

亚 20 nm 荧光超分辨显微技术研究进展(特邀)

何辰颖¹, 詹政以¹, 李传康¹, 黄宇然¹, 匡翠方^{1,2*}, 刘旭¹¹浙江大学光电科学与工程学院, 极端光学技术与仪器全国重点实验室, 浙江 杭州 310027;²浙江大学杭州国际科创中心, 浙江 杭州 311215

摘要 荧光超分辨显微技术自 20 世纪 90 年代诞生以来, 经历了多代创新与发展, 其空间分辨率已经远超衍射极限, 横向分辨率能够达 20 nm 以下, 可以实现分子尺度的生物成像与动态追踪。新一代超高分辨率显微技术的产生得益于传统超分辨技术的深度发展和结合创新。详细介绍横向分辨率在亚 20 nm 尺度的新一代荧光超分辨显微技术, 并阐述其与传统超分辨原理的联系与区别。此外, 针对分辨率的限制因素, 就光学系统、扫描策略和样品制备等方面进行探讨, 并展望高分辨率荧光显微技术在生物医学领域中的应用前景和发展方向。

关键词 荧光显微; 超分辨成像; 调制照明; 单分子定位; 扫描策略

中图分类号 O439

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP232016

Advances in Sub-20-nm Fluorescence Super-Resolution Microscopy(Invited)

He Chenying¹, Zhan Zhengyi¹, Li Chuankang¹, Huang Yuran¹, Kuang Cuifang^{1,2*}, Liu Xu¹¹State Key Laboratory of Extreme Photonics and Instrumentation, College of Optical Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, Zhejiang, China;²Hangzhou Global Scientific and Technological Innovation Center, Zhejiang University, Hangzhou 311215, Zhejiang, China

Abstract Fluorescence super-resolution microscopy has undergone several rounds of innovation and development since the 1990s. The spatial resolution of fluorescence super-resolution microscopy exceeds the diffraction limit by a wide margin, achieving a lateral resolution below to ~ 20 nm and enabling imaging and tracking at the molecular level. The latest generation of ultrahigh-resolution microscopy is the product of extensive development and innovative combination of conventional super-resolution techniques. This review aimed to introduce the new generation of fluorescence super-resolution microscopy at a sub-20-nm scale lateral resolution, and we also elucidated their similarities and differences compared with the conventional super-resolution techniques. Additionally, this review explored how emerging technologies optimize optical systems, scanning strategies, and sample preparation to improve resolution. Finally, we discussed the potential applications and development of high-resolution fluorescence microscopy in biomedical research.

Key words fluorescence microscopy; super-resolution imaging; modulated illumination; single-molecule localization; scanning strategy

1 引言

点扩散函数(PSF)描述了光学成像系统对理想点光源的响应, 可以反映系统的成像性能。由于衍射的存在, 显微系统的 PSF 通常为一定大小的艾里斑^[1]。根据瑞利判据^[2], 当两个艾里斑间距小于 $\frac{0.61\lambda}{NA}$ 时, 两个点光源的像将无法被分辨, 其中 λ 为光波长, NA 为

数值孔径。衍射极限也代表了传统光学显微技术的空间分辨率极限, 理想光学显微镜的横向分辨率 $\frac{\lambda}{2NA}$ 在 200 nm 左右^[3], 而轴向分辨率 $\frac{2\lambda}{NA^2}$ 只能达到约 500 nm^[4-5]。许多重要的生物化学分子或微生物, 如葡萄糖、蛋白质、酶、抗体、病毒等, 物理尺寸都处于 1~100 nm 范围内, 而光学显微技术受到衍射极限的限

收稿日期: 2023-08-31; 修回日期: 2023-10-17; 录用日期: 2023-10-20; 网络首发日期: 2023-11-03

基金项目: 国家自然科学基金(62125504, 62205288)、中央高校基本科研业务费专项资金项目(226-2022-00201)、浙江省“万人计划”科技创新领军人才(2020R52001)

通信作者: *cfkuang@zju.edu.cn

制,无法观察到细胞器和生物大分子水平的物质结构和生命活动。因此,超越衍射极限的荧光超分辨显微技术应运而生^[6-8]。

经典的超分辨显微成像技术可以分为如图 1 所示的 3 类:受激发射损耗显微技术(STED)^[9-11]、单分子定位成像显微技术(SMLM)^[12-19]和结构光照明显微技术(SIM)^[20-23]。STED 属于点扫描显微技术,采用激发光叠加空心损耗光的方式,通过受激辐射淬灭激发光外围的荧光信号,从而缩小有效激发区域,其横向分辨率取决于损耗光的功率,可达 20~70 nm。最早的单分子定位显微技术包括光激活定位显微技术(PALM)^[13]和随机光学重建显微技术(STORM)^[15],它们利用特殊荧光染料的光活化或光开关效应,控制荧光分子稀疏发光,即避免多个分子在一个衍射极限范围内同时发光导致不可区分;通过记录这些荧光分子分时发光(闪烁)

时产生的图像序列并定位每个分子,最终将所有定位结果重构为超分辨图像。这种技术通常基于宽场显微系统实施,重构图像的横向分辨率可达 20~30 nm。SIM 属于宽场显微技术,通过对样品进行多角度的结构光照明,扩展系统的有效光学传递函数(OTF)。相较之前提到的两种技术,SIM 具有相同视场下最快的成像速度,但其横向分辨率相对较低,约为 100 nm。

随着生物医学研究需求的变化,超分辨显微成像技术也在分辨率、成像速度、视场大小、成像深度等方面不断取得进步,其中成像分辨率提升的成果尤为显著。经过数十年的发展,超分辨显微技术已从突破衍射极限发展到横向分辨率可达亚 20 nm,甚至定位精度达埃米($1 \text{ \AA} = 0.1 \text{ nm}$)量级,能够以接近分子尺度的分辨率对核孔、染色质复合物和细胞骨架丝等生物结构进行成像。

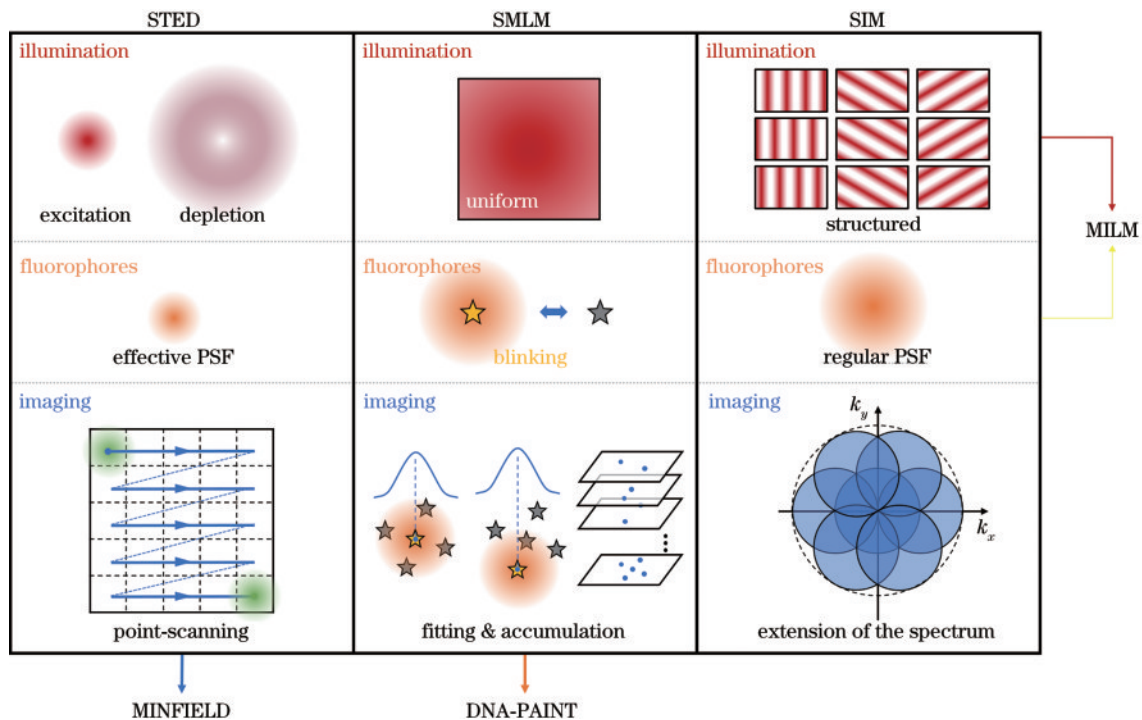


图 1 典型超分辨显微成像技术及发展概述

Fig. 1 Overview of main super-resolution microscopy concepts and development

新一代荧光超分辨显微技术在 3 类经典超分辨技术的基础上有相对深度的发展,也有相互结合的创新,如图 1 所示。针对 STED 中高损耗光强导致的光漂白和光毒性问题,MINFIELD^[24]改变了扫描策略,专注于更小的成像视场,可实现亚 20 nm 的横向分辨率;针对 SMLM 中荧光光子预算有限的问题,用于纳米形貌成像的 DNA 点积累技术(DNA-PAINT)^[25]改变了样品的标记方法,能够从单个结合位点获取更多光子进行定位,可实现优于 10 nm 的横向分辨率。结合三类经典超分辨技术的思想,另一类新的技术被提出,本文将将其称为调制照明定位显微技术(MILM)^[26-27]。MILM 对激发光进行调制,引入类似 SIM 中的条纹或是

STED 采用的空心光斑,通过激发光的位移和获得的光子数分布对单分子进行定位,提高了单个光子携带的定位信息量,从而显著提高了横向分辨率。MILM 可以分为点扫和宽场单分子定位技术:前者包括 Hell 课题组于 2017 年提出的 MINFLUX 技术^[28]和 2021 年提出的 MINSTED^[29],定位精度高达 1 nm 甚至 \AA 量级;后者包括 2019 年 Wieser 课题组^[30]提出的 SIMPLE 技术、同年徐涛和纪伟合作团队^[31]提出的 ROSE 技术、2020 年 Stallinga 课题组^[32]提出的 SIMFLUX,在光子数相同的条件下,定位精度相较传统 SMLM 提升约 2 倍。

本文从经典超分辨技术的深度发展和结合创新两

方面展开,详细介绍横向分辨率为亚 20 nm 的新一代荧光超分辨显微技术。这些超高分辨率技术能够实现分子尺度的定位、成像与追踪,为生物结构研究和生命活动观测提供更多可能。基于成像原理,详细阐述新一代超分辨显微技术与传统技术之间的联系,分析各类技术的优缺点,并探讨它们在系统、扫描策略或样品方面如何优化限制分辨率的因素。最后,列出在实现超高分辨率成像过程中需要重点关注的问题,并展望高精度荧光超分辨显微技术在生物医学领域中的应用前景和发展方向。

2 深度发展:MINFIELD 和 DNA-PAINT

2.1 从 STED 到 MINFIELD

STED 是最早实现的荧光超分辨显微技术^[10],利用聚焦激发光使艾里斑范围内的基态荧光分子跃迁至激发态,接着利用波长与荧光能级差相匹配、截面为环形的空心损耗光(下称 STED 光),使外围的荧光分子通过受激辐射回到基态,从而将自发辐射的荧光限制在环形中心周围的亚衍射大小区域,缩小了系统的有效 PSF^[33],横向分辨率可达 20~70 nm^[34-36]。在 STED 系统中,横向分辨率公式为

$$\Delta x = \frac{\lambda}{2NA \sqrt{1 + \frac{I}{I_{\text{sat}}}}}, \quad (1)$$

式中: λ 为激发波长; NA 为物镜的数值孔径; I_{sat} 是当荧光强度减小到 1/2 饱和值时 STED 光的强度特征值; I 代表实验中 STED 光的最大光强,也是影响 STED 分辨率的重要因素。由式(1)可看出, I/I_{sat} 的值越大,即 STED 光强越大,系统分辨率越高。

理论上,提高 STED 光功率可以缩小自发辐射区域,从而提升 STED 系统分辨率。但实际成像中,STED 系统分辨率因受到信噪比(SNR)的限制而不能无限提升^[37]。由于 STED 系统为点扫描系统,激发光和损耗光的聚焦光斑会随着扫描过程遍历整个视场,样品上标记的荧光分子将反复受到 STED 光照射,这将带来荧光分子漂白和生物细胞光损伤的问题,从而导致视场内荧光信号的衰减,影响成像质量。为解决 STED 分辨率提升和光漂白程度增强之间的矛盾,研究人员在 2017 年提出了 MINFIELD^[24]。该技术通过改变扫描策略,将视场限制在亚衍射大小的区域,可以在此小视场内降低 STED 光引起的光漂白,获得小于 25 nm 的横向分辨率。

对于紧聚焦在样品面上形成的环形 STED 光斑,其中心附近的光强足以产生受激辐射,即淬灭荧光。然而,环形 STED 光斑的峰值强度往往远高于中心区域的强度,这也是造成光漂白的主要原因。在 MINFIELD 中扫描策略变为:先对大视场进行共聚焦

预览,再对感兴趣区域(ROI)进行 STED 成像,但只扫描环形 STED 光中心亚衍射大小的区域。此种扫描策略可将荧光分子保持在适中的损耗光强范围内,从而显著降低样品的光漂白,收集更多的荧光信号。MINFIELD 的原理如图 2(a)和图 2(b)所示。

理想情况下,STED 光的中心强度为 0,因此分子只有位于环形圆圈中心的小区域内才能发射荧光,且该区域面积随着 STED 光功率的增加而减小。通过将成像视场缩小到图 2(a)所示的衍射极限范围内,荧光分子将始终位于 STED 光束强度适中的区域(即在环形 STED 光最小值附近),如图 2(b)所示。

图 2(c)~(e)展示了传统 STED 与 MINFIELD 在多帧成像上的对比。样品为采用 anti-gp210(红色)和 anti-FG repeat Nup(绿色)抗体标记的两栖动物细胞中的核孔复合物(NPC)。图 2(c)表明传统 STED 成像可以分辨出 NPC 结构中的八边形细节,然而,由于视场中高强度的 STED 光扫描,在这种情况下无法连续获取多张图像。图 2(c1)~(c3)显示后续多帧记录中,方框区域内的 STED 成像产生了严重的光漂白。图 2(d)体现了 MINFIELD 成像过程,首先获取低分辨率的大视场共焦图像,然后以高分辨率对小视场区域进行多次扫描,结果如图 2(d1)~(d10)所示。后续可以对获得的多帧荧光信号进行求和(SUM)或逐帧评估等处理。图 2(e)显示了 STED 和 MINFIELD 进行多帧成像时,图像红色和绿色通道信号强度变化。相较传统的 STED,MINFIELD 更好地控制了光漂白,同时可以通过多帧图像的叠加,显著提高成像结果的 SNR。换用标记误差更小的纳米抗体^[38]对 NPC 进行标记后,MINFIELD 能以高信噪比对非洲爪蟾细胞 NPC 中的 Nup93 结构进行成像,分辨率可达约 20 nm。

MINFIELD 是经典 STED 成像技术的重要改进,最大限度地降低了光漂白,提高了从 ROI 中获得的荧光信号强度。该技术将 STED 成像区域限制在与样品亚衍射特征相近的空间维度,有效避免了 STED 光束最大值(环形峰值)的强光场扫描到目标分子,从而使尺寸小于 100 nm 结构的总荧光信号强度提高 2 个数量级^[24]。此外,在成像过程中,MINFIELD 始终将荧光分子保持在 STED 光束的最小光强位置附近,这也为后文提到的 MINFLUX^[28]和 MINSTED^[29]技术的产生提供了思路。

MINFIELD 的局限性在于:成像视场较小,为准确扫描预览图中的目标区域,需要提前对扫描系统进行高精度标定;同时,由于扫描视场限制在 STED 光束的中心区域附近,被 STED 光外围峰值扫到的区域将产生严重光漂白,无法连续扩展成像视场;此外,在极高的扫描速度下,保持扫描过程的线性度和扫描视场的稳定性也是成像的重要挑战。为了使激发光和 STED 光的焦点准确按照设定的扫描位置和时序移动,MINFIELD 使用 2 台电光偏转器(EOD)实现光束

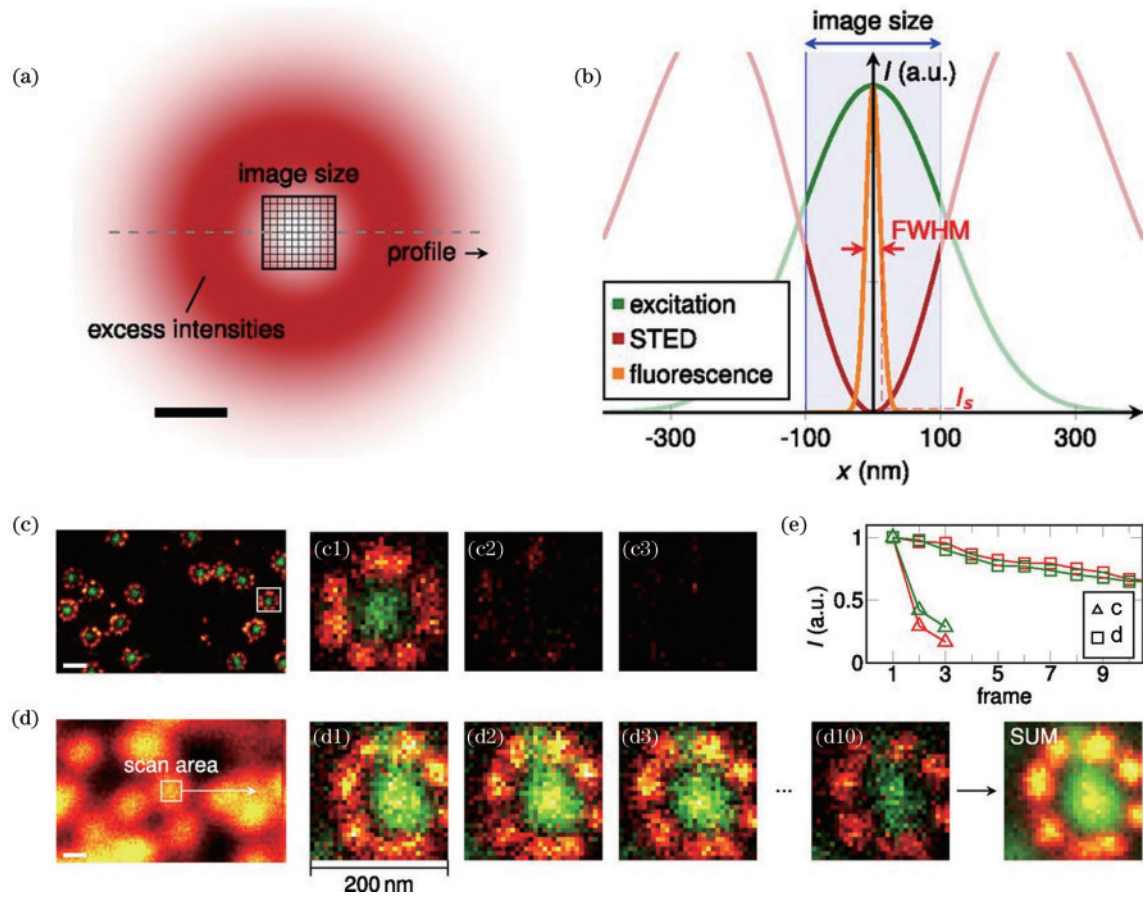


图 2 MINFIELD 原理、扫描策略和成像实验结果^[24]。(a) MINFIELD 扫描视场示意图；(b) MINFIELD 扫描时图 2(a) 中切面上的光强分布；(c)(d) STED 与 MINFIELD 对两栖动物细胞中的 NPC 进行多帧成像的对比，比例尺为 200 nm；(e) 图 2(c1)~(c3) 和图 2(d1)~(d10) 所示多帧图像的红绿通道信号强度变化

Fig. 2 Principle, scanning strategy, and imaging experiment results of MINFIELD^[24]. (a) Scanning field-of-view of MINFIELD; (b) the profile of light intensity distribution in Fig. 2(a) while MINFIELD scanning; (c)(d) comparison of multiframe imaging of STED and MINFIELD for NPCs in amphibian cells, scale bars is 200 nm; (e) signal intensity variation of red and green channels in multiple frame images shown in Fig. 2 (c1)–(c3) and Fig. 2 (d1)–(d10)

在 x 和 y 方向的偏转,增加了系统的复杂度和光路调节难度。

2.2 从 SMLM 到 DNA-PAINT

SMLM 通过对稀疏发光的荧光分子分别进行定位,并叠加所有定位点,实现超越衍射极限的分辨率。特定荧光探针的随机闪烁能将多个分子的荧光发射时间分离,从而以亚衍射精度独立定位它们的空间坐标^[39]。与需要改变系统照明方式的 STED 和 SIM 不同,SMLM 在系统上通常采用传统的宽场激发,其主要挑战在于获得样品端荧光探针良好的闪烁性能。这种闪烁是由荧光蛋白(PALM 方法采用 PA-GFP 标记)或特定有机染料(STORM 方法采用 Cy3-Cy5 标记)的固有光物理特性产生的。然而,闪烁的性能往往受到染料种类、标记密度、激活光功率和缓冲环境等因素的影响,因此较为复杂且难以控制^[40-41]。此外,由于荧光探针具有有限的光子速率和光漂白特性,SMLM 的横向分辨率受限于 20~30 nm。

另一种可用于实现 SMLM 的样品标记方式是用

于纳米形貌成像的点聚集技术(PAINT)^[42]。与将荧光团固定标记于目标分子上的技术不同,PAINT 是通过目标分子永久或瞬时结合溶液中自由扩散的染料^[42]或由染料标记的配体(如 uPAINT^[43])来实现的。相较于其他标记方法,PAINT 简化了 SMLM 样品标记的复杂性,不需要维持特殊的实验条件来获得荧光闪烁,只要探针能扩散并与目标分子结合即可。然而,在 PAINT 的实现方案中,使目标分子与荧光团结合的相互作用限于疏水相互作用或静电耦合方式,因此难以对更多种类的生物分子进行专门标记。

随着生物领域 DNA 纳米技术的发展,2010 年, DNA-PAINT^[25] 的有效性得到验证。与 PAINT 概念类似,DNA-PAINT 不依赖染料自身的光物理特性产生样品的闪烁,而是利用 DNA 双链的互补性,短暂地将荧光染料标记至目标分子上,从而大大提高了荧光探针的稳定性和光子速率。DNA-PAINT 的原理如图 3(a) 所示,样品标记方式主要由对接链(docking)和成像链(imager)实现。它们是互补的单链短 DNA,通

常长度为 8~10 个核苷酸。对接链通过标准免疫标记法固定在待成像的生物样品上^[44], 成像链则与染料偶联, 在环境中自由扩散。由于互补序列, 成像链可以短暂地与对接链结合。结合期间, 成像链在相对较长时间内固定在同一位置, 从而使相机能收集足够的光子, 实现单次定位。在缓冲环境下, 一条对接链可以反复结合

多条成像链, 这极大地增加了从样品单个结合位点 (binding site) 处接收到的荧光光子数量, 从而显著提高了定位精度和成像分辨率。图 3(b) 和图 3(c) 展示了利用 DNA-PAINT 技术对 DNA 折纸进行标记的宽场与超分辨成像结果对比^[45], 可以清晰分辨间隔 20 nm 的结构。

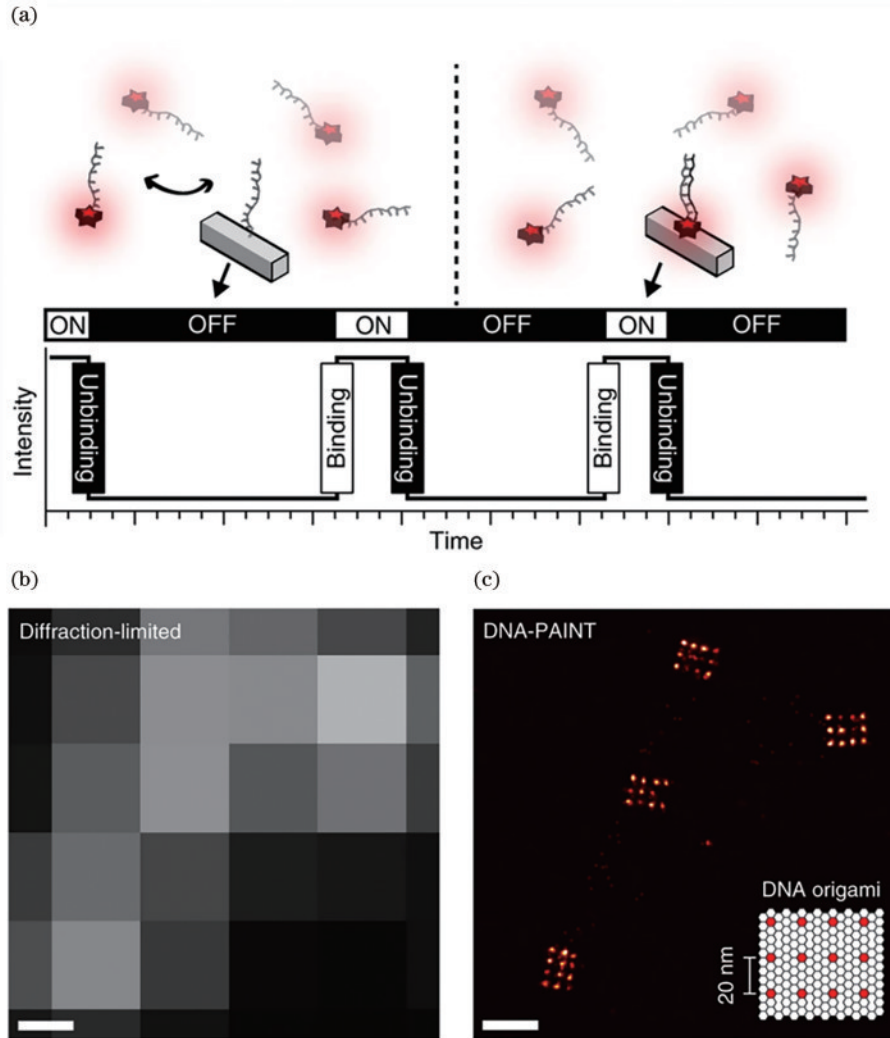


图 3 DNA-PAINT 原理和成像实验结果^[45]。(a) DNA-PAINT 概念示意图;(b)(c) DNA 折纸纳米结构的衍射受限图和超分辨 DNA-PAINT 图像, DNA 折纸结构由排列在 20 nm 网格中的 12 个对接链组成, 如图 3(c) 右下角所示, 比例尺为 100 nm
Fig. 3 Principle and imaging experimental results of DNA-PAINT^[45]. (a) DNA-PAINT concept; (b)(c) diffraction-limited image and super-resolved DNA-PAINT image of DNA origami nanostructures. Each DNA origami nanostructure consists of 12 docking strands that are arranged in a 20-nm size grid shown in lower right corner of Fig3(c), scale bar is 100 nm

利用 DNA-PAINT 标记样品, 可以对成像过程中的闪烁动力学进行精细的外部控制, 以达到最佳的成像效果, 消除了传统标记方法受到的染料性质或激活光等条件的限制。一方面, 对接链和成像链的结合持续时间(类似传统单分子荧光染料的荧光发射时间)取决于所形成 DNA 双链体的稳定性, 该稳定性能通过调节 DNA 短链长度、环境温度或 pH 值等多种方法得到调整^[46-47]。另一方面, 二者结合的频率(类似传统单分子荧光染料的荧光闪烁频率)能通过调节缓冲液中成

像链的浓度得到控制^[48]。另外, 向成像缓冲液中添加特定成分, 例如除氧系统或三重态淬灭剂等^[49-52], 可以显著降低荧光染料的光漂白。即使个别染料在结合期间被漂白, 缓冲溶液中的其余成像链仍然可以在下次结合时继续发光。这些样品标记带来的优势使得 DNA-PAINT 能够实现极高的定位精度 (~1 nm, 50000 光子数^[53]), 从而在荧光超分辨技术发展历程中实现真正的分子尺度分辨率。

与传统的单分子定位成像技术相比, DNA-

PAINT 虽然具有上述多种优势,但也存在一些不足:在成像过程中,未结合的成像链自由扩散会形成动态荧光背景,从而影响系统信背比(SBR)和样品像差^[54],降低部分定位事件的准确性;同时,成像时较高的焦外荧光背景强度要求系统必须具备较强的光学层切性能,例如全内反射、倾斜或光片照明^[55-56],相比宽场的均匀照明更加复杂;此外,DNA 自身稳定性以及其与细胞核酸的潜在非特异性相互作用使得对接链难以标记于活细胞内部。因此采用 DNA-PAINT 对活细胞进行成像仍然是一个巨大的挑战。

不过利用 DNA-PAINT 的特性,经典超分辨系统中复杂的多目标成像有了新的实现方案。传统的多目标成像实验使用不同光谱特性的染料标记样品的不同结构,需要多种波长的激发光照射样品;由于系统中配置的二向色镜和滤光片的限制,一般只能对有限种类的目标进行成像。要实现多目标的多色成像,通常还需引入二向色镜,将探测模块分为不同光谱的成像通道。然而,考虑到色差等限制因素,多通道的定位精度相较单通道有所降低。Exchange-PAINT^[57]则采用不同对接链标记样品的不同结构,通过各自的互补成像链对多目标进行顺序探测。在获取一张 DNA-PAINT 图像后,清洗样品并更换缓冲液,以改变成像链种类。由于不同成像链偶联的荧光染料相同,通过重复进行成像、清洗和引入新序列的成像链步骤,能在不改变激发波长的条件下,获得样品在同一区域的多重结构图像。这样可以避免多色成像带来的色差影响,目前已实现固定细胞中的九色超分辨原位成像^[44]。此外,将 Exchange-PAINT 应用于单目标成像,还可以进一步提升 SMLM 的定位精度。例如,在顺序成像分辨率增强技术(RESI)^[58]的实验中,首次以 Å 级分辨率解析了 DNA 折纸中单碱基对的主链距离。

除 Exchange-PAINT 外,DNA-PAINT 也发展出了较多衍生技术。2016 年,qPAINT^[59]被提出并应用于复合物中的分子计数。该技术通过观察 DNA 成像链和对接链的结合与解离(闪烁)频率,推算出等比例的对接位点数量,能够反映细胞内目标分子的分布和相互作用蛋白质之间的化学计量关系,例如解析心肌细胞膜内兰尼碱信号传导受体(RyRs)的分布,进行 RyR 与调节蛋白 JPH2 之间的化学计量^[60]。2017 年,结合荧光共振能量转移(FRET)原理^[61]的 FRET-PAINT^[62]被提出。该技术将目标分子的对接链上的两个 DNA 结合位点分别用于结合供体链和受体链,通过接收受体链的 FRET 信号实现单分子成像。由于受体链只有在结合后才会通过 FRET 得到激发,因此与传统的 DNA-PAINT 相比,FRET-PAINT 成像中的背景信号显著降低,可以使用更高的成像链(供体和受体)浓度进行实验,成像速度可提高约 30 倍^[62]。

3 结合创新:调制照明定位显微技术(MILM)

在上述经典超分辨技术相对深度的发展中,通过改变扫描策略(如 MINFIELD)或样品标记方法(如 DNA-PAINT),可以降低光漂白或是增加标记荧光团的数量,从样品的给定位置获取更多的荧光光子,从而提升成像分辨率。另一种提升成像分辨率的方法则是从有限的光子预算中提取更多信息,即增加单个荧光光子所包含的定位信息量^[63],这一思想在调制照明定位显微技术中得到了实现。调制照明定位显微技术(MILM)^[27]又称为调制增强定位显微技术(meLM)^[26],结合了结构光照明(SIM)和单分子定位成像(SMLM)的概念,引入类似 SIM 使用的正弦图案或 STED 所采用的环形图案对激发光进行调制,并通过激发光的精确位移对稀疏发光的单分子样品进行定位。这可以显著提高定位精度和成像分辨率,是经典超分辨技术的一种结合与创新。

MILM 可以分为点扫单分子定位技术和宽场单分子定位技术:前者包括 2017 年提出的 MINFLUX 概念^[28]及后续 p-MINFLUX^[64]、RASTMIN^[65]、ISM-FLUX^[66]等衍生方法,以及 2021 年提出的 MINSTED^[29],定位精度高达 1 nm 甚至 Å 量级;后者则包括 SIMPLE^[30]、ROSE^[31]、SIMFLUX^[32]等技术,在光子数相同的条件下,定位精度相较传统 SMLM 提升 2 倍,分辨率也可以达亚 20 nm。

3.1 点扫 MILM

最先被提出并实现的点扫 MILM 技术是 MINFLUX。MINFLUX 是最小光子通量的简称,根据激发光局部最小值产生的最低荧光发射通量进行定位,在仅收集 500 个光子的条件下,MINFLUX 可以实现 3 nm 的定位精度^[28]。在二维定位中,MINFLUX 利用涡旋相位板(VPP)或空间光调制器(SLM)生成类似 STED 成像中的环形光斑,将其用作激发光而不是损耗光。系统采用 EOD 在焦平面上高速移动环形光斑,对目标区域进行图 4(a)所示的 4 次曝光,获得一组光子计数($n_0 \sim n_3$)。理想情况下,如果荧光分子正好位于环形激发光中心时(激发光强为 0),点探测器将不会收集到任何光子^[67], $n_i = 0$;当环形激发光中心靠近单个荧光分子时,二者距离越近(激发光强越低),收集到的光子数就越少。因此,成像过程中获取到的光子计数不仅体现了荧光强度信息,还反映了单个分子与环形激发光中心的相对位置信息。MINFLUX 使用较少的光子数就可以获得极高的定位精度,有效降低了样品的光漂白。

MINFLUX 的一大特点是定位精度与探测范围 L 相关。 L 为一组 4 次曝光下环形光斑中心构成的圆形

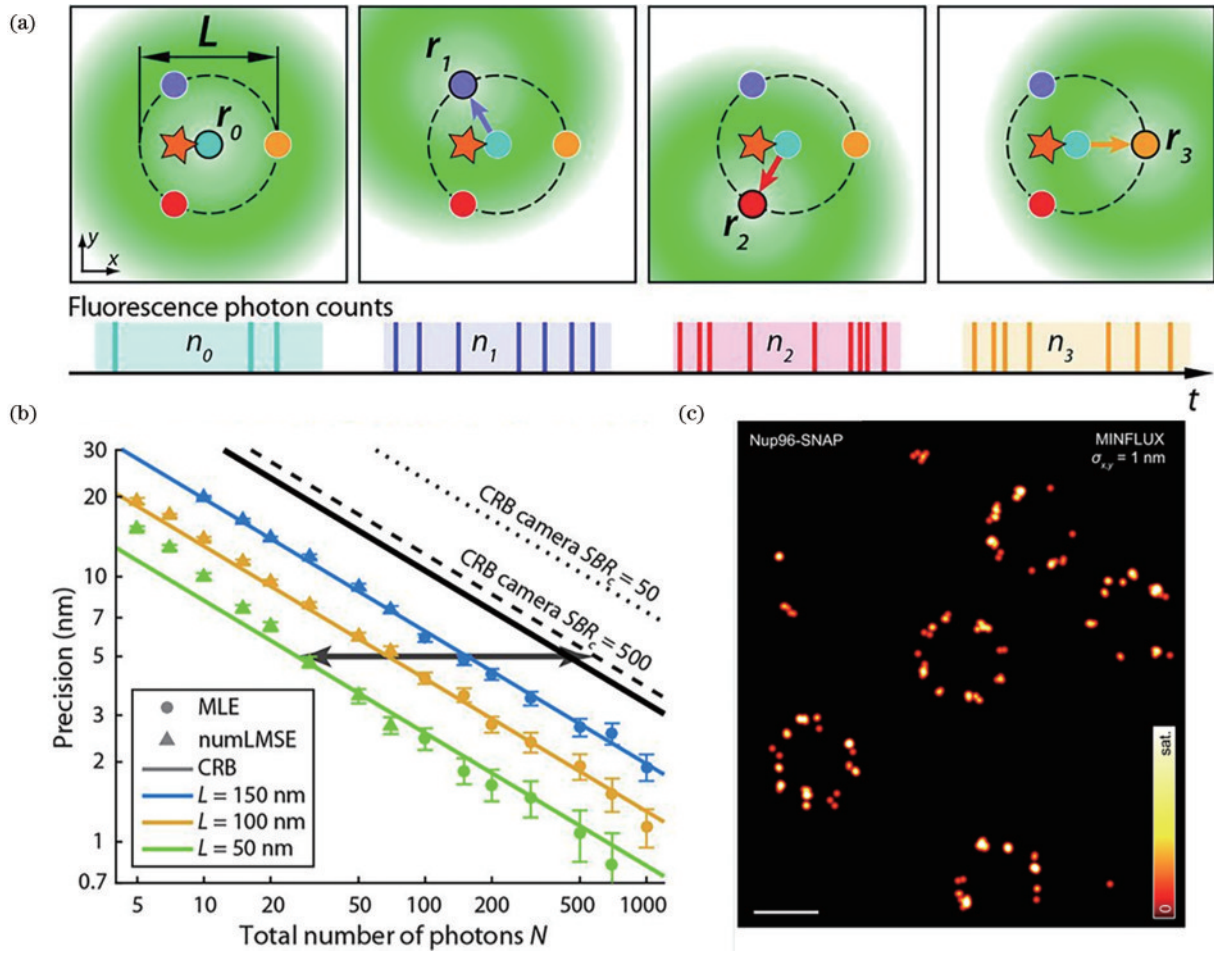


图 4 MINFLUX 原理、定位精度和成像实验结果^[28, 68]。(a) MINFLUX 二维定位扫描策略示意图；(b) 视场中心点的定位精度与检测到的光子总数 N 、视场直径 L 的关系；(c) 使用 Alexa Fluor 647 荧光染料标记的 Nup96-SNAP 的 MINFLUX 重建图像，比例尺为 100 nm

Fig. 4 Principle, localization precision, and imaging experimental results of MINFLUX^[28, 68]. (a) Diagram of 2D MINFLUX localization scanning strategy; (b) localization precision at the center of the excitation pattern as a function of total number of detected photons N and field-of-view diameter L ; (c) MINFLUX nanoscopy reconstruction of Nup96-SNAP labeled with Alexa Fluor 647 fluorescence dye, scale bar is 100 nm

直径，视场中心点的理论最高定位精度可以达到 $\frac{L}{\gamma\sqrt{N}}$ ^[68]，其中 γ 为常数，取决于激发光斑及位移的几何形状， N 为探测到的荧光光子数。将 L 降低到衍射极限以下，可使发射的荧光光子提供更多信息，相比增加光子数 N ，缩小视场 L 可以更有效地提高定位精度，如图 4(b) 所示。在实际实验中，通常先使用较大的 L 值获取分子位置的粗略估计，然后再逐步缩小 L 值进行迭代定位^[69]，以在更大的视场内实现均匀的最佳定位精度。

MINFLUX 原理的提出将超分辨成像的定位精度提升到个位数纳米量级，且有助于降低样品的光漂白。同时，MINFLUX 在单个荧光分子追踪中提供了极高的时空分辨率^[70]，因此在活细胞观察及生命活动实时监测方面具有广阔的应用前景。目前，干涉式 MINFLUX^[71] 能够以高达 1.7 nm/ms 的时空精度记录

马达蛋白 kinesin-1 在活细胞微管上的定向运动，并观察到前进过程中无负载驱动蛋白头部旋转的现象，也能以原纤维级分辨率解析微管的细胞骨架结构^[72]。DNA-PAINT MINFLUX^[73] 则结合了 Exchange-PAINT，实现了超高分辨率的多目标成像。

为实现 MINFLUX 理论上的极高定位精度，系统硬件需满足极高的要求。在成像过程中，激发光斑需要进行精确且快速的移动，因此，MINFLUX 系统选用 EOD 进行光束高速偏转，选用电光调制器 (EOM) 进行高速开关调制。然而，电光器件的价格较为昂贵，并且调试串联扫描器件、开发控制算法、主动矫正三维漂移等工程的难度较大，除 Hell 课题组外，目前全球范围内尚无独立完成完整 MINFLUX 系统搭建的其他研究团队。基于脉冲交错的 MINFLUX (p-MINFLUX)^[64] 和基于光栅扫描的 RASTMIN^[65] 在系统设计中都去除了 EOD，通过简化扫描策略，大大降低了 MINFLUX 的硬件门槛。针对 MINFLUX 高精

度定位视场较小的问题,ISM-FLUX^[66]在系统的探测部分做出修改,结合图像扫描显微镜(ISM)^[74-75]的思想,将MINFLUX的点探测器件改为阵列探测模块,大幅扩大分子的高精度定位范围,也具有同时定位多分子的能力。

MINFLUX是实现极致高分辨率的一次成功探索,同时也为MILM的发展提供了新的思路。2021年,Hell课题组提出了MINSTED^[29],使用STED中半峰全宽被压缩的有效PSF(E-PSF)边缘对单分子荧光探针进行环形扫描,并逐光子迭代定位结果。环形STED光束可以有效抑制目标荧光团附近的荧光背景,使得MINSTED相较MINFLUX进一步提高了SBR,仅需200~1000个光子即可实现1~3 nm的定位精度^[29]。随后,他们通过将STED波长蓝移(775 nm→636 nm),进一步减少了系统的热效应,并且使E-PSF的边缘也变得更加陡峭,从而实现以 $\sigma=4.7 \text{ \AA}$ 的精度(10000个光子)定位DNA链上的独立荧光团^[76]。

3.2 宽场MILM

点扫MILM受限于共焦配置,需要对每个荧光团单独进行定位。尽管其扫描速度可达8~10 kHz,但对于大视场的成像,通常仍需要较长时间,例如,对一个 $\sim 9 \mu\text{m}^2$ 大小区域内的NPC进行迭代MINFLUX成像需要大约1 h^[69]。而宽场成像可以同时定位不在一个衍射极限范围内的多个单分子,将调制照明定位思想与宽场成像结合,可以在成像速度和定位精度间获得较好的平衡。宽场MILM利用正弦图案代替传统的均匀照明,沿着与条纹垂直的方向进行3次相移和曝光,如图5(a)和图5(b)所示。在荧光团对激发光的响应可近似为线性的前提下,所收集的荧光强度与分子相对于照明图案的位置相关。通过分析3次曝光得到的一组光子数,对其按正弦照明的强度分布进行拟合,荧光强度为0的位置即为分子在该方向上的坐标,如图5(c)所示。两组正交的照明条纹进行6次相移,即可独立确定分子在 x 和 y 方向上的坐标,实现单分子的二维定位。

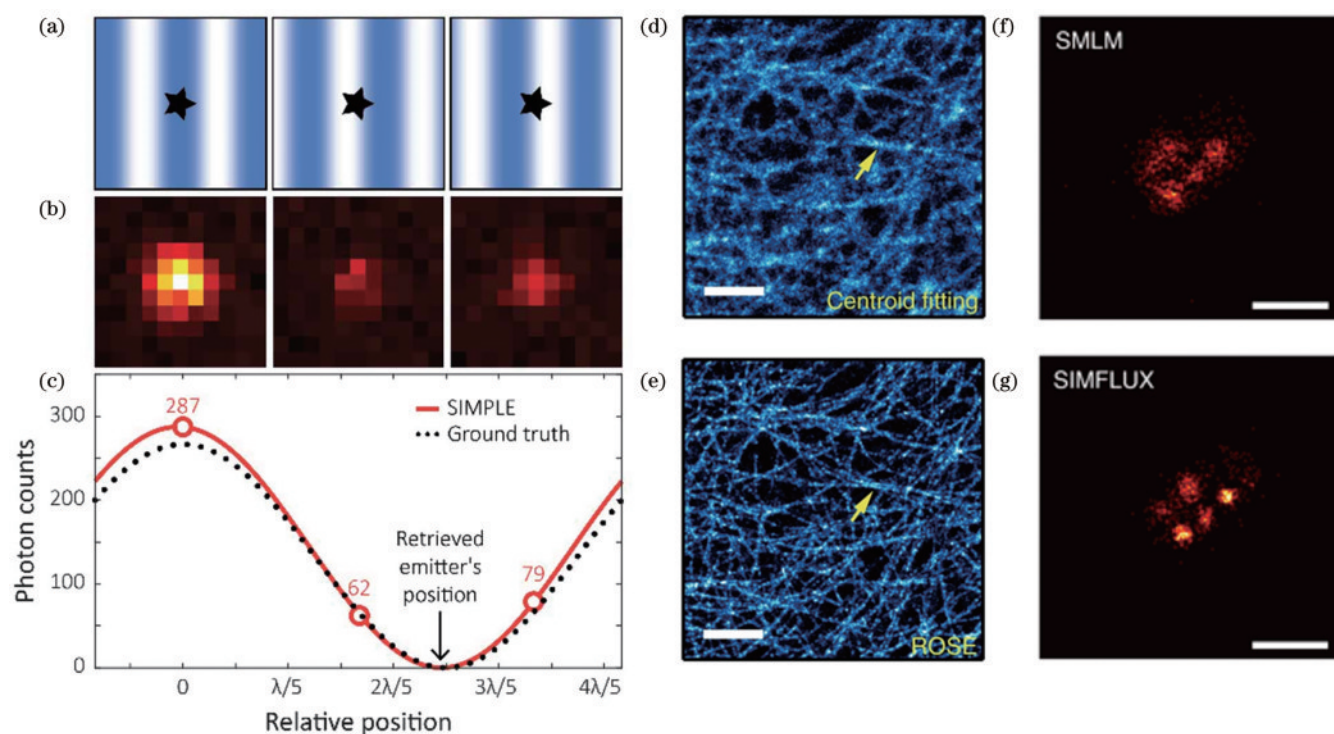


图5 宽场MILM原理和成像实验结果^[26, 31-32]。(a)~(c)宽场MILM照明、成像和定位示意图;(d)(e)SMLM与ROSE对肌动蛋白丝的重建图像,比例尺为40 nm;(f)(g)SMLM与SIMFLUX对20 nm结构的DNA折纸的重建图像,比例尺为50 nm
Fig. 5 Principle and imaging experimental results of wide-field MILM^[26, 31-32]. (a)~(c) Diagram of wide-field MILM illumination, imaging, and localization; (d)(e) images of Alexa-647-labeled actin filaments reconstructed by SMLM and ROSE, respectively, scale bars is 40 nm; (f)(g) images of DNA-origami grids with 20 nm spacing reconstructed by SMLM and SIMFLUX, respectively, scale bar is 50 nm

宽场MILM主要有基于结构化照明的点定位估计方法(SIMPLE)^[30]、重复光学选择性曝光技术(ROSE)^[31]和SIMFLUX^[32]等。与点扫描MILM不同,宽场MILM在全视场范围内具有均匀的定位精度提升,在探测到相同光子数的条件下,其定位精度相比

SMLM的理论极限可提高2倍,在微米级的视场内达4.7 nm^[30]。图5(d)和图5(e)分别展示了SMLM质心拟合方法和ROSE方法对Alexa-647标记的肌动蛋白丝重建的图像,ROSE可以分辨出SMLM无法分辨的两根微丝。图5(f)和图5(g)展示了结合位点间距为

20 nm 的 DNA 折纸网络的 SMLM 和 SIMFLUX 图像, SIMFLUX 有明显更优的效果。

SIMPLE 利用数字微镜(DMD)作为空间光调制器,实现照明图案的产生和精确相移。它需要在荧光分子的单次发光时间内完成视场内沿条纹方向的旋转和 6 次顺序曝光^[77]。因此, SIMPLE 的定位成像速度受限于相机的帧率,且存在部分无效定位,即荧光分子在未经历 6 次曝光前就变暗的情况。

ROSE 系统将激发光路一分为四,每组的两束光聚焦于物镜后焦面上,在样品上产生相互正交的干涉条纹。它通过前端用于偏振调制的 EOM 和偏振分束器(PBS)选通,来完成条纹方向的快速切换;条纹的高速相移则由两组激发光路中用于相位调制的 EOM 实现。探测光路分为 6 路,利用 8 kHz 的高速扫描振镜与上述 EOM 配合,将 6 张子图分别投影到两个 EMCCD 上。每组照明图案仅需 125 μ s 的曝光时间,可以有效减少荧光分子闪烁与激发光强波动的影响,并显著降低对染料开关速率的限制。此外, ROSE 还在系统中引入了二维主动漂移矫正模块,最大限度地降低漂移对定位的影响。SIMFLUX 则利用两组压电控制光栅位移,在 x 和 y 方向上产生并移动干涉条纹,并利用普克尔盒和 PBS 切换激发光路,实现条纹方向的高速转变。考虑到较长时间的图像采集会导致干涉条纹方向和相位的缓慢变化,从而产生残余漂移问题, ROSE 和 SIMFLUX 均在数据后处理过程中采用互相关算法进行矫正,提高定位准确性。

4 总结与展望

荧光超分辨显微成像技术经过近十年的迅速发展,成像分辨率进一步提高,有望为生物医学研究提供更有利的工具。主要介绍了横向分辨率在亚 20 nm 尺度的新一代荧光超分辨显微技术,这些技术的诞生离不开传统超分辨显微成像技术的深度发展和结合创新。通过改变扫描策略或样品标记方法以增加收集到的荧光光子数量,或通过引入照明调制以提高单个光子所包含的定位信息量,研究人员实现了真正意义上的分子级精度成像和动态追踪。这些理念也被运用在超分辨系统轴向分辨率的提升上,产生了 4Pi-SMS^[78-79]、3D MINFLUX^[68-69, 80]、ModLoc^[81]、ROSE-Z^[82]等技术,使高分辨率成像的维度得到拓展。

亚 20 nm 尺度荧光超分辨显微技术在分子动力学和细胞生物学等领域中具有巨大的应用潜力^[83-84]。例如:DNA-PAINT 可以在单分子水平下进行 DNA 结合和解离动力学分析,有助于推动基于 DNA 的生物传感器和分子马达的研究^[25];3D MINFLUX 能够观察亚细胞层级的结构,以超高精度对线粒体接触位点和嵴组织系统(MICOS)进行成像,从而解析 Mic10 和 Mic19 蛋白的纳米级空间排列^[80]或是监测单个 PIEZO1 分子叶片的变化,解析活细胞中 PIEZO1 离子通道在机械

刺激下的构象^[85];干涉型 MINFLUX 可以用于观测生命活动时相应蛋白质的动态结构变化,记录马达蛋白 kinesin-1 在活细胞微管上的定向运动形态,为了解其功能提供更多信息^[71-72]。

亚 20 nm 尺度荧光超分辨显微技术也具有广阔的发展前景。将其与膨胀样品技术^[86-87]相结合,将样品嵌入聚电解质水凝胶后进行物理膨胀,可以进一步提高分辨率^[88-89];在数据重建阶段引入深度学习算法^[90-92],可以减少后处理的计算时间^[93],还能通过对相似结构的学习减少重建所需的定位数量,加速原始图像的采集过程^[94];联合电子显微镜相关成像^[95],可以在细胞超微结构中观察特定的目标分子^[96-97],展示不同细胞区域间的分子分布差异,为生物学研究开拓新的思路。

然而,超高精度的成像技术在实际推广中依然存在许多挑战,传统超分辨显微技术面临的部分问题仍未解决。在系统方面,大型复杂成像系统的机械长期稳定性和控制的精确同步性对纳米级成像尤为重要,同时需要将硬件的漂移最小化^[98-99]。此外,一些高精度定位技术虽然减少了收集到的光子数量,降低了样品的光漂白,但背景噪声和探测器噪声对成像结果的影响也更加显著^[100-101]。因此,降低背景噪声水平、提高 SBR,也是稳定实现高分辨率的关键技术之一。在样品方面,对于上述超高精度的定位成像技术,实际成像结果与理想成像之间最大的差异往往来自于样品的荧光标记误差,即荧光团自身大小及其与目标分子之间的距离。开发更亮^[102]、更小^[38, 103]、更稳定的荧光探针和标记方法,或是光开关性能更优、光损伤阈值更高、生物相容性更佳的荧光染料^[104-105],成为成像分辨率提高后样品研究面临的新挑战。

亚 20 nm 荧光超分辨显微技术的发展历程体现了对分辨率的极致追求,但在实际应用中,分辨率并非是唯一重要的指标。显微技术发展的最终目的是为生物学研究提供更有意义的数据和结果。因此,亚 20 nm 荧光超分辨显微技术未来的发展方向应考虑以下几个方面:提高系统的稳定性、提高成像速度、降低样品标记的要求、扩展成像维度、与其他成像技术结合,从而使其为生物医学研究提供更多的可能性。

参 考 文 献

- [1] Airy G B. On the diffraction of an object-glass with circular aperture[J]. Transactions of the Cambridge Philosophical Society, 1835, 5: 283.
- [2] Rayleigh L. Investigations in optics, with special reference to the spectroscope[J]. The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, 1879, 8(49): 261-274.
- [3] Abbe E. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung[J]. Archiv Für Mikroskopische Anatomie, 1873, 9(1): 413-468.

- [4] Galbraith C G, Galbraith J A. Super-resolution microscopy at a glance[J]. *Journal of Cell Science*, 2011, 124(10): 1607-1611.
- [5] Yamanaka M, Smith N I, Fujita K. Introduction to super-resolution microscopy[J]. *Microscopy*, 2014, 63(3): 177-192.
- [6] Arizono M, Idziak A, Quici F, et al. Getting sharper: the brain under the spotlight of super-resolution microscopy[J]. *Trends in Cell Biology*, 2023, 33(2): 148-161.
- [7] Burgers T C Q, Vlijm R. Fluorescence-based super-resolution-microscopy strategies for chromatin studies[J]. *Chromosoma*, 2023, 132(3): 191-209.
- [8] 卫奥尼, 秦成兵, 董帅, 等. 超分辨荧光显微成像的若干研究进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2023, 60(11): 1106012.
Wei A N, Qin C B, Dong S, et al. Research progress of super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2023, 60(11): 1106012.
- [9] 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.
- [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 the United States of America*, 2000, 97(15): 8206-8210.
- [11] Klar T A, Dyba M, Hell S W. Stimulated emission depletion microscopy with an offset depleting beam[J]. *Applied Physics Letters*, 2001, 78(4): 393-395.
- [12] Betzig E. Proposed method for molecular optical imaging [J]. *Optics Letters*, 1995, 20(3): 237-239.
- [13] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [14] Hess S T, Girirajan T P K, Mason M D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2006, 91(11): 4258-4272.
- [15] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-796.
- [16] van de Linde S, Kasper R, Heilemann M, et al. Photoswitching microscopy with standard fluorophores [J]. *Applied Physics B*, 2008, 93(4): 725-731.
- [17] Lelek M, Gyparaki M T, Beliu G, et al. Single-molecule localization microscopy[J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2021, 1: 39.
- [18] 安莎, 但旦, 于湘华, 等. 单分子定位超分辨显微成像技术研究进展及展望(特邀综述)[J]. *光子学报*, 2020, 49(9): 0918001.
An S, Dan D, Yu X H, et al. Progress and prospect of research on single-molecule localization super-resolution microscopy(invited review) [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2020, 49(9): 0918001.
- [19] 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.
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.
- [20] Heintzmann R, Cremer C G. Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating[J]. *Proceedings of SPIE*, 1999, 3568: 185-196.
- [21] Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy [J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 198(2): 82-87.
- [22] Jost A, Heintzmann R. Superresolution multidimensional imaging with structured illumination microscopy[J]. *Annual Review of Materials Research*, 2013, 43: 261-282.
- [23] Heintzmann R, Huser T. Super-resolution structured illumination microscopy[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(23): 13890-13908.
- [24] Göttfert F, Pleiner T, Heine J, et al. Strong signal increase in STED fluorescence microscopy by imaging regions of subdiffraction extent[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(9): 2125-2130.
- [25] 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.
- [26] Reymond L, Huser T, Ruprecht V, et al. Modulation-enhanced localization microscopy[J]. *Journal of Physics: Photonics*, 2020, 2(4): 041001.
- [27] Sun Y L, Yin L, Cai M X, et al. Modulated illumination localization microscopy-enabled sub-10 nm resolution[J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2022, 15(2): 2230004.
- [28] 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.
- [29] Weber M, Leutenegger M, Stoldt S, et al. MINSTED fluorescence localization and nanoscopy[J]. *Nature Photonics*, 2021, 15(5): 361-366.
- [30] Reymond L, Ziegler J, Knapp C, et al. SIMPLE: structured illumination based point localization estimator with enhanced precision[J]. *Optics Express*, 2019, 27(17): 24578-24590.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] Schermelleh L, Ferrand A, Huser T, et al. Super-resolution microscopy demystified[J]. *Nature Cell Biology*, 2019, 21(1): 72-84.
- [34] Donnert G, Keller J, Medda R, et al. Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy[J].

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(31): 11440-11445.
- [35] Willig K I, Keller J, Bossi M, et al. STED microscopy resolves nanoparticle assemblies[J]. *New Journal of Physics*, 2006, 8(6): 106.
- [36] Willig K I, Rizzoli S O, Westphal V, et al. STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis[J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 935-939.
- [37] Tortarolo G, Castello M, Diaspro A, et al. Evaluating image resolution in stimulated emission depletion microscopy[J]. *Optica*, 2018, 5(1): 32-35.
- [38] 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.
- [39] Hell S W, Sahl S J, Bates M, et al. The 2015 super-resolution microscopy roadmap[J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2015, 48(44): 443001.
- [40] Huang B, Bates M, Zhuang X W. Super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, 78: 993-1016.
- [41] Lippincott-Schwartz J, Patterson G H. Photoactivatable fluorescent proteins for diffraction-limited and super-resolution imaging[J]. *Trends in Cell Biology*, 2009, 19(11): 555-565.
- [42] Sharonov A, Hochstrasser R M. Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(50): 18911-18916.
- [43] Giannone G, Hossy E, Levet F, et al. Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living cells at ultra-high density[J]. *Biophysical Journal*, 2010, 99(4): 1303-1310.
- [44] Agasti S S, Wang Y, Schueder F, et al. DNA-barcoded labeling probes for highly multiplexed Exchange-PAINT imaging[J]. *Chemical Science*, 2017, 8(4): 3080-3091.
- [45] Schnitzbauer J, Strauss M T, Schlichthaerle T, et al. Super-resolution microscopy with DNA-PAINT[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(6): 1198-1228.
- [46] Civitci F, Shanguan J L, Zheng T, et al. Fast and multiplexed superresolution imaging with DNA-PAINT-ERS[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 4339.
- [47] Chung K K H, Zhang Z, Kidd P, et al. Fluorogenic probe for fast 3D whole-cell DNA-paint[J]. *Biophysical Journal*, 2021, 120(3): 13a.
- [48] Schueder F, Stein J, Stehr F, et al. An order of magnitude faster DNA-PAINT imaging by optimized sequence design and buffer conditions[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(11): 1101-1104.
- [49] Rasnik I, McKinney S A, Ha T. Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(11): 891-893.
- [50] Aitken C E, Marshall R A, Puglisi J D. An oxygen scavenging system for improvement of dye stability in single-molecule fluorescence experiments[J]. *Biophysical Journal*, 2008, 94(5): 1826-1835.
- [51] Ha T, Tinnefeld P. Photophysics of fluorescent probes for single-molecule biophysics and super-resolution imaging[J]. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2012, 63: 595-617.
- [52] Vogelsang J, Kasper R, Steinhauer C, et al. A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, 47(29): 5465-5469.
- [53] Dai M J, Jungmann R, Yin P. Optical imaging of individual biomolecules in densely packed clusters[J]. *Nature Nanotechnology*, 2016, 11(9): 798-807.
- [54] 赵泽宇, 张肇宁, 黄振立. 超分辨定位成像中的像差表征和校正[J]. *光学学报*, 2017, 37(3): 0318004. Zhao Z Y, Zhang Z N, Huang Z L. Aberration characterization and correction in super-resolution localization microscopy[J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(3): 0318004.
- [55] Konopka C A, Bednarek S Y. Variable-angle epifluorescence microscopy: a new way to look at protein dynamics in the plant cell cortex[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2008, 53(1): 186-196.
- [56] Tokunaga M, Imamoto N, Sakata-Sogawa K. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(2): 159-161.
- [57] 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.
- [58] Reinhardt S C M, Masullo L A, Baudrexel I, et al. Ångström-resolution fluorescence microscopy[J]. *Nature*, 2023, 617(7962): 711-716.
- [59] Jungmann R, Avendaño M S, Dai M J, et al. Quantitative super-resolution imaging with qPAINT[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(5): 439-442.
- [60] Jayasinghe I, Clowsley A H, Lin R S, et al. True molecular scale visualization of variable clustering properties of ryanodine receptors[J]. *Cell Reports*, 2018, 22(2): 557-567.
- [61] Roy R, Hohng S, Ha T. A practical guide to single-molecule FRET[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(6): 507-516.
- [62] Lee J, Park S, Kang W, et al. Accelerated super-resolution imaging with FRET-PAINT[J]. *Molecular Brain*, 2017, 10(1): 63.
- [63] Masullo L A, Szalai A M, Lopez L F, et al. Fluorescence nanoscopy at the sub-10 nm scale[J]. *Biophysical Reviews*, 2021, 13(6): 1101-1112.
- [64] Masullo L A, Steiner F, Zähringer J, et al. Pulsed interleaved MINFLUX[J]. *Nano Letters*, 2021, 21(1): 840-846.
- [65] Masullo L A, Szalai A M, Lopez L F, et al. An alternative to MINFLUX that enables nanometer resolution in a confocal microscope[J]. *Light: Science & Applications*, 2022, 11: 199.
- [66] Slenders E, Vicidomini G. ISM-FLUX: MINFLUX with an array detector[J]. *Physical Review Research*, 2023, 5(2): 023033.

- [67] Hell S W. Far-field optical nanoscopy[J]. *Science*, 2007, 316(5828): 1153-1158.
- [68] Schmidt R, Weihs T, Wurm C A, et al. MINFLUX nanometer-scale 3D imaging and microsecond-range tracking on a common fluorescence microscope[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 1478.
- [69] 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.
- [70] Eilers Y, Ta H S, Gwosch K C, et al. MINFLUX monitors rapid molecular jumps with superior spatiotemporal resolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(24): 6117-6122.
- [71] Wolff J O, Scheiderer L, Engelhardt T, et al. MINFLUX dissects the unimpeded walking of Kinesin-1 [J]. *Science*, 2023, 379(6636): 1004-1010.
- [72] Deguchi T, Iwanski M K, Schentarra E M, et al. Direct observation of motor protein stepping in living cells using MINFLUX[J]. *Science*, 2023, 379(6636): 1010-1015.
- [73] Ostersehl L M, Jans D C, Wittek A, et al. DNA-PAINT MINFLUX nanoscopy[J]. *Nature Methods*, 2022, 19(9): 1072-1075.
- [74] Müller C B, Enderlein J. Image scanning microscopy[J]. *Physical Review Letters*, 2010, 104(19): 198101.
- [75] Castello M, Tortarolo G, Buttafava M, et al. A robust and versatile platform for image scanning microscopy enabling super-resolution FLIM[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(2): 175-178.
- [76] Weber M, von der Emde H, Leutenegger M, et al. MINSTED nanoscopy enters the Ångström localization range[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(4): 569-576.
- [77] Wang S Y, 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 of the United States of America*, 2014, 111(23): 8452-8457.
- [78] 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.
- [79] Wang J Y, Allgeyer E S, Sirinakis G, et al. Implementation of a 4Pi-SMS super-resolution microscope [J]. *Nature Protocols*, 2021, 16(2): 677-727.
- [80] Pape J K, Stephan T, Balzarotti F, et al. Multicolor 3D MINFLUX nanoscopy of mitochondrial MICOS proteins [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(34): 20607-20614.
- [81] Jouchet P, Cabriel C, Bourg N, et al. Nanometric axial localization of single fluorescent molecules with modulated excitation[J]. *Nature Photonics*, 2021, 15(4): 297-304.
- [82] 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.
- [83] Strauss S, Nickels P C, Strauss M T, et al. Modified aptamers enable quantitative sub-10-nm cellular DNA-PAINT imaging[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(9): 685-688.
- [84] Pujals S, Albertazzi L. Super-resolution microscopy for nanomedicine research[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(9): 9707-9712.
- [85] Mulhall E M, Gharpure A, Lee R M, et al. Direct observation of the conformational states of PIEZO1[J]. *Nature*, 2023, 620(7976): 1117-1125.
- [86] Chen F, Tillberg P W, Boyden E S. Expansion microscopy[J]. *Science*, 2015, 347(6221): 543-548.
- [87] Chang J B, Chen F, Yoon Y G, et al. Iterative expansion microscopy[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(6): 593-599.
- [88] 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: 3388.
- [89] Shi X Y, Li Q, Dai Z P, et al. Label-retention expansion microscopy[J]. *Journal of Cell Biology*, 2021, 220(9): e202105067.
- [90] LeCun Y, Bengio Y, Hinton G. Deep learning[J]. *Nature*, 2015, 521(7553): 436-444.
- [91] Qiao C, Li D, Liu Y, et al. Rationalized deep learning super-resolution microscopy for sustained live imaging of rapid subcellular processes[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(3): 367-377.
- [92] 胡芬, 林洋, 侯梦迪, 等. 基于深度学习的细胞骨架图像超分辨重建[J]. *光学学报*, 2020, 40(24): 2410001.
Hu F, Lin Y, Hou M D, et al. Super-resolution reconstruction of cytoskeleton image based on deep learning[J]. *Acta Optica Sinica*, 2020, 40(24): 2410001.
- [93] Möckl L, Roy A R, Moerner W E. Deep learning in single-molecule microscopy: fundamentals, caveats, and recent developments[J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(3): 1633-1661.
- [94] Ouyang W, Aristov A, Lelek M, et al. Deep learning massively accelerates super-resolution localization microscopy[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(5): 460-468.
- [95] Bykov Y S, Cortese M, Briggs J A G, et al. Correlative light and electron microscopy methods for the study of virus-cell interactions[J]. *FEBS Letters*, 2016, 590(13): 1877-1895.
- [96] Sochacki K A, Dickey A M, Strub M P, et al. Endocytic proteins are partitioned at the edge of the clathrin lattice in mammalian cells[J]. *Nature Cell Biology*, 2017, 19(4): 352-361.
- [97] 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.
- [98] Carter A R, King G M, Ulrich T A, et al. Stabilization of an optical microscope to 0.1 nm in three dimensions[J]. *Applied Optics*, 2007, 46(3): 421-427.
- [99] Pertsinidis A, Zhang Y X, Chu S. Subnanometre single-molecule localization, registration and distance measurements [J]. *Nature*, 2010, 466(7306): 647-651.
- [100] Mortensen K I, Churchman L S, Spudich J A, et al.

- Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 377-381.
- [101] Huang F, Hartwich T M P, Rivera-Molina F E, et al. Video-rate nanoscopy using sCMOS camera-specific single-molecule localization algorithms[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(7): 653-658.
- [102] Grimm J B, English B P, Choi H, et al. Bright photoactivatable fluorophores for single-molecule imaging [J]. *Nature Methods*, 2016, 13(12): 985-988.
- [103] Opazo F, Levy M, Byrom M, et al. Aptamers as potential tools for super-resolution microscopy[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(10): 938-939.
- [104] Wang L, Frei M S, Salim A, et al. Small-molecule fluorescent probes for live-cell super-resolution microscopy [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141 (7): 2770-2781.
- [105] Grimm J B, Tkachuk A N, Xie L Q, et al. A general method to optimize and functionalize red-shifted rhodamine dyes[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(8): 815-821.