

基于荧光随机涨落的超分辨显微成像

曾志平

福州大学物理与信息工程学院, 福建 福州 350116

摘要 基于荧光随机涨落的超分辨显微成像技术具有成像速度快、空间分辨率高、系统成本低和光毒性小的成像优势,在对生物亚细胞结构及其动态运动过程的成像和监测中具有广阔的应用前景。近年来,基于荧光发射的间歇性,发展出多种图像重建算法实现荧光涨落超分辨成像,在无须对传统的荧光显微镜做任何硬件改造的情况下,显著提升了光学成像的空间分辨率,实现了突破光学衍射极限的超分辨成像。从重建算法、成像速度、分辨率提升和图像重建质量等方面,对比分析不同类型荧光涨落超分辨方法的差异和适用范围,为生命科学研究人员针对特定的生物学问题选择最佳的超分辨方法提供参考依据。

关键词 医用光学; 图像处理; 超分辨成像; 荧光涨落; 衍射极限; 空间分辨率

中图分类号 O436

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0307009

Fluorescence Fluctuation-Based Super-Resolution Nanoscopy

Zeng Zhiping

College of Physics and Information Engineering, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350116, China

Abstract Fluorescence fluctuation-based super-resolution nanoscopy has the imaging advantages of fast imaging, high spatial resolution, low system cost and low phototoxicity, and exhibits broad prospects in imaging and monitoring of biological subcellular structures and dynamics. In recent years, based on fluorescence intermittency of fluorophores, a variety of image reconstruction algorithms have been developed to realize fluorescence fluctuation-based super-resolution imaging. These algorithms can achieve significant resolution enhancement of optical imaging without any hardware modification of conventional fluorescence microscope, and can break the optical diffraction limit. From the perspectives of reconstruction algorithms, imaging speed, resolution improvement and image quality, we analyze and compare the differences and application scopes of multiple types of fluctuation-based nanoscopy, which provides reference on optimal super-resolution techniques selection for researchers in life sciences to investigate specific biological issues.

Key words medical optics; image processing; super-resolution imaging; fluorescence fluctuation; diffraction limit; spatial resolution

OCIS codes 170.2520; 100.6640; 180.2520

1 引 言

光学显微成像技术已在生命科学、材料科学、生物医药和临床医学诊断等领域得到广泛应用。传统的光学显微成像技术受到衍射极限的限制,空间分辨率难以突破 200 nm,因此需要发展更高空间分辨率的显微成像技术来满足科学研究的需求。近年来,远场光学超分辨成像技术发展迅速,且与多个学科交叉,广泛应用于生命科学等研究领域。超分辨

光学显微成像技术突破了光学衍射极限对于光学成像空间分辨率的限制,并且能够对活体细胞的超精细结构及其相互作用实现纳米量级分辨率的快速成像和监测,为生命科学研究提供了强有力的技术平台^[1-9]。

基于荧光随机涨落的超分辨技术在成像速度、空间分辨率、系统成本、光毒性等方面能够达成良好的权衡。Dertinger 等^[12-13]提出超分辨光学涨落成像(SOFI),利用量子点自身发射荧光随时间发生强

收稿日期: 2017-09-14; 收到修改稿日期: 2017-11-17

基金项目: 福州大学引进人才科研启动项目(510439)

作者简介: 曾志平(1986—),男,博士,讲师,主要从事光学超分辨显微成像方面的研究。E-mail: zhipingzeng@163.com

度涨落的特性,即荧光间歇性^[10-11],通过对荧光涨落信号进行数学相关函数的分析和处理,可以有效区分来自不同荧光分子的荧光涨落信号,从而提高超分辨成像的时空分辨率。SOFI 技术具有分辨率高、光毒性小、系统成本较低等优点,且所需采集的图像帧数较少(100~1000 帧图像),在对活细胞的研究中具有广泛的应用前景。中国科学院苏州生物医学工程技术研究所的 Jiang 等^[14-15]通过消除荧光涨落信号的低频分量和读出噪声,有效提取荧光涨落的高频分量,能够进一步减少 SOFI 重建所需的图像帧数,实现更快的 SOFI。深圳大学的王雪花等^[16]通过求解光学涨落显微图像的累积量标准差,显著提高了超分辨重构图像的均匀性和连续性,进一步提升了 SOFI 的速度。此外,SOFI 方法还可用于进一步提升光片显微镜的横向空间分辨率^[17]。Zeng 等^[18]在先前的研究工作中提出 JT-SOFI 技术,利用三色联合标记的方法,将高标记密度分散到三个通道进行联合标记,能够有效消除高标记密度下 SOFI 所引起的伪影和断续缺陷,显著提升 SOFI 的保真度和完整性,同时明显提升超分辨成像的速度。

Gustafsson 等^[19]提出基于荧光径向涨落的超分辨成像(SRRF)技术,通过求解分析荧光涨落信号的径向梯度变化实现超分辨成像。SRRF 允许在较低的光功率密度下进行荧光激发,所需的重建帧数较少,时间分辨率更高,适用于活细胞的动态超分辨成像。Yahiatene 等^[20]提出基于熵分析的荧光涨落超分辨成像(ESI)技术,通过荧光涨落的概率分布求解信息熵值,使得空间分辨率显著提升。ESI 无须要求荧光涨落处于严格的开关状态,可使用更多强度值参与图像重建,可用于更多种类荧光分子标记的超分辨成像。

本文围绕荧光分子的荧光涨落特性,分析了 SOFI、SRRF、ESI 等多种利用荧光间歇性实现超高分辨率成像的技术,并对比其成像算法、时空分辨率,以及成像质量。综述了基于荧光随机涨落的超分辨显微成像在研究生物亚细胞结构方面的重要应用,为此类技术更好地应用于生命科学领域的研究提供理论参考和实践依据。

2 基本概念

2.1 量子点的荧光间歇性

荧光物质在受到激发光的照射时,激发光的能量使荧光物质原子中的电子跃迁到能量更高的能级,由

于高能级具有不稳定性,电子会自发地跃迁回基态,能量以光的形式释放出来,产生荧光。大多数情况下,荧光的波长比激发光的波长更长,但在多光子激发的情形下,荧光的波长可以短于激发光的波长。

荧光发射的强度一般不是恒定的,而是会随着时间发生强度的涨落现象(荧光闪烁),即荧光间歇性。其中,量子点发射的荧光会发生非常明显的闪烁现象^[21]。闪烁产生的机制是多方面的,其中一种解释是量子点表面的悬空键会俘获和失去电子,当悬空键带正电荷时,量子点能够发光,当悬空键呈中性或者带负电荷时,量子点则处于暗态^[22]。量子点的荧光闪烁遵循幂次法则,即量子点处于荧光亮态和暗态的概率密度^[23]是

$$P(\tau_{\text{on/off}}) \propto 1/\tau_{\text{on/off}}^m, \quad (1)$$

式中 P 是概率密度函数, τ_{on} 和 τ_{off} 分别为量子点处于荧光亮态和暗态的时间, m 为幂指数系数。从统计学角度来看,量子点处于长时间的亮态和暗态的概率是存在的,但呈现幂指数的衰减趋势,并与照射的光功率密度线性相关。量子点的荧光随机光学涨落可以覆盖多个时间尺度的数量级,从 100 μs 到数十秒的时间尺度均可以观测到量子点的荧光闪烁效应,这降低了对 CCD 相机采集的曝光时间要求,使其可以在多个时间尺度上采集量子点的荧光涨落图像序列。

2.2 有机荧光染料和荧光蛋白的荧光间歇性

除量子点外,有机荧光染料和荧光蛋白也存在荧光发射间歇性的现象。有机荧光分子染料一般需要添加特定的还原剂才能发生明显的荧光随机涨落现象。例如,青色素在硫醇或磷化氢的作用下,合适的光照能够使得青色素分子在荧光亮态和暗态之间转换,其本质是青色素分子结构中的聚甲炔桥与硫醇或硫化氢发生反应生成加合物,使之暂时失去发射荧光的特性。对于另一种有机荧光分子 ATTO655,当加入含硫醇还原剂 MEA 后,使用 658 nm 的激光照射能够将其从荧光亮态转换到荧光暗态,荧光分子与氧气接触发生轻微的振动就能使其迅速恢复到荧光亮态^[24]。

多数荧光蛋白的荧光态转换本质上是顺反异构化作用,即荧光蛋白分子在光照作用下能够在两种顺反异构体之间进行切换。分子的不同异构体具有明显的生物、化学、物理性质差异:顺式异构体具有显著的荧光发射特性;而反式异构体则属于荧光暗态,无法发射荧光。相较于量子点或有机荧光分子,荧光蛋白的优势在于更小的尺寸,以及活细胞标记,

即能够通过基因标记的方式研究活细胞的动态结构特性^[24-25]。

3 超分辨图像重建基本原理

3.1 基于荧光涨落相关分析的超分辨成像

2009年, Dertinger等^[12]提出SOFI方法, 通过对荧光的时间涨落信号计算相关函数, 实现了成像空间分辨率的提升。SOFI最初通过利用量子点的显著荧光涨落特性实现超分辨成像。量子点由于具有亮度高、光学稳定性好、荧光光谱窄等优点, 已经在生命科学研究中得到广泛应用^[26-30]。

SOFI重建过程首先假定待测样品由 N 个独立发光的闪烁荧光分子组成。在空间位置 r 、时间 t 处的荧光信号强度 F 可以表示为^[12]

$$F(r, t) = \sum_{i=1}^N U(r - r_i) \times \epsilon_i \times s_i(t), \quad (2)$$

式中 U 为系统的点扩展函数 (PSF), ϵ 为荧光分子亮度, s 代表单个分子荧光的涨落, r_i 为第 i 个荧光分子的空间位置。此时, 二阶自相关函数可表示为

$$G(r, \tau) = \langle \delta F(r, t + \tau) \times \delta F(r, t) \rangle_t = \sum_i U^2(r - r_i) \times \epsilon_i^2 \times \langle \delta s_i(t + \tau) \delta s_i(t) \rangle_t, \quad (3)$$

可见, 自相关函数与系统的 PSF、荧光分子亮度和涨落的相关程度均相关。在实际的应用中, 一般还需要计算累积量函数, 原因是累积量能够有效地消除低阶相关函数引起的交叉项, 则 n 阶累积量仅与 PSF 的 n 次方有关。除了计算自相关累积量外, 更通用的方法是计算互相关累积量。互相关累积量的计算能够有效地消除散粒噪声的影响, 因为来自不同像素的散粒噪声不具有相关性。

图 1 为 SOFI 重建原理图。首先需要采集一定时间的图像序列, 图像中的荧光分子随时间不断地发生荧光闪烁现象。当对两个相距很近 (小于光学衍射极限) 的荧光分子成像时, 由于光的衍射, 在像面上会形成两个艾里斑。根据瑞利判据, 当两个艾里斑的间距小于艾里斑的中心到第一个零点的距离时, 两个荧光分子在空间上无法分辨。但因为荧光分子所发射的荧光随时间是有涨落的, 在采集一定数量的图像帧后, 取图像上单个像素的亮度随时间变化的曲线, 可以观察到各个像素的亮度随时间的涨落情况。然后, 计算图像中各个像素的时间自相关累积量或空间互相关累积量函数。由于不同荧光分子涨落的相对独立性, 在艾里斑重叠的区域, 计算出的相关累积量数值较小。对图像中所有的像素点做同样的相关累

积量函数运算, 将得到的各个相关累积量函数值组成一幅二维图像, 即 SOFI 图像。可以看出, SOFI 图像能够明显提升重建图像的空间分辨率, 将距离很近的两个荧光分子有效地分辨开来。

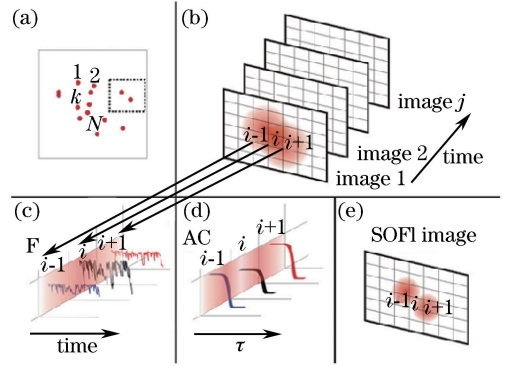


图 1 SOFI 重建原理图^[12]。(a)由 N 个闪烁荧光分子组成的样品; (b)采集图像序列; (c)对所采集图像序列的各个像素点提取时间涨落信号; (d)分别计算 3 个像素时间涨落信号的自相关累积量函数; (e)所得到的 SOFI 图像

Fig. 1 Schematic of SOFI reconstruction^[12].

- (a) A specimen consists of N temporally fluctuating emitters;
- (b) collect the image sequence;
- (c) extract temporal fluctuation signals from each pixel of the image sequence;
- (d) calculate auto-cumulant functions of three fluctuation signals, respectively;
- (e) reconstructed SOFI image

Dertinger等提出^[13]通过傅里叶权重调整法来进一步提高 SOFI 的分辨率。具体来讲, 对系统的 PSF 进行傅里叶变换可以得到光学传递函数 (OTF), 将 OTF 乘以一个权重因子后, 再对 OTF 进行傅里叶逆变换, 则求得的新 PSF 的宽度仅为原先的 $1/n$ 。对于 n 阶累积量函数的 SOFI 成像, 通过调整傅里叶权重, 可以实现 n 倍空间分辨率的提升。

Geissbuehler等^[31]提出了 bSOFI, 通过分析不同阶数的累积量函数, 提取荧光分子的亮暗寿命、浓度和亮度分布等信息, 用于平衡 SOFI 重建图像的对比度, 使得不同荧光分子的亮度被线性化, 并且空间分辨率能够随着累积量函数的阶数实现线性提升。具体来讲, bSOFI 首先对图像做一次 Lucy-Richardson 反卷积, 然后通过 n 次方根对亮度响应进行线性化, 接着截去较小的强度值以消除噪声的影响, 以及反卷积产生的伪影, 最后再重新卷积上相应阶数的 PSF。经过一系列数学处理, 对于 n 阶累积量函数的 bSOFI 成像, 同样可以实现 n 倍空间分辨率的提升。

3.2 基于贝叶斯分析的荧光涨落超分辨成像

2012年, Cox等^[32]利用对荧光分子的涨落和漂白特性进行贝叶斯分析, 实现了超高分辨率的荧光成像(3B)。3B超分辨方法基于贝叶斯概率统计基础, 通过对数百张采集图像序列中的荧光分子涨落和漂白事件进行求解分析, 解析出荧光分子在最大似然概率下的空间位置分布。在某种程度上, 3B是一种更高单分子显示密度下的单分子定位算法。在3B图像重建的过程中, 把荧光分子的状态分为亮态(State 0)、闪烁态(State 0与State 1之间的切换)和漂白态(State 1到State 2的过程), 通过计算贝叶斯概率的方法, 确定荧光分子最大可能的空间位置, 从而实现突破光学衍射极限的超分辨成像。在3B图像重建的过程中, 每一次迭代需要求解荧光分子数量和空间位置分布的最优解, 经过多次迭代后, 最终获得的结果在概率上会逐渐趋向于荧光分子的真实空间位置, 从而突破艾里斑大小的限制, 提升成像的空间分辨率。

一般情况下, 200帧左右的图像序列结合200次以上的迭代运算就可以实现大约50 nm空间分辨率的3B超分辨图像重构, 对应的时间分辨率大约为4 s。相比于光活化定位显微镜(PALM)/随机光学重构显微镜(STORM)等基于单分子定位的超分辨技术, 3B无须空间拟合定位单分子的中心位置, 允许较高的单帧显示分子标记密度, 具有较高的时间分辨率, 因而, 3B超分辨技术是一种比较适用于活细胞成像的超分辨技术。相比于SOFI技术, 3B采用多次迭代的算法进行图像重构运算, 计算量巨大, 因此, 3B的超分辨图像重建时间很长, 且成像的深度较浅, 一般基于全反射荧光显微成像(TIRF)或宽场显微平台采集图像序列来实现3B超分辨成像。2012年, Hu等^[33]通过使用亚马逊云计算显著提升了3B图像重建的速度。2016年, Xu等^[34]提出单分子引导的贝叶斯定位超分辨方法(SIMBA), 通过光转化蛋白mEos3.2标记细胞微丝的实验, 证实SIMBA方法能够进一步加快3B超分辨的计算时间, 并提高图像的重构精度。

3.3 SRRF

2016年, 英国研究人员Gustafsson等^[19]提出SRRF, 通过求解分析荧光涨落信号的径向梯度变化实现超分辨成像, 如图2所示。SRRF的图像重建过程是, 首先, 所采集图像 $I(x, y)$ 在 x 和 y 方向的梯度可表示为

$$\begin{cases} G_x(x, y) = \frac{\partial I(x, y)}{\partial x} \\ G_y(x, y) = \frac{\partial I(x, y)}{\partial y} \end{cases}, \quad (4)$$

通过在放大的网格中定义一系列空间位置点 (x_c, y_c) 用于计算径向度。然后, 定义环形坐标系 (x'_i, y'_i) , 并通过原始图像梯度 G_x 和 G_y 计算梯度 G_{xi} 和 G_{yi} , 则梯度线方程可表示为

$$0 = (x - x'_i)G_{yi} - (y - y'_i)G_{xi}, \quad (5)$$

此时, 位置点 (x_c, y_c) 到梯度线的垂直距离为^[19]

$$d_i = \frac{|(x_c - x'_i)G_{yi} - (y_c - y'_i)G_{xi}|}{\sqrt{G_{xi}^2 + G_{yi}^2}}. \quad (6)$$

定义梯度线在位置点 (x_c, y_c) 的收敛度为^[19]

$$c_i = \text{sgn}\left(\frac{G_i \times r_i}{|G_i| |r_i|}\right) \left[\frac{(1 - d_i)}{|r_i|}\right]^2, \quad (7)$$

式中 $G_i = (G_{xi}\hat{x}, G_{yi}\hat{y})$, $r_i = (r_{xi}\hat{x}, r_{yi}\hat{y})$ 。最后, 图像中像素 (x, y) 在时间 t 的径向度可表示为 N 个环形坐标的平均收敛度, 即

$$R_t(x, y) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N c_i. \quad (8)$$

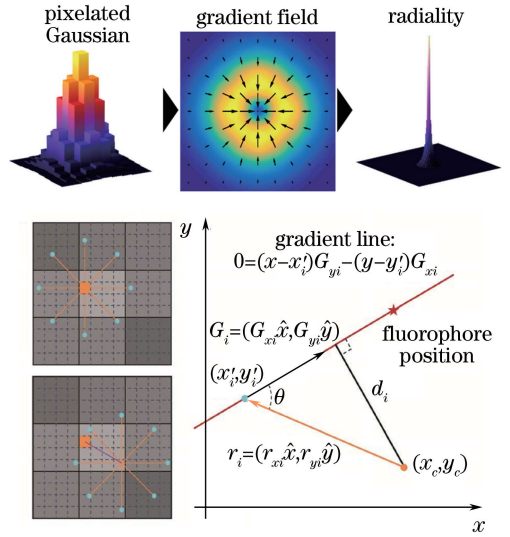


图2 SRRF超分辨成像的原理图^[19]

Fig. 2 Schematic of SRRF super-resolution reconstruction^[19]

SRRF通过求解径向梯度分布的方法能够有效定位出荧光分子中心区域的位置, 提升成像的空间分辨率。此外, SRRF允许在较低的光功率密度下进行荧光激发, 所需的重建帧数较少, 时间分辨率更高, 适用于活细胞的动态超分辨成像。

3.4 ESI

德国研究人员Yahiatene等^[20]提出ESI, 通过对荧光涨落的概率分布求解信息熵值, 获得空间分辨率的显著提升。

ESI 图像重建是通过计算荧光涨落信号的信息熵值,实现超分辨成像。具体来讲,对于所采集图像中坐标为 (i', j') 的像素,其熵值可以表示为^[20]

$$H_{i', j'} = - \sum_{k=1}^N P(I_k^{i', j'}) \times \log_2 [P(I_k^{i', j'})]. \quad (9)$$

式中 $I_k^{i', j'}$ 表示第 k 个荧光分子在坐标 (i, j) 处的荧光强度, $P(I_k^{i', j'})$ 表示其概率分布函数。然后,定义互熵的概念,表示为^[20]

$$xH_{i'+1, j'} = - \sum_{k=1}^N P(I_k^{i', j'}) \times \log_2 [Q(I_k^{i', j'})]. \quad (10)$$

式中 $Q(I_k^{i', j'})$ 表示坐标为 (i, j) 处的荧光强度信号在坐标 $(i+1, j)$ 处的概率分布函数,互熵能够体现两个信号之间的相似性。比如, P 和 Q 代表两个相邻的像素点,如果这两个像素的信号值是来源于同一个荧光分子的信号,则相似性很高,互熵的值较大,如果两个像素来源于不同的荧光分子,由于不同分子发光的独立性,则计算出的互熵值较小,据此可以有效区分来自不同荧光分子的信号。

ESI 与 SOFI 的算法类似,可以计算高阶的统计量,由两部分组成,互熵与高阶混合中心矩的乘积,相当于以高阶混合中心矩为权重的互熵的值。ESI 图像的重建是通过计算相邻像素间的带权重的互熵来实现的,重建的图像会产生更多的像素,相当于一种插值的过程,但具备提升空间分辨率的能力。ESI 的图像重建可以采用多次迭代的方法,先把原始采集的图像序列分成若干小组,然后每个小组单独做 ESI 重建,将重建的结果用于下一次迭代,这样可以实现更高的分辨率提升。ESI 无须要求荧光涨落处于严格的开关状态,可使用更多强度值参与图像重建,是一种可用于更多种类荧光分子标记的超分辨成像方法。

3.5 基于多信号分类的荧光涨落超分辨成像

2016 年, Agarwal 等^[35] 提出多信号分类的荧光涨落超分辨成像 (MUSICAL), 通过计算图像序列的本征图像(在统计上本征图像可以表征系统结构的主要特征), 然后结合系统 PSF 的分布, 实现超分辨成像, 如图 3 所示。

在 MUSICAL 图像重建的过程中, 采用逐个像素滑动软窗的方法, 空间窗的大小与系统 PSF 的主瓣大小相近, 可以表示为

$$W = 1 + 2\text{floor}\left(\frac{0.61\lambda}{NA \times w}\right), \quad (11)$$

式中 λ 为荧光波长, NA 为物镜的数值孔径, W 为

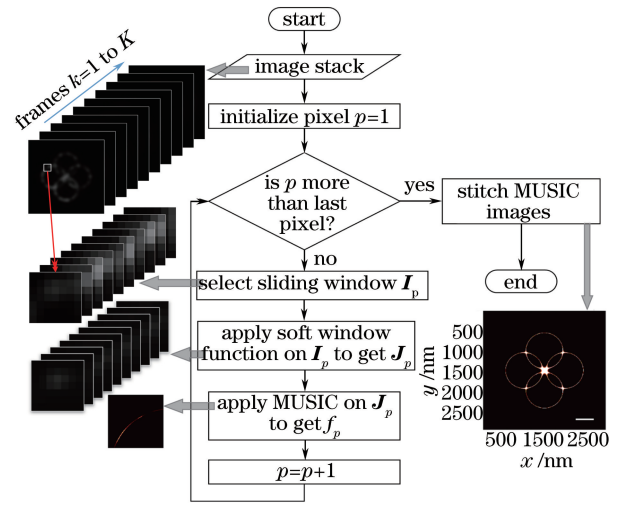


图 3 MUSICAL 图像重建的流程图^[35]

Fig. 3 Flowchart of MUSICAL image reconstruction^[35]

图像像素的大小。滑动窗口的使用有助于确定本征图像。MUSICAL 图像重建的过程为: 首先, 从所采集图像序列的第一个像素开始, 选择合适的滑动窗口, 由于窗口的有限尺寸大小, 窗口边缘的像素存在截断效应, 所以, 对窗口使用软窗函数进行处理, 即通过邻近像素的权重补偿, 消除窗口数据截断的影响; 然后, 使用改进的 MUSIC 算法^[36], 通过对逐个像素进行处理并拼接图像, 最终重建出完整的超分辨图像。

4 基于荧光随机涨落超分辨成像的光路构成及实验要求

荧光随机涨落超分辨成像技术能够基于多种光学系统平台开展研究工作。SOFI 最初是基于传统的宽场荧光显微镜, 采用量子点标记待测样品, 通过 CCD 相机采集多帧荧光图像序列, 使用 SOFI 算法重建出超分辨图像。对于表层结构的研究, SOFI 也可以基于全反射 TIRF 进行超分辨成像, 由于 TIRF 技术能够对样品的表面区域实现更高信噪比的成像, 所以, 重建的超分辨图像具有更高的质量和保真度。此外, SOFI 还能够基于转盘共聚焦系统实现超分辨成像。相较于 TIRF 平台, 转盘共聚焦能够实现更大的成像深度, 并且共聚焦系统的层析作用能够有效抑制焦区外自发荧光的影响, 可对样品较深部区域实现超分辨成像^[5]。

对于 3B 成像, 在传统的宽场荧光显微镜下使用氙弧灯照明, 即可实现对活细胞的 3B 超分辨成像, 此外, 3B 也可以基于 TIRF 模式进行图像采集, 实现超分辨成像。对于 SRRF 成像, 既可以在宽场

模式下采集图像,也可以使用 TIRF 成像模式进行图像序列采集,还可以通过共聚焦模式来实现超分辨成像。ESI 成像在传统的宽场荧光显微镜下即可完成图像序列的采集,将采集的图像序列通过 Fiji 软件中的 ESI 插件处理,可以获得 ESI 超分辨图像。MUSICAL 可以在 TIRF 模式下进行图像序列的采集,通过使用 MUSICAL 算法进行图像重建获得超分辨图像。

基于荧光随机涨落超分辨成像的各种方法均要求所标记的样品具有随机荧光涨落的特性,并且用于图像序列采集的 CCD 或 CMOS 相机能够有效记录这种时间涨落的信号。

5 荧光涨落超分辨技术的对比及在生命科学中的应用

超分辨光学显微成像技术的发展极大地推动了对纳米尺度生命活动和现象的研究^[37-50]。荧光涨落超分辨成像技术由于具备系统成本低、成像速度快、空间分辨率高和光毒性小的成像优势,已经在生物亚细胞结构成像等生命科学领域的研究中获得广泛应用。细胞骨架是细胞中的蛋白纤维网状结构,它能够维持细胞的形态,并且参与细胞的一系列功能活动。细胞骨架主要有:微管、微丝和中间丝。其中,微丝的尺寸最小,平均只有 7 nm,而微管的尺寸最大,可达 25 nm,能够为整个细胞提供结构性支撑,并参与细胞内部的蛋白输运过程。研究表明,通过对细胞微管的结构和功能异常进行检测有助于诊断和治疗癌症和阿尔茨海默病等^[51-53]。但是,25 nm 远小于光学衍射极限,所以,传统的光学显微成像方法难以对细胞骨架的精细结构进行成像。这就必须借助于超分辨成像技术才能够对活细胞的精细结构进行深入研究。

Duwé 等^[54]利用可逆开关荧光蛋白分别标记细胞微管和角蛋白,通过 mt-pcSOFI 技术对细胞骨架进行双通道的超分辨成像。在 mt-pcSOFI 的成像过程中,使用 rsGreenF 荧光蛋白标记细胞的角蛋白、Dronpa 荧光蛋白标记细胞微管,由于 rsGreenF 比 Dronpa 具有更好的荧光时间涨落特性,采用不同的时间延迟进行 SOFI 图像重建,可以有效分离具有不同时间涨落特性的荧光蛋白,实现同时对两种细胞骨架进行 SOFI 超分辨成像。如图 4(a)所示, Scholefield 等^[55]使用 SOFI 技术实现对 NEMO 蛋白的超分辨成像,NEMO 蛋白的高阶结构变化与细胞的基因突变存在关联。通过对色素失

调症患者的细胞进行超分辨成像,发现该疾病患者的细胞中 NEMO 蛋白缺失高阶晶格结构,可为相关疾病的诊疗提供重要的参考价值。

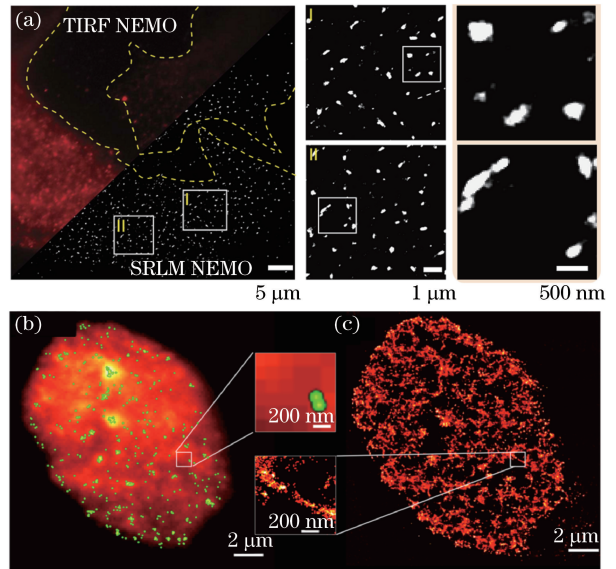


图 4 (a)对色素失调症患者的细胞进行 SOFI 成像,揭示其细胞中 NEMO 蛋白的空间结构分布^[55]; (b) HP1α 蛋白的宽场荧光显微图像; (c) HP1α 蛋白的 3B 荧光显微图像^[56]

Fig. 4 (a) SOFI imaging of cells from patients suffered from incontinentia pigmenti, revealing spatial distribution of NEMO protein in cells^[55]; (b) wide-field image of HP1α protein. (c) 3B image of HP1α protein^[56]

Cox 等^[32]使用 3B 算法,通过对荧光分子的闪烁和漂白过程进行贝叶斯分析,实现了对细胞中伪足小体形成和分解动态的超分辨观测。使用 Alexa 488 荧光染料标记细胞的伪足小体,采用宽场荧光显微镜进行图像序列采集,完成 300 帧图像采集后,通过贝叶斯统计分析所有图像序列的荧光闪烁和漂白过程,重建出细胞伪足小体的超分辨图像,可以有效分辨伪足小体的中空结构,揭示出一部分中空直径小于 300 nm 的伪足小体结构,这部分结构在传统的宽场荧光显微图像中是无法被完全分辨出来的。Hu 等^[56]基于光片显微平台,通过 3B 定位算法,如图 4(c)所示,实现了对细胞中异染色质 HP1α 蛋白分布的超分辨成像。对 HP1α 蛋白的荧光标记是通过细胞表达光激活蛋白 mEos2 实现的,从图 4(b)和(c)可以看出,传统的荧光显微技术无法揭示 HP1α 蛋白的非均匀结构分布特性,而在 3B 图像中能够呈现 HP1α 蛋白在纳米量级的精细结构分布情况。由此可知,3B 超分辨成像技术能够为生物细胞大分子结构分布的研究提供一种良好的技术手段和方法。

SRRF 能够显著提升细胞骨架成像的空间分辨率,如图 5 所示,使用荧光染料 Alexa Fluor 647 标记细胞微管,在 TIRF 系统上采集荧光涨落图像序列,然后通过 SRRF 重建细胞微管的超分辨图像,可以有效分辨空间间距约为 70 nm 的交叉微管分布,比 TIRF 图像实现了 3 倍以上空间分辨率的提升。此外,如图 5(c)和(d)所示,通过 LifeAct-GFP 荧光蛋白转染标记活细胞的丝状肌动蛋白,在 SRRF 重建图像中,可以在更高的空间分辨率下观察丝状肌动蛋白在免疫突触形成时的动态重塑过程。

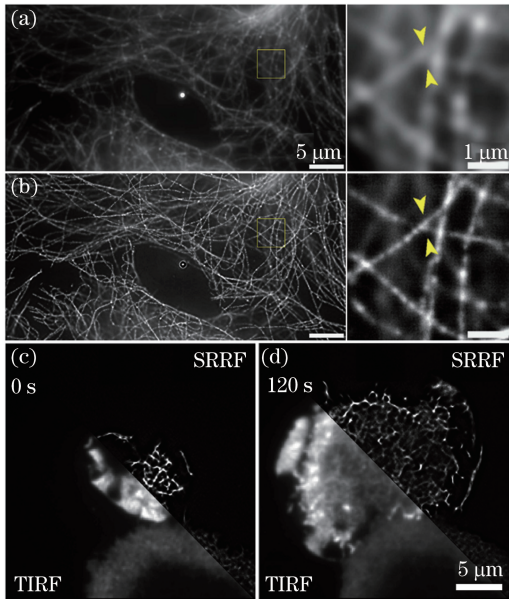


图 5 (a) Alexa Fluor 647 标记细胞微管的 TIRF 图像;
(b) Alexa Fluor 647 标记细胞微管的 SRRF 图像;
(c) LifeAct-GFP 标记 F-actin 的 TIRF 和 SRRF 图像 ($t=0$);
(d) LifeAct-GFP 标记 F-actin 的 TIRF 和 SRRF 图像
($t=120$ s)^[19]

Fig. 5 (a) TIRF image of microtubules labeled with Alexa Fluor 647; (b) SRRF image of microtubules labeled with Alexa Fluor 647; (c) TIRF and SRRF images of F-actin labeled with LifeAct-GFP ($t=0$); (d) TIRF and SRRF images of F-actin labeled with LifeAct-GFP ($t=120$ s)^[19]

ESI 通过对量子点标记的细胞微管蛋白图像序列进行连续采集,对图像序列的逐个像素进行熵值运算,实现了重建图像分辨率 $\sqrt{2n}$ 倍的提升;使用 2 阶 ESI 图像重建能够显著地提升图像的分辨率,实现 2 倍的分辨率提升,重建图像中细胞微管蛋白的半峰全宽约为 136 nm。

MUSICAL 可以获得活细胞微管的超高分辨率图像,利用绿色荧光蛋白 GFP 标记细胞微管,只需采集 49 帧图像序列、曝光时间 5 ms 即可实现时间

分辨率为 245 ms、空间分辨率小于 100 nm 的超高分辨时空分辨成像。此外,在对固定细胞的成像中,Agarwal 等^[35]实现了小于 50 nm 空间分辨率的 MUSICAL 超分辨成像,如图 6 所示。

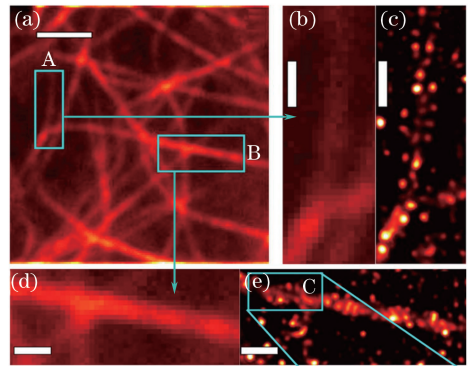


图 6 (a) GFP 标记细胞微管的宽场荧光图像;
(b)区域 A 的放大宽场荧光图像;
(c)区域 A 的放大 MUSICAL 超分辨荧光图像;
(d)区域 B 的放大宽场荧光图像;(e)区域 B 的
放大 MUSICAL 超分辨荧光图像^[35]

Fig. 6 (a) Wide-field image of microtubules labeled with GFP; (b) magnified wide-field image from Region A; (c) magnified MUSICAL image from Region A; (d) magnified wide-field image from Region B; (e) magnified MUSICAL image from Region B^[35]

多种基于荧光随机涨落的超分辨技术参数对比如表 1 所示。从成像的分辨率来看,此类超分辨方法均可以实现 100 nm 以下空间分辨率的成像,其中,3B、SRRF 和 MUSICAL 在实际应用中已经实现约 50 nm 的分辨率。从成像速度方面来看,在实验上现有的技术基本能够在 5 s 以内完成所需图像序列的采集工作,具有较快的成像速度。其中:MUSICAL 在实际应用中已经可以实现 4 frame/s 以上的超分辨图像重建帧率;基于荧光随机涨落超分辨技术的成像速度还取决于荧光涨落的时间特性和荧光亮度,加快荧光涨落的时间尺度、增强荧光发射的亮度,能够显著缩短图像采集的曝光时间,提高图像序列采集所需的总时间,从而提升超分辨成像的速度。从图像重建的计算量分析,除 3B 方法外,其他的荧光随机涨落超分辨成像方法的图像重建计算量适中,在传统的计算机上均能在短时间内完成超分辨图像的重建。3B 方法计算量很大,重建图像需要较长的时间,但云计算技术的应用可以大大缩短 3B 超分辨重建的时间成本。从实验系统要求的角度分析,这 5 种荧光随机涨落超分辨成像技术都能够在传统的宽场荧光显微镜下完成荧光图像序列

的采集,对于样品表层结构的成像,这类超分辨技术也能够进行图像序列的采集。在实验上,SOFI已在转盘共聚焦系统上实现了超分辨图像的重建,SRRF在传统的共聚焦显微系统上实现了超分辨成像。

表 1 基于荧光随机涨落的超分辨成像技术性能对比
Table 1 Comparison of fluorescence fluctuation-based super-resolution microscopy

Technique	Spatial resolution /nm	Imaging speed / (frame·s ⁻¹)	Frame number
SOFI	80	1	≥100
3B	50	0.2-0.5	≥150
SRRF	50-70	0.5-1	≥100
ESI	100	0.5	≥100
MUSICAL	40-50	>4	≥50

通过仿真一个放射状的分辨率测试图案进一步对比不同荧光随机涨落超分辨成像技术的空间分辨率和图像质量。图 7 对比了 SOFI、SRRF、ESI 和 MUSICAL 的重建图像,3B 技术由于图像重建的计算量巨大,没有在仿真中加以对比。4 种技术所重建的超分辨图像均可以实现空间分辨率的显著提升,选择测试图案中的 4 根放射线观察其截面强度分布情况,如图 7 所示:宽场图像无法有效分辨 4 根放射线的结构分布;bSOFI 图像能够分辨其结构,但在高密度区域出现了一些伪影信号,第二根放射线的强度分布偏离了标准的高斯分布;SRRF 图像能够很好地分辨出 4 个高斯分布信号,其半峰全宽小于 100 nm,在高密度区域仍存在伪影信号,但相比 bSOFI 图像,SRRF 图像有所改善;ESI 重建的图像产生了比较明显的对比度偏差,在中间的高密度区域图像的亮度很高,但在其余较低密度的区域,重建的图像亮度显著下降,丢失了一些图像的信息,最终未能准确分辨 4 根放射线的空间分布情况;MUSICAL 图像能够很好地分辨空间结构分布,半峰全宽在 50 nm 以下,具有更高的空间分辨率,但在高密度区域重建的图像亮度均匀性产生了偏差,在图中第 4 根放射线的亮度出现了下降趋势。

6 结 论

基于荧光随机涨落的超分辨显微成像技术利用荧光信号的时间涨落特性,通过多种涨落信号分析算法,实现了对生物亚细胞结构突破光学衍射极限的超分辨成像。实现此类超分辨成像的前提条件是,不同荧光分子的荧光时间涨落是相互独立的,并

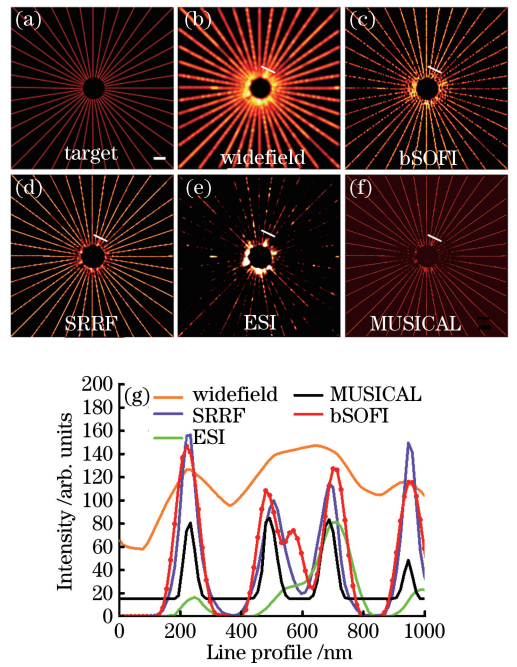


图 7 (a)计算机仿真模拟的一个放射状的分辨率测试图案;(b)测试图案的宽场图像;(c)~(f)测试图案的 bSOFI、SRRF、ESI 和 MUSICAL 超分辨图像;(g)白色线条位置处的截面强度分布曲线图。比例尺:1 μm
Fig. 7 (a) Computer-simulated radial resolution test pattern; (b) widefield image of test pattern; (c)-(f) bSOFI, SRRF, ESI and MUSICAL super-resolution images of test pattern; (g) intensity line profiles of positions indicated by white lines in the images. Scale bar: 1 μm

且图像采集器件能够在时间尺度上有效记录荧光涨落信号;在绝大多数的实验条件下,完全可以满足这些前提条件。

从成像的技术原理来讲,SOFI方法是基于荧光涨落的独立性,多个荧光信号叠加的区域相关性较低,相关函数值的大小能够体现图像中各个荧光分子 PSF 的重叠分布情况,借助于相关函数值的空间差异分辨出衍射极限内的荧光分子分布。不同于 SOFI 方法,3B 超分辨方法是通过统计学最大似然估计方法估计荧光分子的空间分布情况,在多次迭代的过程中不断逼近荧光分子的真实空间分布。SRRF 超分辨方法引入梯度径向度的概念,在采集的图像序列中,通过分析荧光强度梯度分布,求解径向度,实现荧光分子空间位置的准确定位,因而能够突破衍射极限的空间分辨率限制。ESI 超分辨方法借鉴信息论中熵的概念,多个随机涨落信号的叠加会表现出熵值的减少,与 SOFI 方法类似,通过熵值的大小揭示荧光分子空间重叠的情况,实现超分辨成像。MUSICAL 超分辨方法使用本征值分析的处

理方法,零值本征值的本征图像能够体现噪声的分布情况,而非零本征值的本征图像则能够揭示荧光涨落图像序列的不同荧光分布模式,从而实现超分辨成像。

现有的基于荧光随机涨落超分辨成像的方法在对高密度结构进行成像时仍然存在一些不足,主要体现在重建图像的伪影和图像保真度下降,进一步提升此类超分辨技术在高密度结构以及动态过程中成像的保真度是至关重要的。一方面需要继续优化成像的算法,建立更高效、可靠的数学模型,消除超分辨成像的伪影,提升成像的保真度;另一方面,也可以从荧光标记的角度去寻求解决问题的途径,通过多通道联合标记等方法提升高密度亚细胞精细结构超分辨成像的质量。本课题组之前提出了联合标记 SOFI(JT-SOFI)的方法,使用 3 种颜色的量子点同时对细胞微管进行联合标记,通过 SOFI 算法的超分辨图像重建,显著提升了高密度下 SOFI 成像的图像保真度和质量。联合标记的方法有望与其他类型的荧光涨落超分辨技术相结合,共同推进实现高密度亚细胞结构的高质量超分辨成像。

参 考 文 献

- [1] Chojnacki J, Staudt T, Glass B, *et al.* Maturation-dependent HIV-1 surface protein redistribution revealed by fluorescence nanoscopy [J]. *Science*, 2012, 338(6106): 524-528.
- [2] Xu K, Babcock H P, Zhuang X. Dual-objective storm reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(2): 185-188.
- [3] Zeng Z, Xi P. Advances in three-dimensional super-resolution nanoscopy [J]. *Microscopy Research and Technique*, 2016, 79(10): 893-898.
- [4] Balzarotti F, Eilers Y, Gwosch K C, *et al.* Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes[J]. *Science*, 2017, 355(6325): 606.
- [5] Chen X, Zeng Z, Wang H, *et al.* Three-dimensional multimodal sub-diffraction imaging with spinning-disk confocal microscopy using blinking/fluctuating probes[J]. *Nano Research*, 2015, 8(7): 2251-2260.
- [6] 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.
- [7] Chen X, Li R, Liu Z, *et al.* Small photoblinking semiconductor polymer dots for fluorescence nanoscopy[J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(5): 1604850.
- [8] Chen X, Zeng Z, Li R, *et al.* Superior performance with sCMOS over EMCCD in super-resolution optical fluctuation imaging [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2016, 21(6): 066007.
- [9] Zeng Z, Xie H, Chen L, *et al.* Computational methods in super-resolution microscopy[J]. *Frontiers of Information Technology & Electronic Engineering*, 2017, 18(9): 1222-1235.
- [10] Dickson R M, Cubitt A B, Tsien R Y, *et al.* On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein [J]. *Nature*, 1997, 388(6640): 355-358.
- [11] Gómez D E, van Embden J, Jasieniak J, *et al.* Blinking and surface chemistry of single CdSe nanocrystals[J]. *Small*, 2006, 2(2): 204-208.
- [12] Dertinger T, Colyer R, Iyer G, *et al.* Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(52): 22287-22292.
- [13] Dertinger T, Colyer R, Vogel R, *et al.* Achieving increased resolution and more pixels with superresolution optical fluctuation imaging (SOFI) [J]. *Optics Express*, 2010, 18(18): 18875-18885.
- [14] Jiang S, Zhang Y, Yang H, *et al.* Enhanced SOFI algorithm achieved with modified optical fluctuating signal extraction[J]. *Optics Express*, 2016, 24(3): 3037-3045.
- [15] Li R, Qu H M, Zhang Y H, *et al.* Super-resolution optical fluctuation imaging algorithm based on spatial Gaussian filter [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2016, 53(8): 081001.
李蕊, 屈惠明, 张运海, 等. 基于空间高斯滤波的超分辨光学波动成像算法 [J]. *激光与光电子学进展*, 2016, 53(8): 081001.
- [16] Wang X H, Chen D N, Yu B, *et al.* Deconvolution optimization in super-resolution optical fluctuation imaging based on cumulant standard deviation [J]. *Acta Physica Sinica*, 2016, 65(19): 198701.
王雪花, 陈丹妮, 于斌, 等. 基于累积量标准差的超分辨光学涨落成像解卷积优化 [J]. *物理学报*, 2016, 65(19): 198701.
- [17] An K, Wang J, Liang D, *et al.* Improving lateral resolution of light sheet fluorescence microscopy with SOFI method [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2017, 44(6): 0607002.
安坤, 王晶, 梁东, 等. 利用 SOFI 方法提高光片荧光显微镜横向分辨率 [J]. *中国激光*, 2017, 44(6): 0607002.

- [18] Zeng Z, Chen X, Wang H, *et al.* Fast super-resolution imaging with ultra-high labeling density achieved by joint tagging super-resolution optical fluctuation imaging[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8359.
- [19] Gustafsson N, Culley S, Ashdown G, *et al.* Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12471.
- [20] Yahiatene I, Hennig S, Müller M, *et al.* Entropy-based super-resolution imaging (ESI): from disorder to fine detail[J]. *ACS Photonics*, 2015, 2(8): 1049-1056.
- [21] Frantsuzov P, Kuno M, Janko B, *et al.* Universal emission intermittency in quantum dots, nanorods and nanowires[J]. *Nature Physics*, 2008, 4(7): 519-522.
- [22] Brawand N P, Vörös M, Galli G. Surface dangling bonds are a cause of B-type blinking in Si nanoparticles [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(8): 3737-3744.
- [23] Kuno M, Fromm D, Hamann H, *et al.* "On"/"off" fluorescence intermittency of single semiconductor quantum dots [J]. *Journal of Chemical Physics*, 2001, 115(2): 1028-1040.
- [24] Chozinski T J, Gagnon L A, Vaughan J C. Twinkle, twinkle little star: Photoswitchable fluorophores for super-resolution imaging [J]. *FEBS Letters*, 2014, 588(19): 3603-3612.
- [25] Peng D M, Fu Z P, Xu P Y. Fluorescent proteins and super-resolution microscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(3): 0318008.
彭鼎铭, 付志飞, 徐平勇. 荧光蛋白与超分辨显微成像[J]. *光学学报*, 2017, 37(3): 0318008.
- [26] Bentolila L A, Ebenstein Y, Weiss S. Quantum dots for *in vivo* small-animal imaging [J]. *Journal of Nuclear Medicine*, 2009, 50(4): 493-496.
- [27] Hoyer P, Staudt T, Engelhardt J, *et al.* Quantum dot blueing and blinking enables fluorescence nanoscopy[J]. *Nano Letters*, 2010, 11(1): 245-250.
- [28] Ruan G, Winter J O. Alternating-color quantum dot nanocomposites for particle tracking [J]. *Nano Letters*, 2011, 11(3): 941-945.
- [29] Cutler P J, Malik M D, Liu S, *et al.* Multi-color quantum dot tracking using a high-speed hyperspectral line-scanning microscope [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64320.
- [30] Yaghini E, Giuntini F, Eggleston I M, *et al.* Fluorescence lifetime imaging and FRET-induced intracellular redistribution of Tat-conjugated quantum dot nanoparticles through interaction with a phthalocyanine photosensitizer [J]. *Small*, 2013, 10(4): 782-792.
- [31] Geissbuehler S, Bocchio N L, Dellagiacomma C, *et al.* Mapping molecular statistics with balanced super-resolution optical fluctuation imaging (bSOFI) [J]. *Optical Nanoscopy*, 2012, 1(1): 4.
- [32] Cox S, Rosten E, Monypenny J, *et al.* Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(2): 195-200.
- [33] Hu Y S, Nan X, Sengupta P, *et al.* Accelerating 3B single-molecule super-resolution microscopy with cloud computing [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(2): 96-97.
- [34] Xu F, Zhang M, He W, *et al.* Live cell single molecule-guided Bayesian localization super resolution microscopy [J]. *Cell Research*, 2016, 27: 713-716.
- [35] Agarwal K, Machán R. Multiple signal classification algorithm for super-resolution fluorescence microscopy [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 13752.
- [36] Gruber F K, Marengo E A, Devaney A J. Time-reversal imaging with multiple signal classification considering multiple scattering between the targets [J]. *Journal of the Acoustical Society of America*, 2004, 115(6): 3042-3047.
- [37] Keller P J, Stelzer E H. Quantitative *in vivo* imaging of entire embryos with digital scanned laser light sheet fluorescence microscopy [J]. *Current Opinion in Neurobiology*, 2008, 18(6): 624-632.
- [38] Cordes T, Strackharn M, Stahl S W, *et al.* Resolving single-molecule assembled patterns with superresolution blink-microscopy [J]. *Nano Letters*, 2009, 10(2): 645-651.
- [39] Li Q, Wu S, Chou K C. Subdiffraction-limit two-photon fluorescence microscopy for GFP-tagged cell imaging [J]. *Biophysical Journal*, 2009, 97(12): 3224-3228.
- [40] Leung B O, Chou K C. Review of super-resolution fluorescence microscopy for biology [J]. *Applied Spectroscopy*, 2011, 65(9): 967-980.
- [41] Tzeng Y K, Faklaris O, Chang B M, *et al.* Superresolution imaging of albumin-conjugated fluorescent nanodiamonds in cells by stimulated emission depletion [J]. *Angewandte Chemie*, 2011, 50(10): 2262-2265.
- [42] Löschberger A, van de Linde S, Dabauvalle M C, *et al.* Super-resolution imaging visualizes the eightfold symmetry of gp210 proteins around the nuclear pore complex and resolves the central channel with nanometer resolution [J]. *Journal of Cell Science*,

- 2012, 125(3): 570-575.
- [43] Göttfert F, Wurm C A, Mueller V, *et al.* Coaligned dual-channel sted nanoscopy and molecular diffusion analysis at 20 nm resolution[J]. *Biophysical Journal*, 2013, 105(1): L01-L03.
- [44] Maglione M, Sigrist S J. Seeing the forest tree by tree: Super-resolution light microscopy meets the neurosciences [J]. *Nature Neuroscience*, 2013, 16(7): 790-797.
- [45] Szymborska A, de Marco A, Daigle N, *et al.* Nuclear pore scaffold structure analyzed by super-resolution microscopy and particle averaging [J]. *Science*, 2013, 341(6146): 655-658.
- [46] Yamanaka M, Yonemaru Y, Kawano S, *et al.* Saturated excitation microscopy for sub-diffraction-limited imaging of cell clusters [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2013, 18(12): 126002.
- [47] Liu Z, Xing D, Su Q P, *et al.* Super-resolution imaging and tracking of protein-protein interactions in sub-diffraction cellular space [J]. *Nature Communications*, 2015, 5: 4443.
- [48] Zhao Z W, Roy R, Gebhardt J C M, *et al.* Spatial organization of RNA polymerase II inside a mammalian cell nucleus revealed by reflected light-sheet superresolution microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(2): 681-686.
- [49] Zhanghao K, Chen L, Wang M, *et al.* Super-resolution dipole orientation mapping via polarization demodulation[J]. *Light: Science and Applications*, 2016, 5(10): e16166.
- [50] Chen X, Liu Z, Li R, *et al.* Multicolor super-resolution fluorescence microscopy with blue and carmine small photoblinking polymer dots[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(8): 8084-8091.
- [51] Avila J, Pallas N, Bolós M, *et al.* Intracellular and extracellular microtubule associated protein tau as a therapeutic target in Alzheimer disease and other tauopathies [J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2016, 20(6): 653-661.
- [52] Huda M N, Kim D H, Erdene-Ochir E, *et al.* Expression, phosphorylation, localization, and microtubule binding of tau in colorectal cell lines[J]. *Applied Biological Chemistry*, 2016, 59(6): 807-812.
- [53] Zhao Y, Mu X, Du G. Microtubule-stabilizing agents: New drug discovery and cancer therapy[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2016, 162: 134-143.
- [54] Duwé S, Vandenberg W, Dedecker P. Live-cell monochromatic dual-label sub-diffraction microscopy by mt-pcSOFI[J]. *Chemical Communications*, 2017(53): 7242-7245.
- [55] Scholefield J, Henriques R, Savulescu A F, *et al.* Super-resolution microscopy reveals a preformed NEMO lattice structure that is collapsed in incontinentia pigmenti[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12629.
- [56] Hu Y S, Zhu Q, Elkins K, *et al.* Light-sheet Bayesian microscopy enables deep-cell super-resolution imaging of heterochromatin in live human embryonic stem cells[J]. *Optical Nanoscopy*, 2013, 2(1): 7.