

关键生物信号枢纽的细胞原位单分子定位超高分辨率解析

林健, 陈鑫*

厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361102

摘要 细胞内存在大量性质各异的大分子复合物, 它们是控制生命活动的核心信号枢纽。荧光显微成像因其分子特异性、细胞原位可视化和多色标记解析等优势, 已成为当今生物学研究不可或缺的技术手段。而突破光学衍射极限的超分辨光学成像技术为进一步理解多种重要生物百纳米信号体的原位结构和功能调节提供了亚细胞尺度甚至单分子精度的研究思路和方案。首先阐述了超分辨成像和单分子定位显微镜的基本原理, 介绍了近年来在多项生命科学研究中的代表性应用案例, 结合实际研究经验总结了超分辨光学成像技术在使用中面临的诸多挑战和未来发展方向, 提出了基于原位纳米成像解析信号枢纽组织结构将有力促进新型疾病治疗靶点和策略的开发。

关键词 生物光学; 超分辨成像; 单分子定位; 生物信号体; 信号转导

中图分类号 O436; Q2-33

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL231390

1 引言

细胞作为生命活动的基本单元, 在机体的发育、衰老、患病和死亡过程中发挥着关键作用。自 1665 年罗伯特·胡克首次通过显微镜观察到细胞以来, 经过几个世纪的发展, 人们在细胞观测技术和理论认知方面取得了多次重大突破, 将我们对生命活动的解析从细胞水平推进到更深层次的分子水平。细胞内存在大量性质各异的生物大分子(包括蛋白质、核酸和脂质等)复合物, 它们是各项生命活动的核心枢纽, 决定着信号的感知、传递、转变和执行等核心功能^[1-3]。正是通过这种高度可控的信号转导模式, 细胞才能适应环境变化, 维持内部稳态, 并做出恰如其分的生物学响应。因此, 系统研究这些关键信号枢纽的组装结构和调节功能, 有助于我们更加深刻地理解生命的基本运作方式, 并为药物研发和疾病治疗提供指导。

单颗粒冷冻电镜技术(single-particle cryo-EM)是当下解析蛋白质结构的利器, 由于其无需晶体、研究对象广泛、样品用量相对较少和高分辨率等优点, 已成为结构生物学研究中的主要技术^[4]。然而, 冷冻电镜需要将目标蛋白表达纯化或富集后制备样品, 无法准确获取其在细胞原位行使功能状态下的结构信息。同时, 由于不具备分子特异性, 冷冻电镜在解析多组分复

合物时, 难以获取不同分子间的互作信息。另外, 单颗粒冷冻电镜要求样品具有较高的同质性, 因此面对高度异质性的细胞命运关键信号枢纽, 难以获得精确的高质量结构信息^[5]。

面对这些挑战, 超分辨显微技术(SRM)为我们提供了极具吸引力的全新解决思路。荧光显微成像具备分子特异性、可在细胞原位实时解析, 已成为当今生物学研究不可或缺的技术手段^[6]。而 SRM 则通过在样本制备、信号采集和图像处理等维度的创新变革实现对光学分辨极限的突破, 为生命活动的原位解析提供了亚细胞尺度甚至单分子精度的研究方案^[7]。

2 超分辨显微镜

在传统光学成像系统中, 由于光的波动性质, 光学系统无法有效地分辨非常接近的物体和微小细节, 这一限制是由光传播时的衍射现象引起的。瑞利判据为

$$\theta = 1.22 \frac{\lambda}{D}, \quad (1)$$

式中: θ 是衍射角; λ 是光束的波长; D 是光阑直径。式(1)表示波长越短、光束直径越大, 可以分辨的衍射角越小, 对应的成像分辨率越高。即使在所有参数都满足理想条件的情况下, 传统光学成像的平面分辨率仍在 250 nm 左右[图 1(a)]。为了突破荧光显微成像的

收稿日期: 2023-11-13; 修回日期: 2023-12-01; 录用日期: 2023-12-11; 网络首发日期: 2023-12-12

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32370803, 32070736, 31871386)、国家自然科学基金青年项目(31501115)、福建省自然科学基金杰青项目(2023J06003)、厦门大学校长基金(20720210114)、厦门大学拔尖学生贵重实验仪器设备开放创新基金(KFJJ-202206, KFJJ-202316)

通信作者: *xchen@xmu.edu.cn

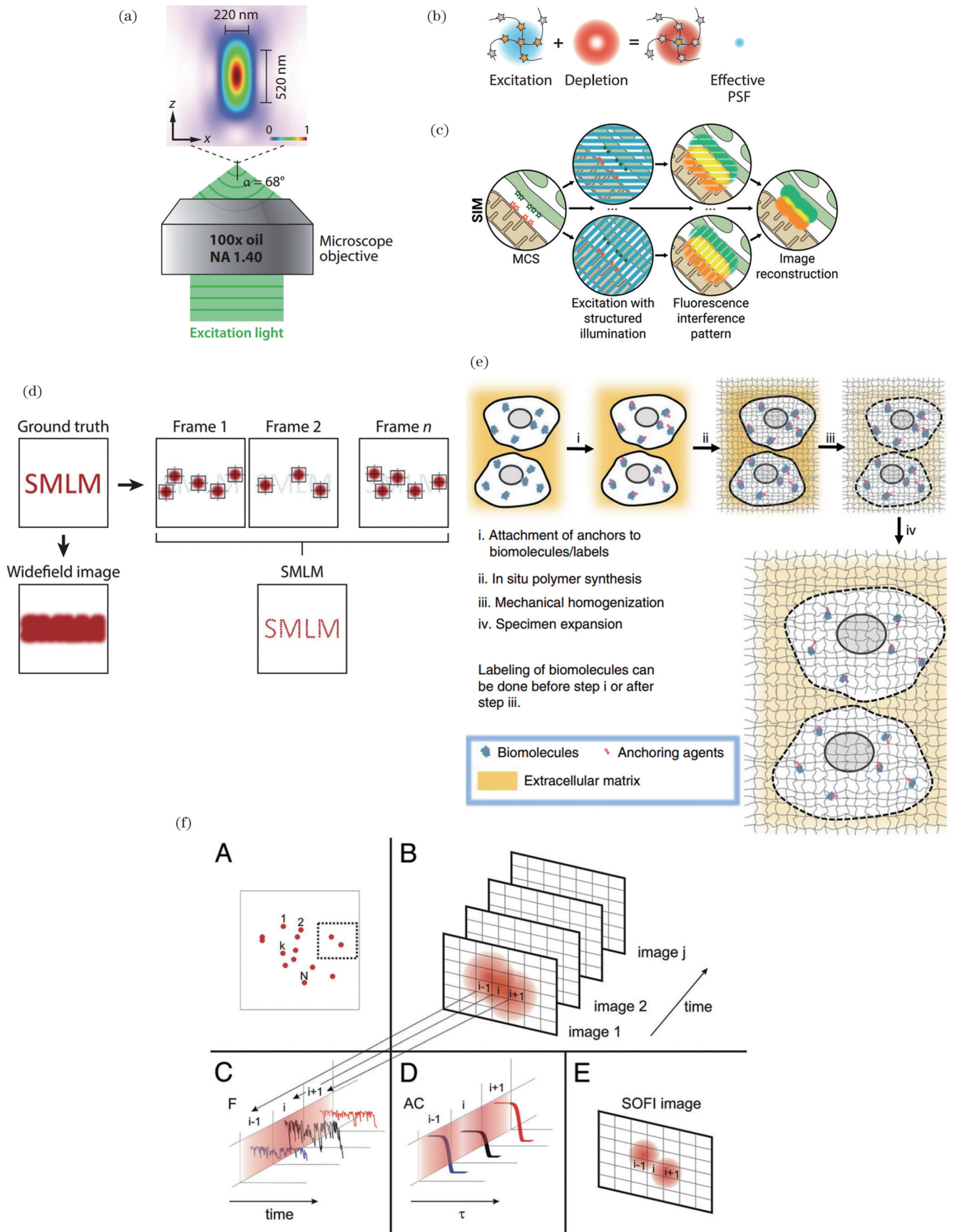


图 1 光学衍射极限和超分辨成像。(a) 光学波动性所造成的点扩散函数^[27]; (b) STED^[28]、(c) SIM^[29]、(d) SMLM^[7]、(e) ExM^[30]和 (f) SOFI^[23]的原理

Fig. 1 Optical diffraction limit and super-resolution imaging. (a) Point spread function due to optical volatility^[27]; principles of (b) STED^[28], (c) SIM^[29], (d) SMLM^[7], (e) ExM^[30], and (f) SOFI^[23]

光学分辨极限,无数科学家付出了长久的努力。最终,以 2014 年的三位诺贝尔化学奖获得者 Eric Betzig、Stefan W. Hell 和 William E. Moerner 为代表的研究团队巧妙地运用多种革新成像方案,成功实现了超高分辨,将光学显微镜的性能提升到前所未有的纳米级别。

超分辨显微镜最早问世于 21 世纪初,彼时主要有受激发射损耗显微镜(STED)和结构光照明显微镜(SIM)两种技术,二者均通过改造点扩散函数(PSF)实现超分辨成像。STED 由 Hell 课题组在 2000 年首次提出,其工作原理为两束激光协同作用:一束激光称为激发光,用来将物镜焦点内的荧光分子带入激发态;另一束光称为损耗光,用于擦除物镜焦点 PSF 的边缘区域,这些区域的荧光分子通过受激辐射损耗发出与耗竭光波长相同的窄带宽信号,从而被滤光片拦截^[8]。因此,物镜只会收集到位于焦点中心的荧光信号,这样就实现了超越衍射极限的高分辨率荧光成像[图 1(b)]。SIM 最早由 Heintzmann 等^[9]和 Gustafsson 等^[10]分别提出,后者在 2005 年进一步提升了该技术的性能^[11]。SIM 的基本原理涉及到莫尔条纹,它是两个具有相近空间频率的周期性光栅图案叠加而形成的光学条纹。带有特定光栅条纹的照明光源(结构化照明)投射到样本上会生成莫尔条纹图形,降低图像的空间频率,使得原本超越物镜分辨能力的精细图像也能容易被光学显微镜捕捉。在拍摄过程中不断变换结构照明的方向和相位,使光栅在不同角度下形成衍射图案,进而得到一系列含莫尔条纹的图像。最后对这些图像进行分析处理,通过算法还原样本的复杂结构,实现超分辨成像[图 1(c)]。另一类超分辨成像技术基于对单个荧光分子的观测,称为单分子定位成像技术[SMLM,图 1(d)]。Moerner 课题组于 1997 年和钱永健合作发现了绿色荧光蛋白(GFP)的光转化效应,为 SMLM 的诞生奠定了重要的前期基础^[12]。而 Betzig^[13]在 1995 年首次提出了通过计算点扩散函数的方式来实现单分子成像的构想,并于 2006 年借助光激活定位显微镜(PALM)成功实现了突破光学分辨极限的荧光蛋白超高分辨成像^[14]。这两位科学家通过各自独立的研究,为单分子显微镜技术的发展奠定了理论和实验基础。因此,他们在 2014 年与 Stefan W. Hell 共同获得了诺贝尔化学奖。值得一提的是,华人科学家庄小威于 2006 年设计了随机光学重构显微镜(STORM),该技术与 PALM 的原理相似,但将荧光分子从荧光蛋白换成了有机荧光染料,也取得了出色的成像效果^[15]。与此同时,Sharonov 等^[16]基于不同的闪烁机理,依靠荧光分子与底物的可逆结合开发出 PAINT (point accumulation for imaging in nanoscale topography) 技术。2010 年,Junemann 等^[17]进一步发展了一种基于寡核苷酸链互补结合的 DNA-PAINT 技术。此外,Hell 课题组将 SMLM 和 STED 的优势结合,于 2017 年提

出了最低光子数显微成像技术(MINIFLUX),达到了 1 nm 定位精度和 6 nm 分辨率^[18]。通过后续升级,该技术只需几十个光子就可以实现纳米精度的单荧光团跟踪^[19],并且能够监测活细胞中的蛋白运动轨迹^[20]。

上述方法主要通过改进光学成像技术来提高分辨率,但这并不是突破光学分辨极限的唯一方法。膨胀显微镜(ExM)将样品嵌入可膨胀的水凝胶,使样品各向同性膨胀,从而增加了分子间的物理距离,等效提高了成像分辨率[图 1(e)]。在最早的技术方案中,样品在所有方向上膨胀 4.5 倍,从而实现了约 70 nm 的分辨率^[21]。2023 年,Klimas 等^[22]提出了 Magnify 技术,利用新的水凝胶配方将生物样本膨胀 11 倍,实现了最高 15 nm 的分辨率。新的水凝胶相比传统水凝胶更加坚固,并且可以保持蛋白质和其他生物分子的完整性,因此 Magnify 可以检测同一样本中的蛋白质、脂类、碳水化合物和核酸等多种类型的生物分子。除了在样品处理上进行优化外,多种图像处理算法同样是突破衍射极限的重要手段之一。Dertinger 等^[23]在 2009 年提出的超分辨率光学波动成像(SOFI)通过对一系列图像中由荧光的闪烁或间歇性发光引起的时间波动进行高阶统计分析实现了分辨率的提升[图 1(f)]。2016 年,Gustafsson 等^[24]开发的超分辨率径向波动(SRRF)算法同时适用于宽场荧光和 SMLM 图像,可以在极短时间内获得 60~120 nm 的分辨率图像。计算超分辨的可靠性非常重要,在无标准样品参考的情况下难以直接评估图像的重建质量,因此迫切需要通过其他公认的方法或标准来评价其结果的真实性。傅里叶环相关(FRC)是一种常用的荧光显微图像分辨率测量方法^[25]。李浩宇和陈良怡团队将滚动傅里叶环相关(rFRC)与改进的分辨率比例误差图(RSM)相结合,使用 rFRC 计算了重建图像和原始图像之间的相似度,联合 RSM 确定了重建图像的相对大小,从而得到了全面、可靠的定量映射,在无需先验知识的情况下定量评估了图像重建过程中的数据误差^[26]。

3 单分子定位超分辨显微镜

由于衍射效应,点光源在经过光学成像系统后会信号接收端形成一个呈 PSF 分布的模糊光斑,我们称之为艾里斑(Airy disk)。当多个光斑的空间位置相对独立且不发生重叠时,便可基于 PSF 的大小和形状对其进行拟合,从而确定其高精度的定位坐标[图 2(a)]。高斯拟合也称最小二乘(LS)法,是目前应用最广泛的定位方法,由 Thompson 等^[31]在 2002 年提出:

$$\sigma = \sqrt{\frac{s^2 + a^2/12}{N} + \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2}}, \quad (2)$$

式中: σ 为定位精度; s 为衍射受限系统 PSF 的标准差; a 为探测器的像素尺寸; N 为单个荧光分子发射的光子数; b 为背景噪声。由式(2)可知,SMLM 的空间分辨

率与检测到的光子数呈正相关。另一常用的定位方法是最大似然估计(MLE)^[32],基于荧光分子在 CCD 靶面上的分布信息,利用已知模型推断出荧光分子的准确位置。学者们在后续还发展出了压缩感知^[33]、DAOSTORM^[34]和 3B 算法^[35]等用于处理高密度定位数据。SMLM 的原理是采集数万帧较为稀疏的定位点,再通过单分子定位算法拟合出精准定位坐标,最后将所有帧中的定位点整合生成最终的超分辨图像。SMLM 在目前诸多主流超分辨成像方法中拥有最高的空间分辨率(平面 20 nm/轴向 50 nm),结合定量单分子分析算法,能够在纳米尺度更好地呈现生命活动关键信号枢纽的组装特性以及调节机制。根据荧光分子不同的稀疏闪烁方式,SMLM 主要分为 PALM、STORM 和 PAINT/DNA-PAINT 三类。

3.1 PALM

PALM 采用遗传编码的、可光控的荧光蛋白来实现单分子定位^[36-37]。这些荧光蛋白主要分为光激活蛋白、光转换蛋白和光开关蛋白三类:光激活蛋白指用一定波长的光照射使其从暗态不可逆地转为发射态^[38];光转换蛋白指用一定波长的光照射使其吸收/发射光谱不可逆地发生改变(一般是从短波区位移到长波区)^[39];光开关蛋白指使用两种不同波长的光照射使其在发射态和暗态间发生可逆的转换^[40][图 2(b)]。在图像采集过程中,光激活蛋白和光转换蛋白的工作原理类似,均是利用低功率激光照射使视野中稀疏分布的少量荧光分子发生激活/转化,进一步使其发射和漂白,随后进入下一次循环;光开关蛋白则是利用两束激光交替照射使荧光蛋白闪烁,直至收集到足量的信号。

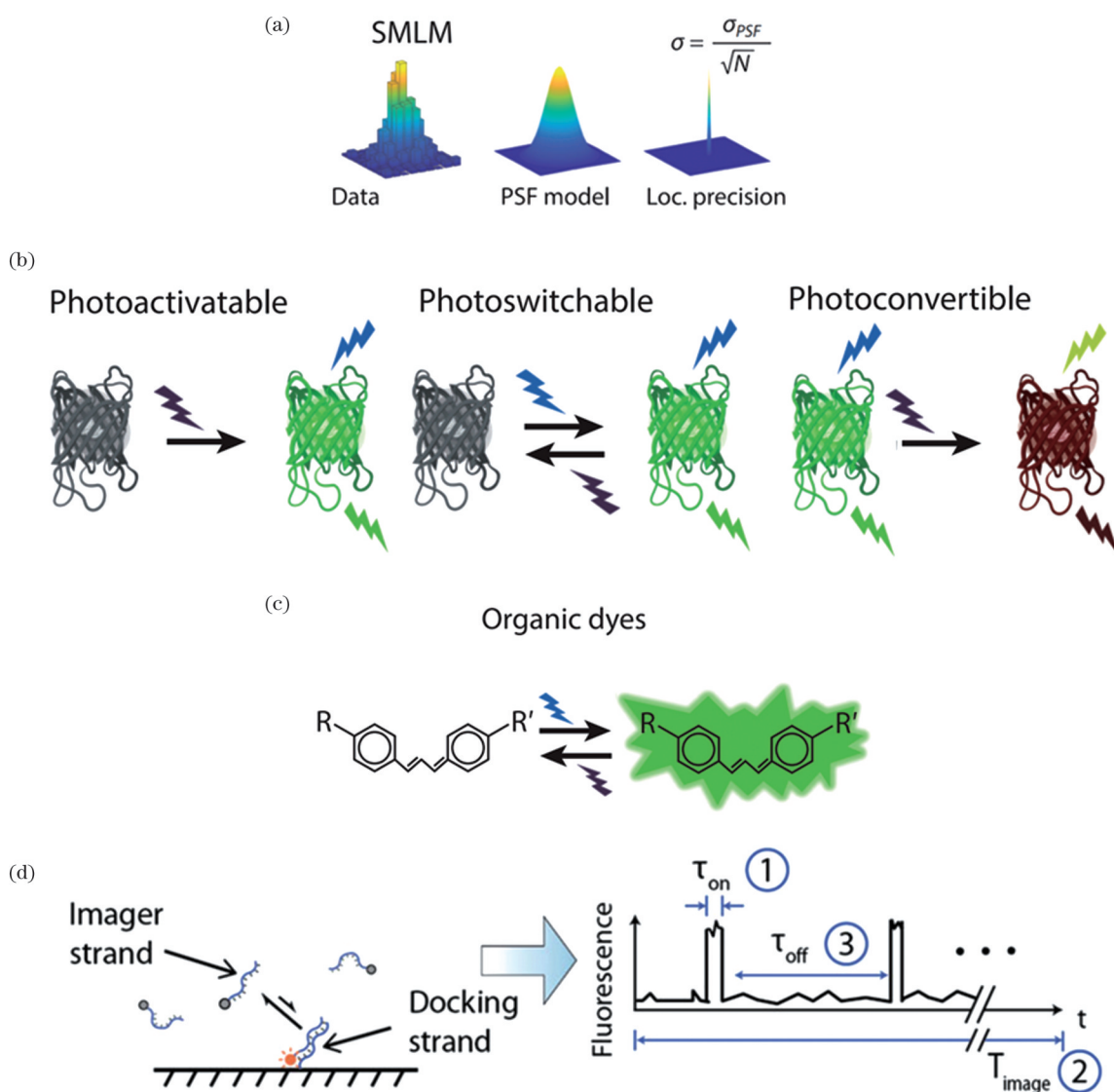


图 2 单分子定位显微镜原理。(a)基于 PSF 模型拟合光斑的空间坐标^[28];(b)光激活蛋白、光转化蛋白和光开关蛋白的成像原理^[7];(c)光开关染料的成像原理^[7];(d)DNA-PAINT 的成像原理^[45]
 Fig. 2 Principles of single-molecule localization microscope. (a) Fitting spatial coordinate of light spot based on PSF model^[28];(b) imaging principles of photoactivatable proteins, photoconvertible proteins, and photoswitchable proteins^[7];(c) imaging principle of photoswitchable dyes^[7];(d) imaging principle of DNA-PAINT^[45]

PALM正是通过对这些光物理过程的精确控制,避免了信号拥挤、信噪比低和拟合不佳等问题,确保了单分子检测和定位的精确性。

3.2 STORM

STORM使用具有光开关性质的有机染料(Cy5、AF647、罗丹明等)。通常在特定的氧化还原缓冲体系下,这些染料经高功率激光照射可以在发射态和暗态间相互切换,从而达到交替闪烁的效果[图2(c)]。与PALM使用荧光蛋白定位的原理相比,STORM采用免疫荧光染色方法来标记目标蛋白,更适用于观察和分析内源表达目标。然而,免疫抗体的分子量较大,无法自由穿越细胞膜,因此需要采用固定和透膜的方式来制备样品。而不同的固定方法可能会对样品的原始结构产生不同程度的影响。

3.3 PAINT和DNA-PAINT

PAINT技术最初依靠溶液中自由扩散的荧光分子基于亲疏水性或静电力与特定细胞结构的随机碰撞,通过采集这些荧光探针处于特定环境时发出的单分子荧光信号来实现超分辨成像^[16]。该技术不需要特殊的成像环境,但可标记目标较为局限。DNA-PAINT则利用单链DNA偶联的抗体(称为对接链)标记目的蛋白,在成像过程中引入荧光标记的另一条互补单链DNA(称为成像链),其与对接链可逆结合。由于分子扩散效应,成像链在样品焦面以外表现为“背景雾”,检测器无法捕捉其有效荧光信号;当成像链与对接链结合并短暂停留时会产生明亮的信号点,检测器可以捕捉并记录该闪烁信号[图2(d)]。这种可逆结合的方法不依赖荧光分子本身的闪烁动力学特性,因此在成像链数量充足的前提下,记录的定位点数量主要受溶液中对接链数量的限制。近年来,Jungmann团队根据PAINT的技术特性进一步开发出具有定量能力的Exchange-PAINT^[41]和qPAINT^[42]成像技术。然而,在成像过程中,游离的对接链会引入较强的背景荧光,因此通常需要较长的曝光时间和全内反射照明(TIRF)来提高信噪比。此外,DNA的结合与解离速率也是影响成像速度的重要因素。在相同帧数下,传统DNA-PAINT的成像速度通常是STORM的1/10~1/15。不过,2020年Strauss等^[43]通过优化DNA互补配对序列以及缓冲体系等显著提升了DNA-PAINT的成像速率和效果。该团队于2023年进一步开发了顺序成像(RESI)^[44],利用随机标签方法使距离相近的分子结合不同的对接标签,并根据标签分批次采集信号,从而避免了相邻目标互相干扰的问题。这一技术使用现有的荧光显微镜硬件和试剂将DNA-PAINT的分辨率提高到了埃级尺度。

4 单分子定位超分辨成像解析关键信号枢纽的研究案例

单分子定位超高分辨显微成像技术能够提供目前

最好的空间成像分辨能力,非常适合解析细胞内百纳米尺度关键信号枢纽的组装结构和功能机制。随着该技术的持续发展,近年来国内外多个研究团队在特定生命科学问题研究中展现了其无可替代的应用价值。

4.1 坏死小体(necrosome)决定细胞死亡的规律

细胞的死亡与细胞的产生具有同等重要的地位,多细胞个体中的细胞死亡往往能够通过免疫互作等形式对整个机体系统产生深远的影响。细胞死亡根据其发生机制分为两种模式:程序性细胞死亡(PCD)和非程序性细胞死亡。PCD包括凋亡、焦亡和程序性坏死等多种类型,每一种都涉及复杂的分子机制和细胞改变。在20世纪末,细胞凋亡一直是PCD的研究重点,因为人们普遍认为它是受到细胞严格调控的,而细胞坏死则被视为不可调控的被动死亡。然而,随着基础研究的深入,学者们逐渐认识到细胞坏死也可以受到细胞信号的严格控制。2009年,韩家淮、王晓东和陈家明三个独立研究团队分别鉴定出受体相互作用蛋白3(RIP3)是调控细胞程序性坏死的关键蛋白^[46-48]。随后,王晓东和刘正刚课题组在2012年独立发现了RIP3的特异性底物混合谱系激酶结构域样蛋白(MLKL)在程序性坏死通路中起着不可或缺的作用^[49-50]。2014年,韩家淮、王晓东和刘正刚课题组进一步分别独立指出MLKL作为执行者通过破坏细胞膜引发细胞死亡^[51-53]。上述标志性工作正式定义了RIP1-RIP3-MLKL信号轴引发的细胞程序性坏死,推动了持续至今的关于该重要细胞死亡方式的深入研究和转化应用。细胞发生程序性坏死时,RIP1与RIP3相互作用形成的necrosome作为核心功能枢纽精细调控细胞死亡的类型和强度。因此,从蛋白质结构的角度解析necrosome的功能执行方式具有重要意义。施一公团队于2013年使用X-ray解析出RIP1的晶体结构并揭示了Necrostatin-1(Nec-1)抑制RIP1激酶活性的空间构象^[54]。同年,他们进一步报道了RIP3激酶结构域、MLKL激酶样结构域以及它们相互作用形成的二元复合体的晶体结构^[55]。对于RIP1/RIP3复合体结构,吴皓团队于2012年发现,在细胞程序性坏死过程中,RIP1/RIP3复合物通过形成功能性淀粉样纤维(amyloid fibers)转导并放大死亡信号^[56]。6年后,该组与McDermott团队利用固态核磁共振和X-ray确定了RIP1和RIP3通过RHIM结构域相互作用而形成的三维高分辨异质淀粉样蛋白结构^[57]。然而,考虑到上述结构解析依赖体外纯化蛋白,程序性坏死细胞内necrosome的组织结构及其决定细胞死亡功能的分子机制仍不清楚。

直到2022年,Chen等^[58]通过优化样品制备标记以及图像处理分析等STORM关键环节,首次在细胞原位以极高的空间分辨率直接回答了上述悬而未决的重要问题。他们发现在受TSZ[由肿瘤坏死因子(TNF)、线粒体促凋亡蛋白模拟物(Smac mimetic)和

泛半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶抑制剂(zVAD-fmk)组成的细胞程序性坏死诱导剂]刺激发生程序性坏死的细胞中,necrosome由初始点团样结构逐渐组装为规则的棒状结构(直径约为50 nm,长度为200~600 nm),并且在这一规则棒状结构中呈现出由RIP1/RIP3组成的马赛克状分布[mosaic necrosomes,图3(a)上]。更进一步的分子机制研究揭示了只有马赛克分布中的RIP3区域满足一定的尺度要求(如四聚体及以上),才能有效诱导下游效应分子MLKL发生多聚,从而靶向细胞膜导致细胞死亡发生,提示该规则结构中存在纳米尺度的功能启动热点。通过使用Nec-1抑制RIP1的激酶活性可以阻碍necrosome的有序马赛克样棒状结构的产生,抑制细胞死亡[图3(a)下]。此外,RIP3激酶活性丧失导致的细胞死亡模式转变也依赖于该结构中RIP1的多聚化程度,提示necrosome的马赛克样组织结构可能是细胞内控制死亡方式的信号选择模块(signaling divarication)。这项研究在细胞原位揭示了关键信号枢纽纳米尺度上的组织特性及其对信号传递/放大/转换的贡献,为未来研究特异性干预细胞程序性死亡提供了新的见解。

4.2 染色质环状结构的产生机制

理解生命的关键之一是研究基因组如何在细胞核内折叠以及三维基因组如何应对不同刺激调控基因活性^[59]。尽管已经确认基因组结构可以影响基因转录,但人们对控制机制知之甚少。近年来,染色体构象捕获方法(如3C、Hi-C和ChIA-PET等)可以检测基因组区域的物理接近,揭示了从染色质区室到拓扑相关域(TADs)和染色质环状结构等多基因组尺度上的顺式(同一染色体上)和反式(不同染色体之间)接触^[60-63]。染色质的环状结构和拓扑相关域(TAD)边界富集了CCCTC结合因子(CTCF)和凝聚素(cohesin)复合物,其中环状结构被认为是通过介导基因调控元件之间的直接接触来控制基因表达的关键结构^[64],但它的结构产生机制仍不清楚。有学者提出,转录机制通过核糖核酸(RNA)聚合酶II(RNAP II)的运动,以物理方式推动黏合蛋白沿DNA运行,从而直接驱动环路挤出^[65]。但该说法存在速度不匹配问题,RNA聚合酶II的催化速度估计为90 base pair/s,而环状结构形成的速度估计为374~850 base pair/s^[66]。

而最新的环状结构形成模型认为,它们是通过凝聚素将染色质纤维困住并逐步将DNA外推而形成的^[67],但是缺乏足够的实验证据支持该理论。Maria Pia Cosma团队于2021年利用STORM和DNA-PAINT技术对环状结构纳米级别的组织方式进行了可视化研究,并在体内水平展示了由转录活动产生的超螺旋结构调控环状结构的形成^[68]。研究人员通过SMLM观察到,在完整细胞核内,这些环状结构的形成依赖于DNA突出的凝聚素复合物支架。RNA聚合酶II位于这些环状结构的顶部,并与凝聚素物理分离

[图3(b)]。增加凝聚素在染色体上的装载会导致核膜边缘的层黏蛋白(lamin)破裂,随后染色质进一步混并在细胞核内均匀分布。通过转录或拓扑异构酶抑制来改变超螺旋结构会增加染色质凝聚,破坏环状结构生成,并导致染色质上的内聚蛋白分布和迁移性的改变。这一工作利用SMLM探究了转录在基因组组织和环状结构形成中可能的关键作用,并提出依赖于转录的负超螺旋是驱动凝聚素在体内外推动环状结构产生的主要因素的新理论/见解。

4.3 Bax/Bak的互作介导的线粒体破膜机制

细胞凋亡是人们最早发现的PCD形式,根据信号传导机制主要分为内源性途径和外源性途径。其中,外源性凋亡途径和细胞程序性坏死相似,与TNF介导的RIP1激活和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-8(Caspase-8)剪切相关;而内源性途径由细胞内应激反应产生,如DNA损伤等。内源性凋亡也称线粒体凋亡,由Bcl-2蛋白家族成员在接收到细胞内凋亡信号后激活,其中Bax、Bad、Bak、Bik等蛋白进一步使线粒体的通透性发生改变,进而消除线粒体膜电位并释放细胞色素C(Cyto C)和其他凋亡因子。Cyto C会与胞质中的凋亡酶激活因子-1(Apaf-1)和Caspase-9结合形成多聚复合物,也称凋亡体(apoptosome)^[69]。最后,Caspase-9在apoptosome上剪切活化并介导下游Caspase家族级联反应,执行细胞凋亡程序。

研究表明,Bax是细胞凋亡的关键调节分子。在细胞应激条件下,Bax在线粒体上发生寡聚并改变线粒体外膜(MOM)的通透性,故Cyto C释放是细胞凋亡的关键环节,但具体分子机制未明。2016年,Ana J. Garcia-Saez与Jonas Ries合作从单分子定位超分辨率成像角度解析了细胞凋亡过程中Bax对线粒体的作用方式^[70]。他们发现凋亡信号激活后,Bax聚集在线粒体外膜上并形成线、弧、环、点状和非规则聚集等不同类型结构[图3(c)]。随后他们通过原子力显微镜观察线粒体的双层脂膜,发现环形和弧形组装形式的Bax能够有效穿透线粒体膜,进而形成凋亡所必需的功能性孔洞。2022年,该团队进一步发现Bax和Bak通过分子互作的方式进行动态组装,共同调控线粒体凋亡孔的形成^[71]。具体来说,Bax和Bak在凋亡进程中呈现出不同的寡聚特性,Bax比Bak更快地组装成更小的结构,随后招募并加速Bax组装成寡聚体,Bak在细胞凋亡过程中持续增长。Bax和Bak分子间的动态平衡决定了凋亡孔的生长速度以及线粒体内容物Cyto C、线粒体DNA(mtDNA)和Smac等重要物质的动态释放。此外,这一生物学事件还会通过调控cGAS/STING信号通路影响凋亡过程中的炎症信号传导。通过单分子定位显微镜,Ana J. Garcia-Saez对细胞凋亡的起始过程进行了可视化定量研究,报道了Bax和Bak通过相互作用控制线粒体内容物的释放动态从而调节凋亡进程和细胞炎症这一新现象。

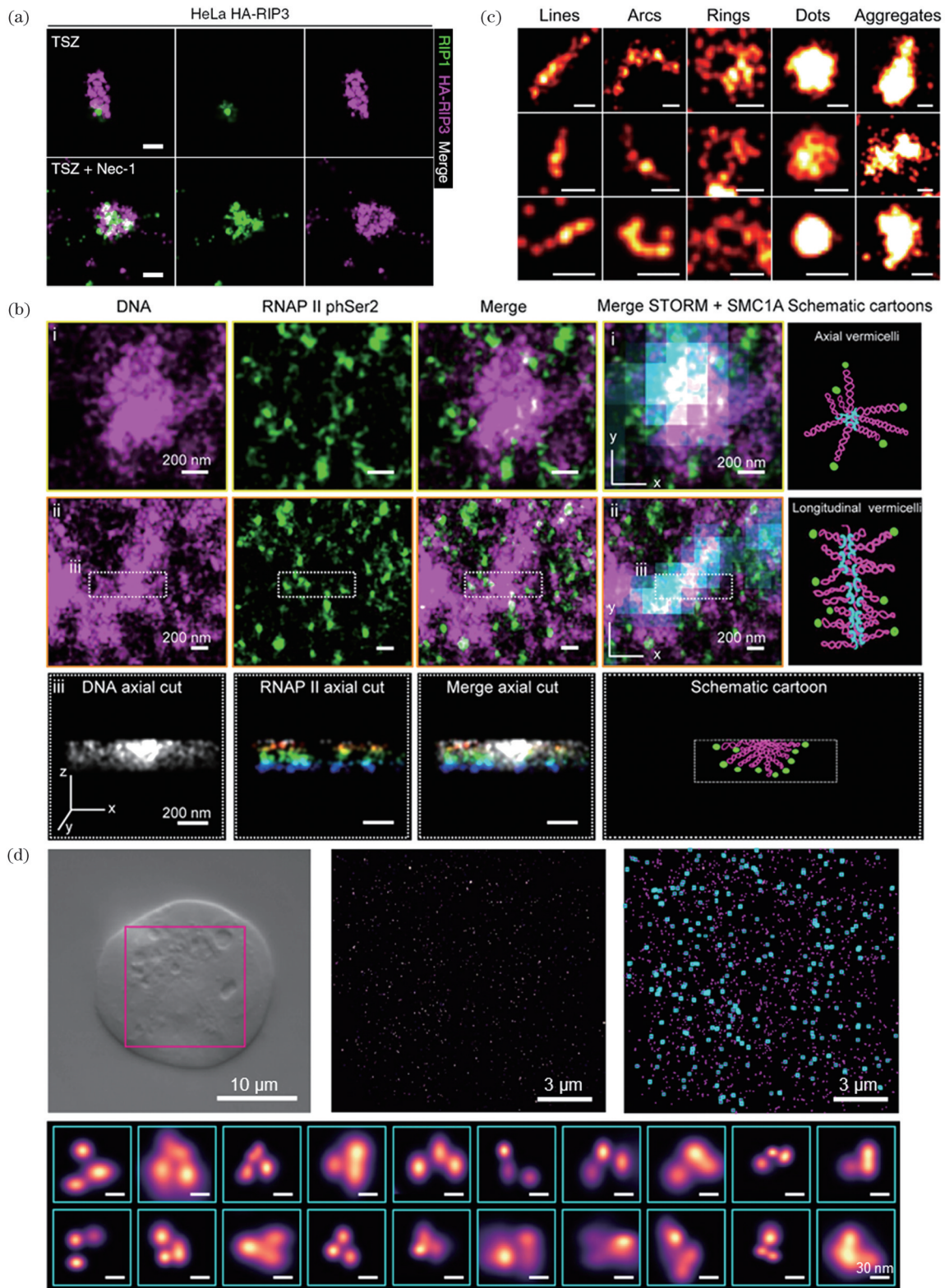


图 3 SMLM 的代表性生物研究应用案例。(a)以 RIP1 和 RIP3 为主体的 necrosome 呈马赛克样棒状分布(TSZ 处理,上),使用 Nec-1 抑制 RIP1 激酶活性以阻止 necrosome 的有序棒状组装(TSZ+Nec-1 处理,下),标尺为 100 nm^[58]; (b)染色质环状结构中 DNA、凝聚素和 RNA 聚合酶的分布模式^[68]; (c)Bax 在线粒体外膜上聚集成线、弧、环、点状和非规则结构,标尺为 100 nm^[71]; (d)细胞中单个 PIEZO1 分子叶片的构象^[81]

Fig. 3 Representative applications of SMLM in biological research. (a) Mosaic necrosome rods dominated by RIP1 and RIP3 (TSZ, top), which are disrupted upon RIP1 kinase inhibition (TSZ+Nec-1, bottom), with scale bar of 100 nm^[58]; (b) distribution patterns of DNA, cohesin, and RNA polymerase in chromatin loops^[68]; (c) distinct Bax structures (lines, arcs, rings, dots, and aggregates) on outer membrane of mitochondria with scale bar of 100 nm^[71]; (d) conformation of individual PIEZO1 molecular blades in cells^[81]

4.4 PIEZO1 在自然环境中的刺激响应机制

感知和传递来自环境的机械信息对于不同生命体的各种生理过程都至关重要。机械传导通道通过调控离子传导孔的开合对细胞膜的扰动作出反应,从而启动细胞信号传导。2021年,Ardem Patapoutian因发现触觉相关感受器(PIEZO1),与温度感受器发现者 David Julius 共同获得诺贝尔生理学或医学奖。其中,PIEZO1是真核生物中机械敏感的氧离子通道,可以将力学信号转化为电信号,在触觉^[72]、血压控制^[73]、机械瘙痒^[74]等各种生理病理过程中发挥重要作用^[75,76]。

对于这一关键分子,体外 cryo-EM 研究表明,PIEZO1会形成大型同源三聚体结构(直径为 24 nm,深度为 9 nm,投影面积为 450 nm²),其单体呈叶片构象^[77-79]。Cryo-EM 的解析结果缺少远端约三分之一的叶片,因此研究人员通过使用其同源蛋白 PIEZO2 进行同源建模预测^[80]和 AlphaFold II 蛋白质三维结构预测的方法补充了这一缺失区域。PIEZO1 通过其跨膜域孔状结构将信号传导至叶片结构,叶片结构通过形变来传递机械力。然而,这些通道如何与其原生环境相互作用及其分子传导机制仍不明确。

2023年,Ardem Patapoutian 课题组为进一步研究复杂细胞环境中 PIEZO1 的功能机制,利用 iPALM 和 MINIFLUX 技术直接观察了细胞中单个 PIEZO1 分子叶片的构象动态^[81][图 3(d)]。研究团队发现,与之前的结构模型相比,静止状态下 PIEZO1 叶片会在质膜施加的弯曲应力作用下显著膨胀,膨胀程度随着叶片向外延伸而显著增加。叶片远端因其子结构域之间的结合强度降低而具有更高的灵动性。功能验证实验显示:PIEZO1 通道活性的抑制剂 GsMTx-4 会使其叶片收缩;而渗透膨胀引发的质膜扩张或小分子激动剂(Yoda1)则可以直接激活 PIEZO1 通道,表现为叶片舒展。Ardem Patapoutian 的研究成果揭示了感觉离子通道 PIEZO1 如何通过改变形状响应机械刺激,以及细胞环境如何塑造 PIEZO1 的结构。这些结构数据为理解 PIEZO1 如何在天然环境中被激活和抑制提供了决定性直观信息。该工作表明,在单分子定位超分辨成像策略下已经可以直接观察到单个膜蛋白分子的构象变化。未来,提高有效标记效率(ELE)、集成纳米光学成像技术和优化更先进的计算方法将会使复杂蛋白质原生状态结构的解析能力提升到更高的维度。

5 面临的挑战和未来发展方向

SMLM 技术的发展使得我们在亚细胞器观测、膜蛋白组织分布、基因组可视化和枢纽蛋白复合体功能解析等研究方向上获得了前所未有的精准可视化信息。然而,SMLM 仍存在技术瓶颈,阻碍了其在生命医学研究领域中的深度应用。虽然 SMLM 在静态成像时具有极高的光学成像空间分辨率,但往往以牺牲时间分辨率为代价,因此 SMLM 技术较难兼具极限分

辨率和研究高通量。同时,成像视野和样品厚度也是限制因素,较难在大视场或组织成像中获得很好的信号质量。近年来,学者们在活细胞 SMLM、组织 SMLM、成像视场扩大和高通量 SMLM 等方面取得了一定进展,为该技术在生命医学中更广泛的应用奠定了良好基础。为了获得高质量的 SMLM 成像效果,在实际使用过程中需要把控好若干关键成像环节,具体如下。

5.1 SMLM 的潜在假象

SMLM 具备强大的原位结构光学解析能力,但其成像结果会受到多种潜在假象的影响[图 4(a)]。这些假象可以分为两类:一类源自通用的免疫荧光(IF)实验,包括样品前处理、抗体选择和荧光标记等;另一类则是 SMLM 特有的问题,涉及图像采集和数据处理等方面。在实验过程中,必须特别留意这些问题。

关于细胞样品的 IF 实验,通常包括固定、透膜、封闭、抗体和染料标记等操作,以上各步骤均需要根据样品类型进行优化。通常,选择固定剂时需要在保留样本原始结构和维持样本标记能力之间把握平衡。使用冰甲醇固定方法可以有效保留细胞骨架的完整性,但可能会破坏膜相关结构;采用甲醛和戊二醛混合物固定可以保留细胞骨架和亚细胞器的完整性,但可能会降低抗原识别效率;只用甲醛固定对抗原识别最有利,但可能会使细胞骨架被解聚。对于透膜步骤,需要谨慎选择去垢剂,以避免在该阶段破坏亚细胞器的膜结构。Triton X-100 是较为常见的选择,但对于需要温和透膜条件的样本,可以使用洋地黄皂苷(digitonin)或皂苷(saponin)等替代品。IF 实验对封闭过程的要求较高,通常使用牛血清白蛋白(BSA)配置封闭液。选择 BSA 时,须根据实际使用效果进行比对,以确保在不引入背景信号干扰的情况下获得最佳的蛋白结构。当目标分子结构被完整保留且抗原表位充分暴露时,抗体便可以渗透到样本中并结合目的蛋白。选择一抗时,要进行严格的质控实验^[82-83]。通常包括:1) 使用目标抗原基因敲除的细胞验证抗体特异性;2) 使用相同结构蛋白抗体共染验证其定位准确性;3) 对于蛋白修饰类抗体(如磷酸化、乙酰化、甲基化等),可使用对应的修饰抑制剂或识别位点突变验证。此外,还需要特别注意不同批次之间的抗体可能存在的差异以及二抗之间的串扰问题。更换抗体批次后,必须重新进行质控实验。当使用不同的二抗标记相近物种(如大鼠和小鼠)的一抗时,需要确认所选用的二抗是否已经进行了相似物种的交叉吸附,以排除串扰的可能性。

SMLM 通过在每一帧中采集多个光斑并对其进行分析,以获取高精度的定位数据。然而,如果其中两个或多个光斑的定位出现在彼此的衍射区域内,则会在后续的计算拟合过程中被错误地判定为一个定位点。同时,一个可“闪烁”的荧光分子在被永久漂白之前可以在发射态和暗态之间多次切换,致使同一荧光

分子被多次采集,产生所谓的“重复定位”。这些重复发射的荧光信号经常被错误地视为来自多个不同的分子,从而导致虚假团簇的形成和分子定量的误差。使用 SMAP (super-resolution microscopy analysis platform) 软件^[84],通过优化拟合算法可以减少错误定位的发生。而整合相近时间内出现在同一位置的定位信号,能够消除荧光分子的闪烁效应引起的重复发射。此外,该软件还允许用户根据定位精度、PSF、Loglikelihood 等参数筛选定位信号,从而进一步提高定位质量,获得更精确的成像数据。

5.2 样品标记

SMLM 图像的质量在很大程度上取决于样品的标记,高效而精确的标记是获取目标蛋白质真实结构的先决条件。在确定了最佳样品处理条件和合适的抗体后,可以通过调整一抗的稀释比例和孵育时间来提高样品的标记效率。对于亚细胞标记,可以考虑使用来自不同宿主的两个或多个一抗同时孵育,以揭示其完整的结构^[85]。Jonas Ries 课题组提出了一种使用核孔复合物(NPC)量化绝对标记效率的方法^[86]。NPC 由 30 余种蛋白质组成,可以选择性地允许大分子通过。核孔复合物组成蛋白之一的 Nup96 在每个 NPC 中存在 32 个拷贝,形成两个核质环。每个环具有 8 个角,每个角包含两个 Nup96 蛋白,间隔 12 nm。两个环上下对齐,从而清晰地呈现出八重对称结构[图 4(b)]。将 Nup96 基因敲入细胞系可以直接测量 ELE。当 ELE 较低时,Nup96 表现为缺角的不完整环。因此,可以通过统计分析许多 Nup96 的缺角数量来得出绝对 ELE。使用 SMAP 软件可以在数百个 Nup96 中自动识别被完整标记的角,从而量化样本的 ELE。

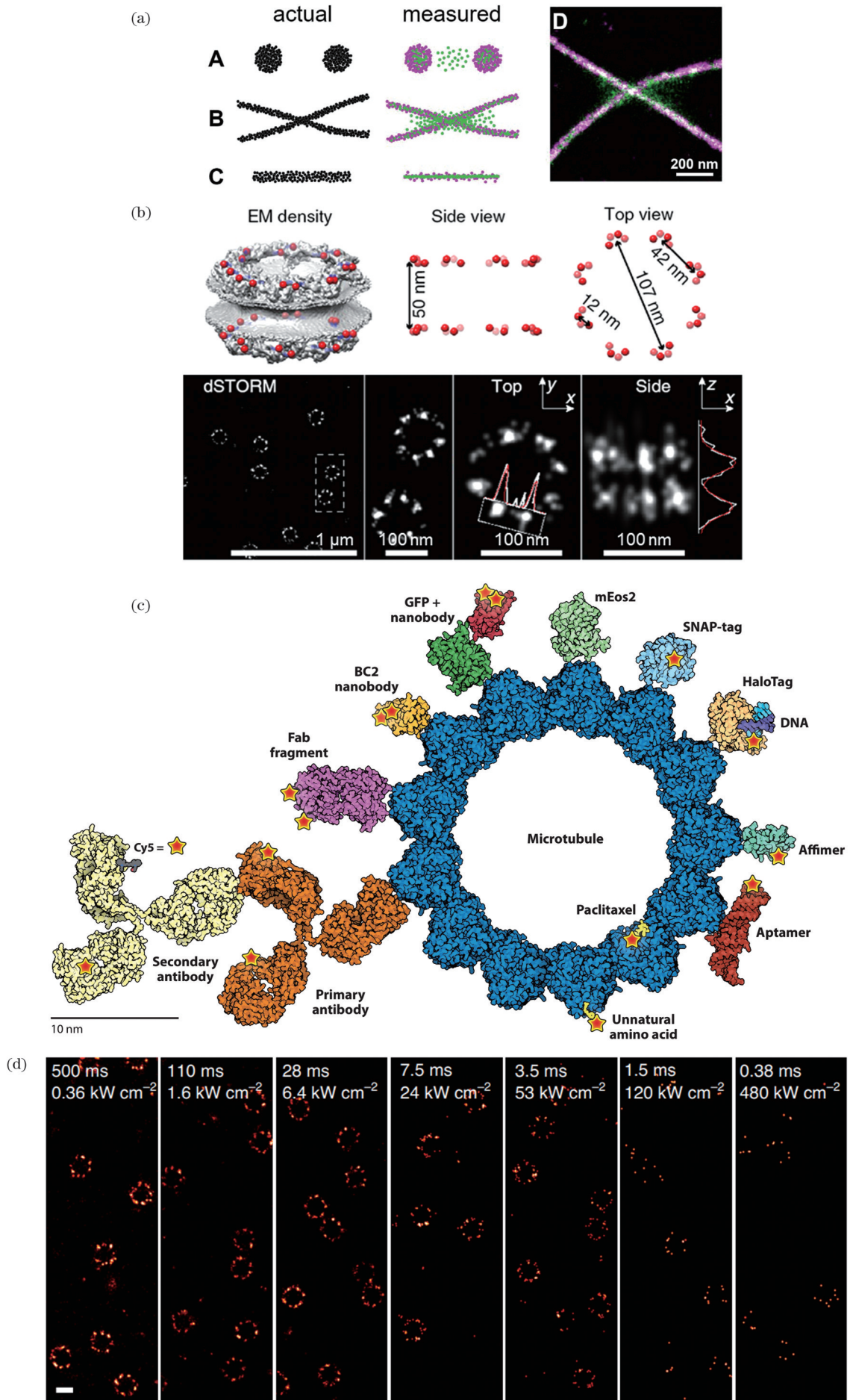
由于 SMLM 技术的标记效率不断提高,缩小标记物的尺寸能进一步提高图像分辨率,并且更准确地反映目标蛋白的真实大小和结构[图 4(c)]。传统的一抗、二抗标记法会使荧光基团相对目标蛋白产生约 20 nm 的位移,即使使用荧光染料直接标记的一抗仍会造成 13 nm 的连接误差^[87]。为了进一步减小标记误差,可以采用荧光蛋白或标签蛋白与目的蛋白融合表达。具体而言,使用光转换蛋白(mEOS3.2^[39]和 mMaple^[88])或自我标记蛋白(SLPs)如 SNAP^[89]、Halo^[90]和 CLIP^[91]可将误差降低至 2~3 nm。还有其他可选方案,诸如使用直径为 2 nm 的纳米抗体直接标记目标蛋白^[92]、GFP 融合蛋白^[93]或短肽标签(BC-2、spot^[94]和 ALAF^[95]),以及使用 Fab 片段直接结合目的蛋白等^[92]。近年来,非抗体分子标记在 SMLM 领域中已经有了一系列广泛的应用,包括核酸适体^[96]和亲和素多肽^[97]等。另外,一些天然产物具备直接标记细胞结构的潜力,如使用紫杉醇标记微管蛋白^[98]、鬼笔环肽标记肌动蛋白^[99]。还有一种方法是在蛋白表达中引入非天然氨基酸,并通过点击化学的方法将它们直接连接到荧光标记团上^[100]。

将荧光蛋白、用于高亲和性和免疫标记的表位标签或反应蛋白标签与目的蛋白融合表达可以避免内源蛋白抗体标记的许多缺陷,但也伴随着一系列风险和限制。首先,融合标签的存在可能导致自发聚合,干扰蛋白质的正常生理功能。其次,引入外源质粒 DNA 通常会导致目标蛋白的高水平表达,有可能造成与正常生理情况不符的过表达效应,并引发细胞毒性。此外,如果不对目标基因进行敲除,这种方法无法标记所有的目标蛋白。

5.3 信号采集

增加样品标记手段之后,还需进一步优化信号采集的效率。对于 STORM 而言,通常的拍摄方式是使用 1~3 kW/cm² 的照明强度,根据染料类型选择 33 Hz (近红外区染料)或 61 Hz (可见光区染料)的频率采集数万帧图像。在采集初始阶段,所有荧光分子会快速进入暗态,并在随后的 10~300 s 逐渐呈现出较低的密度分布,此时开始记录数据。对于紫外光敏感型染料,可使用 405 nm 激光在拍摄过程中逐渐增加照射强度(0.1~30.0 W/cm²),以保持荧光分子的闪烁活性^[101]。Jonas Ries 课题组提出 SMLM 的定位精度与标记密度受到信号采集时的成像速度和激光强度影响,并进行了一系列优化^[102]。在拍摄的初始阶段,使用高强度激光促使荧光分子进入暗态的做法可能导致多达一半的信号分子被漂白。因此,为了保持较高的采集效率,应该在这个过程中使用较低的激光强度,并延长照射时间。此外,研究者发现单个定位点采集到的光子数不受曝光时间的影响。随后他们进一步改变了三个数量级的激发强度,并反向调整曝光时间,以确保每帧图像的采集速度不同但光照剂量恒定。结果显示,与慢速成像相比,快速的成像方式使定位点的平均光子数降低了 1/10,定位精度降低了 1/3,傅里叶环分辨率(FRC resolution)降低了 1/8,ELE 降低了 1/3,导致图像稀疏且结构表征不准确[图 4(d)]。这一研究显示,在 SMLM 中采用慢速成像可以提供更出色的分辨率和更高的采集效率。

基于其成像原理和照明方式,SMLM 无法像常规共聚焦显微镜一样使用逐层扫描的方式获取 3D 空间信息。庄小威课题组于 2008 年首次采用柱面镜色散的方式改变 PSF 形貌,进而将形貌参数与轴向位置匹配以实现 1 μm 范围的 3D-STORM 成像^[103]。SMLM 的轴向成像范围和照明深度是影响其广泛应用的主要技术参数。多年来,学者们通过硬件改造显著扩大了 SMLM 的轴向范围,但由于制造成本和技术手段的限制,大多数 3D-SMLM 应用仍然受到传统成像范围的限制。Li 等^[104]基于单分子算法开发了一种 3D-SMLM 拟合系统,该系统使用实验 PSF 数据来提高轴向精度和可靠性,即使在没有 3D 光学镜片的单分子显微镜上也能使用 3D-SMLM。使用 TIRF 的 SMLM 对厚样本的解析能力较差,只能探测到几百纳米范围内



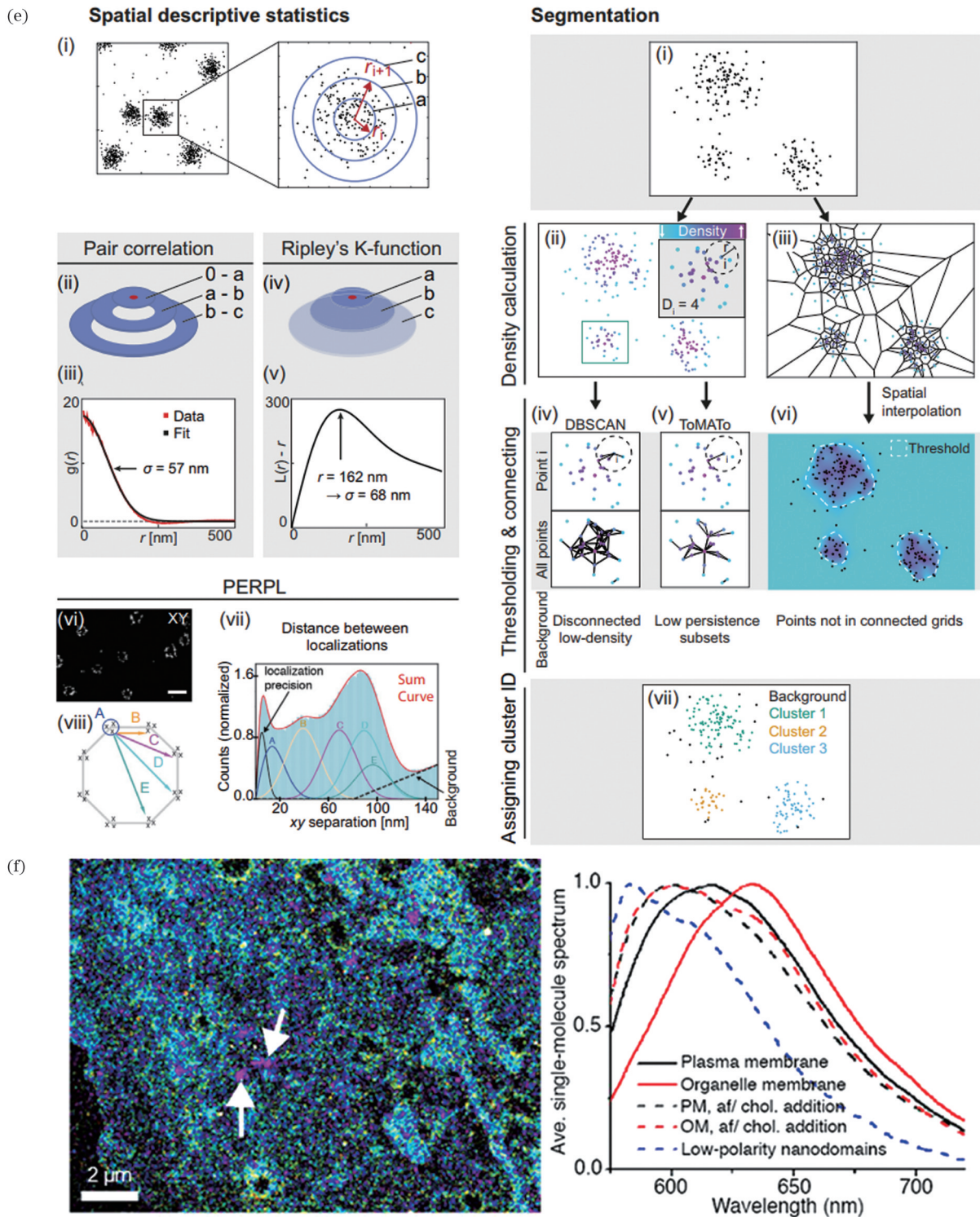


图 4 SMLM 面临的挑战和发展方向。(a) SMLM 的多重定位伪影^[124]; (b) Nup96 蛋白分布模型图(上)和单分子定位图像(下)^[86]; (c) 不同免疫荧光标记物的尺寸^[28]; (d) SMLM 成像速度和激光强度对图像质量的影响, 标尺为 100 nm^[102]; (e) 空间描述性统计(左)和不同聚类分析算法(右)的原理和流程^[125]; (f) 尼罗红标记 COS-7 细胞膜系统的光谱分辨 STORM 图像(箭头指向为低极性纳米域, 左), 及质膜、细胞器膜和低极性纳米域的平均单分子光谱(右)^[126]

Fig. 4 Current challenges and further developments of SMLM. (a) SMLM artifacts caused by inaccurate multiple-molecule localization^[124]; (b) Nup96 protein distribution model map (top) and SMLM image (bottom)^[86]; (c) sizes of different immunofluorescent markers^[28]; (d) effects of SMLM imaging speed and laser intensity on image quality with scale bar of 100 nm^[102]; (e) principles and procedures of spatial descriptive statistics (left) and different cluster analysis algorithms (right)^[125]; (f) spectrally resolved STORM image of COS-7 cell membrane labeled with Nile Red (arrows indicate low-polarity nanodomain, left), and average single-molecule spectra of plasma membrane, organelle membrane, and low-polarity nanodomains (right)^[126]

的信号。Kim 等^[105]在 2019 年通过结合 SMLM 与光片显微镜,开发了单分子斜面显微镜(obSTORM),使用斜光片成像样品的斜切片,实现了深度为 66 μm 的超分辨成像。同时,组织样本中较强的散射和自发荧光通常会产生不均匀的背景信号,显著降低图像分辨率并引入伪影。Xu 等^[106]于 2020 年提出了 PathSTORM 成像技术用于福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)的病理组织的单分子成像。他们通过光学清除(通过减少散射光来提高光学显微镜的成像质量和深度)^[107]和折射率匹配降低背景信号,基于极值激发恢复^[108]校正异质背景,并开发有效的拟合方法以减少闪烁效应带来的精度干扰。该团队使用 PathSTORM 成功揭示了高阶染色质结构的逐渐分解和断裂行为,为癌症早诊和风险评级提供了新的思路。因此,通过硬件改造、软件升级和样本处理优化等手段提升 SMLM 的成像深度与范围,能够为其在生物医学领域中的深度应用奠定更坚实的基础。

5.4 数据挖掘和定量分析

传统宽场荧光显微镜或具有高分辨率的激光共聚焦显微镜可以实现活细胞生物事件的高通量观测,但薄弱的空间分辨能力使其无法对亚细胞组织结构进行充分的解析。此外,为了将目标分子的空间组织特征与蛋白功能相联系,通常会对渲染图像进行基于像素网格(pixel)的特征提取和分析。然而,使用基于 pixel 渲染的传统方法对 SMLM 数据进行分析会丢失很多细节,无法实现蛋白质复合物的精确定量分析^[109]。与传统的解析模式不同,SMLM 能够给出 2 nm 定位精度的单分子空间坐标信息,在纳米尺度下研究分子间相互作用的同时,实现对大分子复合物的定量分析。

近 5 年来,SMLM 的定量分析方法得到了快速发展,已从密度、几何、计量学和分子互作等方面实现对二维和三维数据的统计。密度和几何统计可以描述目标蛋白的形状、大小和紧密程度等特征,分为空间描述性统计和基于分割的聚类分析两类。空间描述性统计用于宏观体现目标区域(ROI)的空间分布模式(随机、聚集或分散),在不均匀的分布中,分子密度比周围环境高的区域称为簇(cluster)。cluster 通常与其生物学功能相关,如蛋白表达水平变化或寡聚信号生成等。使用对关联函数^[110]或多距离空间聚类分析(Ripley's K function)^[111]可以提取所有 cluster 的平均大小和密度特征[图 4(e)左]。与空间描述性统计相反,基于分割的聚类分析可以获取每个 cluster 的特性。对于常见生物样本,cluster 分析方法主要有密度法和泰森多边形法两种类型。密度法包括 DBSCAN 和 FOCAL 等,该方法通过调整阈值参数能够有效去除背景噪声,分割出各种几何类型的 cluster。基于密度的 cluster 统计也存在一些弊端:如算法的阈值参数对分割结果影响较大,存在一定主观性;无法分割密度方差较大的 cluster;处理大数据速度缓慢等。而泰森多边形分割

法可以快速地处理大数据,同时有效去除噪声。此外,该方法对特殊的几何形状(如管状结构)敏感,但对中空状的囊泡类结构分割能力较弱[图 4(e)右]。目前,已有多种基于该方法的独立分析软件供用户使用,如 ClusterVisu^[112]、SR-Tesseler^[113]和 Grafeo^[114]等。不同细胞中成千上万的功能蛋白均具有各自的组织分布特征,同时也存在具有较强异质性的单一蛋白,单一算法通常不具有普适性,应仔细比较选择与样品性质最匹配的分析方法。Nieves 等^[115]推出了一套 cluster 算法评估框架,使用调整兰德系数(ARI)和交并比(IoU)两个指标来评价 7 种 Cluster 算法(DBSCAN、ToMATo、KDE、FOCAL、CAML、ClusterViSu 和 SR-Tesseler)对 9 类不同分布类型样本的解析能力。用户可以将自己的样本类型与上述标准进行匹配,并选择评分更高的分析方法。利用蓬勃发展的定量分析算法充分发挥单分子定位的先天优势,将显著提升对复杂生物样品价值信息的充分提取和精准分析能力,揭示这些数据背后隐藏的生命规律。

5.5 生物功能的 SMLM 直接解读

应用 SMLM 解析蛋白质的空间分布及其功能是近年来 SRM 领域主要的发展方向之一。然而,除结构与分布各异的蛋白质外,细胞内环境还蕴含着其他丰富的生命活动信息:如 pH 值、亲水性、酶活性和分子密度等。使用环境敏感型功能化学探针结合传统荧光显微镜通常能够感知单细胞水平的活动信息,但较低的空间分辨率严重限制了探测灵敏度,进而错失丰富的功能信号。将 SMLM 图像采集过程中稀疏的信号分布与特定生物功能相结合,将会为 SMLM 的生命医学应用提供更多的潜能。

在传统 SMLM 上调节激发光的极化方向,并添加偏振分束器或 Wollaston 棱镜将荧光团分割为平行和垂直于发射激光的极化信号,从而可以实现极化分辨的偏振 SMLM 成像^[116-118]。Shaban 等^[119]利用这一技术实现了对淀粉样蛋白纤维的自旋方向解析,揭示了其内原丝扭曲的超微结构特征。Valades Cruz 等^[116]同样利用偏振 SMLM 实现对体内肌动蛋白、微管蛋白和体外双链 DNA 的高精度分子定位与分子方向成像。这一成像技术为研究蛋白复合体有序组装奠定了基础。

使用比率检测的方式可以简单地判断荧光分子发射光谱的变化,通过二向色镜将荧光分成长波和短波两个部分,进而通过测量两种组分比例实现光谱信息的获取。Brasselet 等^[120]通过将 SNARF-1(荧光 pH 指示剂)标记的葡聚糖加入琼脂糖凝胶,实现了局部 pH 值的探测。将这种方法应用于 SMLM 将为细胞微环境纳米级监测提供新的技术路线。

光谱分辨 SMLM 与荧光偏振 SMLM 的原理类似,基于传统 SMLM 架构在检测相机前加入一个三棱镜使荧光发生色散,从而记录目标分子的广域发射光谱^[121]。Bongiovanni 等^[122]利用尼罗红染料的溶剂化显

色特性(染料分子色彩随溶剂极性的改变而变化的性质),同时提取每个染料分子的发射光谱和空间定位,从而绘制带有极性信息的生物结构。利用这种方式,该团队首先使用 PAINT 解析了 α -突触核蛋白和淀粉样蛋白- β 体外聚合物的表面疏水性,提出了该结构与细胞毒性的潜在相关。此外,这项工作还以侧视图成像的方式将细胞质膜的亲疏水性可视化,发现了胆固醇浓度对细胞质膜极性的调控作用。Moon 等^[123] 同样使用尼罗红对整个细胞质膜进行了光谱分辨 STORM 和 PAINT 成像。以单分子光谱分辨级别的空间分辨率观察到高浓度胆固醇或霍乱毒素处理产生的低极性纳米域,以纳米级灵敏度观测细胞质膜的相分离现象,成功揭示了其组成异质性[图 4(f)]。将荧光偏振、比率检测和光谱分辨等功能化光学技术整合至单分子维度的 SMLM,将为细胞原位的生化监测开辟丰富的纳米尺度应用市场。

6 结束语

SMLM 近 20 年的突破发展为生命活动的信号转导提供了更有深度的解读。传统研究多通过体外生化实验(如免疫沉淀等)的方式了解信号节点的互作关系,而细胞成像天然具有原位优势,能够给出更直观的分子动态互作信息。SMLM 在此基础上进一步大幅提升了空间分辨率,同时借助不断完善的大量数据定量分析方案,能够为多种重要生命活动描绘全新的精准信号图谱,助力相关临床诊疗转化应用。因此,随着 SMLM 技术的不断更新迭代和现有若干不足的改善,关键信号枢纽的细胞原位纳米尺度结构与功能解析将会是未来 5~10 年间细胞生物学重要的研究方向和关注焦点。

参 考 文 献

- [1] Bhuiyan T, Timmers H T M. Promoter recognition: putting TFIIID on the spot[J]. *Trends in Cell Biology*, 2019, 29(9): 752-763.
- [2] Chen X Z, Yin X T, Li J B, et al. Structures of the human Mediator and Mediator-bound preinitiation complex[J]. *Science*, 2021, 372(6546): eabg0635.
- [3] Chen X Z, Qi Y L, Wu Z H, et al. Structural insights into preinitiation complex assembly on core promoters[J]. *Science*, 2021, 372(6541): eaba8490.
- [4] Vogt P K, Hart J R, Yang S, et al. Structural and mechanistic insights provided by single particle cryo-EM analysis of phosphoinositide 3-kinase (PI3K α) [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 2023, 1878(5): 188947.
- [5] Glaeser R M. How good can single-particle cryo-EM become? what remains before it approaches its physical limits? [J]. *Annual Review of Biophysics*, 2019, 48: 45-61.
- [6] 卫奥尼, 秦成兵, 董帅, 等. 超分辨荧光显微成像的若干研究进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2023, 60(11): 1106012.
Wei A N, Qin C B, Dong S, et al. Research progress of super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2023, 60(11): 1106012.
- [7] Hugelier S, Colosi P L, Lakadamyali M. Quantitative single-molecule localization microscopy[J]. *Annual Review of Biophysics*,

- 2023, 52: 139-160.
- [8] Klar T A, Jakobs S, Dyba M, et al. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(15): 8206-8210.
- [9] Heintzmann R, Cremer C G. Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating[J]. *Proceedings of SPIE*, 1999, 3568: 185-196.
- [10] Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 198(2): 82-87.
- [11] Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(37): 13081-13086.
- [12] 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.
- [13] Betzig E. Proposed method for molecular optical imaging[J]. *Optics Letters*, 1995, 20(3): 237-239.
- [14] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution[J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [15] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-796.
- [16] Sharonov A, Hochstrasser R M. Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(50): 18911-18916.
- [17] Jungmann R, Steinhauer C, Scheible M, et al. Single-molecule kinetics and super-resolution microscopy by fluorescence imaging of transient binding on DNA origami[J]. *Nano Letters*, 2010, 10(11): 4756-4761.
- [18] 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): 606-612.
- [19] Wolff J O, Scheiderer L, Engelhardt T, et al. MINFLUX dissects the unimpeded walking of kinesin-1[J]. *Science*, 2023, 379(6636): 1004-1010.
- [20] Deguchi T, Iwanski M K, Schentarra E M, et al. Direct observation of motor protein stepping in living cells using MINFLUX[J]. *Science*, 2023, 379(6636): 1010-1015.
- [21] Chen F, Tillberg P W, Boyden E S. Optical imaging. Expansion microscopy[J]. *Science*, 2015, 347(6221): 543-548.
- [22] Klimas A, Gallagher B R, Wijesekara P, et al. Magnify is a universal molecular anchoring strategy for expansion microscopy [J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(6): 858-869.
- [23] 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 of the United States of America*, 2009, 106(52): 22287-22292.
- [24] 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.
- [25] 罗喜亮, 周舟, 黄江枫, 等. 三维显微图像的分辨率评估方法及应用[J]. *中国激光*, 2022, 49(5): 0507205.
Luo X L, Zhou Z, Huang J F, et al. Resolution evaluation method and applications of 3D microscopic images[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(5): 0507205.
- [26] 赵唯淞, 黄园园, 韩镇谦, 等. 超分辨荧光显微镜中的解卷积技术及应用[J]. *中国激光*, 2024, 51(1): 0107001.
Zhao W S, Huang Y Y, Han Z Q, et al. Deconvolution in super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2024, 51(1): 0107001.
- [27] Huang B, Bates M, Zhuang X W. Super-resolution fluorescence

- microscopy[J]. Annual Review of Biochemistry, 2009, 78: 993-1016.
- [28] Liu S, Hoess P, Ries J. Super-resolution microscopy for structural cell biology[J]. Annual Review of Biophysics, 2022, 51: 301-326.
- [29] Nieto-Garai J A, Olazar-Intxausti J, Anso I, et al. Super-resolution microscopy to study interorganelle contact sites[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(23): 15354.
- [30] Wassie A T, Zhao Y X, Boyden E S. Expansion microscopy: principles and uses in biological research[J]. Nature Methods, 2019, 16(1): 33-41.
- [31] Thompson R E, Larson D R, Webb W W. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes[J]. Biophysical Journal, 2002, 82(5): 2775-2783.
- [32] Ober R J, Ram S, Ward E S. Localization accuracy in single-molecule microscopy[J]. Biophysical Journal, 2004, 86(2): 1185-1200.
- [33] Zhu L, Zhang W, Elnatan D, et al. Faster STORM using compressed sensing[J]. Nature Methods, 2012, 9(7): 721-723.
- [34] Holden S J, Uphoff S, Kapanidis A N. DAOSTORM: an algorithm for high-density super-resolution microscopy[J]. Nature Methods, 2011, 8(4): 279-280.
- [35] Cox S, Rosten E, Monypenny J, et al. Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics[J]. Nature Methods, 2012, 9(2): 195-200.
- [36] Lukyanov K A, Chudakov D M, Lukyanov S, et al. Photoactivatable fluorescent proteins[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2005, 6(11): 885-890.
- [37] Lippincott-Schwartz J, Patterson G H. Photoactivatable fluorescent proteins for diffraction-limited and super-resolution imaging[J]. Trends in Cell Biology, 2009, 19(11): 555-565.
- [38] Henderson J N, Gepshtein R, Heenan J R, et al. Structure and mechanism of the photoactivatable green fluorescent protein[J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 131(12): 4176-4177.
- [39] Zhang M S, Chang H, Zhang Y D, et al. Rational design of true monomeric and bright photoactivatable fluorescent proteins[J]. Nature Methods, 2012, 9(7): 727-729.
- [40] Ando R, Mizuno H, Miyawaki A. Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting[J]. Science, 2004, 306(5700): 1370-1373.
- [41] Jungmann R, Avendaño M S, Woehrstein J B, et al. Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT[J]. Nature Methods, 2014, 11(3): 313-318.
- [42] Jungmann R, Avendaño M S, Dai M J, et al. Quantitative super-resolution imaging with qPAINT[J]. Nature Methods, 2016, 13(5): 439-442.
- [43] Strauss S, Jungmann R. Up to 100-fold speed-up and multiplexing in optimized DNA-PAINT[J]. Nature Methods, 2020, 17(8): 789-791.
- [44] Reinhardt S C M, Masullo L A, Baudrexel I, et al. Ångström-resolution fluorescence microscopy[J]. Nature, 2023, 617(7962): 711-716.
- [45] Dai M J. DNA-PAINT super-resolution imaging for nucleic acid nanostructures[J]. Methods in Molecular Biology, 2017, 1500: 185-202.
- [46] Zhang D W, Shao J, Lin J, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis[J]. Science, 2009, 325(5938): 332-336.
- [47] He S D, Wang L, Miao L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α [J]. Cell, 2009, 137(6): 1100-1111.
- [48] Cho Y, Challa S, Moquin D, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation[J]. Cell, 2009, 137(6): 1112-1123.
- [49] Sun L M, Wang H Y, Wang Z G, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase[J]. Cell, 2012, 148(1/2): 213-227.
- [50] Zhao J, Jitkaew S, Cai Z Y, et al. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(14): 5322-5327.
- [51] Chen X, Li W J, Ren J M, et al. Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death[J]. Cell Research, 2014, 24(1): 105-121.
- [52] Wang H Y, Sun L M, Su L J, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3[J]. Molecular Cell, 2014, 54(1): 133-146.
- [53] Cai Z Y, Jitkaew S, Zhao J, et al. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis[J]. Nature Cell Biology, 2014, 16(1): 55-65.
- [54] Xie T, Peng W, Liu Y X, et al. Structural basis of RIP1 inhibition by necrostatins[J]. Structure, 2013, 21(3): 493-499.
- [55] Xie T, Peng W, Yan C Y, et al. Structural insights into RIP3-mediated necroptotic signaling[J]. Cell Reports, 2013, 5(1): 70-78.
- [56] Li J X, McQuade T, Siemer A B, et al. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis[J]. Cell, 2012, 150(2): 339-350.
- [57] Mompeán M, Li W B, Li J X, et al. The structure of the necrosome RIPK1-RIPK3 core, a human hetero-amyloid signaling complex[J]. Cell, 2018, 173(5): 1244-1253.
- [58] Chen X, Zhu R F, Zhong J J, et al. Mosaic composition of RIP1-RIP3 signalling hub and its role in regulating cell death[J]. Nature Cell Biology, 2022, 24(4): 471-482.
- [59] Lakadamyali M, Cosma M P. Visualizing the genome in high resolution challenges our textbook understanding[J]. Nature Methods, 2020, 17(4): 371-379.
- [60] Sexton T, Yaffe E, Kenigsberg E, et al. Three-dimensional folding and functional organization principles of the *Drosophila* genome[J]. Cell, 2012, 148(3): 458-472.
- [61] Nora E P, Lajoie B R, Schulz E G, et al. Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre[J]. Nature, 2012, 485(7398): 381-385.
- [62] Dixon J R, Selvaraj S, Yue F, et al. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions [J]. Nature, 2012, 485(7398): 376-380.
- [63] McCord R P, Kaplan N, Giorgetti L. Chromosome conformation capture and beyond: toward an integrative view of chromosome structure and function[J]. Molecular Cell, 2020, 77(4): 688-708.
- [64] Rao S S P, Huntley M H, Durand N C, et al. A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping[J]. Cell, 2014, 159(7): 1665-1680.
- [65] Wang X D, Brandao H B, Le T B K, et al. Bacillus subtilis SMC complexes juxtapose chromosome arms as they travel from origin to terminus[J]. Science, 2017, 355(6324): 524-527.
- [66] Rowley M J, Corces V G. Organizational principles of 3D genome architecture[J]. Nature Reviews Genetics, 2018, 19(12): 789-800.
- [67] Davidson I F, Bauer B, Goetz D, et al. DNA loop extrusion by human cohesin[J]. Science, 2019, 366(6471): 1338-1345.
- [68] Neguembor M V, Martin L, Castells-García Á, et al. Transcription-mediated supercoiling regulates genome folding and loop formation[J]. Molecular Cell, 2021, 81(15): 3065-3081.
- [69] Riedl S J, Salvesen G S. The apoptosome: signalling platform of cell death[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007, 8(5): 405-413.
- [70] Salvador-Gallego R, Mund M, Cosentino K, et al. Bax assembly into rings and arcs in apoptotic mitochondria is linked to membrane pores[J]. The EMBO Journal, 2016, 35(4): 389-401.
- [71] Cosentino K, Hertlein V, Jenner A, et al. The interplay between BAX and BAK tunes apoptotic pore growth to control mitochondrial-DNA-mediated inflammation[J]. Molecular Cell, 2022, 82(5): 933-949.
- [72] Ranade S S, Woo S H, Dubin A E, et al. Piezo2 is the major

- transducer of mechanical forces for touch sensation in mice[J]. *Nature*, 2014, 516(7529): 121-125.
- [73] Zeng W Z, Marshall K L, Min S, et al. PIEZOs mediate neuronal sensing of blood pressure and the baroreceptor reflex[J]. *Science*, 2018, 362(6413): 464-467.
- [74] Hill R Z, Loud M C, Dubin A E, et al. PIEZO1 transduces mechanical itch in mice[J]. *Nature*, 2022, 607(7917): 104-110.
- [75] Coste B, Xiao B L, Santos J S, et al. Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels[J]. *Nature*, 2012, 483(7388): 176-181.
- [76] Coste B, Mathur J, Schmidt M, et al. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels[J]. *Science*, 2010, 330(6000): 55-60.
- [77] Guo Y R, MacKinnon R. Structure-based membrane dome mechanism for Piezo mechanosensitivity[J]. *eLife*, 2017, 6: 33660.
- [78] Saotome K, Murthy S E, Kefauver J M, et al. Structure of the mechanically activated ion channel Piezo1[J]. *Nature*, 2018, 554(7693): 481-486.
- [79] Zhao Q C, Zhou H, Chi S P, et al. Structure and mechanogating mechanism of the Piezo1 channel[J]. *Nature*, 2018, 554(7693): 487-492.
- [80] Wang L, Zhou H, Zhang M M, et al. Structure and mechanogating of the mammalian tactile channel PIEZO2[J]. *Nature*, 2019, 573(7773): 225-229.
- [81] Mulhall E M, Gharpure A, Lee R M, et al. Direct observation of the conformational states of PIEZO1[J]. *Nature*, 2023, 620(7976): 1117-1125.
- [82] Bradbury A, Plückthun A. Reproducibility: standardize antibodies used in research[J]. *Nature*, 2015, 518(7537): 27-29.
- [83] Baker M. Reproducibility crisis: blame it on the antibodies[J]. *Nature*, 2015, 521(7552): 274-276.
- [84] Ries J. SMAP: a modular super-resolution microscopy analysis platform for SMLM data[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(9): 870-872.
- [85] 杨建宇, 董浩, 邢福临, 等. 单分子定位超分辨成像技术进展及应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(12): 1200001.
- Yang J Y, Dong H, Xing F L, et al. Single-molecule localization super-resolution microscopy and its applications[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(12): 1200001.
- [86] Thevathasan J V, Kahnwald M, Cieřliński K, et al. Nuclear pores as versatile reference standards for quantitative superresolution microscopy[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(10): 1045-1053.
- [87] Früh S M, Matti U, Spycher P R, et al. Site-specifically-labeled antibodies for super-resolution microscopy reveal in situ linkage errors[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(7): 12161-12170.
- [88] McEvoy A L, Hoi H, Bates M, et al. mMaple: a photoconvertible fluorescent protein for use in multiple imaging modalities[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51314.
- [89] Keppler A, Gendreizig S, Gronemeyer T, et al. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(1): 86-89.
- [90] Los G V, Encell L P, McDougall M G, et al. HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis[J]. *ACS Chemical Biology*, 2008, 3(6): 373-382.
- [91] Gautier A, Juillerat A, Heinis C, et al. An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells[J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(2): 128-136.
- [92] Traenkle B, Rothbauer U. Under the microscope: single-domain antibodies for live-cell imaging and super-resolution microscopy[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 1030.
- [93] Ries J, Kaplan C, Platonova E, et al. A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(6): 582-584.
- [94] Virant D, Traenkle B, Maier J L, et al. A peptide tag-specific nanobody enables high-quality labeling for dSTORM imaging[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 930.
- [95] Götzke H, Kilisch M, Martinez-Carranza M, et al. The ALFA-tag is a highly versatile tool for nanobody-based bioscience applications[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4403.
- [96] Opazo F, Levy M, Byrom M, et al. Aptamers as potential tools for super-resolution microscopy[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(10): 938-939.
- [97] Carrington G, Tomlinson D, Peckham M. Exploiting nanobodies and Affimers for superresolution imaging in light microscopy[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2019, 30(22): 2737-2740.
- [98] Barasoain I, Diaz J F, Andreu J M. Fluorescent taxoid probes for microtubule research[J]. *Methods in Cell Biology*, 2010, 95: 353-372.
- [99] Wulf E, Deboen A, Bautz F A, et al. Fluorescent phalloxin, a tool for the visualization of cellular actin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76(9): 4498-4502.
- [100] Beliu G, Kurz A J, Kuhlemann A C, et al. Bioorthogonal labeling with tetrazine-dyes for super-resolution microscopy[J]. *Communications Biology*, 2019, 2: 261.
- [101] Dempsey G T, Vaughan J C, Chen K H, et al. Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(12): 1027-1036.
- [102] Diekmann R, Kahnwald M, Schoenit A, et al. Optimizing imaging speed and excitation intensity for single-molecule localization microscopy[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(9): 909-912.
- [103] Huang B, Wang W Q, Bates M, et al. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy [J]. *Science*, 2008, 319(5864): 810-813.
- [104] Li Y M, Mund M, Hoess P, et al. Real-time 3D single-molecule localization using experimental point spread functions[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(5): 367-369.
- [105] Kim J, Wojcik M, Wang Y, et al. Oblique-plane single-molecule localization microscopy for tissues and small intact animals[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(9): 853-857.
- [106] Xu J Q, Ma H Q, Ma H B, et al. Super-resolution imaging reveals the evolution of higher-order chromatin folding in early carcinogenesis[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 1899.
- [107] Zhu X P, Huang L M, Zheng Y, et al. Ultrafast optical clearing method for three-dimensional imaging with cellular resolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(23): 11480-11489.
- [108] Ma H Q, Jiang W, Xu J Q, et al. Enhanced super-resolution microscopy by extreme value based emitter recovery[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 20417.
- [109] Baddeley D, Cannell M B, Soeller C. Visualization of localization microscopy data[J]. *Microscopy and Microanalysis*, 2010, 16(1): 64-72.
- [110] Sengupta P, Jovanovic-Talisman T, Skoko D, et al. Probing protein heterogeneity in the plasma membrane using PALM and pair correlation analysis[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(11): 969-975.
- [111] Owen D M, Rentero C, Rossy J, et al. PALM imaging and cluster analysis of protein heterogeneity at the cell surface[J]. *Journal of Biophotonics*, 2010, 3(7): 446-454.
- [112] Andronov L, Orlov I, Lutz Y, et al. ClusterViSu, a method for clustering of protein complexes by Voronoi tessellation in super-resolution microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24084.
- [113] Levet F, Hosy E, Kechkar A, et al. SR-Tesseler: a method to segment and quantify localization-based super-resolution microscopy data[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(11): 1065-1071.
- [114] Haas K T, Peaucelle A. Protocol for multicolor three-dimensional dSTORM data analysis using MATLAB-based script package Grafeo[J]. *STAR Protocols*, 2021, 2(3): 100808.
- [115] Nieves D J, Pike J A, Levet F, et al. A framework for evaluating the performance of SMLM cluster analysis algorithms[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(2): 259-267.
- [116] Valades Cruz C A, Shaban H A, Kress A, et al. Quantitative nanoscale imaging of orientational order in biological filaments by polarized superresolution microscopy[J]. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(7): E820-E28.
- [117] Gould T J, Gunewardene M S, Gudheti M V, et al. Nanoscale imaging of molecular positions and anisotropies[J]. Nature Methods, 2008, 5(12): 1027-1030.
- [118] Backer A S, Lee M Y, Moerner W E. Enhanced DNA imaging using super-resolution microscopy and simultaneous single-molecule orientation measurements[J]. Optica, 2016, 3(6): 659-666.
- [119] Shaban H A, Valades-Cruz C A, Savatier J, et al. Polarized super-resolution structural imaging inside amyloid fibrils using Thioflavine T[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 12482.
- [120] Brasselet S, Moerner W E. Fluorescence behavior of single-molecule pH-sensors[J]. Single Molecules, 2000, 1(1): 17-23.
- [121] Yan R, Moon S, Kenny S J, et al. Spectrally resolved and functional super-resolution microscopy via ultrahigh-throughput single-molecule spectroscopy[J]. Accounts of Chemical Research, 2018, 51(3): 697-705.
- [122] Bongiovanni M N, Godet J, Horrocks M H, et al. Multi-dimensional super-resolution imaging enables surface hydrophobicity mapping[J]. Nature Communications, 2016, 7: 13544.
- [123] Moon S, Yan R, Kenny S J, et al. Spectrally resolved, functional super-resolution microscopy reveals nanoscale compositional heterogeneity in live-cell membranes[J]. Journal of the American Chemical Society, 2017, 139(32): 10944-10947.
- [124] Li H L, Vaughan J C. Switchable fluorophores for single-molecule localization microscopy[J]. Chemical Reviews, 2018, 118(18): 9412-9454.
- [125] Wu Y L, Tschanz A, Krupnik L, et al. Quantitative data analysis in single-molecule localization microscopy[J]. Trends in Cell Biology, 2020, 30(11): 837-851.
- [126] Yan R, Wang B W, Xu K. Functional super-resolution microscopy of the cell[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2019, 51: 92-97.

In Situ Single-Molecule Localization-Based Super-Resolution Analysis of Key Cellular Signalosomes

Lin Jian, Chen Xin*

School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China

Abstract

Significance Cells, the basic structural and functional units, play an essential role in the development, aging, disease, and death of organisms. Since the first microscopic observation of cells by Robert Hooke in 1665, numerous advanced technical and theoretical methods have been developed over the past centuries to microscopically visualize cells, enabling a thorough analysis of life activities from the cellular to the molecular levels. Cells are composed of numerous macromolecular complexes with different sizes and diverse compositions. For example, the eukaryotic 80S ribosome is composed of large and small subunits, and each subunit contains various ribosomal RNA (rRNA) and ribosomal proteins. These complexes are usually considered as core signaling hubs to precisely control cellular structures and functions during various biological activities. Accordingly, cells can properly generate immediate responses to frequent environmental changes and distinct cellular stresses. Therefore, a mechanistic investigation of the structural assembly of these key signaling hubs and their functional regulation is necessary to improve our understanding of life activities and to identify potential therapeutic targets for disease treatment.

Currently, single-particle cryo-electron microscope (cryo-EM), which requires only a small number of samples for analysis and does not involve the use of crystals unlike traditional X-ray-based methods, is the most powerful tool in structural biology owing to its extremely high spatial resolution. However, precisely resolving a structure using cryo-EM involves purification or enrichment of the target biomolecules, which increases the risk of inconsistency between *in vitro* resolved structures and the native structures in cells. Notably, owing to the lack of molecular specificity, understanding the interactions among different molecules when resolving multi-component complexes is challenging. In addition, high-quality cryo-EM analyses depend on the computational averaging of thousands of images of identical particles with good homogeneity and are thus currently unsuitable for evaluating highly heterogeneous signaling hubs that determine cell fates.

Excitingly, super-resolution microscope (SRM) has emerged as an effective solution to these above-mentioned challenges. Fluorescence imaging is an indispensable technical tool for modern biological research owing to its molecular specificity, *in situ* visualization feature, and multiplex analysis ability. Super-resolution imaging, which overcomes the optical diffraction limit, is an efficient method for visualizing the arrangement and functions of biological hundred-nanometer signalosomes at the subcellular scale or even with single-molecule precision.

Progress This review first introduces the basic principles and technical development of several major types of SRM, including stimulated emission depletion microscope (STED), structured illumination microscope (SIM), photoactivated localization microscope (PALM), stochastic optical reconstruction microscope (STORM), point accumulation for imaging in nanoscale topography (PAINT), DNA-PAINT, and minimal photon fluxes (MINIFLUX). These tools have facilitated precise visualization of various biological activities and targets at remarkably high temporal and/or spatial resolutions, even reaching the molecular or angstrom scale in some extreme cases (Figs. 1–2). More importantly, to date, several representative SRM-based applications in life science research have been demonstrated. Through rationale optimization of the key steps in STORM (including structure preservation, fluorescence labeling, signal acquisition, and image analysis), Xin Chen's group from Xiamen University first visualized the ordered organization

of necrosomes at the nanoscale and revealed their underlying mechanism to effectively initiate MLKL (a mixed lineage kinase domain-like protein)-dependent necroptosis and to precisely control the transition between apoptosis and necroptosis in cells stimulated by tumor necrosis factor (TNF). Maria Pia Cosma's group from the Barcelona Institute of Science and Technology employed single-molecule localization microscope (SMLM) to investigate genome organization, especially the formation of chromatin ring structures. They proposed that the transcription-dependent negative superhelix primarily drives the master molecule cohesin to generate ring structures *in vivo*. The team led by Ana J. Garcia-Saez from the University of Tübingen quantitatively imaged Bax- and Bak-mediated pores in the mitochondrial outer membrane during intrinsic cell apoptosis; they observed the interplay of apoptosis and inflammation by controlling the dynamics of the mitochondrial content release. Ardem Patapoutian's group from the Scripps Research utilized the iPALM and MINFLUX technologies to directly visualize the conformational stages of the mechanosensitive channel PIEZO1 in complex cellular environments (Fig. 3). Finally, based on the practical experience gained from our group's efforts, we summarized some important strategies, such as methods to minimize reconstruction artifacts, improve labeling efficiency, and strengthen quantitative analysis of super-resolved images, to obtain high-quality super-resolution images using SMLM (Fig. 4).

Conclusions and Prospects With the groundbreaking innovation of SMLM in the past two decades, our understanding of structural organization and functional regulation in multiple types of cells undergoing various biological activities has improved. Although the classic genetic and biochemical experiments revealed the fundamental cellular mechanisms, cell imaging provides more precise and intuitive information on molecular interactions *in situ*. Therefore, the spatial resolution of SMLM can be further improved up to the molecular level to precisely depict an informative signaling network for a variety of critical biological processes. Thus, considering the continuous development of SMLM and other SRM technologies, we believe that *in situ* nanoscale functional organization of key signaling hubs will become one of the most promising research areas in cell biology in the near future. In addition, SMLM is expected to revolutionize research in science and technology and lead to outstanding discoveries in the next 5–10 years.

Key words bio-optics; super-resolution imaging; single-molecule localization; biological signalosomes; signal transduction