

单分子定位超分辨成像技术进展及应用

杨建宇¹, 董浩¹, 邢福临¹, 胡芬¹, 潘雷霆^{1,2*}, 许京军¹

¹ 弱光非线性光子学教育部重点实验室, 南开大学物理科学学院, 泰达应用物理研究院, 天津 300071;

² 药物化学生物学国家重点实验室, 南开大学生命科学学院, 细胞应答交叉科学中心, 天津 300071

摘要 21 世纪初诞生的超分辨光学成像技术凭借纳米级空间分辨率、低损伤制样等优点, 迅速发展成为生命科学研究中不可或缺的技术手段。其中单分子定位超分辨成像(SMLM)技术更是由于其成像原理易懂、空间分辨率极高等特点, 一直受到科研工作者的青睐, 不断取得重要的技术和应用进展。首先回顾了 SMLM 的工作原理, 讨论了其光路搭建、图像重建、漂移校正等关键技术问题。介绍了两类代表性 SMLM 技术。列举了多种多色 SMLM 方法, 并分析了各自的优缺点。介绍了 SMLM 成像参数的改进研究, 包括横/纵分辨率的提高、成像视野和深度的改善。介绍了 SMLM 和深度学习, SMLM 和电镜等成像手段结合的关联成像研究进展。讨论了 SMLM 数据提取与分析方法。最后列举了 SMLM 在细胞生物学中的重要应用, 并展望了 SMLM 未来的发展方向。期望该综述能为 SMLM 工作者提供有益的启发和参考, 推进 SMLM 在生命科学研究中的深入应用。

关键词 显微; 荧光显微成像; 超分辨成像; 单分子定位; 光学衍射极限; 图像重建

中图分类号 O436

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202158.1200001

Single-Molecule Localization Super-Resolution Microscopy and Its Applications

Yang Jianyu¹, Dong Hao¹, Xing Fulin¹, Hu Fen¹, Pan Leiting^{1,2*}, Xu Jingjun¹

¹ Key Laboratory of Weak-Light Nonlinear Photonics, Ministry of Education, School of Physics and TEDA Institute of Applied Physics, Nankai University, Tianjin 300071, China;

² State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, College of Life Sciences, Frontiers Science Center for Cell Responses, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract Super-resolution microscopy invented at the beginning of the 21st century has rapidly become an indispensable method in life science research owing to their nanoscale spatial resolution, low damage of sample preparation, and so on. Among a variety of super-resolution imaging techniques, single-molecule localization super-resolution microscopy (SMLM) with straightforward principle and outstanding spatial resolution gains more and more attention from researchers, thereby continuously making significant progress on the techniques and applications. Firstly, this paper reviewed the principle of SMLM and discussed some technical problems including the optical path building, the image reconstruction, and the drift correction. Two types of representative SMLMs were introduced and discussed. Then, diversified multi-color SMLMs were introduced and their advantages and disadvantages were analyzed. The improvement of imaging parameters including the lateral/axial spatial resolution, imaging field, and imaging depth of SMLM was subsequently discussed. The research progress of correlated imaging of the SMLM combined with deep learning and SMLM combined with the electron microscope was further

收稿日期: 2021-05-02; 修回日期: 2021-05-18; 录用日期: 2021-05-19

基金项目: 广东省基础与应用基础研究重大项目(2020B0301030009)、国家自然科学基金(11874231, 31801134, 31870843)、中国博士后科学基金(2020M680032)、南开大学中央高校基本科研业务费专项资金(2122019446)、高等学校学科创新引智计划(B07013)

通信作者: *plt@nankai.edu.cn

introduced. Moreover, the extraction and analysis methods of SMLM data were discussed. Finally, some important applications of SMLM in cell biology were listed and the development prospects of SMLM were discussed. We hope the present review could be a useful reference for the SMLM users and provides novel insights for them, thus promoting the in-depth applications of SMLM in life science research.

Key words microscopy; fluorescence microscopic imaging; super-resolution imaging; single-molecule localization; optical diffraction limit; image reconstruction

OCIS codes 180.2520; 100.6640; 170.0180

1 引言

物理学与生命科学的交叉融合不断推动生命科学研究向精准、可控、可视等方向发展,大大提高了人们观察和解析复杂生命现象的能力。其中光学显微成像技术因具有放大、实时可视、非侵入性观察等优点,自诞生以来给生命活动的基本单元——细胞的研究不断带来变革性突破。伴随着新型荧光探针的出现、高灵敏成像探测器的研发和光学控制手段的丰富,超分辨光学成像技术于21世纪初诞生,突破衍射极限限制,把成像分辨率从200 nm提高至几纳米,迅速发展成为生命科学研究中不可或缺的新兴技术手段,为亚细胞尺度生命活动探究提供了强有力的技术支持^[1-3]。2014年美、德三位科学家因发展超分辨光学成像技术被授予“诺贝尔化学奖”。2019年著名华人科学家庄小威,因开发了超分辨光学显微成像技术并揭示了细胞内隐藏的精密结构而获得“科学突破奖”。

超分辨成像技术按其工作原理可分成两类:第一类是基于照明光场改造技术的受激发射损耗显微成像术(STED)^[4-5]和结构光照明显微术(SIM)^[6-7];第二类是基于单分子定位成像技术(SMLM)的随机光学重建显微术(STORM)^[8-9]和光激活定位显微术(PALM)^[10],以及依靠荧光分子与靶标可逆结合发光的纳米尺度点累积形貌成像(PAINT)^[11]。其中SMLM的基本工作原理为多次循环采集被稀疏激活的荧光分子,再利用单分子定位算法分析每一帧图像中离散荧光分子的点扩展函数,给出其精准的空间定位信息,最后将每一帧的定位点合成为一张超分辨图像^[12-13]。诺贝尔奖获得者Hell教授团队于2017年结合STED和SMLM的优势,提出一种最小光子流量(MINFLUX)超分辨成像技术,实现~1 nm的定位精度和~6 nm的成像精度,成为当前分辨率最高的超分辨成像技术^[14]。

本文主要介绍SMLM的进展及应用。首先介绍了单分子定位的基本原理和光路构建,介绍并讨论了两类代表性SMLM,列举了多种多色SMLM

成像方法,重点阐述了SMLM成像精度和视野范围的技术进展及SMLM数据的提取与分析,最后总结了SMLM的生物学应用。

2 SMLM原理简介

2.1 单分子定位原理

单个点光源经过显微成像系统时,由于衍射现象,会在焦平面上形成模糊的光斑,这种光斑被称为艾里斑(Airy disc),也称为点扩展函数(PSF)。光斑的大小可以由其半峰全宽(FWHM)来描述,其 x - y 平面的半峰全宽可以表示为^[15]

$$\Delta_{x,y} = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} = \frac{\lambda}{2NA}, \quad (1)$$

式中: λ 为光的波长; n 为介质的折射系数; α 是物镜的半孔径角; NA 为物镜的数值孔径。在光的传播方向(z 轴)的半峰全宽可以表示为^[16]

$$\Delta_z = \frac{2\lambda}{n \sin^2 \alpha}. \quad (2)$$

由(1)式可以看出,影响光学显微镜分辨率的因素有两个,一是光的波长,二是物镜的数值孔径。理论上可通过减小波长和增大物镜的数值孔径两种方法来提升分辨率,但一般油浸物镜的数值孔径通常在1.40到1.49之间,在可见光波长范围内,PSF的半峰全宽大小约为200 nm,此即为传统光学显微镜的横向分辨率极限。单个荧光分子发出的荧光经成像系统产生模糊的艾里斑,其光强分布与一阶贝塞尔函数相关,其中央最亮处会聚了84%的光强。一个位于 (x_0, y_0) 处的荧光分子在探测器平面的分布可近似为

$$u(x_i, y_j) = \frac{N}{2\pi s^2} \exp \left[-\frac{(x_i - x_0)^2 + (y_j - y_0)^2}{2s^2} \right], \quad (3)$$

式中: N 为该荧光分子发出的光子总数; (x_i, y_j) 为像素 (i, j) 的坐标; s 为标准差。

2002年,Thompson等^[17]综合考虑背景荧光、CCD像素大小、探测器散粒噪声等影响,基于最小二乘法(LS)对艾里斑进行高斯拟合,推导出单个荧光分子在二维平面上的定位精度:

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

式中： σ 为定位的精度； a 为 CCD 像素的大小； b 为背景噪声。

另一种较为常用的单分子定位拟合算法称为极大似然估计(MLE)，该算法凭借其良好性能被广泛用于信号处理^[18]。极大似然估计是找出与样本的分布最接近的概率分布模型。“似然”的意思为寻找合适的参数使得观察到实验结果的概率为最大。2004年 Ober 等^[19]提出基于极大似然估计的单分子定位算法，基于荧光分子在 CCD 靶面的分布信息，利用已知模型推断出荧光分子所在的概率最大的位置。对于满足泊松分布的荧光发射模型，其联合分布概率为

$$L = \prod_{i,j} \frac{u(x_i, y_j)^{d_{i,j}}}{d_{i,j}!} \exp[-u(x_i, y_j)], \quad (5)$$

式中： $d_{i,j}$ 为像素 (i, j) 处收集到的实际光子数。极大似然估计通过得到荧光分子联合分布概率密度的最大值去估算荧光分子的位置，但需要了解 CCD 噪声、增益等参数的精确信息。该方法理论上可以达到极限定位精度^[20-21]。

2009年, Abraham 等^[22]对两种算法进行评估, 结果表明一般情况下两种算法都能恢复单个分子的真实位置。但在低噪声水平和无建模误差的理想情况下, 利用标准偏差来衡量这两种算法, 随着光子数的增加, 两种算法的精度都有提升, 但极大似然估计始终在同等条件下比非线性最小二乘法更为准确。

为了满足 SMLM 对高密度数据的定位需求, 2011年 Holden 等^[23]借助天文学软件 DAOPHOT II 的思路开发出 DAO-STORM 算法, 该算法将多个重叠的荧光 PSF 与多点 PSF 模型进行拟合, 其重建密度较传统算法提高了 6 倍。后续研究者还发展了压缩感知算法^[24]、3B 算法^[25]、Hawk 算法^[26]、UNLOC 算法^[27]等以进一步提升高密度 SMLM 数据的定位精度和速度。

2.2 SMLM 光路搭建

STORM/PALM 是目前应用最广泛的 SMLM, 它们的光路构建及使用方法基本相同, 下面主要以 STORM 为例进行介绍。STORM 需要较大功率密度 $(0.5 \sim 2 \text{ kW/cm}^2)$ 的激发光使荧光团进入荧光态和暗态。为满足稀疏发光的要求, 还需要引入全内反射荧光成像(TIRFM)系统, 以减小激发深度, 抑制背景荧光噪声, 提高成像分辨率。在探测器的选择上, 一般选用高信噪比空间探测器, 如 EMCCD

(Electron-Multiplying CCD) 和 sCMOS (scientific Complementary Metal-Oxide-Semiconductor)。STORM 常规光路如图 1(a) 所示, 首先不同颜色的激光通过反射镜和二向色镜进行合束并耦合进单模光纤, 将光纤传出的发散光通过透镜调整为准直光, 最后通过凸透镜将光束会聚到物镜后焦面上。在光路中使用光纤耦合多色激光有两个好处: 1) 激发光路和成像光路之间相对独立, 提高了 STORM 光路摆放的灵活性, 也便于后期升级调整; 2) 单模光纤自身具有滤波作用, 出射光斑可以更加完美地呈高斯分布。声光可调谐滤波器(AOTF)可以在不改变激光器光强的条件下实现光强调控。2020年 Diekmann 等^[28]发现利用初期使用小功率激光缓慢淬灭荧光、再渐变增加激发光功率的方式可改善 STORM 的成像质量。

为了实现 3D-STORM 成像, 2008 年庄小威组将柱透镜放置于 EMCCD 与显微镜出光口之间, 改造出射荧光的 PSF, 其椭圆度和方向随 z 轴的变化而变化, 最终将 z 轴分辨率提高至约 50 nm ^[29]。当荧光点位于平均焦平面时, PSF 的 x 和 y 方向宽度相同, 呈圆形; 当荧光点在平均焦平面之上时, PSF 在 y 方向上比在 x 方向上更聚焦, 因此长轴沿 x 方向呈椭圆; 当荧光团在平均焦平面之下时, PSF 呈现长轴沿 y 方向的椭圆形[图 1(b)]。通过使用 2D 椭圆高斯函数对图像进行拟合, 获得 x 和 y 坐标以及 PSF 峰宽 w_x 和 w_y , 进而得到荧光团在 z 轴方向分布的信息[图 1(b)]。获得 z 轴校准曲线的实验一般将 20 nm 大小的荧光微球稀疏且均匀地撒在盖玻片上, 制成校准样品, 在 PSF 为圆形的情况下使电动载物台沿 z 轴方向从 $-1 \mu\text{m}$ 到 $1 \mu\text{m}$ 缓慢地移动(步长 10 nm), 每移动一次拍一张图片, 得到荧光微球对应不同焦平面形状变化的图像序列[图 1(b)]。该图像满足含有 z 轴信息的经验公式:

$$w_{x,y}(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z-c}{d}\right)^2 + A\left(\frac{z-c}{d}\right)^3 + B\left(\frac{z-c}{d}\right)^4}, \quad (6)$$

式中： w_0 为焦平面处分子的半峰全宽； c 为 x 、 y 方向相对于平均焦平面产生焦移的补偿参数； d 为显微镜的焦深； A 、 B 为成像系统非理想的高阶项系数。该方法的成像深度可达到 $1 \mu\text{m}$ 。根据 STORM 的原理, 同一荧光分子可被重复激活, 因此每个分子都生成了定位簇。系统分辨率可以通过对定位簇进行高斯拟合并确定其半峰全宽的方法得

到。比如,基于自行搭建的 3D-STORM 平台,将约 40 个分子生成的定位簇按其质心对齐,生成整体 3D 定位分布散点图和定位点沿 x, y, z 方向分布的直方图,进行高斯函数拟合,得到 x, y, z 方向的标准偏差

σ 分别为 9, 11, 22 nm。系统分辨率可表示为

$$\Delta_{\text{FWHM}} = 2\sqrt{2\ln 2}\sigma, \quad (7)$$

利用(7)式计算得到 x, y, z 方向的分辨率分别为 21, 25, 52 nm[图 1(c)]。

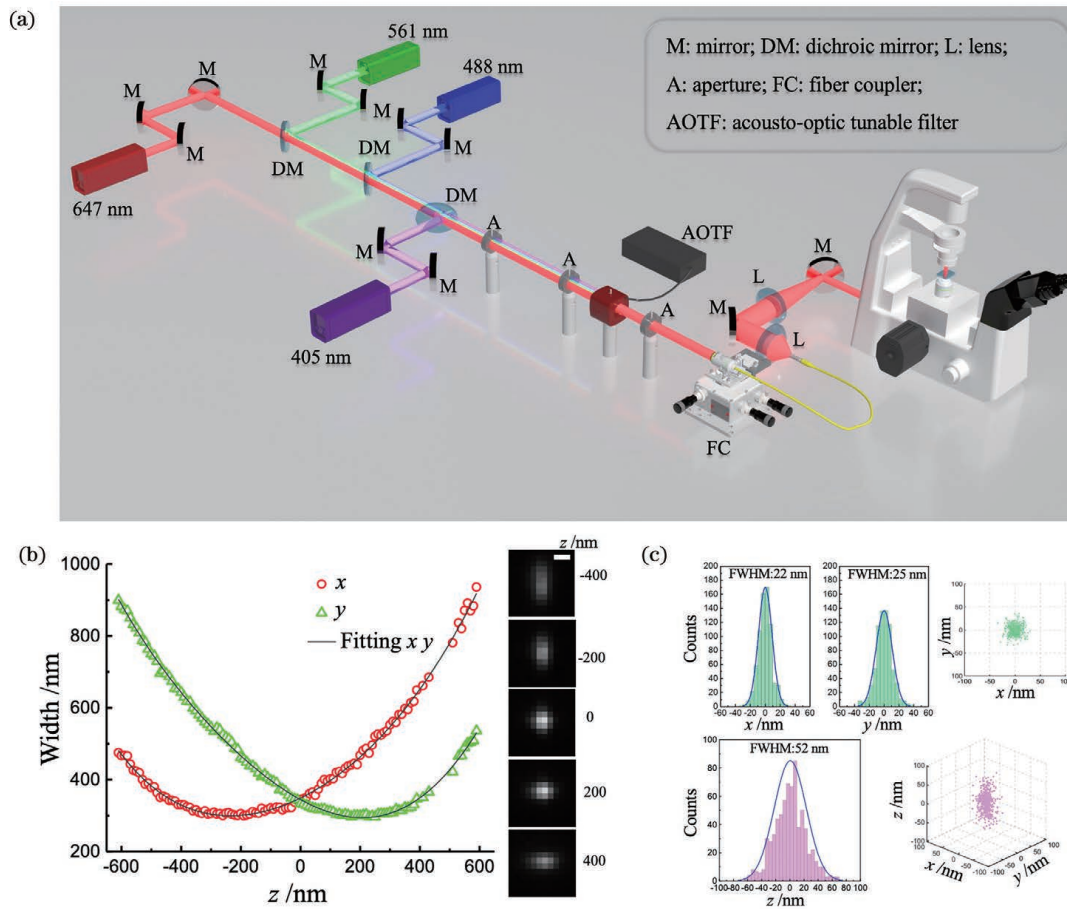


图 1 3D-STORM 原理图。(a) STORM 光路示意图;(b) 荧光团在多个 z 轴位置的 PSF, 以及 x 和 y 方向的宽度随 z 的变化(标尺: 500 nm);(c) 单分子荧光三维定位分布图

Fig. 1 Principle of 3D-STORM. (a) Optical path diagram of STORM; (b) PSF shape of a fluorophore at various z positions and calibration curves show x and y widths as functions of z (scale bar: 500 nm); (c) 3D localization distribution of single molecule fluorescence

搭建的 3D-STORM 系统对 Cos7 细胞线粒体 [图 2(a)]、网格蛋白小窝 [图 2(b)]、微管 [图 2(c)]

和微丝 [图 2(d)] 等亚细胞结构实现了三维超分辨率成像。

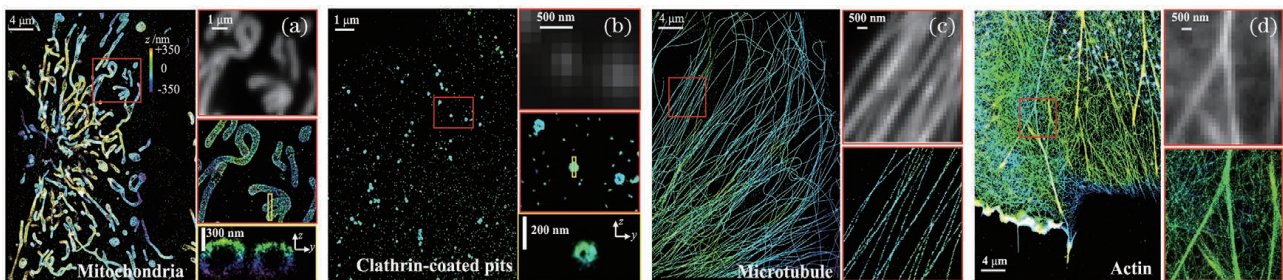


图 2 Cos7 细胞内 4 种亚细胞结构的 STORM 图像。(a) 线粒体;(b) 网格蛋白小窝;(c) 微管;(d) 微丝
Fig. 2 STORM images of four subcellular structures from Cos7 cell. (a) Mitochondria; (b) clathrin-coated pits; (c) microtubules; (d) microfilaments

2.3 漂移校正

SMLM 成像需要采集上万张荧光闪烁图片,整个过程持续数分钟,同时热效应、机械松弛和振动等因素导致成像过程难免发生漂移,影响成像质量。因此漂移校正是 STORM 图像处理的必要步骤。多种漂移校正方法可供选择,其中包括在样本中加入基准标记物或使用分析图像序列相关性的软件^[15],以及通过对载物台进行微调的硬件校正。对于软件校正:如果使用基准标记物进行成像,可通过识别每一帧图像上的基准标记对应的荧光峰值,生成平均位置与时间的关系曲线;如果不使用基准标

记物,可将数据等分成多个时间窗口,再对相邻时间窗口图像进行互相关分析,得到时间序列的互相关函数,然后通过高斯拟合得到漂移量。假设图像是连续漂移的,将时间轨迹插入到所有成像帧,从每帧的定位中减去漂移量,完成漂移校正^[29]。图3为3D-STORM 成像系统获得的 Cos7 细胞微管和红细胞原肌球蛋白校正前后效果图及其对应的校正曲线。可以看到校正前图像较为模糊失真,这严重影响了超分辨成像效果。此外,除了分子坐标本身,普通的明场和荧光成像序列也可以用于互相关分析以完成漂移校正^[30-31]。

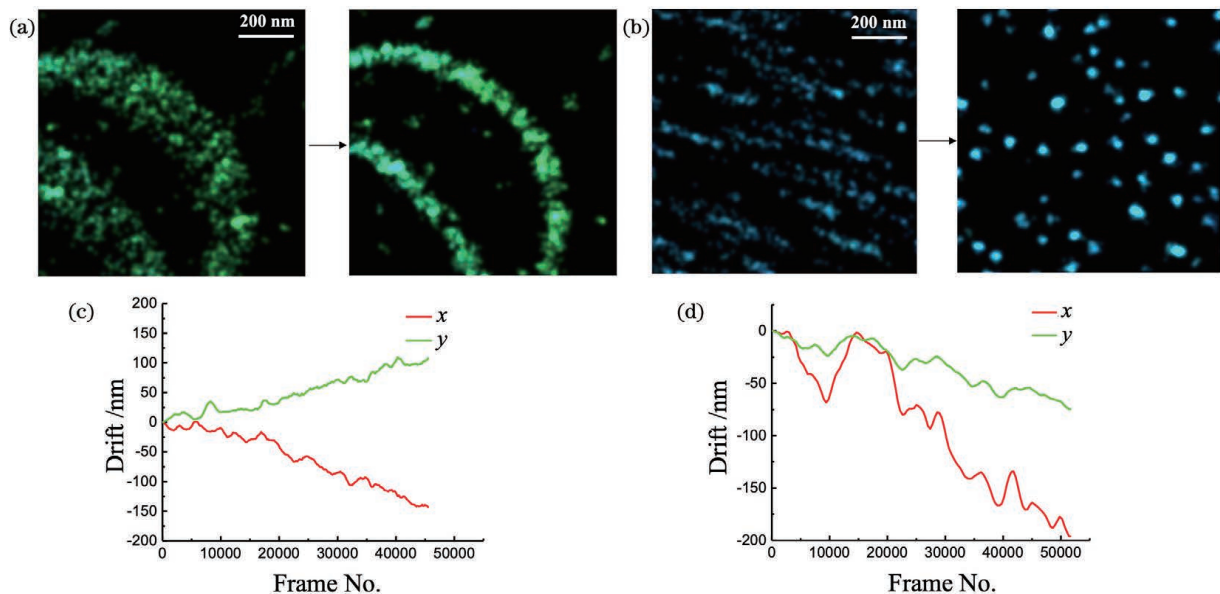


图3 微管和原肌球蛋白 STORM 图像在 x 和 y 方向的漂移校正。(a) Cos7 细胞微管 STORM 图像校正前后对比图; (b) 红细胞原肌球蛋白 STORM 图像校正前后对比图; (c) 微管图像的 x 和 y 方向漂移校正曲线; (d) 原肌球蛋白图像的 x 和 y 方向校正曲线

Fig. 3 Drift correction of STORM images of tubulin and tropomodulin in x and y directions. (a) STORM images of Cos7 cell microtubule before and after drift correction; (b) STORM images of erythrocyte tropomodulin before and after drift correction; (c) drift correction curves of microtubule images in x and y directions; (d) drift correction curves of erythrocyte tropomodulin in x and y directions

除了使用软件进行后期校正处理,还可以通过载物台的移动消除漂移。2013年 Huang 课题组^[32]在物镜上方添加一个波长为 850 nm 的红外 LED,再通过一个普通 CCD 实时观察明场图像变化并不断进行互相关分析,控制载物台的位移消除漂移,该方法可以将几分钟内的横向漂移控制在 10 nm 以内,将轴向漂移控制在 20 nm 以内。2020年 Coelho 等^[33]利用红外 LED 和大视野 sCMOS 形成反馈光路,以 10 Hz 的速度监控样品中添加的 3 μm 大小的聚苯乙烯微球发出的衍射图案,通过质心算法确定漂移量,再以 15 Hz 的速度实时控制平移台的位移,达到 0.1 nm 的跟踪精度,实现小于 1 nm 的稳

定度。

使用荧光微球进行校正时应当注意三点:1)微球所发荧光一般为不闪烁的常亮点,因此同一视野内的荧光标记点不宜过多,否则会影响其周围的目标物荧光信息;2)荧光微球一般铺展在玻璃基底上,对于成像目标焦面高于玻璃基底的图像,该方法可能失效;3)荧光微球很可能在成像过程中被漂白,影响校正精度。对于时间序列的互相关分析校正,其优点在于不需要引入任何的标记物和光路,缺点是校正时间间隔较长,两个时间窗口之间的位置只能通过拟合时间曲线进行插值。使用外接硬件的校正方法的优势在于实时校正,但增加了建造成本。

2.4 图像重建

SMLM 图像重建分为采集过程和重建过程,良好的信号采集取决于样品的制备、采集经验、探测器灵敏度等,而图像重建的优良与否依赖于单分子定位分析程序。为了更好地让单分子定位算法服务于广大科研工作者,多种算法软件或 ImageJ 插件被陆续开发出来^[34-35]。

2010 年第一款 ImageJ SMLM 插件 QuickPALM 发布^[36],它拥有图像重建、漂移校正等功能,它的出现使 ImageJ 分析 SMLM 图像成为可能。2014 年 ThunderSTORM 诞生^[37],这是一款非常全面的 ImageJ 插件,可进行 2D 和 3D 图像重建,拥有独立的图像处理界面,可根据实际情况输入各种参数,还具有预览图像重建的功能,可实时调整参数的输入。ThunderSTORM 可以选择最小二乘法、加权最小二乘或极大似然估计高斯拟合,实现点精确定位;除此之外,它还具备降噪、漂移校正等后期处理功能。

2018 年 SMLocalizer 被开发,这是一款可以实现图形处理器(GPU)加速的 ImageJ 插件^[38]。诸多 SMLM 图像重建软件依赖复杂的输入参数选择,对于初学者来说难以快速上手。SMLocalizer 通过开发迭代算法来降低操作难度,减少了用户对于像素大小和增益的输入要求。当然,该软件也保留了高级选项,用户可以在使用界面中手动修改所有参数。相较于 QuickPALM 和 ThunderSTORM, SMLocalizer 最终的图像处理效果类似,但需要输入的参数更少,且执行速度更快,其速度是 QuickPALM 和 ThunderSTORM 的 2~15 倍。

2020 年 RainbowSTORM 出现,该插件利用

ThunderSTORM 的功能来获取空间信息,同时可为系统校准、光谱识别和分类提供方案^[39]。RainbowSTORM 使用每个随机闪烁点的光谱质心来定义一系列光谱颜色并给超分辨图像添加伪彩。为了提高科研人员的工作效率、避免重复的软件开发和繁琐的数据转换步骤,SMAP 软件于 2020 年诞生^[40]。该软件具有模块化的体系结构,可以完成全套 SMLM 成像流程,包括单分子定位、漂移校正以及后期的数据处理等。而且,该软件会不断更新发布,任何人都可以使用最新的算法。

2.5 样品制备

SMLM 的星云图像性质决定了 SMLM 图像必须保证足够多的荧光分子被采集和定位。为了采集到更多的单分子荧光信息,一方面要延长采集时间,另一方面要确保样本被高效率地标记。要获得一张分辨率良好的 SMLM 图像,图像的采集和定位分析只是一方面,样本的制备同样尤为重要^[3,41]。

为了达到良好的抗体标记效果,首先要筛选合适的抗体。单克隆抗体一般具有明确的蛋白质结合位点,若该抗体结合蛋白的序列恰好位于蛋白质跨膜域等不易原位结合的位点,则该抗体不适合进行免疫荧光染色。选择好抗体后,一般可通过提高一抗浓度、4 °C 条件过夜孵育等方式保证实现最高标记效率。有时,为了揭示亚细胞结构的完整形态(如网格蛋白小窝),还可以使用针对同一目标蛋白不同结合位点的抗体同时标记的方法提高抗体的覆盖率^[29]。选用两种不同线粒体外膜受体 TOM20 蛋白抗体,在相同条件下对线粒体进行染色,不难发现图 4(a)中的抗体标记效率明显比图 4(b)低,从图中

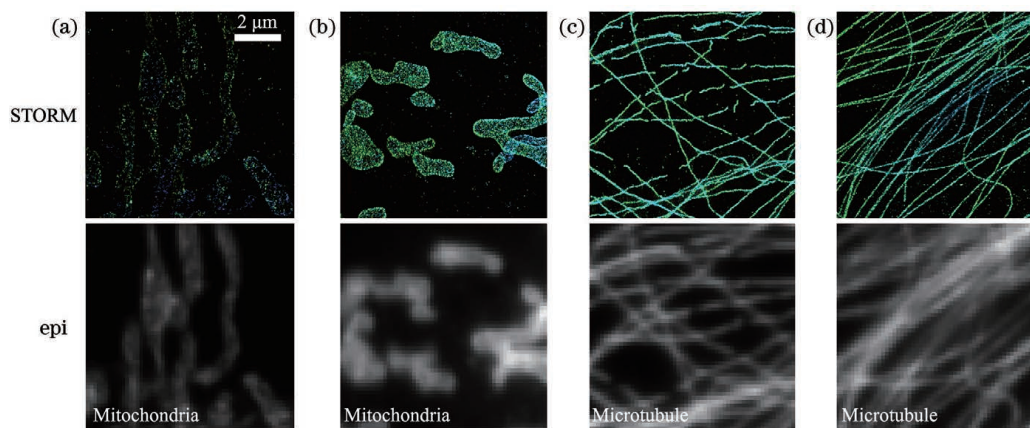


图 4 同种亚细胞结构不同样品制备方法的成像图。(a)(b)不同抗体标记的 Cos7 细胞线粒体图;(c)甲醇固定的 Cos7 细胞微管图;(d)浓度为 3% 的多聚甲醛+浓度为 0.1% 的戊二醛固定的 Cos7 细胞微管图

Fig. 4 Images of the same subcellular structures using different sample preparation methods. (a) (b) Images of mitochondria of Cos7 cell labeled with different primary antibodies; (c) images of microtubule of Cos7 cell fixed with methanol; (d) images of microtubule of Cos7 cell fixed with 3% paraformaldehyde+0.1% glutaraldehyde

无法观察到连续的线粒体结构,说明抗体的重要性。

为了更好地保护细胞的精细结构,需要选择合适的固定剂^[42-43]。化学固定剂主要有多聚甲醛、戊二醛、乙醇和冰甲醇等^[44]。多聚甲醛是最常用的固定剂,可以较好地保存各类亚细胞结构,且基本不会影响抗原识别位点。戊二醛由于单体所含醛基数量多,固定效果更好,但有可能掩盖蛋白的结构域,影响一抗识别^[43]。冰甲醇通过蛋白沉淀固定样品,可以最大程度地保护抗原,但会溶解膜结构,破坏细胞真实形态。使用冰甲醇、浓度为3%的多聚甲醛与浓度为0.1%的戊二醛的混合液固定 Cos7 细胞微管,可以观察到冰甲醇固定的微管产生断裂[图 4(c)],而浓度为3%的多聚甲醛与浓度为0.1%的戊二醛的混合液固定的微管形态保存完好[图 4(d)]。为提高 SMLM 的图像对比度、减少背景噪声,可在染色之前使用牛血清蛋白封闭以减少抗体的非特异性结合。对于戊二醛固定的样品,还需使用硼氢化钠进行还原以消除因引入过多醛基引起的非特异性染色^[45]。

3 代表性 SMLM 简介

由于分辨率极高、工作原理易懂等优点,庄小威教授提出的 STORM 和 Eric Betzig 教授提出 PALM 是目前应用最为广泛的 SMLM。基于不同的闪烁机理,Sharonov 等提出了 PAINT 技术, Jungmann 等提出了 DNA-PAINT,这些技术都得到了较好的发展和应用。

3.1 STORM 与 PALM

很多生物学家对 STORM 与 PALM 之间的区别不了解。STORM 与 PALM 的光路和工作原理均相同,只是荧光物质不同,STORM 使用抗体偶联的商业探针,PALM 使用荧光蛋白。两种方法没有本质的好坏,关键看应用场景,目前 STORM 应用相对较广泛。

STORM 基于免疫荧光染色原理标记目标蛋白,被标记的细胞更为原生态,STORM 尤其对原代细胞的标记更具优势,且其免疫荧光探针为商业探针,选择更为灵活且方便多色成像,荧光探针较好的光子输出性能可提高成像分辨率。免疫染色需要使用抗体标记,抗体尺寸约为 10 nm,无法自由进入细胞膜,因此标记胞内蛋白时需要破膜处理,这会影

响样本的生理结构。免疫荧光目前普遍采用一抗加二抗的标记方法,抗体在受体上来回摆动会影响定位精度,导致图像分辨率下降。目前,为了减小标记物

的体积,多种标记技术被开发出来,包括使用木瓜酶处理过的 Fab 段抗体、天然不含轻链的骆驼科抗体^[46]、SNAP 标签^[47]、Halo 标签^[48]、短肽标签^[49]等,这些标记物的大小均在 5 nm 以下。

采用荧光蛋白成像的 PALM,只需简单固定样品即可成像,样品损伤极小,在膜蛋白研究方面具有很强的优势。但目前荧光蛋白的光子输出相较于商业荧光探针少得多,成像分辨率会受到影响。多色成像还必须转染多种蛋白,这对于成像效果和细胞本身生理活性均提出挑战。此外,荧光蛋白是通过转染与目标蛋白共表达实现,因此仍然会对目标蛋白的功能产生一定影响。且荧光蛋白趋向于二聚化,会影响蛋白质的天然分布^[50]。目前研究大多采用瞬时转染技术标记目标蛋白,蛋白质在体内成熟需要一定时间,因此需对成像时机有一定的估算。

3.2 PAINT 与 DNA-PAINT

单分子成像的关键是荧光探针可以闪烁发光,可实现“时间换空间”的超分辨成像策略。为了使荧光探针或荧光蛋白具有良好的闪烁性,需要考虑探针的种类、成像缓冲液配制、标记密度、激发光强度等一系列因素,而改进一款探针是复杂且费力的。

2006 年 Sharonov 等^[11]依靠荧光分子与靶标可逆结合发光的特性开发出 PAINT 技术。PAINT 技术不需要荧光团稳定标记样品,而是通过多次采集记录自由扩散在溶液中的荧光探针与溶液中物体表面的相互作用(碰撞后脱离或永久结合后漂白)发出的单分子荧光。如尼罗红(Nile Red),它在水中不发光,但在与脂质结合的疏水环境中发出强荧光。最后通过单分子定位算法获得每一帧图像中分子的位置,通过叠加后得到目标物的超分辨形貌特征。PAINT 技术不需要特殊的实验环境,仅通过调节光照强度和探针浓度即可得到荧光闪烁的效果;且其不需要对成像目标物进行任何改造即可成像,最大程度地保证了目标物的原位特性。目前在市面上可以购买到一些针对不同细胞器、细胞膜的商用探针。但该方法较为依赖具有疏水相互作用和静电耦合特性的探针,相关探针可标记的目标有限。

2010 年 Jungmann 等^[51]开发了一种基于荧光标记的 DNA 寡核苷酸链动态结合和解离的单分子检测法,称为 DNA-PAINT。DNA-PAINT 由两个部分组成:互补的双螺旋 DNA。其中一条链通过抗体与靶蛋白相连,称为对接链;另一条链与有机染料结合,称为成像链。成像过程中,与荧光探针结合的成像链在成像缓冲液中自由扩散,由于成像链在不断

飘动,其荧光在单帧时间内会散布在 CCD 多个像素位置上,因此探测器无法捕捉其荧光^[52]。互补 DNA 双链具有高度结合特异性,成像链接触到对接链时会产生自发且短暂的特异性结合,此时探测器可捕捉到被绑定在对接链上的成像链的荧光。为了达到良好的 DNA-PAINT 成像条件,可聚焦两方面进行改善:1)双链结合的时间取决于 DNA 双链的稳定性,可通过调节 DNA 双链长度、CG 碱基对比例、成像缓冲液的温度等条件改变;2)溶液中成像链的浓度也是决定单帧时间内采集到单分子荧光数量的关键因素,应根据实际情况适当调整。通过改造 DNA 链调控荧光闪烁动力学,再通过不断更换带有新成像链的缓冲液,获得强劲的抗漂白能力,理论上可进行无限次闪烁定位成像。

相对于 PAINT, DNA-PAINT 的优势在于可以通过抗体特异性标记靶蛋白;相对于 STORM/PALM, DNA-PAINT 不依赖荧光探针本身的闪烁动力学特性。DNA-PAINT 也存在一定缺点:1)带有荧光探针的成像链在溶液中乱飘会导致背景荧光增加;2)受到 DNA 链结合解离速率的影响,数据采集帧率被限制在 20 Hz 以下,导致整个成像时间较长。2017 年 Auer 等^[53]通过给对接链添加荧光染料,使成像链与对接链之间发生荧光能量共振转移,达到了过滤背景和提高成像速率的目的,其缺点是对接链荧光无法抵抗漂白,成像时间有限,可能导致数据采集不充分。

4 多色 SMLM 概述

多色成像是超分辨成像技术的重要延伸,极大地增强了人们解析亚细胞结构定位与交互关系的能力。目前已诞生的多种多色 SMLM 在分色能力、光谱串扰、采集效率等方面各有优缺点,研究人员可根据自身实验需求选择合适可靠的多色 SMLM 手段探讨相应的科学问题^[54]。

2007 年庄小威组通过设计不同的荧光分子对组合,发展出基于不同激活光的多色 STORM^[30]。该方法将闪烁性较好的荧光探针如 Cy5 作为报告子,再连接上不同种类激活子如 Cy3、Cy2 等,依次切换不同波段的激活光,再由相同的激发光探测同一个报告子 Cy5 发出的荧光,从而实现多色成像。该方法属于同步采集,即一次实验获得所有颜色通道的数据,不同颜色间不需要漂移校正。该方法的缺点是激发光本身会非特异性地激活不同颜色通道,导致较高的串扰率(10~20%),造成实验假象^[55]。

2008 年 Heilemann 等^[56]发现强光激发花菁染料可直接使其在荧光态和暗态之间高效转换,从而开发出 dSTORM 超分辨成像技术,进而使用不同波段的激发光让不同颜色的荧光染料发出荧光,实现多色成像^[57]。该方法的优点在于简单直接,不同颜色之间串扰较小,其缺点也较明显,该方法需要依次采集多色数据,不同波段荧光数据采集间隔的漂移难以避免,且颜色叠加时需进行校正。此外,目前闪烁性较好的荧光探针如 Cy5, Alexa 647 等都集中在红光波段,蓝光、绿光波段的荧光探针闪烁能力较差,导致图像分辨率严重下降。

同年, Bossi 等^[58]开发出基于分光技术的 SMLM。该技术使用相同激发光、不同发射谱的荧光染料标记样本,利用二向色镜把混合荧光分成透射光路和反射光路,再将其成像到 CCD 靶面的左右两侧,利用比率法对荧光点进行颜色分类,实现双色成像。该方法属于同步采集,可同时使用闪烁性较好的红光波段荧光探针,实现双色超分辨率成像。然而,所用的同波段激发的两个荧光探针的吸收谱近似,彼此的发射谱必然发生交叠,导致串扰,造成实验假象。

2014 年 Tam 等^[59]提出了基于荧光淬灭技术的多色 SMLM。该技术的实现不在于成像系统,而在于样品制备。该技术首先将不同目标蛋白标记上不同种属的一抗,再选择其中一个一抗进行二抗标记并采集数据,采集完成后利用硼氢化钠将荧光淬灭,再选择另一个标记好的一抗进行二抗标记并采集数据,如此依次采集到多色信号。颜色数只跟一抗种属(mouse, rat, rabbit, chicken 等)数有关。该方法的好处在于每一个目标蛋白成像均可选择闪烁性能良好的红光探针如 Alex 647,成像分辨率有保证。但该方法的缺点是成像时间过长,本质上是更加极端地采用了以时间换空间的策略。此外由于该方法需要多次费时费力的标记,需要解决同一视野采集和漂移校正的问题。

2014 年 Jungmann 等^[60]开发了两种多色 DNA-PAINT 成像方式。一种是先将两种一抗同时标记到细胞靶蛋白,每种一抗上均带有与其颜色对应的对接链,同时将两种颜色的成像链加入到成像缓冲液中,再依次用不同颜色的激发光采集数据,实现微管和线粒体的双色成像。该方法的颜色瓶颈取决于荧光的颜色种类。第二种方法是利用同种颜色但不同核苷酸链序列的成像链与不同对接链结合进行多色成像。由于 DNA 双链结合的特异性,可

通过核苷酸序列的编辑来调控双链的结合。与 Tam 等^[59]提出的方法类似,该方法首先将带有不同核苷酸序列对接链的一抗与靶蛋白相连,再依次加入其中一种成像链,采集完成后需花费 1~2 min 洗去原成像链再加入下一种成像链,如此反复,最后给每张图像加上伪彩实现多色成像。该方法的多色能力取决于 DNA 序列的数量,目前已在体外 DNA 折纸样本中实现 25 nm 分辨率的 10 色成像及在细胞样本中实现四色成像^[60]。

2015 年加州大学伯克利分校 Xu 组开发出基于光谱技术的多色 SMLM^[61]。该技术在双物镜成像系统的基础上利用三棱镜分光原理将其中一路光路的荧光信号进行横向空间光谱展开,将另一路进行正常的单分子定位成像,最终计算出的超分辨图像既有空间信息又有光谱信息。该方法只需要一束激发光即可获得串扰 < 2% 的高分辨率四色成像,但该方法

需要大量的后期数据处理。2016 年 Dong 等^[62]使用光栅展开实现双色成像,相较于三棱镜,使用光栅得到的光谱展开更为充分,但该方法处理荧光密度较高的样品时会产生光谱重叠,更适合低密度目标物成像。

2016 年 Moerner 教授团队利用光谱依赖的四角 (Tetrapod) 相位板,调制不同颜色荧光的 PSF 形状,进而实现双 SMLM 成像。该方法属于同步采集,颜色串扰较低。但改造的 PSF 较大,占用过多 CCD 靶面,这限制了每帧图片的闪烁荧光点数,只适合低密度目标物的成像^[63]。

上述几种多色 SMLM 的工作原理各异,在分辨率、成像时间和颜色串扰等方面优缺点共存,研究人员应根据自身需求选择适当的多色成像方法(表 1)。关于多色 SMLM,研究人员可重点开发闪烁能力强、发光效率高、颜色多样的有机荧光染料或荧光蛋白。

表 1 不同多色 SMLM 对比

Table 1 Comparison of different multi-color SMLMs

Type	Acquisition mode	Acquisition time	Cross-talk	Maximum multi-color ability	Image field	Target density	Resolution
Activator-reporter ^[30]	Simultaneous	Normal	High	6	Normal	Normal	Better
More excitation ^[57]	Sequential	Longer	Low	2	Normal	Normal	Normal
Split ^[58]	Simultaneous	Normal	High	2	Smaller	Normal	Better
Quenching ^[59]	Sequential	Longer	Low	4	Normal	Normal	Better
DNA-PAINT ^[60]	Sequential	Longer	Low	10	Normal	Normal	Better
Spectrum ^[61]	Simultaneous	Normal	Low	4	Smaller	Lower	Better
PSF engineering ^[63]	Simultaneous	Normal	Low	2	Smaller	Lower	Normal

5 SMLM 参数进展

由于工作原理的固有要求,SMLM 的时间信息获取能力较其他超分辨成像技术存在先天不足,但在空间信息获取能力方面性能卓越,故本文主要讨论 SMLM 的空间尺度参数进展,即如何获得更高的横向/轴向空间分辨率及更大的成像范围(x - y 平面和 z 轴方向)。近年来涌现诸多相关研究,改进手段主要包括算法、硬件以及算法与硬件结合的方式。

5.1 SMLM 分辨率的提高

5.1.1 横向分辨率的提高

正常 PALM/STORM 系统的横向分辨率约为 25 nm/20 nm,远大于理论精度。2012 年庄小威组构建出双物镜 STORM 成像系统,该系统采集到的

荧光光子数较单物镜系统提高两倍,等效提升了系统的数值孔径,同时由于双物镜 z 轴位置的互补特性能有效减少噪声和异常识别等问题,双物镜 STORM 最终将分辨率提高至 10 nm[图 5(a)]^[64]。2013 年 Szyborska 等^[65]基于粒子平均算法,将 SMLM 采集的数千个核孔复合物(NPC)的图像进行对齐求和得到平均图像,最终以小于 1 nm 的精度重构了 NPC 经典的八重对称结构[图 5(b)]。不过该方法具有一定的局限性,只有对高度相似且对称的结构进行平均统计才能有效地提高分辨率。

近几年,几种基于算法和硬件提升的交叉融合的方法被提出,这些方法有效地提升了系统的横向分辨率。2017 年 Hell 教授团队结合 STED 和 SMLM 的优势,研制出 MINFLUX 超分辨成像技术^[14]。

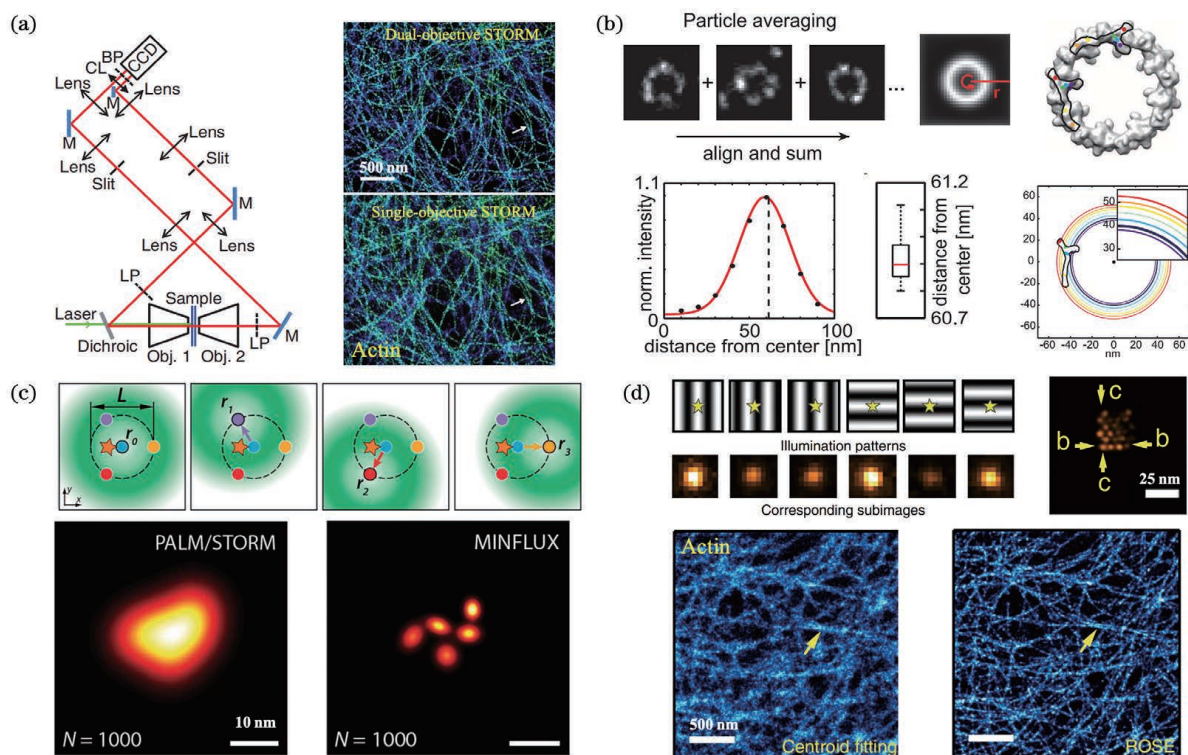


图5 基于算法或硬件改造方式提升 SMLM 横向分辨率。(a) 基于双物镜荧光收集系统提升 STORM 横向分辨率^[64]；(b) 基于粒子平均算法提升 STORM 横向分辨率^[65]；(c) 基于算法+硬件改造的 MINFLUX 技术提升横向分辨率^[14]；(d) 基于算法+硬件改造的 ROSE 提升横向分辨率^[66]

Fig. 5 Improvement of SMLM lateral resolution based on algorithms or hardware modifications. (a) Improvement of STORM lateral resolution by dual objective fluorescence collection system^[64]; (b) improvement of STORM lateral resolution by particle average algorithm^[65]; (c) improvement of lateral resolution by MINFLUX based on algorithm combined hardware modification^[14]; (d) improvement of lateral resolution by ROSE based on algorithm combined hardware modification^[66]

该技术使用“甜甜圈”状的环形光束作为激发光,当荧光分子恰好在甜甜圈中心处时不发光,偏离中心时则发光。借助这一特点,通过移动环形光束到至少3个不同的位置并采集荧光就可准确地定位单分子位置。该系统的定位精度可达1 nm,并成功分辨出6 nm间隔的DNA折纸结构[图5(c)]。相较于STED,MINFLUX实现高精度定位所需要的光强小得多,对细胞样品的损伤也较小。该技术在空间分辨率为48 nm、时间分辨率为125 μ s的情况下,成功追踪大肠杆菌中单个核糖体亚基蛋白的移动过程的时间达300 ms。

2019年中国科学院生物物理研究所纪伟等^[66]提出了一种新型单分子干涉定位超分辨成像方法,即重复光学选择性曝光技术(ROSE)。ROSE采用6个不同方向和相位的干涉条纹去激发荧光分子,荧光分子的发光强度与其所处条纹的相位相关,因此可以通过荧光分子强度与干涉条纹的相位关系来判断荧光分子的精确位置信息可类比于GPS定位。

该方法的理论定位精度是传统方法的2.4倍,以约3 nm的分辨率成功解析了5 nm间距的DNA折纸阵列,并对细胞微丝骨架实现了更高精度的超分辨成像[图5(d)]。此外,ROSE通过谐振振镜扫描的方式成功将相机单次曝光时间里每个单分子的发光状态均匀地分配给3个CCD上的6个区域,从而有效避免了荧光分子发光能力波动对定位精度的干扰。该技术的主要缺点在于硬件较为复杂,需要搭配谐振振镜及3个CCD;该技术需要重复曝光成像,导致其相比普通SMLM需要更长的成像时间。2020年Cnossen等^[67]提出了SIMFLUX技术,结合结构光照明进行单分子定位成像,其原理类似ROSE,实现了近一倍的分辨率提升。

2015年Boyden课题组提出膨胀显微成像(ExM)^[68]。该方法将样品包埋在可吸水膨胀的水凝胶中并进行锚定,通过蛋白酶K消化或者蛋白质变性的方法破坏样品蛋白质分子之间的内源性相互作用,水凝胶在吸水涨大的同时,锚定在水凝胶中的

分子之间的距离也会随之增加,使得原本距离小于衍射极限的分子可被光学显微镜观察到。ExM与SMLM相结合,理论上可极大地提高SMLM的空间分辨率。然而由于膨胀过程中荧光分子的密度大大降低,且SMLM中可以使荧光分子随机闪烁的缓冲液会使得膨胀的水凝胶不受控制地收缩,因此这两种显微技术的结合还存在很多困难。2020年Zwettler等^[69]使用重新膨胀以及对样品进行后标记的方法较好地解决了这一问题,发展的Ex-SMLM技术的空间分辨率较传统SMLM技术提高了~3.2倍,架起了电子显微镜与荧光显微镜之间的桥梁。尽管如此,Ex-SMLM仍存在许多缺陷,如荧光分子易被破坏、膨胀系数较小和视野漂移等。

5.1.2 轴向分辨率的提高

轴向位置的识别主要是通过更改PSF形貌,使PSF图像的特定参数取决于轴向位置,然后通过理论拟合PSF的实验测量数值生成校准曲线,从而将该参数与轴向位置相关联。2008年庄小威组采用柱透镜像散的方法,使PSF的横纵比随轴向深度的

变化而变化,实现了3D-STORM成像。该方法的成像深度约为 $1\ \mu\text{m}$,轴向分辨率约为 $50\ \text{nm}$,是目前最为常用的3D-SMLM成像方法^[29]。2012年该组构建出双物镜STORM成像系统,尽管同样是利用像散的方法识别 z 轴位置,但是该方法基于双物镜的对称性同时生成 z 轴位置相对应的PSF图案,最终将纵向分辨率提升至 $20\ \text{nm}$,这时可清晰地观察到Cos7细胞片状伪足处的双层肌动蛋白网络[图6(a)]^[64]。

2009年Moerner组利用空间光调制器构造带有两个凸角的双螺旋PSF,这两个凸角围绕一个中心点旋转,其角度与轴向位置相对应,实现了 $10\sim 20\ \text{nm}$ 轴向分辨率、 $2\ \mu\text{m}$ 成像深度的3D-SMLM图像^[70]。

2009年Hess课题组将PALM与单光子多相位干涉相结合,研制出干涉测量光激活定位显微镜(iPALM)^[71]。该技术使用两个物镜收集荧光,利用反射镜将每个物镜光路中的单分子荧光反射到定制的三向分束器中,使其自身发生干涉并分配到三个不同的CCD中。两束物镜光路的光程差决定了荧光的轴向位置,根据CCD中接收到的荧光图像的相对振幅计算出单分子荧光在轴向的精准位置。

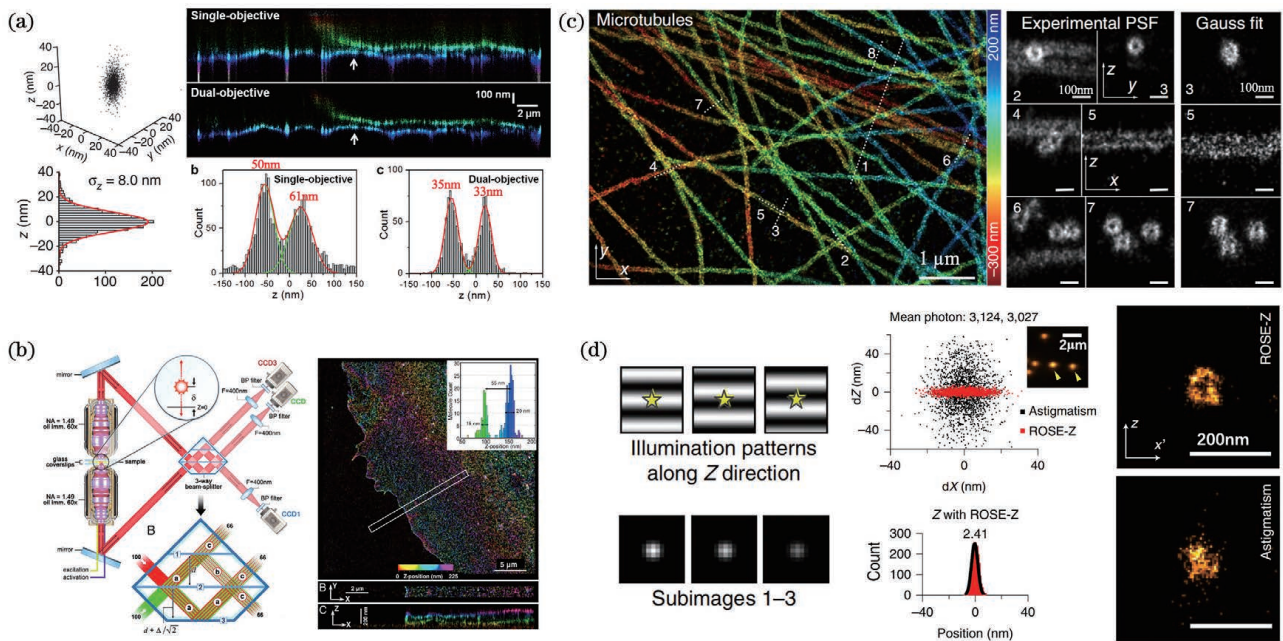


图6 基于算法或硬件改造提升SMLM轴向分辨率。(a)基于双物镜荧光收集系统提升STORM轴向分辨率^[64]; (b)基于双物镜荧光干涉测量系统提升轴向分辨率^[71]; (c)发展点扩展函数3D拟合定位新算法提高DNA-PAINT轴向分辨率^[72]; (d)基于算法+硬件改造的ROSE-Z提升轴向分辨率^[73]

Fig. 6 Improvement of SMLM axial resolution based on algorithms or hardware modifications. (a) Improvement of STORM axial resolution by dual objective fluorescence collection system^[64]; (b) improvement of axial resolution by dual objective fluorescence interferometric system^[71]; (c) improvement of DNA-PAINT axial resolution by developing new 3D fitting localization algorithm of PSF^[72]; (d) improvement of axial resolution by ROSE-Z based on algorithm and hardware modification^[73]

iPALM在 x 、 y 、 z 三个方向的分辨率同为20 nm,可实现对细胞边缘腹侧和背侧膜结构的双层成像[图6(b)]。但由于干涉图像具有周期性,分子相对位置达到半波长时会产生相同的干涉图像,因此成像深度限制在250 nm左右。

2018年李依明等^[72]开发了一个可以对任意实验型PSF进行三维拟合定位的算法,该方法可对实验中测得的实际PSF模型进行 z 轴校正和三次样条插值,极大地提高了对一系列不同形状PSF的分析定位能力,以10 nm的轴向分辨率解析出微管的中空结构[图6(c)]。此外,该工作还开发了一种双向拟合方法,利用焦平面上方和下方PSF间的细微差异来准确定位荧光团 z 轴位置,在无需借助任何3D光学器件的情况下,实现了与柱透镜像散PSF几乎相当的轴向分辨率^[72]。

2021年纪伟等在此前ROSE超分辨成像系统的基础上^[66],通过引入非对称光路生成干涉条纹,研制出轴向单分子干涉定位显微镜ROSE-Z,与传统的像散成像相比,其轴向分辨率提升了6倍,并成功实现了对微管中空结构的解析[图6(d)]。

5.2 SMLM成像范围的扩大

5.2.1 成像视场的扩大

生物科学某种意义上属于统计科学,生物科学研究需要归纳总结大量的实验数据。此外,某些研究领域,如脑科学等需要在组织甚至全脑范围进行高分辨率成像,这些情况的样本量极大,单次成像视场的大小直接决定工作效率,这对大视场SMLM的研发提出了迫切需求。扩大成像视场可以考虑多个实验参数如物镜倍数(物镜倍数越小,视场越大)、激发光功率(荧光闪烁依赖激发光功率密度即光强,视场大则要求激发光功率高以保证足够光强去激发荧光闪烁)、相机芯片尺寸(需保证足够的成像靶面与激发区域匹配)和相机采集速度(荧光闪烁成像需要相机具有较高的帧速匹配,相机芯片越大,要求A/D转换速度越高,对相机性能的要求越高)。

上述实验参数要辩证考量,如小倍率物镜视场虽大,但是数值孔径变小,影响分辨率。激发光源一般为激光,其光功率呈高斯分布,视场中心功率高边缘低,导致视场边缘分辨率较视场中心低(边缘荧光光子数少),图片分辨率不均一。因此通过提高激发光强度实现大视场成像,首先要对原始激发光进行光场调制,实现均匀照明。此外激发光功率太高,则物镜后焦面可能无法承受,易被烧毁。对于相机,SMLM光路探测器早期多为EMCCD,目前其芯片

尺寸已经很大,如Andor Ixon Ultra 888芯片大小约13 mm×13 mm(1024 pixel×1024 pixel,单个像素13 μm),但是A/D转换速度相对较低(30 MHz),其全帧采集速度只有26 frame/s,无法对闪烁荧光进行快速采集(闪烁荧光采集速度一般要求达到100 frame/s)。近些年技术日趋成熟的sCMOS相机具有较大的靶面和更快的A/D转换速度,如滨松Flash 4.0 sCMOS相机芯片尺寸也约为13 mm×13 mm(2048 pixel×2048 pixel,单个像素6.5 μm),基于comeralink数据传输协议,sCMOS相机的全帧采集速度高达100 frame/s。sCMOS价格较EMCCD低且参数指标无明显劣势,正逐渐取代EMCCD成为SMLM常用的成像探测器。此外,大视场成像对图像的重建算法、计算机性能和速度也提出了更高的要求。

因此,在相机硬件满足的情况下,大视场成像的实现主要从激发光源平场大视场改造、应用低倍率物镜、提高采集速度和图像处理速度等方面来进行^[74]。2016年Douglass等^[75]开发了基于微透镜阵列的落射照明系统,将其命名为平面照明的场独立成像(FIFI)。该SMLM系统使用放大倍率为60、数值孔径为1.4的物镜,采集速度为100 frame/s,最终在40 nm空间分辨率情况下实现了约100 μm ×100 μm 的扩展视场[图7(a)]。2017年Zhao等^[76]研制出高功率多模光纤合束器,利用高频振动电机消除了高光经过多模光纤后导致的散斑,实现了高功率大视场均匀照明。该系统采用放大倍率为60、数值孔径为1.2的物镜,采集速度为50 frame/s,在保证均匀的40 nm空间分辨率的情况下,成像视场达到221 μm ×221 μm [图7(b)]。由于激发光功率太高,该技术目前仅适用于普通落射式照明,若利用物镜进行TIRF照明,可能导致物镜被烧毁。2017年Diekmann等^[77]开发了一种可直接放置样本的波导芯片,该波导由高折射率对比度材料构成。激光侧向入射波导,在波导表面产生大面积倏逝场去激发荧光。系统设计具有光路简化、易于集成等优点。该技术使用放大倍率为20、数值孔径为0.45的物镜,当采集速度为20 frame/s时以130 nm的分辨率实现了约为500 μm ×500 μm 超大视场STROM成像,可同时对200~300个细胞进行采集[图7(c)]。2019年该课题组又选用放大倍率为25、数值孔径为0.8的物镜,结合波导芯片成功实现了分辨率为70~75 nm的500 μm ×500 μm 超大视场成像^[78]。同年Archetti

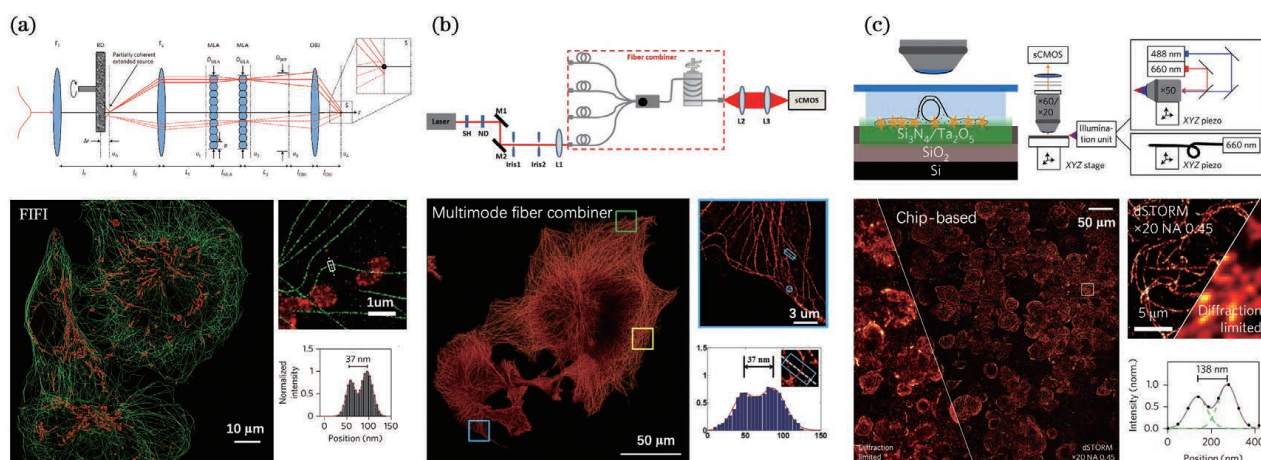


图7 大视场 SMLM 成像。(a)基于 FIFI 技术扩展 STORM 成像 FOV 至 $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ ^[75]; (b)利用多模光纤扩展 STORM 成像视场至 $221\ \mu\text{m} \times 221\ \mu\text{m}$ ^[76]; (c)基于芯片的 $500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$ 大视场 STORM 成像^[77]

Fig. 7 Imaging of SMLM in large field of view (FOV). (a) Enlargement of the FOV of STORM to $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ by FIFI^[75]; (b) enlargement of the FOV of STORM to $221\ \mu\text{m} \times 221\ \mu\text{m}$ by multi-mode fiber^[76]; (c) STORM imaging in large FOV of $500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$ based on chip^[77]

等^[79]将波导与 PAINT 相结合,采用了放大倍率为 4、数值孔径为 0.1 的低倍物镜,实现了 $100\ \mu\text{m} \times 2000\ \mu\text{m}$ 超大视场的均匀 TIRF 照明,极大地提高了

PAINT 的通量和数据质量。然而,大数值孔径的低倍物镜仍存在着场平整度差问题,即视场边缘图片的分辨率较低。上述大视场成像方法的各参数见表 2。

表 2 不同方法实现大视场 SMLM 成像的参数对比

Table 2 Comparison of parameters of different methods to achieve large field SMLM imaging

Method of illumination	Field of view size / ($\mu\text{m} \times \mu\text{m}$)	Resolution / nm	Objective	Illumination type	Camera	Frame rate / ($\text{frame} \cdot \text{s}^{-1}$)
FIFI ^[75]	100×100	40	$60\times$, $NA=1.4$, Nikon	Epi	sCMOS (Zyla 4.2, Andor)	100
Multimode fiber combiner ^[76]	221×221	40	$60\times$, $NA=1.20$, Olympus	Epi	sCMOS (Hamamatsu Orca Flash 4.0 v2)	50
Chip-based method ^[77]	500×500	130	$20\times$, $NA=0.45$, Olympus	TIRF	sCMOS (Hamamatsu Orca Flash 4.0 v2)	20
Chip-based method ^[78]	500×500	70–75	$25\times$, $NA=0.8$, Zeiss	TIRF	sCMOS (Hamamatsu ORCA flash)	40
Waveguide-PAINT ^[79]	100×2000	—	$4\times$, $NA=0.10$, Olympus	TIRF	sCMOS (Prime 95B25MM, Photometrics)	—

视场的扩大同样导致了计算量的增加,这对图像重建速度提出了更高的要求。2019 年黄振立组利用单分子信号的密度分布特征,根据“分而治之”策略对包含一个或多个发射点的感兴趣区域(ROI)进行分类处理,并结合 GPU 进行并行加速,开发了在线多分子并行定位算法 QC-STORM,在 $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ 视场下对具有 $1024\ \text{pixel} \times 1024\ \text{pixel}$ 分辨率和 $100\ \text{frame/s}$ 采集速度的 sCMOS 相机采集的数据进行实时处理^[80]。

综上,实现大视场成像需选用低倍率物镜和 sCMOS 相机,但是要牺牲一定的分辨率,因此,从某种意义上说,分辨率和大视场难以两全。

5.2.2 轴向范围的提高

基于全内反射照明的 SMLM 只能实现几百纳米深度的成像,局限于对样品表面信息的探测。 z 轴成像范围主要受到物镜的焦深、像差以及样品自身的折射率变化的影响,后者(尤其是厚样品)引入的像差会导致轴向定位精度和准确性下降。近年来

PSF 调制和激发光源改造有效提升了 SMLM 的轴向成像范围。

2014 年庄小威组利用空间光调制器把荧光 PSF 调制为艾里光束,将其命名为自弯曲点扩展函数(SB-PSF)^[81]。艾里光束具有衍射小、自愈等优点,因此可通过测量艾里光束的横向位移量精准表征荧光点的 z 轴位置,最终在不损失定位精度的情况下将成像深度提高至 $3 \mu\text{m}$,并对微管线粒体进行了深度成像[图 8(a)]。但该方法将 PSF 展开较大,且使用分光手段,成像只能使用一半靶面。

2015 年 Burke 等^[82]提出一种新的自适应光学(AO)方法,该方法使复杂样本像差的校正成为可能。该方法根据闪烁点的原始图像来估计样本引起的像差,利用可变形镜(DM)产生与该像差等大反向的量以对其进行校正,从而消除了样本像差引起的定位误差和图像伪像,提高了 3D-SMLM 图像的质量,并成功对细胞内深约 $6 \mu\text{m}$ 处的微管进行了 3D 成像。

2016 年 Bewersdorf 课题组在 iPALM 技术的基础上开发了全细胞 4Pi 单分子转换纳米显微技术

(W-4PiSMSN)^[83],该技术同样利用两个相对的物镜收集发射的荧光,但在 4Pi 干涉腔的两个臂中添加了可变形镜,以校正仪器和样品导致的像差,从而提高了轴向位置分配的可靠性和效率,在 20 nm 的轴向分辨率的基础上,基于轴向扫描的方式将成像深度提高 $10\sim 40$ 倍,最终实现对厚约 $10 \mu\text{m}$ 的细胞样品的大深度成像。

尽管自适应光学方法能够消除由厚样品带来的像差的影响,但其单个分子的轴向位置仍由像散形状编码,随着成像深度的增加,PSF 像散形状的轴向调制仍会变得较差,因而无法进行准确的轴向定位。2018 年 Mlodzianoski 等^[84]开发了一种自适应像散(AA)的方法,可针对图像深度自适应地改变可变形镜引入的像散大小,从而在样品的不同深度实现了几乎相同的、较好的 PSF 像散形状的调制。该方法与自适应光学方法相结合,在保持与盖玻片表面几乎相同的轴向分辨率的情况下,理论成像深度可达 $170 \mu\text{m}$ 。该方法成功可视化和重建了阿尔茨海默病小鼠 $30 \mu\text{m}$ 厚的大脑切片中的 β -淀粉样蛋白斑块的形态和纳米级细节。

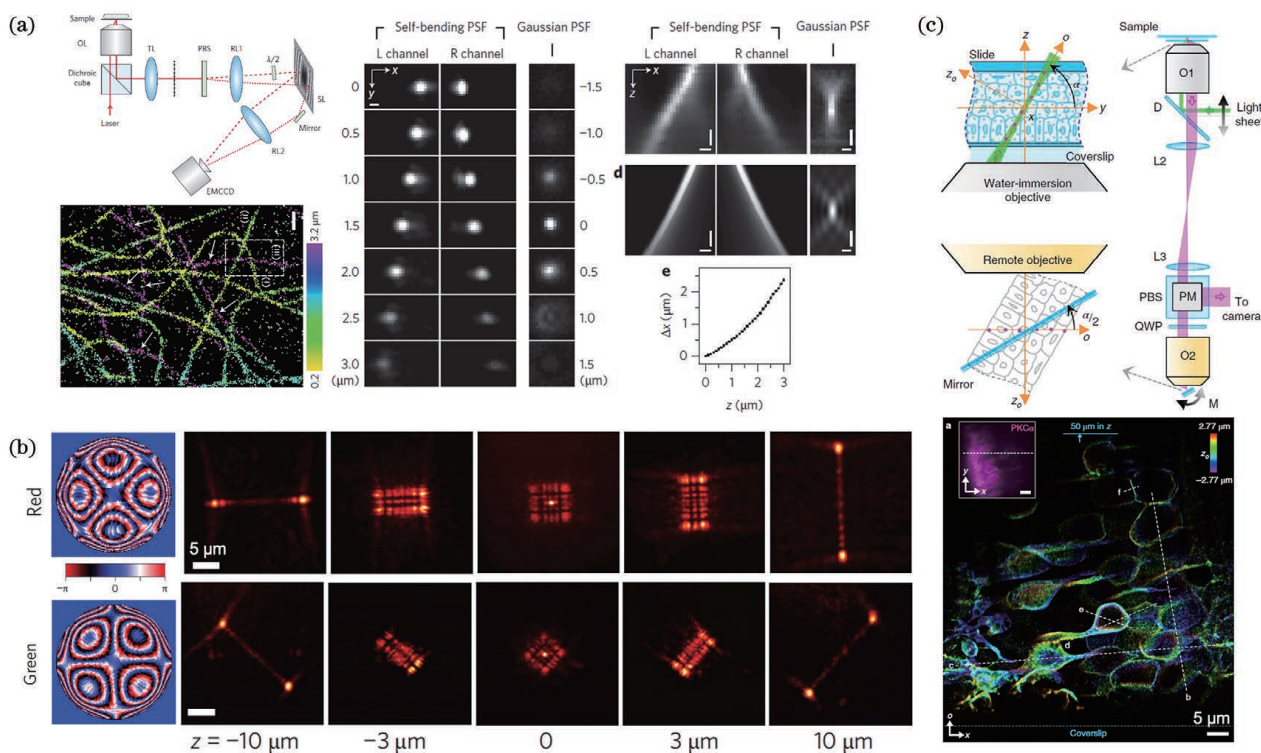


图 8 利用 PSF 工程和激发光源改造增大 SMLM 轴向范围。(a)基于自弯曲 PSF 工程增大轴向范围^[81]; (b)利用四脚相位板调控 PSF 以增大轴向范围^[63]; (c)利用倾斜光片照明系统增大轴向范围^[85]

Fig. 8 Enlargement of SMLM axial range based on PSF engineering and modification of excitation light source. (a) Enlargement of axial range by self bending PSF engineering^[81]; (b) enlargement of axial range by PSF engineering via tetrapod phase plate^[63]; (c) enlargement of axial range by using oblique-plane illuminating system^[85]

2020年 Xu 等^[86]提出了一种原位 PSF 检索 (INSPR) 算法。该算法从理想的 PSF 模型开始, 把采集的原始单分子荧光 PSF 图案与理想的 PSF 模型轴向截面图案进行对比, 并将其分配至相应的轴向位置, 再将分配好的不同轴向位置的 PSF 图案分别进行对齐平均, 以生成新的 PSF 模型, 进而利用该 PSF 模型对原始 PSF 图案数据集进行重新分配, 由此不断更新迭代 PSF 模型, 直至不再变化为止。该重建的原位 PSF 模型能很好地反映出仪器及样品引起的像差的影响, 实验表明利用该算法可在 21~45 nm 的轴向定位精度情况下实现 20 μm 成像深度。

相位板亦是调控 PSF 的一种有效手段。2016年 Moerner 组利用光谱依赖的 Tetrapod 相位板, 以 z 轴深度依赖的方式调制不同颜色荧光的 PSF 形状, 进而实现双色三维 SMLM 成像, 成像范围达到 20 μm [图 8(b)]^[63]。

光片照明光是一张与成像面平行的薄光片, 只有焦平面的样品被其照亮, 而其上下的样品不受影响, 再通过对光片在 z 轴方向的扫描实现对样品的三维成像。光片照明可减少背景并减少光漂白和光损伤。2004年 Huisken 等^[87]开发了选择性平面照明显微镜 (SPIM), 首次实现了光片与显微镜的结合, 开启了光片显微镜的发展之路。2019年 Kim 等^[85]研发出单分子斜面超分辨显微镜 (obSTORM), 直接通过倾斜的光片对样品进行照射, 实现 66 μm 的成像深度[图 8(c)]。

6 多模态关联成像

关联成像指使用不同的显微成像技术对样品的同一视野进行探测, 以弥补各种成像技术的不足, 获取样品更多的时空信息。SMLM 可将分辨率提升至纳米量级, 但仅能同时标记一种或几种目标蛋白分子, 对于样品的其他信息获取不足, 因此将其与其他显微成像技术结合起来发展多模态关联成像技术, 将极大地增加实验结果的可靠性与多样性。值得注意的是, 不同成像手段的原理及制样流程大相径庭, 给 SMLM 和其他成像技术(如电子显微镜、原子力显微镜等)的关联带来了一定困难。

6.1 光镜关联成像

尽管 SMLM 分辨率远高于普通荧光显微镜, 但其采取极端的以时间换空间的策略, 成像周期较长, 视野范围有限。而普通光学显微镜的成像速度快, 视野范围大, 与 SMLM 联用可有效提升实验效率,

促进多维信息的获取。此外, 多色 SMLM 存在样品制备繁琐、窜扰严重、校准困难等问题, 而普通光学显微镜和 SMLM 联用则可在牺牲部分分辨率的情况下有效解决这些问题。以共聚焦显微镜和 SMLM 相结合的 Confocal-SMLM 关联成像为例, 共聚焦显微镜可获取细胞甚至组织水平的空间信息, 而 SMLM 可获取亚细胞精细结构, 二者相结合有效促进了样品从整体到局部、从轮廓到精细结构信息的获取。如 Crossman 等^[88]利用 Confocal-SMLM 关联成像人的心脏组织, Confocal 成像小麦胚芽凝集素标记的细胞膜, STORM 成像亲联蛋白 (JPH) 和兰尼碱受体 (RyR), 发现 JPH 和 RyR 在膜上的共定位特征明显于细胞内组分[图 9(a)]。Dudok 等^[89]利用 Confocal-SMLM 关联成像研究了大麻素受体 CB1 在不同种类中间神经元细胞上的分布。研究者首先在共聚焦显微镜下勾勒出神经元的形态, 对 perisomatic 神经元和 dendritic 神经元进行区分, 随后通过 STORM 揭示这两种类型的中间神经元中大麻素受体 CB1 空间定位和数量的差异[图 9(b)]。

探针的光谱信息在成像过程中一般容易被忽略, 但其往往蕴含着丰富的环境信息。SMLM 与光谱联合成像, 在实现高空间分辨率的同时, 还可揭示出更多新的信息。2017年加州大学伯克利分校的 Xu 组^[90]基于双光路系统, 发展了光谱分辨的 PAINT 超分辨成像技术, 利用对化学极性具有光谱红移特征的探针分子尼罗红, 揭示了细胞膜极性的局域变化, 展现了细胞膜纳米尺度的成分异质性[图 9(c)]。随后, 该课题组又利用光谱分辨的 PAINT, 对有机小分子表面吸附层的化学极性进行了光谱超分辨成像, 揭示了有机吸附层形貌与极性的相关性, 并实现了两组份有机混合物表面吸附层化学成分的解析, 为表面吸附层纳米尺度分析提供了新的光学分析手段[图 9(d)]^[91]。

6.2 电镜关联成像

电子显微镜 (EM) 利用电子代替光子, 电磁场代替透镜对样品进行成像。由于电子的波长远小于光子, 因此电子显微镜可以达到 1 nm 的分辨率, 远高于普通光学显微镜, 可实现对亚细胞结构的精细描绘。然而纯电镜成像的缺陷同样明显, 无法区别分子特异性。以透射电镜为例, 其成像依据是: 样品致密程度不同的区域对电子束的散射程度不同, 图像仅以衬度差异来表征不同组分。免疫电镜尽管实现了成像标记特异性, 但其应用仍受到低标记密度

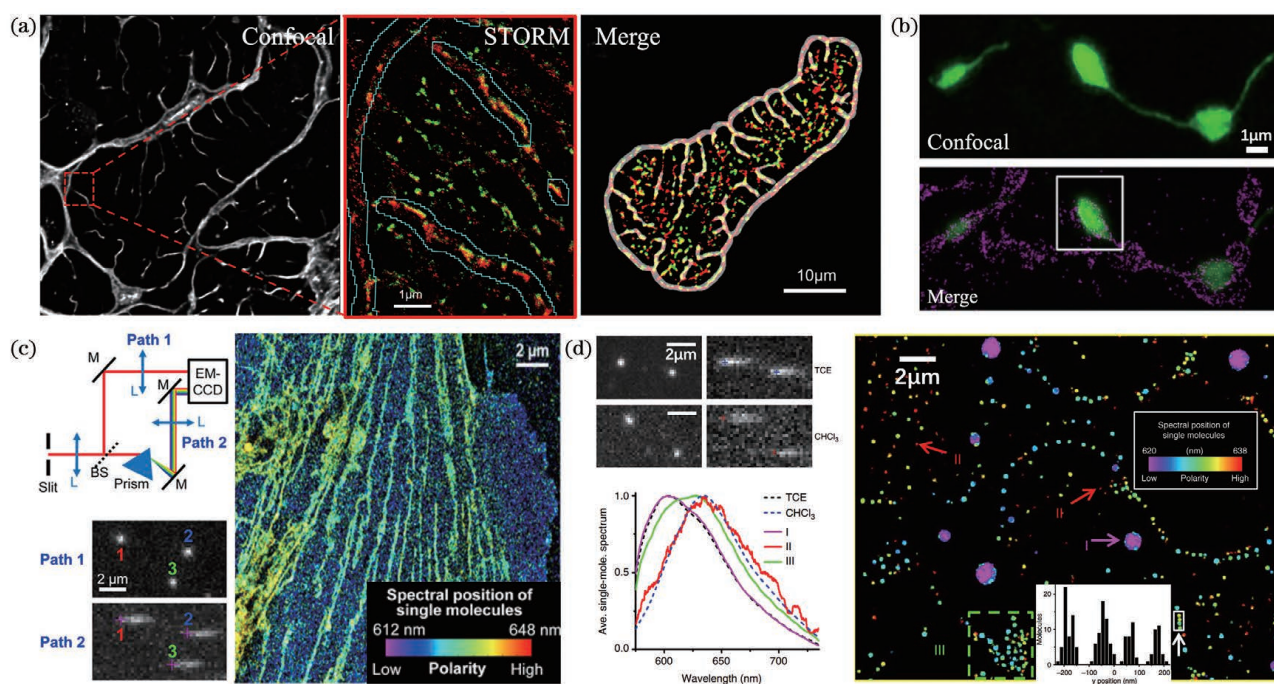


图9 共聚焦/光谱与SMLM关联成像。(a)亲联蛋白、兰尼碱受体及细胞膜的Confocal-STORM关联成像^[88]；(b)生物胞素标记的神经轴突和大麻素受体CB1的Confocal-STORM关联成像^[89]；(c)光谱与PAINT关联成像揭示细胞膜的成分异质性^[90]；(d)光谱与PAINT关联成像解析两组份有机混合物表面吸附层化学成分^[91]

Fig. 9 Confocal/spectrum-SMLM correlative imaging. (a) Confocal-STORM correlative imaging of junctophilin, ryanodine receptors, and cell membrane^[88]; (b) confocal-STORM correlative imaging of biocytin-filled axon terminals and cannabinoid receptor CB1^[89]; (c) heterogeneity of cell membrane revealed by spectrally resolved PAINT^[90]; (d) identification of surface adsorption layer of two-component mixture resolved by spectrally resolved PAINT^[91]

和难以标记多靶点的限制。SMLM可将蛋白特异性标记的作用发挥到极致,但对样品整体多组分描绘无能为力。因此,SMLM与电镜成像联合将是多模态关联成像的最佳范例之一。

电镜样品制备需经过固定、脱水、包埋、切片等步骤,成像时使用电子束轰击样品,将对样品的荧光标记造成极大破坏,SMLM与电镜关联成像需要克服这些障碍^[92]。2011年Hess课题组改进了制样方法,包括调整固定剂配比如改变戊二醛、四氧化锇的浓度,向包埋树脂中加入水等,减少对荧光蛋白的破坏^[93]。首先利用PALM对荧光蛋白标记的线虫细胞切片进行成像,之后利用投射电镜对样品进行成像,成功实现了线粒体亚细胞结构的PALM-电镜关联成像[图10(a)]。2012年,该课题组又采用了聚焦离子束扫描电镜(FIB-SEM)和SMLM关联成像,首先将样品夹持在两个玻片之间,将其固定并快速冷冻,随后进行iPALM成像,接下来去掉覆盖的玻片进行FIB-SEM成像,这揭示了线粒体中类核体和线粒体膜具有复杂的相互作用^[94]。2013年Suleiman等^[95]首次将STORM与快速冷冻刻蚀电

镜结合起来,揭示了鼠肾小球基膜上的整合素、胶原蛋白、巢蛋白等分子的精细组织分布。

2015年庄小威组直接将细胞培养在SiN薄膜这种既可以透过可见光也可以透过电子的材料上,优化了固定包埋等样品的制备方法,实现了对微丝微管骨架、线粒体等组分的STORM-EM关联成像[图10(b)]^[96]。加州大学伯克利分校的Xu组^[97]将单层石墨烯覆盖在细胞表面,实现含水样品的扫描电镜成像,并与STORM进行关联成像,展示了细胞骨架微丝肌动蛋白的超精细结构。2020年Hess课题组与Betzig合作,联合SMLM/SIM和FIB-SEM成像,叠加了两个显微镜的三维图像数据,在全局超微结构背景下对蛋白质进行多色三维纳米可视化探究,以惊人的清晰度揭示了各种亚细胞结构的细节[图10(c)]^[98]。

6.3 原子力显微镜关联成像

原子力显微镜(AFM)利用载有锋利尖端(约10 nm)的弹簧悬臂来扫描样品表面,通过悬臂的弯曲或振动来表征样品的表面形貌或力学特性。与电镜相比,AFM对样品的要求少得多,不需要固

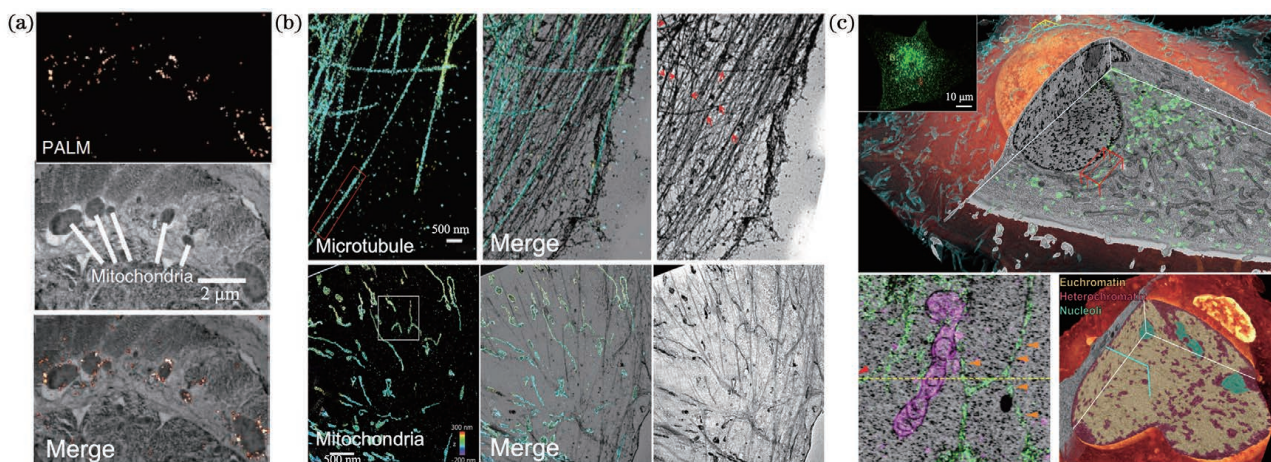


图10 电镜与SMLM关联成像。(a)采用电镜与PALM(标记线粒体TOM20蛋白)关联成像线粒体^[93]; (b)采用电镜与STORM(标记微管和线粒体)关联成像细胞骨架和线粒体^[96]; (c)聚焦离子束扫描电镜与SMLM关联的全细胞成像^[98]

Fig. 10 EM-SMLM correlative imaging. (a) Correlative imaging of mitochondria by EM and PALM (labeling TOM20 proteins)^[93]; (b) correlative imaging of cytoskeletons and mitochondria by EM and STORM (labeling microtubules and mitochondria)^[96]; (c) correlative imaging of FIB-SEM and SMLM for whole cells^[98]

定、脱水等操作,甚至可以对活细胞进行成像。AFM可提供样品表面纳米级空间形貌信息,但同样缺乏特异性。AFM与SMLM的联合成像可极大地丰富待测样品的空间信息。2011年Morner组^[99]对亨廷顿蛋白聚合物进行了SMLM成像,随后通过校准视野对同一区域进行了AFM成像,揭示了亨廷顿蛋白聚合物的结构与形貌特征[图11(a)]。

2015年Odermatt等^[100]搭建了STORM-AFM成像平台,无需移动样品即可同时对其进行AFM和STORM成像,并且实现了对活细胞形貌——黏着斑的关联成像[图11(b)]。2020年Zhou等^[101]利用AFM-STORM对细胞膜胞质侧的 Na^+/K^+ -ATP酶和锚蛋白进行关联成像,发现这两种蛋白倾向于定位在膜上的“蛋白岛”[图11(c)]。

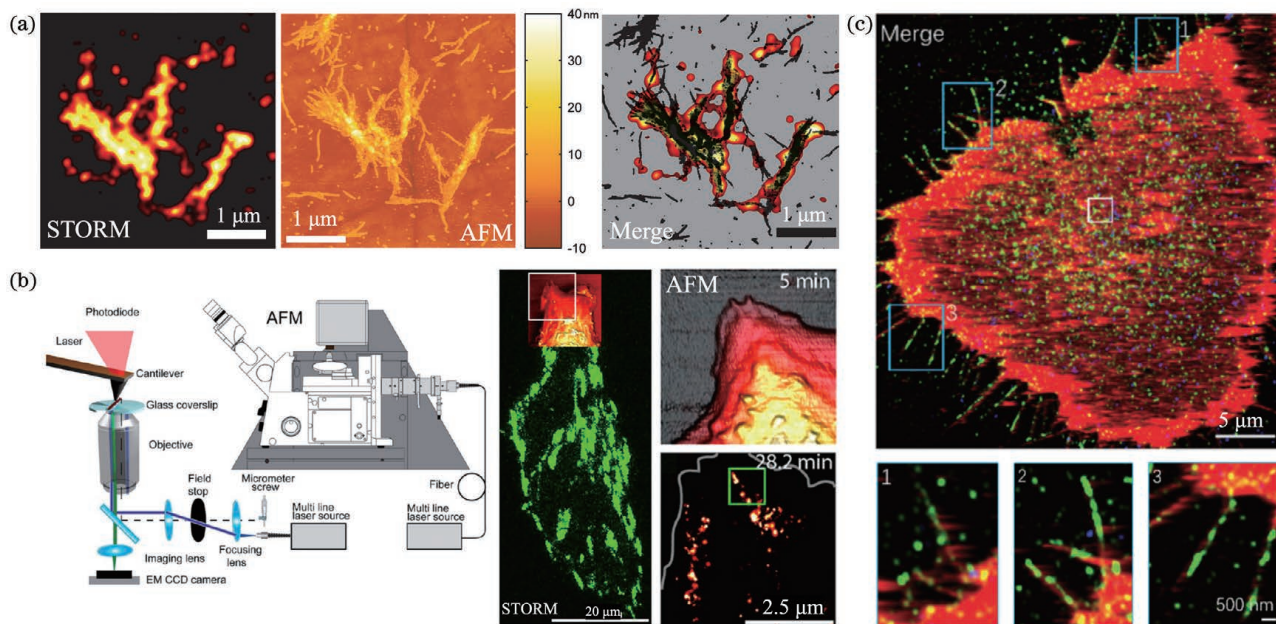


图11 原子力显微镜(AFM)与SMLM关联成像。(a)AFM-STORM关联成像亨廷顿蛋白聚集体^[99]; (b)AFM-STORM关联成像细胞桩蛋白和片状伪足^[100]; (c)AFM-STORM关联成像 Na^+/K^+ ATP酶在细胞膜上的分布^[101]

Fig. 11 AFM-SMLM correlative imaging. (a) AFM-STORM correlative imaging of Huntington protein aggregate^[99]; (b) AFM-STORM correlative imaging of paxillin and lamellipodia extension in live cell^[100]; (c) distributions of Na^+/K^+ ATPase on membrane revealed by AFM-STORM correlative imaging^[101]

7 深度学习

深度学习作为机器学习方法中的一类,已经成为解决图像分类和图像恢复问题的一种非常有效的工具,其通过训练人工神经网络学习样本数据的内在规律,获得高分辨图像和低分辨图像之间的映射关系,将低分辨图像重建成为高分辨图像。基于深度学习的超分辨图像重建有望为 SMLM 成像速度慢、后期数据分析复杂等问题提供新的解决方案。2016年 Dong 等^[102]首次将深度卷积神经网络引入超分辨图像重建领域,提出超分辨卷积神经网络(SRCNN)。该网络仅用了三个卷积层,结构较简单,除优化之外几乎没有额外的预处理/后处理,可取得较好的超分辨图像重建效果。

正常 SMLM 成像视野只有几十微米,且一个视野成像时间为数分钟,高通量采集意味着需要耗费大量时间,若闪烁点密度很高则需要耗费更多的时间,即需要延长淬灭时间和数据采集时间以保证高密度点数据不丢失。2018年 Christophe Zimmer 组^[103]提出 Artificial Neural Network Accelerated PALM(ANNA-PALM)深度学习方法,该方法可极大地提高超大视野 SMLM 成像速度。结果表明只需要 3 h 即可获得超过 1000 个视野(含有 1000 个以上细胞)的超分辨率成像数据,成像尺度从 20 nm 跨越到 2 mm,这证明该方法在快速高通量超分辨成像方面的明显优势^[103]。同时, Yoav Shechtman 组^[104]开发了一种名为 Deep-STORM 的深度学习方法,在无需待测目标物形貌信息的情况下,能够快速、准确地对高密度闪烁点图像进行定位分析,并快速输出超分辨率图像,有效提升高密度 SMLM 成像速度。此外,2019年该课题组基于 PSF 的色差依赖性,利用深度学习,在单色相机上区分不同闪烁点的颜色^[105]。

2019年加州大学伯克利分校的 Xu 组^[106]提出了一种数据驱动的深度学习方法,实现了从单分子的成像中提取高维度信息,即基于未经改动的普通单分子显微镜,对单分子像的图案直接实现了双色三维 SMLM。

如前所述,利用 Tetrapod 相位板可以实现大 z 轴范围的 PSF 调制,但调制后的 PSF 空间尺度变大,占用过多成像靶面,只适合低密度样品成像^[63]。2020年, Yoav Shechtman 组^[107]针对因 Tetrapod 相位板调制的 PSF 过大而无法进行高密度成像的问题,在 Deep-STORM 的基础上发展了 Deep-

STORM3D,利用深度学习神经网络实现了大 z 轴范围的密集闪烁点 PSF 定位分析,实现了全细胞中线粒体超分辨成像。

8 数据提取与分析

单分子定位图像是由众多高精度荧光定位点叠加组成,不仅可以给出目标物的超分辨形貌信息,还可以通过有效的数据提取和分析得到图片背后深层结构信息。目前研究人员针对 SMLM 数据已经发展出各种行之有效的分析方法,尤其是对 SMLM 数据中形态较为多见的簇状结构的聚类分析^[108]。

8.1 K 函数

1977年 Ripley^[109]针对空间点分布提出了 K 函数(Ripley's K Function)分析方法,用于描述空间内点的聚集和分散,其方程一般写为^[110]

$$K(r) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n N_{p_i}(r) / \lambda, \quad (8)$$

式中: n 为空间内点数量; λ 为点密度; $N_{p_i}(r)$ 为以第 i 点为圆心、 r 为半径的区域内所有点的数量。该函数处理可理解为以图像内任意一点为中心,画一个半径为 r 的圆盘,统计该圆盘区域内点数量,通过增加圆盘的半径,再次统计圆盘内点的数量,对所有点都进行类似操作后即得到 K 函数曲线。如果点为聚集分布,则在较短距离内统计到的小间距的点对多;反之,如果点为离散分布,则在较短距离内统计到的小间距的点对少。当 $K(r) = \pi r^2$ 时,空间内的点为完全随机分布。Besag^[111]提出用 L 函数把 K 函数归一化,L 函数为

$$L(r) = \sqrt{K(r)/\pi}. \quad (9)$$

将 L 函数进一步归一化,可得到 H 函数^[112]:

$$H(r) = L(r) - r. \quad (10)$$

H 函数为目前常用的 K 函数的归一化形式,用来表征目标物的分布情况。因此对于 K 函数分析法,K 函数的纵坐标经常用 $L(r) - r$ 或 $H(r)$ 代替。当分子为簇状分布时,H 函数曲线从零点出发,在 x 轴上方逐步增大至峰值后逐步下降至 x 轴下方;当分子为随机分布时,H 函数在 x 轴附近徘徊;当分子为离散分布时,H 函数曲线完全处于 x 下方[图 12(a)]^[108]。通常,H 函数的峰值高度可以评判聚集程度,其相应的 r 的大小介于簇的半径与直径之间。值得注意的是,峰值位置不仅受到团簇大小的影响,而且还受到团簇之间相互距离的影响,因此无法精准地定量簇的大小^[110]。K 函数分析方法的优势在于其可分析整体的聚集行为,且从多条归一

化后的 K 函数即 H 函数曲线可以直观看出不同簇的聚集程度,但其缺点在于无法获得单个簇的具体性质。

2017 年 Burgert 等^[113] 使用 K 函数分析了 STORM 采集的细胞膜上神经酰胺的簇状分布图像,证明蜡状芽孢杆菌鞘磷脂酶处理过的细胞神经

酰胺簇变大。同年,基于 STORM 数据, Lopes 等^[114] 利用 K 函数描述了人巨噬细胞 SIRP α 受体被 IgG 刺激发生聚集的现象[图 12(b)]。2018 年,王宏达组基于 STORM 数据,使用 K 函数证明 Hela 细胞上表面 GLUT1 受体比下表面的分布更为聚集 [图 12(c)]^[115]。

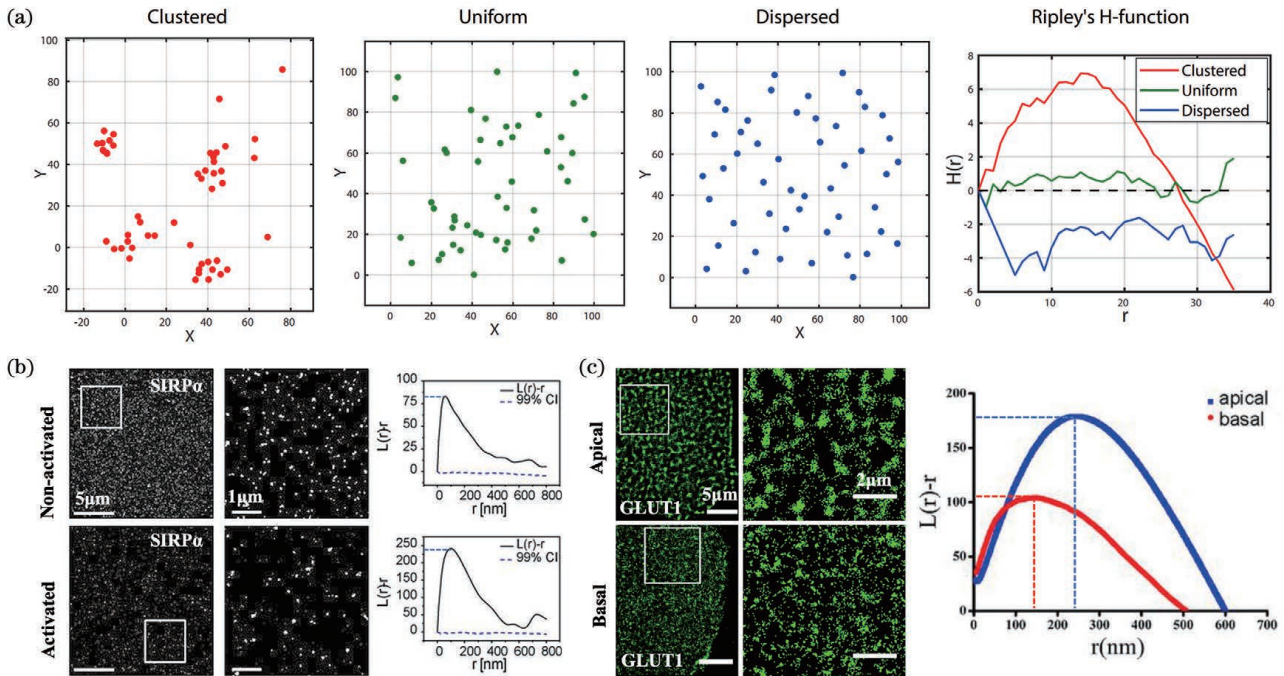


图 12 K 函数原理及应用。(a) K 函数工作示意图^[108]; (b) K 函数揭示激活的巨噬细胞 SIRP α 蛋白的团簇特性^[114];

(c) K 函数揭示 Hela 细胞 GLUT1 蛋白在上下表面不同的团簇尺寸^[115]

Fig. 12 Principle and applications of Ripley's K function. (a) Schematic diagram of Ripley's K function^[108]; (b) Ripley's K function reveals the clustering of SIRP α in activated human macrophage^[114]; (c) Ripley's K function indicates cluster sizes of GLUT1 proteins on the apical/basal surface in Hela cells^[115]

8.2 关联函数

定量描述蛋白质聚集特性的先决条件是精准知道有多少个蛋白质分子。对于 SMLM 数据而言,单个荧光分子的多次闪烁定位会有细微差别,因此单分子定位点也会以簇的形式出现。但 K 函数分析法只能粗略评估图像的整体聚类情况,且容易受到单分子荧光多次闪烁的影响,若不对闪烁次数进行量化, K 函数分析会得到伪簇的结果。为解决这一问题, Sengupta 等^[116-117] 基于对关联函数开发了 PC-PALM 分析法。PC-PALM 通过分析单个荧光分子多次闪烁形成的峰簇的空间特征量化和消除多次闪烁的影响,阐述蛋白质簇是否存在并定量表征蛋白质簇的大小、密度等。对关联函数为 K 函数的微分形式^[118],其公式为

$$g(r) = \frac{1}{2\pi r} \frac{dK(r)}{dr}. \quad (11)$$

对关联函数可以理解为以空间内任一点为圆心、半径为 r 的 dr 宽度圆环内分子数目与距离的关系。当分子随机分布时,对关联函数为一条几乎等于 1 的直线;当分子簇状分布时,该函数为一条随距离 r 逐步趋向于 1 的弯曲曲线[图 13(a)箭头处曲线]^[116]。

PC-PALM 分析法只能为近似于径向对称且面积较统一的蛋白质簇提供可靠的聚类参数估计,因为该方法与 K 函数分析计算的都是整个图像上蛋白质簇的平均值,因此更适用于表征极化不明显的膜蛋白簇。对于非径向对称或大小不一的簇(如微管、黏着斑等结构),这种平均算法会降低在这种簇结构中检测到的聚集程度,从而造成假象。2020 年 Wang 等^[119] 利用对关联函数获取了年轻小鼠和衰老小鼠红细胞 CD47 膜蛋白簇的大小、密度等信息,证明了衰老小鼠红细胞 CD47 簇聚集程度高于新鲜小鼠红细胞[图 13(b)]。除了研究蛋白质簇的数

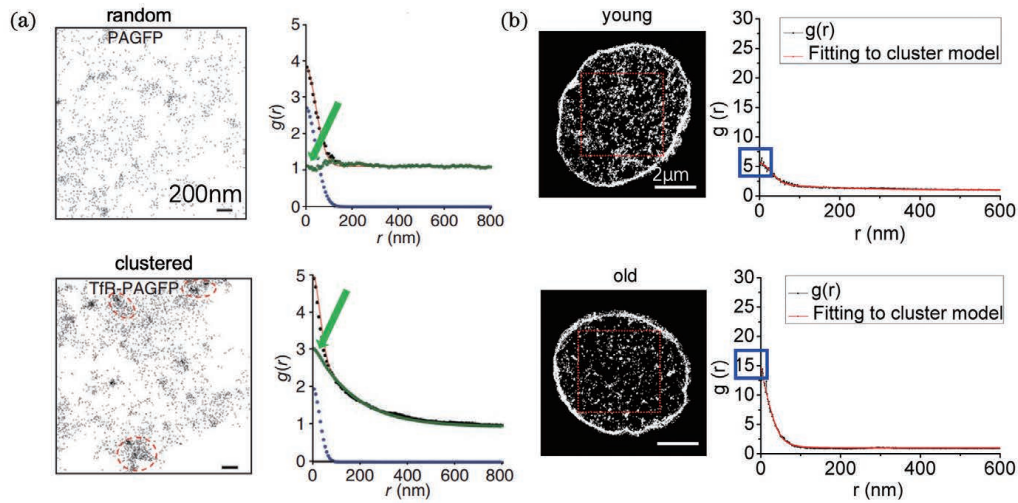


图 13 对关联函数分析结果。(a)随机分布和簇状分布的对关联函数分析结果图^[116]；(b)年轻和衰老小鼠红细胞 CD47 的对关联函数分析结果图^[120]

Fig. 13 Analysis results of pair correlation function. (a) Results of pair correlation function with random and clustered distributions^[116]; (b) pair correlation function analysis results of CD47 in young and old mouse erythrocytes^[120]

量,对关联函数还可表征蛋白质在细胞膜上的无规则扩散速度。2020年 Rey-Suarez 等^[120]模拟了 B 细胞受体的 8 种扩散过程,并成功用对关联函数进行表征。

此外,还可以使用原理类似的自相关分析和互相关分析描述两个目标物之间的关系。2013 年庄小威组基于 STORM 成像和一维互相关分析阐明了神经细胞轴突部分微丝-帽蛋白复合物与血影蛋

白交替构成间距为 180~190 nm 的周期性结构[图 14(a)]^[121]。2017 年该组又通过二维自相关分析发现神经细胞胞体和树突部位的血影蛋白呈现二维三角晶格结构[图 14(b)]^[122]。2018 年潘雷霆等^[123]基于 STORM 成像,应用二维自相关分析和互相关分析得到红细胞血影蛋白生理长度为 80 nm,并证实血影蛋白骨架存在六边形网格状结构[图 14(c)]。

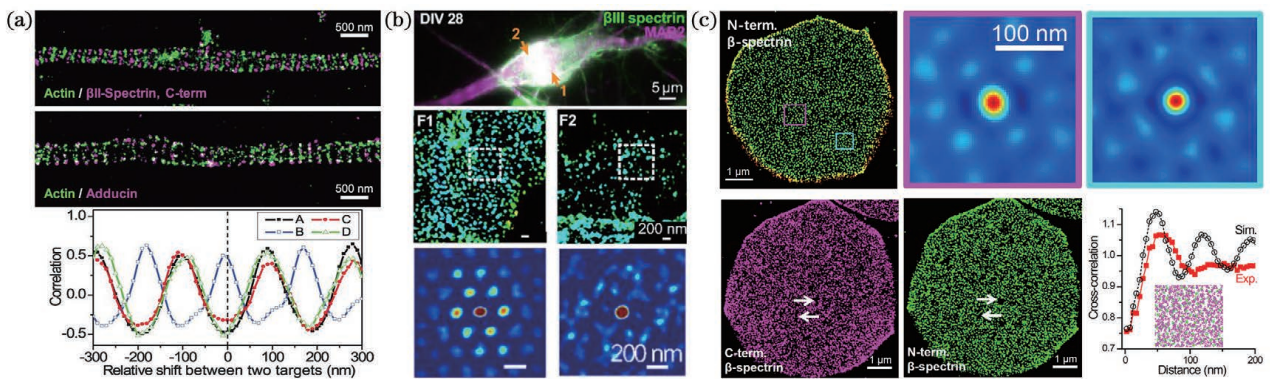


图 14 自相关分析与互相关分析的应用。(a)神经轴突中肌动蛋白和血影蛋白 C 端、N 端和帽蛋白的一维互相关分析^[121]；(b)神经细胞胞体中血影蛋白的二维自相关分析^[122]；(c)人红细胞中血影蛋白 N 端的自相关分析及血影蛋白 C 端与 N 端的互相关分析^[123]

Fig. 14 Applications of auto/cross-correlation analysis. (a) One-dimensional cross-correlation analysis of actin, C-terminal of spectrin, N-terminal of spectrin, and adducin in axons^[121]; (b) two-dimensional auto-correlation analysis of spectrin in the soma of neurons^[122]; (c) cross-correlation analysis of N-terminal of spectrin and cross-correlation analysis of C-terminal and N-terminal of spectrin in human erythrocytes^[123]

8.3 贝叶斯方法

聚类分析方法的有效实施通常依赖使用者输入合适的参数,人为主观性和赋值的不确定性会影响

计算机对 SMLM 图像聚类识别的效果。此外,在批量处理数据时,由于输入参数固定,往往需要输入妥协的次优参数。贝叶斯方法将簇信息交由具有明确

模型的贝叶斯后验概率进行评估,减少了人为主观因素的影响^[124]。

首先,由定位软件生成图像中每个分子的坐标,再在二维平面上将分子坐标建模为高斯分布簇。这些分子坐标拥有不同的标准差,而标准差受光子数、PSF宽度、局部背景噪声以及像素大小等因素的影响。该方法使用K函数统计每个定位点半径范围 r 以内的点数量,计算出局部密度,低于特定的密度阈值的定位点会被分配给背景。阈值可理解为将点分配给簇所需的最小密度。

为了反馈给用户最好的簇分布建议,贝叶斯方法首先通过不断更换距离 r 和阈值参数,计算出成千上万个簇分布的可能性,然后为其分配后验概率,最终得到概率最大的参数组合及其产生的簇分布方案,进而得到SMLM数据的定量信息(簇大小、密度等)。

相较之前需要不断输入并调整参数以达到理想簇识别效果的方法,贝叶斯方法有较大优势,该方法是第一个考虑到分子定位精度的方法。但目前该方法仍有不足之处:1)该方法对6个以上分子构成的簇的识别能力较好,对于二聚体、三聚体等小型复合

物的识别能力较差;2)该方法没有充分考虑分子定位闪烁对实验结果的影响,需要其他软件辅助消除闪烁影响;3)贝叶斯方法需要计算出成千上万个方案,再从中挑选最佳方案,因此运算速度极慢。目前,Griffié等^[125]已发展出适合3D-SMLM数据分析的贝叶斯法。

8.4 DBSCAN 算法

1996年Ester等^[126]发表了一种基于密度的空间聚类(DBSCAN)算法。DBSCAN基于两个输入参数,检测和提取SMLM数据中的簇,一个参数是邻域半径 ϵ ,另一个参数是在 ϵ 内包含的点的最少数量(N_{\minPts})。

DBSCAN将点分为三类:核心点,边界点和离群点。核心点是指在半径 ϵ 区域内含有超过 N_{\minPts} 数目的点。边界点是指在半径 ϵ 区域内含有小于 N_{\minPts} 数目的点,但该点落在核心点的邻域内。既不是核心点也不是边界点的点会被定义为离群点。该算法可以从任何未被访问的点开始,将满足 ϵ 和 N_{\minPts} 的点设置为核心点后,继续保持该条件对核心点周围的点进行判断并不断向外扩张,直到获得包含核心点和边界点的最大化区域[图15(a)]^[108]。

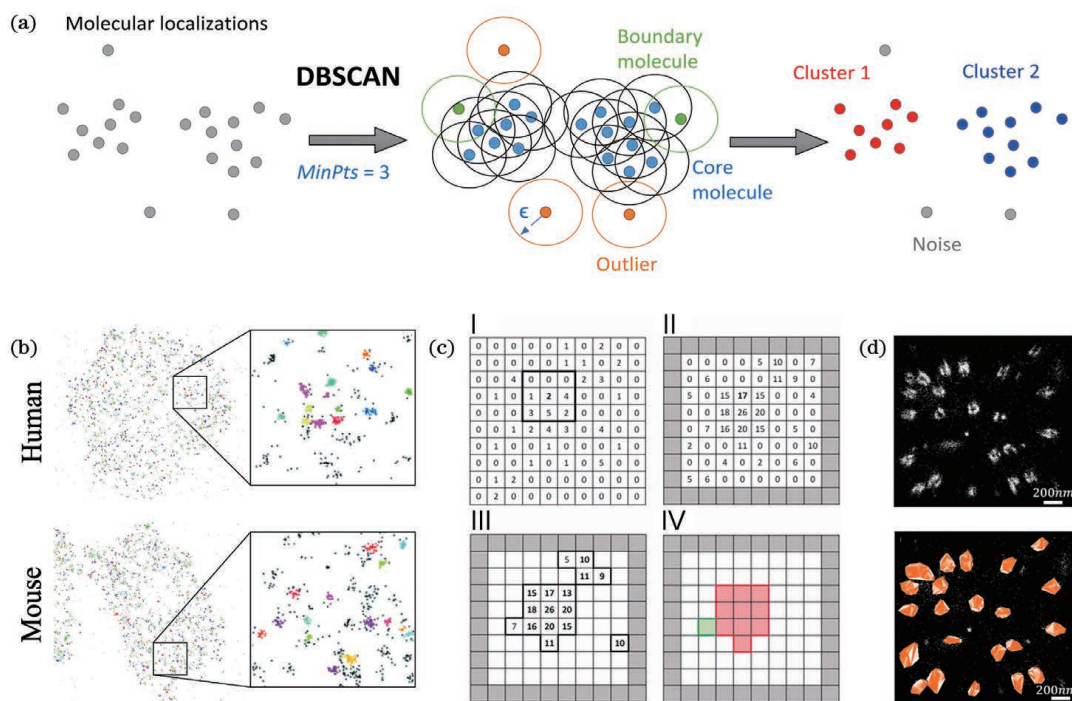


图15 DBSCAN算法和FOCAL算法的原理及应用。(a)DBSCAN原理图^[108]; (b)利用DBSCAN对人和小鼠血小板中的酪氨酸激酶进行簇分析^[127]; (c)FOCAL算法原理图^[128]; (d)利用FOCAL3D分析U2OS细胞的核孔复合物(NPC)^[129]

Fig. 15 Principle and applications of DBSCAN and FOCAL. (a) Principle of DBSCAN^[108]; (b) cluster analysis of tyrosine kinase in human and mouse platelets using DBSCAN^[127]; (c) principle of FOCAL^[128]; (d) cluster analysis of NPC in U2OS cells by FOCAL3D^[129]

DBSCAN 的优势在于其能够发现任意形状的簇。但该方法也有明显缺点,如 DBSCAN 所依赖的两个参数要求所分析数据中的簇与簇之间密度不能相差太大,否则参数的设定会导致低密度的簇被全部归类为背景噪声。其次,选择参数的主观性可能会极大地改变聚类结果。因为两个参数之间具有联动性,需要靠经验去判定,如保持 N_{\minPts} 不变, ϵ 设置太大会把多个簇集成一个簇, ϵ 设置太小会导致一个簇被分成多个簇;若 ϵ 不变, N_{\minPts} 设置太大会导致离群点(即噪声)过多, N_{\minPts} 设置太小会导致核心点过多。目前,DBSCAN 多作为评判其他新兴簇分析算法优劣的标准。2020 年 Dunster 等^[127]利用该算法对人和小鼠的血小板酪氨酸激酶的 SMLM 数据进行识别提取,证明了小鼠酪氨酸激酶簇密度均大于人类[图 15(b)]。

8.5 FOCAL 算法

DBSCAN 对两个参数的设定互相影响,往往需要多次调整以达到最优效果。此外,该算法具有高时间复杂度 $O(n^2)$,这限制了其在 SMLM 数据上的应用。为解决这些局限性,2015 年 Mazouchi 等^[128]开发了专门为 SMLM 服务的快速优化的定位群集算法 FOCAL。

SMLM 图像是根据定位坐标构建的,每个定位坐标都会产生定位不确定性 σ ,且根据荧光染料的不同, σ 也会有所差异,如 STORM 常用的 Alexa 647 染料存在约 10 nm 的定位不确定度。FOCAL 利用 SMLM 图像坐标,将图像分割成宽度大小为 σ 的方格阵列,再将定位点分配到方格内(方格内的数字代表了该方格内定位点的数量),完成了第一次密度图的构建。在此阶段,簇和背景之间的对比度非常低,简单的阈值处理无法有效地区分簇和背景。扩大方格的大小虽会提高对比度,但同时也会丢失精细的簇结构信息。为了在不改变方格大小的情况下提高对比度,以每个非零方格为中心,将其周围 8 邻域的数值与中心叠加,构造成新的密度图[图 15(c)中 I 到 II 的转化]^[128]。

接下来对新的密度图进行阈值化。首先将新密度图中数值大于密度阈值(T_{\min})的方格标识为核心点。不是核心点但属于核心点的 4 邻域(上下左右)的非零点,则被视为边界点,一同作为簇的候选对象被保留。异常闪烁或常亮的荧光团将产生多次重复定位,是伪簇,现有的阈值参数无法剔除它们。因此,为了屏蔽这些伪簇,只有最小尺寸为 $3 \times 3 + 1$ 格的簇才被定义为蛋白质簇[图 15(c)中 III 到 IV 的

转化]。

与 DBSCAN 相比,FOCAL 根据图像定位的不确定性 σ 设置最小簇的阈值,可以消除由单个荧光团的多次定位引起的伪簇。FOCAL 只需要输入一个参数,就可快速测试出最佳参数,可最大程度地减少错误簇的识别,并保持簇的完整性。除此之外 FOCAL 的参数还可以用于快速确定 DBSCAN 的参数。FOCAL 的优势在于处理速度快,但相较于 DBSCAN,其簇识别精确度有待提高。2020 年 Nino 等^[129]开发出了 FOCAL3D 方法,该方法可对 3D-SMLM 数据进行聚类分析,并成功识别和提取了核孔复合物的簇信息[图 15(d)]。

8.6 泰森多边形方法

泰森多边形方法是一种将空间细分为以点为中心(称为“种子”)的多边形区域的方法^[130]。2015 年,Levet 等^[131]将 SMLM 数据中的分子坐标作为种子,构建泰森多边形,提出 SR-Tesseler 聚类分析方法,将泰森多边形根据不同参数进行区域分割,分析和提取 SMLM 图像内的簇。泰森多边形的边与最近的两个种子点等距,即在只有两个种子点的情况下,它们所属的多边形的边由垂直平分线形成,可保证任何多边形之间都没有相交。添加新种子点后,此等分线将被旧种子点和新种子点之间的等分线割断,对每个新种子点重复此过程以生成泰森多边形。每个多边形都可以视为其相应种子点的影响区域,与种子点共享边缘的相邻多边形被称为一阶泰森多边形,以此类推可获得二阶至 n 阶多边形[图 16(a)]^[131]。利用每一个种子点均可计算出如面积、密度、平均距离、相邻种子点最近距离等多个参数信息。这些参数提供了每个种子点及其周围种子点的定量信息,种子点密度较高的区域由小且密集的多边形组成,种子点密度稀疏的区域由大且稀疏的多边形组成[图 16(b)]^[131]。

构建好泰森多边形后,后续将分三个步骤进行分割:

- 1) 通过计算得到多边形参数的统计信息如平均值和标准差。
- 2) 根据统计信息确定相关参数阈值,筛选出符合阈值的多边形。阈值一般确定为平均密度的两倍,也可以根据实际情况选择其他值作为阈值。
- 3) 将步骤 2) 筛选出的相互接触的多边形合并,连接属于边界的所有定位点,获得簇轮廓。

基于上述处理步骤,在模拟[图 16(b)]和实验数据[图 16(c)]中成功提取了图像中簇的定量信息。

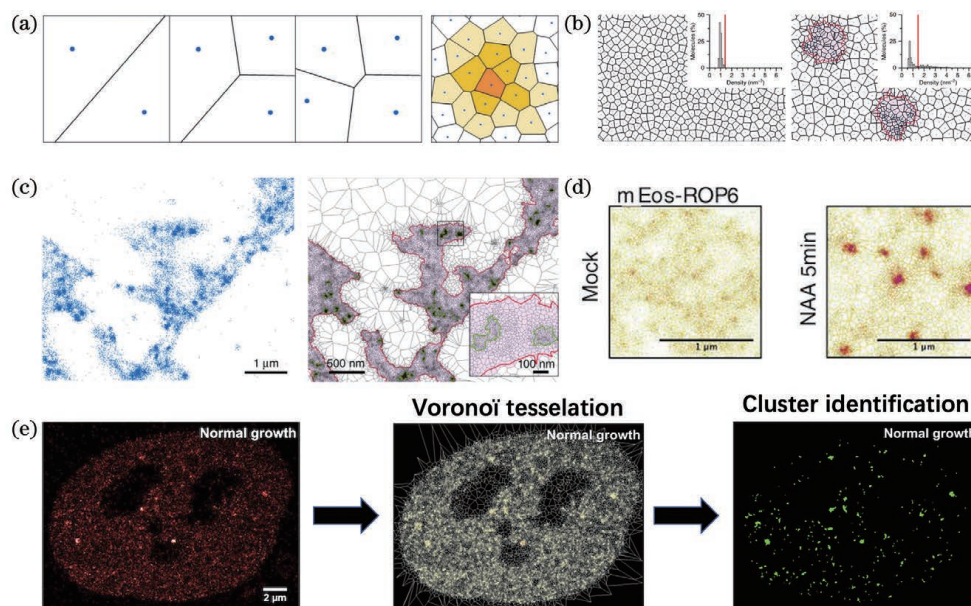


图 16 基于泰森多边形的 SR-Tesseler 的原理及应用。(a)泰森多边形的原理^[131];(b)利用 SR-Tesseler 对均匀(左)和非均匀(右)模拟图像进行自动分割^[131];(c)利用 SR-Tesseler 对 GluA1 蛋白 SMLM 图像进行分割^[131];(d)利用 SR-Tesseler 对 ROP6 蛋白 SMLM 图像进行簇分析^[132];(e)利用 SR-Tesseler 对核孔复合物 SMLM 图像进行簇分析^[133]

Fig. 16 Principle and applications of SR-Tesseler based on Voronoi diagram. (a) Principle of Voronoi diagram^[131]; (b) automatic segmentation of the uniform (left) and non-uniform (right) simulated images by SR-Tesseler^[131]; (c) segmentation of GluA1 SMLM image by SR-Tesseler^[131]; (d) cluster analysis of ROP6 SMLM image by SR-Tesseler^[132]; (e) cluster analysis of nuclear pore complex SMLM image by SR-Tesseler^[133]

2019 年 Platre 等^[132]通过 SR-Tesseler 方法发现生长素可以使拟南芥的根尖细胞膜表面 ROP6 蛋白聚集成簇[图 16(d)]。2020 年,孙育杰组^[133]使用 SR-Tesseler 对细胞核内的 RNA polymerase II(Pol II)蛋白簇进行聚类分析,发现和正常条件相比,Pol II 蛋白簇在血清刺激下密度更高、更活跃、持续时间更长[图 16(e)]。

2019 年 Levet 等^[134]在 SR-Tesseler 的基础上针对 SMLM 数据开发出共定位分析方法 Coloc-

Tesseler。该方法首先为每个颜色通道生成泰森多边形,并进行图像分割,通过计算曼德斯共定位系数(MCC)和皮尔森相关系数(PCC)量化共定位程度。Coloc-Tesseler 的性能已在模拟和实验数据上得到验证,且其支持三维图像分析,成为分析多色 SMLM 的新型工具。

通过以上描述可以看出不同的簇分析方法各有特点,需根据数据获取情况进行合理选择,不同簇分析方法的对比见表 3。

表 3 不同簇分析方法的对比

Table 3 Comparison of different cluster analysis methods

Type	Time cost	Number of parameters	Blinking correction	Cluster shape	Cluster information
Ripley's K function ^[109]	Normal	One	No	Radially symmetric	Overview
PC-PALM ^[116]	Normal	One	Yes	Radially symmetric	Overview
Bayesian Methods ^[124]	Very long	Zero	No	Code-dependent	Specified
DBSCAN ^[126]	Long	Two	No	Various	Specified
FOCAL ^[128]	Normal	One	No	Various	Specified
SR-Tesseler ^[132]	Normal	One	Yes	Various	Specified

8.7 簇分析的注意事项

SMLM 数据中并非所有簇都与生物结构有关。某些簇是由于荧光分子的光物理性质的不确定性造成的成像伪影,即伪簇^[135]。伪簇可能会使检测到的团簇的数量和解释产生偏差。因此,需对荧光闪烁进行预处理分析以校正计数过多的伪像^[136-138]。

2017年 Zanicchi 等^[139]基于 DNA 折纸术可控地制备出不同聚合度的蛋白模型[图 17(a)],并开发了一种数据处理和拟合方法,通过对闪烁能力的分析,实现了对蛋白聚合度的定量解析。首先对 SMLM 数据进行簇识别,再提取每个簇的闪烁信

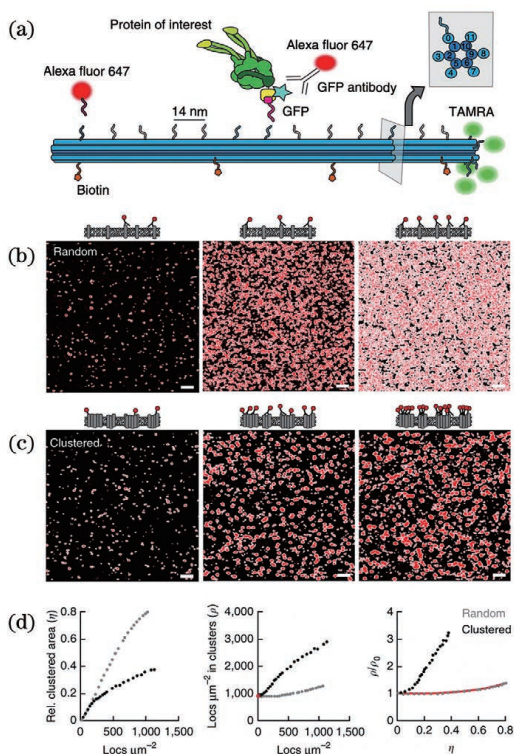


图 17 DNA 折纸术原理和膜蛋白纳米团簇鉴别。(a)DNA 折纸术原理图^[139]; (b)标记密度逐渐增加的随机分布膜蛋白模拟图^[140]; (c)标记密度逐渐增加的簇状分布膜蛋白模拟图^[140]; (d)纳米团簇的定量分析(团簇占空比 η 、团簇密度 ρ 及二者归一化曲线)^[140]

Fig. 17 Principle of DNA origami and identification of nanoclusters of membrane proteins. (a) Principle of DNA origami^[139]; (b) simulation images of random membrane proteins with gradually increased labeling density^[140]; (c) simulation images of clustered membrane proteins with gradually increased labeling density^[140]; (d) quantitative analysis of nanoclusters (duty ratio η , cluster density ρ , and their normalized curves)^[140]

息,其闪烁次数分布满足

$$f_n = f_{n-1} \otimes f_1, \quad (12)$$

$$f_1 = \frac{1}{x\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(\ln x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right], \quad (13)$$

式中: \otimes 为卷积; n 为蛋白质聚合度; x 为闪烁次数; f_1 为单倍体蛋白标记的荧光分子闪烁次数; f_n 为 n 倍体蛋白标记的荧光闪烁次数; μ 与 σ 决定函数形状,可根据需要进行适当调节。通过计算得到视野中不同聚合度的蛋白质簇所占比例。

此外,为了评估膜蛋白在膜上是否真实以簇状形式存在,2016年 Baumgart 等^[140]开发了一种通过不同密度抗体多次标记的方法来评估蛋白分布的方法。该方法不直接计算每个蛋白的荧光闪烁数,而是观察不同密度标记的膜蛋白荧光图特征的变化[图 17(b)、(c)]。该方法首先将 SMLM 数据转化为二值图,计算出蛋白簇在图像中所占的面积,再计算出簇所在区域中的闪烁次数,得到荧光簇的占空比 η 和定位密度 ρ ,并绘制二者的关系图。随着标记密度的提高,对于随机分布的膜蛋白,其归一化的簇内定位密度和荧光簇占空比 η 的比值几乎保持不变,但对于簇状分布的蛋白,其归一化的簇内定位密度和荧光簇占空比 η 的比值得到提高[图 17(d)]。该方法对总体聚集有很强的识别能力,但很难检测到稀薄的团簇或含有少量蛋白质的大团簇。Bálint 等^[141]利用该方法证明了 NKG2D 在 NK 细胞表面的团簇状分布。

9 SMLM 生物学应用

SMLM 近年来发展迅速,先后实现了多色、三维及大视野成像。较其他超分辨成像技术,SMLM 有最高的空间分辨率,在生物学领域有着广泛的应用。如利用 STORM、PALM 等 SMLM 陆续实现了对染色质、中心粒、核孔复合物、线粒体、内质网以及细胞骨架等诸多亚细胞结构的精细观察。另一方面,利用这些技术可直观、可视地获得细胞中基因组 DNA、蛋白质等重要生物大分子纳米尺度的空间分布情况和组织特性,从而对分子间的共定位关系和相互作用网络进行更加精准、全面和定量的分析。

9.1 细胞骨架等亚细胞结构 SMLM 成像

首先,SMLM 在细胞骨架超微结构解析方面有诸多关键进展。如庄小威组通过 3D-STORM 观察到 Cos7 细胞腹侧层(Ventral Layer)和背侧层(Dorsal Layer)微丝骨架网络具有不同的空间组织特性,即背侧层表现为密集且均匀的网状结构,而腹

侧层则呈现出具有较低纤维密度和高度可变组织的网状结构,相关结果扩展了人们对于细胞微丝骨架三维结构组织的认识^[64]。另外,庄小威组基于双色 STORM 首次揭示出常规显微镜无法分辨的神经元轴突上肌动蛋白-帽蛋白复合物与血影蛋白交替排布形成的间隔约为 180~190 nm 的膜相关周期性骨架结构[图 18(a)]^[121]。之后,该组阐述了这种周

期性结构的发育机制^[142],证明该结构普遍存在于多种动物的神经细胞^[143],揭示出神经元树突和胞体中存在周期性三角晶格膜骨架结构^[122]。2019年,庄小威组继续利用 STORM 观察到多种细胞膜酪氨酸激酶受体与膜相关周期性骨架结构之间的相互作用,并验证了这一相互作用对受体下游信号通路的调控机制^[144]。

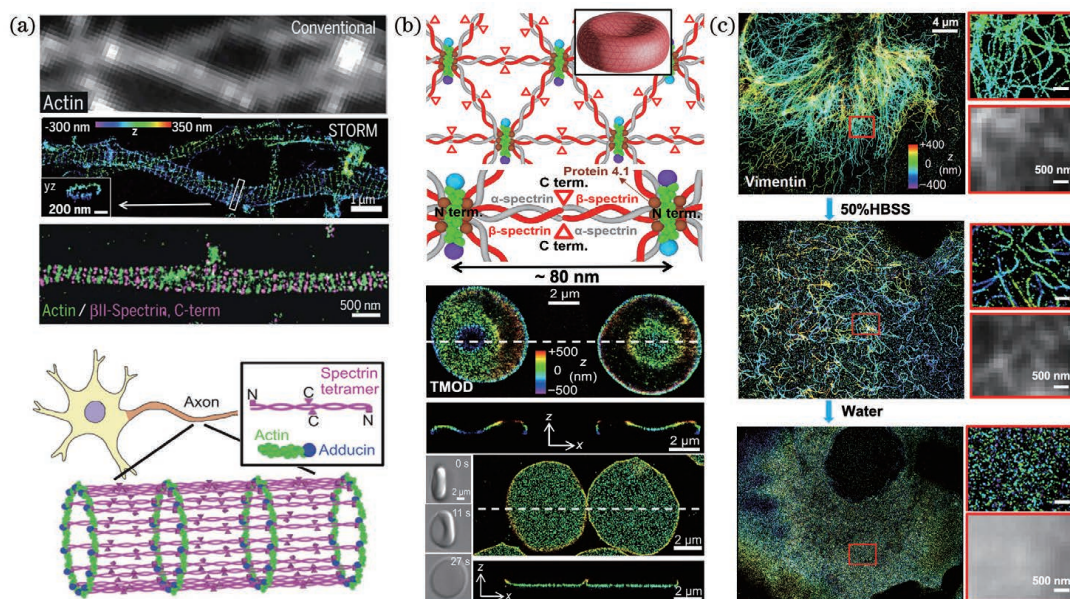


图 18 STORM 解析细胞骨架精细结构。(a)STORM 解析神经细胞轴突部位周期性膜骨架结构^[121]; (b)STORM 揭示生理条件下红细胞膜骨架组织特性^[123]; (c)STORM 揭示中间纤维骨架去组装特性^[145]

Fig. 18 Delicate cytoskeletal ultrastructures revealed by STORM. (a) Membrane-associated periodic skeleton in nerve axons revealed by STORM^[121]; (b) characteristics of membrane skeleton ultrastructure of erythrocyte under physiological conditions revealed by STORM^[123]; (c) disassembly characteristics of intermediate filaments revealed by STORM^[145]

此外,潘雷霆等^[123]运用 STORM 在近无损生理条件下对人红细胞骨架组织特性进行了新方法研究,同时引入最近距离分析、二维自相关分析和二维互相关分析数理方法,并结合理论建模,揭示出骨架核心组分血影蛋白生理状态长度约为 80 nm [图 18(b)],澄清了近 40 年人们对其生理长度的疑问,为揭示红细胞极强变形性的内在机制提供了新的物理信息支持和思考视角。之后,该组还利用 STORM 技术直观清晰地观察到低渗对 Cos7 细胞骨架三种主要成分微管、微丝、中间纤维不同的调控方式,发现中间纤维虽然被认为相对稳定,但是其在低渗刺激下反而比微管、微丝呈现更高度的动态性,可快速地进行组装和去组装[图 18(c)],相关结果揭示了中间纤维骨架网络新的组装特性和作用机理^[145]。

除了对细胞骨架精细结构的解析,SMLM 也被

应用于与细胞骨架相关的特征性黏附结构研究中。如 Kanchanawong 等^[146]基于 iPALM 成像揭示了黏着斑轴向维度的精细结构,发现肌动蛋白丝与整合素胞质结构域之间存在~40 nm 的轴向间隙[图 19(a)]。Nahidiazar 等^[147]应用多色 STORM,发现半桥粒中 $\beta 4$ 整合素是沿角蛋白丝分布而非之前所报道的在角蛋白丝下方分布,并证明了半桥粒斑块蛋白-半乳糖凝集素与 $\beta 4$ 整合素和角蛋白间同时且不对称的相互作用。Bouissou 等^[148]通过 STORM 发现踝蛋白在伪足小体环内可被拉伸,是一种机械张力敏感蛋白。

SMLM 在解析其他亚细胞结构(如具有多重对称结构的中心粒和核孔复合物)方面亦是一种有力的研究工具。其中,2013 年 Szyborska 等^[65]利用 STORM 对核孔复合物中各组分蛋白分子进行精确定位,并借助冷冻电镜的粒度平均方法重构出核孔

复合体的经典八重对称结构。2017年 Shi 等^[149]通过 STORM 成像直观可视地证明了纤毛基体中心粒的经典九重对称结构[图 19(b)]。此外,2018年 Goliand 等^[150]使用 STORM 成像解析了转运必需内体分选复合物 III(ESCRT-III)在细胞分裂过程中的结构变化,表明其通过螺旋环绕切割细胞间桥发挥作用[图 19(c)]。

9.2 膜蛋白分布 SMLM 成像

细胞上膜蛋白种类繁多、功能丰富,参与细胞识别、信号转导和物质运输等诸多重要过程,其表达、分布、组织等特性的改变都可能引发各种疾病。受限于成像分辨率,利用传统光学显微镜无法在单分子水平对膜蛋白组织分布特性进行细致研究。近年来通过各种 SMLM,越来越多的膜蛋白在细胞表面纳米尺度的组织分布特性被阐明。例如,Sengupta 等^[116]利用 PALM 探究了 Cos7 细胞中具有不同膜锚定和脂质分配特性的膜蛋白纳米尺度组织分布特性的差异,发现在外部扰动下糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定蛋白排列可发生显著变化。Sherman 等^[151]通过 PALM 研究了 T 淋巴细胞中信号分子与 T 细胞受体的结合过程,发现形成的信号复合体在细胞膜上呈现出小于衍射极限的团簇状分布特性[图 19(d)],并阐明了 T 细胞的激活是由这些纳米尺度信号簇的动态组装所驱动。Wu 等^[152]使用 STORM 观测了 E-钙黏蛋白纳米簇的大小并计算出簇中的平均分子数,揭示出 E-钙黏蛋白在黏附位点聚集的机制。Gao 等^[153]利用 STORM 揭示出 Cos7 细胞中表皮生长因子受体(EGFR)簇状结构的平均直径约为 200 nm。Lee 等^[154]基于 STORM 对神经元 AMAP 受体的分布模式进行了超分辨成像和定量分析,阐明了该受体在突触外移动但不在突触外膜中积累。王宏达组通过 STORM 成像发现葡萄糖转运受体 GLUT1 同样呈团簇状分布,通过使用环糊精等调控脂筏使得簇的平均直径由 250 nm 下降至 130~140 nm^[115]。Jayasinghe 等^[155]利用 STORM 和 PAINT 观测了心肌细胞兰尼碱(Ryanodine)受体的表达和分布,发现受体随机地组织成不规则的聚集模式[图 19(e)],留下的间隙被辅助蛋白或调节蛋白占据。之后,Shen 等^[156]运用 3D-STORM 继续揭示出心肌细胞表面及内部兰尼碱受体组织定位的新细节,清晰地给出细胞表面的受体簇的轴向分布,发现受体簇尺寸显著小于之前的 2D 成像结果,而细胞内部的受体簇则比细胞表面更大更复杂,从而形成更多的 Ca^{2+} 释放单元,产

生更加持续的钙火花。Jing 等^[157]基于 STORM 发现上皮细胞黏附分子 EpCAM 蛋白在 MCF-7 乳腺癌细胞膜上呈现出大小不一的团簇分布,团簇中含有不同数量的 EpCAM 蛋白。上述工作给出了不同的功能膜蛋白分子在空间维度组织和分布的精细信息,有助于从新的视角理解和认识膜蛋白在信号传递中的作用和机制。

9.3 经典细胞器及其相互作用 SMLM 成像

SMLM 在解析高度动态的细胞器的精细结构特性以及研究细胞器之间的相互作用网络方面也具有突出的表现。如庄小威组利用特异性作用于细胞膜、线粒体、内质网及溶酶体的光控膜探针,在 30~60 nm 的空间分辨率,1~2 s 的时间分辨率级别上,对活细胞中的各种膜结构进行 STORM 动态成像,观察到之前常规显微镜无法清晰显示的膜边界,揭示了之前无法细致观察到的线粒体融合和分裂过程及内质网再形成的形态变化^[158]。该课题组还基于 3D-STORM 揭示出线粒体与嘌呤体存在空间共定位特性[图 19(f)],并且表明包含嘌呤体的细胞数量会随线粒体的功能失调而发生改变^[159]。东南大学崔一平教授团队通过 PALM 和 STORM 对人类乳腺癌细胞外泌体膜受体进行超分辨成像,结果显示出癌细胞外泌体与正常受体细胞的溶酶体是共定位的,即癌症外泌体与受体细胞结合后会被转运至其溶酶体进行消化^[160]。此外,Georgiades 等^[161]利用 STORM 对内质网进行成像,通过图像重构后对内质网小管的长度和直径进行定量分析,发现内质网小管具有半灵活性,即大部分小管的伸缩处于平衡态,而少数小管可在分子马达驱动下发生较大的拉伸,这样的特性允许内质网在需要时迅速调整和改变结构以适应细胞活动。

9.4 染色质 SMLM 成像

近年来庄小威组利用 STORM 在单细胞染色质显微结构方面的研究进展也非常引人注目,基于高通量测序的染色质构象捕获技术(3C 和 Hi-C)已经鉴定出大量的组织特异染色质环(Loops),并发现了胚胎发育不同时期的特异染色质拓扑结构域(TADs)。但是这些研究主要是群体细胞分析的结果,未发现单细胞行为是否有所不同。单细胞 Hi-C 方法虽然揭示了染色质结构的异质性,但其分辨率不足以使研究人员在单细胞水平看到清晰的 TADs 结构。2018 年庄小威组将他们早期开发的多重抗误差校正荧光原位杂交技术(MERFISH)与 STORM 有机结合,解析了 30 kbit 分辨率下的单细

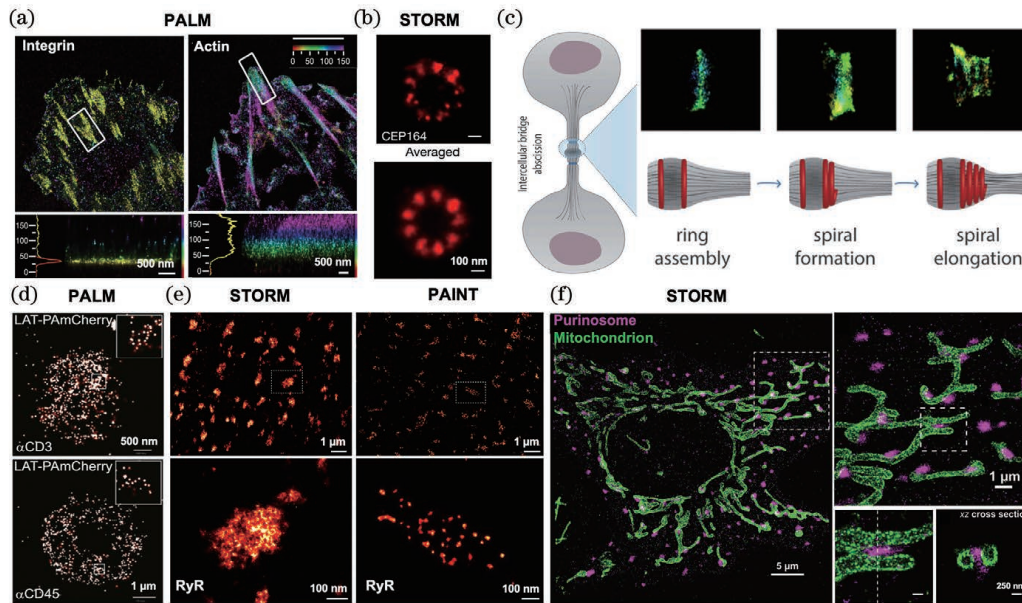


图 19 SMLM 在亚细胞结构、膜蛋白和细胞器研究中的应用。(a)PALM 揭示黏着斑轴向维度的精细结构^[146]；(b)STORM 重构出中心粒经典九重对称结构^[149]；(c)STORM 揭示在细胞分裂过程中转运必需内体分选复合物 III 螺旋环绕切割细胞间桥的结构^[150]；(d)PALM 揭示 T 细胞受体信号复合物团簇状空间组织特性^[151]；(e)STORM 和 PAINT 揭示细胞兰尼碱受体团簇状空间组织特性^[155]；(f)3D-STORM 揭示线粒体与嘌呤体的空间共定位^[159]

Fig. 19 Applications of SMLM in visualizing subcellular structures, membrane proteins, and intracellular organelles. (a) PALM maps the fine structure of focal adhesions with axial dimension^[148] ; (b) STORM reconstructs the radial ninefold symmetry of centriole-containing complex^[149] ; (c) STORM reveals the structures of the ESCRT-III complex during abscission of the intercellular bridge connecting two dividing cells^[150] ; (d) nanoscale clustering of T cell receptor-mediated signaling complexes revealed by PALM^[151] ; (e) Nanoscale clustering of ryanodine receptors revealed by STORM and PAINT^[155] ; (f) 3D-STORM reveals the colocalization of purinosomes with mitochondria^[159]

胞 TADs 结构,直接证明了类 TADs 结构域是在细胞里真实存在的物理性结构,同时也发现类 TADs 结构以及其边界在单细胞中的高度异质性^[162]。随后, Alistair 组把染色质 DNA 检测的分辨率提高到 2 kbit,通过在胚胎中上千个细胞中同时原位检测染色质三维结构和基因表达,能清晰地看到增强子与启动子的相互作用,实现高精度直接观测染色质基因表达的时空调控^[163]。

9.5 单分子扩散 SMLM 成像

近期加州大学伯克利分校的 Xiang 等^[164]借助频闪技术开发了活细胞内单分子位移成像技术 (SMdM)。运用该技术成功地实现了活细胞内游离的荧光蛋白分子自由扩散速率的超分辨成像,清晰地展示出活细胞内生物分子的扩散速率是不均匀的。进一步运用 STORM 对细胞中肌动蛋白进行成像,发现细胞骨架结构图像与前面得到的分子扩散图像完美契合,说明扩散速率慢的区域是由该处密集的细胞骨架蛋白造成的,即细胞骨架蛋白在保

持细胞形状的同时,会阻碍胞内分子的扩散 [图 20(a)]。同时,该组通过对细胞膜进行 SMdM 成像发现内质网与腹侧细胞膜接触位点处的分子扩散速率降低 [图 20(b)]^[165]。由于细胞内分子扩散是诸多重要细胞生理过程的基础,这一纳米级分子扩散速率成像方法可为人们深入了解细胞复杂的生命活动过程提供新的实验策略。

10 商业 SMLM 系统简介

SMLM 系统主要基于 TIRF 照明,通过匹配多路高功率激光、整合普通荧光显微镜实现,总体来说光学成像硬件系统相对简单。四大显微镜厂商和新兴成像公司都推出了 SMLM 成像系统,其工作原理基本类似,本文主要介绍下述三家公司产品。

德国蔡司 Elyra 7 超分辨成像系统的 SMLM 模块的横向分辨率可达 20 nm。在 3D 成像方面,系统在物镜后光瞳面上利用双相位斜坡调制点扩展函数,轴向分辨率可达 50 nm,单次 z 轴成像范围为

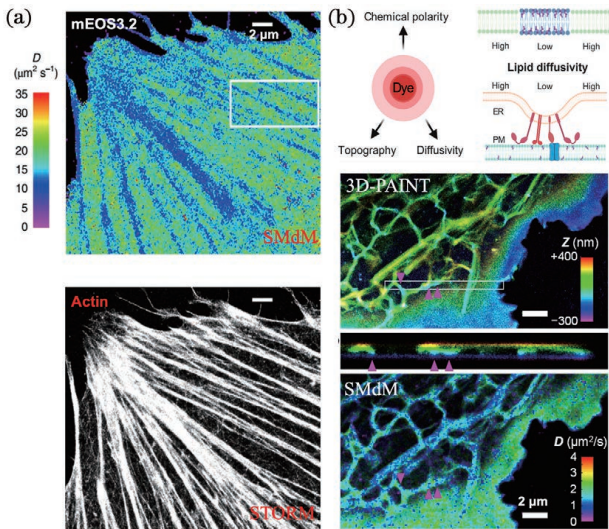


图 20 SMdM 研究活细胞中生物大分子的纳米尺度扩散速率。(a)活细胞中 mEos3.2 蛋白 SMdM 图和肌动蛋白骨架 STORM 图^[164]；(b)活细胞膜 3D-PAINT 图和 SMdM 图^[165]

Fig. 20 Study on nanoscale diffusion rate of biomolecules in live cell by SMdM. (a) SMdM diffusivity map of free mEos3.2 in the cytoplasm of a live cell and correlated STORM image of the actin cytoskeleton^[164]; (b) 3D-PAINT and SMdM images of live cell membranes^[165]

1.4 μm 。使用成像倍数为 63、数值孔径为 1.4 的物镜,成像视野可达 81 $\mu\text{m} \times 81 \mu\text{m}$ 。全软件控制 SMLM 成像,具有数据采集和分析在线处理能力。

法国 Abbelight 公司推出了模块化设计的 3D-SMLM 超分辨成像系统 SAFe360,该系统可在实验室现有的荧光显微镜基础上进行整合,兼容共聚焦、STED、SIM 等多种成像光路。其独有的 DAISY 技术整合了散光技术和超临界角光技术,可获得 x 、 y 、 z 三个方向各向同性的 15 nm 分辨率和 1.2 μm 成像厚度。该成像系统可进行实时漂移校正和四色成像。此成像系统具有全局域均匀照射模式,可实现 200 $\mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ 的大视野成像。

日本尼康公司的 N-STORM 是庄小威组 STORM 的商用版本,是“原生态”的 STORM 系统,其横向分辨率同样可达 20 nm。3D 成像采用柱透镜散光成像原理,分辨率可达 50 nm,成像厚度约为 800 nm。最新研发的 N-STORM 4.0 技术将 EMCCD 替换为 sCMOS,使成像帧频在 20 $\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ 的视野下提高到 500 frame/s,可支持快速活细胞 SMLM 成像。

各个厂家 SMLM 系统的硬件和性能指标基本

相似,使用效果好坏主要取决于其软件系统的数据分析处理能力及厂家对样品制备等的支持能力。

11 讨论与展望

评判各类成像设备或者方法好坏的本质就是看其捕获目标物时空信息的能力。时间信息捕获能力包含两方面:1)单次采集能力,即能否用极短的曝光时间获得一张图像,如 ICCD 有皮秒级门控时间;2)连续采集能力,即可否一次获得快速运动目标物的完整动态过程。空间信息捕获能力也包含两个方面:1)单次成像信息总量获取能力,即成像视场大小;2)信息细节获取能力,即成像分辨率高低。虽然人们一直追求时空信息获取能力的共同提高,但实际上由于每种成像方式工作原理的内在限制,往往只能对时间和空间信息的一种进行改善,这会存在“测不准现象”,一个指标高,另一个指标必然受影响,时空信息获取难以两全,尤其在极限成像(如超分辨)上体现得更为明显。不难看出,SMLM 的工作方式原则上要求被定位成像的分子不能“动”,否则定位的空间信息就会发生偏差,因此其在时间信息获取能力上存在先天固有缺陷。但也因为其工作原理属性,SMLM 的空间信息获取能力拥有无可比拟的优势,其相关的研究进展不断取得突破,是无可争议的空间分辨率最高的超分辨成像手段,某种意义上属于“时间换空间”的超分辨成像。此外,SMLM 的定位精度虽然达到 1 nm,但成像精度并没有同步实现。若未来把成像精度提高到 1 nm,将极大改变目前成像领域现状,可在蛋白复合物结构解析上提供光学解决方案。

SMLM 数据蕴含丰富的定量信息,数据量化分析还需进一步开发研究。首先,有机荧光探针的闪烁机制尚没有揭示清楚,针对无规则闪烁的数据分析也没有较好的解决方案,这阻碍蛋白定量分析。其次,蛋白在细胞中的分布各异,尺度在几十纳米到几百纳米不等,且可能呈现各种特殊分布形态,亟需发展多样的蛋白簇评估标准。此外,目标蛋白的三维簇分析仍处于起步阶段,迫切需要更好的分析方法填补此处洼地。

深度学习在 SMLM 上获得了较好的进展,通过神经网络建立映射关系把低分辨率图像重建成为高分辨率图像,极大地节约硬件成本。但机器学习毕竟属于软件层面的经验推理,只是对真实现象的预测,产生的结果存在一定的错误概率,这就导致其在未知现象的探测上无法给出令人信服的决定性

结论。深度学习只能是超分辨成像的一种辅助手段,更为真实可靠的结果还是应该基于硬件手段获得。

目前市场上应用较为广泛的 SMLM 为 STORM/PALM,其在双色多色成像方面存在缺陷,因为具有良好闪烁性的探针只用于红外激发波段,用于其他可见光激发波段的探针如蓝光/绿光激发尚没有更好的选择,双色通道分辨率不同,从而影响不同目标物的空间定位关系分析^[166]。此外,设备使用方面,目前国内很多高校和科研院所陆续购买了 STORM/PALM 设备,但老师学生甚至设备代理商对设备的工作原理、工作条件理解不深,样品制备流程不熟,工作经验缺乏,使得仪器使用效果欠佳,老师学生使用 SMLM 的积极性不高,亟需通过不同形式的培训研讨等方式加强 SMLM 使用教育,提高设备的使用效率和使用效果。期望本综述能为 SMLM 使用者提供有益的启发和参考,推进 SMLM 在生命科学中的有效应用。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Möckl L, Moerner W E. Super-resolution microscopy with single molecules in biology and beyond-essentials, current trends, and future challenges[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(42): 17828-17844.
- [3] Jacquemet G, Carisey A F, Hamidi H, et al. The cell biologist's guide to super-resolution microscopy [J]. *Journal of Cell Science*, 2020, 133(11): jcs240713.
- [4] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy [J]. *Optics Letters*, 1994, 19(11): 780-782.
- [5] Klar T A, Jakobs S, Dyba M, et al. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(15): 8206-8210.
- [6] Gustafsson M G. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 198(2): 82-87.
- [7] Gustafsson M G. 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [11] Sharonov A, Hochstrasser R M. Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(50): 18911-18916.
- [12] Miller H, Zhou Z K, Shepherd J, et al. Single-molecule techniques in biophysics: a review of the progress in methods and applications[J]. *Reports on Progress in Physics*, 2018, 81(2): 024601.
- [13] Li Y Z, Li C K, Hao X, et al. Review and prospect for single molecule localization microscopy[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2020, 57(24): 240002.
李雨竹, 李传康, 郝翔, 等. 基于单分子定位成像技术的研究及展望 [J]. *激光与光电子学进展*, 2020, 57(24): 240002.
- [14] 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.
- [15] Hinterdorfer P, Oijen A. Handbook of single-molecule biophysics [M]. New York: Springer, 2009: 95-127.
- [16] Sheppard C J R. Axial resolution of confocal fluorescence microscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 1989, 154(3): 237-241.
- [17] Thompson R E, Larson D R, Webb W W. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes[J]. *Biophysical Journal*, 2002, 82(5): 2775-2783.
- [18] Kay S M. Fundamentals of statistical signal processing[M]. London: Prentice Hall PTR, 1993: 83-180.
- [19] Ober R J, Ram S, Ward E S. Localization accuracy in single-molecule microscopy[J]. *Biophysical*

- Journal, 2004, 86(2): 1185-1200.
- [20] Deschout H, Zanicchi F C, Mlodzianoski M, et al. Precisely and accurately localizing single emitters in fluorescence microscopy[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(3): 253-266.
- [21] Small A, Stahlheber S. Fluorophore localization algorithms for super-resolution microscopy [J]. *Nature Methods*, 2014, 11(3): 267-279.
- [22] Abraham A V, Ram S, Chao J, et al. Quantitative study of single molecule location estimation techniques [J]. *Optics Express*, 2009, 17 (26): 23352-23373.
- [23] Holden S J, Uphoff S, Kapanidis A N. DAOSTORM: an algorithm for high-density super-resolution microscopy[J]. *Nature Methods*, 2011, 8 (4): 279-280.
- [24] Zhu L, Zhang W, Elnatan D, et al. Faster STORM using compressed sensing [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 721-723.
- [25] Cox S, Rosten E, Monypenny J, et al. Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics[J]. *Nature Methods*, 2011, 9 (2): 195-200.
- [26] Marsh R J, Pfisterer K, Bennett P, et al. Artifact-free high-density localization microscopy analysis[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(9): 689-692.
- [27] Mailfert S, Touvier J, Benyoussef L, et al. A theoretical high-density nanoscopy study leads to the design of UNLOC, a parameter-free algorithm [J]. *Biophysical Journal*, 2018, 115(3): 565-576.
- [28] Diekmann R, Kahnwald M, Schoenit A, et al. Optimizing imaging speed and excitation intensity for single-molecule localization microscopy [J]. *Nature Methods*, 2020, 17(9): 909-912.
- [29] Huang B, Wang W, Bates M, et al. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy[J]. *Science*, 2008, 319(5864): 810-813.
- [30] Bates M, Huang B, Dempsey G T, et al. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes [J]. *Science*, 2007, 317 (5845): 1749-1753.
- [31] Mennella V, Keszthelyi B, McDonald K L, et al. Subdiffraction-resolution fluorescence microscopy reveals a domain of the centrosome critical for pericentriolar material organization [J]. *Nature Cell Biology*, 2012, 14(11): 1159-1168.
- [32] McGorty R, Kamiyama D, Huang B. Active microscope stabilization in three dimensions using image correlation [J]. *Optical Nanoscopy*, 2013, 2 (1): 24380058.
- [33] Coelho S, Baek J, Graus M S, et al. Ultraprecise single-molecule localization microscopy enables in situ distance measurements in intact cells [J]. *Science Advances*, 2020, 6(16): eaay8271.
- [34] Lin W N, Jin L H, Xu Y K. Progress on single-molecule localization algorithms for super-resolution imaging [J]. *Chinese Journal of Biomedical Engineering*, 2020, 39(2): 229-237.
林婉妮, 金璐红, 许迎科. 超分辨显微成像中荧光单分子定位算法的研究进展 [J]. *中国生物医学工程学报*, 2020, 39(2): 229-237.
- [35] Sage D, Pham T A, Babcock H, et al. Super-resolution fight club: assessment of 2D and 3D single-molecule localization microscopy software [J]. *Nature Methods*, 2019, 16(5): 387-395.
- [36] Henriques R, Lelek M, Fornasiero E F, et al. QuickPALM: 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ [J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 339-340.
- [37] Ovesný M, Křížek P, Borkovec J, et al. ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30 (16): 2389-2390.
- [38] Bernhem K, Brismar H. SMLocalizer, a GPU accelerated ImageJ plugin for single molecule localization microscopy [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34 (1): 137-138.
- [39] Davis J L, Soetikno B, Song K H, et al. RainbowSTORM: an open-source ImageJ plug-in for spectroscopic single-molecule localization microscopy (sSMLM) data analysis and image reconstruction [J]. *Bioinformatics*, 2020, 36(19): 4972-4974.
- [40] Ries J. SMAP: a modular super-resolution microscopy analysis platform for SMLM data [J]. *Nature Methods*, 2020, 17(9): 870-872.
- [41] Jimenez A, Friedl K, Leterrier C. About samples, giving examples: optimized single molecule localization microscopy [J]. *Methods*, 2020, 174: 100-114.
- [42] Pereira P M, Albrecht D, Culley S, et al. Fix your membrane receptor imaging: actin cytoskeleton and CD4 membrane organization disruption by chemical fixation [J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 675.
- [43] Leyton-Puig D, Kedziora K M, Isogai T, et al. PFA fixation enables artifact-free super-resolution imaging of the actin cytoskeleton and associated proteins [J]. *Biology Open*, 2016, 5(7): 1001-1009.
- [44] Whelan D R, Bell T D M. Image artifacts in single molecule localization microscopy: why optimization of

- sample preparation protocols matters [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 7924.
- [45] Kaplan C, Ewers H. Optimized sample preparation for single-molecule localization-based superresolution microscopy in yeast [J]. Nature Protocols, 2015, 10(7): 1007-1021.
- [46] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains [J]. Nature, 1993, 363(6428): 446-448.
- [47] Keppler A, Gendreizig S, Gronemeyer T, et al. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules *in vivo* [J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(1): 86-89.
- [48] Los G V, Encell L P, McDougall M G, et al. HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis [J]. ACS Chemical Biology, 2008, 3(6): 373-382.
- [49] Virant D, Traenkle B, Maier J, et al. A peptide tag-specific nanobody enables high-quality labeling for dSTORM imaging [J]. Nature Communications, 2018, 9: 930.
- [50] Wang S, Moffitt J R, Dempsey G T, et al. Characterization and development of photoactivatable fluorescent proteins for single-molecule-based superresolution imaging [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(23): 8452-8457.
- [51] Jungmann R, Steinhauer C, Scheible M, et al. Single-molecule kinetics and super-resolution microscopy by fluorescence imaging of transient binding on DNA origami [J]. Nano Letters, 2010, 10(11): 4756-4761.
- [52] Schnitzbauer J, Strauss M T, Schlichthaerle T, et al. Super-resolution microscopy with DNA-PAINT [J]. Nature Protocols, 2017, 12(6): 1198-1228.
- [53] Auer 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.
- [54] Pan L T, Hu F, Zhang X Z, et al. Multicolor single-molecule localization super-resolution microscopy [J]. Acta Optica Sinica, 2017, 37(3): 0318010.
潘雷霆, 胡芬, 张心正, 等. 多色单分子定位超分辨显微成像术 [J]. 光学学报, 2017, 37(3): 0318010.
- [55] 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.
- [56] Heilemann M, van de Linde S, Schüttpelz M, et al. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes [J]. Angewandte Chemie, 2008, 47(33): 6172-6176.
- [57] van de Linde S, Löschberger A, Klein T, et al. Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes [J]. Nature Protocols, 2011, 6(7): 991-1009.
- [58] Bossi M, Fölling J, Belov V N, et al. Multicolor far-field fluorescence nanoscopy through isolated detection of distinct molecular species [J]. Nano Letters, 2008, 8(8): 2463-2468.
- [59] Tam J, Cordier G A, Borbely J S, et al. Cross-talk-free multi-color STORM imaging using a single fluorophore [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101772.
- [60] 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.
- [61] Zhang Z Y, Kenny S J, Hauser M, et al. Ultrahigh-throughput single-molecule spectroscopy and spectrally resolved super-resolution microscopy [J]. Nature Methods, 2015, 12(10): 935-938.
- [62] Dong B Q, Almassalha L, Urban B E, et al. Super-resolution spectroscopic microscopy via photon localization [J]. Nature Communications, 2016, 7: 12290.
- [63] Shechtman Y, Weiss L E, Backer A S, et al. Multicolour localization microscopy by point-spread-function engineering [J]. Nature Photonics, 2016, 10(9): 590-594.
- [64] 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.
- [65] Szymborska A, de Marco A, Daigle N, et al. Nuclear pore scaffold structure analyzed by super-resolution microscopy and particle averaging [J]. Science, 2013, 341(6146): 655-658.
- [66] 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.
- [67] 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.
- [68] Chen F, Tillberg P W, Boyden E S. Expansion microscopy [J]. Science, 2015, 347(6221): 543-548.
- [69] Zwettler F U, Reinhard S, Gambarotto D, et al. Molecular resolution imaging by post-labeling expansion single-molecule localization microscopy (Ex-SMLM) [J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 3388.

- [70] 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 of the United States of America, 2009, 106(9): 2995-2999.
- [71] Shtengel G, Galbraith J A, Galbraith C G, et al. Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(9): 3125-3130.
- [72] Li Y M, Mund M, Hoess P, et al. Real-time 3D single-molecule localization using experimental point spread functions[J]. Nature Methods, 2018, 15(5): 367-369.
- [73] Gu L S, Li Y Y, Zhang S W, et al. Molecular-scale axial localization by repetitive optical selective exposure[J]. Nature Methods, 2021, 18(4): 369-373.
- [74] Ma H Q, Liu Y. Super-resolution localization microscopy: toward high throughput, high quality, and low cost [J]. APL Photonics, 2020, 5(6): 060902.
- [75] Douglass K M, Sieben C, Archetti A, et al. Super-resolution imaging of multiple cells by optimized flat-field epi-illumination[J]. Nature Photonics, 2016, 10(11): 705-708.
- [76] Zhao Z Y, Xin B, Li L C, et al. High-power homogeneous illumination for super-resolution localization microscopy with large field-of-view [J]. Optics Express, 2017, 25(12): 13382-13395.
- [77] Diekmann R, Helle Ø I, Øie C I, et al. Chip-based wide field-of-view nanoscopy[J]. Nature Photonics, 2017, 11(5): 322-328.
- [78] Helle Ø I, Coucheron D A, Tinguely J C, et al. Nanoscopy on-a-chip: super-resolution imaging on the millimeter scale[J]. Optics Express, 2019, 27(5): 6700-6710.
- [79] Archetti A, Glushkov E, Sieben C, et al. Waveguide-PAINT offers an open platform for large field-of-view super-resolution imaging [J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1267.
- [80] Li L C, Xin B, Kuang W B, et al. Divide and conquer: real-time maximum likelihood fitting of multiple emitters for super-resolution localization microscopy [J]. Optics Express, 2019, 27(15): 21029-21049.
- [81] 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.
- [82] Burke D, Patton B, Huang F, et al. Adaptive optics correction of specimen-induced aberrations in single-molecule switching microscopy [J]. Optica, 2015, 2(2): 177-185.
- [83] Huang F, Sirinakis G, Allgeyer E S, et al. Ultra-high resolution 3D imaging of whole cells [J]. Cell, 2016, 166(4): 1028-1040.
- [84] Mlodzianowski M J, Cheng-Hathaway P J, Bemiller S M, et al. Active PSF shaping and adaptive optics enable volumetric localization microscopy through brain sections [J]. Nature Methods, 2018, 15(8): 583-586.
- [85] Kim J, Wojcik M, Wang Y, et al. Oblique-plane single-molecule localization microscopy for tissues and small intact animals [J]. Nature Methods, 2019, 16(9): 853-857.
- [86] Xu F, Ma D H, MacPherson K P, et al. Three-dimensional nanoscopy of whole cells and tissues with *in situ* point spread function retrieval [J]. Nature Methods, 2020, 17(5): 531-540.
- [87] Huisken J, Swoger J, del Bene F, et al. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy [J]. Science, 2004, 305(5686): 1007-1009.
- [88] Crossman D J, Hou Y F, Jayasinghe I, et al. Combining confocal and single molecule localisation microscopy: a correlative approach to multi-scale tissue imaging [J]. Methods, 2015, 88: 98-108.
- [89] 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.
- [90] Moon S, Yan R, Kenny S J, et al. Spectrally resolved, functional super-resolution microscopy reveals nanoscale compositional heterogeneity in live-cell membranes [J]. Journal of the American Chemical Society, 2017, 139(32): 10944-10947.
- [91] Xiang L M, Wojcik M, Kenny S J, et al. Optical characterization of surface adlayers and their compositional demixing at the nanoscale [J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 1435.
- [92] Hauser M, Wojcik M, Kim D, et al. Correlative super-resolution microscopy: new dimensions and new opportunities [J]. Chemical Reviews, 2017, 117(11): 7428-7456.
- [93] Watanabe S, Punge A, Hloppeter G, et al. Protein localization in electron micrographs using fluorescence nanoscopy [J]. Nature Methods, 2011, 8(1): 80-84.
- [94] Kopeck B G, Shtengel G, Xu C S, et al. Correlative 3D superresolution fluorescence and electron microscopy reveal the relationship of mitochondrial

- nucleoids to membranes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(16): 6136-6141.
- [95] Suleiman H, Zhang L, Roth R, et al. Nanoscale protein architecture of the kidney glomerular basement membrane[J]. *eLife*, 2013, 2: e01149.
- [96] Kim D, Deerinck T J, Sigal Y M, et al. Correlative stochastic optical reconstruction microscopy and electron microscopy[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124581.
- [97] Wojcik M, Hauser M, Li W, et al. Graphene-enabled electron microscopy and correlated super-resolution microscopy of wet cells [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7384.
- [98] Hoffman D P, Shtengel G, Xu C S, et al. Correlative three-dimensional super-resolution and block face electron microscopy of whole vitreously frozen cells [J]. *Science*, 2020, 367(6475): eaaz5357.
- [99] Duim W C, Chen B, Frydman J, et al. Sub-diffraction imaging of huntingtin protein aggregates by fluorescence blink-microscopy and atomic force microscopy [J]. *Chemphyschem*, 2011, 12(13): 2387-2390.
- [100] Odermatt P D, Shivanandan A, Deschout H, et al. High-resolution correlative microscopy: bridging the gap between single molecule localization microscopy and atomic force microscopy [J]. *Nano Letters*, 2015, 15(8): 4896-4904.
- [101] Zhou L L, Gao J, Wang H L, et al. Correlative dual-color dSTORM/AFM reveals protein clusters at the cytoplasmic side of human bronchial epithelium membranes[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(18): 9950-9957.
- [102] Dong C, Loy C C, He K M, et al. Image super-resolution using deep convolutional networks [J]. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 2016, 38(2): 295-307.
- [103] Ouyang W, Aristov A, Lelek M, et al. Deep learning massively accelerates super-resolution localization microscopy [J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(5): 460-468.
- [104] 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.
- [105] Hershko E, Weiss L E, Michaeli T, et al. Multicolor localization microscopy and point-spread-function engineering by deep learning [J]. *Optics Express*, 2019, 27(5): 6158-6183.
- [106] Kim T, Moon S, Xu K. Information-rich localization microscopy through machine learning [J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1996.
- [107] Nehme E, Freedman D, Gordon R, et al. DeepSTORM3D: dense 3D localization microscopy and PSF design by deep learning [J]. *Nature Methods*, 2020, 17(7): 734-740.
- [108] Khater I M, Nabi I R, Hamarneh G. A review of super-resolution single-molecule localization microscopy cluster analysis and quantification methods [J]. *Patterns*, 2020, 1(3): 100038.
- [109] Ripley B D. Modelling spatial patterns[J]. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 1977, 39(2): 172-192.
- [110] Kiskowski M A, Hancock J F, Kenworthy A K. On the use of Ripley's K-function and its derivatives to analyze domain size [J]. *Biophysical Journal*, 2009, 97(4): 1095-1103.
- [111] Besag J. Discussion on Dr Ripley's paper[J]. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 1977, 39(2): 192-212.
- [112] Ehrlich M, Boll W, van Oijen A, et al. Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits[J]. *Cell*, 2004, 118(5): 591-605.
- [113] Burgert A, Schlegel J, Bécam J, et al. Characterization of plasma membrane ceramides by super-resolution microscopy [J]. *Angewandte Chemie*, 2017, 56(22): 6131-6135.
- [114] Lopes F B, Bálint Š, Valvo S, et al. Membrane nanoclusters of FcγRI segregate from inhibitory SIRPα upon activation of human macrophages [J]. *Journal of Cell Biology*, 2017, 216(4): 1123-1141.
- [115] Yan Q, Lu Y, Zhou L, et al. Mechanistic insights into GLUT1 activation and clustering revealed by super-resolution imaging [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(27): 7033-7038.
- [116] Sengupta P, Jovanovic-Talisman T, Skoko D, et al. Probing protein heterogeneity in the plasma membrane using PALM and pair correlation analysis [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(11): 969-975.
- [117] Sengupta P, Jovanovic-Talisman T, Lippincott-Schwartz J. Quantifying spatial organization in point-localization superresolution images using pair correlation analysis [J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(2): 345-354.
- [118] Dixon P M. Ripley's K function [M]. Singapore: John Wiley & Sons Inc, 2014.
- [119] Wang F, Liu Y H, Zhang T, et al. Aging-associated changes in CD47 arrangement and interaction with thrombospondin-1 on red blood cells visualized by super-resolution imaging [J]. *Aging Cell*, 2020, 19(10): e13224.
- [120] Rey-Suarez I, Wheatley B A, Koo P, et al. WASP

- family proteins regulate the mobility of the B cell receptor during signaling activation [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 439.
- [121] Xu K, Zhong G S, Zhuang X W. Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons [J]. *Science*, 2013, 339(6118): 452-456.
- [122] 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.
- [123] 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.
- [124] Rubin-Delanchy P, Burn G L, Griffié J, et al. Bayesian cluster identification in single-molecule localization microscopy data [J]. *Nature Methods*, 2015, 12(11): 1072-1076.
- [125] Griffié J, Shlomovich L, Williamson D J, et al. 3D Bayesian cluster analysis of super-resolution data reveals LAT recruitment to the T cell synapse [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 4077.
- [126] Ester M, Kriegel H P, Sander J, et al. A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise [C]//*Proceedings of the Second International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining*, August 2, 1996, Virginia, USA. Virginia: AIAA Press, 1996, 96(34): 226-231.
- [127] Dunster J L, Unsworth A J, Bye A P, et al. Interspecies differences in protein expression do not impact the spatiotemporal regulation of glycoprotein VI mediated activation [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2020, 18(2): 485-496.
- [128] Mazouchi A, Milstein J N. Fastoptimized cluster algorithm for localizations (FOCAL): a spatial cluster analysis for super-resolved microscopy [J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(5): 747-754.
- [129] Nino D F, Djayakarsana D, Milstein J N. FOCAL3D: a 3-dimensional clustering package for single-molecule localization microscopy [J]. *PLoS Computational Biology*, 2020, 16(12): e1008479.
- [130] Aurenhammer F. Voronoi diagrams: a survey of a fundamental geometric data structure [J]. *ACM Computing Surveys*, 1991, 23(3): 345-405.
- [131] Levet F, Hosy E, Kechkar A, et al. SR-Tesseler: a method to segment and quantify localization-based super-resolution microscopy data [J]. *Nature Methods*, 2015, 12(11): 1065-1071.
- [132] Platre M P, Bayle V, Armengot L, et al. Developmental control of plant Rho GTPase nano-organization by the lipid phosphatidylserine [J]. *Science*, 2019, 364(6435): 57-62.
- [133] Wei M, Fan X Y, Ding M, et al. Nuclear actin regulates inducible transcription by enhancing RNA polymerase II clustering [J]. *Science Advances*, 2020, 6(16): eaay6515.
- [134] Levet F, Julien G, Galland R, et al. A tessellation-based colocalization analysis approach for single-molecule localization microscopy [J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 2379.
- [135] Golfetto O, Wakefield D L, Cacao E E, et al. A platform to enhance quantitative single molecule localization microscopy [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(40): 12785-12797.
- [136] Annibale P, Vanni S, Scarselli M, et al. Identification of clustering artifacts in photoactivated localization microscopy [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(7): 527-528.
- [137] Lee S H, Shin J Y, Lee A, et al. Counting single photoactivatable fluorescent molecules by photoactivated localization microscopy (PALM) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(43): 17436-17441.
- [138] Puchner E M, Walter J M, Kasper R, et al. Counting molecules in single organelles with superresolution microscopy allows tracking of the endosome maturation trajectory [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(40): 16015-16020.
- [139] Zanicchi F C, Manzo C, Alvarez A S, et al. A DNA origami platform for quantifying protein copy number in super-resolution [J]. *Nature Methods*, 2017, 14(8): 789-792.
- [140] Baumgart F, Arnold A M, Leskovar K, et al. Varying label density allows artifact-free analysis of membrane-protein nanoclusters [J]. *Nature Methods*, 2016, 13(8): 661-664.
- [141] Bálint Š, Lopes F B, Davis D M. A nanoscale reorganization of the IL-15 receptor is triggered by NKG2D in a ligand-dependent manner [J]. *Science Signaling*, 2018, 11(525): eaal3606.
- [142] Zhong G, He J, Zhou R, et al. Developmental mechanism of the periodic membrane skeleton in axons [J]. *eLife*, 2014, 3: e04581.
- [143] He J, Zhou R B, Wu Z H, et al. Prevalent presence of periodic actin-spectrin-based membrane skeleton in a broad range of neuronal cell types and animal species [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113

- (21): 6029-6034.
- [144] Zhou R B, Han B R, Xia C L, et al. Membrane-associated periodic skeleton is a signaling platform for RTK transactivation in neurons[J]. *Science*, 2019, 365(6456): 929-934.
- [145] Pan L T, Zhang P, Hu F, et al. Hypotonic stress induces fast, reversible degradation of the vimentin cytoskeleton via intracellular calcium release [J]. *Advanced Science*, 2019, 6(18): 1900865.
- [146] Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera A M, et al. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions [J]. *Nature*, 2010, 468(7323): 580-584.
- [147] Nahidiazar L, Krefl M, van den Broek B, et al. The molecular architecture of hemidesmosomes, as revealed with super-resolution microscopy[J]. *Journal of Cell Science*, 2015, 128(20): 3714-3719.
- [148] Bouissou A, Proag A, Bourg N, et al. Podosome force generation machinery: a local balance between protrusion at the core and traction at the ring [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(4): 4028-4040.
- [149] Shi X Y, Garcia G, van de Weghe J C, et al. Super-resolution microscopy reveals that disruption of ciliary transition-zone architecture causes Joubert syndrome[J]. *Nature Cell Biology*, 2017, 19(10): 1178-1188.
- [150] Goliand I, Adar-Levor S, Segal I, et al. Resolving ESCRT-III spirals at the intercellular bridge of dividing cells using 3D STORM [J]. *Cell Reports*, 2018, 24(7): 1756-1764.
- [151] Sherman E, Barr V, Manley S, et al. Functional nanoscale organization of signaling molecules downstream of the T cell antigen receptor [J]. *Immunity*, 2011, 35(5): 705-720.
- [152] Wu Y, Kanchanawong P, Zaidel-Bar R. Actin-delimited adhesion-independent clustering of E-cadherin forms the nanoscale building blocks of adherens junctions[J]. *Developmental Cell*, 2015, 32(2): 139-154.
- [153] Gao J, Wang Y, Cai M, et al. Mechanistic insights into EGFR membrane clustering revealed by super-resolution imaging [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(6): 2511-2519.
- [154] Lee S H, Jin C, Cai E, et al. Super-resolution imaging of synaptic and extra-synaptic AMPA receptors with different-sized fluorescent probes[J]. *eLife*, 2017, 6: e27744.
- [155] Jayasinghe I, Clowsley A H, Lin R, et al. True molecular scale visualization of variable clustering properties of ryanodine receptors[J]. *Cell Reports*, 2018, 22(2): 557-567.
- [156] Shen X, van den Brink J, Hou Y, et al. 3D dSTORM imaging reveals novel detail of ryanodine receptor localization in rat cardiac myocytes[J]. *The Journal of Physiology*, 2019, 597(2): 399-418.
- [157] Jing Y, Zhou L, Chen J, et al. Quantitatively mapping the assembly pattern of EpCAM on cell membranes with peptide probes [J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(2): 1865-1873.
- [158] Shim S H, Xia C, Zhong G, et al. Super-resolution fluorescence imaging of organelles in live cells with photoswitchable membrane probes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(35): 13978-13983.
- [159] French J B, Jones S A, Deng H, et al. Spatial colocalization and functional link of purinosomes with mitochondria[J]. *Science*, 2016, 351(6274): 733-737.
- [160] Chen C, Zong S F, Wang Z Y, et al. Imaging and intracellular tracking of cancer-derived exosomes using single-molecule localization-based super-resolution microscope[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(39): 25825-25833.
- [161] Georgiades P, Allan V J, Wright G D, et al. The flexibility and dynamics of the tubules in the endoplasmic reticulum[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 16474.
- [162] 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.
- [163] Mateo L J, Murphy S E, Hafner A, et al. Visualizing DNA folding and RNA in embryos at single-cell resolution[J]. *Nature*, 2019, 568(7750): 49-54.
- [164] Xiang L M, Chen K, Yan R, et al. Single-molecule displacement mapping unveils nanoscale heterogeneities in intracellular diffusivity[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(5): 524-530.
- [165] Yan R, Chen K, Xu K. Probing nanoscale diffusional heterogeneities in cellular membranes through multidimensional single-molecule and super-resolution microscopy[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(44): 18866-18873.
- [166] Li H L, Vaughan J C. Switchable fluorophores for single-molecule localization microscopy[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(18): 9412-9454.