

# 荧光原位杂交扩增探针的结构光照明超分辨成像与计数

吴寅<sup>1,2</sup>, 梁永<sup>1,2</sup>, 张洁<sup>2</sup>, 李辉<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学技术大学生物医学工程学院(苏州), 生命科学与医学部, 江苏 苏州 215163;

<sup>2</sup>中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏省医用光学重点实验室, 江苏 苏州 215163

**摘要** 人类表皮生长因子受体-2(HER2)的异常扩增会导致癌细胞的过度增殖和肿瘤恶化。在采用常规光学显微成像技术检测扩增水平较高的乳腺癌细胞HER2基因时,荧光原位杂交探针的荧光信号斑点呈簇状分布,难以精确计数。应用结构光照明超分辨成像技术对HER2基因荧光原位杂交的病理切片进行成像,从而分辨距离较近的荧光探针。通过大视场扫描成像和图像拼接,对数百个细胞进行成像和统计分析,提高了高扩增水平病理切片上HER2探针计数的准确性。

**关键词** 乳腺癌病理诊断; 荧光原位杂交; 结构光照明超分辨成像; 图像拼接

中图分类号 O438.2

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP231182

## Imaging and Enumeration of Fluorescence *in situ* Hybridization Amplification Probe using Structured-Light Illumination Super-Resolution Microscopy

Wu Yin<sup>1,2</sup>, Liang Yong<sup>1,2</sup>, Zhang Jie<sup>2</sup>, Li Hui<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Life Sciences and Medicine, School of Biomedical Engineering (Suzhou), University of Science and Technology of China, Suzhou 215163, Jiangsu, China;

<sup>2</sup>Jiangsu Key Laboratory of Medical Optics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, Jiangsu, China

**Abstract** Aberrant amplification of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) genes can lead to excessive proliferation of cancer cells and tumor progression. When conventional optical microscopy is used to detect the HER2 gene in breast cancer cells with high amplification levels, the fluorescent spots of the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) probe tend to appear as clusters, making accurate counting challenging. In this paper, structured-light illumination super-resolution microscopy is applied to image pathological sections of HER2 gene fluorescence *in situ* hybridization, in order to resolve fluorescent probes close to each other. Through large field scanning imaging and image stitching, hundreds of cells can be imaged with super-resolution and statistically analyzed. The proposed method allows more accurate enumeration of aggregated fluorescent spots on slides with high-level gene amplification.

**Key words** breast cancer pathological diagnosis; fluorescence *in situ* hybridization; structured-light illumination super-resolution imaging; image mosaic

## 1 引言

荧光原位杂交(FISH)是一种利用荧光染料标记的探针DNA在生物样品中进行杂交,进而研究特定

DNA序列在染色体上数量和位置的方法<sup>[1]</sup>。FISH作为常用的分子病理诊断的技术,可以对肿瘤组织中分子水平的基因突变进行特异性检测<sup>[2]</sup>,为临床靶向性治疗和预后评估提供依据。

收稿日期: 2023-04-27; 修回日期: 2023-06-14; 录用日期: 2023-07-12; 网络首发日期: 2023-08-07

基金项目: 国家自然科学基金(62141506,62205367)、江苏省重点研发计划(BE20200664)

通信作者: \*hui.li@sibet.ac.cn

乳腺癌作为一种常见的女性恶性肿瘤,近年来发病率逐年升高<sup>[3]</sup>。人类表皮生长因子受体-2(HER2)基因是人类 17 号染色体长臂中的原癌基因,该基因的过表达与肿瘤的发生及发展具有密切的联系。文献报道有 20% 的浸润性乳腺癌发生 HER2 扩增<sup>[4]</sup>。HER2 基因不仅是临床上乳腺癌治疗的关键靶点,也被视为重要的预后判断指标。FISH 是乳腺癌中公认的 HER2 基因状态评估方法。参照免疫组化检测结果,医生确定潜在扩增的浸润性肿瘤组织细胞,再使用荧光显微镜观察并统计细胞核中红色 HER2 与绿色 CEP17(chromosome 17 centromere)荧光信号的数目。根据 2018 版美国临床肿瘤学会/美国病理医师学院(ASCO/CAP)乳腺癌 HER2 检测指南<sup>[4]</sup>,临床上要求至少对 20 个边界完整的癌细胞核内信号进行定量统计,依据  $N_{\text{HER2}}/N_{\text{CEP17}}$  比值(其中  $N$  为数量)和 HER2 平均拷贝数( $C_{\text{HER2}}$ )这两项指标进行分级。当  $N_{\text{HER2}}/N_{\text{CEP17}} \geq 2.0$ ,且  $C_{\text{HER2}}/N_{\text{cell}} \geq 4.0$  时,此种情况判为 FISH 阳性,其中  $N_{\text{cell}}$  为细胞数量。

宽场荧光显微镜和荧光病理切片扫描仪是目前进行 FISH 病理诊断的主要成像工具<sup>[5]</sup>。然而,宽场荧光显微镜由于受到光学衍射极限的限制,当采用波长为 561 nm 的激发光时,FISH 探针的成像分辨率约为 300 nm,当细胞核中两个或多个的荧光探针距离小于成像分辨率时,将无法对其进行准确计数。要实现阳性患者的 HER2 基因水平的精确统计,需要采用更高分辨率的成像技术。激光扫描共聚焦显微成像技术(CLSM)利用物理针孔将离焦信号滤除,相比宽场荧光显微镜,明显地提高了成像信噪比。Ram 等<sup>[6]</sup>使用共聚焦荧光显微镜定位染色体目标的 DNA 片段并定量计算空间距离,提出了一种用于分割和检测 3D FISH 斑点的算法。但是由于 CLSM 采用点扫描方式进行成像,成像速度较慢,目前在实际的 FISH 诊断中没有广泛应用,并且其分辨率也同样受到光学衍射极限的限制,只能达到 200 nm 左右。近年来发展的超分辨成像装置有望为 FISH 辅助诊断带来新突破。随机光学重建显微镜(STORM)通过使用具有开关特性的荧光染料对样本进行特异性标记<sup>[7-8]</sup>,经过一系列的激发与淬灭,最终得到样本的超分辨图像,分辨率可以达到 10 nm。Maddox 等<sup>[9]</sup>将荧光标记的 HER2 单抗抗体作为探针,利用 STORM 技术定量评估 HER2 阳性患者治疗过程中的 HER2 密度与聚集程度。但是 STORM 超分辨成像具有成像速度慢等缺点,其特殊的染色方法也无法使用常规荧光原位杂交技术,在实际病理诊断中的应用还存在一定困难<sup>[10]</sup>。结构光照明超分辨成像技术(SIM)是另外一种宽场超分辨成像方法。SIM 利用结构光条纹照射样本,从而使样本中不可探测的高频信息搬到物镜可探测的低频域,其分辨率最高可提升至衍射极限的 2 倍,且具有时间分辨率高、对荧光染料无特殊要求等优势<sup>[11-14]</sup>。Szabo 等<sup>[15]</sup>

结合染色体构象捕获和 SIM 技术,使用 FISH 探针靶向标记了染色体的拓扑结构域,得到了果蝇细胞染色质折叠的空间视图。他们在 2021 年进一步利用 SIM 技术和 FISH 标记方法,对果蝇和哺乳动物细胞的染色体三维结构进行分析<sup>[16]</sup>。上述工作体现了 SIM 分辨率的提升对 FISH 定量分析的重要作用<sup>[17]</sup>,但是采用 FISH 进行乳腺癌病理诊断时不仅需要超分辨的成像,还需要对足够多的细胞进行成像和分析,目前还缺乏这方面的文献报道。

本文发展了基于样品扫描和图像拼接方法的大视场 SIM 技术,并将其应用于乳腺癌 HER2 基因 FISH 病理切片的成像。相较于宽场荧光显微镜,SIM 分辨率的提升提高了对扩增水平较高的细胞 HER2 基因扩增数据统计的准确性,有望成为 FISH 病理诊断的新工具。

## 2 材料及实验方法

### 2.1 样本准备和 FISH 处理

乳腺癌组织切片由复旦大学肿瘤医院病理科<sup>[18]</sup>和陆军军医大学第一附属医院病理学研究所<sup>[19]</sup>提供。先对石蜡包埋乳腺癌切片进行烘烤处理并将其浸泡脱蜡,再经过漂洗、蛋白酶消化、缓冲液洗涤和烘干后,使用与杂交缓冲液预混预变性的 HER2 基因检测探针和 CEP17 探针(Vysis, Abbott 公司)与切片样本进行杂交。杂交反应在原位杂交仪(ThermoBrite, Abbott 公司)中避光进行,杂交后经过多次清洗步骤去除未结合的 FISH 探针。使用二脒基-苯基吡啶(DAPI)荧光染料对干燥后的样品的细胞核进行复染,经 FISH 处理后的载玻片在  $-20^{\circ}\text{C}$  低温避光保存。

杂交后的样本带有红色和绿色两种荧光探针。其中绿色为 17 号染色体着丝粒探针 CEP17,因此一个细胞中应有 2 个绿色斑点。红色为 HER2 基因探针,也位于 17 号染色体上,因此正常细胞也具有 2 个红色斑点,称为 HER2 阴性,如图 1(a)所示。在部分乳腺癌等细胞中,由于 HER2 基因发生扩增突变,呈现多个红色荧光斑点,称为 HER2 阳性,如图 1(b)所示。HER2 基因的 FISH 检测主要对 HER2 平均拷贝数和  $N_{\text{HER2}}/N_{\text{CEP17}}$  比例进行统计,因此需要对每个细胞中的红色斑点进行计数。

### 2.2 SIM 显微镜成像装置

FISH 标记的病理切片成像在本实验室自主搭建的 SIM 系统上进行<sup>[20]</sup>,其光路如图 1(c)所示。波长分别为 405 nm、488 nm、561 nm、647 nm 的四波长激光器(L6Ce-CSB-143, Oxxius 公司)发出的水平线偏振光经准直扩束物镜(TL2X-SAP, Thorlabs 公司)和偏振分光棱镜(PBS251, Thorlabs 公司),垂直入射铁电液晶空间光调制器(SXGA-R12, Fourth Dimension Displays 公司)。经过空间光调制器调制,光被 PBS 反射后进入后续光路,产生的垂直偏振衍射光进入透镜 2(焦距为 300 mm, Thorlabs 公司)。光路中使用一个

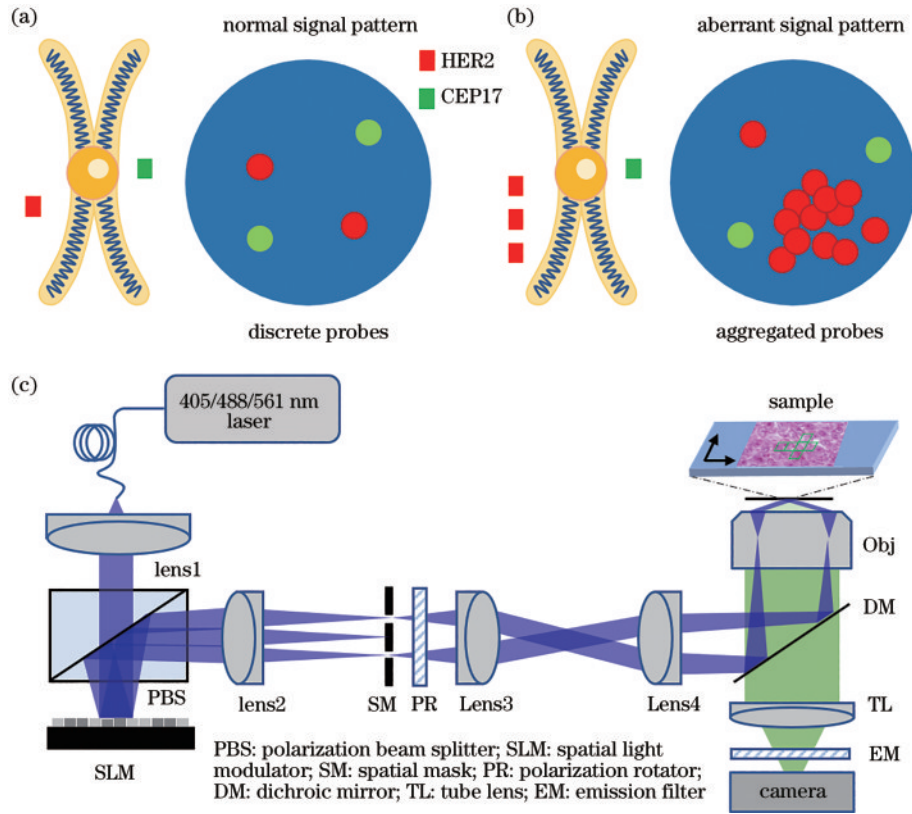


图1 HER2荧光原位杂交检测示意图和SIM成像系统示意图。(a)HER2阳性示意图;(b)HER2阴性示意图;  
(c)激光干涉式SIM成像系统示意图

Fig. 1 Schematic of the HER2 test of FISH and structured-light illumination microscope (SIM) imaging system. (a) HER2 positive diagram; (b) HER2 negative diagram; (c) schematic of laser interferometric SIM imaging system

空间滤波器(SM)阻挡零级光及其他高级次光,确保仅有 $\pm 1$ 级衍射光通过小孔。 $\pm 1$ 级衍射光经组合半波片(PR)改变偏振态后,再通过透镜3(焦距为150 mm, Thorlabs公司)和透镜4(焦距为200 mm, Thorlabs公司)后进入到倒置显微镜(IX83, Olympus公司)中。光再经过浸油物镜(60 $\times$ , NA为1.42, Olympus公司),激发放置在载物台上的样本。两束衍射光在物镜的焦平面上形成干涉条纹,激发FISH探针产生荧光。荧光信号由物镜收集后透过保偏二向色镜(4ZT405/473-488/561/640rpc-Phase, PI Chroma公司),由sCMOS相机(ORCA-flash4.0 V2, 滨松公司)进行图像采集。使用HiFi-SIM算法对采集到的原始图像进行超分辨重建<sup>[20]</sup>。采用直径为100 nm的聚苯乙烯荧光微球(F8803, Thermo Fisher Scientific公司),标定该系统在488 nm通道的横向分辨率为136 nm,与之对比的宽场成像分辨率为253 nm<sup>[21]</sup>;对于561 nm通道,标定的横向分辨率为158 nm,与之对比的宽场成像分辨率为294 nm。

### 2.3 大视场图像拼接的SIM

受限于SIM系统中的空间光调制器的靶面大小<sup>[22]</sup>,上述SIM成像视场大小为55  $\mu\text{m} \times 55 \mu\text{m}$ ,单次成像得到的可供分析的细胞数目较少。但病理分析是针对足够多的细胞进行成像和统计的,因此采用高精

度电动载物台(H117P1XD, Prior公司)移动样品进行扫描成像。

SIM需要拍摄9幅原始图像来重建出一张SIM图像,成像速度为2.78 frame/s。使用电动样品台进行5行5列的扫描成像,设置相邻图像的重叠区域比例为10%,因此完成254  $\mu\text{m} \times 254 \mu\text{m}$ 区域单个通道SIM成像的时间约为9.3 s。

在SIM重建之后,对三个通道的SIM图像逐一进行图像拼接处理,得到大视场的超分辨FISH病理图像。对于图像拼接,采用基于经典Grid Stitching显微图像拼接算法<sup>[23]</sup>的FIJI显微图像拼接插件,设置每张图片重叠区域为10%,在一个通道中完成5行5列的SIM图像拼接总耗时14.7 s。

### 2.4 FISH病理图像处理与统计

对FISH病理数据进行分析的步骤包括对细胞核的分割和对每个细胞核中荧光斑点的计数。对于细胞核的分割,使用Otsu阈值和分水岭算法<sup>[24]</sup>。对于斑点计数,采用自动化图像计数方法,并由人工进行复核。

依据斑点的半径以及斑点质心间的距离等特征对FISH扩增探针进行判读<sup>[25-27]</sup>。首先将与标准斑点的半径或强度差异过大的荧光斑点视为背景噪声,不进行统计。根据瑞利判据,相邻两个斑点能够区分的临界条件是:斑点质心之间的距离大于等于SIM系统的横向分辨



率[荧光微球的半峰全宽(FWHM)]。当紧邻荧光信号质心距离大于等于横向分辨率或发生明显形态变化时,将其统计为两个或两个以上的荧光信号;对于两个质心距离小于SIM成像分辨率的紧邻斑点,合并为一个较大斑点进行统计;当出现团状斑点半径大于SIM成像分辨率时,统计为一个信号。根据荧光小球标定得到的分辨率,采用561 nm激光激发时的SIM系统的横向分辨率为158 nm,相应的宽场成像分辨率为294 nm。

### 3 实验分析和讨论

#### 3.1 SIM对扩增FISH探针的定量分析

首先为展示SIM超分辨成像对扩增FISH探针评

估的优势,选择了一例HER2阳性乳腺癌患者的病理切片进行SIM和宽场荧光成像。在激发光561 nm通道下,对与HER2基因杂交的荧光探针进行SIM成像的结果如图2(a)所示。图2(b)和图2(c)为部分区域的宽场成像结果,按照当前的扩增FISH探针统计规则,线段上一共包含了3个荧光信号。在引入结构光照明模块之后,FISH扩增探针对应的荧光斑点更小,其中弥散状荧光斑点更加清晰,如图2(d)和图2(e)所示。在同一位置绘制荧光斑点信号归一化强度图,如图2(c)和图2(e)所示,能够看到聚集的6个荧光信号在SIM模式下强度差异明显,相邻的荧光信号的区分更为容易。

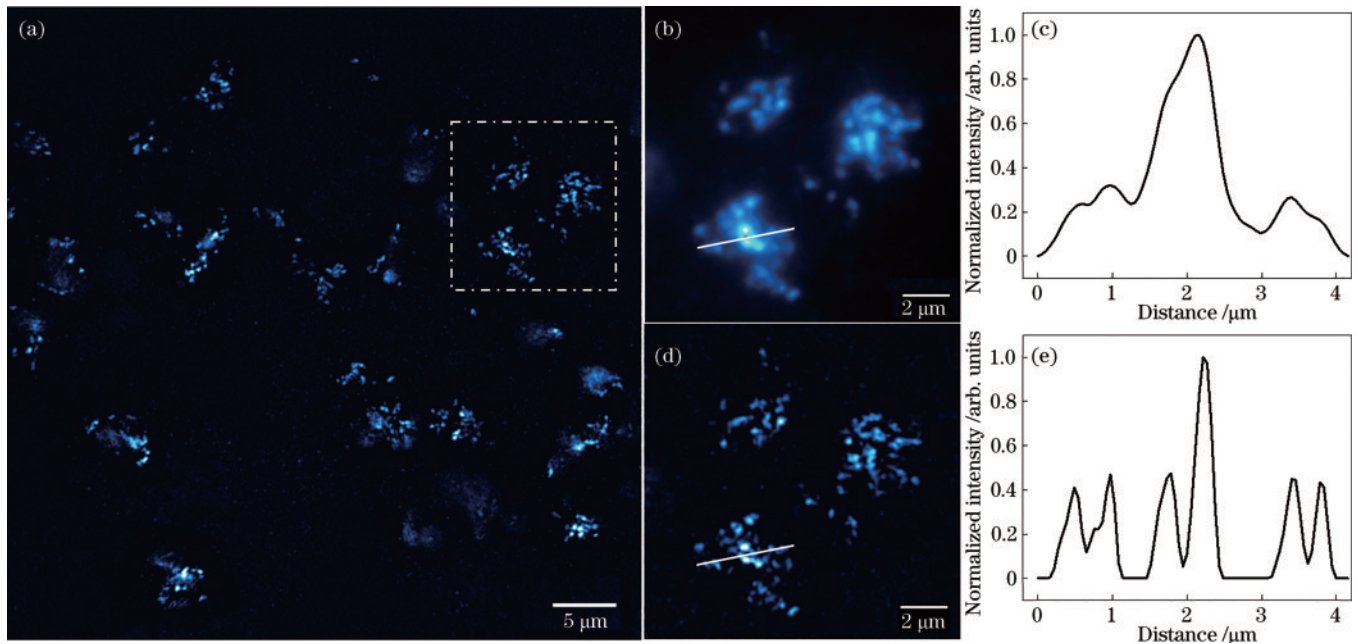


图2 SIM对乳腺癌病理组织切片的成像结果及定量分析。(a)SIM成像结果;(b)信号密集分布区域对应的宽场(WF)图像;(c)图2(b)线段标记处的归一化强度分布;(d)信号密集分布区域对应的SIM图像;(e)图2(d)线段标记处的归一化强度分布

Fig. 2 SIM imaging on pathological tissue sections of breast cancer and quantitative analysis of imaging results. (a) SIM imaging result; (b) wide-field (WF) image corresponding to areas of dense signal distribution; (c) normalized intensity distribution at the line marker in Fig. 2(b); (d) SIM image corresponding to areas of dense signal distribution; (e) normalized intensity distribution at the line marker in Fig. 2(d)

#### 3.2 大视场图像拼接SIM扫描成像

对病理切片进行荧光成像时不仅需要保证成像分辨率,还需要大视场成像来确保有足够数目的细胞进行统计分析。设置电动载物台进行5行5列的逐行扫描,逐一对组织切片的不同位置进行SIM成像,再对重建后的SIM图像进行图像拼接,最终得到大视场的超分辨病理图像。

如图3(a)所示,25张子图拼接后最终视场大小为0.254 mm×0.254 mm,图像总共包含了两百多个肿瘤细胞,可以满足病理上的统计需要。右上方区域没有红色和绿色荧光斑点,可能是样品染色不均匀造成的信号缺失。左下角及中心区域细胞核分布清晰,适合进行观察和统计。实线框的放大如图3(b)所示,包含多个

HER2基因拷贝数较低的肿瘤细胞,HER2基因荧光信号稀疏,荧光斑点相互之间没有重叠,对其探针计数的结果和宽场成像得到的结果一致。虚线框的放大如图3(c)所示,包含多个HER2基因拷贝数较高的肿瘤细胞,图3(c)左上角的细胞核内的荧光信号在SIM超分辨成像下比较清晰,能够准确进行统计计数。

接下来定量统计细胞核中HER2基因的平均扩增数目。根据乳腺癌HER2检测指南要求<sup>[2]</sup>,选择了20个细胞核边界完整、孤立无重叠的浸润性癌细胞进行定量统计,比较宽场和SIM两种成像方法下细胞核中红色荧光信号的数目,最终得到HER2基因扩增数目的统计结果。如图4所示,横轴表示选择的20个典型细胞核,纵轴表示对细胞核进行手动计数统计得到的红色

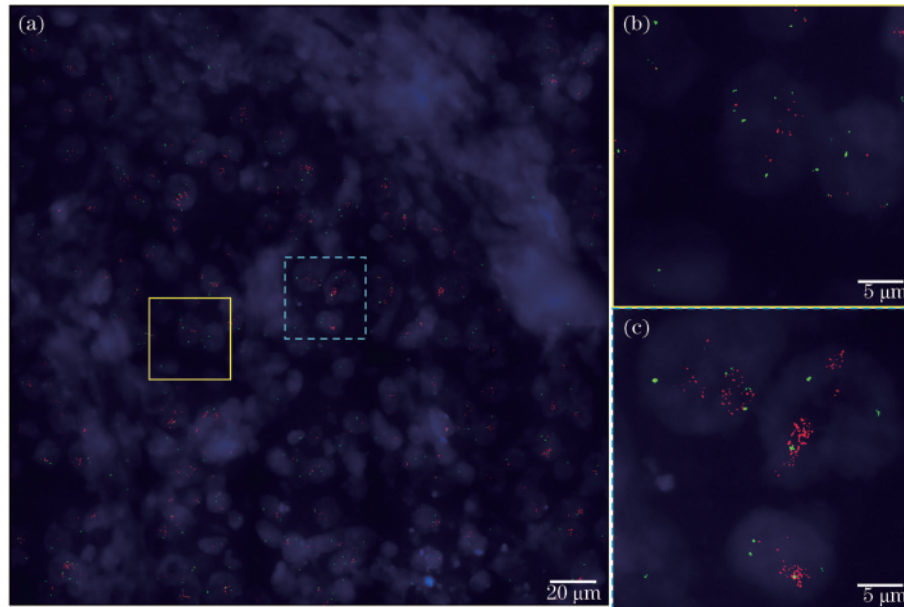


图 3 SIM 扫描拼接图像。(a)大视场超分辨扫描拼接图像;(b)多个 HER2 基因扩增水平较低的细胞核;(c)多个 HER2 基因扩增水平较高的细胞核

Fig. 3 Stitched image obtained from SIM scanning. (a) Super-resolution large-field-of-view scanning stitched image; (b) multiple nuclei with low levels of HER2 gene amplification; (c) multiple nuclei with high levels of HER2 gene amplification

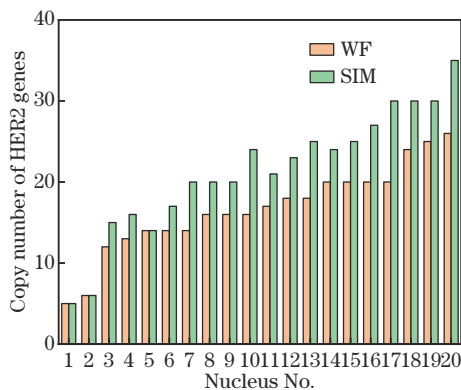


图 4 20 个典型细胞核中 HER2 基因拷贝数目定量统计

Fig. 4 Quantitative statistics of HER2 gene copy number in 20 typical cell nuclei

荧光信号数目。为了清楚地展示两种成像方式对癌细胞 HER2 基因拷贝数的差异,将 20 个细胞核按照 HER2 基因拷贝数由低到高进行排列。可以发现:对于基因拷贝数在 15 以下的细胞,两种方法差别不大;对于基因拷贝数在 15 以上的细胞,差别显著,并且随着拷贝数的增多差别越明显。这是因为在拷贝数目多的细胞中更容易出现聚集的荧光斑点,在宽场成像时无法分辨;而在对 SIM 图像进行统计分析时,仍然存在部分统计为一个信号的团状斑点,因此实际的基因拷贝数可能更高。宽场成像统计到的 20 个典型细胞核平均  $N_{\text{HER2}}/N_{\text{CEP17}}$  为 8.35, SIM 成像方式得到的平均  $N_{\text{HER2}}/N_{\text{CEP17}}$  为 10.68,此结果表明对于阳性扩增 FISH 探针对应的荧光信号,尤其是弥散以及簇状分布的斑点,常规宽场成像由于分辨率限制,对扩增比值的判读

与实际值相比偏低,从而影响肿瘤诊断和预后效果的评估。SIM 成像分辨率的提高提升了 FISH 探针的定位精度,有助于提高对 HER2 等扩增探针计数的准确性。

## 4 结 论

采用自主搭建的激光干涉式 SIM 系统对病理切片中扩增 FISH 探针的病理切片样本进行超分辨显微成像。通过电动样品台扫描成像和图像拼接,得到了乳腺癌 FISH 病理切片的 SIM 大视场扫描图像。通过对密集分布 FISH 荧光信号图像数据进行定量统计,比较了 WF 与 SIM 两种成像模式对应的 HER2 基因拷贝数目,证实了 SIM 超分辨成像能够对 HER2 基因状态进行相对精确的定量评估。对 HER2 基因状态更为精确的定量统计有助于对乳腺癌 HER2 阳性患者的分级治疗和术后评估进行补充。

本文对 FISH 组织切片的 SIM 扫描成像采用的是单层成像。由于物镜景深等限制,在 SIM 扫描过程中不在一个焦面上的 FISH 探针在统计时会被遗漏。在轴向进行多层扫描生成图像堆栈,可以实现扩增 FISH 荧光探针在不同平面上的定量统计,统计结果会更加准确,但是同时也会导致数据处理量过大、扫描耗时成倍增加等问题。因此在将来的研究中将对 SIM 扫描流程进行进一步改进,进一步提高 FISH 病理检测中的扩增探针的统计准确性,为临床病理诊断提供可靠方法。

## 参 考 文 献

- [1] 吴颖, 吴坤河, 阮红民, 等. 乳腺癌 HER2 检测指南 2019 版与 2014 版对 HER2 过表达患者分类影响比较 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(24): 1876-1882.

- Wu Y, Wu K H, Ruan H M, et al. Comparison of HER2 expression classification in 392 patients with breast cancer between 2019 and 2014 version of HER2 testing guidelines in breast cancer[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2019, 26(24): 1876-1882.
- [2] 杨文涛, 步宏. 乳腺癌 HER2 检测指南(2019 版)[J]. 中华病理学杂志, 2019, 48(3): 169-175.
- Yang W T, Bu H. Guideline for HER2 detection in breast cancer, the 2019 version[J]. Chinese Journal of Pathology, 2019, 48(3): 169-175.
- [3] 许志兵, 吴进锦, 丁路, 等. 基于偏振和明场多模态显微成像技术的乳腺癌智能诊断研究[J]. 中国激光, 2022, 49(24): 2407102.
- Xu Z B, Wu J J, Ding L, et al. Intelligent diagnosis of breast cancer based on polarization and bright-field multimodal microscopic imaging[J]. Chinese Journal of Lasers, 2022, 49(24): 2407102.
- [4] Wolff A C, Hicks D G, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update [J]. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2014, 138(2): 241-256.
- [5] Pajor G, Kajtár B, Pajor L, et al. State-of-the-art FISHing: automated analysis of cytogenetic aberrations in interphase nuclei[J]. Cytometry Part A, 2012, 81A(8): 649-663.
- [6] Ram S, Rodríguez J J, Bosco G. Segmentation and detection of fluorescent 3D spots[J]. Cytometry Part A, 2012, 81A(3): 198-212.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Maddox A L, Brehove M S, Eliato K R, et al. Molecular assessment of HER2 to identify signatures associated with therapy response in HER2-positive breast cancer[J]. Cancers, 2022, 14(11): 2795.
- [10] Okada M, Kubo T, Masumoto K, et al. Super resolution imaging of HER2 gene amplification[J]. Proceedings of SPIE, 2016, 9714: 97140E.
- [11] 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.
- [12] Gustafsson M G L, Shao L, Carlton P M, et al. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination[J]. Biophysical Journal, 2008, 94(12): 4957-4970.
- [13] 唐于珺, 王林波, 文刚, 等. 结构光照明超分辨成像图像重建算法研究进展[J]. 激光与光电子学进展, 2022, 59(6): 0617009.
- Tang Y J, Wang L B, Wen G, et al. Recent advances in structured illumination microscope super-resolution image reconstruction[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2022, 59(6): 0617009.
- [14] 高露, 高贝贝, 王富. 超分辨显微成像技术在活体大脑成像中的应用[J]. 中国激光, 2022, 49(20): 2007301.
- Gao L, Gao B B, Wang F. Applications of super-resolution microscopy techniques in living brain imaging [J]. Chinese Journal of Lasers, 2022, 49(20): 2007301.
- [15] Szabo Q, Jost D, Chang J M, et al. TADs are 3D structural units of higher-order chromosome organization in *Drosophila*[J]. Science Advances, 2018, 4(2): eaar8082.
- [16] Szabo Q, Cavalli G, Bantignies F. Higher-order chromatin organization using 3D DNA fluorescent *in situ* hybridization[M]//Bodega B, Lanzuolo C. Capturing chromosome conformation. Methods in molecular biology. New York: Humana, 2021, 2157: 221-237.
- [17] Marasca F, Cortesi A, Manganaro L, et al. 3D multicolor DNA FISH tool to study nuclear architecture in human primary cells[J]. Journal of Visualized Experiments, 2020(155): 60712.
- [18] Lü H, Bai Q M, Liu Y, et al. Response to anti-HER2 neoadjuvant chemotherapy in invasive breast cancers with different HER2 FISH-positive patterns[J]. Cancer Research, 2022, 82(4\_Supplement): 2-13-11.
- [19] Shi Y, Ping Y F, Zhou W C, et al. Tumour-associated macrophages secrete pleiotrophin to promote PTPRZ1 signalling in glioblastoma stem cells for tumour growth [J]. Nature Communications, 2017, 8: 15080.
- [20] Liang Y, Chen X H, Sun Z L, et al. High dynamic range structured illumination microscope based on multiple exposures[J]. Frontiers in Physics, 2021, 9: 648174.
- [21] Wen G, Li S M, Wang L B, et al. High-fidelity structured illumination microscopy by point-spread-function engineering[J]. Light: Science & Applications, 2021, 10: 70.
- [22] 郜鹏, 方翔, 温凯, 等. 大视场结构光照明显微技术(特邀)[J]. 光子学报, 2022, 51(8): 0851506.
- Gao P, Fang X, Wen K, et al. Micro-technology with obvious illumination in large field of view structure (invited) [J]. Acta Photonica Sinica, 2022, 51(8): 0851506.
- [23] Preibisch S, Saalfeld S, Tomancak P. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions[J]. Bioinformatics, 2009, 25(11): 1463-1465.
- [24] Les T, Markiewicz T, Osowski S, et al. Automatic evaluation system of FISH images in breast cancer[M]//Elmoataz A, Lezoray O, Nouboud F, et al. Image and signal processing. Lecture notes in computer science. Cham: Springer, 2014, 8509: 332-339.
- [25] Kozubek M, Kozubek S, Lukášová E, et al. High-resolution cytometry of FISH dots in interphase cell nuclei[J]. Cytometry, 1999, 36(4): 279-293.
- [26] Gué M, Messaoudi C, Sun J S, et al. Smart 3D-fish: automation of distance analysis in nuclei of interphase cells by image processing[J]. Cytometry Part A, 2005, 67A(1): 18-26.
- [27] Wang X W, Zheng B, Li S B, et al. Automated detection and analysis of fluorescent *in situ* hybridization spots depicted in digital microscopic images of Pap-smear specimens[J]. Journal of Biomedical Optics, 2009, 14(2): 021002.