

新型超分辨显微技术浅析

金录嘉, 何洋, 瞿璐茜, 张弛, 李美琪*, 席鹏

北京大学工学院生物医学工程系, 北京 100871

摘要 随着荧光探针的出现,超分辨成像技术发展迅速,多种不同的超分辨显微技术产生并得到广泛应用。超分辨成像技术的发展为生命科学领域的研究提供了极大便利,也越来越受到研究者的重视。由于传统超分辨显微成像技术在成像速度、观察视野范围、系统成本等方面仍存在一定的限制,新型超分辨显微成像技术的发展让研究人员再次看到超分辨成像领域的曙光。介绍了近年来出现的几种新型超分辨成像技术,包括膨胀样品超分辨技术、表面增强超分辨技术和荧光偏振超分辨技术,旨在总结这些新型超分辨技术的发展,为生命科学领域提供新的技术参考。

关键词 成像系统; 超分辨显微; 膨胀样品超分辨; 表面增强超分辨; 荧光偏振超分辨

中图分类号 O439

文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP55.030006

Analysis of New Super-Resolution Microscopy Technology

Jin Lujia, He Yang, Qu Luxi, Zhang Chi, Li Meiqi, Xi Peng

Department of Biomedical Engineering, College of Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

Abstract With the advent of fluorescent probes, the technology of super-resolution imaging has developed rapidly, and a variety of different super-resolution microscopy technologies have been developed and widely used. It provides great convenience for the field of life science research and receives more and more attention from researchers. Because the traditional super-resolution microscopic imaging technologies still have some restrictions in imaging speed, observation field of view, system costs and so on, the development of new super-resolution microscopy technology expands our vision of the field of super-resolution image. Several new super-resolution imaging technologies including expansion sample super-resolution, surface enhanced super-resolution and fluorescence polarization super-resolution are reviewed with the purpose of making a summary of the development of new super-resolution technologies and providing a new technical reference for the application of the field of life science.

Key words imaging systems; super-resolution microscopy; expansion sample super-resolution; surface enhanced super-resolution; fluorescence polarization super-resolution

OCIS codes 110.0180; 180.2520; 180.5655; 120.5410

1 引言

显微成像技术在现代生物学的发展中起到了至关重要的作用,从17世纪英国物理学家、天文学家罗伯特·胡克发明显微镜并用其成功观察且命名细胞开始,显微成像技术就与现代生物学的关系越来越密切。然而,德国物理学家阿贝曾经指出,由于受

光学衍射极限的影响,传统光学显微成像分辨率最小约为入射光波长的一半。因此,科学家们一直在不断努力,试图寻找突破光学显微镜分辨极限的方法。

近年来,随着计算机技术的发展,基于硬件信号采集和软件计算分析相结合的超分辨显微技术应运而生^[1]。实现超分辨的关键在于荧光团的强度调制,

收稿日期: 2017-08-25; 收到修改稿日期: 2017-09-25

基金项目: 国家自然科学基金(61475010, 61729501)、科技部重大仪器专项(2013YQ03065102)、科技部重点研发专项(SQ2017ZY040214)

作者简介: 金录嘉(1996—),男,本科生,主要从事 lncRNA 结构与功能方面的研究。E-mail: jinlujia@pku.edu.cn

导师简介: 席鹏(1978—),男,博士,研究员,主要从事超分辨显微成像方面的研究。E-mail: xipeng@pku.edu.cn

* 通信联系人。E-mail: limeiqi@pku.edu.cn

这种调制可以通过结构化方式实现,如受激发射损耗^[2-3]、饱和结构光照明显微^[4];也可以通过随机方式实现,如光敏定位显微和随机光学重建显微(STORM)^[5-7]。此外,还有一些其他的超分辨方法,例如超分辨率光学波动成像^[8]和基于熵的超分辨成像(ESI)^[9]等。

然而,在超分辨显微技术飞速发展的同时,现有成像技术的缺陷也日益显现,主要包括:1) 通过强度开关调制来实现超分辨的方法在很大程度上依赖于不同的激发波长,不同的波长对荧光标记物有严格要求,特殊的样品制备条件使得超分辨技术的应用受到限制;2) 成像分辨率和成像时间不可兼得,使得超分辨技术在活细胞成像领域中的应用受限;3) 为了得到尽可能高的分辨率,常需要使用高数值孔径(NA)的物镜,因此对透镜制造技术提出了一定要求,也限制了观测的视野,使得能够同时观察到的细胞数量大幅减少;4) 设备变得庞大笨重、价格昂贵,并且日益复杂的设备使得操作和维护也越来越困难。

为了解决上述问题,需要发展一些新型的超分辨技术以适应不同领域的要求。本文将介绍近几年出现的几种新型超分辨显微成像技术及其相关应用和发展前景。

2 膨胀样品超分辨成像技术

膨胀样品显微术(ExM)的概念是由Chen等^[10]于2015年提出的,该技术利用高吸水性分子吸水溶胀的特性,将样品物理放大以达到超分辨显微的效果。这种技术不依赖于光学技术来突破衍射极限,而是在衍射极限存在的条件下人为放大样品,从而可以观察到更细微的结构。

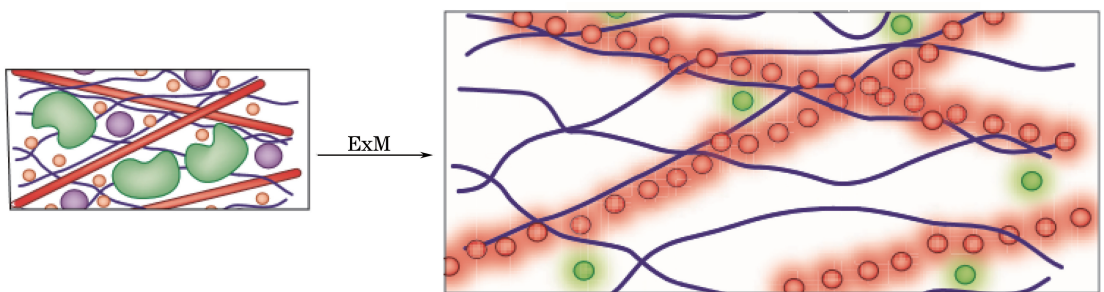


图1 ExM的工作原理^[12]

Fig. 1 Working principle of ExM^[12]

与此同时,研究人员还把这种新的显微术应用于基因原位杂交技术中。研究人员将核糖核酸(RNA)作为样品的观察对象,利用膨胀样品达到可视化的原理,定位了RNAs在纳米级细胞结构(例如神经突触)中的

21世纪以来,脑科学已成为世界各国的研究热点,然而时至今日,大脑依旧是人类认知领域的黑洞。要了解大脑产生思想、控制人体活动的机理,需要看清大脑结构、控制大脑回路和绘制大脑分子图谱。到目前为止,依然缺乏有效测绘大脑精细结构的工具。Marblestone和Boyden^[11]尝试将原位测序技术应用到大脑结构测绘中。通过放大大脑组织,再利用原位测序技术读取细胞,就可以描绘出大脑回路的结构。将组织进行放大的技术,即为本节要介绍的新型超分辨技术——膨胀样品超分辨显微术。

研究人员将大脑样本包埋在一种高吸水性的分子中,整个细胞形成一个密集的网,再将带有荧光的标记分子与特定的靶点结合,用蛋白酶将样品中的蛋白质消化,最后加水溶胀,即可将大脑样本扩大。如图1^[12]所示,在ExM中,多聚物(紫线)穿过固定的细胞(左图),经过再水化,多聚物吸水溶胀(右图)。定位细胞结构的染液(绿色和红色的圆圈)与多聚物以共价键的形式连接并随着样品扩展。由于荧光标记分子已与特定的靶点结合,在各向同性的溶胀中,各标记的相对位置不发生改变,从而反映了大脑样本的原本结构。这种技术可以将大脑样本的线性维度扩大4倍左右,从而将分辨率提高到70 nm左右^[10]。但是这种未保留组织中蛋白质特性且仅依靠特殊定制的试剂来区分细胞结构的方法有很大的局限性。因此,研究人员又对ExM进行改进,发明了蛋白质保留膨胀样品超分辨术(proExM)^[13]。利用传统荧光标记的抗体、链霉菌素或荧光蛋白直接与可溶凝胶交联,取得了很好的超分辨成像效果(图2^[13])。

位置,并研究了RNAs的组织结构,为FISH技术锦上添花,因此该技术也被称为ExFISH^[14]。

ExM在超分辨显微成像中已是一个巨大的突破,可实现用常规光学显微镜达到超分辨显微的效

果。在科研人员的不懈努力下,又一项新成果问世,即迭代 ExM(iExM)^[15]。

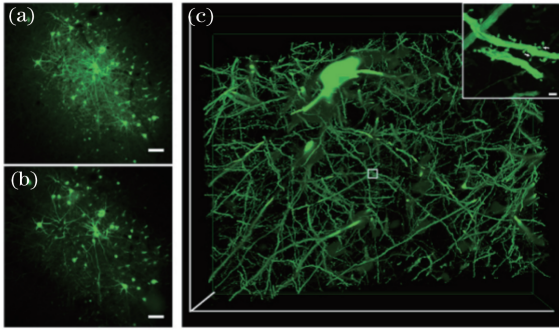


图 2 用 proExM 观察得到的哺乳动物脑电路^[14]。将带有绿色荧光蛋白的病毒注射入猕猴大脑皮层后(a)膨胀前和(b)膨胀后的宽场成像照片;(c)将图 2(b)中某个区域利用共聚焦显微镜成像并进行立体渲染后的照片

Fig. 2 Mammalian brain circuitry observed by proExM^[14]. (a) Pre-expansion and (b) post-expansion wide field imaging pictures when virus with green fluorescent protein injected in cortex of macaque; (c) image taken with a confocal microscope and stereoscopically rendered of the boxed region in Fig. 2(b)

如何将一个样品放大很高倍数,可以参考吹气球的过程,气球吹得越大,气球的厚度就越薄,由此可知,若要将样本放得更大,就需要减小细胞中由高吸水性分子形成的网的密度。但是细胞在溶胀过程

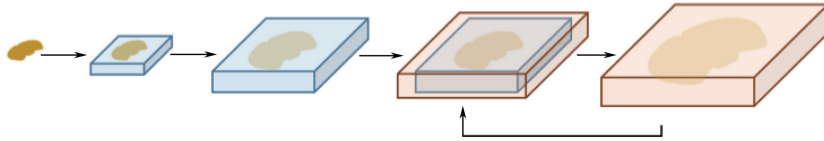


图 3 iExM 的原理图

Fig. 3 Diagram of iExM

ExM 是一种便宜、快速且分辨率高的新型成像技术。相比于传统显微镜,ExM 的时间分辨率无附加限制,但空间分辨率可以达到 70 nm。相比于原有超分辨技术,其样品制备要求与传统显微镜相同,因而适用范围较广。

3 表面增强超分辨技术

现有超分辨技术在样品纵向图像的获取上可分为两类:1) 通过增加可获取的信号纵深以更好地获取样品的三维图像,如双光子荧光显微技术等;2) 通过降低可获取的信号纵深以更好地获取样品表面的图像,如等离子体结构照明显微技术(PSIM)和基于芯片的宽视场纳米显微术(CWN)等。下面主要介绍第 2 类技术中的两种新型前沿显微技术,二者都

中无法各向同性地扩大,导致细胞结构变得极其不稳定,也就失去了观察的意义。因此需要找到一种方法,使得细胞在溶胀过程中还可以保持其结构的稳定,这种方法就是使用另一种高吸水性分子凝胶。这种凝胶可以破坏原有吸水分子间的交联,然后再进行自身的吸水溶胀,如此便可以保证组织的结构稳定。具体的实现办法是对组织进行两次溶胀^[15],如图 3 所示,第一次溶胀与传统 ExM 相同,第二次溶胀基于第一次溶胀产生的新空隙,这是该技术的重点。由此,样本可以被扩展到 20 倍,成像分辨率达到了 25 nm,因此可以观察到小鼠大脑中的突触蛋白以及树突棘的详细结构。

利用 iExM 可以观察到影响突触内数百种蛋白结构的支架蛋白,以及神经递质在突触后细胞表面的分布。目前,光遗传学技术可以控制脑回路,膨胀样品超分辨显微术可以描绘脑回路,3D 成像技术可以重建大脑高速电动力学 3D 图像,这些技术的产生无疑会极大地促进脑科学的发展。Boyden 教授认为,未来最快 5 年就可以完全掌握绘制神经回路精确细节、观察其高速动态变化以及控制它的技术。此外,绘制出足够细致的小型神经回路图像,甚至用计算机模拟出其运作过程的技术预计也能实现,到时可以将模拟一些结构较为简单的大脑神经元及其分子的动态变化。

是利用特殊材料的样品作为载物台对照明光进行有效的调制,以增强样品表面的成像效果。

3.1 等离子体结构照明显微技术

PSIM 是于 2014 年由 Wei 等^[16]在传统客户识别模块(SIM)原理的基础上利用表面等离子体干涉(SPI)代替光学干涉,从而获得达到 SIM 两倍分辨率的新型超分辨显微技术,该技术的关键在于对表面增强拉曼散射(SERS)的应用。SERS 现象最早是由 Fleischmann 等^[17]于 1974 年提出的,他们在研究电化学电池时发现吡啶分子在银电极上的吸附使其拉曼光谱的谱线强度发生明显增强。SERS 并不是在任何表面都可以发生,只在有限的几种金属表面上才能够有效产生,通常应用的是银和铜。当光入射到金属和样品界面时,金属表面会产生一种沿表面传播的

表面等离子体波 (SPW)。p 偏振光在表面发生全反射时,在特定的入射角会与 SPW 发生共振,称为表面等离子体共振 (SPR)。产生 SPR 时,SPW 可增强几百倍,因此 SPR 有显著的表面增强效应。

近年来, SIM^[4] 以其光毒性低、成像速度快、适用于观察活细胞等优点得到了越来越广泛的应用,然而传统 SIM 由于原理上的限制只能达到衍射极限两倍左右的成像分辨率。PSIM 将 SIM 与可调制的 SPI 结合起来,用 SPI 序列作为新的照明光源代替传统 SIM 中的激光干涉条纹,利用振镜扫描实现条纹变化,通过重建达到了相当于传统 SIM 两倍的分辨率。PSIM 的成像系统如图 4 所示^[18],图中照射到 xoz 和 $yo z$ 平面的入射角度是通过振镜 s1 和 s2 的扫描来实现的, s2 放在透镜 1 的后焦平面上,样品放在透镜 2 的焦平面上。

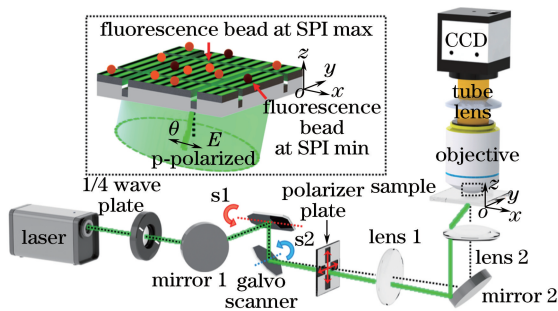


图 4 PSIM 系统示意图^[18]

Fig. 4 Schematics of the PSIM system^[18]

PSIM 与传统荧光显微技术成像效果的对比如图 5 所示^[18]。图 5(d)、(e) 中黄色虚线代表光学传递函数;图 5(f) 中蓝色曲线为传统荧光成像的截面强度分布,绿色和红色为 PSIM 重建后的荧光成像的轴向分布。

相比之下, PSIM 主要有以下优点:

1) 高分辨率。与传统 SIM 技术和 SSIM 技术相比, PSIM 的优势在于在不减帧速且不利用饱和和荧光效应的前提下获得高分辨率的显微图像。

2) 高信噪比。倏逝波在垂直方向上快速衰减,通过将激发光限制在样品表面一个很小的区域内即可得到较高的信噪比。

3) 成像分辨率不依赖于 NA。PSIM 原理上不依赖于 NA 的限制,利用较小 NA 的物镜仍可获得比 SIM 更高分辨率的图像。

4) 极大的应用前景。对于诸如哺乳动物细胞等需要对其表面进行观测的样品, PSIM 是一种能够较好地解决衍射极限问题、同时还具备较高对比度的成像手段。这种技术将在高速超分辨领域内产生巨大的影响。

3.2 芯片照明超分辨

基于芯片的 CWN, 简称芯片照明超分辨, 利用照明光在波导片与样品界面处产生的瞬逝场使得样品仅在表面极薄的部分得到激发, 从而减弱获取信号中背景信息的干扰, 实现超分辨。

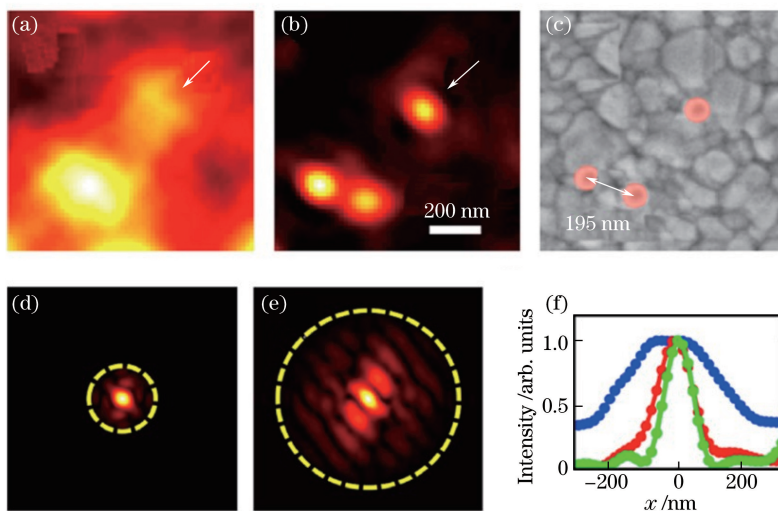


图 5 PSIM 下直径为 100 nm 的荧光颗粒^[18]。(a) 传统的荧光显微图像; (b) 重建的 PSIM 图像; (c) 对应的扫描电子显微镜图像; (d) 图 5(a) 的傅里叶变换; (e) 图 5(b) 的傅里叶变换; (f) 荧光强度分布

Fig. 5 Fluorescent particles with diameter of 100 nm obtained by PSIM^[18]. (a) Conventional fluorescence microscopic image; (b) reconstructed PSIM image; (c) corresponding scanning electron microscope image; (d) Fourier transform of

Fig. 5(a); (e) Fourier transform of Fig. 5(b); (f) fluorescence intensity distribution

CWN 技术是由 Grandin 等^[19]在 2006 年提出的,并由 Diekmann 等^[20]在 2017 年进行改进。Diekmann 等利用波导片实现了照明光与探测光的完全分离,在原有的平板波导的基础上研制了可控能力更强的肋形波导和带状波导^[20],如图 6 所示,将复杂的光学功能集成在以波导片为主体的通用平台上。图 6(a)是在原有平板波导的基础上部分蚀刻形成的肋形波导,图 6(b)是在原有平板波导的基础上完全蚀刻至二氧化硅(SiO_2)底板形成的带状波导,两种情形下波导通道的宽度都是 25~500 μm 。CWN 的主要优点有:1) 波导片的应用将激发光路完全从显微系统中分离出去,使用时无需考虑光路的耦合,大大降低了整套设备的复杂度;2) 波导片利用光在高折射率材料和周围介质(水或细胞)间的界面上发生全内反射的原理,高效地利用瞬逝场照明样品;3) 由于其对照明光在空间上的严格限制,图像具有较高的信噪比;4) 由于照明光与成像光的物镜非相关,因此可以随意根据需要更换不同放大倍数/分辨率的物镜;5)

由于该技术对光信号的利用效率高,使用 NA 较小的物镜即可在获得较大视场的同时,确保图像的分辨率不至于太差。

Diekmann 等^[20]利用两种互补的技术——ESI 技术和直接 STORM(dSTORM)技术,展现了基于波导芯片的超分辨荧光显微成像技术的功能。他们分别用两种技术观察了小鼠肝窦内皮细胞中肌动蛋白细胞骨架和质膜相互作用形成的开孔。两种技术的主要差异如表 1 所示。由表可知,CWN 可以极大地提升显微成像的空间分辨率,但当它与 STORM 等技术结合使用时,受到时间分辨率的限制,无法进行活细胞成像。这项技术解决了一直以来存在于超分辨显微技术中的缺陷,提高了超分辨显微系统的应用性能,有极大的市场价值和开发前景。此外,该技术为研究者提供了新的思路,基于芯片的激光产生、过滤和调制技术将为超分辨显微领域带来发展的新动力。可以预见,未来的超分辨显微领域将会因为光子集成电路的发展而再次产生较大的飞跃。

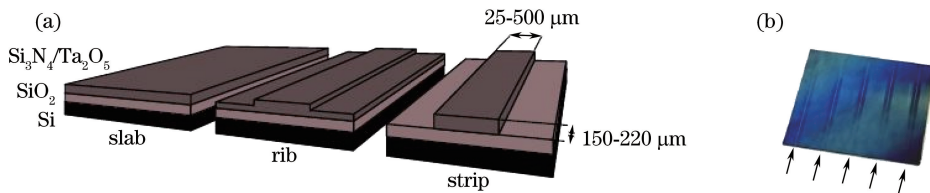


图 6 波导片。(a)肋形波导;(b)带状波导

Fig. 6 Waveguide chips. (a) Rib waveguide; (b) strip waveguide

表 1 基于芯片的 ESI 技术和 dSTORM 技术的主要差异

Table 1 Main differences between chip-based ESI and dSTORM technologies

Parameter	Chip-based	Chip-based
	ESI technology	dSTORM technology
Acquisition time	<25 s	8-30 min
Resolution with $\times 20$ lens /nm	340	<140
Resolution with $\times 60$ lens /nm	110	<50

4 偏振超分辨成像技术

荧光的基本物理尺寸包括强度(反映荧光浓度)、波长(吸收和发射光谱)、时间(荧光衰减寿命)和偏振(由偶极子取向产生)。诺贝尔奖获得者 Betzig 教授^[21]在 1995 年曾提出可以通过在不同维度上分离相邻的分子来实现超分辨成像,荧光的偏振与发色团的偶极子取向有关,使得使用荧光偏振

显微揭示生物大分子的结构和功能成为可能。然而,偏振作为荧光的第四维度,在超分辨领域的发展中一直处于初级阶段。

2014 年,Walla 课题组^[22]通过对激光进行偏振调制和稀疏重构来实现超分辨成像,该课题组提出的偏振调制超分辨(SPoD)技术在不需要结构光照明、开关调制以及闪烁荧光探针的条件下通过偏振调制以及偏振角度缩小实现了超分辨成像,将偏振引入超分辨显微成像领域。偏振调制数据采用 SPEED(Sparsity Penalty-Enhanced Estimation by Demodulation)反卷积算法进行解调,从而重构超分辨图像。该方法虽然可以实现超分辨,但重构期间会导致偶极子方向信息丢失。对于究竟是 SPoD 带来了超分辨还是 SPEED 重构算法带来了超分辨仍存在着争论。2015 年,Frahm 等^[23]对此提出质疑并发表了针对这一文章的评论:利用荧光偏振不能够获得进一步的超分辨。Walla 课题组^[24]一方面承

认 Keller 等的观点,另一方面则用新的实验捍卫他们自己的工作。关于偏振调制能否带来超分辨信息目前仍然存在着争议。

2016年10月31日,Nature Methods 杂志的“研究亮点”栏目报道了由北京大学席鹏课题组及其合作者提出的一种新的基于偏振偶极子方位角的 SDOM (Super-Resolution Dipole Orientation Mapping) 技术^[25-26],该技术引入荧光的偶极子角

表2 基于荧光偏振显微镜的 SPoD 技术和 SDOM 技术的主要差异

Table 2 Main differences between SPoD and SDOM technologies based on fluorescence polarization microscope

Technology	Algorithm	Orientation information	Acquisition time	Resolution
SPoD	SPEED	No	About 300 ms	About 100 nm
SDOM	Polarization-variant deconvolution	Yes	About 200 ms	About 100 nm

通过比较不难看出,SDOM 技术在时间分辨率和图像分辨率上均优于 SPoD 技术,且具有激光功率低和成像速度快的优势,因此可被用于动态活细胞成像。但是,作为一种偶极子分辨技术,SDOM 技术也存在一定的局限性:SDOM 技术需要利用不同的偶极子取向信息来分辨细节,对于密集标记的均匀取向样品,由于偶极子取向采用平均值,SDOM 技术难以解析偏振角信息。

另一种偏振超分辨技术主要基于单分子成像。Cruz 等^[27]提出的偏振解析 dSTORM (polar-dSTORM) 可在一帧中测量单个荧光偶极子,并通过随机切换开/关状态在其他帧中测量其他的偶极子取向,再通过重建获得整体的超分辨率图像。在 polar-dSTORM 中,为了保持单分子定位中的高信噪比,使用两个探测通道来实现平面取向内偶极子取向信息的测量,并忽略单个偶极子的摆动信息。通过重建算法计算每帧中单个分子的方位

度作为荧光分子的第四维度,同时从荧光强度和荧光各向异性等方面来考虑偏振调制能否带来更多超分辨信息,完美回答了上述争论问题。Zhanghao 等^[26]在 SPoD 技术的基础上提出了 SDOM 技术,利用稀疏反卷积算法代替了 SPEED 算法,在实现相同强度分辨率的条件下进一步获取了偶极子取向信息,两种成像方式的对比如表 2 所示。

角和位置,可以实现单分子的精确定位和取向测量。其中,取向信息中包括从每帧图片中的荧光各向异性直接测得的平均偶极子取向信息和静态估计出的摆动孔径角。polar-dSTORM 可用于生物细丝的纳米取向成像,包括 dsDNA、actin 蛋白和细胞微管成像,可以给出点取向和摆动角的定量结果。由于 polar-dSTORM 的成像时间大约为 2~40 min,加上其特定的样品制备要求,使得它在活细胞成像中受限。

在 Hafi、Zhanghao 以及 Cruz 等的研究中,已经将利用偏振维度的超分辨荧光显微镜运用到对海马切片、哺乳动物细胞和酵母细胞的观察之中。相比于其他超分辨技术,利用偏振实现超分辨的优势在于:在不牺牲成像速度和样品毒性的前提下实现了传统分辨率两倍以上超分辨。因此,未来荧光偏振超分辨显微镜可在更多的生物领域中发挥作用。几种新型成像方法对比如表 3 所示。

表3 几种新型成像方法对比

Table 3 Comparison of several new imaging methods

Method	Name	Spatial resolution	Time resolution	Specimen requirement
Expansion microscopy	ExM	70 nm	Depend on what kind of microscopy used	Escherichia coli, mammalian cells, mouse cortex and brain hippocampus, etc
	iExM	25 nm		
Surface enhanced microscopy	PSIM	2.6-fold of epi-fluorescence	Depend on what kind of microscopy used	Just proved in beads
	CWN	50 nm (with dSTORM)	8 frame·s ⁻¹ (with ESI)	Stationary samples that need specific preparation
Fluorescence polarization microscopy	SPoD	100 nm	3 frame·s ⁻¹	Limited by densely labeled and heterogeneously samples
	SDOM	100 nm	5 frame·s ⁻¹	Limited by densely labeled, and homogeneously orientated samples
	polar-dSTORM	10 nm	2-40 min	Stationary samples that need specific preparation

5 总 结

近年来,超分辨技术发展迅速,被评选为2014年Nature Methods的十大年度方法之一,并先后实现了多色、三维、活细胞快速成像。超分辨技术突破了传统光学成像中的衍射极限,将传统成像分辨率提高了2~20倍,其在生物领域中的应用也愈加广泛,实现了对细胞膜蛋白分布、细胞骨架、线粒体、染色质和神经元突触等诸多精细结构的观察,极大地加快了生命科学领域的研究进展。但是,原有的超分辨成像技术受原理限制,在成像速度或分辨率水平等成像特性上很难再有突破,因此新型超分辨技术的发展显得尤为重要。

在此介绍了最近出现的几种新型超分辨技术。从上述描述中可以看出,几种新型的超分辨技术在不同的应用中各有所长,为光学成像领域带来了新的曙光。随着人们对生命科学领域的不断深入探索,超分辨技术将会继续发展以满足不同的应用需求。未来需要在并行化、高速、活细胞和活组织方面,实现超高时空分辨活体成像。科研人员需要不断开拓思维来推动新型超分辨技术的发展,使得超分辨领域朝着3D实时动态活细胞成像的目标不断前进。

参 考 文 献

- [1] Hao X, Kuang C F, Gu Z T, *et al.* From microscopy to nanoscopy via visible light[J]. *Light Science & Applications*, 2013, 2(10): e108.
- [2] Yang X S, Xie H, Alonas E, *et al.* Mirror-enhanced super-resolution microscopy[J]. *Light Science & Applications*, 2016, 5(6): e16134.
- [3] Hell S W. Microscopy and its focal switch[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(1): 24-32.
- [4] 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.
- [5] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313 (5793): 1642-1645.
- [6] Hess S T, Girirajan T P K, Mason M D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2006, 91(11): 4258-4272.

- [7] Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3 (10): 793-795.
- [8] 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.
- [9] Yahiyaene 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.
- [10] Chen F, Tillberg P W, Boyden E S. Expansion microscopy[J]. *Science*, 2015, 347(6221): 543-548.
- [11] Marblestone A H, Boyden E S. Designing tools for assumption-proof brain mapping[J]. *Neuron*, 2014, 83(6): 1239-1241.
- [12] Geertsema H, Ewers H. Expansion microscopy passes its first test[J]. *Nature Methods*, 2016, 13 (6): 481-482.
- [13] Tillberg P W, Chen F, Piatkevich K D, *et al.* Protein-retention expansion microscopy of cells and tissues labeled using standard fluorescent proteins and antibodies[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(9): 987-992.
- [14] Chen F, Wassie A T, Cote A J, *et al.* Nanoscale imaging of RNA with expansion microscopy[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(8): 679-684.
- [15] Chang J B, Chen F, Yoon Y G, *et al.* Iterative expansion microscopy[J]. *Nature Methods*, 2017, 14 (6): 593-599.
- [16] Wei F F, Liu Z W. Plasmonic structured illumination microscopy[J]. *Nano Letters*, 2010, 10(7): 2531-2536.
- [17] Fleischmann M, Hendra P J, Mcquillan A J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode[J]. *Chemical Physics Letters*, 1974, 26(2): 163-166.
- [18] Wei F F, Lu D, Shen H, *et al.* Wide field super-resolution surface imaging through plasmonic structured illumination microscopy[J]. *Nano Letters*, 2014, 14(8): 4634-4639.
- [19] Grandin H M, Stadler B, Textor M, *et al.* Waveguide excitation fluorescence microscopy: A new tool for sensing and imaging the biointerface[J]. *Biosens Bioelectron*, 2006, 21(8): 1476-1482.
- [20] Diekmann R, Helle Ø I, Øie C I, *et al.* Chip-based wide field-of-view nanoscopy[J]. *Nature Photonics*,

2017, 11: 322-328.

- [21] Betzig E. Proposed method for molecular optical imaging[J]. Optics Letters, 1995, 20(3): 237-239.
- [22] Hafi N, Grunwald M, van den Heuvel L S, *et al.* Fluorescence nanoscopy by polarization modulation and polarization angle narrowing [J]. Nature Methods, 2014, 11(5): 579-584.
- [23] Frahm L, Keller J. Polarization modulation adds little additional information to super-resolution fluorescence microscopy[J]. Nature Methods, 2015, 13(1): 7-8.
- [24] Hafi N, Grunwald M, van den Heuvel L S, *et al.* Reply to " Polarization modulation adds little additional information to super-resolution fluorescence microscopy" [J]. Nature Methods, 2015, 13(1): 8-9.
- [25] Strack R. Imaging: Orientation mapping in super-resolution[J]. Nature Methods, 2016, 13: 902.
- [26] Zhanghao K, Chen L, Yang X S, *et al.* Super-resolution dipole orientation mapping via polarization demodulation [J]. Light: Science & Applications, 2016, 5(10): e16166.
- [27] Cruz C A V, 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-E828.