到达时间。利用单分子相干过程与周围环境温度的关系, 定义单分子量子相干可视度 (V), 建立 V 与环境温度的对应关系。通过调制解调荧光光子的到达时间, 获取单分子周围环境温度, 结合扫描成像, 实现细胞的温度成像和实时检测。**结果** 该方法可以实现高精度 (温度分辨率 $< 0.1^\circ\text{C}$) 和大范围温度 ($10\sim 50^\circ\text{C}$) 的温度成像和测量, 并观测到了单个细胞代谢相关的温度变化。**结论** 该研究有助于深入了解细胞代谢、蛋白质功能和疾病机制, 为生物医学研究提供重要工具。

关键词 量子相干调制, 单分子显微, 细胞温度成像

中图分类号 Q6, O56

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0423

细胞温度是细胞内部环境的关键参数, 它对于细胞内生化反应的速率和效率具有重要影响^[1-3]。随着单细胞技术的发展, 单细胞温度成像技术可以帮助研究人员更好地了解细胞内部生物过程的温度敏感性和温度调控机制, 对于理解细胞内的生物化学反应和代谢过程具有十分重要的意义^[4]。

目前已经有多种细胞测温技术被开发出来, 热电偶是一种直接测量温度的方法, 它可以提供高精度的温度测量数据^[5-6]。然而, 热电偶需要与细胞直接接触才能进行测量, 因此会对细胞造成一定的伤害, 并且其获得的结果是多细胞整体的状态, 至少需要 $10^2\sim 10^3$ 个细胞才能获得可读取的数据^[7]。红外线成像技术则可以进行无接触的测量, 并且可以在非侵入性的条件下对细胞的温度进行实时监测^[8]。然而, 这种技术受到环境温度的影响, 需要对环境温度进行校准。荧光纳米温度计在提供高分辨率的温度成像方面表现出显著优势^[9-11], 然而, 这种技术也面临着一些限制。具体来说, 荧光强度很容易受到荧光猝灭和环境因素的影响, 这些因素可能会对温度测量的准确性造成干扰。此外,

荧光纳米温度计的温度分辨率通常大于 0.5°C , 而且其测量范围有限, 一般在 $25\sim 35^\circ\text{C}$ 之间^[12], 无法完全满足细胞温度的测量的需求^[13]。

近年来, 一些科学家开始探索利用量子机制进行细胞温度测量的可能性。量子相干过程发生在飞秒到皮秒的时间尺度, 不仅对环境温度很敏感, 而且几乎不受物质自身荧光动力学过程和周围环境及其它物化性质的影响, 因此成为目前发展最快的细胞测温手段之一^[14-16]。哈佛大学 Kucsko 等^[17] 利用金刚石纳米晶体中氮空位中心的电子自旋相干过程, 实现了对活细胞内局部热环境的高精度测量, 达到小于 0.1°C 的精度。然而, 由于标记问题, 这种方法难以用于成像测量。

针对上述问题, 本文基于团队前期的单分子特性的研究基础^[18-21], 利用单分子量子相干过程的温度依赖特性, 并结合单分子荧光探针的标记成像

* 国家自然科学基金 (62005150, 81971655, 62127817, 62222509, U22A6008, U22A2091) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0351-4639425, E-mail: zht@sxmu.edu.cn

收稿日期: 2023-11-02, 接受日期: 2023-12-07

优势, 提出了单分子量子相干调制的细胞温度成像技术。通过荧光单分子标记单个细胞, 并利用单分子显微技术和超快光学调制技术, 可以实现高精度(温度分辨率 $<0.1^{\circ}\text{C}$)和大范围($10\sim 50^{\circ}\text{C}$)的细胞温度成像和测量。

1 材料与方法

1.1 测温原理

本研究基于前期发展的单分子量子相干调制技术^[18-19], 利用单分子退相位过程和温度的依赖关系, 通过测量单分子激发态布居几率的变化, 实现细胞内温度的测量。单分子退相位过程可以用二能级的刘维尔方程描述^[22]:

$$\frac{\partial \hat{\rho}}{\partial t} = \frac{1}{i\hbar} (\hat{H}\hat{\rho} - \hat{\rho}\hat{H}) \quad (1)$$

这里 \hat{H} 是光场与二能级系统相互作用的哈密顿量, $\hat{\rho}$ 是二能级系统的密度矩阵, i 是虚数单位, \hbar 是普朗克常数。为了定量描述退相位过程, 利用相位调制的飞秒脉冲对获取单分子周围的退相位信息, 并定义量子相干可视度(V)来描述脉冲对对单分子量子相干态的操控能力:

$$V = \frac{\rho(0) - \rho(\pi)}{\rho(0) + \rho(\pi)} \quad (2)$$

这里 $\rho(0)$ 和 $\rho(\pi)$ 分别是相位为 0 和 π 时单分子激发态的布居几率。通过将单分子标记于细胞内, 利用相位调制的飞秒脉冲对测量获取单分子的 V , 然后利用 V 与温度的依赖关系获取细胞内的温度(图1a)。单分子的量子相干态变化可以通过布洛赫球上的箭头表示, 当单分子周围环境温度很低时, 单分子几乎不发生退相位, 此时脉冲对可以完

全操控单分子的量子相干态, 单分子的 V 最大(接近1)。随着单分子周围环境温度的逐渐升高, 单分子退相位时间逐渐缩短, 脉冲对对单分子的量子相干态的操控能力减弱, 单分子的 V 逐渐减小(趋于0)。

1.2 测温装置

实验装置如图1b所示, 利用激光器(FemtoFiber Pro TVIS, Toptica, 脉冲宽度389 fs, 波长635 nm, 重频10 MHz, 单脉冲能量 <0.1 nJ)结合迈克尔逊干涉装置制备偏振相互垂直, 延时可调的飞秒脉冲对, 在其中的一个光路中加入电光调制器(EOM, New Focus)调节两个脉冲之间的相位差。根据荧光光子数, 通常调制电压设置为1 kHz的锯齿波。细胞样品被放置于冷热台上来实现样品的温度调节($-10\sim 80^{\circ}\text{C}$, PE80-10, 文天精策仪器科技(苏州)有限公司)。调制的脉冲对通过物镜激发细胞内标记的单分子, 并通过同一个物镜收集荧光, 经过二向色镜和滤波片后通过偏振分数棱镜(PBS)和单光子探测器(SPAD, PicoQuant)获取不同偏振方向上的荧光, 并由多通道皮秒时间计数器(MCPET, SIMINICS)记录每个光子的到达时间。对收集的光子到达时间做离散傅里叶变化可以获得在调制频率处的调制强度, 最终通过如下公式获取 V :

$$V = \left(\frac{I_1}{I_2} + \frac{I_2}{I_1} \right) \xi \quad (3)$$

其中 I_1 和 I_2 分别是两个不同偏振方向上探测到的荧光强度, ξ 为荧光调制强度与总荧光强度的比值, 具体推导过程可以参考团队前期的工作^[19]。

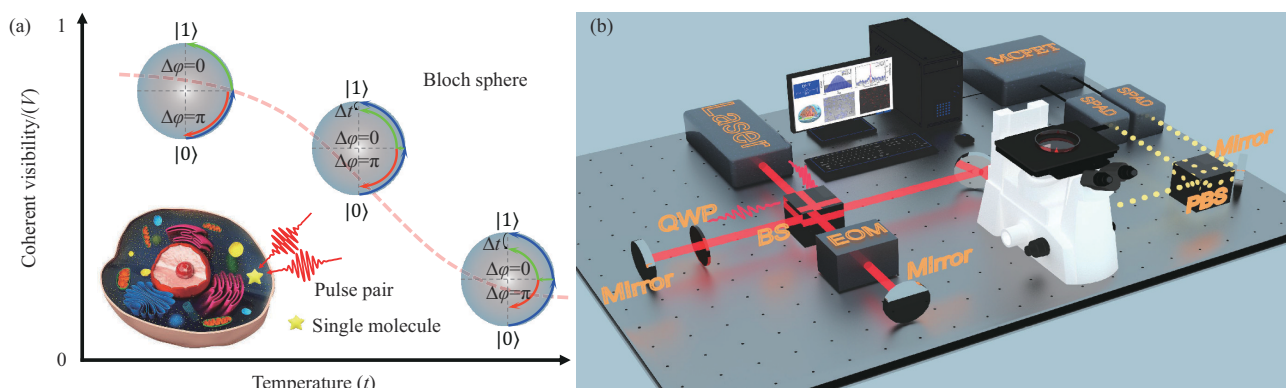


Fig. 1 Schematic diagram of cellular temperature measurement based on single-molecule quantum coherent modulation

(a) Experimental principle. (b) Experimental setup. EOM, electro-optical modulator; QWP, quarter-wave plate; BS, 50/50 beam splitter; DM, dichroic mirror; SPAD, single-photon avalanche diode; PBS, polarization beam splitter; MCPET, multichannel picosecond event timer.

1.3 细胞培养与标记

实验选取的测试细胞为人源的非小细胞肺癌细胞 (A549, Procell Life Science & Technology), 细胞在培养基、细胞生长因子和匀霉素的混合溶液 (100 : 1 : 1) 和 5% 浓度的 CO_2 环境中并培养至对数期进行实验。选取方酸衍生轮烷分子 (squaraine-derived rotaxanes, SR) 作为单分子温度探针, 在之前的实验中已经证明了 SR 等多种荧光单分子具有很好的量子相干特性^[21]。在细胞染色过程中, SR 分子先用 DMSO 有机溶剂溶解, 然后再用超纯水稀释到 10~50 nmol/L。对细胞染色 1 h 后, 用培养基冲洗 3 次, 然后在孵化器中处理 3 h 再用于观察。为了与传统的荧光温度探针做对比, 本文选择商用的纳米凝胶型温度探针 Particulate Thermoprobe (FDV-0003, Lumiprobe)^[23], 该探针分子由温敏性基团 (poly(NIPAM-co-DBD-AE))、水敏感荧光基团 (N- {2- [(7-N, N-dimethylaminosulfonyl) -2, 1, 3-benzothiadiazol-4-yl], DBThD-AA)、交联器 (N,N'-methylenebisacrylamide, MBAM) 组成。探针水溶液在低温时, 由于结构内水分子的存在, 荧光基团信号减弱, 在高温时, 水分子被排除到探针外, 荧光基团信号增强, 从而实现测温效果。实验时, 先将 100 μg 的颗粒热探针粉末重新溶解于 10 μl 的 80 mmol/L KCl、10 mmol/L K_2HPO_4 和 4 mmol/L NaCl 的溶液中, 然后通过涡旋或轻敲等方式将其完全溶解。在 4 $^\circ\text{C}$ 下放置过夜 (至少 8 h), 从瓶中

取 1 μl 的溶液, 注入玻璃毛细管针中以进行微量注射, 在 30 $^\circ\text{C}$ 以下的温度下, 将其注入细胞质中, 细胞静置 30 min 后用于测量。

2 结果与讨论

将细胞样品放置于显微镜的冷热台上, 通过控制冷热台的温度并测量单分子的 V , 在不同温度下获得的 V 调制频谱 (图 2a)。观测发现, 明显的调制信号出现在 1 kHz 的调制频率位置。这是由于脉冲对的相位调制影响了荧光光子的到达时间, 当进行傅里叶变换后, 这种效应在调制频率 (1 kHz) 处产生了一个显著的调制峰。此外还注意到, 随着温度的升高, V 呈现出逐渐减小的趋势。这种现象的发生主要是因为温度升高导致量子系统的热运动增加, 进而缩短了退相位时间。这种热运动的增加削弱了量子叠加状态, 从而导致 V 的减少。统计从 10~50 $^\circ\text{C}$ 范围内不同温度下的实验数据 (每个温度测量 100 组数据), 同时对比纳米荧光温度探针的测量结果 (图 2b)。观察结果表明, 利用量子相干测量技术开发的温度传感器在 10~50 $^\circ\text{C}$ 的广泛温度范围内, 成功保持了稳定的线性关系。这一特点与基于纳米荧光温度探针的测量方法形成了鲜明对比, 后者在超出 20~40 $^\circ\text{C}$ 的温度区间后便无法维持线性关系。这一显著差异突出了量子相干测量方法在测量温度范围方面的显著优势。

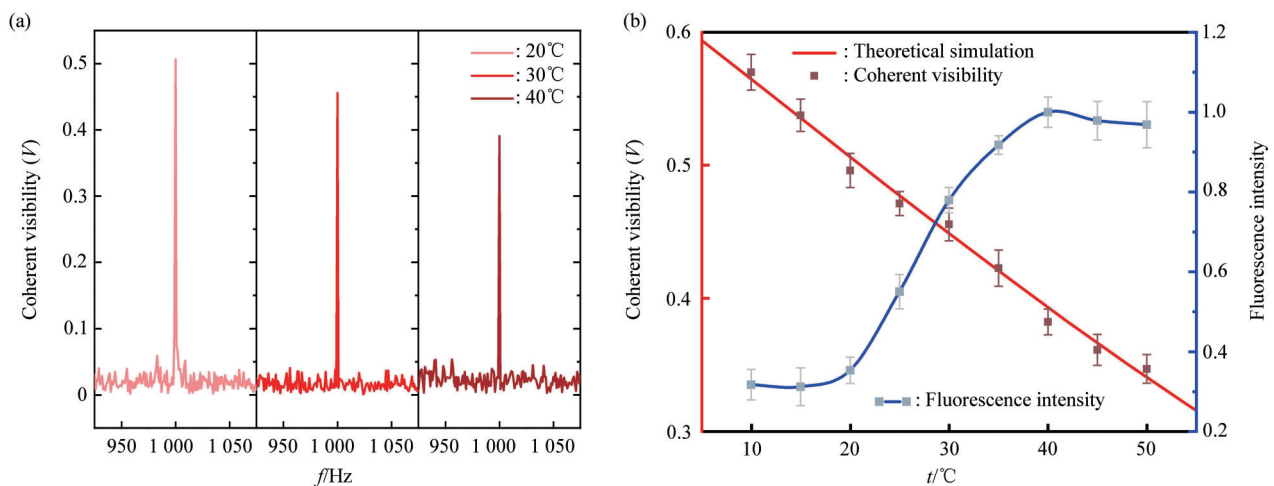


Fig. 2 Processing of experimental data

(a) Modulation spectra of quantum coherence visibility (V) at different temperatures. (b) Comparison of temperature measurements using single-molecule quantum coherent modulation and fluorescence nano thermometry.

本研究应用了调制解调技术的原理来提高温度测量精度。这种方法的核心在于，不同光子数下的信噪比会有所不同，进而影响测量精度。具体来说，当光子数较少时，信噪比较低，导致测量精度不高。而随着光子数的增加，信噪比提高，测量的精度也随之增加。为了深入研究这一现象，测量不同光子数下的温度轨迹来获得温度分辨率，并对比单分子量子相干和纳米温度探针测量的温度分辨率效果（图3）。随着光子数的增加，纳米温度探针的

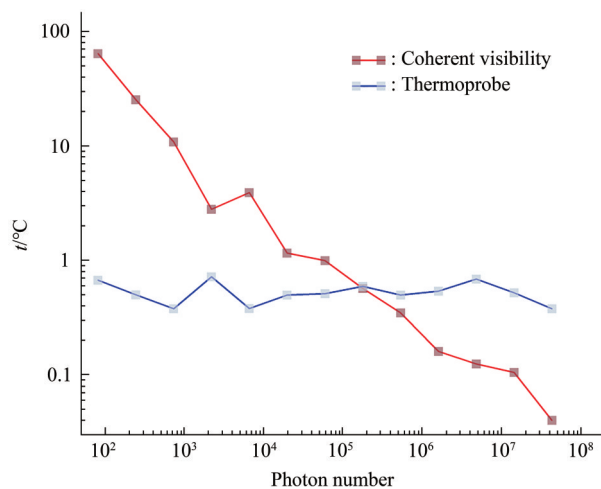


Fig. 3 Contrast temperature resolution between quantum coherence visibility and nano thermometry

温度分辨率保持在 0.5°C 上下，几乎不发生改变，这是因为纳米温度探针的温度灵敏度限制了其在信噪比提高时温度分辨率的提高。而基于相干可视度的方案，其温度分辨率会随着光子数的增加而不断提高，在大于 10^5 光子数时，温度分辨率优于纳米温度探针，在大于 10^7 光子数时，温度分辨率小于 0.1°C 。这一显著提升归因于调制解调技术对于散粒噪声背景的抑制，从而使得测量结果更为精确和敏感。这些发现表明，在进行高精度温度测量时，光子数是一个关键因素，而 V 测量方法在处理大量光子数据时展现出显著的优势。

将量子相干调制测温技术与共聚焦扫描系统（Nikon, Ti2-U）结合，获得了细胞的温度成像。观测发现，细胞的温度范围大约在 $30\sim 36^{\circ}\text{C}$ 之间（图4a）。细胞内温度变化的可视化是通过的后期处理实现的。具体来说，首先将包含每个像素点相干可视度 V 的数据矩阵导入到Matlab R2022b软件中，接着，利用Matlab的image函数，根据像素的尺寸来创建图像，并且选择合适的伪色来直观地表示细胞内的温度分布。为了深入探索细胞代谢对温度的影响，在细胞中加入寡霉素（Oligo），一种已知的ATP合成酶的抑制剂。寡霉素通过抑制氧化磷酸化作用及线粒体耦合膜中所有依赖ATP的过程，

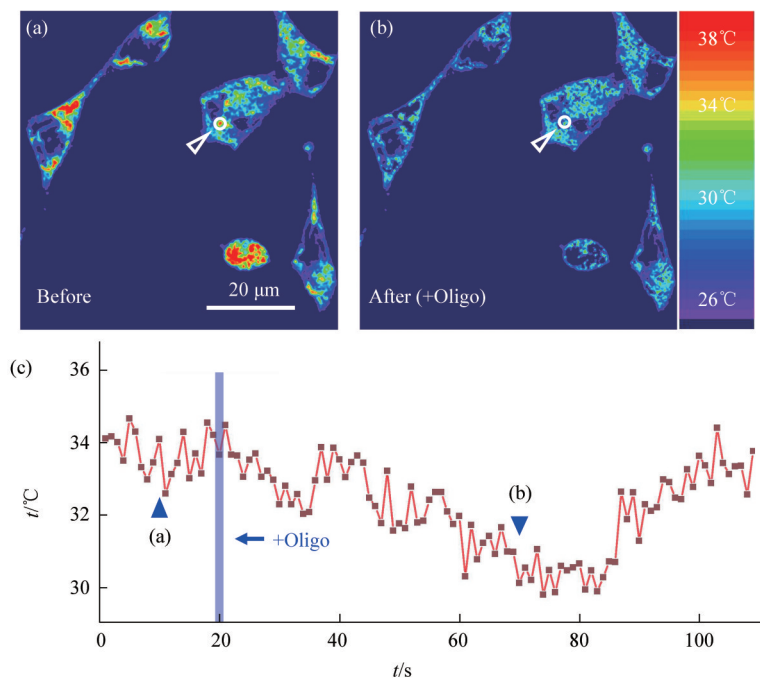


Fig. 4 Cell temperature imaging and temperature trajectory before and after the addition of Oligo

(a) Cellular temperature imaging before the addition of Oligo. (b) Cellular temperature imaging after the addition of Oligo. (c) Temporal evolution of cellular temperature at the locations indicated by arrows in (a) and (b). Blue triangles mark the time points of imaging for (a) and (b), while the shaded area indicates the duration when Oligo was added.

来降低细胞的代谢活动。温度成像结果清晰地显示, 加入寡霉素后, 细胞内部分区域的温度明显降低 (图 4b)。这一现象表明, 由于寡霉素导致的代谢活动抑制, 细胞的热量产生减少, 进而引起了温度的变化。进一步分析图 4c 中对应位置的温度轨迹发现, 在加入寡霉素后, 细胞温度逐渐下降至大约 30°C。值得注意的是, 大约 80 s 后, 随着寡霉素的代谢, 其抑制作用开始减弱, 细胞的温度逐渐恢复。这一结果不仅揭示了细胞代谢活动的变化与温度变化之间的直接联系, 而且还展示了量子相干调制测温技术在实时监测细胞代谢状态变化方面的潜力。这一研究表明了细胞代谢的变化会造成细胞相应温度的变化。

3 结 论

本文是基于单分子退相位过程与单分子周围环境温度依赖关系建立的, 实验证明这种方法相对于基于荧光强度的温度探针方法具有更准确 (<0.1°C) 和更宽范围 (10~50°C) 的温度测量。并且, 本实验利用这种方法观测到了细胞代谢关联的温度变化。未来, 结合靶向单分子的量子相干调制技术, 细胞测温系统有望在细胞温度与代谢活动之间的相关研究中发挥关键作用, 进而深入解析特定代谢过程的温度依赖性。此方法的发展将可能推动细胞生物学、分子生物学和生物物理学等领域的重大进步。通过精确测量和调控细胞内温度, 研究人员能够更好地理解和模拟细胞内的生化反应, 这对于揭示细胞代谢、疾病发生及药物作用机制等具有重要意义。此外, 该技术的提升也将助力新药的开发和个性化医疗的实施, 使治疗方法更为精准高效。综上所述, 细胞测温系统的未来发展不仅能够深化对生命科学的理解, 还可能为临床医学带来革命性的变革。

参 考 文 献

- [1] Knapp B D, Huang K C. The effects of temperature on cellular physiology. *Annu Rev Biophys*, 2022, **51**: 499-526
- [2] Wang F, Han Y, Gu N. Cell temperature measurement for biometabolism monitoring. *ACS Sens*, 2021, **6**(2): 290-302
- [3] Liang H, Yang K, Yang Y, *et al.* A lanthanide upconversion nanothermometer for precise temperature mapping on immune cell membrane. *Nano Lett*, 2022, **22**(22): 9045-9053
- [4] Ali A, Davidson S, Fraenkel E, *et al.* Single cell metabolism: current and future trends. *Metabolomics*, 2022, **18**(10): 77
- [5] Huang L, Ding X, Pan X, *et al.* Single-cell thermometry with a nanothermocouple probe. *Chem Commun*, 2023, **59**(7): 876-879
- [6] Zhao X, Gao W, Yin J, *et al.* A high-precision thermometry microfluidic chip for real-time monitoring of the physiological process of live tumour cells. *Talanta*, 2021, **226**: 122101
- [7] Braissant O, Keiser J, Meister I, *et al.* Isothermal microcalorimetry accurately detects bacteria, tumorous microtissues, and parasitic worms in a label-free well-plate assay. *Biotechnol J*, 2015, **10**(3): 460-468
- [8] Kumawat M K, Thakur M, Gurung R B, *et al.* Graphene quantum dots from mangifera indica: application in near-infrared bioimaging and intracellular nanothermometry. *ACS Sustain Chem Eng*, 2017, **5**(2): 1382-1391
- [9] Xue K, Wang C, Wang J, *et al.* A sensitive and reliable organic fluorescent nanothermometer for noninvasive temperature sensing. *J Am Chem Soc*, 2021, **143**(35): 14147-14157
- [10] Qiao J, Mu X, Qi L. Construction of fluorescent polymeric nanothermometers for intracellular temperature imaging: a review. *Biosens Bioelectron*, 2016, **85**(15): 403-413
- [11] Gota C, Okabe K, Funatsu T, *et al.* Hydrophilic fluorescent nanogel thermometer for intracellular thermometry. *J Am Chem Soc*, 2009, **131**(8): 2766-2767
- [12] Zhou J, Del Rosal B, Jaque D, *et al.* Advances and challenges for fluorescence nanothermometry. *Nat Methods*, 2020, **17**(10): 967-980
- [13] Chretien D, Bénit P, Ha H H, *et al.* Mitochondria are physiologically maintained at close to 50°C. *PLoS Biol*, 2018, **16**(1): e2003992
- [14] Gu Q, Shanahan L, Hart J W, *et al.* Simultaneous nanorheometry and nanothermometry using intracellular diamond quantum sensors. *ACS Nano*, 2023, **17**(20): 20034-20042
- [15] Guo C, Alexandradinata A, Putzke C, *et al.* Temperature dependence of quantum oscillations from non-parabolic dispersions. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 6213
- [16] Yukawa H, Fujiwara M, Kobayashi K, *et al.* A quantum thermometric sensing and analysis system using fluorescent nanodiamonds for the evaluation of living stem cell functions according to intracellular temperature. *Nanoscale Adv*, 2020, **2**(5): 1859-1868
- [17] Kucsko G, Maurer P C, Yao N Y, *et al.* Nanometre-scale thermometry in a living cell. *Nature*, 2013, **500**(7460): 54-58
- [18] Zhou H, Yao W, Zhou X, *et al.* Accurate visualization of metabolic aberrations in cancer cells by temperature mapping with quantum coherence modulation microscopy. *ACS Nano*, 2023, **17**(9): 8433-8441
- [19] Zhou H, Qin C, Han S, *et al.* Visualizing quantum coherence based on single-molecule coherent modulation microscopy. *Nano Lett*, 2021, **21**(3): 1477-1483
- [20] Zhou H, Qin C, Chen R, *et al.* Accurate investigation on the fluorescence resonance energy transfer between single organic molecules and monolayer wse2 by quantum coherent modulation-enhanced single-molecule imaging microscopy. *J Phys Chem Lett*, 2019, **10**: 2849-2956
- [21] Zhou H, Qin C, Chen R, *et al.* Quantum coherent modulation-enhanced single-molecule imaging microscopy. *J Phys Chem Lett*, 2019, **10**(2): 223-228
- [22] Goddard B D, Hurst T D, Wilkinson M. A derivation of the liouville equation for hard particle dynamics with non-conservative interactions. *PRoy Soc Edinb A*, 2021, **151**(3): 1040-1074
- [23] Uchiyama S, Gota C, Tsuji T, *et al.* Intracellular temperature measurements with fluorescent polymeric thermometers. *Chem Commun*, 2017, **53**(80): 10976-10992

Cellular Temperature Imaging Technology Based on Single-molecule Quantum Coherent Modulation*

ZHOU Hai-Tao^{1)**}, QIN Cheng-Bing²⁾, XIAO Lian-Tuan²⁾, WU Zhi-Fang¹⁾, LI Si-Jin¹⁾

¹⁾Department of Nuclear Medicine, The First Hospital of Shanxi Medical University, Collaborative Innovation Center for Molecular Imaging,

Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

²⁾Collaborative Innovation Center of Extreme Optics, Institute of Laser Spectroscopy, State Key Laboratory of Quantum Optics and Quantum Optics Devices, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract Objective Cellular temperature imaging can assist scientists in studying and comprehending the temperature distribution within cells, revealing critical information about cellular metabolism and biochemical processes. Currently, cell temperature imaging techniques based on fluorescent temperature probes suffer from limitations such as low temperature resolution and a limited measurement range. This paper aims to develop a single-cell temperature imaging and real-time monitoring technique by leveraging the temperature-dependent properties of single-molecule quantum coherence processes. **Methods** Using femtosecond pulse lasers, we prepare delayed and phase-adjustable pairs of femtosecond pulses. These modulated pulse pairs excite fluorescent single molecules labeled within cells through a microscopic system, followed by the collection and recording of the arrival time of each fluorescent photon. By defining the quantum coherence visibility (V) of single molecules in relation to the surrounding environmental temperature, a correspondence between V and environmental temperature is established. By modulating and demodulating the arrival times of fluorescent photons, we obtain the local temperature of single molecules. Combined with scanning imaging, we finally achieve temperature imaging and real-time detection of cells. **Results** This method achieves high precision (temperature resolution $<0.1^{\circ}\text{C}$) and a wide temperature range ($10\text{--}50^{\circ}\text{C}$) for temperature imaging and measurement, and it enables the observation of temperature changes related to individual cell metabolism. **Conclusion** This research contributes to a deeper understanding of cellular metabolism, protein function, and disease mechanisms, providing a valuable tool for biomedical research.

Key words quantum coherent modulation, single-molecule microscopy, cellular temperature imaging

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0423

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (62005150, 81971655, 62127817, 62222509, U22A6008, U22A2091).

** Corresponding author.

Tel: 86-351-4639425, E-mail: zht@sxmu.edu.cn

Received: November 2, 2023 Accepted: December 7, 2023