

三维超分辨显微成像技术的研究进展及展望

王潇^{1†}, 涂世杰^{1†}, 刘鑫¹, 赵悦晗¹, 匡翠方^{1,2,3}, 刘旭^{1,3}, 郝翔^{1*}

¹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;

²浙江大学宁波技术研究所, 浙江 宁波 315100;

³之江实验室, 浙江 杭州 311121

摘要 超分辨显微成像技术是细胞生物学中研究细胞器结构、相互作用和蛋白质功能的强大工具, 其具有突破光学衍射极限的分辨能力, 从纳米尺度上为细胞生物学提供了新的分析手段, 对生命科学相关领域具有重大意义。然而, 受衍射极限的影响, 超分辨显微镜的轴向分辨率相比于横向分辨率要更难以提高, 这导致实现细胞结构亚百纳米分辨率的三维成像更为困难。从受激辐射损耗显微术和单分子定位显微术这两种主流技术出发, 对目前存在的多种三维成像技术进行了原理介绍和特点分析, 最后对其未来发展方向进行了展望。

关键词 显微; 荧光成像; 超分辨显微; 三维成像; 受激辐射损耗显微术; 单分子定位显微术

中图分类号 O436

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202158.2200001

Advance and Prospect for Three-Dimensional Super-Resolution Microscopy

Wang Xiao^{1†}, Tu Shijie^{1†}, Liu Xin¹, Zhao Yuehan¹, Kuang Cuifang^{1,2,3}, Liu Xu^{1,3}, Hao Xiang^{1*}

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

²Ningbo Research Institute, Zhejiang University, Ningbo, Zhejiang 315100, China;

³Zhejiang Lab, Hangzhou, Zhejiang 311121, China

Abstract Super-resolution microscopy techniques are versatile and powerful tools for visualizing organelle structures, interactions, and protein functions in biomedical research, and its resolution ability to break the optical diffraction limit provides new analytical frameworks for cell biology on the nanoscale, which is indispensable to life science related fields. However, due to the effect of the diffraction limit, the axial resolution of a super-resolution microscope is more arduous to improve than the lateral resolution, which hinders the realization of sub-hundred-nanometer resolution three-dimensional imaging of cellular structures. Therefore, based on the two main techniques, stimulated emission depletion microscopy and single-molecule localization microscopy, the present paper introduces the principles and characteristics of a variety of existing three-dimensional imaging techniques, and finally discusses the future of that. Finally, we briefly discuss the research trend of the two techniques in the three-dimensional imaging area.

Key words microscopy; fluorescence imaging; super-resolution microscopy; three-dimensional imaging; stimulated emission depletion microscopy; single-molecule localization microscopy

收稿日期: 2021-05-28; 修回日期: 2021-06-18; 录用日期: 2021-06-26

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0701400)、中央高校基本科研业务费专项资金(2019QNA5006)、之江实验室(2020MC0AE01)

通信作者: *haox@zju.edu.cn

† 共同第一作者

OCIS codes 180.2520; 180.6900

1 引言

众所周知,大多数细胞结构本质上都是三维的,传统光学显微成像技术能够清晰分辨出三维亚细胞结构,这对细胞生物学研究来说是必不可少的。然而由于阿贝衍射极限^[1]的存在,传统光学显微镜的分辨率受到了限制,其横向和轴向分辨率分别为

$$d_{xy} = \frac{\lambda}{2NA}, d_z = \frac{2\lambda}{NA^2}, \quad (1)$$

式中: d_{xy} 和 d_z 分别为显微镜的横向和轴向分辨率; λ 为光的波长; NA 为显微物镜的数值孔径。由此可知:在可见光波段,传统光学显微镜的横向分辨率仅为200~300 nm,轴向分辨率为横向分辨率的1/3~1/2,只能达到500~800 nm。显然,这两个尺寸都远大于许多亚细胞结构^[2-4]。

于是,科学家们基于物理和化学方法提出了许多突破光学衍射极限的显微成像技术。在众多技术中,基于荧光标记的超分辨显微成像技术将横向分辨率和轴向分辨率分别提高了至少10倍和6倍,一跃成为当下的研究热点。荧光显微成像技术都是通过荧光团的亮态(on state)和暗态(off state),按时间顺序记录其亚衍射极限特性,并且荧光分子处于亮态或暗态的概率与激发光强呈非线性相关。通过对荧光团进行坐标定向或者随机时间开关处理,荧光显微镜就能够在亚衍射极限范围内清晰地分辨出荧光标记的细胞结构,实现了从传统光学显微镜到超分辨光学显微镜的转变。通过此原理,科学家们也首次通过荧光显微镜进行了许多基本的生物学研究^[5]。

目前,超分辨显微成像主要分为三种技术^[6-8]。第一种技术以受激辐射损耗(STED)显微术为代表。STED采用两束激光,一束用于激发荧光分子产生荧光,另一束中心光强为零的环形损耗光用于损耗荧光并将发光区域限制在衍射极限以下,于是通过点扫描的方式即可实现超分辨成像。第二种技术以单分子定位显微术(SMLM)为主,其代表性技术有光激活定位显微镜(PALM)和随机光学重构显微镜(STORM)。SMLM通过使用激活光和激发光控制成像区域中每次成像时仅有少量、随机、离散的荧光分子发光,再通过高斯拟合得到每个荧光分子高精度的空间定位,最后将所有图片进行叠加,形成一幅超分辨图像。第三种技术是结构光照明显微术

(SIM)。SIM通过使用具有空间结构的光束将空间高频成分编码到荧光图像,再通过图像算法解码重构出超分辨图像。

理论上,SIM的分辨率极限为传统光学显微术的两倍^[9],而STED技术和SMLM的分辨率没有限制,因此本文将围绕后两种技术,对目前存在的多种三维成像技术进行原理介绍,并从分辨率、成像深度、光子利用效率以及系统复杂度等方面对各种方法进行分析。最后对三维成像技术的未来发展方向进行了展望,旨在帮助科研人员选择适当的三维成像技术并对未来三维成像技术的发展方向提供新的参考。

2 受激辐射损耗显微镜的三维成像技术研究进展

在受激辐射损耗显微成像中,中心光强为零的环形暗斑可以用来提高横向分辨率,但由于轴向上并不能损耗荧光,轴向分辨率并未得到提升。此外,由于像差的存在,成像的深度也受限。因此,在三维成像中,提高轴向分辨率、增大成像深度、实现具有各向同性三维分辨率的深度成像至关重要。

2.1 三维分辨率

根据STED的成像原理,要想提升显微成像系统的三维空间分辨率,实现样品的三维超分辨成像,关键是要让损耗光在样品焦平面处聚焦成一个三维中空暗斑,只有暗斑中心所在位置可以发出荧光,其他位置的荧光都被损耗了。要想实现这一点,目前的技术主要有基于单物镜架构的3D-STED和基于双物镜架构的isoSTED。

基于单物镜架构的3D-STED的技术关键是对损耗光加载 $0/\pi$ 环形相位(也叫作“Top-hat”相位),这种相位分布可以让损耗光经过物镜聚焦成具有焦面中心强度最小、焦面上下强度最大分布的三维暗斑^[10]。在这种架构(z-STED)下,基于单物镜架构的3D-STED技术相比于共聚焦显微成像技术,可以获得轴向6倍和横向2倍的分辨率提升,即获得90~110 nm的近乎各向同性的三维分辨率。为了进一步增大横向的损耗、提升横向分辨率,可以通过再引入一路损耗光加载传统的 $0\sim 2\pi$ 涡旋相位,产生一个横向分布的“甜甜圈”形状的环形暗斑,最终将两个暗斑在焦面进行非相干强度叠加,得到横向43 nm和轴向125 nm的分辨率^[11]。如图1(a)所

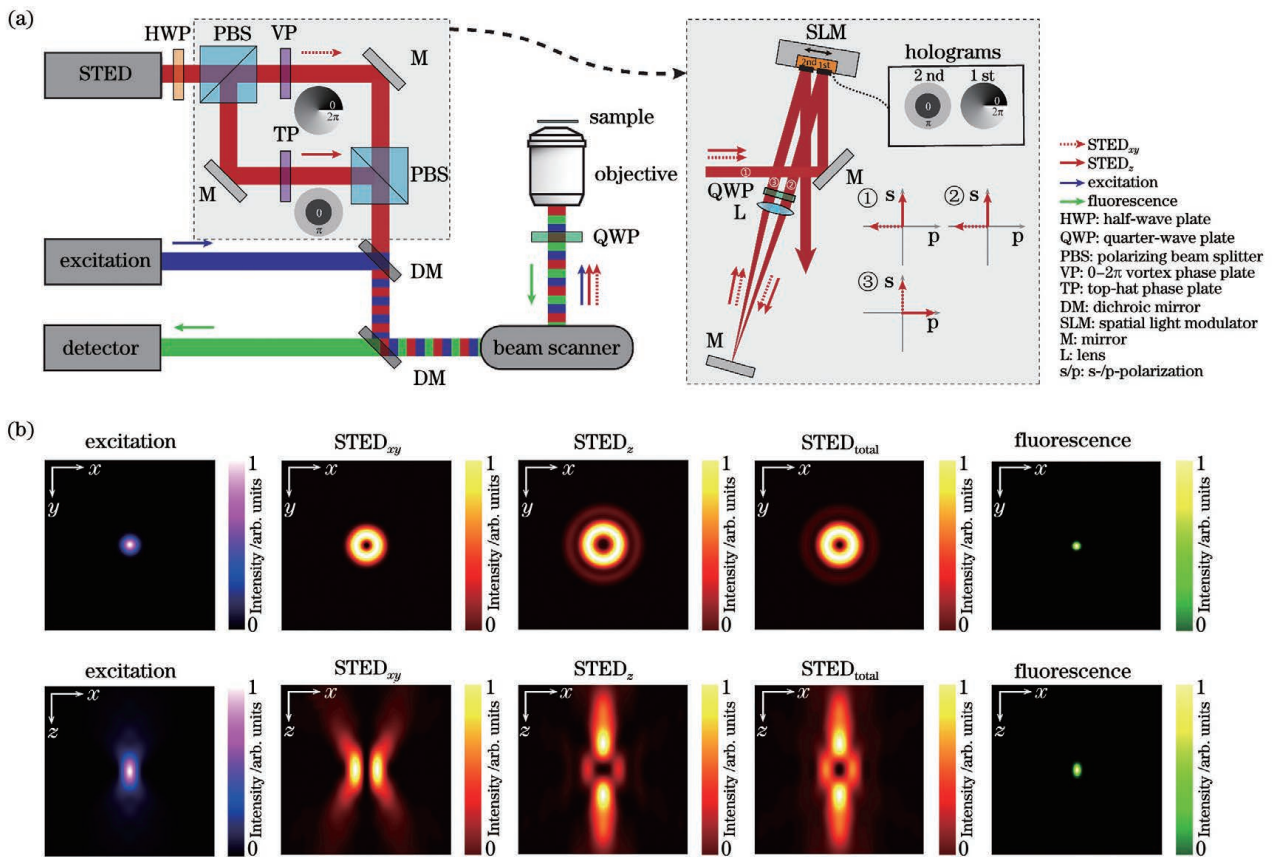


图1 基于单物镜架构的3D-STED纳米显微技术原理图。(a)光学装置简化示意图;(b)PSF结果

Fig. 1 Principle for 3D-STED nanoscopy based on a single-objective geometry. (a) Simplified schematic of the optical setup; (b) results of PSF

示,损耗光经过偏振分束器后分为水平偏振光 $STED_{xy}$ 和垂直偏振光 $STED_z$, 分别加载 $0 \sim 2\pi$ 涡旋相位板和 $0/\pi$ 环形相位板,二者随后经过偏振分束器合束,接着与激发光通过二色镜合束,最终经过光束扫描组件和 $1/4$ 波片一起进入物镜。值得注意的是,为了保证两束损耗光的非相干性并形成高质量的三维暗斑,两束损耗光脉冲在时间上有一定的延迟。

除了可以使用相位板对损耗光进行波前调制,也可以利用空间光调制器(SLM)对其进行波前调制^[12-13]。相位型的液晶空间光调制器往往只能对一种偏振光进行调制,这种偏振光的偏振方向与液晶取向一致。图1(a)展示了这样的一种架构:空间光调制器只对水平偏振光进行调制,其加载的第一个全息图是 $0 \sim 2\pi$ 涡旋相位,相位的第二个全息图是 $0/\pi$ 环形相位;水平偏振光 $STED_{xy}$ 和垂直偏振光 $STED_z$ 经 SLM 第一个全息图的调制后,只有损耗光 $STED_{xy}$ 受到调制;两束损耗光随后依次经过 $1/4$ 波片、透镜,再经反射镜原路返回经过透镜、 $1/4$ 波片,此时原来的垂直偏振光 $STED_z$ 已经变成水

平偏振光,受到 SLM 第二个全息图的调制,而原来的水平偏振光 $STED_{xy}$ 已经变成垂直偏振光,不再被 SLM 调制。通过调节两束损耗光的光强比,可以分别调节横向和纵向的损耗能力,最终可以得到不同形状的荧光点扩展函数(PSF)^[13]。图1(b)展示了3D-STED技术中激发光、损耗光和荧光PSF在 xy 和 xz 平面的强度分布。值得注意的是,SLM的表面要和物镜后焦面光学共轭。此外,利用SLM还可以很方便地对暗斑的形状及位置进行控制,例如:可以通过泽尼克系数对损耗光波前进行补偿,达到像差校正的目的^[12];可以随时切换到二维STED模式^[14](两个全息图都加载 $0 \sim 2\pi$ 涡旋相位);可以调节全息图的大小以及环形相位的直径以匹配不同的物镜^[15];可以通过加载光栅相位实现和激发光的自动对准^[16]。

基于双物镜架构的 isoSTED 的技术关键是损耗光通过两个对置物镜在样品面发生干涉而形成暗斑。采用两个对置物镜的4Pi显微镜,对荧光样品进行双向激发和双向探测,等效于在轴向上增大了物镜的孔径(得到近乎 4π 的空间立体角),这样可以

减小 PSF 的轴向大小,极大地提升轴向分辨率^[17]。2002年,研究人员首次将 STED 与 4Pi 技术相结合,获得了 33 nm 的轴向分辨率^[18]。在这种被称为“STED-4Pi”的显微镜中,通过对 STED 光引入像差来消除聚焦暗斑除中心以外的其他极小值,从而消除荧光 PSF 沿轴向分布的旁瓣。进一步地,2008年研究人员提出的 isoSTED 技术可以在此架构下提升横向分辨率,得到 40~45 nm 的各向同性分辨率^[19]。isoSTED 的光学装置简化示意图如图 2(a)所示,一束损耗光 $STED_{xy}$ 通过 $0\sim 2\pi$ 涡旋相位板后经偏振分束器分为两路,二者分别进入两个对置物镜,在样品面发生相长干涉,形成一个横向分布的暗斑,产生横向上的荧光损耗。另一束损耗光 $STED_z$ 经偏振分束器后分为两路,二者分别进入两

个对置物镜,在样品面发生相消干涉,形成一个纵向分布的暗斑,产生纵向上的荧光损耗。最终,这两个暗斑在样品面进行非相干强度叠加,生成一个三维中空暗斑,如图 2(b)所示。通过调节 $STED_{xy}$ 和 $STED_z$ 的光强比,最终可以得到一个近乎球形的荧光 PSF。值得注意的是,为了避免这两个暗斑在样品面相互干涉、影响三维中空暗斑质量, $STED_{xy}$ 和 $STED_z$ 这两束损耗光通常由两台激光器分别产生;此外,最终生成的三维中空暗斑在焦面上下有零值暗斑,使得此处的荧光不会被损耗掉,最终荧光 PSF 在焦面上下会有两个旁瓣,形成伪像,这个旁瓣可以在后期通过线性或非线性反卷积算法消除;另外,由于像差随着深度的增加而增大,该技术只能成像深度在 $1\ \mu\text{m}$ 以内的样品。

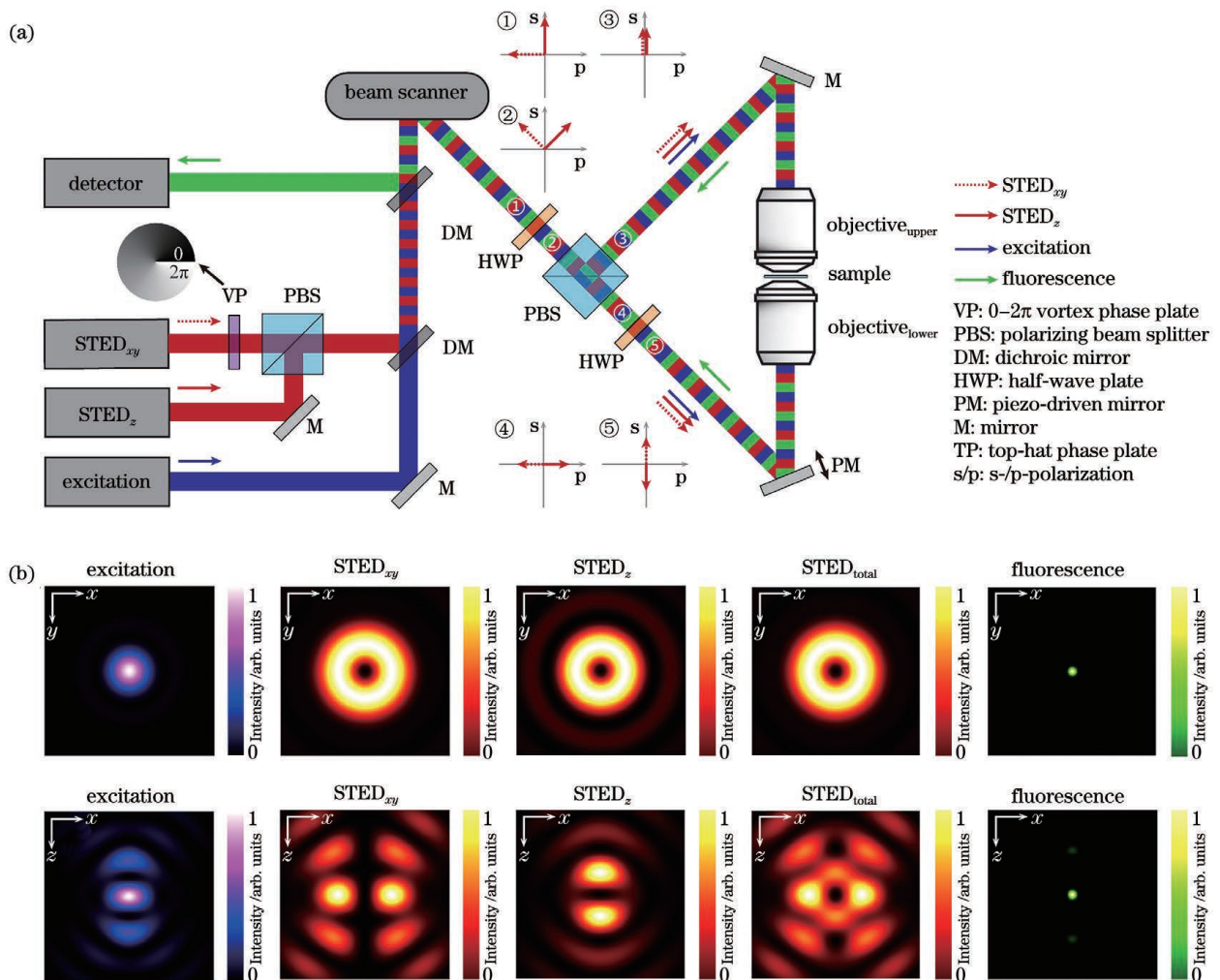


图 2 基于双物镜架构的 isoSTED 纳米显微技术原理图。(a)光学装置简化示意图;(b)PSF 结果

Fig. 2 Principle of isoSTED nanoscopy based on a dual-objective geometry. (a) Simplified schematic of the optical setup; (b) results of PSF

2020年, Hao 等^[20]将自适应光学技术用于 isoSTED 系统(AO isoSTED),以三维亚 50 nm 的

分辨率对全细胞和组织样品进行成像。AO isoSTED 技术和 2008 年研究人员提出的 isoSTED

技术相比,有如下三方面的改进:1) $STED_{xy}$ 和 $STED_z$ 来自同一台激光器的不同偏振成分,并采用迈克耳孙干涉仪装置对两束光进行脉冲延迟以破坏其相干性,同时利用一个 SLM 对两束光分别进行相位调制^[13],对 $STED_z$ 加载离焦相位,以有效地消除荧光 PSF 在焦面上下的旁瓣^[21];2) 在原来的两条干涉臂各放入一片 1/4 波片,使得激光在进入物镜前由原来的线偏光转为圆偏光,这样可以降低激光对荧光分子选择性激发与损耗的概率,同时减小图像中激光导致的背景;3) 在原来的两条干涉臂各放入一个变形镜,采用无传感自适应光学技术^[22]对像差进行校正。值得注意的是,尽管 isoSTED 技术实现了厚样品成像,其三维分辨率也高于 3D-STED 技术,但是由于双物镜的对准要求极为严苛,其仍面临系统复杂、搭建调试难度大的问题。2016年,考虑到 4Pi 系统的高度轴向对称性,北京大学 Yang 等^[23]提出镜面增强超分辨显微技术(MEANS),用一面反射镜取代样品后面的载玻片,使得入射光和反射光在镜面发生干涉,得到轴向 110 nm 的分辨率,其与二维 STED 技术相结合(MEANS-STED),可以在 STED 的基础上进一步将横向分辨率提升 2 倍,获得 19 nm 的横向分辨率,但是其成像深度仅在离镜面 200 nm 范围内。总的来说,使用单物镜的镜面增强超分辨显微技术降低了 isoSTED 技术的系统复杂度。

上述技术旨在通过缩小荧光发光区域即减小荧光 PSF 体积来提升成像时的三维分辨率。而膨胀显微技术^[24](ExM)首先通过化学手段对样品进行各向同性的物理膨胀,然后进行成像,这样三维分辨率得到提升,且提升的倍数与膨胀的倍数相当。进一步地,ExSTED 技术^[25]结合了样品膨胀显微技术和 STED 超分辨显微技术,可以得到亚 10 nm 的二维分辨率和亚 50 nm 的三维分辨率。值得注意的是,亚 50 nm 的三维分辨率是采用水镜得到的,这样做是为了得到更大的成像深度,但如果采用油镜的话,可以进一步提升三维分辨率,但折射率不匹配引起的球差会使得成像深度受限。

2.2 三维成像深度

在三维成像应用中,保持在不同深度处有较高的三维分辨率是很有必要的。成像深度往往受限于成像过程中的光散射和像差。此外,光散射和像差也会影响 STED 成像中激发光和损耗光的对准以及三维暗斑的质量^[26]。为了减小成像过程中的光散射和像差,增大三维成像深度,主要从选择合适物

镜、采用样品清洁技术和使用自适应光学技术这三个方面进行考虑。

在进行厚样品的深度成像时,物镜浸没液和组织样品的折射率不匹配会导致球差的产生,且球差随着成像深度的增加而增加^[27]。虽然高折射率的浸没液会让物镜拥有更大的数值孔径,集光能力更强,理论上会带来更高的成像分辨率,但是其和样品折射率不匹配而导致的球差会降低成像质量。因此,针对不同的组织样品,选择合适的物镜浸没液至关重要。在对富含脂质的脑组织切片进行成像时,由于其折射率更接近甘油(折射率 1.45)而不是水(折射率 1.33),因此选择甘油物镜更合适。此外,额外的校正环可以进一步补偿折射率不匹配问题^[28]。2011年,Urban 等^[28]使用带校正环的甘油物镜,对活脑切片进行成像,以二维 60~80 nm 的分辨率揭示了突触内的肌动蛋白分布,成像深度可达 120 μm 。在对活细胞成像时,由于其折射率更接近水(折射率 1.33)而不是油(折射率 1.518),因此选择水镜更为合适。此外,额外的自适应光学元件,如空间光调制器,可以对损耗光的暗斑进行球差校正^[15]。2018年,Heine 等^[15]利用水镜,结合空间光调制器,在 z-STED 架构下实现对活细胞样品的成像,轴向成像深度可达 37 μm ,轴向分辨率可达 150 nm,对充满水的荧光珠成像时穿透深度可达 180 μm 。在对膨胀样品进行成像时,由于样品存在于吸水膨胀后的凝胶之中,凝胶由水构成,其折射率为 1.33,因此选择水镜更为合适。2018年,Gao 等^[25]在 ExSTED 中,选用 NA 为 1.2 的水镜后成像深度由使用油镜时的不到 5 μm 增大到 50 μm ,并获得 70 nm 的三维分辨率。

样品清洁是通过匹配样品和物镜浸没液的折射率来减小光散射和像差的一种方法,可以提高成像质量、增大成像深度^[29]。通过使用基于水凝胶的光学清洁技术,利用 Abberior STAR 635P 染料和 Leica SP8 STED 显微镜,实现了对肾脏组织样品的成像,分辨率约 80 nm,成像深度可达 30 μm ^[30]。样品的安装介质采用 CFM3(其折射率为 1.52,与油镜的浸没液折射率一致),结合商业 STED 显微镜,可以实现对树突棘的深度成像,成像深度可达 40 μm ,轴向分辨率为 273 nm^[31]。

使用自适应光学技术可以进一步校正由样品折射率变化导致的像差。自适应光学技术通过动态校正元件(如空间光调制器和变形镜),采用特定的像差测量技术和控制方法(如直接波前测量和间接像

差优化)来补偿畸变的波前,提高成像质量^[22]。将自适应光学技术用于 STED 显微术时,空间光调制相比于变形镜对光的偏振和波长敏感,因此常将其放置于损耗路,用来调制损耗光,而变形镜常被放置于激发光、损耗光和荧光共同所在的光路,用来调制所有光束。值得注意的是,为了保证调制效果,空间光调制器和变形镜需要和物镜后焦面呈光学共轭。一种测量像差的方法是通过波前传感器(如 Shack-Hartmann 波前传感器^[32-34])来直接进行测量,但这种方法往往需要一个点状的荧光目标作为“导星”;另一种测量像差的方法是通过间接进行像差优化^[12-13,20,35-39],按照一定的控制模式(如泽尼克系数)不断改变动态校正元件的相位分布,获取一系列图像,并对每一幅图像进行像质评价(如图像总强度或锐度),从而确定最佳的相位分布;此外,还可以通过测量不同深度的焦斑图像,利用相位恢复算法,得到畸变的波前分布^[40]。2021年,Velasco等^[32]搭建了一套 AO-2PE-3D-STED 显微成像系统,采用直接波前测量的自适应光学技术,利用空间光调制器和变形镜作为校正元件,并结合双光子激发、水镜和 3D-STED 技术,实现了对固定鼠脑组织样品和活体鼠脑样品的三维成像,成像深度分别可达 164 μm 和 76 μm 。2020年,Hao等^[20]搭建了一套 AO isoSTED 成像系统,利用间接像差优化的自适应光学技术,将空间光调制器和变形镜作为校正元件,结合 isoSTED 技术,以三维亚 50 nm 的分辨率实现了对全细胞和组织样品的成像,成像深度可达 30 μm 。

此外,将中空贝塞尔光束作为损耗光、高斯光束作为激发光的 GB-STED 技术^[41],充分利用中空贝塞尔光束的非衍射和自重构特性,可以在类似脑组织灰质的样品约 100 μm 深度处成像,横向分辨率约为 100 nm。

3 单分子定位显微镜的三维成像技术研究进展

在单分子定位显微成像中,荧光分子的横向位置可以根据其图像中类高斯分布的质心确定。可是对于轴向定位,虽然可以通过离焦的光斑大小进行轴向定位^[42],但是无像差的 PSF 关于焦平面对称,这使得 PSF 在焦平面两侧距离相同的位置处是相同的,无法确定离焦方向。除此之外,PSF 的轴向位置变化灵敏度较低、离焦信号信噪比较低、定位深度依赖于系统景深等问题也亟须解决^[5-6,8,43-52]。

图 3 为无像差的 PSF 在不同轴向位置的图像^[53]。

于是,人们提出了多种三维成像技术来提高 SMLM 的轴向分辨能力、增大成像深度,例如 PSF 工程、多位置观测、超临界角荧光和 4Pi 显微镜等其他方法^[5-6,8,43,45-52]。

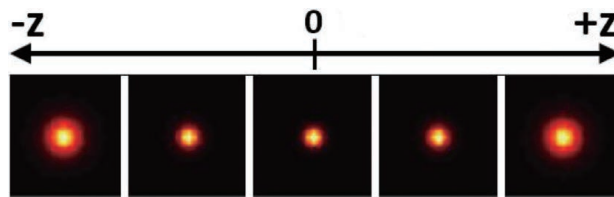


图 3 无像差的 PSF 在不同轴向位置的图像^[53]

Fig. 3 Images of aberration-free PSF at different axial positions^[53]

3.1 PSF 工程

由于无像差的 PSF 在焦平面两侧是具有对称性的,那么可以人为改变 PSF 的空间分布,将 PSF 的轴向位置信息编码到 PSF 的横向形状上,并通过横向形状进行轴向定位。这类方法被统称为 PSF 工程。

3.1.1 像差

由于无像差的 PSF 在焦平面两侧具有对称性,那么在 PSF 中引入不具有对称性的像差就可以打破这种局面,实现轴向定位。早在 1994 年,Kao 和 Verkman^[54]通过在 PSF 中引入像散,实现了单个荧光颗粒的三维示踪(SPT),轴向分辨率可达 12 nm。

基于此技术,2008 年 Huang 等^[55]实现了 3D STORM。如图 4 所示,在传统的荧光成像光路中,他们在物镜(objective)和筒镜(imaging lens)之间加入了一个焦距为 1 m 的柱透镜(cylindrical lens),使得图像在 x 和 y 方向受到不同程度的调制。于是,荧光分子的 PSF 椭圆度和方向随着轴向位置的变化而变化。当荧光分子恰好在平均焦平面时,PSF 在 x 和 y 方向上具有相等的宽度,图像呈圆形;当荧光分子在其他位置时,PSF 在 x 和 y 方向上聚焦程度不同,图像呈椭圆形。因此,如果标定好 PSF 在 x 和 y 方向上宽度关于 z 的变化曲线(校正曲线),那么只需要测量 PSF 在这两个方向上的宽度就可以确定荧光分子的轴向位置。

在绘制校正曲线时,首先使量子点或荧光分子稀疏地附着在盖玻片表面,保持样品台不动,在 z 方向移动物镜以恒定速率进行扫描,得到不同轴向位置的 PSF。然后使用二维椭圆高斯函数进行拟合,得到 PSF 中心坐标以及 x 和 y 方向的宽度。使用离焦函数进行拟合,并对折射率不匹配进行修正^[27],最终可以得到校正曲线。

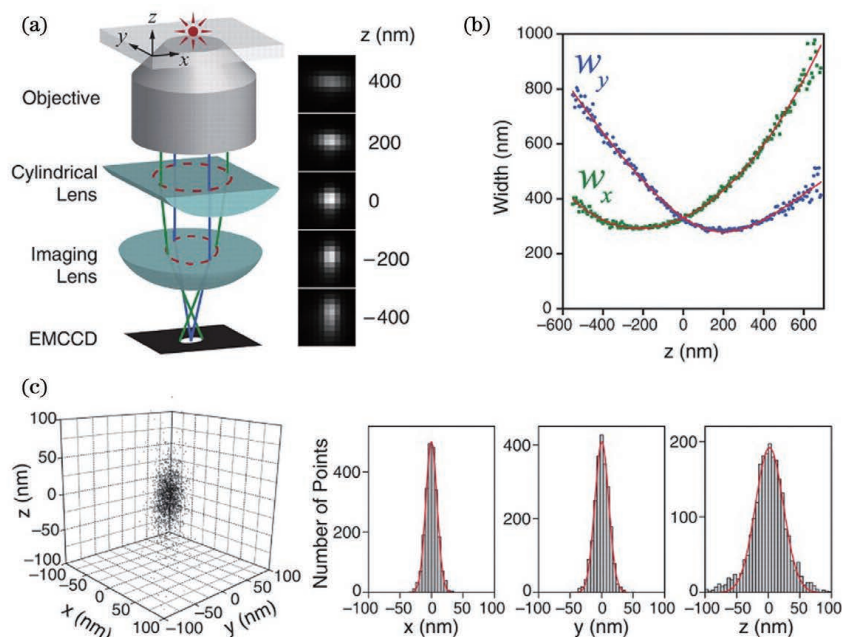


图4 3D STORM示意图^[55]。(a)实验装置;(b)校正曲线中图像宽度 w_x 和 w_y 与轴向位置 z 的关系;(c)单分子的三维定位分布

Fig. 4 Schematic of 3D STORM^[55]. (a) Experimental setup; (b) calibration curves of image widths w_x and w_y as functions of z ; (c) three-dimensional localization distribution of single molecule

一般而言,绘制校正曲线所使用的二维椭圆高斯函数和离焦函数分别为

$$G(x, y) = I_0 \exp \left[-2 \frac{(x - x_0)^2}{w_x^2} - 2 \frac{(y - y_0)^2}{w_y^2} \right]^2 + b, \quad (2)$$

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

式中: I_0 是峰值强度; b 是背景噪声; (x_0, y_0) 是图像的中心坐标; w_x 和 w_y 分别是图像在 x 和 y 方向的宽度; w_0 是图像在平均焦平面时的宽度; c 是 x 或 y 方向焦平面相对于平均焦平面的偏移量; d 是显微镜的焦深; A 和 B 是高阶项的系数,用于补偿光学系统的像差。

在距离平均焦平面 100 nm 时,此方法的单分子横向和轴向定位精度分别为 10 nm 和 20 nm。于是,为了测试其分辨能力,对哺乳动物细胞微管和线粒体网络进行深度为 600 nm 的 3D STORM 成像。由于柱透镜改变了 PSF 的形状,横向拟合误差增大, x 和 y 方向的分辨率大致为 20~30 nm,略低于传统 2D STORM^[56-57]。 z 方向的分辨率大致为 50~70 nm,约为 x 和 y 方向的 2~3 倍。

此方法光路较为简单,成本低,是目前最受欢迎的方法。当然,引入像散的缺点也很明显。单次成像的定位深度较浅,通常限制在距离平均焦平面

±350 nm 的范围,要对厚生物样品进行成像依赖于轴向扫描^[2],因为距离基准面越远,PSF 逐渐展宽,信噪比会变低。并且,样品和物镜之间折射率的不匹配会产生球差,这使得在距离基准面越远位置的球差影响越大。但是值得注意的是,在基准面以下,球差影响较小^[2,27,55]。另外,在选择柱透镜的焦距时,需要在像散强度和信噪比之间进行权衡,像散越强,横向 PSF 对于轴向位置变化的分辨率就会越高,具有深度信息的横向 PSF 对轴向位置变化的灵敏度就会越高,但是信噪比也会越低^[58]。若想同时保证信噪比和轴向成像深度,可以使用双物镜,2012 年 Xu 等^[59]在此系统的基础上,将单物镜改为双物镜,光子利用效率提升了两倍,单分子定位精度在横向和轴向分别为 4 nm 和 8 nm。在对肌动蛋白丝进行三维成像时,单次成像深度约为 500~550 nm,横向和轴向分辨率相比于单物镜也提升了两倍。除了使用双物镜,也可以使用光片(light sheet)照明技术

提升信噪比^[60-61]。

3.1.2 自干涉

2018年Bon等^[62]提出了自干涉三维超分辨显微镜(SELFI)。SELFI的原理如下:对于焦点平面附近的荧光分子,所收集的荧光的波前曲率很大程度上取决于分子的轴向位置,并且在焦点处表现出曲率符号反转。因此,在成像平面中,通过干涉测量对荧光波前进行分析,可以得到荧光分子的轴向位置。他们通过在距离像面几微米的位置处加入一个相位衍射光栅对PSF进行改进,产生了一种空间重叠度大于90%的自相干PSF,它的干涉图案随着荧光分子的轴向位置的变化而改变,并且干涉图案的包络线对应着原始PSF的横向分布。因此,根据干涉图案就可以进行三维定位。而且,SELFI对像差不敏感,可以让3D SMLM深入完整组织内部进行三维成像。于是,他们把SELFI与像散技术进行了比较,结果表明在成像深度大于10 μm 时,像散技术的轴向定位精度明显下降,但是SELFI依旧保持着各向同性的定位精度。随后,他们使用SELFI对厚样品中肌动蛋白和OCT4进行三维成像,其中在对OCT4进行成像时,SELFI揭示了OCT4在未清除的组织球体内部深达50 μm 的空间分布,这也证明了SELFI具有对厚样品进行三维成像的能力。2019年他们实现了SELFI的活细胞三维成像^[63]。当然,SELFI的轴向定位深度相比于像散技术并没有很大提升,可以实现700 nm(± 350 nm)深度下的轴向定位。

3.1.3 傅里叶面调制

为了解决成像深度较浅的问题,2009年Pavani等^[64]报道了一种使用双螺旋PSF(DH-PSF)进行三维成像的技术。早在2006年,Greengard等^[44]提出了一种基于空间旋转的PSF,但是这种PSF的光子利用效率很低,用于定位的两个主瓣有极少的能量,因此Pavani等对此进行了改进。如图5所示,在 $4f$ 系统中,他们使用SLM在傅里叶面对PSF进行调制,通过在模态平面叠加特定的高斯-拉盖尔模式,使PSF拥有类似于DNA的双螺旋结构。在距离焦平面不同深度的位置上,DH-PSF两个主瓣之间连线与水平方向夹角的不同,反映了荧光分子轴向位置的变化。与像散的方法一样,在绘制校正曲线后,就可以确定荧光分子的轴向位置。

对于单颗粒成像,这种方法的成像深度可以达到2 μm ,三个方向的分辨率都可以达到10~20 nm,并且使用最大似然估计法时,分辨率还可以继续提

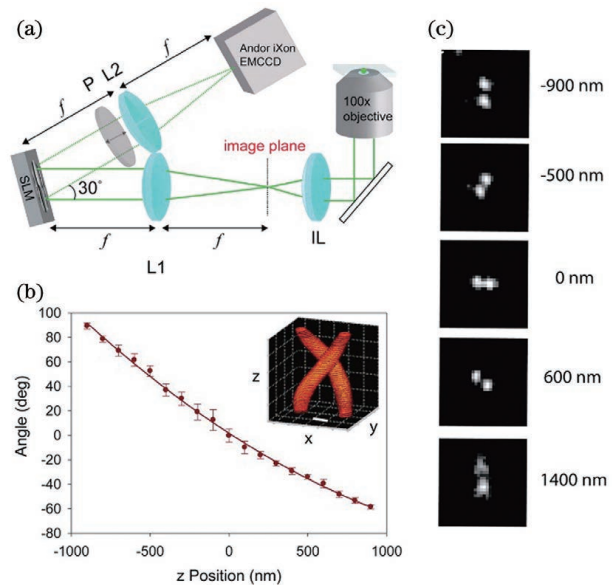


图5 DH-PSF系统和轴向位置 z 校准示意图^[64]。(a)实验装置;(b)校正曲线中主瓣连线与水平方向的夹角与轴向位置 z 的关系;(c)使用校正曲线对不同轴向位置荧光珠进行成像的结果

Fig. 5 Schematic of DH-PSF system and z -calibration^[64]. (a) Experimental setup; (b) angle between two main lobes and horizontal direction varying with z ; (c) imaging results of a fluorescent bead at different axial positions using calibration curve

高^[65]。但是DH-PSF旁瓣(side lobes)的能量占用和SLM的能量损失^[64-65],导致光子利用效率较低,需要较长的曝光时间才能提高定位精度,因此这种方法只适用于高亮度的荧光染料和荧光蛋白。若想要减少SLM的能量损失并对细胞结构进行成像,则可以使用专门定制的相位板(phase mask)代替SLM^[66-68],DH-PSF被广泛地用于生物样品(如微管)的成像,其横向和轴向分辨率分别能达到20 nm和30 nm,成像深度最大可以达到2.5 μm ^[66]。

后来,人们基于理论或者实验调制出了多种PSF,用于增大成像深度、提高定位精度,例如phase ramp PSF^[69]、corkscrew PSF^[70]、self-bending PSF^[71]、saddle-point PSF^[72]、tetrapod PSFs^[73]、bisected PSF^[74]、Airy-beam PSF^[75]和twin-Airy PSF^[76]等。

在这些PSF中,Jia等^[71]基于艾里光束的非衍射特性提出自弯曲(self-bending)PSF,其在细胞结构的三维成像中分辨率最高,它的定位精度可达10 nm,三维分辨率可达20 nm,成像深度可以达到3 μm 。定位原理如下:自弯曲PSF由两个艾里光束组成,艾里光束在传播时会发生横向位移(光路弯

曲)。因此,可以根据两个艾里光束的横向位移确定光束沿轴向的传播距离,从而确定荧光分子的轴向位置。Zhou 等^[77]设计了艾里光束(Airy-beam) PSF,利用其进行单颗粒成像的深度最深。在较小的数值孔径($0.5NA$)和20倍放大率下,对斑马鱼胚胎血液中荧光珠进行亚毫秒三维跟踪,成像深度达到了 $600\ \mu\text{m}$,定位精度为 $100\ \text{nm}$ 。相比于用于调制自弯曲 PSF 的 SLM,艾里光束 PSF[图 6(a)]所使用的折射型相位板可以提供更高的光子利用效率,提升定位精度。但是和自弯曲 PSF 一样,艾里光束 PSF 在焦平面附近的离焦灵敏度较低,并且无法确定离焦方向,这需要借助双焦面进行判断。2020年,Zhou 等^[76]对艾里光束 PSF 进行了进一步的完善,他们使用折射型相位板产生了一组对称的艾里光束 PSF,即孪生艾里光束(twin-Airy) PSF [图 6(b)],这解决了艾里光束 PSF 离焦灵敏度不均匀和无法确定离焦方向的问题。在整个成像深度范围内,孪生艾里光束 PSF 的灵敏度几乎保持一致,并且两个艾里光束之间的距离同时反映了位置和离焦方向的信息,这使得有效的成像深度增大了两倍。因此,在60倍放大率和 $1.4\ \text{NA}$ 的条件下,SPT 能够实现在三个方向上的定位精度均低于 $30\ \text{nm}$ 并且成像深度大于 $7\ \mu\text{m}$,这也表明了孪生艾里光束 PSF 在细胞结构三维成像中的应用潜力。虽然 tetrapod PSFs 也可以在 SPT 中达到 $6\ \mu\text{m}$ 的成像深度、 $12\ \text{nm}$ 的横向定位精度和 $21\ \text{nm}$ 的轴向定位精度,但是它所使用的基于相位恢复的极大似然估计定位算法,与定位孪生艾里光束 PSF 所主要使用的维纳滤波(Wiener filter)相比更为耗时。因此,虽然目前(孪生)艾里光束 PSF 只应用于 SPT,但是其定位深度大的能力很有希望应用于稀疏分布的细胞结构成像。

虽然上述的 PSF 都能增大成像深度或者提高定位精度,但是它们都有一个共同的问题,就是成像时占据了较多的面积。在对高密度的生物样品进行成像时,成像深度越深,PSF 越容易发生混叠,这提高了算法定位的难度^[78]。为了解决这个问题,2020年 Nehme 等^[79]从算法的角度出发,提出了一种 DeepSTORM3D 算法。在此项工作中,他们设计了一种卷积神经网络架构并进行训练,使其从随机生成、不同深度、指定密度的发射点经过相位板所产生的二维四脚(tetrapod) PSF 中反算出它们的三维位置,即对定位算法进行优化。与此同时,他们通过在网络中加入了一个相位可调的物理层对相位板进行

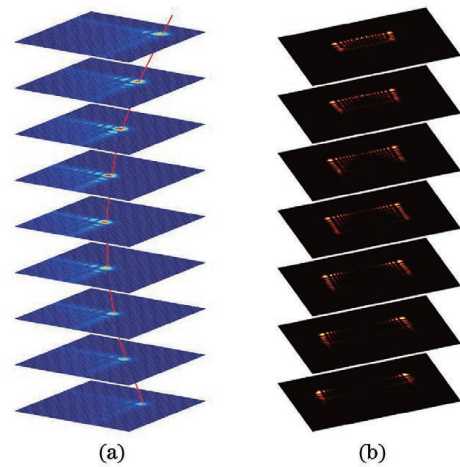


图6 艾里光束 PSF 和孪生艾里光束 PSF。(a)艾里光束 PSF^[77]; (b)孪生艾里光束 PSF^[76]

Fig. 6 Airy-beam PSF and twin-Airy PSF. (a) Airy-beam PSF^[77]; (b) twin-Airy PSF^[76]

同时优化,得到了适用于定位高密度发射点的最优四脚 PSF(通过神经网络得到的 PSF)。为了证实此算法的有效性和适用性,他们将 DeepSTORM3D 与 SMAP-2018^[80]定位算法进行比较,通过将 DH-PSF 与 DeepSTORM3D 相结合进行高密度定位,得到不错的结果。随后,他们对 COS-7 细胞的线粒体进行成像,实验结果表明,在单次成像深度达到 $4\ \mu\text{m}$ 时,横向分辨率约为 $40\ \text{nm}$,轴向分辨率约为 $50\ \text{nm}$ 。

3.2 多位置观测

如前所述,PSF 的横向尺寸在焦平面附近变化缓慢,仅凭单独的 2D PSF 拟合很难确定其轴向位置。因此,除了采用 PSF 工程修改 PSF 形状,也可以通过在物方或者像方的不同位置进行同时成像,从中提取物体的轴向位置。

3.2.1 双平面

双平面(Biplane)观测最早由 Prabhat 等^[81]于2004年提出,旨在解决无法对不同深度的物体进行同时成像的问题。在此系统中,分束镜将成像光路一分为二,分别由两个相机接收荧光信号,相机的感光面分别在样品的不同深度处共轭,两个平面之间的距离通常在 $500\sim 1500\ \text{nm}$ 之间,因此可以对其进行不同深度下的同时成像。

随后在2007年和2009年,他们对此方法进行了改进,分别提出了如图7所示的多焦面显微镜(MUM)和双物镜多焦面显微镜(dMUM),用于提升三维成像的轴向分辨能力^[82-84]。对于 MUM,当两个探测器分别位于焦平面($0\ \text{nm}$)和远离焦平面($500\ \text{nm}$)的位置时,对于同一个分子发出的荧光信

号,探测器接收到的信号强度是不同的,换而言之就是横向 PSF 的形状不同。因此,可以通过实验测得深度和 PSF 形状(信号强度分布)之间的关系,确定荧光分子的轴向位置,或者可以通过 PSF 模型的理论计算进行定位。相对于传统显微镜,MUM 提升了焦平面附近的定位精度,为增大定位深度,可以继续增加平面个数、增大间距^[84-85],但是每个探测器分配到的光子数也会减少,导致定位精度下降,因此通常将 MUM 和其他方法相结合以弥补不足,例如艾里光束 PSF^[75,77]。dMUM 使用了类似于 4Pi 和 I⁵M 的双物镜结构,提高了光子利用效率,定位精度得到进一步提升,在 SPT 中的轴向定位精度最高可

以达到 10 nm 左右,定位深度可达 1~2 μm ^[83-84]。但是相比于 MUM,dMUM 的系统复杂度较高。2008 年,Juette 等^[86]首次在 FPALM 中引入双平面技术,并对荧光分子标记的球形珠(直径为 4 μm)进行三维成像,在单次成像深度为 1 μm 的情况下,实现了横向 30 nm 和轴向 75 nm 的分辨率。随后,此技术又被应用到细胞微管、线粒体网络、隔膜蛋白等细胞结构的 3D SMLM 成像中^[87-88]。另外需要注意的是,MUM 和 dMUM 都存在着一个问题,对于 NA 较大的物镜,对偏离物镜和管镜预设的焦平面进行成像会引入球差和其他高级像差,影响定位精度,并且在偏移较大的情况下像差的影响会加重^[51]。

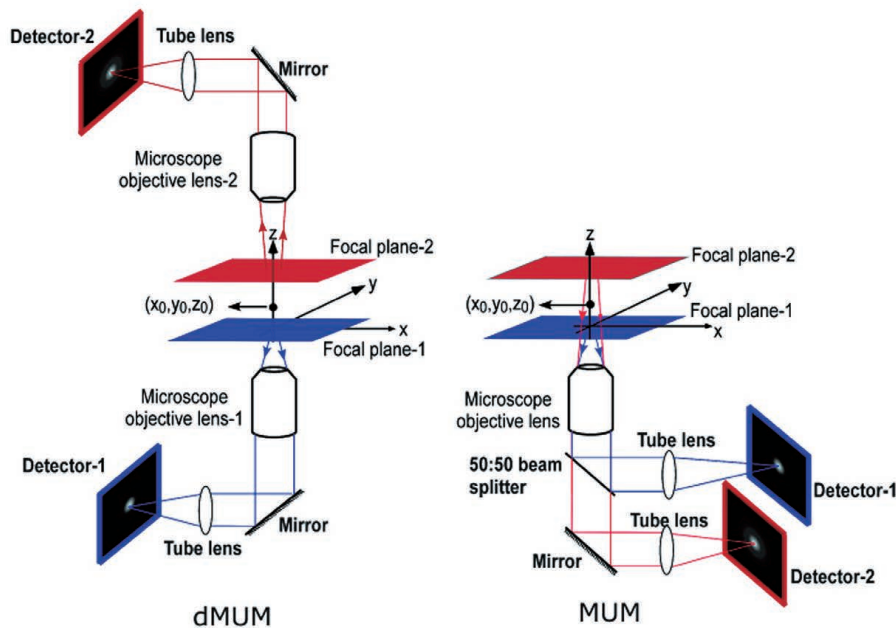


图7 dMUM 和 MUM 系统示意图^[84]

Fig. 7 Schematics of dMUM and MUM systems^[84]

3.2.2 多平面

为减小多平面观测中像差的影响,可以使用定制的衍射光学器件将物体发出的光衍射为多个级次,并同时无像差地成像在同一平面的不同位置上,不同级次衍射光的相位不同,对应着不同位置的平面。早在 1999 年,Blanchard 和 Greenaway^[89]首次报道使用一种畸变衍射光栅对不同深度下的物体进行同时成像,并介绍了如何设计这种光栅可以校正像差(图 8)。

2013 年,Abrahamsson 等^[90]对宽场显微镜进行了改进,提出了一种像差校正的多焦点显微镜(MFM)。他们设计了一种多焦点衍射光栅,将荧光衍射为 9 个级次,即得到了 9 个间距相同的平面。使用 MFM 对 RNA 聚合酶 II 的异质核迁移进行三维示踪,单次成像深度可以达到 4 μm 。相比于

dMUM 使用双物镜和 MUM 使用多个分束镜产生多个平面的方法,MFM 的系统较为简单,只需在 4f 系统的傅里叶面加入多焦点衍射光栅即可。2014 年,Hajj 等^[91]将 MFM(图 9)应用于 STORM/PALM 中,实现了多色 3D SMLM 全细胞成像。他们对哺乳动物线粒体网络和酵母微管进行了成像,单次成像的定位深度可达 4 μm ,横向和轴向分辨率分别为 20 nm 和 50 nm。但是,多焦点衍射光栅的衍射效率较低,9 个级次的理论极限仅为 67% 左右。想要提高光子利用效率,可以增加衍射级次或者使用多重相位光栅代替原本的二元光栅,从而可将 9 个级次的光子利用效率提升至 74%,甚至更高^[92-93]。

由上可知,想要增大单次成像的定位深度,最直接的办法就是增加平面个数^[94-96]。但是,这也需要

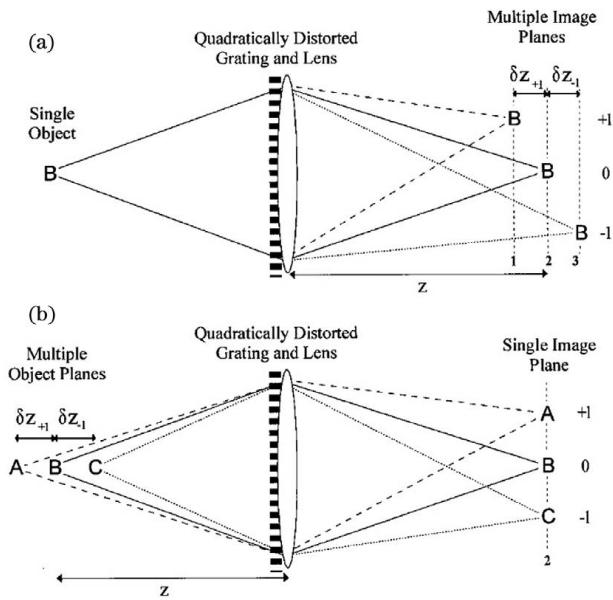


图8 使用畸变衍射光栅和透镜进行成像^[89]。(a)单个物体成像在多个平面上;(b)多个物体成像在单个平面上
Fig. 8 Imaging by using distorted diffraction grating and lens^[89]. (a) Single object is imaged onto multiple image planes; (b) multiple objects are imaged onto a single image plane

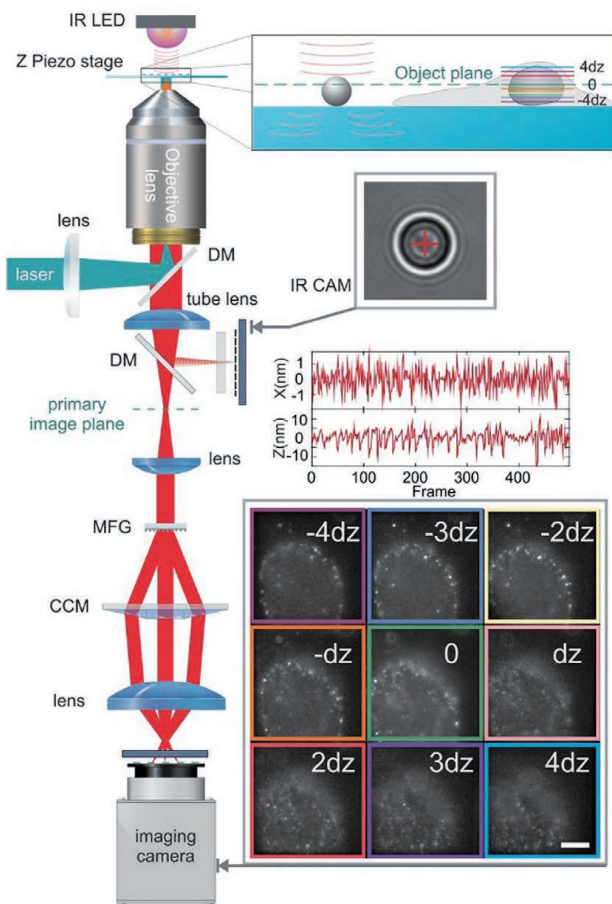


图9 MFM系统示意图^[91]
Fig. 9 Schematic of MFM system^[91]

在定位精度和平面个数之间权衡,平面个数的增多会让每个平面分配到的光子数减少,导致每个平面的定位精度降低。换言之,位于特定平面上的荧光分子是这些图像中某个子集的焦点,同时在其他荧光分子进行定位时荧光分子又是背景噪声,用于提升定位精度的光子个数仅占探测到总光子数的一小部分^[48,51,97]。因此,双/多平面技术直接应用于细胞结构的3D SMLM成像具有一定难度,因此多平面技术也通常和其他技术(如像散^[98-99])进行结合并且也在3D SPT成像中应用广泛^[48,51,94-97]。

3.2.3 多角度

另一种实现在不同位置同时观测的方法就是多角度观测,此方法通常表现为在样品基底加入微反射镜、增加视场角或成像光路引入视差。

1) 增加视场角

2009年,McMahon等^[100]首次使用锥形微反射镜基底对直径为190 nm的聚苯乙烯颗粒进行高速3D SPT成像,三维定位精度达到了20 nm。如图10所示,当颗粒发生轴向移动时,虽然其不影响对颗粒的直接成像,但是荧光在微型反射镜的入射点是上下移动的,使得颗粒的反射成像在横向上移动,即微型反射镜将轴向位移转化为横向位移,并且结合其他位置的反射成像实现轴向定位。

基于此技术,2010年Tang等^[101]提出了一种虚体积超分辨成像显微镜(VVSRM),并将其应用于PALM/FPALM和PAINT。如图11所示,他们制作了一种反射镜基底,倾斜的反射镜可以对荧光分子侧面进行反射成像,通过分束镜和辅助透镜可将实像和离焦的反射像同时成像在同一个平面上,再对横向定位的结果进行坐标变换,即可实现轴向定位。当反射镜倾斜角度为 45° 时,理论上可以实现空间上各向同性的分辨率,各向同性也使得其体积测量的准确度高于共聚焦显微镜。若光子数超过5000,则定位精度能达到亚20 nm。对大肠杆菌细胞中的Cas2和MreB进行3D PALM成像,VVSRM在各个方向的分辨率均为亚100 nm;使用PAINT对大鼠的神经元突触进行三维成像,VVSRM的分辨率能够到亚150 nm。不难看出在VVSRM中加入反射镜基底,不但补偿了分束镜带来的能量损失,而且减小了轴向漂移和像差的影响。然而,反射镜基底也带来了不利的因素,例如样品制备的难度增大。

2) 引入视差

最早引入视差的方法通常是在物镜后焦面或者

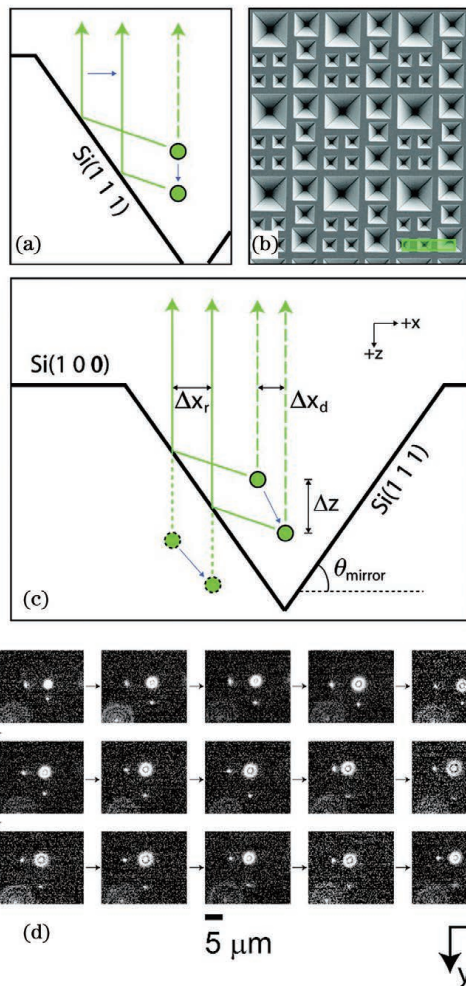


图 10 锥形微反射镜孔三维成像原理图^[100]。(a)垂直运动中的正交跟踪原理；(b)锥形微反射镜孔的扫描电镜图像；(c)一般情况下的正交跟踪原理；(d)水/甘油溶液中直径为 190 nm 的颗粒的正交跟踪影像中的连续图像

Fig. 10 Schematic of 3D imaging principle of pyramidal micromirror holes^[100]. (a) Orthogonal tracking principle in vertical motion; (b) SEM image of pyramidal micromirror holes; (c) orthogonal tracking principle in general condition; (d) a series of images from orthogonal tracking movie of 190 nm diameter particle in water/glycerine solution

后焦面的共轭面加入楔形棱镜或者反射镜以将成像光路按角度分成两个通道,使得物体的轴向位移表现为两个横向图像之间相对位置的改变,在 3D SPT 中都可以达到纳米级的精度^[102-103]。图 12 为反射镜三维成像示意图。

2019年,Guo等^[104]首次提出傅里叶光场显微镜(FLFM)。他们通过将微透镜阵列放在成像光路的傅里叶面上的方法引入视差,实现了小鼠肾脏切

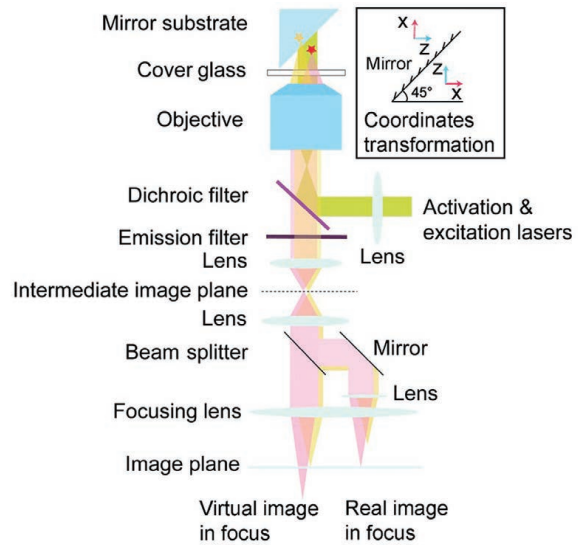


图 11 VVSRM 系统示意图^[101]
Fig. 11 Schematic of VVSRM system^[101]

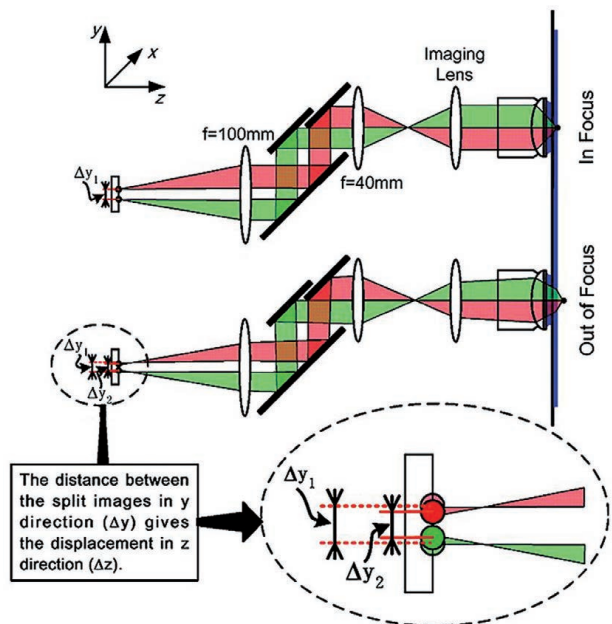


图 12 反射镜三维成像示意图^[103]

Fig. 12 Schematic of mirror 3D imaging^[103]

片的传统三维显微成像 3~5 μm 的分辨率。2020年,Sims等^[97]将此技术引入 SMLM 中,并将其命名为单分子光场显微镜(SMLFM),分辨率得到了显著提升。如图 13 所示,在探测器的接收面上,MLA 将成像光路在横向上划分为二维阵列,阵列的每个区域都可以测量光场的四维信息以及二维空间和角度信息。每个微透镜都会对物体的一部分波前进行成像,若物体发生轴向位移,则在阵列的不同区域,其图像的横向位置会朝着孔径波前平均梯度的方向移动,并且位移长度与平均梯度成比例关系。例如,当物体靠近物镜,图像向阵列中心外侧移动;

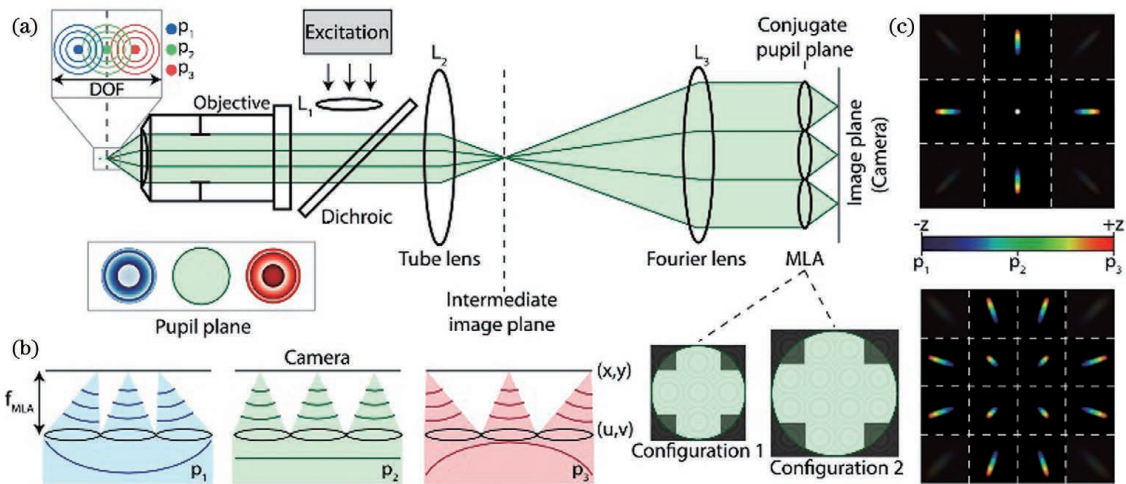


图 13 SMLFM 系统示意图^[97]。(a)实验装置;(b)微透镜阵列从波前采样空间和角度信息,表现为像方主平面的不对称曲率;(c)两种不同光场显微镜下的模拟点扩散函数

Fig. 13 Schematic of SMLFM system^[97]. (a) Experimental setup; (b) microlens array samples spatial and angular information from the wavefront, which exhibits asymmetric curvature of the primary image plane; (c) simulated point spread functions for two different light field microscopes

反之,图像向中心内侧移动。通过理论模型进行计算即可获取轴向位置信息,因此微透镜阵列可以测量光场的五维信息。

在实验测试中,SMLFM 首先对直径为 100 nm 的荧光珠进行三维成像,结果显示在单次成像定位深度为 3 μm 时,单次成像的三维定位精度都在 20 nm 以下,若增加微透镜的个数,在定位精度不变的情况下,单次成像定位深度可以更大。随后,他们使用 PAINT 对淋巴细胞膜进行 3D SMLM 成像,SMLFM 的三维分辨率可达 50 nm 左右,单次成像定位深度为 8 μm 。此项工作使用微透镜阵列获取的光场的四维信息进行定位,相较于只使用二维信息具有更高的定位精度,微透镜阵列也使得定位后并不需要相位恢复等其他后处理算法。可是,微透镜阵列不仅减小了视场范围(对淋巴细胞膜成像时,视场大小仅为 15 $\mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$),而且其产生的二维阵列在某些区域存在失真,定位时需要舍弃,这降低了光子利用效率。若想提升此效率,则可以使用六边形微透镜阵列代替方形微透镜阵列或者在二维定位前对失真数据进行反卷积。

3.3 超临界角荧光

众所周知,样品和玻璃界面之间存在折射率不匹配的情况,这对在分界面附近的荧光分子辐射角度分布有很大影响。在距离分界面的一定范围内,荧光分子辐射的一部分荧光会以低于临界角的范围射入玻璃,称为低临界角荧光(UAF);另一部分荧光则会以超过临界角的范围入射,称为超临界角荧

光(SAF)。根据折射定律,在几何光学中 SAF 是不可能存在的,SAF 也因此被称为“禁止的光线”。但是,从物理光学的角度分析,荧光分子所辐射的倏逝分量会在分界面另一侧的介质(如玻璃)中传播,并且会随着荧光分子和分界面的距离的增加而急剧下降。因此,SAF 的能量贡献会随着此距离的增加而急剧下降,而在此范围内 UAF 的能量贡献几乎不变^[105-109]。如图 14 所示,当荧光分子与分界面($z = 0 \text{ nm}$)接触时,SAF 光子数大致等于总光子数的一半;当荧光分子与分界面距离大于等于 λ ($z \geq \lambda$) 时,SAF 光子数几乎为 0,并且光子数随着其与分界面距离的增加呈指数形式下降,具体表达式如下^[106-111]:

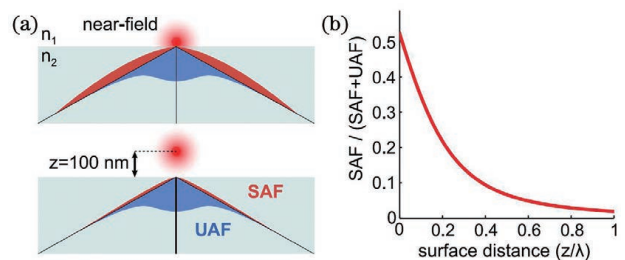


图 14 SAF 原理图^[106]。(a)靠近分界面的荧光团 UAF 和 SAF 的辐射角分布;(b)SAF 的强度随表面距离 z 的增加呈指数形式下降

Fig. 14 Schematic of SAF^[106]. (a) Emission angular distributions of UAF and SAF of fluorophore close to interface; (b) SAF intensity decreases exponentially with increasing surface distance z

$$I_{\text{SAF}}(z) = \int_0^{\nu_{\text{NA}}} \frac{2(n_1^2 + n_2^2)\nu f \sqrt{n_2^2 - n_1^2 - \nu^2 f^2} (n_1^2 + \nu^2 f^2)}{3(n_2^2 - n_1^2) [n_1^4 + (n_1^2 + n_2^2)\nu^2 f^2]} e^{-2\nu z} d\nu, \quad (4)$$

式中: $f = \lambda/2\pi$, λ 为光的波长; n_1 和 n_2 分别为样品和玻璃的折射率, $\nu_{\text{NA}} = f^{-1}(NA^2 - n_1^2)^{-1/2}$, NA 为物镜的数值孔径。

3.3.1 SAFM

基于此原理,2004年 Ruckstuhl 和 Verdes^[105] 首次提出超临界角荧光显微镜(SAFM),用于在共聚焦显微镜中同时分析荧光分析物表面结合和未结合部分的相关信息。2010年他们提出 3D-SAFM 技术,并将其应用在三维显微成像中^[112]。如图 15 所示,在 3D-SAFM 中,SAF 和 UAF 分别由抛物面型聚光器和物镜收集,角度范围分别为 $60^\circ \sim 75^\circ$ (最小角度可通过光阑调节) 和 $0^\circ \sim 24^\circ$ 。在一定范围内,UAF 的能量分布与激光相同,相比于 SAF 几乎没有改变,因此可以使用 SAF 和 UAF 的比值和轴

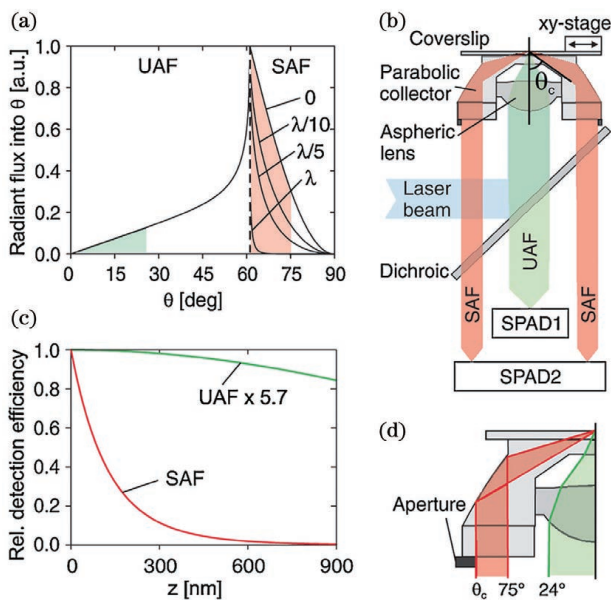


图 15 3D-SAFM 原理图^[112]。(a)在水-玻璃分界面不同距离 z 处,与随机方向的荧光团光轴夹角为 θ 的辐射通量;(b)实验装置;(c)模拟得到的水-玻璃分界面距离 z 与 SAF 和 UAF 的相对探测效率之间的关系;(d)光路放大图

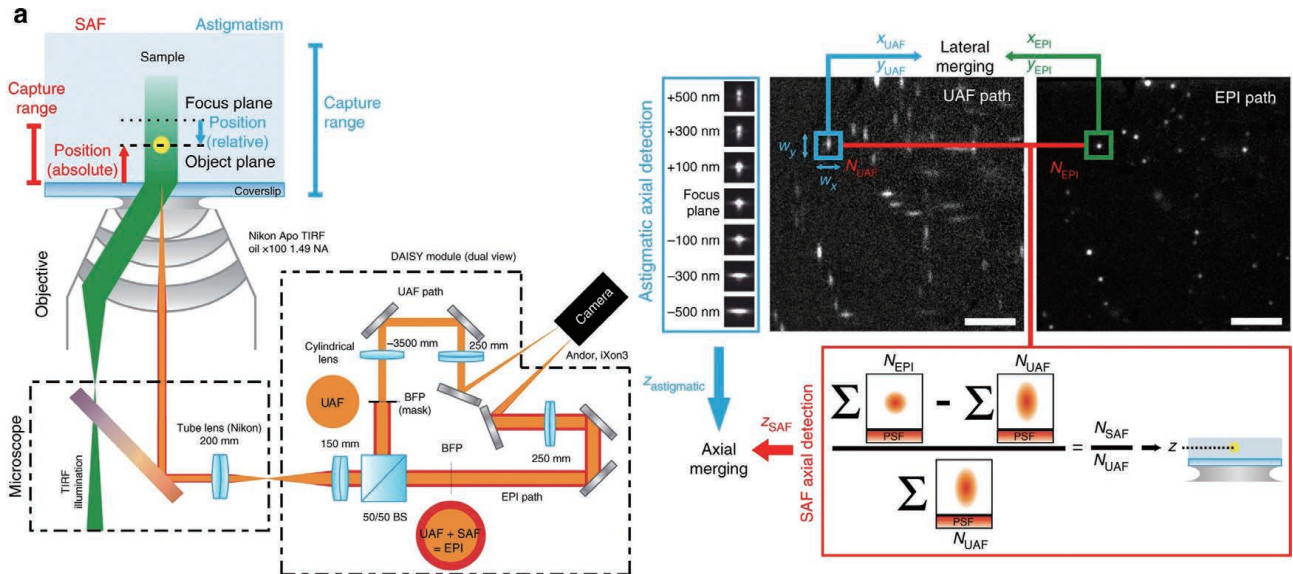
Fig. 15 Principles of 3D-SAFM^[112]. (a) Radiant flux for angle θ from the optical axis of a fluorophore with randomized orientation at different distances z from a water-glass interface; (b) experimental setup; (c) simulated relationship between distance z from a water-glass interface and relative detection efficiencies of SAF and UAF; (d) enlarged view of optical path

向位置的关系进行定位,而且 SAF 还避免了外界因素对成像采集过程中漂移的影响。经过实验验证,3D-SAFM 的轴向定位精度可达亚 15 nm,在对小鼠胚胎纤维细胞的微管网络进行三维成像时,轴向分辨率优于 60 nm。

3.3.2 DONALD

2015年, Bourq 等^[111] 将 dSTORM 与 SAFM 结合,提出一种可直接进行轴向定位探测的光学纳米显微系统(DONALD)。在 DONALD 中,他们使用高数值孔径(0.49 NA)的物镜来收集包含 SAF 在内的落射荧光,在成像光路的 DONALD 模块中,落射荧光被分束镜分为两部分,一部分为 SAF 和 UAF,另一部分为 UAF(SAF 被光阑阻挡)。因为在高 NA 物镜的后焦面(共轭面)上,SAF 和远场 UAF 在径向上是分开的,所以可以将 UAF 和 SAF 分开。这样在 EMCCD 平面上,可以通过将落射荧光与 UAF 相减得到 SAF,再计算 SAF 与 UAF 的比值,实现轴向定位。理论上,DONALD 可以实现 5~10 nm 的轴向定位精度。但是,在实际成像时,DONALD 的轴向定位精度可以达到约 15 nm;在对细胞结构(如细胞纤维型肌动蛋白和微管)成像时,轴向分辨率为 40~80 nm,且随着深度的增大,分辨率逐渐降低。这是因为分束器导致 UAF 和 SAF 的能量都被舍弃了 50%,用于轴向定位的光子数减少,信噪比降低,外加像差的影响,DONALD 的定位精度和理论值有所差距。

不难理解,仅使用 SAF 进行轴向定位也存在缺陷。在 SAF 存在的范围内进行轴向定位,DONALD 的分辨率能达到很高的水平,可以轻易超过传统衍射极限下的横向分辨率。可是此方法的定位深度较浅,最高不超过 600 nm,超过此范围的 SAF 能量非常少,因此需要将 UAF 与其他方法结合以扩展轴向的定位范围。于是在 2019 年 Cabriel 等^[113] 将 DONALD 与像散结合,提出了一种基于 SAF 的双视场像散成像技术(DAISY)。如图 16 所示,除了在 UAF 光路中加入柱透镜引入的强像散以外,DAISY 光学系统的其他部分在原理上与 DONALD 几乎一致。为了对 SAF 和像散共同进行轴向定位,他们基于定位精度和正态分布组合定律为两者在定位中分配权重,对落射荧光和 UAF 共同进行横向定位的方法也是如此。因此,DAISY

图 16 DAISY 系统示意图^[113]Fig. 16 Schematic of DAISY system^[113]

在对细胞骨架、活菌膜和轴突周期性亚膜支架进行 3D SMLM (dSTORM 和 DNA-PAINT) 成像时, 单次成像定位深度为 $1.2 \mu\text{m}$, 各个方向的定位精度几乎一致且在此深度范围内变化缓慢, 并且最高可以达到 15 nm 。

3.3.3 dSALM

针对 SAF 和 UAF 存在能量损失的问题, 2021 年 Dasgupta 等^[106] 报道了一种直接超临界角定位显微术 (dSALM), 并将之前的方法^[114] (如 DONALD 和 DAISY) 归类为虚拟超临界角定位显微术 (vSALM)。值得注意的是, 早在 2014 年他们就提出了一种与 DONALD 极其类似的方法, 将其命名为超临界角定位显微术 (SALM)^[115], 因此 dSALM 是对原有的 SALM 进行了改进。有趣的是, 他们使用了一种 DNA 折纸四面体^[116] 作为 SALM 成像质量的评判标准。如图 17 所示, 在 dSALM 的系统中, 他们使用一种定制的椭圆形反射镜在后焦面上将 SAF 从落射荧光中直接分离出来。在 UAF 所在光路中, 他们通过加入柱透镜引入较弱的像散, 用于横向定位和精度较低的轴向定位。在定位算法方面, dSALM 沿用了 DAISY 的方案。因此, 相比于舍弃近乎一半能量的 vSALM, dSALM 的直接分离法让其定位精度得到 4 倍的提高、有效景深得到 4 倍的增大。在对荧光珠的 3D 成像和 DNA 折纸四面体的 3D DNA-PAINT 成像中, 各个方向上的定位精度均为 $4 \sim 5 \text{ nm}$, 分辨率可以达到 30 nm ; 在对细胞网格蛋白小窝和微管的 3D DNA-PAINT 成像中, 分辨率可以达到 50 nm 。此方法虽然提升了

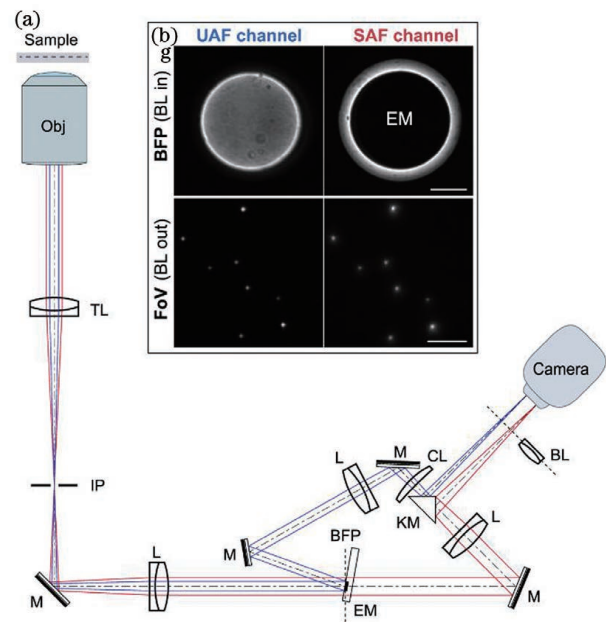


图 17 dSALM 系统示意图^[106]。(a) 实验装置; (b) 在相机上看到的 UAF 和 SAF 通道, 其中上面板为 Bertrand 透镜 (BL) 放入光路中, 下面板为 Bertrand 透镜 (BL) 未放入光路中

Fig. 17 Schematic of dSALM system^[106]. (a) Experimental setup; (b) UAF and SAF channels seen on the camera with the Bertrand lens (BL) inserted in the optical path (upper panel) and without the Bertrand lens (BL) inserted in the optical path (lower panel)

定位精度, 但是 dSALM 引入了弱像散, 导致成像深度较大时定位精度无法得到保证, 因此其单次成像定位的深度较小, 实验中最大成像深度为 600 nm 。

此外, dSALM 使用高数值孔径(1.7 NA)物镜所需的高折射率油镜, 导致其无法使用光激活荧光染料; 较大的视场像差将视场限制在 $20 \mu\text{m}$ 。

当然, 除了使用分离 UAF 和 SAF 的方法进行三维成像, 还可以使用其他系统结构较为简单的方法, 例如离焦^[117]。但是, 离焦产生的像差会影响定位精度和校正曲线的绘制^[106, 117]。

3.4 4Pi 显微镜

由于单个物镜最多只能收集一半球形波前, 在不牺牲横向分辨率的情况下, 很难实现轴向分辨率的提升。但是, 如果可以在成像系统的焦平面的另一侧上也放置一个物镜(共焦面物镜)收集波前的另一半, 这样可以得到近乎完整的球形波前, 由于恢复了对称性, PSF 的轴向延展也会大大减小, 各向同性分辨率也因此实现, 并且收集的光子数也提升了 1 倍。基于此理念, 在 20 世纪 90 年代 Hell 课题组提出了 4Pi 显微镜^[17, 118] (4Pi microscopy)。如图 18 所示, 因为一个物镜在理论上最多可以覆盖空间立体角的一半(2π), 所以两个相对的物镜可以实现全空间立体角(4π), 故将其命名为 4Pi 显微镜。实际上, 空间立体角通常可以实现 $2.5\pi \sim 3\pi$ ^[5]。在 SMLM 中使用 4Pi 可将干涉条纹中的相位信息转化

为轴向位置信息, 进而提高轴向分辨率, 目前已经实现了 4 通道同时记录相位信息的成像系统^[119-124]。

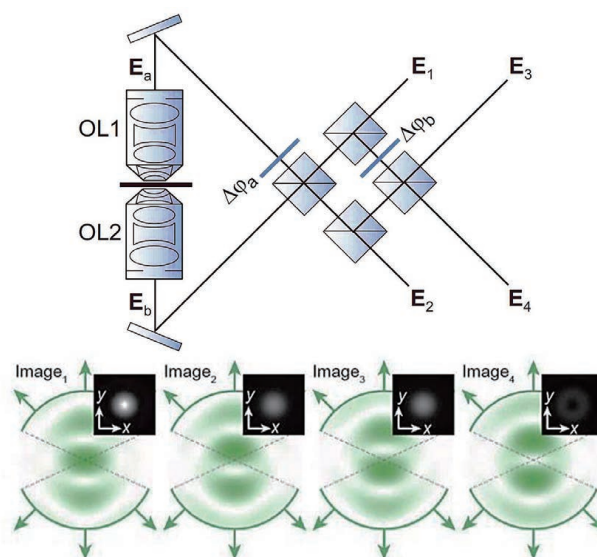


图 18 4Pi-SMLM 系统示意图^[5, 124]

Fig. 18 Schematic of 4Pi-SMLM system^[5, 124]

3.4.1 iPALM

2009 年 Shtengel 等^[123] 首次将 PALM 与 4Pi 结合, 并将其命名为干涉测量型 PALM (iPALM)。如图 19 所示, iPALM 使用 3 通道分束器将荧光分

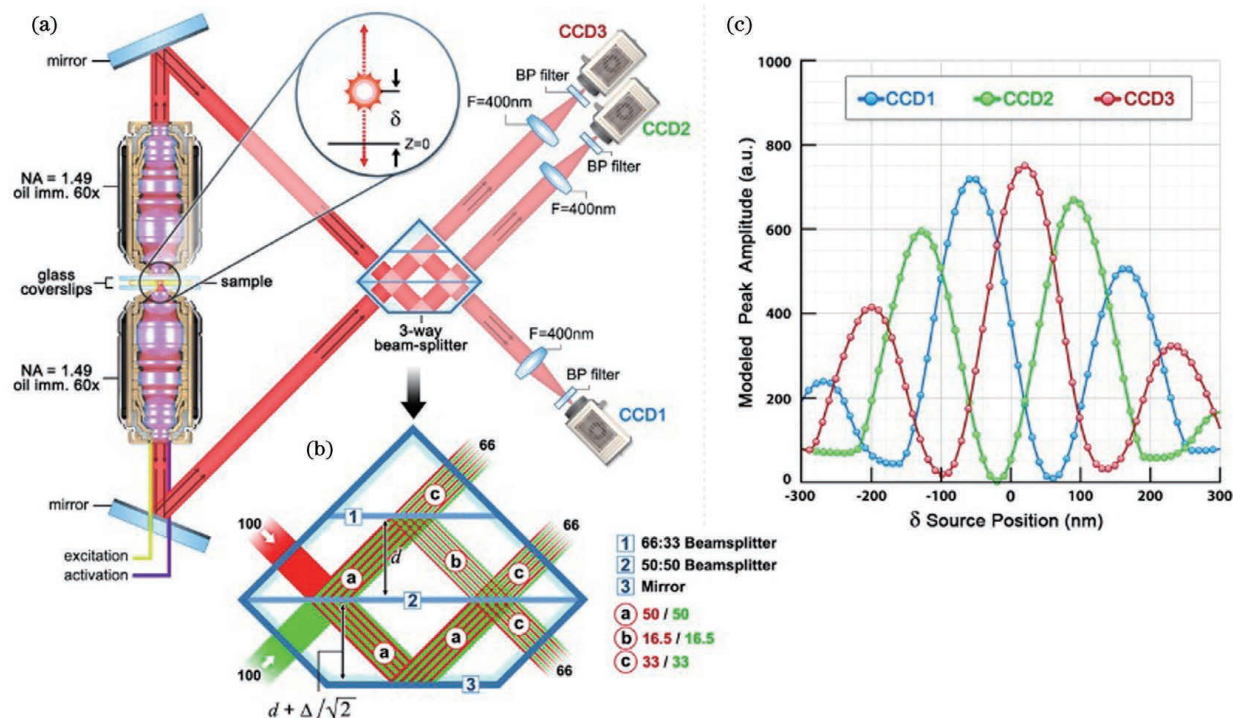


图 19 iPALM 系统示意图^[123]。(a) 实验装置; (b) 从 z 位置为 δ 的荧光团发出的两束光在特制的 3 通道分束器中发生干涉; (c) 每个通道中相机探测到的振幅分布, 相邻两个通道之间的相位差为 120°

Fig. 19 Schematic of iPALM system^[123]. (a) Experimental setup; (b) two beams emitted from a fluorophore with z -position δ interfere in a special 3-channel beam splitter; (c) amplitude distribution detected by camera in each channel, and the phase difference between two adjacent channels is 120°

成3个光束并产生自干涉,且每个通道之间的相位差为 $\pi/3$,找到每帧图像中荧光分子的中心即可实现横向定位;对于轴向定位,同时获取3个通道中同一荧光分子的强度并通过强度与轴向位置的关系曲线,即可得到该分子的相对轴向位置,最终实现三维定位。iPALM的横向和轴向定位精度分别为20 nm和10 nm,对生物细胞结构进行三维成像时可以达到20 nm以下的三维分辨率,因此iPALM可以清晰分辨出细胞微管、质膜、内质网等细胞结构^[125-127],在这其中轴向分辨率最高可以达到10 nm左右。当然,iPALM也有局限性,由于他们把荧光波前当作平面波来分析,iPALM的成像定位深度较小,仅为225 nm。若想扩大轴向定位范围,则可以将iPALM与其他技术相结合,不过其他技术的缺陷也可能会被引入其中^[126]。

3.4.2 4Pi-SMS

2008年,Hell课题组^[124]首次提出了将4Pi应用于SMLM的方案,并且提出了4通道分束器的概念。对于单个分子定位,此方案理论上可以实现5~10 nm的三维分辨率。2011年,他们报道了4Pi单分子开关显微镜^[122],并成功实现了双色三维成像。4Pi-SMS采用了一种三角形4Pi腔^[128],4Pi干涉腔的每个臂上都加入了一个1/4波片(光轴与安装面呈45°)和巴比涅-索雷补偿器,使得p偏振光相对于s偏振光分别产生 $\Delta\phi_a$ 和 $\Delta\phi_b$ 的相位延迟,并且保证 $\Delta\phi_a - \Delta\phi_b = \pi/2$ 。最终,通过倾斜反射镜在空间上将荧光根据偏振态和传播方向分成4个通道并同时成像在同一相机上。对于轴向定位范围超过 $\lambda/2$ 的荧光分子,分子的轴向位置之差为 $\lambda/2$ 的整数倍时,会导致干涉图案相同,使得轴向定位不准确,进而导致图像中包含轴向偏移的伪像。为此,他们不仅计算了相机上荧光分子高斯加权强度的全局

相位,还计算了其高斯加权第三中心矩阵的全局相位。因此,在成像深度为 1.5λ (~650 nm)时,4Pi-SMS的轴向分辨率至少为5.4~6.6 nm,横向分辨率为8.3~22.3 nm。于是,4Pi-SMS被应用于人体血小板和哺乳动物微管的三维成像中,成像深度为700~1000 nm。此外,相比于iPALM,4Pi-SMS的多色成像也较容易实现,只需在原本的光路中加入一个二向色镜,通过透过率和不同偏振态之间的关系以及两种偏振态的能量比率判断染料种类,实现多色成像。

3.4.3 W-4PiSMSN

为了进一步增大成像深度,2016年Huang等^[121]提出了一种全细胞4Pi单分子开关纳米显微镜(W-4PiSMSN)。虽然前人解决了厚度大于250 nm的样本存在伪像的问题,但是若想实现对厚度为5~10 μm 的哺乳动物的全细胞成像,4Pi-SMS依然会受到定位密度和像差的影响^[122-123,125-127,129-130]。如图20所示,为了在哺乳动物细胞的全厚度上实现10~20 nm的三维分辨率,他们改进了4Pi-SMS的系统设计,在4Pi干涉腔的每个臂中都加入了可变形镜,用于校正系统的各种像差和优化PSF;其次,他们根据Brown等^[126]提出的4Pi-PSF偏心距分析算法进行改进,将4Pi-PSF的干涉相位(可以进行精确的轴向定位,不能区分干涉峰)及其包含像散的偏心距(可以将轴向定位范围缩小到每个干涉峰,不能提供干涉精度)所提供的信息共同用于轴向定位。因此,使用W-4PiSMSN对噬菌体、核孔和纤毛等细胞结构进行大体积三维成像,其三维分辨率均可达到10~20 nm,并且成像深度可达10 μm 左右。值得注意的是,2020年Zhang等^[120]对W-4PiSMSN的多色成像进行了改进,提出了一种使用补救荧光进行多色成像的新方法,可以同时进行三

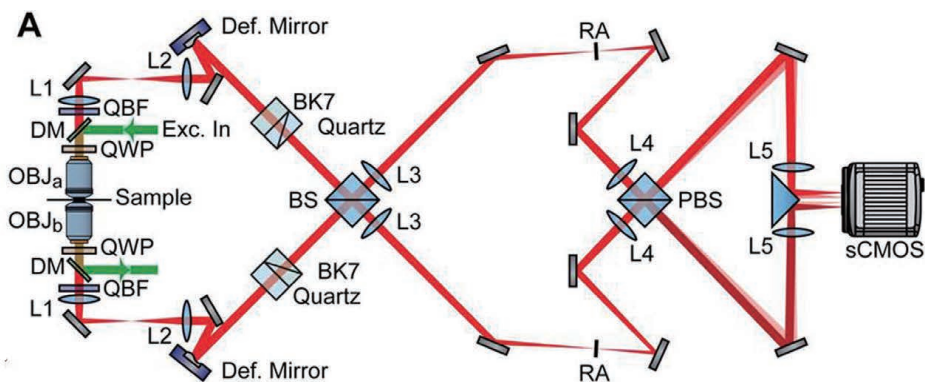


图20 W-4PiSMSN系统示意图^[121]

Fig. 20 Schematic of W-4PiSMSN system^[121]

色成像,并且补救荧光的色差偏移为1~5 nm,相比于传统的比率法,色差偏移至少增大了2倍。因此,使用补救荧光可以分辨出高度复杂的细胞结构,例如高尔基体、内质网和质膜三者之间的生物关系。另外,补救荧光也适用于单物镜系统,因此也可以在采用宽场均匀照明的系统中使用补救荧光,例如其他SMLM和SPT技术。

综上所述,4Pi-SMS的确可以实现很高的分辨率,相比于其他技术有很大的优势。但是,4Pi-SMS的系统复杂程度较高,成本较高,搭建周期长(通常为1年),存在较多的不稳定性^[119],因此全世界仅有少数实验室拥有4Pi-SMS,这也限制了4Pi-SMS在世界各地生物实验室中的广泛应用。

3.5 其他方法

2021年,中国科学院生物物理研究所徐涛院士课题组与纪伟课题组提出了一种新型轴向单分子定位成像技术,并将其命名为轴向定位重复光学选择曝光(ROSE-Z)技术^[131],这是他们基于2019年提出的ROSE技术^[132]所进行的改进研究。

在ROSE-Z中,激光通过分束器被分成两束,一束激光会聚在物镜的后焦面上,从底部激发样品,而另一束激光被透镜聚焦,从顶部激发样品。于是在样品中,这两束光将产生干涉,从而产生轴向非对称干涉光路。通过使用相位调制器对干涉条纹进行三次移相和使用振幅调制器改变激发光强(干涉条纹周期可实现263 nm),最终通过校正曲线实现轴向定位。另外,ROSE-Z的定位精度与ROSE不同,当光子数为 N 时,定位精度 σ 为

$$\sigma \approx \frac{263}{2\pi\sqrt{N}} \approx 42/\sqrt{N}, \quad (5)$$

这相比于原本横向定位精度又提升了 $\sqrt{2}$ 倍,而且为了避免干涉的周期性干扰,ROSE-Z中加入了柱透镜(引入像散),以提供初始轴向位置信息。因此,在单物镜和3000个光子的情况下,该方法的轴向定位精度可达2 nm以下,是传统像散方法定位精度的6倍以上,在对细胞微管以及线粒体等细胞结构进行三维成像时均实现了纳米精度的分辨率,且轴向深度为500~600 nm,这也证实了ROSE-Z是一种易于使用且功能强大的三维成像手段。若将ROSE与ROSE-Z相结合并解决定位所需时间较长的问题,则此技术势必会为细胞纳米结构分析提供强有力的帮助。

4 总结与展望

自从超分辨显微成像技术问世以来,其在生物

学研究方面的优势越来越明显,生物学家的各种需求也在不断刺激STED和SMLM在光学、生物、化学和计算机技术等领域的急速发展。经过了十几年的发展,越来越多的三维成像技术不断涌现出来,有些技术已经商业化并且走向其他领域。

在STED三维成像技术中,三维分辨率的提升既可以通过单物镜架构的3D-STED技术^[11]实现,又可以通过双物镜架构的isoSTED技术^[19]实现,前者相对于后者,架构更为简单且容易实现,但三维分辨率略低于后者;三维成像深度的增大既可以通过匹配物镜与浸没液折射率来实现,如选择合适的物镜和使用样品清洁技术,又可以通过像差校正的光学技术来实现,如AO STED技术^[20,32]。目前主流的SMLM三维成像技术大致可分为4种:PSF工程、多位置观测、超临界角荧光和4Pi显微镜。对于PSF工程,虽然通过引入像散、相位衍射光栅和空间光调制器对PSF进行调制,可以提高轴向分辨率和增大成像深度,但是此方法的横向分辨率及其对高密度样品的定位能力会下降。对于多位置观测,虽然使用双/多平面、增加视场角和引入视差的方法可以进行轴向超分辨,但是此技术存在像差、光子利用效率、系统复杂度和样品制备等多种影响成像质量的因素。对于超临界角荧光,虽然在SAF存在的轴向范围内,这种方法能够达到很高的轴向分辨率,但是超过此范围就无法使用SAF进行定位,需要与其他技术相结合。虽然4Pi显微镜在4种技术中的分辨能力最高,但是其系统复杂程度也是最高的。因此,本文介绍的每种技术都有各自的优缺点,选择某一种系统时,除了成像深度越大和分辨能力越好等优点是首要考虑因素外,时间以及金钱成本多和系统复杂程度高等缺点不能忽视^[5-6,8,43,45-52]。

未来,对于STED三维成像技术,实现三维的快速长时程成像是其一个发展方向,即实现 $xy-z-t$ 全四维成像^[133]。在三维成像时,由于成像空间尺度变大,成像时间变长,光漂白问题加剧。为了减少光漂白,提高成像的信噪比和分辨率,一种方法是使用自适应照明策略,如DyMIN技术^[134],在扫描无信号的背景像素时关闭损耗光,另一种方法是使用特定的荧光标记方法,如Protected STED技术^[135],利用可逆开关荧光蛋白作为标记使荧光团进入第二种暗态,或者直接用荧光团取代漂白的荧光团^[136]。为了提高成像速度、缩短成像时间,可以使用并行STED技术^[137-138],进行多焦点并行扫描。此外,将STED技术和其他技术(如定位显微技术^[139]、膨胀

显微技术^[25]和电子显微技术^[140]和深度学习技术^[141])相结合,也是其一个发展方向。对于 SMLM 三维成像技术,本文所介绍的只是所有技术中的一部分。从光学的角度来看,改善照明技术可以提升信噪比,从某种程度上也可以提高轴向分辨率、增大成像深度,例如全内反射照明^[142-143]、光片照明^[61,144-147]和转盘共聚焦照明^[148-150]等其他照明技术;也可以将 SMLM 与其他超分辨技术相结合,例如 Hell 课题组提出的 MINFLUX^[151-153]和 MINSTED^[139],虽然后者并未实现三维成像,但具有很大的可行性。从生物和化学的角度来看,利用闪烁特性好、量子产率高以及抗漂白能力强的荧光染料也可以得到分辨率较高的 SMLM 图像,例如 PAINT 技术^[154]、Exchange-PAINT 技术^[155-156]和 DNA-PAINT 技术^[116,148,155-157],其分辨率最高可达到 10 nm 以下。对算法进行改进,也可以提高分辨率、增大成像深度,特别是在对高密度物体进行成像的情况下,改进后的算法包括 DeepSTORM3D^[79]、ZOLA-3D^[158]和 SMAP-2018^[80]等多种算法^[159]。此外,通过引入冷冻技术实现超分辨光镜-电镜关联成像也是一种研究趋势,例如徐涛院士课题组的 cryo-light 系统^[160-161]、美国加州理工学院 Jensen 课题组^[162]的 cryo-PALM-CET 系统和德国马普光科学研究所 Sandoghdar 课题组^[163]的 COLD 系统等多种技术^[164-166]。

总之,经过时代的发展,超分辨显微成像正在从一系列前沿技术迅速转变为成熟的商业化技术。未来一定会出现更多的新型三维超分辨显微成像技术使科学家能够直接分辨出纳米尺度的生物样品,并同时满足他们其他的特殊需求,许多目前无法由传统分子和细胞生物学方法得到的知识也将会被填补,人们对生命科学将会有更深层次的理解。

参 考 文 献

[1] Abbe E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung[J]. Archiv Für Mikroskopische Anatomie, 1873, 9(1): 413-468.

[2] Huang B, Jones S A, Brandenburg B, et al. Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution [J]. Nature Methods, 2008, 5(12): 1047-1052.

[3] Hao X, Yang Q, Kuang C F, et al. Optical super-resolution imaging based on frequency shift [J]. Acta Optica Sinica, 2021, 41(1): 0111001. 郝翔, 杨青, 匡翠方, 等. 光学移频超分辨成像技

术进展[J]. 光学学报, 2021, 41(1): 0111001.

- [4] Chen Y C, Li C K, Hao X, et al. Progress of point scanning super-resolution microscopy based on frequency shifting [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2020, 57(18): 180001. 陈宇宸, 李传康, 郝翔, 等. 点扫描移频超分辨显微成像进展[J]. 激光与光电子学进展, 2020, 57(18): 180001.
- [5] Hao X, Li Y M, Fu S, et al. Review of 4Pi fluorescence nanoscopy [EB/OL]. (2020-12-09) [2021-05-28]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095809920303647>.
- [6] Heintzmann R, Gustafsson M G L. Subdiffraction resolution in continuous samples[J]. Nature Photonics, 2009, 3(7): 362-364.
- [7] Hell S W, Schmidt R, Egner A. Diffraction-unlimited three-dimensional optical nanoscopy with opposing lenses[J]. Nature Photonics, 2009, 3(7): 381-387.
- [8] Zhuang X W. Nano-imaging with STORM [J]. Nature Photonics, 2009, 3(7): 365-367.
- [9] Zhao T Y, Wang Z J, Feng K, et al. High-speed structured illumination microscopy and its applications[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2020, 57(24): 240001. 赵天宇, 汪召军, 冯坤, 等. 高速超分辨结构光照明显微的关键技术及应用[J]. 激光与光电子学进展, 2020, 57(24): 240001.
- [10] Klar T A, Jakobs S, Dyba M, et al. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 2000, 97(15): 8206-8210.
- [11] Harke B, Ullal C K, Keller J, et al. Three-dimensional nanoscopy of colloidal crystals[J]. Nano Letters, 2008, 8(5): 1309-1313.
- [12] Gould T J, Burke D, Bewersdorf J, et al. Adaptive optics enables 3D STED microscopy in aberrating specimens [J]. Optics Express, 2012, 20(19): 20998-21009.
- [13] Lenz M O, Sinclair H G, Savell A, et al. 3-D stimulated emission depletion microscopy with programmable aberration correction [J]. Journal of Biophotonics, 2014, 7(1/2): 29-36.
- [14] Wildanger D, Medda R, Kastrup L, et al. A compact STED microscope providing 3D nanoscale resolution [J]. Journal of Microscopy, 2009, 236(1): 35-43.
- [15] Heine J, Wurm C A, Keller-Findeisen J, et al. Three dimensional live-cell STED microscopy at increased depth using a water immersion objective

- [J]. The Review of Scientific Instruments, 2018, 89(5): 053701.
- [16] Gould T J, Kromann E B, Burke D, et al. Auto-aligning stimulated emission depletion microscope using adaptive optics[J]. Optics Letters, 2013, 38(11): 1860-1862.
- [17] Hell S, Stelzer E H K. Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope[J]. Journal of the Optical Society of America A, 1992, 9(12): 2159-2166.
- [18] Dyba M, Hell S W. Focal spots of size $\lambda/23$ open up far-field fluorescence microscopy at 33 nm axial resolution[J]. Physical Review Letters, 2002, 88(16): 163901.
- [19] Schmidt R, Wurm C A, Jakobs S, et al. Spherical nanosized focal spot unravels the interior of cells[J]. Nature Methods, 2008, 5(6): 539-544.
- [20] Hao X, Allgeyer E S, Lee D-R, et al. Three-dimensional adaptive optical nanoscopy for thick specimen imaging at sub-50-nm resolution[J]. Nature Methods, 2021, 18(6): 688-693.
- [21] Hao X, Allgeyer E S, Booth M J, et al. Point-spread function optimization in isoSTED nanoscopy [J]. Optics Letters, 2015, 40(15): 3627-3630.
- [22] Booth M J. Adaptive optical microscopy: the ongoing quest for a perfect image[J]. Light: Science & Applications, 2014, 3(4): e165.
- [23] Yang X S, Xie H, Alonas E, et al. Mirror-enhanced super-resolution microscopy [J]. Light: Science & Applications, 2016, 5(6): e16134.
- [24] Chen F, Tillberg P W, Boyden E S. Expansion microscopy [J]. Science, 2015, 347(6221): 543-548.
- [25] Gao M, Maraschini R, Beutel O, et al. Expansion stimulated emission depletion microscopy (ExSTED) [J]. ACS Nano, 2018, 12(5): 4178-4185.
- [26] Vicidomini G, Bianchini P, Diaspro A. STED super-resolved microscopy [J]. Nature Methods, 2018, 15(3): 173-182.
- [27] Hell S, Reiner G, Cremer C, et al. Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index [J]. Journal of Microscopy, 1993, 169(3): 391-405.
- [28] Urban N T, Willig K I, Hell S W, et al. STED nanoscopy of actin dynamics in synapses deep inside living brain slices [J]. Biophysical Journal, 2011, 101(5): 1277-1284.
- [29] Zhu X, Huang L, Zheng Y, et al. Ultrafast optical clearing method for three-dimensional imaging with cellular resolution [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(23): 11480-11489.
- [30] Unnersjö-Jess D, Scott L, Blom H, et al. Super-resolution stimulated emission depletion imaging of slit diaphragm proteins in optically cleared kidney tissue[J]. Kidney International, 2016, 89(1): 243-247.
- [31] Angibaud J, Mascalchi P, Poujol C, et al. A simple tissue clearing method for increasing the depth penetration of STED microscopy of fixed brain slices [J]. Journal of Physics D: Applied Physics, 2020, 53(18): 184001.
- [32] Velasco M G M, Zhang M, Antonello J, et al. 3D super-resolution deep-tissue imaging in living mice [J]. Optica, 2021, 8(4): 442-450.
- [33] Wang K, Milkie D E, Saxena A, et al. Rapid adaptive optical recovery of optimal resolution over large volumes [J]. Nature Methods, 2014, 11(6): 625-628.
- [34] Aviles-Espinosa R, Andilla J, Porcar-Guezenec R, et al. Measurement and correction of *in vivo* sample aberrations employing a nonlinear guide-star in two-photon excited fluorescence microscopy [J]. Biomedical Optics Express, 2011, 2(11): 3135-3149.
- [35] Patton B R, Burke D, Oswald D, et al. Three-dimensional STED microscopy of aberrating tissue using dual adaptive optics [J]. Optics Express, 2016, 24(8): 8862-8876.
- [36] Yan W, Yang Y L, Tan Y, et al. Coherent optical adaptive technique improves the spatial resolution of STED microscopy in thick samples [J]. Photonics Research, 2017, 5(3): 176-181.
- [37] Zdankowski P, McGloin D, Swedlow J R. Full volume super-resolution imaging of thick mitotic spindle using 3D AO STED microscope [J]. Biomedical Optics Express, 2019, 10(4): 1999-2009.
- [38] Antonello J, Barbotin A, Chong E Z, et al. Multi-scale sensorless adaptive optics: application to stimulated emission depletion microscopy [J]. Optics Express, 2020, 28(11): 16749-16763.
- [39] Zdańkowski P, Trusiak M, McGloin D, et al. Numerically enhanced stimulated emission depletion microscopy with adaptive optics for deep-tissue super-resolved imaging [J]. ACS Nano, 2020, 14(1): 394-405.
- [40] Kromann E B, Gould T J, Juetten M F, et al. Quantitative pupil analysis in stimulated emission depletion microscopy using phase retrieval [J]. Optics Letters, 2012, 37(11): 1805-1807.
- [41] Yu W T, Ji Z H, Dong D S, et al. Super-resolution

- deep imaging with hollow Bessel beam STED microscopy[J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2016, 10(1): 147-152.
- [42] Speidel M, Jonáš A, Florin E L. Three-dimensional tracking of fluorescent nanoparticles with subnanometer precision by use of off-focus imaging [J]. *Optics Letters*, 2003, 28(2): 69-71.
- [43] Huang B, Bates M, Zhuang X W. Super-resolution fluorescence microscopy [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, 78(1): 993-1016.
- [44] Greengard A, Schechner Y Y, Piestun R. Depth from diffracted rotation [J]. *Optics Letters*, 2006, 31(2): 181-183.
- [45] Ram S, Prabhat P, Chao J, et al. Localizing single molecules in three dimensions: a brief review [C]// 2008 42nd Asilomar Conference on Signals, Systems and Computers, October 26-29, 2008, Pacific Grove, CA, USA. New York: IEEE Press, 2008: 64-66.
- [46] Patterson G, Davidson M, Manley S, et al. Superresolution imaging using single-molecule localization [J]. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2010, 61: 345-367.
- [47] Hajj B, El Beheiry M, Izeddin I, et al. Accessing the third dimension in localization-based super-resolution microscopy [J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2014, 16(31): 16340-16348.
- [48] von Diezmann L, 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.
- [49] Liu W J, Toussaint K C, Jr, Okoro C, et al. Breaking the axial diffraction limit: a guide to axial super-resolution fluorescence microscopy [J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2018, 12(8): 1700333.
- [50] 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.
- [51] Zhou Y Z, Handley M, Carles G, et al. Advances in 3D single particle localization microscopy [J]. *APL Photonics*, 2019, 4(6): 060901.
- [52] Liu S, Huh H, Lee S H, et al. Three-dimensional single-molecule localization microscopy in whole-cell and tissue specimens [J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2020, 22: 155-184.
- [53] Liu S, Lidke K A. A multiemitter localization comparison of 3D superresolution imaging modalities [J]. *Chemphyschem*, 2014, 15(4): 696-704.
- [54] Kao H P, Verkman A S. Tracking of single fluorescent particles in three dimensions: use of cylindrical optics to encode particle position [J]. *Biophysical Journal*, 1994, 67(3): 1291-1300.
- [55] 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.
- [56] Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-796.
- [57] 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.
- [58] Izeddin I, Beheiry M E, Andilla J, et al. PSF shaping using adaptive optics for three-dimensional single-molecule super-resolution imaging and tracking [J]. *Optics Express*, 2012, 20(5): 4957-4967.
- [59] Xu K, Babcock H P, Zhuang X. Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(2): 185-188.
- [60] Cella Zanacchi F, Lavagnino Z, Perrone Donnorso M, et al. Live-cell 3D super-resolution imaging in thick biological samples [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(12): 1047-1049.
- [61] Wäldchen F, Schlegel J, Götz R, et al. Whole-cell imaging of plasma membrane receptors by 3D lattice light-sheet dSTORM [J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 887.
- [62] Bon P, Linarès-Loyez J, Feyeux M, et al. Self-interference 3D super-resolution microscopy for deep tissue investigations [J]. *Nature Methods*, 2018, 15(6): 449-454.
- [63] Linarès-Loyez J, Ferreira J S, Rossier O, et al. Self-interference (SELI) microscopy for live super-resolution imaging and single particle tracking in 3D [J]. *Frontiers in Physics*, 2019, 7: 68.
- [64] Pavani S R, 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.
- [65] Pavani S R P, Piestun R. Three dimensional tracking of fluorescent microparticles using a photon-limited double-helix response system [J]. *Optics Express*, 2008, 16(26): 22048-22057.

- [66] Agrawal A, Colomb W, Gaumer S. High precision 3D single molecule microscopy using the double helix point spread function [J]. *Microscopy and Microanalysis*, 2020, 26(S2): 1586-1589.
- [67] Yoon J, Comerci C J, Weiss L E, et al. Revealing nanoscale morphology of the primary cilium using super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2019, 116(2): 319-329.
- [68] Gahlmann A, Ptacin J L, Grover G, et al. Quantitative multicolor subdiffraction imaging of bacterial protein ultrastructures in three dimensions [J]. *Nano Letters*, 2013, 13(3): 987-993.
- [69] Baddeley D, Cannell M B, Soeller C. Three-dimensional sub-100 nm super-resolution imaging of biological samples using a phase ramp in the objective pupil [J]. *Nano Research*, 2011, 4(6): 589-598.
- [70] Lew M D, Lee S F, Badieirostami M, et al. Corkscrew point spread function for far-field three-dimensional nanoscale localization of pointlike objects[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(2): 202-204.
- [71] 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.
- [72] Shechtman Y, Sahl S J, Backer A S, et al. Optimal point spread function design for 3D imaging [J]. *Physical Review Letters*, 2014, 113(13): 133902.
- [73] Shechtman Y, Weiss L E, Backer A S, et al. Precise three-dimensional scan-free multiple-particle tracking over large axial ranges with tetrapod point spread functions[J]. *Nano Letters*, 2015, 15(6): 4194-4199.
- [74] Backer A S, Backlund M P, von Diezmann A R, et al. A bisected pupil for studying single-molecule orientational dynamics and its application to three-dimensional super-resolution microscopy[J]. *Applied Physics Letters*, 2014, 104(19): 193701.
- [75] Zhou Y Z, Zammit P, Carles G, et al. Computational localization microscopy with extended axial range [J]. *Optics Express*, 2018, 26(6): 7563-7577.
- [76] Zhou Y Z, Zammit P, Zickus V, et al. Twin-Airy point-spread function for extended-volume particle localization[J]. *Physical Review Letters*, 2020, 124(19): 198104.
- [77] Zhou Y Z, Zickus V, Zammit P, et al. High-speed extended-volume blood flow measurement using engineered point-spread function [J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(12): 6444-6454.
- [78] 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.
- [79] 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.
- [80] Li Y, 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.
- [81] Prabhat P, Ram S, Ward E S, et al. Simultaneous imaging of different focal planes in fluorescence microscopy for the study of cellular dynamics in three dimensions[J]. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 2004, 3(4): 237-242.
- [82] Ram S, Prabhat P, Chao J, et al. High accuracy 3D quantum dot tracking with multifocal plane microscopy for the study of fast intracellular dynamics in live cells[J]. *Biophysical Journal*, 2008, 95(12): 6025-6043.
- [83] Ram S, Chao J, Prabhat P, et al. A novel approach to determining the three-dimensional location of microscopic objects with applications to 3D particle tracking [J]. *Proceedings of SPIE*, 2007, 6443: 64430D.
- [84] Ram S, Prabhat P, Ward E S, et al. Improved single particle localization accuracy with dual objective multifocal plane microscopy [J]. *Optics Express*, 2009, 17(8): 6881-6898.
- [85] Ram S, Kim D, Ober R J, et al. 3D single molecule tracking with multifocal plane microscopy reveals rapid intercellular transferrin transport at epithelial cell barriers [J]. *Biophysical Journal*, 2012, 103(7): 1594-1603.
- [86] Juette M F, Gould T J, Lessard M D, et al. Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(6): 527-529.
- [87] Mlodzianoski M J, Schreiner J M, Callahan S P, et al. Sample drift correction in 3D fluorescence photoactivation localization microscopy [J]. *Optics Express*, 2011, 19(16): 15009-15019.
- [88] Ries J, Kaplan C, Platonova E, et al. A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(6): 582-584.
- [89] Blanchard P M, Greenaway A H. Simultaneous

- multiplane imaging with a distorted diffraction grating[J]. *Applied Optics*, 1999, 38(32): 6692-6699.
- [90] Abrahamsson S, Chen J, Hajj B, et al. Fast multicolor 3D imaging using aberration-corrected multifocus microscopy[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(1): 60-63.
- [91] Hajj B, Wisniewski J, El Beheiry M, et al. Whole-cell, multicolor superresolution imaging using volumetric multifocus microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2014, 111(49): 17480-17485.
- [92] Hajj B, Oudjedi L, Fiche J B, et al. Highly efficient multicolor multifocus microscopy by optimal design of diffraction binary gratings[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 5284.
- [93] Mait J N. Understanding diffractive optic design in the scalar domain[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 1995, 12(10): 2145-2158.
- [94] Abrahamsson S, McQuilken M, Mehta S B, et al. MultiFocus Polarization Microscope (MF-PolScope) for 3D polarization imaging of up to 25 focal planes simultaneously[J]. *Optics Express*, 2015, 23(6): 7734-7754.
- [95] Descloux A, Großmayer K S, Bostan E, et al. Combined multi-plane phase retrieval and super-resolution optical fluctuation imaging for 4D cell microscopy[J]. *Nature Photonics*, 2018, 12(3): 165-172.
- [96] Louis B, Camacho R, Bresolí-Obach R, et al. Fast-tracking of single emitters in large volumes with nanometer precision[J]. *Optics Express*, 2020, 28(19): 28656-28671.
- [97] Sims R R, Rehman S A, Lenz M O, et al. Single molecule light field microscopy[J]. *Optica*, 2020, 7(9): 1065-1072.
- [98] Hajj B, Beheiry M E, Dahan M. PSF engineering in multifocus microscopy for increased depth volumetric imaging[J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(3): 726-731.
- [99] Oudjedi L, Fiche J B, Abrahamsson S, et al. Astigmatic multifocus microscopy enables deep 3D super-resolved imaging [J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(6): 2163-2173.
- [100] McMahon M D, Berglund A J, Carmichael P, et al. 3D particle trajectories observed by orthogonal tracking microscopy[J]. *ACS Nano*, 2009, 3(3): 609-614.
- [101] Tang J, Akerboom J, Vaziri A, et al. Near-isotropic 3D optical nanoscopy with photon-limited chromophores [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2010, 107(22): 10068-10073.
- [102] Yajima J, Mizutani K, Nishizaka T. A torque component present in mitotic kinesin Eg5 revealed by three-dimensional tracking[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2008, 15(10): 1119-1121.
- [103] Sun Y, McKenna J D, Murray J M, et al. Parallax: high accuracy three-dimensional single molecule tracking using split images[J]. *Nano Letters*, 2009, 9(7): 2676-2682.
- [104] Guo C L, Liu W H, Hua X W, et al. Fourier light-field microscopy [J]. *Optics Express*, 2019, 27(18): 25573-25594.
- [105] Ruckstuhl T, Verdes D. Supercritical angle fluorescence (SAF) microscopy[J]. *Optics Express*, 2004, 12(18): 4246-4254.
- [106] Dasgupta A, Deschamps J, Matti U, et al. Direct supercritical angle localization microscopy for nanometer 3D superresolution[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 1180.
- [107] Ries J, Ruckstuhl T, Verdes D, et al. Supercritical angle fluorescence correlation spectroscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2008, 94(1): 221-229.
- [108] Enderlein J, Ruckstuhl T, Seeger S. Highly efficient optical detection of surface-generated fluorescence[J]. *Applied Optics*, 1999, 38(4): 724-732.
- [109] Richards B, Wolf E, Gabor D. Electromagnetic diffraction in optical systems, II. Structure of the image field in an aplanatic system [J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series A Mathematical and Physical Sciences*, 1959, 253(1274): 358-379.
- [110] James Shirley F, Neutens P, Vos R, et al. Supercritical angle fluorescence characterization using spatially resolved Fourier plane spectroscopy [J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(7): 4263-4267.
- [111] Bourg N, Mayet C, Dupuis G, et al. Direct optical nanoscopy with axially localized detection[J]. *Nature Photonics*, 2015, 9(9): 587-593.
- [112] Winterflood C M, Ruckstuhl T, Verdes D, et al. Nanometer axial resolution by three-dimensional supercritical angle fluorescence microscopy[J]. *Physical Review Letters*, 2010, 105(10): 108103.
- [113] Cabriel C, Bourg N, Jouchet P, et al. Combining 3D single molecule localization strategies for reproducible bioimaging[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1-10.
- [114] Barroca T, Balaa K, Lévêque-Fort S, et al. Full-

- field near-field optical microscope for cell imaging [J]. *Physical Review Letters*, 2012, 108 (21): 218101.
- [115] Deschamps J, Mund M, Ries J. 3D superresolution microscopy by supercritical angle detection [J]. *Optics Express*, 2014, 22(23): 29081-29091.
- [116] Inuma R, Ke Y G, Jungmann R, et al. Polyhedra self-assembled from DNA tripods and characterized with 3D DNA-PAINT[J]. *Science*, 2014, 344 (6179): 65-69.
- [117] Zelger P, Bodner L, Velas L, et al. Defocused imaging exploits supercritical-angle fluorescence emission for precise axial single molecule localization microscopy: erratum[J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(10): 5456-5457.
- [118] de Hell S D. Doppelkonfokales Rastermikroskop: EP0491289A1[P]. 1992-06-24.
- [119] Wang J, Allgeyer E S, Sirinakis G, et al. Implementation of a 4Pi-SMS super-resolution microscope[J]. *Nature Protocols*, 2021, 16 (2): 677-727.
- [120] Zhang Y, Schroeder L K, Lessard M D, et al. Nanoscale subcellular architecture revealed by multicolor three-dimensional salvaged fluorescence imaging[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(2): 225-231.
- [121] Huang F, Sirinakis G, Allgeyer E S, et al. Ultra-high resolution 3D imaging of whole cells[J]. *Cell*, 2016, 166(4): 1028-1040.
- [122] Aquino D, Schönle A, Geisler C, et al. Two-color nanoscopy of three-dimensional volumes by 4Pi detection of stochastically switched fluorophores[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(4): 353-359.
- [123] 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 of the United States of America*, 2009, 106(9): 3125-3130.
- [124] Middendorff C V, Egner A, Geisler C, et al. Isotropic 3D Nanoscopy based on single emitter switching [J]. *Optics Express*, 2008, 16 (25): 20774-20788.
- [125] Case L B, Baird M A, Shtengel G, et al. Molecular mechanism of vinculin activation and nanoscale spatial organization in focal adhesions [J]. *Nature Cell Biology*, 2015, 17(7): 880-892.
- [126] Brown T A, Tkachuk A N, Shtengel G, et al. Superresolution fluorescence imaging of mitochondrial nucleoids reveals their spatial range, limits, and membrane interaction[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2011, 31(24): 4994-5010.
- [127] Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera A M, et al. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions[J]. *Nature*, 2010, 468(7323): 580-584.
- [128] Egner A, Jakobs S, Hell S W. Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(6): 3370-3375.
- [129] von Diezmann L, Lee M Y, Lew M D, et al. Correcting field-dependent aberrations with nanoscale accuracy in three-dimensional single-molecule localization microscopy[J]. *Optica*, 2015, 2(11): 985-993.
- [130] 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.
- [131] Gu L, Li Y, Zhang S, et al. Molecular-scale axial localization by repetitive optical selective exposure [J]. *Nature Methods*, 2021, 18(4): 369-373.
- [132] Gu L, Li Y, Zhang S, et al. Molecular resolution imaging by repetitive optical selective exposure[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(11): 1114-1118.
- [133] Wu Z Y, Xu X Z, Xi P. Stimulated emission depletion microscopy for biological imaging in four dimensions: a review[J]. *Microscopy Research and Technique*, 2021, 84(9): 1947-1958.
- [134] Heine J, Reuss M, Harke B, et al. Adaptive-illumination STED nanoscopy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(37): 9797-9802.
- [135] Danzl J G, Sidenstein S C, Gregor C, et al. Coordinate-targeted fluorescence nanoscopy with multiple off states[J]. *Nature Photonics*, 2016, 10 (2): 122-128.
- [136] Spahn C, Grimm J B, Lavis L D, et al. Whole-cell, 3D, and multicolor STED imaging with exchangeable fluorophores[J]. *Nano Letters*, 2019, 19(1): 500-505.
- [137] Bergermann F, Alber L, Sahl S J, et al. 2000-fold parallelized dual-color STED fluorescence nanoscopy [J]. *Optics Express*, 2015, 23(1): 211-223.
- [138] Bingen P, Reuss M, Engelhardt J, et al. Parallelized STED fluorescence nanoscopy[J]. *Optics Express*, 2011, 19(24): 23716-23726.
- [139] Weber M, Leutenegger M, Stoldt S, et al. MINSTED fluorescence localization and nanoscopy [J]. *Nature Photonics*, 2021, 15(5): 361-366.
- [140] Watanabe S, Punge A, Hölloppeter G, et al. Protein

- localization in electron micrographs using fluorescence nanoscopy[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(1): 80-84.
- [141] Wang H D, Rivenson Y, Jin Y Y, et al. Deep-learning enables cross-modality super-resolution in fluorescence microscopy[J]. *Nature methods*, 2019, 16(1): 103-110.
- [142] Mattheyses A L, Simon S M, Rappoport J Z. Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist[J]. *Journal of Cell Science*, 2010, 123(pt 21): 3621-3628.
- [143] Szalai A M, Siarry B, Lukin J, et al. Three-dimensional total-internal reflection fluorescence nanoscopy with nanometric axial resolution by photometric localization of single molecules [J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 517.
- [144] Yu B, Yu J, Li W, et al. Nanoscale three-dimensional single particle tracking by light-sheet-based double-helix point spread function microscopy [J]. *Applied Optics*, 2016, 55(3): 449-453.
- [145] Mangeol P, Peterman E J. High-resolution real-time dual-view imaging with multiple point of view microscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(9): 3631-3642.
- [146] Gustavsson A K, Petrov P N, Lee M Y, et al. 3D single-molecule super-resolution microscopy with a tilted light sheet [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 123.
- [147] Gustavsson A K, Petrov P N, Moerner W E. Light sheet approaches for improved precision in 3D localization-based super-resolution imaging in mammalian cells [J]. *Optics Express*, 2018, 26(10): 13122-13147.
- [148] Schueder F, Lara-Gutiérrez J, Beliveau B J, et al. Multiplexed 3D super-resolution imaging of whole cells using spinning disk confocal microscopy and DNA-PAINT[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 2090.
- [149] Chen X Z, Zeng Z P, Wang H N, et al. Three-dimensional multimodal sub-diffraction imaging with spinning-disk confocal microscopy using blinking/fluctuating probes[J]. *Nano Research*, 2015, 8(7): 2251-2260.
- [150] Hosny N A, Song M, Connelly J T, et al. Super-resolution imaging strategies for cell biologists using a spinning disk microscope[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e74604.
- [151] Gwosch K C, Pape J K, Balzarotti F, et al. MINFLUX nanoscopy delivers 3D multicolor nanometer resolution in cells[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(2): 217-224.
- [152] Eilers Y, Ta H, 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.
- [153] 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.
- [154] Sharonov A, Hochstrasser R M. Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2006, 103(50): 18911-18916.
- [155] Silverberg J L, Jungmann R, Avendano M S, et al. DNA-paint and exchange-paint for multiplexed 3D super-resolution microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2015, 108(2): 477a.
- [156] 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.
- [157] Schlichthaerle T, Lindner C, Jungmann R. Super-resolved visualization of single DNA-based tension sensors in cell adhesion[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 2510.
- [158] Aristov A, Lelandais B, Rensen E, et al. ZOLA-3D allows flexible 3D localization microscopy over an adjustable axial range[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2409.
- [159] 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.
- [160] Liu B, Xue Y, Zhao W, et al. Three-dimensional super-resolution protein localization correlated with vitrified cellular context [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13017.
- [161] Xu X J, Xue Y H, Tian B Y, et al. Ultra-stable super-resolution fluorescence cryo-microscopy for correlative light and electron cryo-microscopy [J]. *Science China Life Sciences*, 2018, 61(11): 1312-1319.
- [162] Chang Y W, Chen S, Tocheva E I, et al. Correlated cryogenic photoactivated localization microscopy and cryo-electron tomography [J]. *Nature Methods*, 2014, 11(7): 737-739.
- [163] Weisenburger S, Boening D, Schomburg B, et al. Cryogenic optical localization provides 3D protein structure data with Angstrom resolution[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(2): 141-144.

- [164] Dahlberg P D, Moerner W E. Cryogenic super-resolution fluorescence and electron microscopy correlated at the nanoscale[J]. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2021, 72: 253-278.
- [165] Kopek 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.
- [166] Sochacki K A, Shtengel G, van Engelenburg S B, et al. Correlative super-resolution fluorescence and metal-replica transmission electron microscopy [J]. *Nature Methods*, 2014, 11(3): 305-308.