

# 基于单分子定位成像技术的研究及展望

李雨竹<sup>1</sup>, 李传康<sup>1</sup>, 郝翔<sup>1</sup>, 刘旭<sup>1,3</sup>, 匡翠方<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>浙江大学光电科学与工程学院现代光学仪器国家重点实验室, 浙江 杭州 310027;

<sup>2</sup>浙江大学宁波研究院, 浙江 宁波 315100;

<sup>3</sup>山西大学极端光学协同创新中心, 山西 太原 030006

**摘要** 超分辨显微技术突破衍射极限的分辨能力为研究纳米尺度的超精细结构和生理学过程提供了有力的观察手段,对研究细胞的功能以及疾病的发病机制有十分重要的影响,具有十分重要的生物医学意义。单分子定位成像技术作为超分辨成像技术的一个分支,具有重大的科研价值。从单分子定位成像技术的研究背景和意义出发,详细介绍了该技术的发展历程,对现有的主要单分子定位技术进行了较为详细的原理介绍和各自优缺点的分析,最后对单分子定位技术的实际应用进行了展望。

**关键词** 医用光学; 荧光成像; 超分辨显微; 单分子定位成像; 光漂白; 定位精度

中国分类号 O436

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP57.240002

## Review and Prospect for Single Molecule Localization Microscopy

Li Yuzhu<sup>1</sup>, Li Chuankang<sup>1</sup>, Hao Xiang<sup>1</sup>, Liu Xu<sup>1,3</sup>, Kuang Cuifang<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation, College of Optical Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310027, China;

<sup>2</sup>Ningbo Institute, Zhejiang University, Ningbo, Zhejiang 315100, China;

<sup>3</sup>Collaborative Innovation Center of Extreme Optics, Shanxi University, Taiyuan, Shanxi 030006, China

**Abstract** Optical super-resolution microscopy, enabling to break the diffraction limit, provides a powerful observation means for research on ultra-fine structures and physiological processes. It has an important impact on studying the functions of cells and the pathogenesis of diseases, which is of great biomedical significance. As a branch of super-resolution imaging methods, single molecule localization microscopy has great scientific research value. We first introduce the research background and significance of single molecule localization microscopy. Then we describe the development process of this technology in detail. In addition, the basic principles of the existing mainstream technologies are elaborated and their corresponding advantages and disadvantages are also analyzed. Finally, we prospect the applications of the single molecule localization technology.

**Key words** medical optics; fluorescence microscopy; super-resolution microscopy; single molecule localization microscopy; photobleaching; localization accuracy

**OCIS codes** 170.0180 180.2520

## 1 引言

细胞是生命体的基本单元<sup>[1]</sup>。研究细胞的内部结构和功能以及细胞间的相互作用具有着十分重要的生物医学意义。生物分子组成化合物的方式以及组织之间的动态过程对细胞的功能以及疾病的发病机制有着十分重要的影响<sup>[2]</sup>。但是细胞内各

种结构的特征尺度,包括细胞器水平以及生物大分子水平,大多在纳米量级。比如,核糖体和微管的特征尺度在 20 nm 左右,一些蛋白质和分子生物化学传动装置的特征尺度常常小于 10 nm<sup>[3]</sup>。因此,如何清晰观察到这些纳米尺度的物体和超精细结构成为了生物成像领域亟需解决的问题。

由于衍射现象的存在,一个理想的物点经过光

收稿日期: 2020-04-07; 修回日期: 2020-05-07; 录用日期: 2020-05-08

基金项目: 国家自然科学基金重大科研仪器研制项目(61827825)、浙江省之江实验室项目(2020MC0AE01)

\*E-mail: cfkuang@zju.edu.cn

学系统之后不再是一个理想的像点,而是一个弥散斑,我们称之为点扩散函数(Point Spread Function, PSF),这也可以理解为光学系统的单位冲激响应<sup>[4]</sup>。当两个发光分子的距离非常近甚至小于 PSF 宽度的时候,PSF 会出现重叠而无法再被分辨。根据瑞利判据,当一个点物衍射图样的中央极大与近旁另一个点物衍射图样的第一极小重合时,认为这两个点物是恰可分辨的。我们通常认为,焦平面上的最小分辨距离为  $0.61\lambda/NA$ ,其中  $\lambda$  是光波长,NA 是对应的显微镜的数值孔径。一般在实际应用中,传统光学显微系统的横向空间分辨率只能达到 200 nm 左右,纵向分辨率只能达到 500 nm 左右<sup>[5]</sup>。

为了观察到尺度小于衍射极限的物体,需要克服衍射极限的约束。飞速发展的超分辨显微技术巧妙地解决了这一难题<sup>[6]</sup>。这些超分辨显微技术主要可以分为两类:第一类是基于图样模式照明的超分辨,比如受激发射损耗显微(Stimulated Emission Depletion Microscopy, STED)技术通过改变激发光的图样模式来获得更小的 PSF,结构光照明显微(Structured Illumination Microscopy, SIM)技术利用结构光照明将高频信息转移到低频被恢复的信息;另一类则是单分子定位成像技术<sup>[7-8]</sup>。由于本文主要研究单分子定位成像技术,故对 STED 技术和 SIM 技术不再赘述。

单分子定位成像技术(Single Molecule Localization Microscopy, SMLM)定位和成像的对象是单分子,通过多次综合处理单分子定位结果,可得到全视场的荧光分子分布情况,即宏观的样品信息。由于一个单分子的尺寸往往是小于衍射极限的,因此利用得到的单分子位置信息就可以实现超分辨成像。但是,如果两个单分子的距离非常近,由于衍射,两个单分子无法各自定位。现有两类方法来分辨这两个单分子:第一类是基于稀疏性的考虑。如果距离很近的两个荧光分子不同时发光,那么就可以在时间上将其分开,即牺牲一部分的时间分辨率来换取空间分辨率。最典型的方法就是利用光激活性质,即通过光控制开关,使得稠密溶液中的分子能够稀疏发光。有三个课题组基于该原理独立提出了相似的三种方法,分别是光激活定位显微成像(Photoactivated Localization Microscopy, PALM)技术,荧光光激活定位显微成像(Fluorescence Photoactivated Localization Microscopy, FPALM)技术和随机光学重构超分辨成像(Stochastically Optical Reconstruction Microscopy, STORM)技

术<sup>[9]</sup>。基态损耗后返回显微(Ground State Depletion With Individual Molecule Return, GSDIM)技术和基于点积累的纳米分辨成像(Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography, PAINT)技术也属于此类方法。另外,也可以利用光漂白性质,即荧光分子的漂白过程是分阶段的,被漂白的分子在时间上呈现稀疏性特点,通过漂白前后图像差分即可获得被漂白的单分子图像。这种技术被称为随机漂白定位成像(Single-Molecule High-Resolution Imaging with Photobleaching, SHRIMP)<sup>[10]</sup>。第二类方法是利用其他信息来减小有效 PSF 的尺寸,进而在空间上加以分辨。比如,利用径向梯度信息的超分辨径向涨落(Super-Resolution Radial Fluctuations, SRRF)成像算法和利用荧光波动信息的超分辨光学涨落成像(Super-Resolution Optical Fluctuation Imaging, SOFI)法。

在单分子定位算法上,即使是稀疏发光,获得的单分子图像依然是一个弥散斑。为了将其定位到一个点,一般是对弥散斑的分布进行高斯拟合,用其中心位置代替理想的物点位置。最近出现了一些新的精度更高的确定单分子位置的方法,即基于差分思想,利用照明光位置的空间偏移来获得荧光分子的相对偏移信息,进而通过一定的概率模型来获得单分子定位的准确信息。比如基于最少光子数的纳米尺度定位(Nanoscopy with Minimal Photon Fluxes, MINFLUX)技术,利用结构光照明的 MINFLUX 变体 SIMFLUX 技术以及重复光学选择曝光(Repetitive Optical Selective Exposure, ROSE)技术。

综上所述,这些单分子定位成像技术作为超分辨显微工具,在提供细胞和分子尺度信息方面发挥着非常重要的作用,同时也为生物医学的研究提供了强有力的工具。本文梳理了单分子定位成像技术的研究历程,介绍了现有的几种主流技术的原理和优缺点,最后对单分子定位成像技术的发展方向进行了展望。

## 2 研究历程

单分子荧光时代开启于 20 世纪 90 年代初。Orrit 等<sup>[11-12]</sup>在低温条件下检测出主晶体中的单掺杂分子。Brooks 等<sup>[13]</sup>通过激光诱导荧光,检测了单个荧光标记的单核苷酸分子,进而对单个 DNA 分子进行了测序,并于 1990 年在水溶液中实现了对单个荧光团的检测。

1995年, Betzig<sup>[14]</sup>提出了基于单分子信号实现超高分辨率的构思,该方法利用了聚焦区域内分子的不同离散特征。为了实现超分辨,聚焦区域的荧光团必须具有空间离散或者时间离散的光谱特征。实验证明,荧光的间歇性闪烁为在时间上分离荧光分子提供了可能。

2004年, Gordon等<sup>[10]</sup>提出了基于随机光漂白的超分辨成像方法。该方法基于荧光分子的稀疏化漂白特点,实现了重构,达到了超分辨。2005年, Heintzmann团队基于单分子荧光发射的时间分离进行了超分辨显微成像<sup>[15]</sup>,实验利用半导体量子晶体即量子点来实现依赖于时间强度的闪烁。但是,不确定的开关时间限制了该技术的使用。

2006年, Betzig等<sup>[16]</sup>在实验上实现了PALM技术,该技术结合了单分子检测技术、光激活荧光蛋白标记技术以及单分子定位算法,将显微技术的精度提高到20 nm以内。与此同时,庄小威团队提出了STORM技术,原理和PALM技术大致相同,区别在于使用的荧光标记方式不同<sup>[17]</sup>。同时,2006年, Sharonov等<sup>[18]</sup>提出了PAINT技术中的单分子定位方法。该方法在不需要荧光探针标记的情况下,可以实现快速纳米级成像,具有空间分辨的能力。

2007年, STORM技术实现了多色成像。紧接着,2008年, Heilemann等<sup>[19]</sup>提出了单个荧光分子的直接STORM技术,即dSTORM技术。为了实现纵向分辨率的提高,庄小威团队提出了三维STORM技术<sup>[20]</sup>。2008年, Shroff等<sup>[21]</sup>将PALM技术用于记录两种蛋白质的相对位置,并且在次年开发出可用于活细胞上的记录细胞黏附蛋白的动力学过程的PALM技术。同年,研究者提出了GSDIM方法<sup>[22]</sup>。GSDIM通过随机记录时间和空间,简化了单分子纳米镜检查方法,使非光激活荧光团的使用成为可能<sup>[23]</sup>。2009年, Piestun等<sup>[24]</sup>利用双螺旋点扩散函数

同样实现了三维STORM技术。同年, Dertinger等<sup>[25]</sup>提出了SOFI法。该方法通过记录荧光分子的闪烁过程,并对随时间涨落的实时荧光信号进行高阶统计分析,实现了对不同单分子的区分。

上述这些单分子定位方法都是基于光子具有单一分子来源的假设,不适用于高密度分子定位的情况。2011年, Holden等<sup>[26]</sup>提出了高密度分子定位算法DAOSTORM,将定位分子的密度提高了6~9倍<sup>[27]</sup>。2016年, Gustafsson等<sup>[28]</sup>提出了SRRF成像算法,即通过后期算法,提取了径向梯度信息,减小了等效PSF的半峰全宽,从而能够将距离很近的两个分子辨别出来,实现了超分辨。

2017年,研究者又提出了MINFLUX方法<sup>[29]</sup>。在该方法中,样品同样需要满足稀疏性的要求,但是不同于以往单分子高斯拟合定位算法,MINFLUX方法通过移动激发光斑,根据获得的不同光子数分布来进行概率估计,从而拟合出单分子位置。定位精度得到大幅提高,并且有助于解决光漂白等问题。随着人工智能技术的快速发展,出现了与神经网络相结合的超分辨图像处理技术。该方法将传统的诸如PALM/STORM技术得到的超分辨图像作为训练目标,虽然不能直接提高分辨率,但大幅提高了获得高分辨图像的速度。比如人工智能神经网络辅助PALM(Artificial Intelligence Neural Network PALM, ANNA-PALM)<sup>[30]</sup>和DeepSTORM技术<sup>[31]</sup>。2019年, Hell<sup>[32]</sup>改进了MINFLUX技术,并且实现了三维多色的MINFLUX系统。同年, Gu等<sup>[33]</sup>提出了一种基于摄像机的单分子定位技术ROSE,通过估计发光点相对于移动干涉条纹的相对位置来定位发光点。2020年, Cnossen等<sup>[34]</sup>利用结构光照明对MINFLUX算法中的定位方法进行了进一步改善,提出了SIMFLUX,其原理和ROSE类似。图1所示为整个研究脉络。

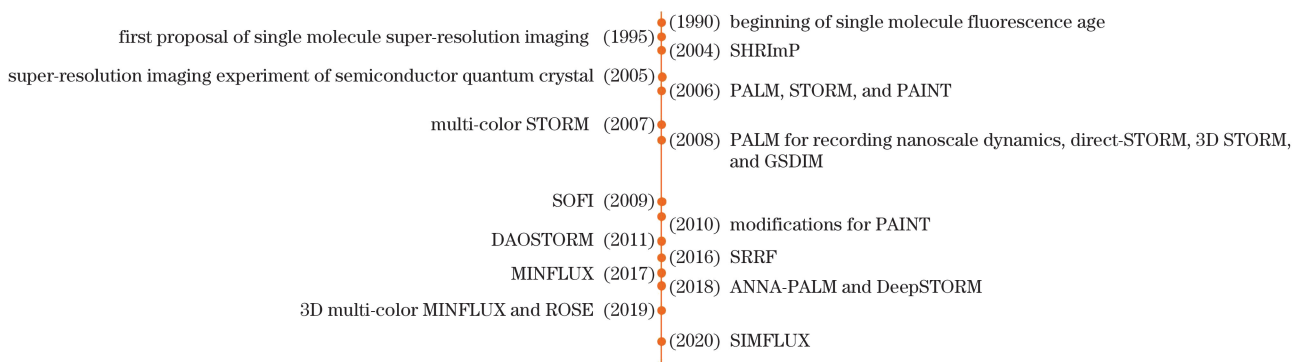


图1 单分子定位成像技术的研究历程

Fig. 1 Research history of single molecule localization microscopy



### 3 单分子定位成像的研究进展

#### 3.1 荧光成像

相较于传统的光学显微镜对宏观物体的成像,荧光显微镜为分子尺度的显微观察提供了有力的手段。荧光发光原理如图2所示。

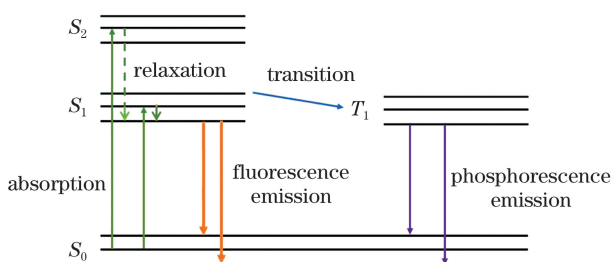


图2 荧光发光原理

Fig. 2 Principle of fluorescence emission

荧光基团分子一般处于基态  $S_0$ ,在光子激发下吸收了光子能量后,被激发至第一激发态  $S_1$  或第二激发态  $S_2$ 。除极少数外,大部分分子会迅速弛豫至激发态  $S_1$ 。发光基团在热平衡条件下从  $S_1$  的最低振动能级跃迁至单线基态并发射荧光光子<sup>[35]</sup>。如果处于  $S_1$  状态的发光基团分子通过系间电子跃迁跳跃到能级低一些的第一激发三线态  $T_1$ ,而后从  $T_1$  回到基态  $S_0$ ,则会发射磷光<sup>[35]</sup>。荧光和磷光都属于自发辐射现象。荧光基团一般分为内源性和外源性两类<sup>[36]</sup>。荧光显微成像首先对观察的物质进行外源荧光标记,或者利用其自身发射荧光的特性,通过激光激发使其产生荧光,再利用物镜目镜进行观察。荧光显微成像可以利用荧光探针标记技术,将被观察物体的尺度缩小到分子水平,分辨率较高,荧光即使很微弱也可以被观察到,灵敏度高,适合于活体应用<sup>[37]</sup>。荧光显微镜的基本结构如图3所示。

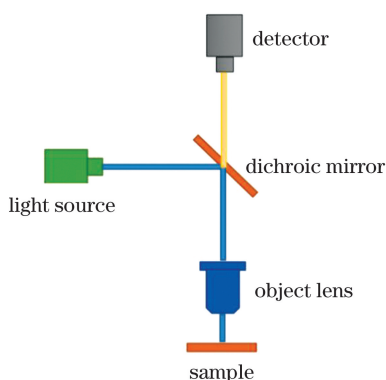


图3 荧光显微镜的基本结构

Fig. 3 Basic configuration of fluorescence microscopy

荧光显微镜的结构分为激发光路和探测光路,由于激发光波长和发射荧光波长不同,因此可以通过二向色镜的特性将两者分离。当激发光的强度超过一定限度时,光吸收趋近于饱和,并不可逆地破坏激发态分子,这就是光漂白现象,一般来说需要避免该现象的发生<sup>[38]</sup>。特别地,利用荧光开关特性进行稀疏发光,或者利用随机光漂白现象,可以进一步突破衍射极限,实现超分辨<sup>[39]</sup>。

#### 3.2 荧光光激活定位显微成像技术与随机光学重构超分辨成像技术

荧光光激活定位显微成像技术与随机光学重构超分辨成像技术的基本原理都是稀疏发光和分时综合。我们认为荧光具有“开”与“关”两个状态。“开”对应的是荧光态,“关”对应的是荧光淬灭态(暗态)<sup>[40]</sup>。通过控制荧光分子的开关状态,在一次测量中只有一个处于衍射极限内的荧光分子被激活,即使因为衍射形成了艾里斑,也可以通过质心定位高斯拟合的方法还原一个没有大小的理想像点。由于确定该点的过程不可能完全精确,因此还原出来的像点尺寸将由定位精度决定<sup>[41]</sup>。只要两次还原后的像点半径小于两个像点之间的距离,则它们叠加之后将彼此互不影响,从而实现超分辨。整个过程可以描述为:利用不同波长激光调控高度精确定位的单个荧光分子或绿色荧光蛋白,使其在荧光淬灭态和荧光态之间发生转变;在每一次循环中,视野中绝大部分的荧光探针分子被转换到暗态,只有稀疏少量的荧光分子发生随机活化的荧光发射,这些稀疏发光的荧光分子的图像彼此不会重叠,因此可以实现这部分荧光分子高度精确定位,经过多次重复随机地激发呈稀疏分布的荧光分子,可以实现大量荧光分子的精确定位,将采集的稀疏分子发光图像进行整合与重建,可以实现高分辨的显微成像<sup>[5]</sup>。总结来看,PALM/STORM技术具有两个主要的特点:一是可控制荧光团的开关状态,二是具有精准的单分子定位算法。接下来,将分别对荧光团的选择和高斯定位算法进行介绍。高斯定位算法的定位精度一般大致估计为  $\sigma/\sqrt{N}$ ,其中  $\sigma$  一般为 PSF 分布对应的标准差,  $N$  为收集到的总光子数<sup>[2]</sup>。可以看出,收集到的光子数越多,定位的精度越高。对于最小分辨距,PALM技术能定位到  $2 \sim 25 \text{ nm}$ <sup>[16]</sup>,STORM技术能定位到  $20 \text{ nm}$ <sup>[17]</sup>。PALM/STORM技术的实验装置与荧光显微成像装置类似。

### 3.2.1 荧光开关的选择

PALM 技术所使用的荧光开始是一种绿色荧光蛋白(Green Fluorescence Protein, GFP)的变体 PA-GFP,其是一种外源蛋白<sup>[42]</sup>。首先使用 405 nm 的激光(低能量)稀疏地激活荧光蛋白,再通过 488 nm 的激光照射进行单分子定位成像,经过长时间照射后,该次激活的荧光蛋白被漂白掉。重复这个激活漂白的过程,经过多次图像的处理,得到最终的超分辨图像<sup>[43]</sup>。

STORM 技术使用的不是荧光蛋白,而是有机荧光小分子花菁类荧光染料。具体过程是将三甲川菁类染料(Cy3)和五甲川菁类染料(Cy5)的荧光染料分子同时共价连接至靶向目标,使二者距离足够接近以组成能量传递体系,其中 Cy5 可以在连续红光波段激光的照射下进入暗态,该连续激光的波长为其最大吸收峰对应的波长,Cy3 可激活处在暗态的 Cy5 染料分子,在绿光波段激光照射下荧光分子转入辐射荧光的初始状态<sup>[44]</sup>。2008 年,dSTORM 技术使用的是 Alexa 647 荧光染料,它不需要启动染料,只需要波长的转换即可实现开态和关态之间的转换。首先使用 647 nm 波长的激光照射,荧光分子进入暗态,再在 514 nm 波长的激发下回到荧光态<sup>[5]</sup>。

### 3.2.2 高斯拟合定位算法

在光子数比较少(即低信噪比)的情况下,某个光子到达探测器某个具体位置的概率服从泊松分布<sup>[45]</sup>。高斯拟合定位算法的关键点在于拟合出 PSF 的模型以及噪声模型,再通过最小二乘法、极大似然概率估计法或中心估计的非拟合方法来确定荧光分子的位置<sup>[46]</sup>。

一般来说,PSF 的分布主要使用高斯函数来进行拟合:

$$I(x, y) = I_0 \exp\{-ak_1^2 [(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2]\} + b, \quad (1)$$

式中:  $I(x, y)$  为位于  $(x, y)$  位置处的光强;  $k_1$  是波数;  $a$  是用来约束 PSF 宽度的数值因子;  $I_0$  是峰值强度,与荧光的光子发射率和单帧采集时间有关;  $(x_0, y_0)$  是荧光分子的位置。当建立好 PSF 的模型之后,通过高斯拟合可以直接获得荧光分子的位置坐标,一般采用最小二乘法进行估计。除此之外,还可以采用极大似然概率估计法,即当荧光分子处于某位置时,求出产生某种具体光子分布的概率,选取其中概率最大的点作为荧光分子的位置<sup>[47]</sup>。对于这两种拟合方式,极大似然概率估计法

的准确度较高,但是当光子数较多时,最小二乘估计法可以达到和极大似然概率估计法相似的结果<sup>[48]</sup>。

除了以上两种基于拟合的估计之外,还可以直接假设光子处于像素的中心,则可以很容易地计算出平均光子位置,从而很好地估计出荧光团的位置。这种估计方法速度非常快,但是精确度受限<sup>[48]</sup>。

值得注意的是,利用二维高斯拟合法模拟得到的系统 PSF 只是经验值,并不能等价于实际系统的 PSF。一个更好的策略是将发光的荧光分子当成一个偶极子,计算它穿过整个成像系统到达探测器的分布。但这种方法比较复杂,并且计算复杂度较高,不如高斯拟合法方便直观。此外,当荧光分子靠近等离子体衬底时,这种定位方法会受到等离子体纳米结构的影响而产生误差。这是因为单分子发出的光会与纳米结构的不同等离子体模式进行耦合,因此发光并不来源于分子而是来源于等离子体。也就是说,基于二维高斯定位的分子位置是基于高度耦合系统的,既不是荧光分子的位置,也不是等离子体纳米颗粒的位置,而是二者的结合<sup>[49]</sup>。

在基本的 STORM 技术之后,出现了多色 STORM、dSTORM、三维 STORM 和适用于高密度分子的定位方法 DAOSTORM。多色 STORM 是利用不同染料分子之间的组合配对来创建不同颜色的探针<sup>[50]</sup>。在原有 Cy3/Cy5 荧光分子对的基础上,Cy3 与一系列荧光分子在不同波长激光激发下产生不同的荧光,从而实现多色荧光成像分析<sup>[51]</sup>。dSTORM 由于 Alexa 647 的使用,不用再利用一对染料分子之间的配合,而是通过直接转换激发波长来转换荧光分子的开关状态<sup>[52]</sup>。

庄小威团队在 STORM 系统中引入了柱透镜像散,使处于不同轴向位置的物点经过系统后形成具有不同形状或取向的像斑,从而实现定位,这即为三维 STORM。庄小威团队的三维 STORM 的实现装置如图 4 所示,装置可以在径向上达到 20~30 nm 的分辨距,在轴向上达到 50~60 nm 的分辨距。具体方式是在光路中引入一个柱面透镜,由于柱面透镜的会聚作用具有方向性,因此系统在  $x$  方向和  $y$  方向上有着不同的焦面。当分子的轴向位置发生变动时,产生的二维高斯分布的截面将不再是一个圆形,而是一个椭圆形。我们可以根据 PSF 形状的变化来确定荧光分子在  $z$  轴上的位置,由于轴向位置变动对分子在  $xy$  平面中心的位置不产生

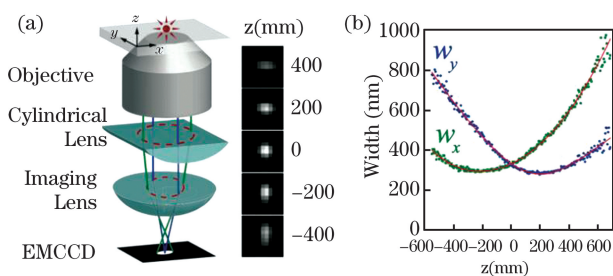


图4 三维 STORM 示意图<sup>[20]</sup>。(a)实验装置；(b)椭圆 PSF 的轴长与分子在  $z$  方向上的位置的关系

Fig. 4 Schematic of three-dimensional STORM<sup>[20]</sup>.

(a) Experimental setup; (b) relationship between axial lengths of elliptical PSF and  $z$  position of molecules

大的影响,因此我们可以获得该荧光分子的三维坐标信息,从而实现三维 STORM。具体地,当荧光分子位于平均焦面(大约是在  $x$  焦面和  $y$  焦面的中间处)上时,获得的 PSF 基本呈圆形;当荧光分子位于平均焦面的上方时, $x$  方向为 PSF 椭圆的长轴;当荧光分子位于平均焦面的下方时, $y$  方向为 PSF 椭圆的长轴。PSF 椭圆长轴和短轴的长度与对应分子在  $z$  方向上的位置的关系可以通过提前标定来获得<sup>[20]</sup>。除此之外,还有通过 PSF 工程和干涉探测实现三维超分辨的方法<sup>[53]</sup>。

DAOSTORM 主要是基于算法上的改进,参考了天文学常用的处理软件,能够同时拟合多个荧光发光分子的高斯斑,从而能够从多个混叠的 PSF 中区分出发光点,使得 STORM 更加适应高浓度染料分子的情况。

### 3.2.3 优缺点分析

PALM/STORM 技术的优点是原理简单,可以实现纳米尺度超高精度的成像<sup>[54]</sup>。但是缺点在于其定位的精度对所采集到的光子数量的要求较高。并且因为其稀疏发光的特性,需要采集大量的原始图像,耗时非常长,计算量非常大,不适合研究生物样品的动态过程。加上样品制备条件严格,该技术在研究活体样本上仍有诸多限制<sup>[55]</sup>。活细胞应用的高帧频要求和单分子定位精度对光子数的要求本身是矛盾的,采用提高激光功率密度的方法虽然可以在一定程度上同时得到较高的帧频和光子数,但由此带来的光漂白问题限制了该方法在活细胞中的应用<sup>[41]</sup>。特别地,PALM 技术只能用来观察外源表达的蛋白质,而对于分辨细胞内源蛋白质的定位却无能为力<sup>[56]</sup>。STORM 技术虽然可以对内源

蛋白质进行标记,但是由于这种标记并非一对一关系,因此 STORM 技术不能量化细胞内蛋白质分子的数量<sup>[57]</sup>。

## 3.3 基于点积累的纳米分辨成像

### 3.3.1 定位原理概述

基于点积累的纳米分辨成像的原理如下:将物体放入荧光团分散的水溶液中,由于双分子碰撞的间歇现象,溶液中的荧光分子和物体表面碰撞之后会被固定在表面上<sup>[58]</sup>。对这些荧光分子的 PSF 进行拟合并将其当作一个理想的像点,那么经过多次成像积累,就可以获得具有极高分辨率的物体表面形状信息,从而实现超分辨成像<sup>[59]</sup>。这种方法最小分辨距可以达到 25 nm 左右。这个方法的关键点在于双分子碰撞的间歇现象、光漂白和 PSF 测量。该方法的操作过程和 PALM/STORM 技术大致相同,都需要满足稀疏性的要求,即一次被固定在物体表面的荧光分子在空间上是呈现低密度的,相应的 PSF 是由一个荧光分子发出的,从而定位这些荧光分子<sup>[60]</sup>。因此,采集一次图像的时间应该大于荧光分子漂白和脱离物体的时间,而小于两次集中碰撞的时间间隔。

特别地,在单位时间内,在单位体积内有  $N'$  个荧光分子,一次碰撞被固定在物体表面  $\pi R^2$  ( $R$  为在物体表面选取的圆区域的半径)面积内的荧光分子个数为  $4DRN'$ ,其中  $D$  为扩散系数。因此,通过控制溶液中荧光分子的浓度就可以控制被固定在物体表面上的分子密度,从而实现精准调控,使该超分辨方法同样满足稀疏性的要求。

### 3.3.2 优缺点分析

PAINT 技术的优点十分明显,因为物体是被放在荧光分子溶液中的,所以不需要对物体或者样品本身进行荧光探针的标记,避免了生物兼容性冲突和样品制备等问题。并且可以通过溶液浓度方便地控制物体表面固定的分子密度,从而实现高分辨成像。但是其缺点在于,前期图像的采集和后期图像的综合处理的时间仍然很长,不利于生物动力学过程的记录。并且也只能获得物体或者样品表面的形状信息,而不能获得样品内部的信息,应用受到了限制<sup>[61]</sup>。

## 3.4 基态损耗后返回显微技术

### 3.4.1 定位原理概述

GSDIM 技术将荧光单线态和三重态之间的过渡称为开关过渡,这种过渡通常存在于所有的荧光团中。分子被激发至第一激发态之后会大概率地



通过发射荧光以自发辐射的方式回到基态,荧光寿命大约为 3 ns,但仍有一部分分子被激发至第一激发态之后通过开关过渡转换至三重态或者其他的亚稳态暗态,经过大约毫秒量级的寿命时间再返回基态,这个过程是不释放荧光的<sup>[62]</sup>。因此我们可以将后者视为荧光分子的“关”状态。在这种情况下,不需要特定的荧光团,即使普通的荧光分子也可以实现开关状态的自然转换。当激发光的光强大于饱和光强时,可以直接返回基态发射荧光。这部分分子占有所有荧光分子数量的比例远远小于 10%,因此也满足超分辨成像中稀疏性的要求。对于一次激发而言,通过高斯拟合定位出这些稀疏发光分子的位置之后,再通过对每次稀疏发光图像进行综合处理,最终可以获得超分辨的图像信息<sup>[22]</sup>。GSDIM 的最小分辨距可以达到小于 30 nm。

### 3.4.2 优缺点分析

GSDIM 技术的最大优点是,可以不受限于使用特定的具有光激活特性的荧光团,比如绿色荧光蛋白或者 Cy3/Cy5 染料分子对,这使得超分辨成像技术的适用样品更加广泛。甚至不需要更换激发光的波长,只需要连续强激光的照射即可,且装置简单。其次,这种开关转换的速度要高于 PALM/STORM 等技术,能够在一定程度上缩短获得单幅超分辨图像的时间。其缺点在于较强的激光容易造成光漂白和光损伤,并且仍然不能避免稀疏性分时成像的耗时性和繁琐性,在活细胞和实时成像的应用方面都受到了很大的限制。

## 3.5 随机光漂白成像

### 3.5.1 定位原理概述

随机光漂白成像和前文所提到的几种方法不同,前文所提到的几种方法是通过各种手段去创造荧光分子的“开”态和“关”态,对稀疏在“开”态的荧光分子进行成像,而随机光漂白成像则主要是利用那些被随机稀疏漂白了的荧光分子<sup>[63]</sup>。成像的精度大约可以达到 10 nm。这种方法其实出现在 PALM 和 STORM 技术之前,这也就容易理解为什么这种方法并不依赖于具有光开关性质的荧光团,其在适用对象方面具有更强的普适性<sup>[64]</sup>。

我们对一个混叠的 PSF 进行考虑,假设其由  $m_1$  和  $m_2$  两个分子发出的荧光所构成。这个混叠 PSF 的强度会分成两步减小,每一步对应着一个单分子的漂白。假如第一次漂白了  $m_1$ ,那么可以通过二维高斯拟合,实现对  $m_2$  分子发出的 PSF 的中心位置的估计。也就是说,选择漂白前的图像  $I_{pre}$  和

经过一步漂白后的图像  $I_{post}$ ,就可以通过  $I_{pre} - I_{post}$  获得被漂白的那个分子的信息,从而通过二维高斯拟合来定位该分子。由于漂白的过程是随机且稀疏进行的,那么每次漂白前后两幅图像的差都能对应那些被漂白了的分子,而这些分子此时也都具备空间稀疏特点。因此,首先对连续分步漂白过程进行记录,再通过作差获得每个稀疏被漂白分子的图像并对其进行定位,最后将这些图像进行综合处理,就可以得到超分辨的图像。相应的原理示意如图 5 所示。

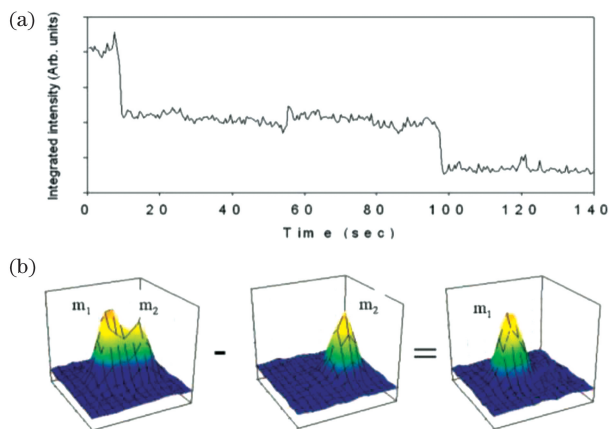


图 5 随机光漂白超分辨成像原理示意图<sup>[10]</sup>。(a)联合光强随时间的衰减;(b)利用光漂白分辨 PSF  
Fig. 5 Principle diagram of stochastic photobleaching super-resolution imaging<sup>[10]</sup>. (a) Attenuation of integrated intensity with time; (b) distinguishing two PSFs by photobleaching

当然,这种拟合也不一定通过作差来实现,也可以通过对  $I_{post}$  进行单个二维高斯拟合,对  $I_{pre}$  进行双二维高斯拟合,即可分辨出两个中心,这两个中心对应两个荧光分子的发光位置。

### 3.5.2 优缺点分析

随机光漂白成像技术的优点在于不需要特定的荧光开关,对大部分的荧光分子都具有普适性。而且图像处理的过程相对来说没有 PALM/STORM 技术那么繁琐,不需要反复地开关,而只需记录连续的分步漂白过程即可。但是这种技术也有局限,比如被漂白的稀疏荧光高斯斑只对应一个荧光分子的假设不适用于多个相近分子同时被漂白的情况。其次,目前该方法还只适用于二维定位的情形,或者只适用于二维投影的距离<sup>[65]</sup>。

## 3.6 超分辨径向涨落成像方法与超分辨光学涨落成像算法

这两种技术在实验光学系统上没有特别要求,

所接收的原始图像仍然是衍射极限下的 PSF, 并且 PSF 不一定呈现稀疏特征, 经过后期算法的处理, 等效 PSF 减小, 从而衍射极限内的两个物点得以分辨。

### 3.6.1 超分辨径向涨落成像方法

SRRF 成像方法假设图像是由点光源与点扩散函数进行卷积形成的, 该函数比背景具有更高的局部对称性。然而, SRRF 成像方法不是检测和定位单个径向对称点, 而是在亚像素的基础上, 利用图像序列中的每一帧来计算全部帧的局部梯度收敛度即辐射度。在单个荧光团条件下, 这会形成一个具有较小半峰全宽的连续锥形分布, 因此等效 PSF 减小, 同时, 可以通过控制梯度的收敛半径来调控辐射度分布的半峰全宽。这种分布与 PSF 的强度大小和尺寸大小都是无关的。一些噪声点也会呈辐射对称分布, 进而出现辐射峰值。为了解决这个问题, SRRF 成像方法引入了时间序列上的相关分析。这种时间序列上的分析基于两点: 一是噪声引起的辐射峰值在时间上是不相关的, 因此随着图像帧数的增加, 噪声信号在各个位置上的像素级时间相关性将趋近于零; 二是最高程度的时间相关性位于荧光团信号产生的辐射峰值的中心。SRRF 成像方法的最小分辨距取决于不同途径获得的原始数据集, 比如使用 SMLM 的数据集, 最小分辨距可以达到 50 nm; 使用共聚焦显微镜拍得的数据集, 最小

分辨距可以达到 80~98 nm; 使用宽场发光二极管(LED)照明显微镜拍得的数据集, 最小分辨距为 103~106 nm<sup>[28]</sup>。

### 3.6.2 超分辨光学涨落成像算法

SOFI 算法在成像速度、空间分辨率、系统成本和光毒性等方面能够实现良好的平衡<sup>[66]</sup>。SOFI 算法主要依赖的是荧光分子时间涨落的高阶统计分析, 基于三个基本假设条件: 一是荧光团至少具有两种及其以上不同的发射状态, 最简单的是开或者关; 二是不同的荧光团以随机的方式在不同的状态之间反复独立地切换; 三是接受器电荷耦合器件(CCD)或者互补金属氧化物半导体(CMOS)的像素尺寸小于衍射极限。以二阶统计为例, 我们论证了该技术对等效 PSF 的减小作用。在时间  $t$ 、位置  $\mathbf{r}$  处获得的荧光信号可以看作是系统 PSF 与荧光源分布的卷积:

$$F(\mathbf{r}, t) = \sum_{k=1}^N U(\mathbf{r} - \mathbf{r}_k) \times \epsilon_k \times s_k(t), \quad (2)$$

式中:  $F(\mathbf{r}, t)$  为获得的荧光信号强度;  $U(\mathbf{r})$  为系统的 PSF;  $\mathbf{r}_k$  为第  $k$  个荧光分子的位置;  $\epsilon_k$  为常数系数;  $s_k(t)$  为荧光分子对应的亮度函数;  $\epsilon_k \times s_k(t)$  为时间为  $t$  时第  $k$  个荧光分子的亮度。

假设荧光分子在采集图像过程中一直处于平衡平稳状态, 其随时间的涨落均值为零。这种波动可以表示为

$$\delta F(\mathbf{r}, t) = F(\mathbf{r}, t) - \langle F(\mathbf{r}, t) \rangle_t = \sum_{k=1}^N U(\mathbf{r} - \mathbf{r}_k) \times \epsilon_k \times [s_k(t) - \langle s_k(t) \rangle_t] = \sum_{k=1}^N U(\mathbf{r} - \mathbf{r}_k) \times \epsilon_k \times \delta s_k(t), \quad (3)$$

式中:  $\langle \cdot \rangle_t$  代表对时间的平均。相隔时间  $\tau$  之后, 根据(3)式再获取一张涨落图像, 作两幅图像的自相关运算, 可得

$$G_2(\mathbf{r}, t) = \langle \delta F(\mathbf{r}, t + \tau) \times \delta F(\mathbf{r}, t) \rangle_t = \sum_{j,k} U(\mathbf{r} - \mathbf{r}_j) U(\mathbf{r} - \mathbf{r}_k) \epsilon_j \epsilon_k \langle \delta s_j(t + \tau) \delta s_k(t) \rangle_t = \sum_k U^2(\mathbf{r} - \mathbf{r}_k) \epsilon_k^2 \times \langle \delta s_j(t + \tau) \delta s_k(t) \rangle_t, \quad (4)$$

式中:  $j, k$  为荧光分子的编号;  $\mathbf{r}_j, \mathbf{r}_k$  为荧光分子的位置。我们认为不同的荧光分子在时间上的涨落是相互独立的, 所以第二项中  $\langle \delta s_j(t + \tau) \delta s_k(t) \rangle_t$  所有的交叉项都为 0, 因此会有第三步的结果。从形式上看, 二阶自相关运算的结果和原始图像类似, 但是新的 PSF 是原来 PSF 的平方。如果原来 PSF 是二维高斯分布, 可以计算得出其平方的标准差缩小到原来的  $1/\sqrt{2}$ , 相当于减小了等效 PSF 的尺寸, 从而可以将两个相距的距离在衍射极限内的荧光分子在空间上区分出来, 从而实现超分辨成

像<sup>[25]</sup>。但是, 如果荧光自身亮度和接受器接收的信号强度之间存在非线性关系, 高阶自相关运算反而会加剧这种消极的非线性效应的影响, 造成定位的不准确。辐射度信息在所有荧光团中是相似的, 并且与亮度无关, 因此上述 SRRF 成像方法可以在一定程度上缓解这一问题。

### 3.6.3 优缺点分析

这两种技术最大的优点在于不依赖于物理的光学系统, 可以依靠普通的宽场或者全内反射荧光显微镜, 也不会产生光毒性, 只需连续拍摄样品即



可,纯粹依靠后期的算法处理达到超分辨的能力,因此可以用于活细胞动力学过程的观察。并且比起其他能够分析高密度数据集的超分辨算法, SRRF 成像方法可以减小恢复图像的缺陷点,恢复的图像具有更好的质量。但是这两种技术的缺点也很明显,就是超分辨的能力有限,一般只能达到 100 nm 左右的分辨率,最高能达到 50 nm 左右,不能和 PALM/STORM 等方法一样达到 20 nm 级别的分辨率,适用于对超分辨要求不那么高的场景。

### 3.7 基于最少光子数的纳米尺度定位技术

#### 3.7.1 定位算法

这种方法是一种和高斯拟合单分子定位算法不同的定位算法,通过移动激发光斑位置,得到对应的差分信息,经过概率分布反求得到荧光分子的位置,可以只使用较少的光子数,达到较高的定位精度,分辨率甚至可以达到亚十纳米<sup>[67]</sup>。具体操作过程是将暗斑放置在探测视场的圆心和圆周三等分点四个位置处。因为荧光分子被暴露在四个不同的光强之下,因此会产生不同强度的荧光发射,那么探测器可以接受到不同的光子数。具体装置和原理如图 6 所示。

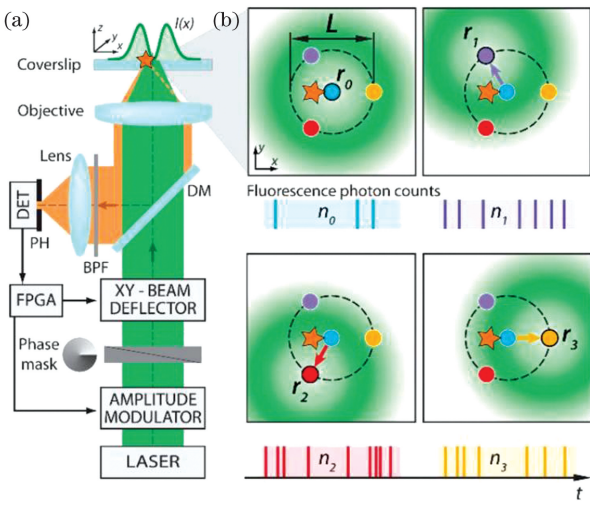


图 6 MINFLUX 装置与原理示意图<sup>[29]</sup>。(a) MINFLUX 实验装置图;(b) MINFLUX 探测步骤示意图

Fig. 6 Setup and principle diagram of MINFLUX<sup>[29]</sup>.

(a) Experimental setup of MINFLUX;  
(b) detection steps of MINFLUX

由于每个光子到达定位位置的概率服从多项式分布,因此具体产生一种光子数分布的概率为

$$L = \frac{N!}{\prod_{i=0}^{k'-1} n_i!} \prod_{i=0}^{k'-1} p_i^{n_i}, \quad (5)$$

式中: $k'$  是在一次定位周期中放置暗斑的总位置数; $n_i$  是暗斑放置在第  $i$  个位置时收集到的光子数; $p_i$  是暗斑放置在第  $i$  个位置时荧光分子产生的概率。

$$p_i = \frac{I_i}{\sum I_i}, \quad (6)$$

式中: $I_i$  是暗斑放置在第  $i$  个位置时荧光分子对应的激发光强度。对探测区域的每一个可能的点求  $p_i$ , 即假设荧光分子位于该点,然后求出在此条件下产生特定光子数分布的可能性,取这些概率的最大值,就可以将其对应的位置认为是荧光分子实际所在的位置。其定位精度利用克拉美罗界(CRB)判据可以表示为

$$\sigma_{\text{CRB}}(|\bar{\mathbf{r}}|=0) = \frac{L}{2\sqrt{2N''}} \left(1 - \frac{L^2 \ln 2}{F_w^2}\right)^{-1}, \quad (7)$$

式中: $\sigma_{\text{CRB}}$  为误差分布标准差; $L$  为圆形视场的直径; $F_w$  为用于激发的暗斑的半峰全宽。可以从(7)式分母上明显看出定位精度的理论提高<sup>[29]</sup>。当然这种定位方法仍然存在误差,比如当探测圆范围内存在多个荧光分子被激发时,则这些荧光分子的光效应会叠加,致使彼此无法被分辨出来。另外,使用单探测器会有“死区”问题,即同时到达探测器的多个光子会被识别为一个脉冲,使用探测器阵列可以较为方便地解决这个问题。MINFLUX 算法的前提条件是激发光强和荧光发光光强呈现线性关系,但事实上,荧光发光是随机波动的,这对 MINFLUX 算法中收集到的总光子数会有较大的影响,从而使定位结果产生误差。这个问题同样可以用探测器阵列来解决。因为探测器阵列不仅可以获得总光子数信息,还可以获得光子数随空间变化的分布信息,荧光强度的涨落只会引起总光子数的波动,而不会引起光子数空间分布的波动,从而结果能够得到有效的补充修正。

2019 年, Hell 课题组发布了最新的研究成果,公开了 MINFLUX 的多色三维成像。三维 MINFLUX 实现原理与二维较为类似。在  $z$  轴上同样进行两次空间上的移动,加上中心点一共三个位置,用同样的概率分布分析方法获得  $z$  轴的位置信息。也可以和  $xy$  平面情形一样放置四个位置,但这对仪器的移动要求更高。对于多色 MINFLUX 的实现,不同的荧光分子可以用同样的波长进行激发,但释放光谱会存在差异<sup>[68]</sup>。如果采用两种不同的特定的荧光团标记不同的物质,比如 Alexa Fluor 647 和 CF660C 分子,在接收方使用二

向色镜,就可以将不同波长的荧光分开。将分别收集的光子数相加,再使用相关的算法进行定位。但具体区分荧光分子则需要通过比较光谱对应的信号强度来确定。还可以对所有 MINFLUX 迭代的光谱分量进行主成分分析,根据第一个主成分的分布选择分类阈值,进而对分类进行细化<sup>[32]</sup>。同时,对于定位算法,先对一个大范围进行估计,然后通过逐步减小定位圆的半径来精细化位置的估计,经过较长迭代,也可以更好地提高定位的精度和准确度。

### 3.7.2 优缺点分析

MINFLUX 算法最大的优点就是利用了暗斑差分而非高斯定位的方法,可以有效地提高光子利用率。由前文叙述可知,传统高斯定位的方法需要大量的光子数来提高定位的精度,因为极少光子数的随机泊松分布会同时影响单分子定位的精度和准确度。但是,MINFLUX 算法可以利用很少的光子数,通过引入光子数分布的新信息来获得荧光分子的位置。同时,对于定位精度的提高,MINFLUX 算法也有了质的突破,最小分辨距甚至可以达到亚十纳米的高水平。同时,高度定位所需的光子数比较少,对生物样品本身的破坏较小,因此有望在活细胞中实现应用。但是,在本质上,MINFLUX 算法并没有摆脱稀疏性的限制,换句话说,如果在一次定位的激发过程中不只有一个分子受到激发,而是有两个或者多个分子,MINFLUX 算法并不能识别出来,这种分子间的相互干扰就会对定位结果产生影响,因此稀疏发光的特性仍需满足,MINFLUX 算法的应用被限制在低染料浓度的条件下。其次,

MINFLUX 算法相比原来的 PALM/STORM 技术,定位时间增长,之前只需要一次激发就能定位一个分子,现在却需要多次激发,因此获得大视场较高密度的样品信息,还需要很长的图像处理时间<sup>[32]</sup>。

## 3.8 基于结构光的 MINFLUX 变体与重复光学选择曝光技术

### 3.8.1 SIMFLUX 定位算法

SIMFLUX 是由 MINFLUX 变体而来的,但是结合了高斯中心定位的方法和 MINFLUX 移动激发光斑的办法,能够进一步扩展成像的视场,同时提高了定位精度。照明方式选择驻波模型( $\sin$  函数),在  $x$  方向移动三个位置,在  $y$  方向移动三个位置,可以得到六幅图像。此过程可以视为相位的移动,荧光分子被暴露在六个不同的光强下,因而可以获得六个光子数。数据处理的流程如下:第一步,先对该区域内有无荧光分子进行确定,使用高斯拟合的方式对荧光分子的位置进行初步估计,圈定探测区域的大小;第二步,在圈定探测区域内,利用驻波照明移动获得的光子数信息,获得单独的  $x$  坐标信息和  $y$  坐标信息;第三步,进行更小范围照明模式的移动,通过迭代过程进一步提高定位的准确度。其定位的精确度为

$$\Delta x_0 = \frac{\sigma}{\sqrt{N} \cdot \sqrt{1 + 2\pi^2 \sigma^2 / p^2}}, \quad (8)$$

式中:  $\Delta x_0$  为荧光分子的定位误差;  $p$  为驻波照明模式的最小间距。由于  $\sigma \approx \lambda/4NA$ ,  $p \approx \lambda/2NA$ , (8)式大致可以简化为  $\sigma/2.4\sqrt{N}$ , 比起传统的高斯定位方法提高了很多。其定位原理图如图 7 所示。

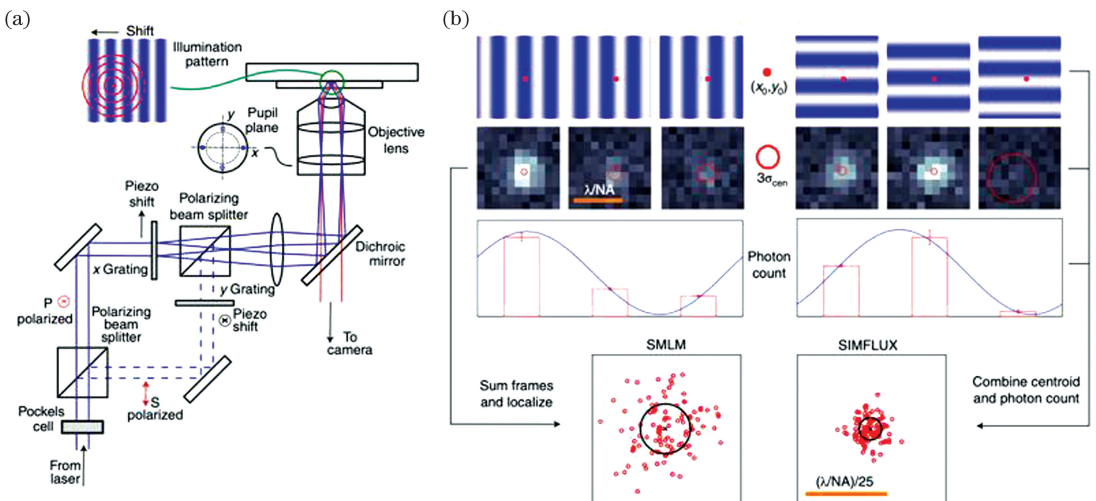


图 7 SIMFLUX 原理示意图<sup>[34]</sup>。(a)实验装置图;(b)工作流程图

Fig. 7 Principle diagram of SIMFLUX<sup>[34]</sup>. (a) Experimental setup; (b) work flow chart

### 3.8.2 重复光学选择曝光技术

ROSE 技术的定位原理和上述 SIMFLUX 十分相近,区别在于 SIMFLUX 的迭代过程更多。激发激光束被调制成分布在样品表面上的相位可控的干涉条纹。三条相位分别偏移  $120^\circ$  的条纹被用来定位分子, $x$ 、 $y$  两个方向对应得到六张子图。定位算法包含了传统的正态传统高斯拟合和六个图像中获得的光子数比值计算。高斯拟合实现了基本的粗略的位置估计,而光子数的比值运算提供了相对于干涉条纹的相对位置。当使用的干涉条纹的周期长度大约是  $220\text{ nm}$  时,定位精度大约是  $50/\sqrt{N}^{[33]}$ 。

### 3.8.3 优缺点分析

两种技术的优点在于结合了传统高斯定位和 MINFLUX 概率分布定位的方法,能够先圈定一个大致的合适的探测圆范围,再使用 MINFLUX 光子数提供更精细的相对位置信息,最终得到定位结果,有助于提高定位的精度和准确度。但是,目前这种移动局限在二维情形,而且获得一次定位信息的步骤也较为复杂和繁琐,相对更加耗费时间。

综上所述,所有 SMLM 的参数和优缺点对比如表 1 所示。

## 4 结束语

总而言之,单分子定位成像技术仍然有很大的应用前景和发展潜能<sup>[69]</sup>。它能观察的尺度越来越小,这有助于其在比较稠密的荧光标记样品中的应用。它可以与其他技术进行进一步结合,以实现更多的功能和应用及更高的图像质量<sup>[70]</sup>。比如单分子定位成像技术和光片照明技术相结合,可以减少背景噪声以及离焦的光漂白现象;和电镜相结合,可以进一步观察组织的超结构和蛋白质的超精细位置。基于单分子定位成像技术获得的原始数据,通过与其他技术的结合,可以有助于从图像中获取更多的信息。比如将单分子定位成像技术提供的分子知识与功能测定和敲除突变相结合,有助于扩展我们的视野,并解释进化在分子水平上提供复杂功能的原理<sup>[2]</sup>。

目前,除了基于算法的 SOFI 和 SRRF 方法之外,几乎所有的单分子定位超分辨方法还是离不开稀疏性的要求,需要反复多次的分时定位再综合处理,后期处理时间非常长,一般至少是荧光寿命的

10000 倍,大约为  $0.01\text{ ms}$ ,这就限制了这些方法在细胞动态过程检测方面的应用<sup>[71]</sup>。因此,今后的一大研究方向是进一步提高算法的计算效率以实现后期处理速度的提高以及更有效地利用荧光的开关特性来减少图像采集时间。这两者都有助于缩短获得单幅高分辨率图像的总时间。除此之外,目前 sCMOS 相机比传统的 CCD 接收器具有更大的优势,采集图像的速度更快,并且每幅图像包含的信息数量和质量也更好,可以在更短时间内获得单幅高分辨图像。因此,高性能探测器的研发对于单分子定位超分辨成像也是非常重要的研究方向<sup>[72]</sup>。

此外,另一个研究方向是单分子定位超分辨方法在活细胞中的应用<sup>[73]</sup>。PALM/STORM 等方案需要比较高的荧光光子数,因此需要高强度的激光激发,光毒性比较强。而随机光漂白成像不利于单分子定位超分辨方法在活细胞中的应用。相对而言,MINFLUX 在活细胞中有着更为开阔的应用前景。当然,在较低功率密度且不降低光子数的条件下得到较高的分辨率以实现实时的活细胞成像,这还依赖于荧光探针闪烁特性的改善(包括探针结构的改进和化学环境的优化等)<sup>[74]</sup>。

还有一个新兴的研究方向是单分子定位超分辨方法和计算机人工智能等的结合。当前人工智能技术发展迅速,如果能建立普通的非超分辨图像和超分辨图像之间的非线性输入输出关系,那么就能将传统荧光显微镜拍摄的图像进行超分辨化,进而缩短处理时间。目前该方面的研究刚刚起步,效果还有很大的提升空间。因此,借助计算机算法来提高超分辨成像的速度和可靠度是十分有前景的发展方向。

最后,单分子定位成像相关技术在生物医学方面的应用仍然具有巨大的发展潜力<sup>[75]</sup>。例如,利用超越衍射极限的空间分辨率,可研究生物发育过程中细胞器的形态变化,包括细胞骨架结构的动态重构、细胞黏连和连接的协调形成和重组所介导的细胞迁移。再比如传统电镜不能对蛋白质进行特异性研究,但单分子定位成像技术就可以确定这些复合物中蛋白质的分子组成和三维空间结构<sup>[76]</sup>。当然,单分子定位成像技术对具体疾病的治疗研究以及在临床上的成功应用还需要更进一步的研究。



表1 各SMLM的对比  
Table 1 Comparison among all SMLMs

SMLM	Best resolution	Localization precision	Advantage	Disadvantage
PALM <sup>[16]</sup>	2–25 nm	$\sigma/\sqrt{N}$	Super high precision	Being time-consuming, large amount of calculation, being unsuitable for dynamic process imaging, severe photobleaching, and only exogenous proteins being observed
STORM <sup>[17]</sup>	About 20 nm	$\sigma/\sqrt{N}$	Super high precision	Being limited in <i>in-vivo</i> imaging, severe photobleaching, and being unable to quantify molecule numbers in a cell
PAINT <sup>[18]</sup>	About 25 nm	$\sigma/\sqrt{N}$	No need to label sample	Large amount of calculation, long post-processing time, and only obtaining surface information of sample, not internal information
GSDIM <sup>[22]</sup>	About 30 nm	$\sigma/\sqrt{N}$	No need of special fluorophore, simple device, and shortening time of image acquisition	Severe photobleaching, complex processing, and being limited in real-time imaging of living cells
SHRIMP <sup>[10]</sup>	About 10 nm	$\sigma/\sqrt{N}$	No special fluorophore, and relatively simple process	Being unsuitable for cases where two or more neighboring molecules are bleached at the same time and being limited in 2D situation
SRRF <sup>[28]</sup>	50–106 nm	$\sigma/\sqrt{N}$	Being able to be complemented in conventional microscope	Being limited resolution
SOFI <sup>[25]</sup>	100 nm	$\sigma/\sqrt{N}$	No phototoxicity and short processing time	Being limited resolution
MINFLUX <sup>[29]</sup>	1–5 nm	About $L/2 \sqrt{2N}$	Improved photon utilization, improved localization precision, and being suitable for living cell imaging	Complex processing and being limited in sparse solution and long acquisition time
SIMFLUX <sup>[34]</sup>	5–10 nm	$\sigma/2.4 \sqrt{N}$	Improved localization precision and accuracy	Being limited in 2D situation
ROSE <sup>[33]</sup>	2–5 nm	About $50/\sqrt{N}$	Improved localization precision and accuracy	Being time-consuming

## 参 考 文 献

- [1] Wang B K, Barbiero M, Zhang Q M, et al. Super-resolution optical microscope: principle, instrumentation, and application [J]. *Frontiers of Information Technology & Electronic Engineering*, 2019, 20(5): 608-630.
- [2] Sauer M, Heilemann M. Single-molecule localization microscopy in eukaryotes [J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(11): 7478-7509.
- [3] Schermelleh L, Ferrand A, Huser T, et al. Super-resolution microscopy demystified [J]. *Nature Cell Biology*, 2019, 21(1): 72-84.
- [4] Mishin A S, Lukyanov K A. Live-cell super-resolution fluorescence microscopy [J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2019, 84: 19-31.
- [5] Pan W H, Li W, Qu J H, et al. Research progress on organic fluorescent probes for single molecule localization microscopy [J]. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 2019, 36(3): 269-281.  
潘文慧, 李文, 屈璟涵, 等. 单分子定位超分辨显微成像有机荧光探针的研究进展 [J]. *应用化学*, 2019, 36(3): 269-281.
- [6] Vangindertael J, Camacho R, Sempels W, et al. An introduction to optical super-resolution microscopy for the adventurous biologist [J]. *Methods and*

- Applications in Fluorescence, 2018, 6(2): 022003.
- [7] Biteen J, Willets K A. Introduction: super-resolution and single-molecule imaging [J]. Chemical Reviews, 2017, 117(11): 7241-7243.
- [8] Fu Y, Wang T L, Zhao S. Imaging principles and applications of super-resolution optical microscopy [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2019, 56(24): 240002.  
付芸, 王天乐, 赵森. 超分辨光学显微的成像原理及应用进展 [J]. 激光与光电子学进展, 2019, 56(24): 240002.
- [9] Shashkova S, Leake M C. Single-molecule fluorescence microscopy review: shedding new light on old problems [J]. Bioscience Reports, 2017, 37(4): BSR20170031.
- [10] Gordon M P, Ha T, Selvin P R. Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(17): 6462-6465.
- [11] Orrit M, Bernard J. Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a *p*-terphenyl crystal [J]. Physical Review Letters, 1990, 65(21): 2716.
- [12] Moerner W E, Kador L. Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid [J]. Physical Review Letters, 1989, 62(21): 2535-2538.
- [13] Brooks Shera E, Seitzinger N K, Davis L M, et al. Detection of single fluorescent molecules [J]. Chemical Physics Letters, 1990, 174(6): 553-557.
- [14] Betzig E. Proposed method for molecular optical imaging [J]. Optics Letters, 1995, 20(3): 237-239.
- [15] Lidke K A, Rieger B, Jovin T M, et al. Superresolution by localization of quantum dots using blinking statistics [J]. Optics Express, 2005, 13(18): 7052-7062.
- [16] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. Science, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Heilemann M, van de Linde S, Schüttelpelz M, et al. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2008, 47(33): 6172-6176.
- [20] 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.
- [21] Shroff H, Galbraith C G, Galbraith J A, et al. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics [J]. Nature Methods, 2008, 5(5): 417-423.
- [22] Fölling J, Bossi M L, Bock H, et al. Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return [J]. Nature Methods, 2008, 5(11): 943-945.
- [23] Lalkens B, Testa I, Willig K I, et al. MRT letter: nanoscopy of protein colocalization in living cells by STED and GSDIM [J]. Microscopy Research and Technique, 2012, 75(1): 1-6.
- [24] Piestun R, Pavani S R P, Thompson M A, et al. Three-dimensional single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit using a double-helix point spread function [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(9): 2995-2999.
- [25] Dertinger T, Colyer R A, 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.
- [26] Holden S, Uphoff S, Kapanidis A N. DAOSTORM: an algorithm for high-density super-resolution microscopy [J]. Nature Methods, 2011, 8(4): 279-280.
- [27] Hu C G, Zha R D, Ling Q Y, et al. Super-resolution microscopy applications and development in living cell [J]. Infrared and Laser Engineering, 2017, 46(11): 15-25.  
胡春光, 查日东, 凌秋雨, 等. 超分辨显微技术在活细胞中的应用与发展 [J]. 红外与激光工程, 2017, 46(11): 15-25.
- [28] Gustafsson N, Culley S, Ashdown G W, et al. Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations [J]. Nature Communications, 2016, 7(1): 12471.

- [29] 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.
- [30] Ouyang W, Aristov A, Lelek M, et al. Deep learning massively accelerates super-resolution localization microscopy [J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(5): 460-468.
- [31] Nehme E, Weiss L E, Michaeli T, et al. Deep-STORM: super-resolution single-molecule microscopy by deep learning [J]. *Optica*, 2018, 5(4): 458-464.
- [32] Hell S W. MINIFLUX Nanoscopy: Superresolution post Nobel[J]. *European Biophysics Journal*, 2019, 48(S1): S34.
- [33] Gu L S, Li Y Y, Zhang S W, et al. Molecular resolution imaging by repetitive optical selective exposure[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(11): 1114-1118.
- [34] Cnossen J, Hinsdale T, Thorsen R Ø, et al. Localization microscopy at doubled precision with patterned illumination[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(1): 59-63.
- [35] Chen T S. Research on photobleaching mechanism and real-time measurement technology of fluorescent resonance energy transfer efficiency [D]. Wuhan: Huangzhong University of Science and Technology, 2003.  
陈同生. 光漂白机理与荧光共振能量转移效率实时测量技术的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2003.
- [36] Roubinet B, Weber M, Shojaei H, et al. Fluorescent photoswitchable diarylethenes for biolabeling and single-molecule localization microscopies with optical superresolution [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(19): 6611-6620.
- [37] Wang L, Frei M S, Salim A, et al. Small-molecule fluorescent probes for live-cell super-resolution microscopy[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(7): 2770-2781.
- [38] 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.
- [39] Burnette D T, Sengupta P, Dai Y, et al. Bleaching/blinking assisted localization microscopy for superresolution imaging using standard fluorescent molecules[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(52): 21081-21086.
- [40] Paës G, Habrant A, Terryn C. Fluorescent nano-probes to image plant cell walls by super-resolution STED microscopy[J]. *Plants*, 2018, 7(1): 11.
- [41] Lin D Y, Qu J L. Recent progress on super-resolution imaging and correlative super-resolution microscopy[J]. *Acta Physica Sinica*, 2017, 66(14): 148703.  
林丹樱, 屈军乐. 超分辨成像及超分辨关联显微技术研究进展[J]. *物理学报*, 2017, 66(14): 148703.
- [42] Li H L, Vaughan J C. Switchable fluorophores for single-molecule localization microscopy[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(18): 9412-9454.
- [43] 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.
- [44] Bates M, Huang B, Zhuang X W. Super-resolution microscopy by nanoscale localization of photo-switchable fluorescent probes[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2008, 12(5): 505-514.
- [45] 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.
- [46] Stallinga S, Rieger B. Accuracy of the Gaussian point spread function model in 2D localization microscopy [J]. *Optics Express*, 2010, 18(24): 24461-24476.
- [47] Small A, Stahlheber S. Fluorophore localization algorithms for super-resolution microscopy [J]. *Nature Methods*, 2014, 11(3): 267-279.
- [48] Ober R J, Ram S, Ward E S. Localization accuracy in single-molecule microscopy [J]. *Biophysical Journal*, 2004, 86(2): 1185-1200.
- [49] Willets K A, Wilson A J, Sundaresan V, et al. Super-resolution imaging and plasmonics [J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(11): 7538-7582.
- [50] Yang J Y, Pan L T, Hu F, et al. Stochastic optical reconstruction microscopy and its application [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2017, 46(11): 1103008.  
杨建宇, 潘雷霆, 胡芬, 等. 随机光学重构显微术及其应用研究进展[J]. *红外与激光工程*, 2017, 46(11): 1103008.
- [51] Mark Bates W, Huang B, Dempsey G T, et al. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes[J]. *Science*, 2007, 317(5845): 1749-1753.



- [52] Pereira P M, Almada P, Henriques R. High-content 3D multicolor super-resolution localization microscopy [J]. *Methods in Cell Biology*, 2015, 125: 95-117.
- [53] 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.
- [54] Sauer M. Localization microscopy coming of age: from concepts to biological impact [J]. *Journal of Cell Science*, 2013, 126(16): 3505-3513.
- [55] Truong Quang B A, Lenne P F. Superresolution measurements *in vivo*: imaging Drosophila embryo by photoactivated localization microscopy [J]. *Methods in Cell Biology*, 2015, 125: 119-142.
- [56] Szcurek A, Birk U J, Knecht H, et al. Super-resolution binding activated localization microscopy through reversible change of DNA conformation [J]. *Nucleus*, 2018, 9(1): 182-189.
- [57] Oddone A, Vilanova I V, Tam J, et al. Super-resolution imaging with stochastic single-molecule localization: concepts, technical developments, and biological applications [J]. *Microscopy Research and Technique*, 2014, 77(7): 502-509.
- [58] Auer A A, Strauss M T, Schlichthaerle T, et al. Fast, background-free DNA-PAINT imaging using FRET-based probes [J]. *Nano Letters*, 2017, 17(10): 6428-6434.
- [59] Schlichthaerle T, Strauss M T, Schueder F, et al. Direct visualization of single nuclear pore complex proteins using genetically-encoded probes for DNA-PAINT [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(37): 13004-13008.
- [60] Wade O K, Woehrstein J B, Nickels P C, et al. 124-color super-resolution imaging by engineering DNA-PAINT blinking kinetics [J]. *Nano Letters*, 2019, 19(4): 2641-2646.
- [61] Strauss S, Nickels P C, Strauss M T, et al. Modified aptamers enable quantitative sub-10-nm cellular DNA-PAINT imaging [J]. *Nature Methods*, 2018, 15(9): 685-688.
- [62] Pereira A, Sousa M, Almeida A C, et al. Coherent-hybrid STED: high contrast sub-diffraction imaging using a bi-vortex depletion beam [J]. *Optics Express*, 2019, 27(6): 8092-8111.
- [63] Cai H Q, Kuang C F, Wang Y F, et al. Superresolution microscopy imaging based on wide-field stochastic fluorescent bleaching [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2013, 40(11): 1110001.
- [64] Wang Y F, Kuang C F, Cai H Q, et al. Sub-diffraction imaging with confocal fluorescence microscopy by stochastic photobleaching [J]. *Optics Communications*, 2014, 312: 62-67.
- [65] Simonson P D, Rothenberg E, Selvin P R. Single-molecule-based super-resolution images in the presence of multiple fluorophores [J]. *Nano Letters*, 2011, 11(11): 5090-5096.
- [66] 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.
- [67] Eilers Y, Ta H S, Gwosch K C, et al. MINFLUX monitors rapid molecular jumps with superior spatiotemporal resolution [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(24): 6117-6122.
- [68] Gwosch K C, Pape J K, Balzarotti F, et al. MINFLUX nanoscopy delivers 3D multicolor nanometer resolution in cells [J]. *Nature Methods*, 2020, 17: 217-224.
- [69] Taraska J W. A primer on resolving the nanoscale structure of the plasma membrane with light and electron microscopy [J]. *The Journal of General Physiology*, 2019, 151(8): 974-985.
- [70] Mund M, Kaplan C, Ries J. Localization microscopy in yeast [J]. *Methods in Cell Biology*, 2014, 123: 253-271.
- [71] Li H L, Vaughan J C. Switchable fluorophores for single-molecule localization microscopy [J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(18): 9412-9454.
- [72] Gui D, Shang M T, Huang Z. Super-resolution localization microscopy with scientific complementary metal oxide semiconductor camera [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45(2): 0207016.  
桂丹, 商明涛, 黄振立. 基于 sCMOS 相机的超分辨定位成像技术 [J]. *中国激光*, 2018, 45(2): 0207016.
- [73] Pittet M J, Garris C S, Arlauckas S P, et al. Recording the wild lives of immune cells [J]. *Science Immunology*, 2018, 3(27): eaaq0491.
- [74] Dersch S, Graumann P L. The ultimate picture: the combination of live cell superresolution microscopy and single molecule tracking yields highest spatio-

temporal resolution [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 43: 55-61.

[75] Wang X H, Li X J, Deng X, et al. Single-molecule fluorescence imaging to quantify membrane protein dynamics and oligomerization in living plant cells[J].

*Nature Protocols*, 2015, 10(12): 2054-2063.

[76] Sengupta P, van Engelenburg S B, Lippincott-Schwartz J. Superresolution imaging of biological systems using photoactivated localization microscopy [J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(6): 3189-3202.