

# 超分辨光学显微的成像原理及应用进展

付芸\*, 王天乐, 赵森

长春理工大学光电工程学院, 吉林 长春 130022

**摘要** 突破了衍射极限的超分辨光学显微成像通常被用于观测亚细胞的结构特性及其相互作用,对于研究基因组和攻克重大疾病具有重要意义。首先分别介绍了 4 种典型的超分辨显微成像技术的工作原理,然后阐述了多色荧光成像和三维成像等观测手段的研究进展,最后综述了近年来国内外超分辨光学成像在细胞活动观测、细菌细胞研究和细胞骨架观测中的应用现状。文中指出,影响成像质量的主要因素包括荧光蛋白较差的光稳定性、低的光活化速率以及弱的荧光强度等。随着上述问题的解决,超分辨光学成像将在厚样品三维成像、多色荧光成像和活细胞快速成像等方面得到广泛应用,最终推动生命科学、材料科学的发展。

**关键词** 显微; 衍射极限; 荧光成像; 活细胞成像; 多色荧光成像; 三维定位

中图分类号 Q27; Q63

文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP56.240002

## Imaging Principles and Applications of Super-Resolution Optical Microscopy

Fu Yun\*, Wang Tianle, Zhao Sen

*School of Optoelectronic Engineering, Changchun University of Science and Technology,  
Changchun, Jilin 130022, China*

**Abstract** Ultra-resolution optical microscopy, which breaks through the diffraction limit, is typically used to observe structural characteristics and interactions of subcells. This method has great significance for the study of genomes and tackling major diseases. This paper begins by introducing the working principles of four typical super-resolution microscopic imaging techniques. Subsequently, research progress in the areas of multi-color fluorescence imaging and three-dimensional imaging is emphasized. Finally, recent applications of super-resolution optical imaging for cell activity observation, bacterial cell research, and cytoskeleton observation are reviewed both domestically and abroad. The main factors reportedly affecting the imaging quality are poor light stability of the fluorescent protein, low light activation rate, and weak fluorescence intensity. Solution of the above problems will lead to the widespread use of super-resolution optical imaging for the three-dimensional imaging of thick samples, multi-color fluorescence imaging, and fast imaging of living cells, ultimately furthering the development of life science and materials science.

**Key words** microscopy; diffraction limit; fluorescence imaging; live-cell imaging; multicolor fluorescence imaging; three-dimensional localization

**OCIS codes** 180.2520; 170.0180; 170.2520; 110.0180

## 1 引言

在人类探索微观世界的进程中,显微镜起了决定性作用,它的发明与发展推动了生物学、医学、化学、物理学的进步。最初,人们用肉眼仅能分辨

0.1 mm的物体。19 世纪末,光学显微镜的分辨率达到 0.2  $\mu\text{m}$ ,借助它人们能看到细胞及其部分结构。20 世纪 30 年代出现了电子显微镜,其分辨率为 50 nm,使人们看到了更精细的细胞结构。20 世纪 80 年代初发明的扫描隧道显微镜的分辨率达到

收稿日期: 2019-04-15; 修回日期: 2019-05-12; 录用日期: 2019-06-05

基金项目: 吉林省重点科技计划(20170204015GX,20180201049YY)

\* E-mail: linda\_fy@cust.edu.cn

了 0.01 nm,从而将人们带入了原子的世界。相比于光学显微镜,电子显微镜缺乏荧光光学显微镜的基本优势,即高度特异性的多色标记和活细胞成像。然而,光学显微镜受光的衍射效应和光学系统有限孔径的限制,存在分辨率  $\delta$ (也称阿贝极限),即  $\delta=0.61\lambda/(n\sin\alpha)$ ,其中, $\lambda$  为光源的波长, $n$  为折射率, $\alpha$  为孔径角。假设光源的波长  $\lambda$  为 400 nm,物镜和样本之间的介质为空气(折射率  $n=1$ ),此时的分辨率为 200 nm。这个分辨率对于平均直径为 10~20  $\mu\text{m}$  的人体细胞来讲是足够了,但是对于亚细胞结构,如线粒体、中心体、高尔基体、细胞骨架等,还远远不够。生物医学的研究与发展需要更高分辨率显微镜,超分辨光学显微镜应运而生<sup>[1]</sup>。超分辨光学显微镜突破了传统光学显微镜的衍射极限,将分辨率从几百纳米提高到几十纳米,显微镜下直径为 200~750 nm 的模糊一团的时代过去了<sup>[2]</sup>,人类的观测视野上升到一个新水平。

超分辨光学显微的成像原理主要分为两类:一类是基于单分子定位显微(SMLM)成像,它包括光激活定位显微(PALM)和随机光学重构显微(STORM);另一类是基于点扩展函数(PSF)调制的超分辨显微成像,它包括受激发射损耗显微(STED)和结构光照明显微(SIM)。鉴于超分辨成像对生物学研究的重大影响,2014年诺贝尔化学奖被授予对超分辨荧光显微成像作出卓越贡献的3位科学家——美国霍华德·休斯医学研究所教授 Eric Betzig、德国马克斯·普朗克生化研究所教授 Stefan W. Hell 和美国斯坦福大学教授 William Moerner<sup>[3]</sup>。

近年来,超分辨光学显微成像被广泛地应用于生物医学研究中,纳米级的分辨率使其在分子水平上的研究成为可能,因此活体细胞观测技术也越来越成熟。利用活细胞观测技术,人们可以实时跟踪与定位活细胞内的基因<sup>[4]</sup>,这有利于理解基因及其相互作用,也让人们看到了攻克癌症、治愈人类重大疾病的希望。本文在详细说明各种超分辨光学成像原理的基础上,着重阐述了多色荧光成像和三维定位与成像等观测手段的研究成果,最后综述了超分辨成像技术在生命科学研究,包括细胞活动观测、细菌细胞研究和细胞骨架观测方面的应用进展,旨在推动超分辨成像技术的发展。

## 2 超分辨光学成像原理

### 2.1 单分子定位

在基于 SMLM 技术的超分辨成像中,PALM

与 STORM 的原理十分相似,成像过程包括多次循环,每个循环期间荧光团被连续地激活、成像和去活化。然而,为了实现荧光团的高精度定位,通常使用低强度激光(保证一定密度的激活分子),循环地随机激活不同的荧光团,使得各个荧光团的图像互不重叠,从而有助于确定荧光团的位置<sup>[5]</sup>。它们的区别在于所用标记的类型不同:PALM 用荧光蛋白进行标记,收集到光子的数量较少,从而限制了它的分辨率;STORM 用荧光染料进行标记,可以在给定的时间内发射更多的光子<sup>[6]</sup>,但是,荧光染料可能具有的光毒性限制了其在活细胞标记中的应用。PALM 一般用于观察细胞外源表达的蛋白质,而 STORM 则多用于研究细胞内源蛋白质的定位<sup>[7]</sup>。随着荧光团技术和其他相关 SMLM 技术的发展,这些差异将会变得更小<sup>[8]</sup>。

Betzig 等<sup>[9]</sup>用光活性绿色荧光蛋白(PA-GFP)标记蛋白质。首先,采用 405 nm 激光以低能量照射细胞表面,激活稀疏分布的几个荧光分子;然后用 561 nm 激光照射,使已经激活的荧光分子受激发射荧光,接着继续照射将使这些发光的荧光分子漂白,而不能被下一轮激发光再次激活。随后,交替使用 405 nm 和 561 nm 激光激活,激发和漂白其他的荧光分子,进入下一个循环,这就是光激活定位显微术。荧光光活化定位显微(FPALM)<sup>[10]</sup>是 PALM 方法的一个延伸,两者原理相似,即:发光的荧光团经 CCD 摄像机成像后,荧光分子被可逆地灭活或不可逆地光漂白而从视场中消失,这些可光活化分子的活化速率或光漂白速率受光强的控制。Rust 等<sup>[11]</sup>和 Dempsey 等<sup>[12]</sup>利用不同波长的激光照射光开关荧光基因,使其发生荧光态-暗态转换,获得了比传统光学显微镜高 10 倍的分辨率,并将这一过程命名为 STORM<sup>[13]</sup>。单分子定位的优点在于可以实现高分辨率的宽视场成像,缺点则是需要循环成像,由于反复激活和淬灭荧光分子,所需时间长,其时间分辨率较低。光激活定位显微术和随机光学重构显微术的原理如图 1 所示。

图 1 表示标记样品结构的荧光探针在不同时刻被激活,使得荧光基因在没有空间重叠的情况下被精确地定位。反复的激活和成像过程能够依次确定许多荧光探针的位置,然后由这些位置已知的探针分子就可重建出超分辨率图像。图 1(b)中左下角显示了一种单一荧光染料和高精度定位的分子图像(十字标记)。

PALM 和 STORM 都属于宽场成像,横向分辨

率为 10~30 nm,轴向分辨率为 10~75 nm,时间分辨率可达秒量级。虽然它们的空间分辨率都很高,

但成像时间相对较长,对标记密度较为敏感,且荧光团之间的串扰等也是需要解决的问题<sup>[14]</sup>。

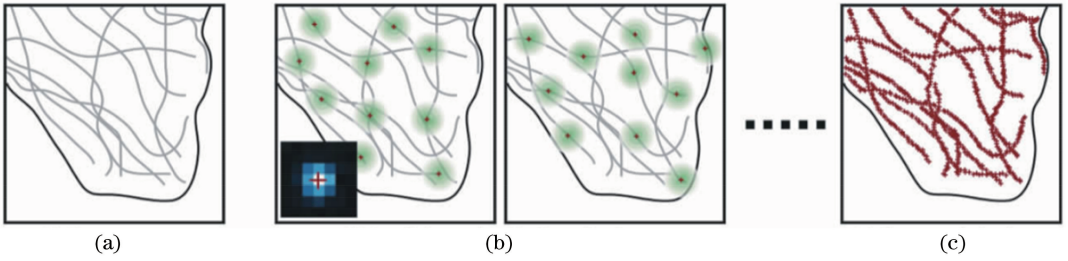


图 1 随机光学重构显微术、光激活定位显微术和荧光光活化定位显微术的原理<sup>[13]</sup>。

(a) 目标结构; (b) 已激活的探针定位; (c) 超分辨图像

Fig. 1 Principle of stochastic optical reconstruction microscopy (STORM), photoactivated localization microscopy (PALM), and fluorescence photoactivation localization microscopy (FPALM)<sup>[13]</sup>. (a) Target structure; (b) localization of activated probes; (c) super-resolution image

## 2.2 PSF 调制

与单分子定位不同,PSF 是基于特殊强度分布照明光场的成像方法。STED 技术<sup>[15-18]</sup>采用两束共

轴激光,分别为激发光和损耗光,如图 2 所示。在激发光的照射下,基态的荧光分子吸收光子跃迁到激发态;延迟几皮秒之后再使用甜甜圈型(Doughnut)

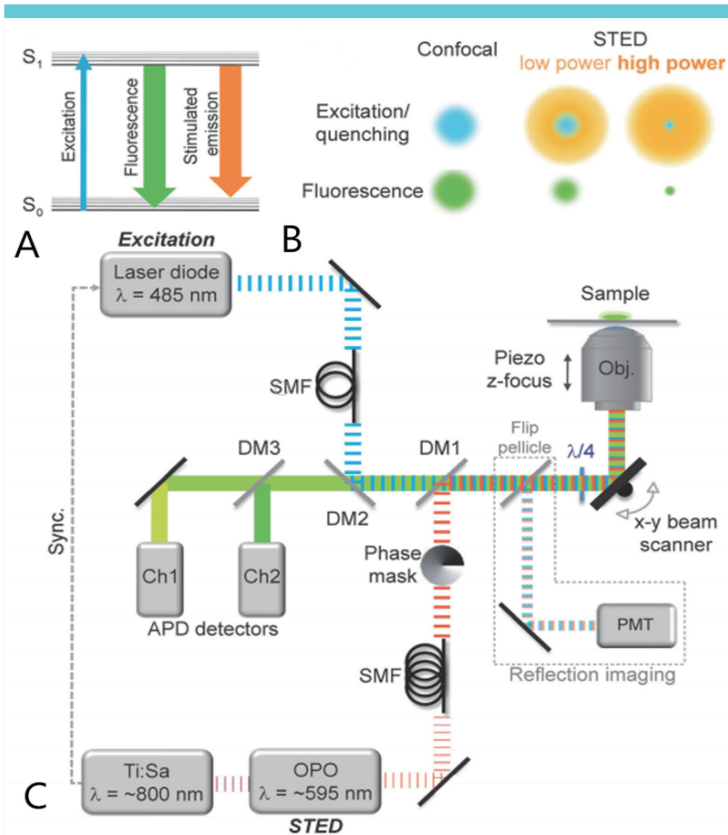


图 2 STED 显微的原理<sup>[15]</sup> (A 为简化的 Jablonski 图,描述了荧光周期内绿色荧光蛋白(GFP)的能量跃迁;B 给出了使用甜甜圈型 STED PSF 荧光发射的空间限制;C 为使用绿色和黄色发射探针进行活体脑切片双色超分辨成像的受激发射损耗显微镜的设计方案)

Fig. 2 Basic principle of STED microscopy<sup>[15]</sup>. (A is simplified Jablonski diagram describing the energy transitions of green fluorescent protein (GFP) during a fluorescence cycle; B is spatial restriction of fluorescence emission using doughnut shaped STED PSF; C is design of a home-built STED microscope for performing two-color super-resolution imaging of green and yellow emitting probes in living brain slices)

耗损光进行照射,当激发态的荧光分子遇到一个入射光子,而且这个光子的波长刚好等于基态与激发态之间的能量差时,将产生受激发射,从而使得这个区域内的荧光分子进入不发光的耗损态。随着STED激光器功率的提高,饱和耗损区将逐渐扩大,但不影响焦点上的荧光发射。也就是说,仅在焦点处一个小区域内才能看到荧光信号,从而降低了PSF的有效宽度,实现超分辨率成像。这项技术的优点是无需进行后续的图像处理、分辨率高且成像速度快,缺点则是激发光的功率高,可能会损伤活细胞,不适合用于活细胞的观测。STED是在共聚焦显微镜的基础上加入一束甜甜圈型耗损光实现的,横向分辨率为 $20\sim 70\text{ nm}$ ,轴向分辨率为 $40\sim 150\text{ nm}$ ,时间分辨率为毫秒量级<sup>[14]</sup>。

SIM技术<sup>[19-21]</sup>需要生成特殊的照明模式。在照明光路中插入一个结构光调制器(如光栅、数字微镜阵列DMD或空间光调制器),照明光经光栅调制后再经过物镜投射到样品表面,形成正弦照明模式,

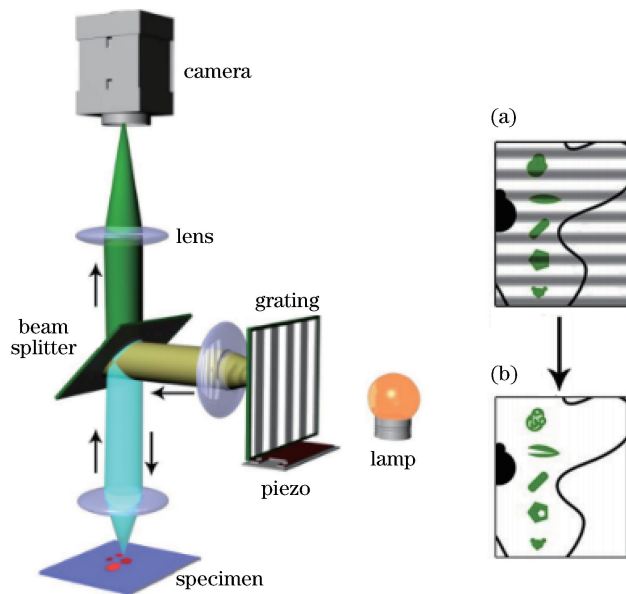


图3 SIM原理<sup>[22]</sup>。(a)原图像;(b)重构图像

Fig. 3 Principle of SIM<sup>[22]</sup>. (a) Raw image; (b) reconstructed image

图4(b)所示的结构光模式照射在一个具有细小特征的样品[图4(a)]上,形成叠栅条纹,如图4(c)所示,经过傅里叶空间变换后得到的结果显示在图4(d)中。其中:半径为 $f_{\text{cutoff}}$ 的灰色圆对应于表面荧光显微镜的观测区域;中间圆与左右两个圆之间的区域代表着高频信息,可以通过结构光耦合到可观测区域。空间位移由照明模式的空间频率 $f_1$ 决定。

为了提高分辨率,STED和SSIM都需要很高

如图3所示。在正弦结构光的照射下,样品发射荧光。当激发光强度较低时,荧光发射强度与激发光强度成正比,属于线性结构光照明。当激发光强度增大至峰值时,强激发光使荧光发射饱和;而在零点处,不激发荧光基团,使得有效的照明模式中出现锐利的暗区,此时荧光强度分布呈非线性,属于非线性结构光照明,即饱和结构光照明(SSIM)<sup>[22]</sup>。正弦照明模式生成一个空间频率远低于样品的叠栅条纹,可以通过显微镜成像。然而,空间频率远高于照明模式的精细结构依然不可分辨。SSIM将高频分量引入到照明模式中,这些高频分量分别是线性结构光的二次谐波、三次谐波或更高次谐波频率<sup>[19,23]</sup>,能够观测到远低于衍射极限的特征。SIM属于宽场显微成像,横向分辨率为 $100\sim 130\text{ nm}$ ,轴向分辨率约为 $300\text{ nm}$ ,时间分辨率可达毫秒量级。此种成像方法的实验过程和样品设备较为简单,但其重建算法可能会造成伪影。图4给出了SIM增强分辨率的原理。

的入射光功率。STED使用了相对较高的激光器强度,采集后可直接生成超分辨图像,不需要进行任何额外的数据处理<sup>[8]</sup>。理论上讲,只要激发光功率足够大,SSIM就可以不受分辨率的限制,较好地观测活体细胞,达到 $50\text{ nm}$ 的分辨率。然而,SSIM必须克服一些特殊的限制,比如,高强度照明光所引起的荧光漂白和比SIM更慢的成像速度<sup>[24]</sup>。因此,Li等<sup>[25]</sup>提出了图案激活的非线性SIM,用以提高非线性SIM的成像速度。

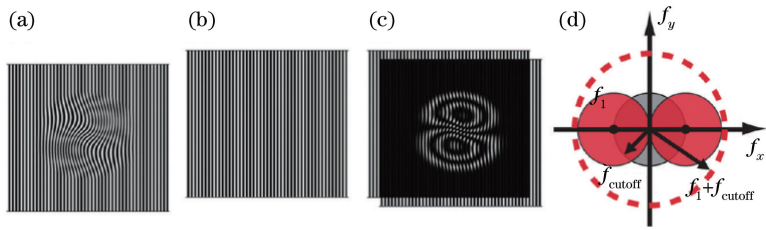


图4 SIM分辨率增强原理<sup>[24]</sup>。(a)具有细节特征的样品;(b)结构光照明模式;  
(c)由图4(b)和图4(a)叠加形成的叠栅条纹;(d)SIM的傅里叶空间变换

Fig. 4 Principle of resolution enhancement of SIM<sup>[24]</sup>. (a) Sample with detail features; (b) structured illumination pattern;  
(c) Moiré fringes formed by superposing structured illumination pattern in Fig. 4(b) with sample in Fig. 4(a);  
(d) Fourier space representation of SIM

除上述4种典型的超分辨成像方法外,还有诸如RESOLFT<sup>[26]</sup>、GSD<sup>[27]</sup>、DNA-PAINT<sup>[28]</sup>、SOFI<sup>[29-30]</sup>等方法。可逆饱和荧光跃迁(RESOLFT)的原理类似于STED,都是通过重复利用荧光分子的快速激发与淬灭特性实现超分辨,两者的区别是淬灭方式不同,RESOLFT使用特定波长的光关闭荧光蛋白。此外,RESOLFT的基态损耗(GSD)也与STED相似,即将粒子激发到高能自发辐射级,但相对于STED,RESOLFT消耗的能量较少。点积累在纳米尺度的地形成像(DNA-PAINT)使用短染色标记的寡核苷酸和它们的互补目标瞬时结合,生成必要的闪烁来开启随机超分辨显微成像。将DNA分子的可编程性和特异性用于成像和标记探针,可以实现超分辨。超分辨光学涨落成像(SOFI)利用荧光发射强度随时间的涨落现象,在多个时间尺度上采集量子点荧光涨落图像序列,通过图像中像素点相关累积量函数运算就可以得到超分辨图像。

## 2.3 观测手段

### 2.3.1 多色荧光成像

清晰地分辨生物结构有助于理解生物系统的状态,但还不足以表达不同结构或生物分子间的相互作用。多色超分辨成像使用具有鲜明颜色的探针标记不同的成分,将不同颜色之间的共定位作为相互作用指示器。共定位的准确性仅受成像方法固有分辨率的限制<sup>[13]</sup>。多色荧光成像的快速、高分辨率、简单性、非侵入性等特征表明它可在纳米尺度的细胞结构中实现分子间相互作用的可视化<sup>[31]</sup>。

以往采用荧光共振能量转移(FRET)观测生物分子间的相互作用特别有效,但是,实现图像上分子的精确定位有一定难度。STORM利用化学合成的有机荧光分子对,如Cy5-Cy3,标记细胞内的生物蛋白。Bates等<sup>[32]</sup>设计了一组光转换的荧光探针,每

个探针包含一个光转换的“报告子”荧光基团,该基团能在荧光态和暗态之间转换;此外,每个探针还包含一个“激活子”,它可以提高“报告子”的光激活特性。反复和特异性地激活少数个体可以实现纳米级定位,再把多次激发的结果叠加,就可以构建出超分辨率的STORM图像,图像的横向分辨率为20~30 nm,轴向分辨率为50~60 nm。不同激活子-报告子对不仅能通过发射光的颜色(由报告子决定)进行区分,还能通过激活光的颜色(由激活子决定)进行区分,因此,报告子-激活子的配对组合能形成许多不同颜色的探针,这就是多色随机光学重建显微成像。这种方法常被用于DNA模型样品<sup>[33]</sup>和一个完整的哺乳动物细胞的多色荧光成像。

量子点随机光学重构显微-自适应光学(QSTORM-AO)成像利用计算机辅助可变形透镜调节厚组织成像时产生的畸变。Xu等<sup>[34]</sup>采用可见光/近红外量子点(CdSe/ZnS)以及两个带通滤光片分别对氧化量子点成像,实现了多色成像。光的持续照明会引起光诱导氧化,使得CdSe量子点直径变小,导致荧光发射峰位置蓝移80 nm,从而使得通道间没有重叠区域。利用这种技术,Xu等观察到两个线粒体的区室之间有一个细长的管状连接结构,这在宽场显微成像中是无法看到的。

在STED中使用甜甜圈型的损耗光瞬间关闭分子的荧光,然而损耗光的强度会加剧光子的漂白。将荧光基团发射的荧光限制在指定的超衍射区域(MINFIELD)内,促使激发态的荧光分子在发射荧光之前经过受激发射返回基态,使得STED法不需要高强度的损耗光。STED/RESOLFT可从根本上减小光漂白,结果表明光漂白被大幅缩小<sup>[35]</sup>。由于分辨率和信号受到荧光去激发效率和光漂白的限制,因此,Oracz等<sup>[36]</sup>探讨了这两个因素与常用的750 nm波长激光的脉冲宽度和功率的关系。Oracz

等在实验中采用红色和橙色发光染料,脉冲宽度从亚皮秒到连续波范围内可调,在 80 MHz 重复频率的条件下,平均功率达到了 200 mW,峰值功率为 1 kW,脉冲能量为 2.5 nJ。

通过一个长单链 DNA 分子与荧光标记的短寡核苷酸的瞬时结合(DNA-PAINT),仅采用单一的染料和激光光源,能够对多目标连续成像,从而完成简单和易实现的多路超分辨率成像,在体外合成的 DNA 结构具有小于 10 nm 的空间分辨率。Jungmann 等<sup>[37]</sup>在试管合成 DNA 结构上实现 10 种颜色的超分辨成像,并实现了对固定细胞中蛋白质的 4 色 2D 成像和 3 色 3D 成像。

Legant 等<sup>[38]</sup>利用自由扩散及细胞渗透性化学探针,通过晶格光片显微镜对 20  $\mu\text{m}$  厚的样品(包括分裂细胞和斑马鱼胚胎的神经瘤器官)进行了高精度定位和多色定位显微镜检查,获得了具有蛋白质特异性的光活化荧光团的超分辨率成像。

### 2.3.2 三维定位与成像

观察亚细胞结构可以了解细胞的结构与功能,对揭示生命的本质具有重要意义。传统方法仅能获取细胞三维结构在二维平面上的投影信息,而实际的细胞都具有立体结构。因此,出现了三维成像技术。

#### 1) 干涉测量法

一个发射光子可以与其自身干涉,光子的位置决定光程差,即相位关系。相位干涉法由两路相干光产生一个波长大小的调制信号,通过配置光学系统来保证干涉能够在一个较宽的横向范围内成像至面阵探测器(例如快速、并行采集的 CCD)上。这种方法不受强度变化和荧光寿命的影响,能够提供与位置相关的干涉相位角信息。将每个荧光分子产生的光子进行同时、多相位干涉,并与光激活定位显微术相结合的技术称为干涉测量光激活定位显微术(IPALM)。Wang 等<sup>[39]</sup>利用这种方法实现了丝状肌动蛋白细胞骨架的可视化。Buss 等<sup>[40]</sup>采用该方法观测原核微管蛋白同系物 FtsZ 及其相关蛋白 ZapA、ZapB 相对于内膜的空间分布,在  $x$ 、 $y$  和  $z$  方向上都获得了 20 nm 的分辨率。

3D-SIM 方法拓宽了之前使用两束干涉光的 2D-SIM 方法,可以产生沿着  $z$  轴向、 $x$  和  $y$  横向的模式。Kraus 等<sup>[41]</sup>提供了一个被验证的样品制备方案,用于标记培养的哺乳动物细胞的细胞核、图像采集和配准实践,以及核结构和表观遗传标记的下游图像分析。使用免疫染色和复制标记并结合图像分割、质心映射和开源环境下的最近邻分析等方法,

可以在单细胞中分析核结构的三维图像,以及在纳米尺度上按荧光标准归一化。

4Pi 显微镜<sup>[42]</sup>使用两个相对的显微物镜从两侧照射荧光物体,并收集两侧的发射荧光,共焦点的照射波前或共探测针孔的检测波前的相长干涉使其轴向分辨率约为共聚焦荧光显微镜的 4 倍。全细胞 4Pi 单分子转换纳米显微镜(W-4PiSMSN)能以 10~20 nm 的分辨率对整个哺乳动物细胞进行三维成像,成像厚度约为 10  $\mu\text{m}$ <sup>[43]</sup>。

#### 2) PSF 调制

这种方法通常以 PSF 的形状进行轴向编码,以实现精确的轴向定位<sup>[44]</sup>。相位掩模法可用于 PSF 调制,包括椭圆(散光)PSF、相位斜坡 PSF、双螺旋 PSF、自弯曲 PSF 等。

在 STORM 显微镜的成像光路中引入一个柱面镜<sup>[45]</sup>,在  $x$ 、 $y$  方向上引起光程差,可使离焦平面上的光斑呈椭圆形。由于椭圆的特征参数与轴向位置有关,因此,可以根据光斑形状推导出细胞的三维结构。不需要扫描样品,通过反复地随机激活光开关探针就可实现对荧光基团的精确定位,构造出的 3D 图像具有 20~30 nm 的横向分辨率和 50~60 nm 的轴向分辨率<sup>[46]</sup>。通过将量子点的异步光谱蓝移与随机光学重构显微镜、自适应光学结合起来,可实现多色三维超分辨率量子点成像(QSTORM),获得具有 24 nm 横向分辨率和 37 nm 轴向分辨率的三维图像<sup>[47]</sup>。

双螺旋 PSF(DH-PSF)宽场显微成像可在图像平面上得到两个主要波瓣,其角度方向随发射器的轴向位置旋转。通过使用可光活化的荧光团对稀疏子集重复成像,最终得到高密度荧光分子的三维超分辨成像<sup>[48]</sup>。为了进一步验证被动跟踪单个量子点在活细胞内的扩散和主动运输,Jia 等<sup>[49]</sup>设计了一个可实现双通道的无旁瓣自弯曲 PSF,称为基于艾里光束的自弯曲 PSF(SB-PSF)。SB-PSF 既可获得各向同性的三维定位精度,又可从实质上改善成像深度。这种方法可在 3  $\mu\text{m}$  成像深度上实现 10~15 nm 的各项同性的三维定位精度。

Baddeley 等<sup>[50]</sup>在物方光瞳平面的两半部分之间引入线性相位梯度,将 PSF 分成两个相对位置依赖于离焦的侧向波瓣。该方法在  $x$ 、 $y$ 、 $z$  轴上的分辨率均为 42 nm,可实现对心肌细胞微管的三维成像。还有一种单分子定位的三维分析方法,即基于随机光学重建显微镜的相对定位分析(STORM-RLA)<sup>[51]</sup>。该方法在  $xy$  平面上的分辨率为 20 nm,

在  $z$  方向上的分辨率小于 50 nm;此外,该方法可以用来定量评估共标记蛋白质簇之间重叠的频率及程度,以及计算三维重叠簇与非重叠簇之间的准确距离。因此,STORM-RLA 代表了蛋白质空间组织的高通量定量评估的重要进步。

### 3) 多平面成像法

多平面成像法需要采集多幅图像,是一种常见的三维成像方法。

像差校正多焦点显微法(MFM)使用衍射光栅来形成多个焦点位移图像和无像差再聚焦,生成 9 幅二维图像的实时聚焦叠加,从而以单分子灵敏度实现多色高分辨率三维成像<sup>[52]</sup>。利用多焦点显微镜对细胞分裂期间哺乳动物线粒体网络和酵母微管成像,对于 4  $\mu\text{m}$  深度的单分子(荧光蛋白或合成染料),取得 20 nm 横向分辨率和 50 nm 轴向分辨率<sup>[53]</sup>。

通过将 PALM 与共焦显微镜结合,即共焦相关 PALM(ccPALM),克服了解剖学背景对多细胞生物成像的限制。利用这项技术,Vangindertael 等<sup>[54]</sup>观察到秀丽隐杆线虫中的离子型谷氨酸受体分布,分辨率达到 20 nm,揭示了受体簇的超分辨率结构,并将其映射到动物的神经元上,实现了在生理学相关的背景下解剖具有单分子分辨率的生物结构。

双自适应 3D-STED 光学系统用一个变形镜同时消除三个光路中的色散。让变形镜(DM)表面的位置随着光程的变化而改变,可以校正每个波长的相位。再用空间光调制器(SLM)进行光束整形相位掩模,由于 DM 的表面形状受执行机构的限制,而 SLM 能够产生更复杂的相位分布,因此 SLM 用于校正 DM 无法消除的残余像差,从而使厚组织样品<sup>[55]</sup>的性能得到改善。Patton 等<sup>[56]</sup>用这种方法演示了黑腹果蝇大脑中复杂结构的三维 STED 成像。

三维点扩散函数倾斜光片显微(TILT3D)将新颖的光片照明方法与长轴点扩散函数相结合,用于低背景、单分子三维超定位,以及厚细胞三维超分辨率成像,整个哺乳动物厚细胞的三维成像达到数十纳米的定位精度。Gustavsson 等<sup>[57]</sup>使用双螺旋 PSF 单分子检测,以及用于基准珠跟踪和实时轴向漂移校正的四足动物 PSF,通过线粒体成像验证了 TILT3D 在哺乳动物细胞中的三维超分辨率成像。使用光片照射法可以减少离焦背景光的干扰,实现单分子的精确定位。

## 3 生命科学中的应用

细胞中的细胞膜、核糖体、各种膜结构,以及各

种细胞器的内部详细结构,都属于超微结构,也称亚显微结构。由于细胞内各种结构的尺度量级都非常小,如微管和核糖体一般在 20 nm 左右,而一些蛋白质以及分子生物化学的传动装置常常小于 10 nm,因此需要纳米级的观测水平。超分辨显微成像实现了纳米尺度的观测<sup>[15]</sup>,不仅可以观察到细胞的亚显微结构,也可以观察到细胞活动的变化。在细胞核的研究中,研究人员利用荧光显微镜发现了细胞核在运动中的不稳定波动,并根据这些信号来判断细胞是否正常,实现了对人体细胞生命周期的监测,为一些疾病的治疗提供了依据。

### 3.1 细胞活动观测

细胞是生物有机体的基本单位。在活细胞内部进行着复杂而有序的生命活动,其中有许多与细胞代谢活动密切相关的运动过程<sup>[58-69]</sup>,如细胞膜内外的物质运输、细胞膜上的蛋白质运动、细胞内部的物质转运、细胞核内外的物质运输等。这些运动过程以及真核细胞的有丝分裂等对于生物学的研究具有重要意义,而超分辨荧光显微术的出现使得深入研究细胞活动成为了可能。

Bowler 等<sup>[70]</sup>采用随机光学重构显微镜和电子显微镜来准确判断远端附属蛋白的定位与中心微管和附属电子密度的关系。研究发现,远端附属物在有丝分裂前经历了戏剧性的超结构重组,在此期间,它们暂时失去了外部成分,而内部成分则保持着九重组织。此外,电子断层扫描发现,哺乳动物的远端附属物通过精细的丝状基底与两个中心微管三联体相关联,并且它们看起来几乎呈径向指状突起,这是一种在整个有丝分裂期间保持的风车状结构,这一发现对哺乳动物远端附属物的传统描述提出了挑战。邓月月<sup>[71]</sup>通过自行搭建的 STORM 平台清晰地展现了纺锤体的结构信息,为后续从提高空间分辨率角度研究卵母细胞非整倍体的形成机制提供了依据。

Betzig 等<sup>[9]</sup>将光激活定位显微术和活细胞单粒子跟踪(SPT)结合起来提出了一种新的观测方法,称为 sptPALM。该方法通过对膜蛋白 Gag 和 VSVG 成像,生成了单分子运动的空间分辨图,获得了比单粒子跟踪法高出几个数量级的细胞轨迹。通过探测分子的特异性子集,sptPALM 揭示了细胞膜的时空异构性,以及膜蛋白动力学的空间解析信息,从而给单分子提供了一个局部环境,为理解驱动各种行为的机制提供了重要线索,包括膜蛋白中普遍存在的聚类和反常扩散等行为。相比于普通荧光

成像,超分辨显微成像能够更细致地观测细胞姿态,捕捉更丰富的细节。

Hanne 等<sup>[72]</sup>在常用的 775 nm 波长的 STED 激光照射下,成功地实现了对具有商用价值的红色量子点的纳米尺度的观测。目前,单量子点可达到 50 nm 的分辨率,在纤维母细胞中用量子点标记的波形蛋白细丝的成像进一步证明了超衍射分辨率。如果考虑到探针的高度稳定性,则有望实现定时成像。Honigmann 等<sup>[73]</sup>通过扫描 STED-FCS(荧光相关光谱)揭示活细胞质膜中脂质相互作用的时空异质性。

Dudok 等<sup>[74]</sup>将细胞特异性的生理学、解剖学特征与超分辨率成像相结合,用于研究塑造小鼠海马体中突触内源性大麻素信号传导的生理特性的分子和结构参数,结果表明,在脑回路中进行内源性蛋白质分布的细胞类型特异性纳米级分析是可能的,并且能够识别先前未知的分子特性,这些特性控制内源性大麻素信号的传导和大麻在认知功能障碍中的调控作用。

### 3.2 细菌研究

细菌是生物的主要类群之一,也是生物中数量最多的一类,它的个体非常小,一般为 0.5~1  $\mu\text{m}$ 。受分辨率的限制,传统光学显微镜下的细菌内部结构大部分模糊不清。虽然电子显微镜的分辨率高,但在成像中要用胶体金免疫标记方法对细菌进行处理,这样做会导致细菌的内部结构遭到破坏,从而影响检测结果。因此,目前常将各种荧光标记方法与光学显微镜相结合进行活细菌内部结构的观测<sup>[75-77]</sup>。

鉴于细菌细胞的微小尺寸,确定 Z 环的体内结构是一个挑战。Jacq 等<sup>[75]</sup>在光活化定位显微镜上使用工程化 spDendra2(一种针对该细菌优化的光可转换荧光蛋白)对人类病原体肺炎链球菌进行研究。使用 spDendra2 标记内源表达的 FtsZ 可以在纳米级水平上揭示分裂循环期间内 Z 环形态的重塑。在这个过程中,环的轴向厚度和 FtsZ 聚集倾向的变化与细胞周期的发展相关。Holden 等<sup>[78]</sup>建立了一种高通量的光敏定位显微术,它能够在细胞周期的各个阶段对上百个细菌同时自动成像。Holden 等将已这种方法成功地用于新月杆菌中细菌细胞分裂蛋白 FtsZ 的研究中。Strauss 等<sup>[79]</sup>利用 3D SIM 超分辨显微术研究了 FtsZ 蛋白的珠状排列结构和分裂机制对触发细胞分裂的影响。

基于可光活化荧光蛋白 mIrisFP 的分裂,Chen 等<sup>[80]</sup>开发了一种三片段荧光互补(TFFC)系统,并将其用于活细胞内三元配合物的成像。使用 TFFC

和 PALM 的组合,即 TFFC-PALM 技术,能够以纳米级空间分辨率和单分子灵敏度来识别三元配合物的多体相互作用。

Wang 等<sup>[81]</sup>采用超分辨显微成像结合染色体构象捕获(Chromosome Conformation Capture, 3C)分析,研究了活体大肠杆菌细胞中主要的拟核相关蛋白(NAPs)的分布情况,并利用 STORM 研究了类组蛋白拟核结构蛋白(H-NS)在细菌中的分布及功能。结果表明,H-NS 与 DNA 结合的低聚反应促进了染色体中聚集体的形成。

Xia 等<sup>[82]</sup>利用 Nikon-STORM 系统研究了在体外内皮细胞(EC)的单分子层上,内皮表面糖原(ESG)的有组织超微结构,以及其组分在脓毒症发病过程中是如何失去的。这项新技术能够在正常和疾病条件下,从天然细胞环境中发现细胞功能的纳米级结构和分子机制。

### 3.3 细胞骨架观测

细胞骨架存在于古生菌、细菌和真核生物中,是真核细胞借以维持其基本形态的重要结构,是细胞内各种蛋白质纤维的聚合物,是调控蛋白相互纠缠连接的复杂的三维纤维状网架体系。要想了解细胞活动的真实姿态,必须细致地观测细胞骨架。微管是一种具有极性的细胞骨架,由  $\alpha$  和  $\beta$  两种微管蛋白组成,直径为 22~25 nm,呈不分支的中空管状结构。微管在细胞内主要起支撑作用,还可以进行细胞内的物质运输。相对于传统的生物检测方法,超分辨成像能够更清楚地看到细胞骨架中微管的结构<sup>[25,40,83-91]</sup>

研究人员发现,缺氧环境下的细胞会在平行微管之间产生一些交错排列的微观结构,这为计算缺氧时间找到了一种新方法。袁淑怡<sup>[92]</sup>以 C2C12 小鼠成肌细胞为实验样品对微管结构进行观测,之后对 HeLa 细胞进行缺氧处理,结果发现,缺氧会改变细胞骨架结构,增大癌细胞的存活率和增殖速度。HeLa 细胞 STORM 超分辨重构图像如图 5 所示。D'Este 等<sup>[93]</sup>利用 STED 纳米技术和荧光探针 SiR-Actin 揭示了独特的神经元细胞的骨架特征。

## 4 结束语

超分辨光学成像具有非接触、无损伤、高分辨率等优点,已被广泛地用于生命科学和材料科学的研究中。由于突破了衍射极限,超分辨成像能够观测到纳米尺度的亚细胞结构及其运动状态。在观测手段上,超分辨光学成像的研究成果主要体现在以下两方面。



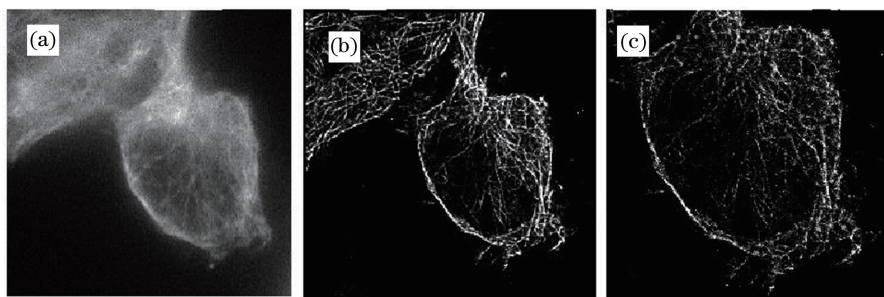


图5 HeLa细胞STORM超分辨重构图像<sup>[92]</sup>。(a)宽场荧光图像;(b)重构图像;(c)局部放大图像

Fig. 5 STORM super-resolution reconstruction images of HeLa cells<sup>[92]</sup>.

(a) Wide-field fluorescence image; (b) reconstruction image; (c) locally enlarged image

1) 多色荧光成像。多色超分辨荧光成像使用各种颜色的探针标记不同结构或生物分子之间的相互作用,以便于人们观察。常用的多色荧光基因有荧光蛋白和荧光染料。为了提高对比度,要求探针具有高的消光系数和量子效率。相比之下,荧光染料的发射光子数和对比较高,而且通过组合配对,例如 Cy3-Cy5,可以显著提高荧光染料的光转换特性。此外,为了获得更多的光子,还要求激发峰和发射峰应尽量分开。因此,量子点技术被应用到多色超分辨成像中,在激光光诱导氧化的作用下,量子点的荧光发射峰发生蓝移,从而避免了不同颜色通道之间的串扰。

2) 三维定位与成像。细胞的三维观测对于分析细胞结构具有重要意义,其中,提高轴向分辨率对三维观测精度的影响更大。利用光学散光法,在显微镜的发射光路中引入一个柱面镜,就会产生一定的像散,从而可以获取完整的三维位置信息。STORM可以实现一个完整的哺乳动物细胞成像,以及对细胞微管、网格蛋白有被小窝和线粒体外膜结构等空间组织的观测,但散光法的成像深度有限。利用艾里斑的传输特性与轴向位置的函数关系可以实现荧光分子的精确3D定位。分光镜将位于原始像面前后的两个像平面成像到CCD上,由此可解算出Z轴的位置信息,这种方法的成像分辨率比散光法低。用CCD相机跟踪荧光或非荧光粒子,也将成为未来研究细胞运动的有力工具之一。IPALM利用荧光分子产生的光子进行同时、多相位干涉,Z轴的位置与干涉相位角有关,由此决定光子的位置,而不受荧光强度变化和荧光寿命的影响。3D-SIM采用多干涉光束照明,通过移位编码将倒易(傅里叶或频率)空间转换成可观测的调制图像,形成类似于叠栅条纹的图案。解码获取的附加信息可用于重建细节,但是,此方法的分辨率很低。

观测手段的不断发展推动了超分辨成像技术在生命科学领域的应用,其中荧光探针发挥了重要作用。通过进一步研究探针的光物理性质,合成出更多种颜色的新染料,同时,考虑光源的辐照强度、光照模式、波长等因素对荧光标记物的影响,尽量削弱光漂白和光毒性对活细胞的损伤,以实现完善的活细胞的超分辨成像。此外,提高图像采集速度和探测器的灵敏度,可以提高超分辨成像的时间和空间分辨率。

超分辨荧光显微术使得人们在光学显微镜下看到了活细胞的亚显微结构,奠定了人类攻克重大疑难疾病的基础。但是,在实际应用中还有许多问题亟待解决,如:荧光蛋白的光稳定性差,光活化速率低,荧光强度弱及荧光团之间的潜在串扰问题等。除了超分辨显微成像中的探针问题外,还要考虑以下问题:SIM的图像重建算法可能产生的伪影,以测量深度或测量时间为代价的高精度定位,显微镜结构的优化等。未来超分辨光学成像还将在这些问题上寻求更大的突破。

## 参 考 文 献

- [1] Hell S W, Sahl S J, Bates M, *et al.* The 2015 super-resolution microscopy roadmap [J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2015, 48(44): 443001.
- [2] Chi K R. Super-resolution microscopy: breaking the limits[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(1): 15-18.
- [3] Ji W, Xu T, Liu B. Super-resolution fluorescent microscopy: a brief introduction to the Nobel Prize in Chemistry 2014 [J]. *Chinese Journal of Nature*, 2014, 36(6): 404-408.  
纪伟, 徐涛, 刘贝. 光学超分辨荧光显微成像: 2014年诺贝尔化学奖解析[J]. *自然杂志*, 2014, 36(6): 404-408.
- [4] Qin P W, Parlak M, Kuscu C, *et al.* Live cell

- imaging of low- and non-repetitive chromosome loci using CRISPR-Cas9 [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14725.
- [5] Samanta S, Gong W J, Li W, *et al.* Organic fluorescent probes for stochastic optical reconstruction microscopy (STORM): recent highlights and future possibilities [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2019, 380: 17-34.
- [6] Almada P, Culley S, Henriques R. PALM and STORM: into large fields and high-throughput microscopy with sCMOS detectors [J]. *Methods*, 2015, 88: 109-121.
- [7] Bernhem K, Blom H, Brismar H. Quantification of endogenous and exogenous protein expressions of Na, K-ATPase with super-resolution PALM/STORM imaging [J]. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0195825.
- [8] Tam J, Merino D. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) in comparison with stimulated emission depletion (STED) and other imaging methods [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2015, 135(4): 643-658.
- [9] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [10] 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.
- [11] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) provides sub-diffraction-limit image resolution [J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-795.
- [12] 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.
- [13] Huang B, Bates M, Zhuang X W. Super-resolution fluorescence microscopy [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, 78(1): 993-1016.
- [14] Sydor A M, Czymmek K J, Puchner E M, *et al.* Super-resolution microscopy: from single molecules to supramolecular assemblies [J]. *Trends in Cell Biology*, 2015, 25(12): 730-748.
- [15] Chéreau R, Tønnesen J, Nägerl U V. STED microscopy for nanoscale imaging in living brain slices [J]. *Methods*, 2015, 88: 57-66.
- [16] Vicidomini G, Bianchini P, Diaspro A. STED super-resolution microscopy [J]. *Nature Methods*, 2018, 15(3): 173-182.
- [17] Yu W T, Ji Z H, Dong D S, *et al.* Super-resolution deep imaging with hollow Bessel beam STED microscopy [J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2016, 10(1): 147-152.
- [18] Vicidomini G, Moneron G, Han K Y, *et al.* Sharper low-power STED nanoscopy by time gating [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(7): 571-573.
- [19] Chen J L, Qiu C M, You M H, *et al.* Structured illumination microscopy and its new developments [J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2016, 9(3): 1630010.
- [20] Curd A, Cleasby A, Makowska K, *et al.* Construction of an instant structured illumination microscope [J]. *Methods*, 2015, 88: 37-47.
- [21] Heintzmann R, Huser T. Super-resolution structured illumination microscopy [J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(23): 13890-13908.
- [22] Saxena M, Eluru G, Gorthi S S. Structured illumination microscopy [J]. *Advances in Optics and Photonics*, 2015, 7(2): 241-275.
- [23] Huang Y J, Zhu D Z, Jin L H, *et al.* Laser scanning saturated structured illumination microscopy based on phase modulation [J]. *Optics Communications*, 2017, 396: 261-266.
- [24] Wei F F, Ponsetto J L, Liu Z W. Plasmonic structured illumination microscopy [M]//Liu Z W. *Plasmonics and super-resolution imaging*. New York: Jenny Stanford Publishing, 2017: 127-163.
- [25] Li D, Shao L, Chen B C, *et al.* Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics [J]. *Science*, 2015, 349(6251): aab3500.
- [26] Chmyrov A, Keller J, Grotjohann T, *et al.* Nanoscopy with more than 100, 000 'doughnuts' [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(8): 737-740.
- [27] Hell S W, Dyba M, Jakobs S. Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy [J]. *Current Opinion in Neurobiology*, 2004, 14(5): 599-609.
- [28] Schnitzbauer J, Strauss M T, Schlichthaerle T, *et al.* Super-resolution microscopy with DNA-PAINT [J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(6): 1198-1228.
- [29] 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.
- [30] Zeng Z P. Fluorescence fluctuation-based super-resolution nanoscopy[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45(3): 0307009.  
曾志平. 基于荧光随机涨落的超分辨显微成像[J]. *中国激光*, 2018, 45(3): 0307009.
- [31] Shroff H, Galbraith C G, Galbraith J A, *et al.* Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(51): 20308-20313.
- [32] Bates M, Dempsey G T, Chen K H, *et al.* Multicolor super-resolution fluorescence imaging via multi-parameter fluorophore detection [J]. *ChemPhysChem*, 2012, 13(1): 99-107.
- [33] Bintu B, Mateo L J, Su J H, *et al.* Super-resolution chromatin tracing reveals domains and cooperative interactions in single cells[J]. *Science*, 2018, 362(6413): eaau1783.
- [34] Xu J Q, Tehrani K F, Kner P. Multicolor 3D super-resolution imaging by quantum dot stochastic optical reconstruction microscopy[J]. *ACS Nano*, 2015, 9(3): 2917-2925.
- [35] Göttfert F, Pleiner T, Heine J, *et al.* Strong signal increase in STED fluorescence microscopy by imaging regions of subdiffraction extent [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(9): 2125-2130.
- [36] Oracz J, Westphal V, Radzewicz C, *et al.* Photobleaching in STED nanoscopy and its dependence on the photon flux applied for reversible silencing of the fluorophore [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 11354.
- [37] 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.
- [38] Legant W R, Shao L, Grimm J B, *et al.* High-density three-dimensional localization microscopy across large volumes[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(4): 359-365.
- [39] Wang Y L, Kanchanawong P. Three-dimensional super resolution microscopy of F-actin filaments by interferometric photoactivated localization microscopy (iPALM) [J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(118): e54774.
- [40] Buss J, Coltharp C, Shtengel G, *et al.* A multi-layered protein network stabilizes the *Escherichia coli* FtsZ-ring and modulates constriction dynamics [J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(4): e1005128.
- [41] Kraus F, Miron E, Demmerle J, *et al.* Quantitative 3D structured illumination microscopy of nuclear structures[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(5): 1011-1028.
- [42] Hell S, Stelzer E H K. Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope [J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 1992, 9(12): 2159-2166.
- [43] Huang F, Sirinakis G, Allgeyer E S, *et al.* Ultra-high resolution 3D imaging of whole cells[J]. *Cell*, 2016, 166(4): 1028-1040.
- [44] von Diezmann A, Shechtman Y, Moerner W E. Three-dimensional localization of single molecules for super-resolution imaging and single-particle tracking [J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(11): 7244-7275.
- [45] Holtzer L, Meckel T, Schmidt T. Nanometric three-dimensional tracking of individual quantum dots in cells[J]. *Applied Physics Letters*, 2007, 90(5): 053902.
- [46] Jones S A, Shim S H, He J, *et al.* Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(6): 499-505.
- [47] Xu J Q, Ma H Q, Liu Y. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. *Current Protocols in Cytometry*, 2017, 81(1): 12.46.1-12.46.27.
- [48] Pavani S R P, Thompson M A, Biteen J S, *et al.* Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(9): 2995-2999.
- [49] Jia S, Vaughan J C, Zhuang X W. Isotropic three-dimensional super-resolution imaging with a self-bending point spread function[J]. *Nature Photonics*, 2014, 8(4): 302-306.
- [50] Baddeley D, Cannell M B, Soeller C. Three-dimensional sub-100 nm super-resolution imaging of biological samples using a phase ramp in the objective pupil[J]. *Nano Research*, 2011, 4(6): 589-598.
- [51] Veeraraghavan R, Gourdie R G. Stochastic optical reconstruction microscopy-based relative localization analysis (STORM-RLA) for quantitative nanoscale assessment of spatial protein organization [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2016, 27(22): 3583-3590.
- [52] Abrahamsson S, Chen J J, Hajj B, *et al.* Fast

- multicolor 3D imaging using aberration-corrected multifocus microscopy[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(1): 60-63.
- [53] Hajj B, Wisniewski J, ElBeheiry M, *et al.* Whole-cell, multicolor superresolution imaging using volumetric multifocus microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(49): 17480-17485.
- [54] Vangindertael J, Beets I, Rocha S, *et al.* Super-resolution mapping of glutamate receptors in *C. elegans* by confocal correlated PALM[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13532.
- [55] Xie X L, Chen R, Zhao Y X, *et al.* Combination light-sheet illumination with super-resolution three-dimensional fluorescence microimaging[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45(3): 0307006.  
谢新林, 陈蓉, 赵宇轩, 等. 结合光片照明与超分辨的三维荧光显微成像[J]. *中国激光*, 2018, 45(3): 0307006.
- [56] Patton B R, Burke D, Oswald D, *et al.* Three-dimensional STED microscopy of aberrating tissue using dual adaptive optics[J]. *Optics Express*, 2016, 24(8): 8862-8876.
- [57] Gustavsson A K, Petrov P N, Lee M Y, *et al.* 3D single-molecule super-resolution microscopy with a tilted light sheet[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 123.
- [58] Sigal Y M, Zhou R B, Zhuang X W. Visualizing and discovering cellular structures with super-resolution microscopy[J]. *Science*, 2018, 361(6405): 880-887.
- [59] Nienhaus K, Nienhaus G U. Where do we stand with super-resolution optical microscopy? [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(2): 308-322.
- [60] Wegner W, Ilgen P, Gregor C, *et al.* *In vivo* mouse and live cell STED microscopy of neuronal actin plasticity using far-red emitting fluorescent proteins [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 11781.
- [61] D'Este E, Kamin D, Balzarotti F, *et al.* Ultrastructural anatomy of nodes of Ranvier in the peripheral nervous system as revealed by STED microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(2): E191-E199.
- [62] Boettiger A N, Bintu B, Moffitt J R, *et al.* Super-resolution imaging reveals distinct chromatin folding for different epigenetic states[J]. *Nature*, 2016, 529(7586): 418-422.
- [63] Lubeck E, Cai L. Single-cell systems biology by super-resolution imaging and combinatorial labeling [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 743-748.
- [64] Morozova K S, Piatkevich K D, Gould T J, *et al.* Far-red fluorescent protein excitable with red lasers for flow cytometry and superresolution STED nanoscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2010, 99(2): L13-L15.
- [65] Lukinavičius G, Umezawa K, Olivier N, *et al.* A near-infrared fluorophore for live-cell super-resolution microscopy of cellular proteins [J]. *Nature Chemistry*, 2013, 5(2): 132-139.
- [66] Nikić I, Plass T, Schraidt O, *et al.* Minimal tags for rapid dual-color live-cell labeling and super-resolution microscopy [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(8): 2245-2249.
- [67] Godin A G, Lounis B, Cognet L. Super-resolution microscopy approaches for live cell imaging [J]. *Biophysical Journal*, 2014, 107(8): 1777-1784.
- [68] Jans D C, Wurm C A, Riedel D, *et al.* STED super-resolution microscopy reveals an array of MINOS clusters along human mitochondria [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(22): 8936-8941.
- [69] Westphal V, Lauterbach A, di Nicola A, *et al.* Dynamic far-field fluorescence nanoscopy [J]. *New Journal of Physics*, 2007, 9(12): 435.
- [70] Bowler M, Kong D, Sun S F, *et al.* High-resolution characterization of centriole distal appendage morphology and dynamics by correlative STORM and electron microscopy [J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 993.
- [71] Deng Y Y. Fluorescence super resolution microscopic imaging for the study of oocyte meiosis [D]. Shenzhen: Shenzhen University, 2017.  
邓月月. 荧光超分辨显微成像用于研究卵母细胞减数分裂过程[D]. 深圳: 深圳大学, 2017.
- [72] Hanne J, Falk H J, Görlitz F, *et al.* STED nanoscopy with fluorescent quantum dots[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7127.
- [73] Honigsmann A, Mueller V, Ta H S, *et al.* Scanning STED-FCS reveals spatiotemporal heterogeneity of lipid interaction in the plasma membrane of living cells[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 5412.
- [74] Dudok B, Barna L, Ledri M, *et al.* Cell-specific STORM super-resolution imaging reveals nanoscale organization of cannabinoid signaling [J]. *Nature Neuroscience*, 2015, 18(1): 75-86.
- [75] Jacq M, Adam V, Bourgeois D, *et al.* Remodeling of the Z-ring nanostructure during the *Streptococcus*

- pneumoniae* cell cycle revealed by photoactivated localization microscopy [J]. *mBio*, 2015, 6(4): e01108-15.
- [76] Laplante C, Huang F, Tebbs I R, *et al.* Molecular organization of cytokinesis nodes and contractile rings by super-resolution fluorescence microscopy of live fission yeast [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(40): E5876-E5885.
- [77] Holden S. Probing the mechanistic principles of bacterial cell division with super-resolution microscopy [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 43: 84-91.
- [78] Holden S J, Pengo T, Meibom K L, *et al.* High throughput 3D super-resolution microscopy reveals *Caulobacter crescentus* *in vivo* Z-ring organization [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(12): 4566-4571.
- [79] Strauss M P, Liew A T F, Turnbull L, *et al.* 3D-SIM super resolution microscopy reveals a bead-like arrangement for FtsZ and the division machinery: implications for triggering cytokinesis [J]. *PLoS Biology*, 2012, 10(9): e1001389.
- [80] Chen M H, Liu S Y, Li W, *et al.* Three-fragment fluorescence complementation coupled with photoactivated localization microscopy for nanoscale imaging of ternary complexes[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(9): 8482-8490.
- [81] Wang W, Li G W, Chen C, *et al.* Chromosome organization by a nucleoid-associated protein in live bacteria[J]. *Science*, 2011, 333(6048): 1445-1449.
- [82] Xia Y, Fu B M. Investigation of endothelial surface glycocalyx components and ultrastructure by single molecule localization microscopy: stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 2018, 91(3): 257-266.
- [83] Wegel E, Göhler A, Lagerholm B C, *et al.* Imaging cellular structures in super-resolution with SIM, STED and Localisation Microscopy: a practical comparison[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27290.
- [84] Butkevich A N, Mitronova G Y, Sidenstein S C, *et al.* Fluorescent rhodamines and fluorogenic carbopyronines for super-resolution STED microscopy in living cells[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(10): 3290-3294.
- [85] Xu K, Babcock H P, Zhuang X W. Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(2): 185-188.
- [86] Suleiman H Y, Roth R, Jain S, *et al.* Injury-induced actin cytoskeleton reorganization in podocytes revealed by super-resolution microscopy [J]. *JCI Insight*, 2017, 2(16): e94137.
- [87] Unsain N, Bordenave M D, Martinez G F, *et al.* Author correction: remodeling of the actin/spectrin membrane-associated periodic skeleton, growth cone collapse and F-actin decrease during axonal degeneration[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 3007.
- [88] Han B R, Zhou R B, Xia C L, *et al.* Structural organization of the actin-spectrin-based membrane skeleton in dendrites and soma of neurons [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(32): E6678-E6685.
- [89] Pan L T, Yan R, Li W, *et al.* Super-resolution microscopy reveals the native ultrastructure of the erythrocyte cytoskeleton[J]. *Cell Reports*, 2018, 22(5): 1151-1158.
- [90] Unsain N, Stefani F D, Cáceres A. The actin/spectrin membrane-associated periodic skeleton in neurons [J]. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 2018, 10: 10.
- [91] Wen G, Li S M, Yang X B, *et al.* Super-resolution fluorescence microscopy system by structured light illumination based on laser interference [J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(3): 0318003.  
文刚, 李思颀, 杨西斌, 等. 基于激光干涉的结构光照明超分辨荧光显微镜系统 [J]. *光学学报*, 2017, 37(3): 0318003.
- [92] Yuan S Y. STORM super resolution imaging of cytoskeleton [D]. Shenzhen: Shenzhen University, 2017.  
袁淑怡. 细胞骨架的 STORM 超分辨成像研究 [D]. 深圳: 深圳大学, 2017.
- [93] D'Este E, Kamin D, Göttfert F, *et al.* STED nanoscopy reveals the ubiquity of subcortical cytoskeleton periodicity in living neurons [J]. *Cell Reports*, 2015, 10(8): 1246-1251.