

高通量单分子定位显微成像技术进展(特邀)

林昭珺[†], 常桓志[†], 李依明^{*}

南方科技大学生物医学工程系, 广东 深圳 518055

摘要 由于衍射极限的存在,传统的光学成像手段无法观测细胞器结构及细胞器之间的相互作用。单分子定位显微成像技术作为三种超分辨技术中分辨率最高的成像技术,为生命科学领域的研究提供了重要手段。大视场高通量单分子成像技术具有分辨率高、成像范围大和成像时间短等特点,在生物医学领域广泛用于观察和分析复杂的生物结构和功能。从基于硬件扫描的拼接成像技术、基于大面阵 sCMOS 的大视场高通量成像技术、大景深单分子定位成像技术、高通量数据分析技术 4 个方面回顾近年来大视场高通量单分子定位技术的研究进展。最后,对大视场高通量单分子定位成像技术的发展方向进行展望。

关键词 高通量; 大视场; 单分子定位显微镜; 超分辨成像

中图分类号 O436 文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP232570

Advances in High-Throughput Single-Molecule Localization Microscopy (Invited)

Lin Zhaojun[†], Chang Huanzhi[†], Li Yiming^{*}

Department of Biomedical Engineering, Southern University of Science and Technology,
Shenzhen 518055, Guangdong, China

Abstract The diffraction limit prevents traditional optical imaging methods from observing organelle structures and interaction between the organelles. As the imaging technique with the highest resolution among the three super-resolution techniques, single-molecule localization microscopy is an important tool for research in the field of life science. Single-molecule imaging technology with a large field of view and high throughput has been widely used in the biomedical field to observe and analyze complex biological structures and functions due to its high resolution, wide imaging range, and short imaging time. In this paper, the recent research progress of high-throughput single-molecule localization microscopy with a large field of view is reviewed from four perspectives: hardware scanning-based mosaic imaging technology, large-array sCMOS large-field-of-view high-throughput imaging technology, large-depth single-molecule positioning imaging technology, and high-throughput data analysis technology. Finally, the development direction for the large-field-of-view high-throughput single-molecule localization microscopy is prospected.

Key words high-throughput; large field of view; single-molecule localization microscope; super-resolution imaging

1 引言

荧光显微镜因分子特异性等优点广泛用于生命科学研究,但由于衍射极限^[1]的存在,传统的荧光显微镜的横向分辨率限制在 250 nm 左右,轴向分辨率限制在 500 nm 左右^[2]。对于细胞器及其内部结构的研究,通常采用电子显微镜等分辨率更高的成像设备进行

观察。然而,电子显微镜由于受制样复杂、缺乏分子特异性和无法进行多色成像等限制,无法用于活细胞成像,不能观测细胞器之间的相互作用。大量科学家为此提出不同绕过衍射极限以获取更高分辨率的光学成像方法,超分辨显微成像技术因此诞生^[3-5]。超分辨显微技术保留了光学显微镜的优势,具有样品无损、成像灵活和分子特异性等优点^[6]。目前,主要的 3 种超分辨

收稿日期: 2023-11-28; 修回日期: 2024-01-20; 录用日期: 2024-01-26; 网络首发日期: 2024-02-20

基金项目: 国家自然科学基金(62375116)、山东省重点研发计划(2021CXGC010212)、深圳市科学计划基础研究项目(JCYJ20220818100416036)、深圳市高层次人才团队项目(KQTD20200820113012029)、深圳市医学研究专项资金(B2302038)、南方科技大学启动基金

通信作者: liym2019@sustech.edu.cn

[†] 共同第一作者

显微成像技术是基于频域调制的结构光照明显微成像技术(SIM)^[7-8]、对系统点扩散函数(PSF)进行改造的受激发射损耗显微成像技术(STED)^[9]和基于荧光分子稀疏发光特性的单分子定位成像技术(SMLM)^[10]。其中,单分子定位成像技术主要以随机光学重建显微技术(STORM)^[11]和光激活定位显微成像技术(PALM)^[12-13]为代表,其横向分辨率可达20~30 nm,轴向分辨率可达60 nm,是3种超分辨技术中分辨率最高的。单分子定位显微成像技术作为生命科学领域强有力的研究工具,在观测细胞骨架^[14-15]、膜蛋白分布^[16-17]和经典细胞器及其相互作用^[18-19]等方面得到了广泛的运用。

自2006年问世以来,单分子定位技术迅速而广泛地应用于生物医学领域,帮助科学工作者们更好地观察与了解亚细胞尺度下的生命活动^[20-21]。单分子定位技术通过让视场范围内的荧光分子在时序上随机稀疏地激活发光,利用定位算法拟合单分子点的空间位置,在多次循环采集的过程中逐渐完成对所有单分子点的定位。因为“随机”、“稀疏”的特性,该技术使得在同一时刻基本不会有空间距离上很近的单分子点同时发光,因而实现了超分辨成像。由于对光学显微镜分辨率的开创性突破,这项工作获得了2014年诺贝尔化学奖。虽然单分子定位技术将分辨率极限约250 nm提升了近10倍,但是传统的单分子定位技术需要采集至少数万帧原始数据^[22]进行重建获取超分辨图像,以过长的图像采集时间、海量的数据存储和分析为代价换取重建图像的超高分辨率。

高通量成像技术在观察细胞形态、筛选和分析大量细胞表型等方面具有显著的优势^[23]。高通量成像意味着在单次采集中以更大的视场或者更快的成像速度来获得更多成像数据。随着单分子定位技术在理解复杂生命科学问题中的应用越来越多,对单分子成像技术的视场大小和吞吐量提出了越来越高的要求。高通量超分辨成像可以在观察亚细胞结构的同时探究不同细胞种群之间的差异,对跨尺度成像意义非凡。基于硬件扫描的拼接成像技术、基于大面阵科研级互补金属氧化物半导体(sCMOS)的高通量成像技术、大景深

单分子定位技术等是目前主流的高通量成像技术。在传统宽场成像技术中,由于高斯光束照明的不均匀性与激光功率问题,单分子定位技术的照明视场局限在约40 μm×40 μm范围内^[24]。同时,早期探测端电子倍增电荷耦合器件(EMCCD)传感器的较小靶面面积也使得其很难兼顾系统放大倍率与视场大小,在相同的采样率、放大倍率条件下,较小的靶面只能实现较小视场范围的成像。除此之外,场相关像差也限制着成像视场的大小。在几种高通量成像方案中:硬件扫描技术将样品划分了多个子区域,依次对每个子区域成像后进行拼接,得到一幅完整图像;而基于大面阵sCMOS的高通量成像技术则打破了视场与分辨率的限制关系,由于高达4096×4096,甚至6144×6144大面阵sCMOS相机的出现,可以提供的视场大小和采集速率均优于EMCCD,使大视场高通量单分子成像技术成为可能。

本文将从自动化硬件扫描、基于大面阵sCMOS的大视场高通量成像技术、大景深单分子定位技术和高通量数据处理4个方面介绍大视场高通量单分子定位技术的研究现状,最后对大视场高通量单分子定位成像技术进行总结和展望。

2 基于硬件扫描的拼接成像

为了对生物问题进行研究,最初采用了移动样品位移台,对样品的多个子区域进行成像,通过引入自动锁焦机制,保持系统的稳定性,将每个子区域的图像拼接起来,实现了高通量成像。2014年,Holden等^[25]在改进硬件和软件的基础上构建了可在数小时内完成数百个细胞的三维PALM的高通量PALM。为获取高通量图像,该工作将10/90分束镜应用于定制PALM显微镜,10%的光用于外部相衬显微镜对样品内的细菌进行预识别,如图1(a)所示,90%的光用于3D-PALM并采用图像分析、激光强度和活性荧光团形成的自动闭环控制活性荧光团密度的机制,如图1(b)所示。长时间的高通量成像过程中,为避免热效应等因素引起的图像漂移影响成像质量,用805 nm激光经玻璃片的反射光进行自动锁焦。该工作利用高通量

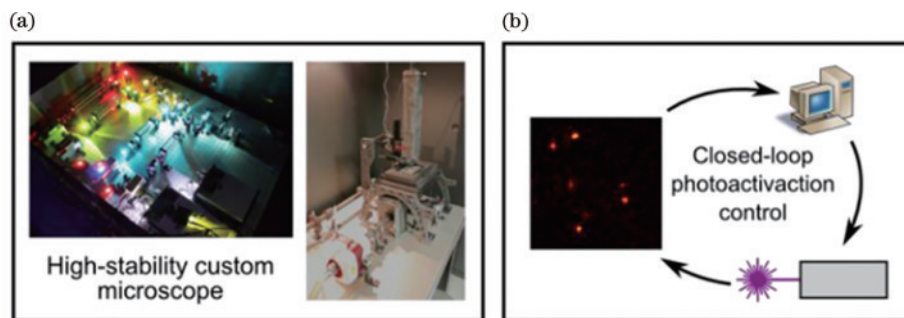


图1 高稳定显微镜^[25]。(a)定制高稳定性显微镜;(b)荧光密度的控制机制

Fig. 1 High-stability custom microscope^[25]. (a) High-stability home-built microscope; (b) closed-loop control of the density of fluorophores

PALM 在整个细胞周期对数百个活新月杆菌的 FtzS 进行了三维成像,并对 Z-ring 纳米级结构进行了定量分析。

2017 年, Beghin 等^[26]提出了一种全自动化显微镜平台,该平台集成了硬件控制、数据分析、元数据提取和数据挖掘等模块。该平台用低倍显微镜对样品进行筛选后,再使用高倍显微镜进行超分辨成像,并利用自动锁焦模块减少长时间成像过程中产生的漂移。在无人工操作的情况下,用 96 孔样品孔板对微管采集获得的数据进行在线分析后,用 single molecule profiler(SMP)软件提取元数据和创建数据库,并用 cell profiler analyst(CPA)软件^[27]进行数据挖掘并解释。整个高通量单分子成像过程包括三维定位和图像重建耗时 8 h,平均每一个孔耗时 5 min。

2018 年, Mund 等^[28]设计出一种高通量超分辨显微镜,研究内吞过程中内吞蛋白的组织结构。在样品上划分 100~500 个区域,每个区域间隔 200 μm ,以避免散射激光在相邻区域的交叉激发。对于每一个感兴

趣的子区域,预定义一组激光强度、透镜和滤光片位置实现自动采集。对于同一位置,若已经获取所有不同类型的数据,系统将移动到下一子区域进行成像。在不同子区域之间,平台移动后有 15 s 的机械平衡时间。重复上述步骤,直到遍历所有子区域完成成像,在成像过程中额外引入近红外激光并采用象限光电二极管接收玻片上的反射光并分析反射光光斑,进而控制压电物镜位移台实现 z 方向的锁焦,保证系统的稳定性。

单分子定位技术需要长时间成像,由于温度等因素引起的机械振动,导致图像漂移进而影响图像获取质量,常用自动聚焦技术让样品保持聚焦的状态。传统的自动聚焦技术可以分为两类:通过计算图像强度等指标判断离焦量;添加额外光学系统测量样品的离焦量。近期,深度学习也应用于自动聚焦技术中。2019 年, Pinkard 等^[29]根据相机所记录的散斑信号,利用已经训练好的卷积神经网络(CNN)量化离焦量。2022 年, Lightley 等^[30]在单分子定位显微镜中,引入额外的激光并采用相机接收玻片上的反射光,如图 2(a)

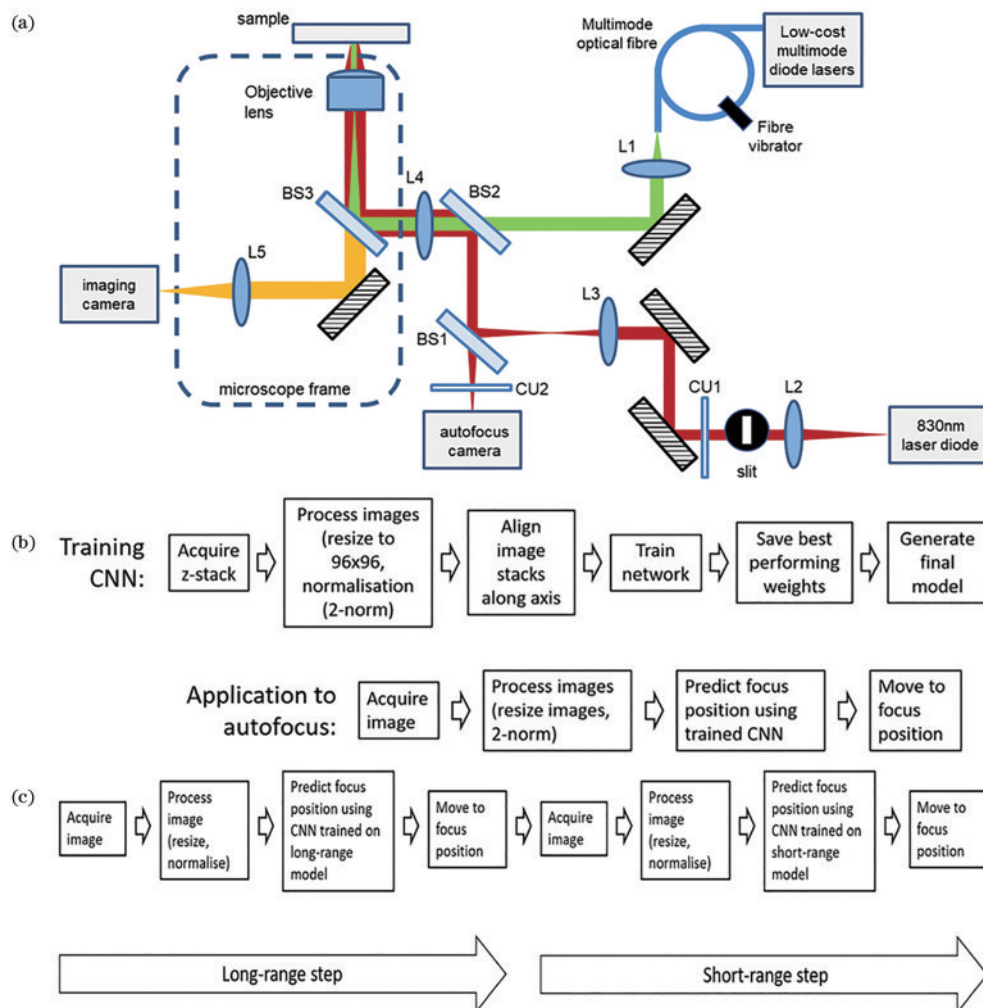


图 2 自动聚焦的 easySTORM^[30]。(a)自动聚焦的 easySTORM 显微镜的光路;(b)训练 CNN 进行自动聚焦的流程;(c)两步自动对焦数据处理流程

Fig. 2 easySTORM microscope utilizing optical autofocus^[30]. (a) Schematic of the optical path of easySTORM microscope with optical autofocus; (b) schematic of processes to train CNN for optical autofocus; (c) diagram of data process stages for two-step autofocus

所示,利用深度学习分析随显微镜离焦程度变化的反射光斑图像实现自动聚焦。在该工作中,采集已知离焦的自动对焦系统获取的 z 堆栈数据作为 CNN 模型的训练集,为了生成最终的模型,只有性能表现最好的模型权重将被保存,如图 2(b)所示。结合两步校正过程,如图 2(c)所示,该系统在高达 $\pm 100\ \mu\text{m}$ 的离焦范围内、数值孔径(NA)为 1.3、景深为 600 nm 的显微物镜下实现了良好的精度。该自动聚焦系统可应用于每个样品都需要重新聚焦的多孔板样品进行成像。相较于传统的图像度量算法,将训练好的 CNN 模型运用于显微成像系统的方法只需 300 ms 即可完成自动对焦的操作。

虽然硬件扫描可以实现大视场高通量成像,但是基于硬件扫描的拼接成像还存在以下问题:虽然常见的拼接工具 MIST^[31]生成的缝合图像平均质心距离误差小于视场(FOV)的 2%,但最终的成像效果往往受位移台的精度、拼接算法等因素影响,为避免配准失误造成的伪影影响成像质量,对位移台和图像配准的精度提出了严苛的要求;相邻区域被激光多次照射,增加了激光对生物样本的光毒性,且在成像过程中荧光被漂白;在进行图像拼接时,相邻图像之间会出现不连续的情况;需要定制的硬件设施,需要额外的锁焦系统,最大程度保证系统稳定性,操作复杂且成本较高;基于硬件扫描的拼接成像时间较久。

3 基于大面阵相机的非拼接式成像

在传统的单分子定位显微系统中,由于传感器面积和传感单元数量的限制,系统的分辨能力和视场之间存在相互制约的关系。在成像过程中,样品面的荧光会到达传感器面上,在对应的离散分布的像素点进行采样。离散采样的采样率(即像素大小)在一定程度上决定着系统的分辨能力。根据奈奎斯特-香农采样定律,为了能够分辨出图像中的最小细节,样品面的采样间隔最好小于细节尺寸的约 1/2.8。然而,较小的采样间隔会导致较低的信噪比,因此采样间隔一般设置在系统阿贝衍射极限的约 1/2.3,即大约 100 nm^[32]。此时,由于传感器传感单元数量的限制(传统 EMCCD 传感器通常具有 512 \times 512 个传感单元),成像视场限制在约 50 μm \times 50 μm 范围内^[32-33]。

近年来,随着 CMOS 的不断成熟,sCMOS 传感器因具有极高的读取速度、较大的动态范围和较多的传感单元数量等优势逐渐取代了 EMCCD 传感器,应用于超分辨成像领域^[34-35]。其中,大面阵 sCMOS 传感器由于具有更多的像素单元,使兼顾系统的分辨能力和视场大小成为可能。例如,国产鑫图相机 Dhyana 6060BSI 拥有 86 mm 的靶面直径和 6144 \times 6144 个传感单元,在保持采样间隔为 100 nm 的情况下,理论上可以将视场扩大为约 600 μm \times 600 μm 。然而,基于大面阵 sCMOS 传感器的高通量成像技术也存在一些挑

战^[36],例如如何实现对较大视场的均匀照明、如何校正大视场边缘处的像差^[37-38]等。

利用激光照明荧光分子使其闪烁荧光是单分子定位显微系统中至关重要的一步。定位精度很大程度上取决于荧光光子数,因此需要对整个视场进行均匀且足够强度的激光照明。而这对 STORM 来说尤为重要。STORM 不同于传统 STORM,其原理是使荧光分子全部发光,并将部分转换为暗态以达到稀疏荧光的效果。因此,在 STORM 中,激光还需要使荧光分子能够转换为暗态^[24],这需要使用均匀照明以确保全视场荧光闪烁事件的一致性。传统的利用 EMCCD 传感器进行成像的显微系统通常使用基于单模光纤产生的高斯激光束进行照明。在这种情况下,样品面接收到的激光强度呈二维高斯分布。对于较小的视场,高斯形状的激光光斑在距离光斑中心较小的范围内可以视为均匀照明。然而,在基于 sCMOS 的高通量大视场成像中,这样的高斯光束无法提供均匀且足够强度的照明。因此,需要采用其他方法来实现均匀照明,以确保成像视场内均匀的分辨率。

光束整形是改善照明均匀性问题的最直接方法^[39-42]。Douglass 等^[39]提出了一种利用光束整形技术实现大视场均匀落射式照明的方法。他们的照明系统利用了一组微透镜阵列,通过调整微透镜的形状和排列方式,使样品面上的每一个点都可以接收到源平面中的每一个点的相同立体角范围内的光。这种设计可以将入射的高斯光束经系统到达样品面时整形为均匀的平顶光束。相比传统的照明方式,这种方法将照明面积扩大了约 4 倍,实现了更大视场的均匀照明。由于微透镜阵列可以在一定程度上适应机械振动,因此系统受机械振动的影响较小,可以获得更稳定的成像结果。此外,该系统的成本相对较低,具有一定的经济优势。然而,这种照明系统在场适应性方面存在一定的限制。由于微透镜阵列的固定形状和排列方式,系统对不同样品的不同照明需求的适应性有限。如果需要适应不同样本对光功率与视场的不同需求,可能需要重新设计和制造微透镜阵列以满足新的照明要求。除了上述方法,还有基于 pi-shaper、top-shape 等平顶光整形元件的光束整形方法,Ibrahim 等^[43]在照明系统中集成了 pi-shaper 与 top-shape,并讨论了不同元件的不同应用场景。

另外一种实现大视场均匀照明的方法是采用多模光纤^[44-46]。如图 3 所示,Zhao 等^[44]利用激光光束组合器将多束激光合束,并利用振动器消除激光散斑,提高了照明激光的功率。同时利用激光在多模光纤孔径面上分布均匀的特点,利用透镜组合将孔径面投影至样品面进行成像,因此在样品面上得到了较为均匀的大视场照明,同时也保证了照明功率密度。同样利用多模光纤照明的还有 Deschamps 等^[45]的工作。他们将均匀多模激发与单模全内反射荧光照明技术(TIRF)相

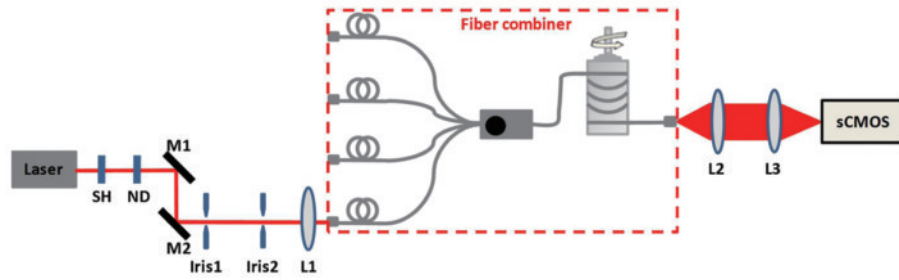


图 3 基于多模光纤的大视场均匀照明方案的光路^[44]

Fig. 3 Optical path of homogeneous illumination with large FOV using multimode fiber^[44]

结合,同时获得了视场范围内均匀的荧光亮度与 TIRF 光学切片的效果。

利用波导技术进行全样品 TIRF 照明也是一种新兴的大视场照明方式^[47-50]。如图 4 所示,Diekmann 等^[49]提出了一种基于波导的 Waveguide-TIRF 技术,用于实现大视场均匀 TIRF 照明。该技术利用 TIRF 照明的光学切片特性,降低了背景噪声强度,提高了信噪比和分辨率。传统的 TIRF 照明方式通过物镜使激光在玻片表面发生全反射,利用倏逝波对位于焦面的

样品进行照明激发。这种方式可以降低不在焦面上的荧光分子发光而产生的背景信号。传统 TIRF 的照明面积取决于物镜尺寸、放大倍率等因素,而在 Waveguide-TIRF 中,激光在波导纤芯与水溶液之间的界面处不断发生全反射并向前传播,从而在整个波导表面上产生均匀 TIRF 照明。然而,这种方式存在一些限制:首先,由于波导照明是在整个波导表面上进行的,这将会照亮整个样品,无法将照明区域限制在相机的实际视野内;其次,波导照明会同时照明和漂白整个

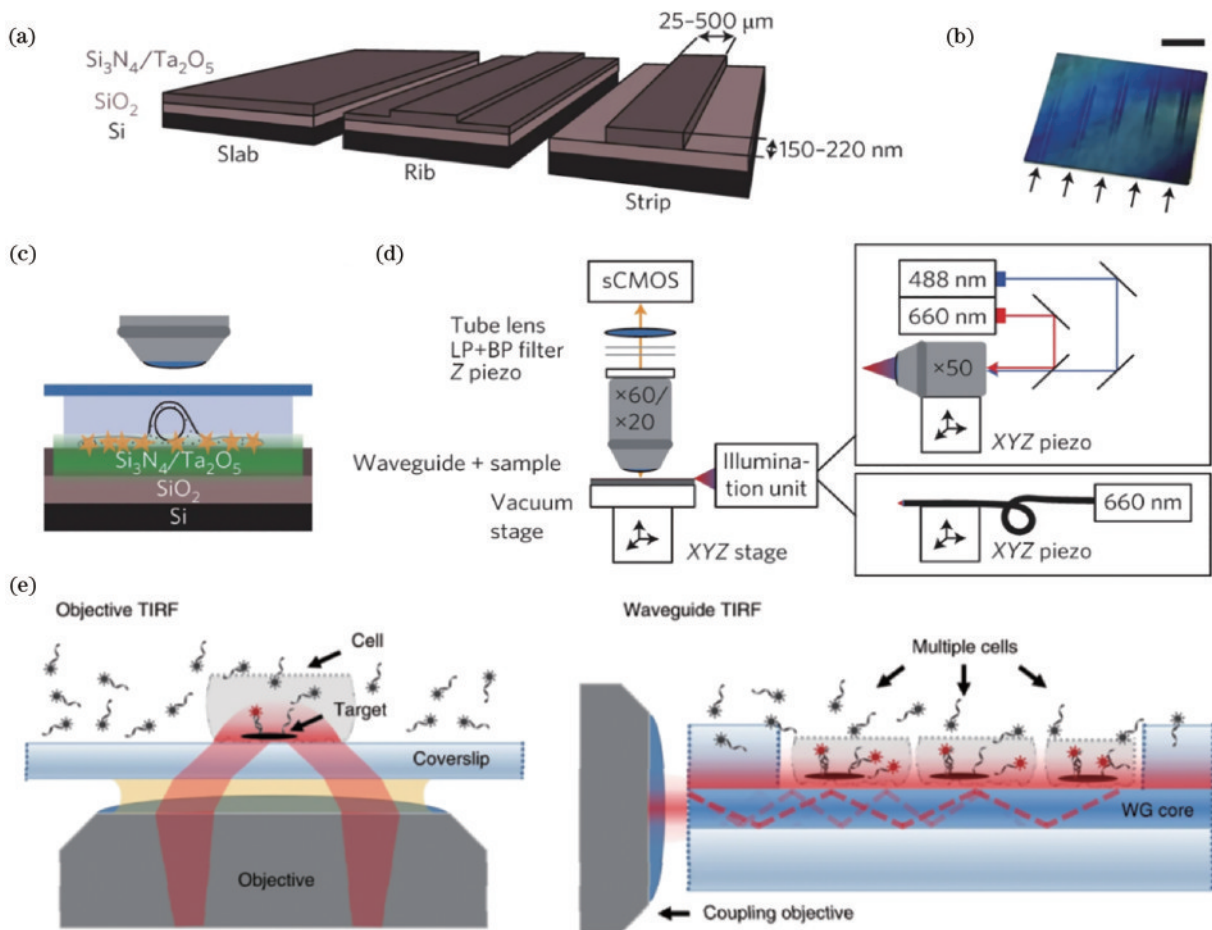


图 4 Waveguide-TIRF 技术原理^[47-49]。(a)波导结构示意图;(b)波导内激光路径示意图;(c)波导内激光产生倏逝波照亮样本;(d)光学系统示意图;(e)传统 TIRF 照明技术与 Waveguide-TIRF 照明技术的对比

Fig. 4 Principles of Waveguide-TIRF^[47-49]. (a) Schematic of waveguide structure; (b) schematic of laser path inside the waveguide; (c) sample is illuminated by evanescent wave generated by laser inside the waveguide; (d) optical setup of Waveguide-TIRF; (e) comparison of traditional TIRF lighting technology and Waveguide-TIRF lighting technology

样品;除此之外,波导制备与系统的复杂度也是制约这一技术推广的关键所在。

另外,还有基于扫描振镜的大视场照明方案。Mau 等^[24]利用振镜对光斑较小的高斯光束在 $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ 的视场范围内进行二维扫描。这使得在一个扫描周期内,扫描区域内的每一个点都受到近乎相同时间的照明,进而实现对整个扫描区域约 $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ 的均匀照明,在约 $150\ \mu\text{m} \times 150\ \mu\text{m}$ 范围内保证了高于 90% 的相对照明强度。而这种方案的缺点在于需要保证扫描与曝光的高度同步性,即振镜的转动必须与曝光的时间控制相匹配,以确保每个点都能够获得均匀的照明。这要求系统具有高度的同步性和

精确控制,增加了系统的复杂度。

以上所述都是物镜式的照明方式。在传统的物镜式的照明方案中,如果想实现 TIRF 照明,即让照明光在样品表面发生全反射,需要采用较高放大倍率的物镜,而这些物镜限制了成像视场的大小。如图 5 所示, Foylan 等^[51]提出了棱镜式的 MesoTIRF 照明方案,将照明光路与成像光路独立,利用棱镜使得激光光束在样品表面处发生全反射,进而进行 TIRF 照明。同时,为了实现较大的视场,该课题组采用了自研发的一款物镜,即 Mesolens^[52]。该物镜的放大倍率约为 4, NA 约为 0.5,视场最大可达 6 mm。同样采用棱镜式照明的还有近期 Rames 等^[53]提出的照明方案,其创新点在

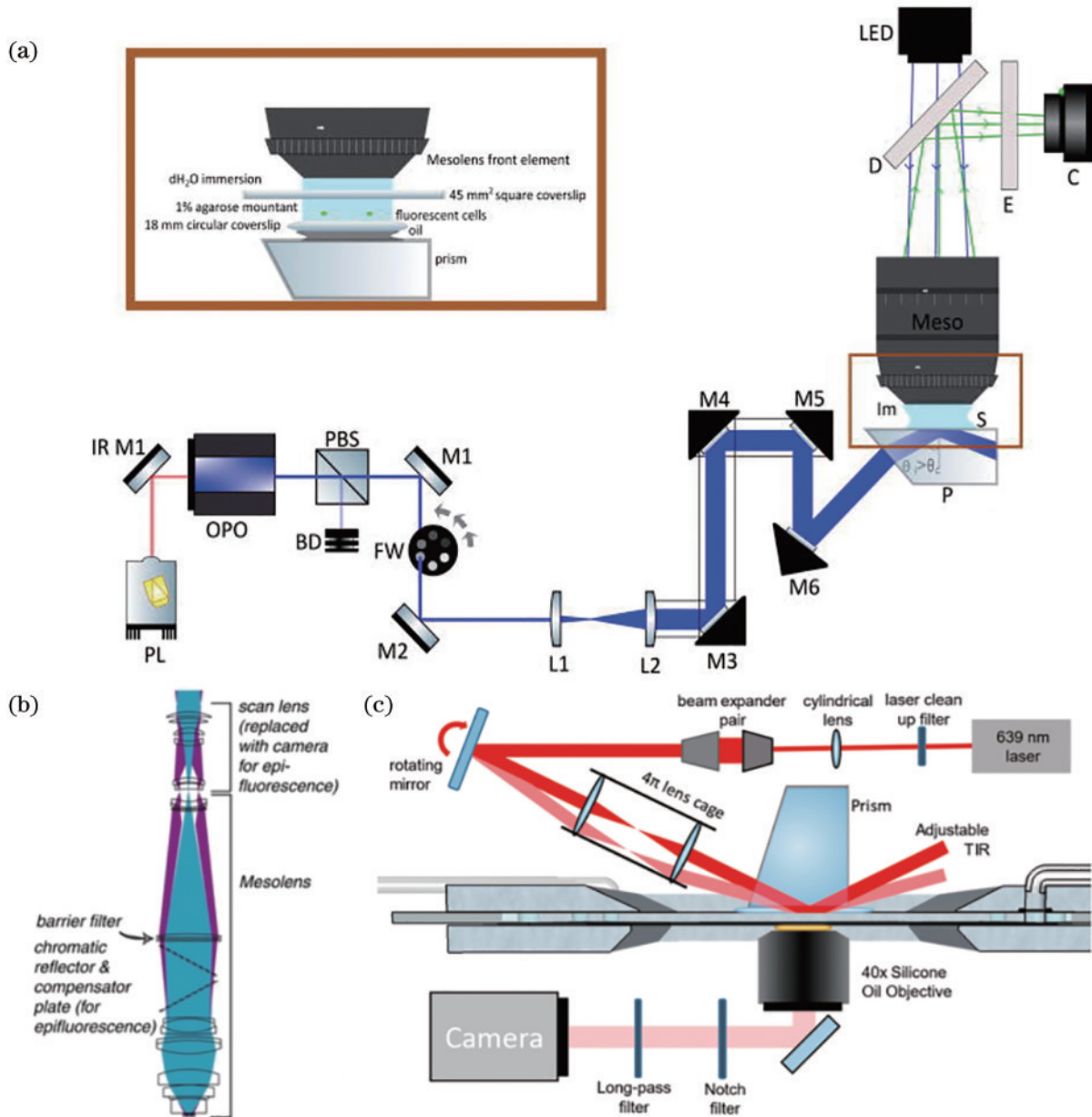


图 5 两种基于棱镜的大视场照明方案^[51-53]。(a)基于 Mesolens 的棱镜式 TIRF 照明方案;(b)Mesolens 示意图;(c)利用 4π 笼式结构实现 TIRF 照明与 Hilo 照明的任意切换
 Fig. 5 Comparison of two large FOV illumination schemes based on prisms^[51-53]. (a) Mesolens TIRF based on prism; (b) schematic of Mesolens; (c) free switching between TIRF and Hilo by implementing a 4π cage structure

于利用 4π 笼式透镜在 $520\ \mu\text{m} \times 520\ \mu\text{m}$ 级的视场内实现了 TIRF 与高度倾斜和层压光片照明(Hilo)两种照明模式的任意切换,同时提供了约 25~40 nm 的较高轴向分辨率。

4 大景深单分子定位技术

虽然单分子定位技术具有三维定位的能力,但是将其应用在三维成像中仍需克服一定问题,这是因为传统的高斯点扩散函数在焦平面前后呈对称的光场分布,因此无法仅通过点扩散函数的形状判断单分子点位于焦平面的哪一侧。除此之外,高斯点扩散函数的

较小景深与较小轴向光场变化幅度意味着,在一次成像中只能拍摄到焦面附近的单分子点。为了克服这一问题,研究者们提出了包括点扩散函数工程、远聚焦、物镜扫描的多种技术路线。

4.1 点扩散函数工程

点扩散函数工程是一种通过在成像光路中加入相位板^[54]、空间光调制器^[55]、可变形镜^[56]等光学元器件,引入像差来调制系统的点扩散函数,使其适用于高通量三维成像的技术。图 6 列举了几种常见的点扩散函数与相应景深。下面将对对比介绍几种主要的点扩散函数工程技术,包括具体的相位调制方法与大景深成像技术等。

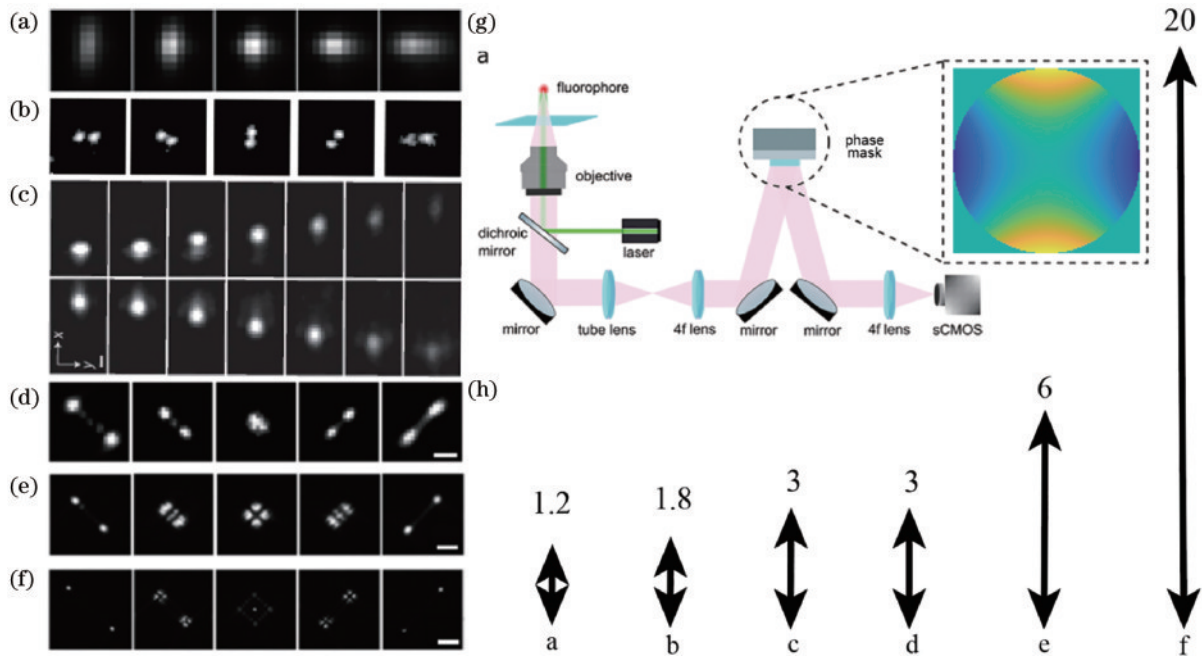


图 6 不同点扩散函数示意图与景深对比^[55]。(a) 散光点扩散函数示意图;(b) 双螺旋点扩散函数示意图;(c) 自弯曲点扩散函数示意图;(d) Saddle-point 点扩散函数示意图;(e) $6\ \mu\text{m}$ -Tetrapod 点扩散函数示意图;(f) $20\ \mu\text{m}$ -Tetrapod 点扩散函数示意图;(g) 利用相位板调制点扩散函数;(h) 各种点扩散函数景深范围

Fig. 6 Schematics and DOF (depth of field) of different PSFs^[55]. (a) Schematic of astigmatic PSF; (b) schematic of double-helix PSF; (c) schematic of self-bending PSF; (d) schematic of Saddle-point PSF; (e) schematic of $6\ \mu\text{m}$ -Tetrapod PSF; (f) schematic of $20\ \mu\text{m}$ -Tetrapod PSF; (g) PSF modulated by using phase mask; (h) DOF of different PSFs

散光点扩散函数以便捷性成为目前应用最为广泛的点扩散函数之一。2008年,庄小威课题组^[57]首次将散光像差引入提出的 STORM 系统中,使得系统点扩散函数的长与宽之比随着轴向位置的变化而改变,并实现了对焦平面附近 $\pm 600\ \text{nm}$ 范围内的单分子点的三维定位,使单分子定位技术实现了从二维定位到三维定位的突破,并且该系统轴向分辨率达到了约 50 nm。散光点扩散函数仅需在光路中插入柱面镜即可实现调制,因便捷性而广泛应用于各种三维单分子定位成像技术中。

另外一种大景深点扩散函数为双螺旋点扩散函数^[58-59]。2009年,Moerner 课题组^[59]利用相位板实现了一种双螺旋点扩散函数。在成像光路中引入了一种特殊相位,使得系统点扩散函数呈现为两个分支,且两分

支之间连线的角度会随着焦深变化而改变,因其形状类似于 DNA 双螺旋结构,因此被命名为双螺旋点扩散函数。相比于散光点扩散函数,双螺旋点扩散函数有着更大的景深,可以探测到约 $\pm 900\ \text{nm}$ 范围内的单分子点。除此之外,该函数的定位精度对轴向位置的敏感度相较于传统方法也更低。基于这一方法,该工作实现了 10~20 nm 的轴向分辨率与约 $2\ \mu\text{m}$ 景深的三维单分子定位成像。

为了进一步提高单分子定位景深的同时保证较高的分辨率,2014年,庄小威课题组^[60]利用艾里光束在长距离内衍射较小的特点,设计了基于艾里光束的自弯曲点扩散函数。该方法利用艾里光束在不同焦深处的不同横向位置来对荧光分子进行轴向定位,实现了 $3\ \mu\text{m}$ 成像范围内约 10~15 nm 的精确三维定位。但

是由于在成像光路中使用了空间光调制器,减少了探测信号的光子数,因而降低了信噪比。文中提到,这一缺点可以通过使用光子损失量较低的相位板或者结合双物镜成像来弥补。

Tetrapod 点扩散函数作为目前拥有最大景深的点扩散函数,也广泛应用于单分子定位成像中^[61-64]。Moerner 课题组基于相位板的点扩散函数调制方法,调制出了一系列类似于“四足虫”的点扩散函数,因此将其命名为 Tetrapod 点扩散函数。2014 年,该课题组首次模拟实现了拥有 3 μm 景深的 Tetrapod 点扩散函数(也称为 saddle-point 点扩散函数),并且在理论上计算出了其在不同焦深处的定位精度,在每荧光分子拥有 2000 光子信号与每像素点拥有 28 光子噪声的信噪条件下,该函数在 x 、 y 、 z 三个维度均能达到 10~20 nm 的定位精度。除了在焦面位置稍差外,saddle-point 点扩散函数在不同焦深处的定位精度比传统的双螺旋点扩散函数均更优,在焦深越大的位置这一优势更为明显。如图 7 所示,2015 年,该课题组在 saddle-point 点扩散函数的基础上进一步优化出了 6 μm 景深与 20 μm 景深的 Tetrapod 点扩散函数^[61]。两者均达到了在整个景深范围内较为均匀的定位精度:在相同的成像条

件下,6 μm -Tetrapod 的 x 和 y 定位精度在 12 nm 左右, z 定位精度在 21 nm 左右;20 μm -Tetrapod 的定位精度整体稍差, x 和 y 定位精度在 29 nm 左右, z 定位精度在 53 nm 左右。在用荧光小珠进行的单分子追踪模拟中,该点扩散函数表现较佳。2016 年,该课题组又进一步调制了 Tetrapod 点扩散函数,使其适用于多色成像^[62]。其原理是:将荧光分子的光谱信息编码进点扩散函数的形状里,使得不同颜色的荧光分子对应的点扩散函数有明显的区别,因而可以同时双色成像。2022 年,Fu 等^[56]利用可变形镜(DM)对 Tetrapod 点扩散函数进行进一步优化,克服了传统 SLM 荧光损失的问题,通过对 DM 每个促动器的精确校准,以每个促动器的响应函数为光瞳函数的基函数,优化出适用于 DM 的大景深 DMO-Tetrapod 点扩散函数,定位精度相较于传统 Tetrapod 点扩散函数提升约 20%~30%。Tetrapod 点扩散函数在保证较高定位精度的情况下,景深范围最大可以达 20 μm ,这无疑极大地提高了系统的成像通量,有着广阔的应用范围。2017 年,Moerner 课题组^[63]利用 Tetrapod 点扩散函数对活芽酵母的细胞染色质动力学进行了三维追踪成像。

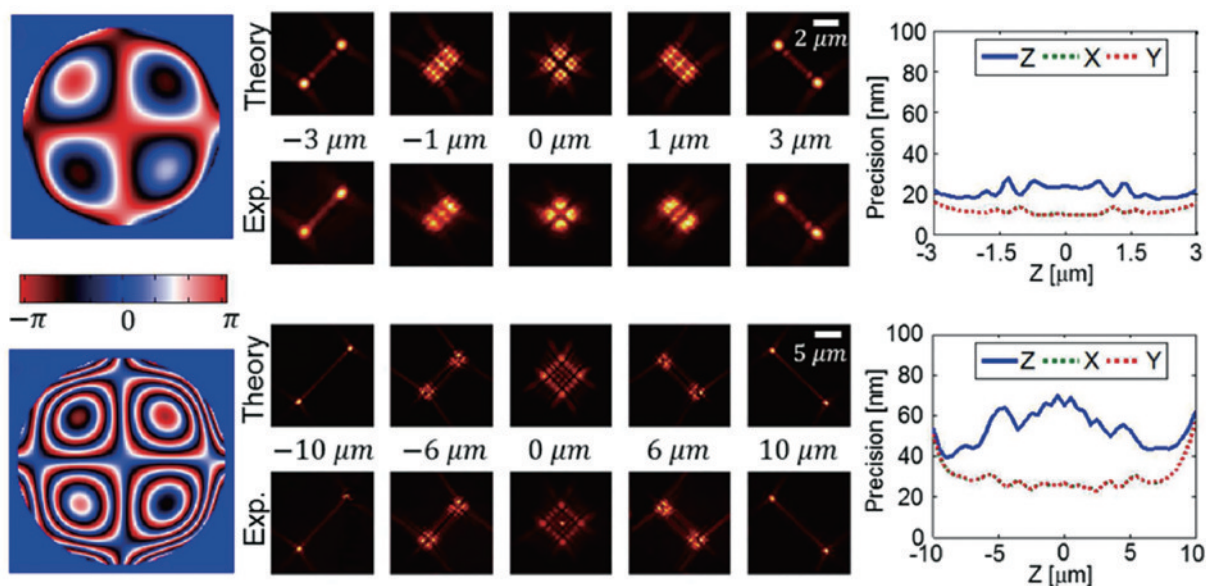


图 7 6 μm -Tetrapod 与 20 μm -Tetrapod 及其相位示意图^[61]

Fig. 7 Schematic of 6 μm -Tetrapod and 20 μm -Tetrapod and their phase^[61]

4.2 远聚焦技术

除了点扩散函数工程,还有一种基于远聚焦技术提升系统景深的方法^[65-66],该技术已广泛集成应用在各种生物成像技术中^[67-68]。在远聚焦成像系统中,系统中的前两个物镜将焦平面附近的空域光场“投影”在第三个物镜的焦点处,通过移动第三个物镜改变其焦平面位置,从而可以实现对较大景深范围内的任一平面成像。其他改变焦平面的方法还包括利用 DM^[69]、电动可调焦透镜(ETL)^[70]等方式。如图 8 所示,

Booth 课题组^[71]实现了基于可变形镜的多平面成像,利用可变形镜在物镜的后焦面共轭面上加载不同相位以等效实现聚焦在不同焦深的效果。基于这一工作,Radenovic 课题组^[69]将其与像差校正、点扩散函数工程相结合,进行了系统优化,并对 COS-7 细胞进行了成像,结果表示在整个 10 μm 范围内实现了约 20 nm 的定位精度。Mondal 课题组^[70]则利用 ETL 的焦距随电流变化而改变的特性,在光路中引入一块 ETL,在成像过程中,通过给 ETL 施加高频的电流变化以实现在

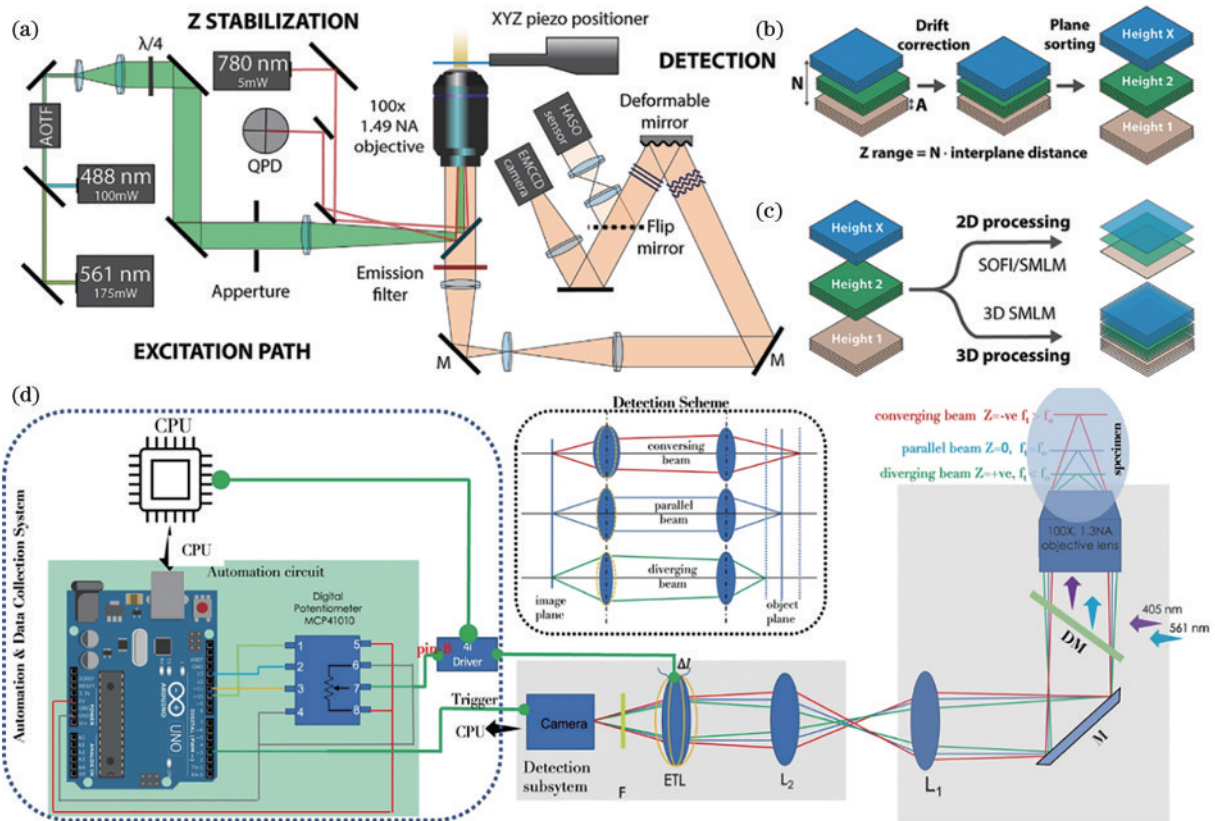


图 8 基于可变形镜或 ETL 的远聚焦技术原理。(a)~(c) 基于可变形镜的远聚焦技术的原理^[69]；(d) 基于 ETL 的远聚焦技术的原理^[70]

Fig. 8 Principles of remote focus technology based on deformable mirror or ETL. (a)–(c) Schematic of the remote focus technology based on deformable mirror^[69]; (d) schematic of the remote focus technology based on ETL^[70]

较大体积范围内的成像。该系统实现了约 $4.5 \mu\text{m}$ 的轴向范围成像。

5 高通量数据分析

sCMOS 数据采集通量高于传统的 EMCCD, 高像素带来的海量数据大大增加了数据处理压力^[34,72]。为了减少单分子定位技术的整体成像时间, 目前常用高性能 GPU 加速^[73-74]、计算集群^[75]等方法。

2013 年, Hu 等^[76]注意到贝叶斯 (Bayesian) 定位显微成像技术放宽了单分子定位显微镜信噪比的要求, 但是 3B 单分子定位超分辨显微成像技术^[77]占用了大量的计算资源, 因此利用 Amazon EC2 (Amazon Elastic Compute Cloud) 可访问性和易用性的优势进行 3B 分析。利用 Amazon EC2 对尺寸为 $150 \text{ 像素} \times 100 \text{ 像素} \times 1500 \text{ 帧}$ 的 U2OS 细胞中 PAmCherry 标记的微管蛋白的图像仅需 210 min 即可重建, 而在普通台式计算机上, 这一过程要耗时几天。

为提高 SMLM 处理数据集的速度, 2019 年 Li 等^[78]基于计算机科学中的分治算法, 提出了利用快速最大似然估计对高密度分子进行定位的方法 (QC-STORM)。从原始数据中提取多个 ROI, 利用一系列基于极大似然估计 (MLE) 的算法对荧光分子进行快速定位, 在可比较的空间分辨率的情况下, QC-

STORM 的速度相较于 ThunderSTORM^[79] 提高了 2~3 个数量级, 并能对 1024×1024 像素和 10 ms 曝光时间的原始数据进行实时图像处理。然而, QC-STORM 的执行速度仍然不够快, 无法在全帧率工作下对 sCMOS 捕获的图像中高密度分子进行实时定位。如图 9 所示, 2021 年 Gui 等^[80]在 QC-STORM 的基础上, 针对高通量单分子定位显微镜结合全帧率 sCMOS 带来的巨大存储问题, 提出了包含多核 CPU、GPU 和自定义现场可编程门阵列 (FPGA) 的异构计算平台 (HCP-STORM)。采用 FPGA 对原始数据进行去噪、背景消除、荧光点识别和 ROI 的提出和分类, 构建不同大小的 ROI 并将其分类为低密度分子和高密度分子的 ROI, 有利于减少后面基于 MLE 的定位时间, 随后将 ROI 复制搭配到 GPU 进行定位、渲染等处理。在相同的全帧率 sCMOS 下, HCP-STORM 比 QC-STORM 快 25 倍, 比 ThunderSTORM 快 295 倍。

由于单次采集的超分辨图像视场往往都小于样品的大小, 将单次采集得到的超分辨图像拼接起来是获取大视场图像的方法之一。2021 年, Du 等^[81]注意到由于传统的拼接方法是基于灰度图进行拼接的, 需要提供图像序列信息。但是在超分辨图像重建中, 包含荧光分子位置信息的定位表包含了重建所需要的全部信息且其文件大小通常小于相应的超分辨图像文件大

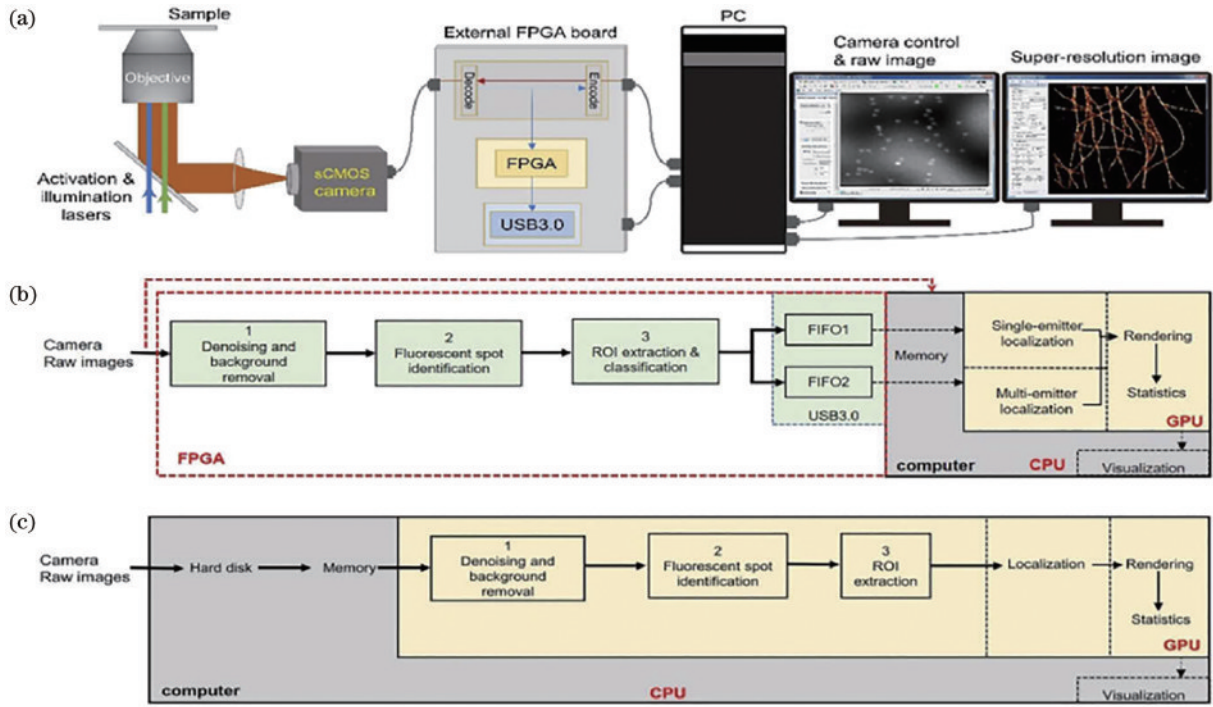


图 9 超分辨定位显微镜处理原始图像的异构平台^[80]。(a)系统结构;(b) HCP-STORM 的图像处理步骤;(c) QC-STORM 的图像处理步骤

Fig. 9 Heterogeneous computing platform for processing raw images in super-resolution localization microscope (SRLM)^[80]. (a) The system configuration; (b) the data processing steps in HCP-STORM; (c) the data processing steps in QC-STORM

小,无须占用太多的存储资源,可以利用这一特性用定位表代替灰度图进行拼接,得到一幅巨大的图像。这种方法被命名为 NanoStitcher,如图 10 所示,该方法包含 5 个步骤:1)确定子区域间的重叠区域的大小,通过余弦近似计算两幅子图像之间的重叠区域并自动确定匹配区域;2)利用体素网格滤波的方法对点集数据进行预处理,去除背景噪声和异常值,提高定位算法的准确性和速度;3)利用 joint registration of multiple point clouds(JRMPC)算法对图像进行拼接;4)将欧几里得距

离作为拼接路径的优化评估指标,并使用最小生成树去确定最优拼接路径;5)最后,对拼接后的图像进行融合和平滑处理。利用 NanoStitcher 以 10 nm 像素大小渲染视场为 500 $\mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ 的微管图像,得到的 25 个子图像的大小为 10 GB。对比基于灰度图拼接方法的 TrakEM2^[82],该工作发现 NanoStitcher 处理的图像中微管结构清晰连续,而 TrakEM2 处理得到的微管图像有断裂结构。NanoStitcher 利用定位表进行图像拼接,在最小化文件大小和存储无损文件等方面具有优势。

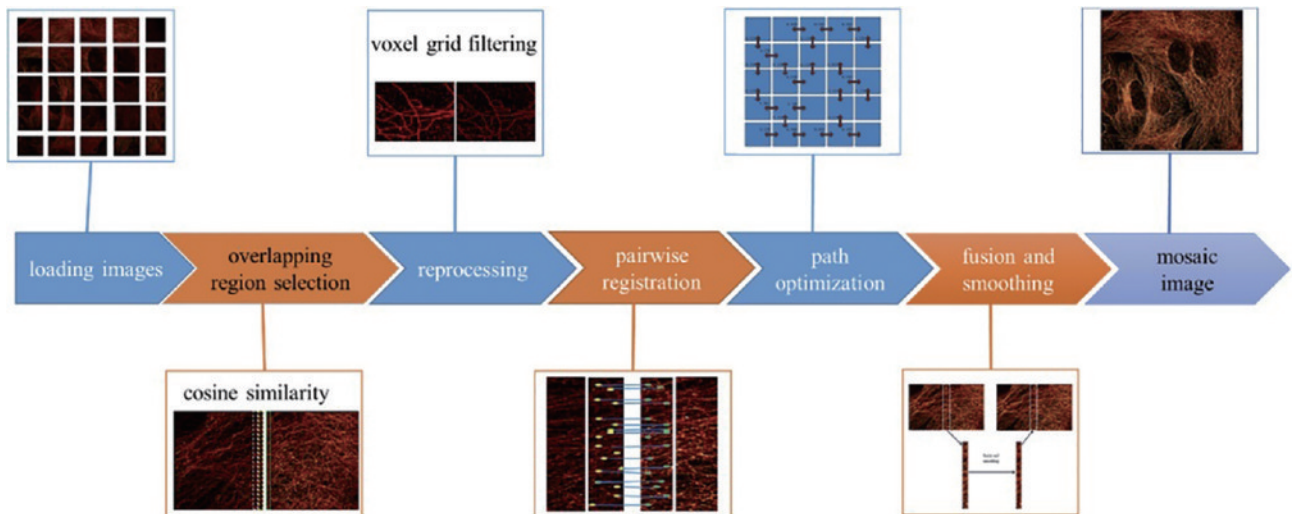


图 10 全景超分辨图像计算框架^[81]

Fig. 10 Computational framework for generating a panoramic super-resolution image^[81]

由于传统的单分子定位显微镜以 sCMOS 的全帧率持续成像会产生大量的数据存储和分析,因此难以提高其日均成像通量,Barentine 等^[22]在 2023 年提出了一种采集和分析一体化的高通量纳米显微镜,该显微镜配有自动锁焦等机制,可实现三维多色成像,如图 11(a)所示。为解决高速率带来的数据存储瓶颈,该工作开发了一种针对显微镜噪声模型的压缩算法,并在小型计算机集群中进行分布式存储,这种数据压缩方式和分布式存储相结合为并行数据分析奠定了基础,如

图 11(b)所示。该工作还优化了之前基于 GPU 的最大似然估计代码^[34],通过使用每个定位 ROI 像素的一个线程来评估模型函数,使速度提高了 15 倍,实现了实时定位。该工作展示了利用该成像平台对细胞进行自动成像的内容,首先在宽场模式下对捕获的图像进行拼接,组合成一幅马赛克图像,随后对图像进行分割和处理,以生成适用于 SMLM 成像的合适的 FOV 列表。如图 11(c)所示,这种方法成像数万个细胞只需耗时一天。

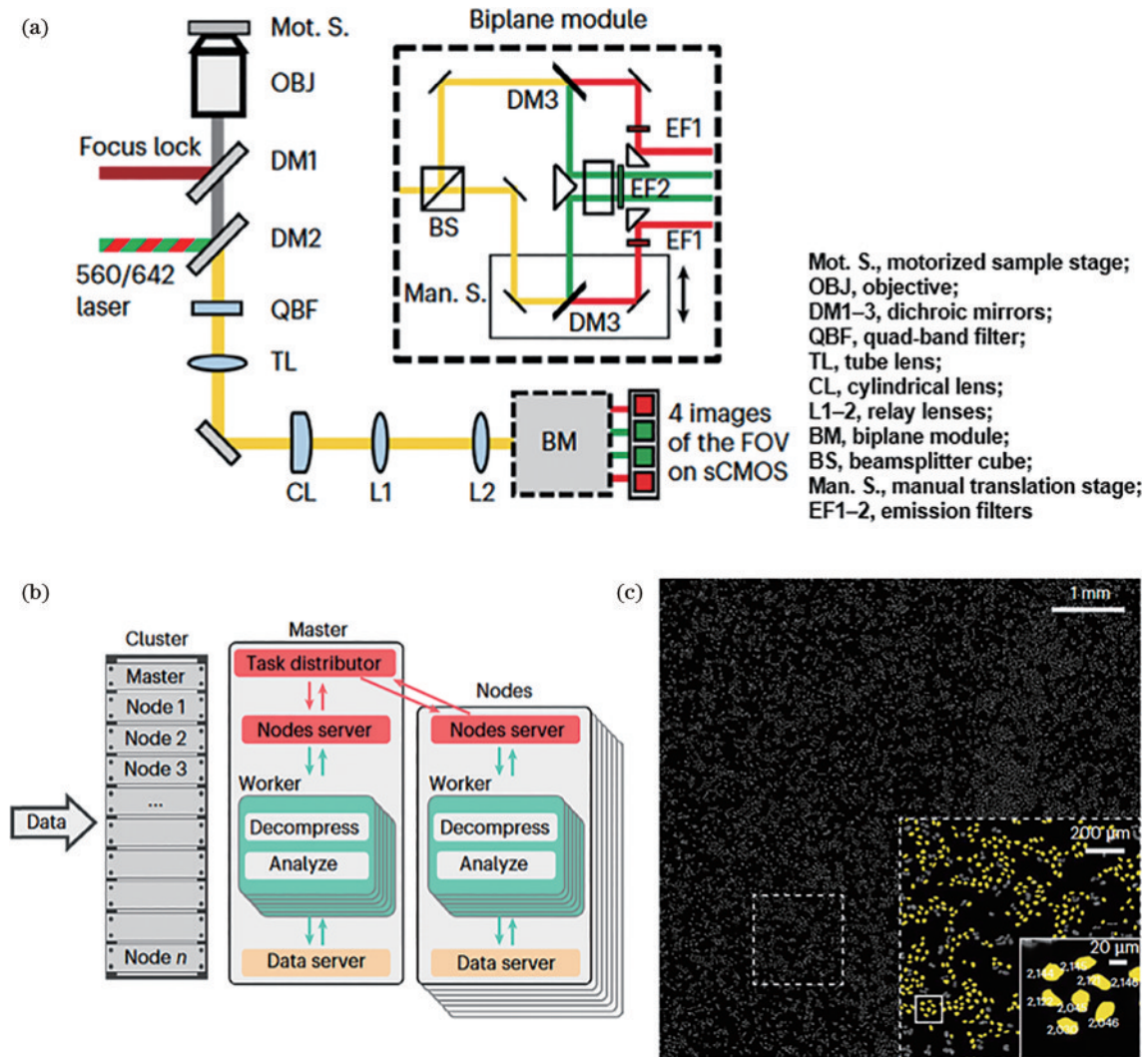


图 11 高通量单分子定位显微镜^[22]。(a)自动化多色 3D 双平面散光单分子定位显微镜;(b)实时定位和自动化定位后分析的可扩展数据流程;(c)日均 10000 个细胞的多色三维 SMLM 成像

Fig. 11 High-throughput SMLM microscope^[22]. (a) Schematic of automated multicolor 3D biplanar-astigmatism SMLM microscope; (b) diagram of scalable data pipeline for real-time localization and automated post-localization analysis; (c) 3D multicolor SMLM imaging for 10000 cells a day

2023 年本课题组^[83]提出了一种基于深度学习的单分子定位系统中的大视场像差校正方案,即 FD-DeepLoc,发现了深度学习在改善单分子定位技术成像质量方面的潜力。FD-DeepLoc 的训练过程如图 12(a)所示,将采集到的有像差的单分子数据按其在视场中的位置分为几个子区域,将子区域与其在整

个视场中的位置信息传入预训练好的网络中,将输出较为准确的单分子定位结果。为了克服视场相关像差,该网络引入两个位置相关通道,卷积核在卷积单分子图片时,也对两个位置通道进行卷积,从而把位置相关信息编码到神经网络里。除此之外,网络还通过引入一个较小的像差变量来增强其对不同数据集的鲁棒

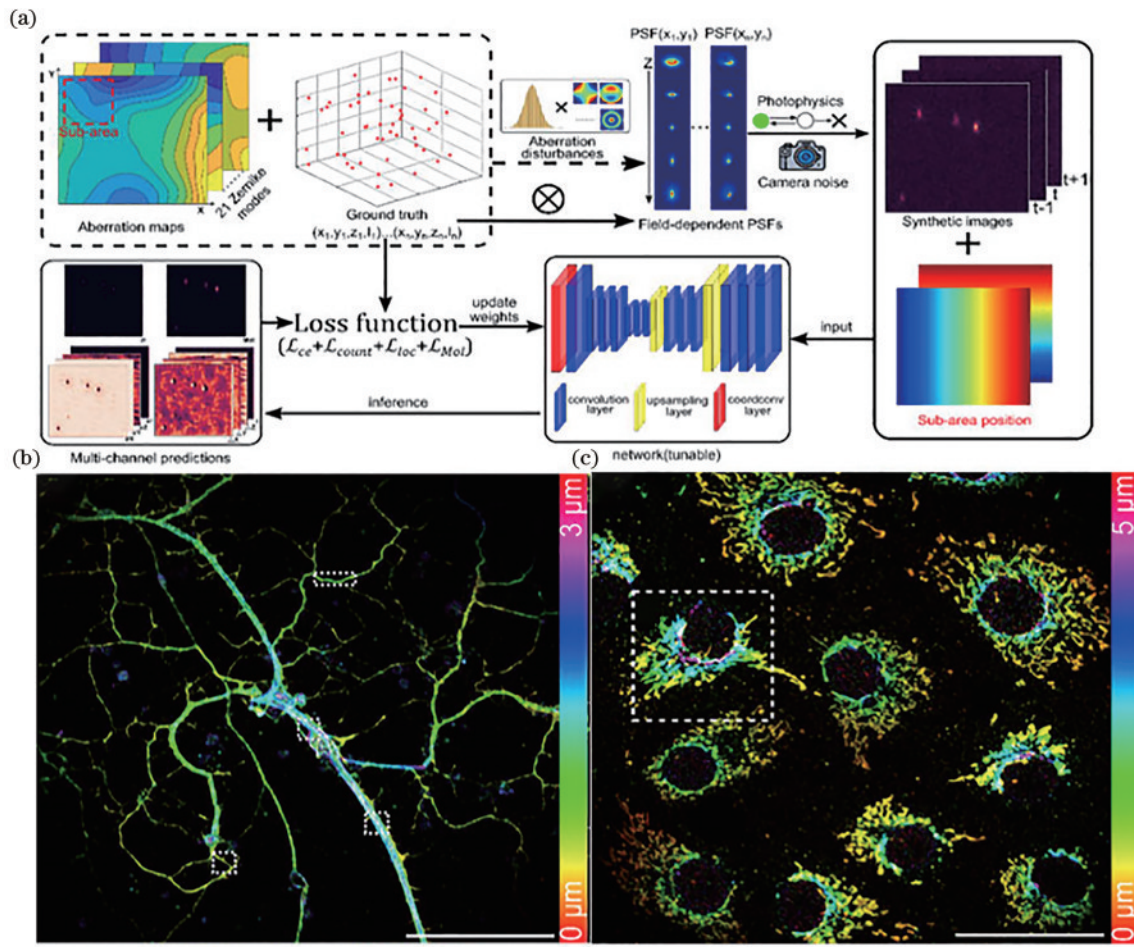


图 12 FD-DeepLoc 示意图^[83]。(a)FD-DeepLoc 训练过程的可视化表示;(b)FD-DeepLoc 在大视场上对神经元的高质量三维超分辨重构,比例尺为 50 μm ;(c) FD-DeepLoc 在大视场上对多个细胞线粒体的大景深三维超分辨重构,比例尺为 50 μm

Fig. 12 Schematic of FD-DeepLoc^[83]. (a) Visual representation of the FD-DeepLoc in training process; (b) FD-DeepLoc enabling high quality 3D super-resolution reconstruction of thick neurites over a large FOV. Scale bar is 50 μm ; (c) FD-DeepLoc enabling 3D super-resolution imaging of mitochondria within a large FOV and DOF. Scale bar is 50 μm

性。基于以上技术,FD-DeepLoc 实现了 $180 \mu\text{m} \times 180 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ 范围无须扫描的全细胞超分辨成像,将三维 SMLM 的成像通量提升了约 100 倍。利用 FD-DeepLoc 对大视场内的神经元细胞以及大量轴突片段进行了观测,其骨架周期状分布清晰可见,如图 12(b) 所示。同时也实现了对多个细胞线粒体的超分辨大景深成像,完整重构了其多层次三维中空结构,如图 12(c) 所示。

6 总 结

随着单分子成像技术的不断成熟,高通量的单分子成像逐渐受到研究者的重视与青睐。较高的通量意味着研究者可以在单次成像或者更短的时间内获取更多的生物样本信息,使得研究效率得到极大提高,甚至使得同时研究亚细胞生命活动与不同细胞种群之间的差异成为可能。介绍了几种实现高通量单分子成像的思路与对应的案例,包括依靠样品扫描的扫描式高通量成像、依靠大面阵 sCMOS 扩大成像范围的非扫描

式高通量成像、依靠点扩散函数工程和远聚焦技术的大景深成像及高通量数据分析。

值得注意的是,在工程应用上,上述方法并不是彼此独立的,往往会将以上几种方法结合使用,以达到更好的成像效果。例如在采用基于大面阵 sCMOS 的高通量成像技术中,可以同时成在成像光路中调制系统的点扩散函数以获得更大的景深,并辅以高通量数据分析技术加快信息处理速度。

在现有阶段,为了进一步实现更大通量的单分子定位成像,可以从以下几个角度出发:在激发照明方面,将高功率激光与激发光扫描技术相结合,以实现更大区域的照明,采用快速闪烁染料提高成像速度;在成像光路方面,调制系统点扩散函数以获得适合大视场低采样率的点扩散函数,以提高定位精度;在数据处理方面,利用深度学习进一步矫正更大视场范围的场相关像差等;在系统设计方面,利用高密度成像并配合基于深度学习的数据分析来减少成像所需总帧数,以提高成像速度及通量。总的来说,探究单分子定位技术

的高通量可能性是极具研究价值与工程价值的一个研究方向,涉及关于成像系统从激发照明、成像光路、数据分析等方面的多角度、全方位优化,展现出巨大的研究潜能与应用价值。

参 考 文 献

- [1] Abbe E. Note on the proper definition of the amplifying power of a lens or lens-system[J]. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 1884, 4(3): 348-351.
- [2] Zhuang X W. Nano-imaging with storm[J]. *Nature Photonics*, 2009, 3(7): 365-367.
- [3] Shao L, Kner P, Rego E H, et al. Super-resolution 3D microscopy of live whole cells using structured illumination[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(12): 1044-1046.
- [4] 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.
- [5] Markwirth A, Lachetta M, Mönkemöller V, et al. Video-rate multi-color structured illumination microscopy with simultaneous real-time reconstruction[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 4315.
- [6] Schermelleh L, Ferrand A, Huser T, et al. Super-resolution microscopy demystified[J]. *Nature Cell Biology*, 2019, 21(1): 72-84.
- [7] Gustafsson M G. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 198(2): 82-87.
- [8] Heintzmann R, Jovin T M, Cremer C. Saturated patterned excitation microscopy: a concept for optical resolution improvement[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2002, 19(8): 1599-1609.
- [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] Biteen J, Willets K A. Introduction: super-resolution and single-molecule imaging[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(11): 7241-7243.
- [11] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3: 793-796.
- [12] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [13] 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.
- [14] Xu K, Babcock H P, Zhuang X W. Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(2): 185-188.
- [15] Zhou R B, Han B R, Xia C L, et al. Membrane-associated periodic skeleton is a signaling platform for RTK transactivation in neurons[J]. *Science*, 2019, 365(6456): 929-934.
- [16] Sengupta P, Jovanovic-Talisman T, Skoko D, et al. Probing protein heterogeneity in the plasma membrane using PALM and pair correlation analysis[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(11): 969-975.
- [17] Jing Y Y, Zhou L L, Chen J L, et al. Quantitatively mapping the assembly pattern of EpCAM on cell membranes with peptide probes[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(2): 1865-1873.
- [18] Georgiades P, Allan V J, Wright G D, et al. The flexibility and dynamics of the tubules in the endoplasmic reticulum[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 16474.
- [19] Shim S H, Xia C L, Zhong G S, et al. Super-resolution fluorescence imaging of organelles in live cells with photoswitchable membrane probes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(35): 13978-13983.
- [20] 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.
- [21] Jacquemet G, Carisey A F, Hamidi H, et al. The cell biologist's guide to super-resolution microscopy[J]. *Journal of Cell Science*, 2020, 133(11): jcs240713.
- [22] Barentine A E S, Lin Y, Courvan E M, et al. An integrated platform for high-throughput nanoscopy[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(11): 1549-1556.
- [23] Pegoraro G, Misteli T. High-throughput imaging for the discovery of cellular mechanisms of disease[J]. *Trends in Genetics*, 2017, 33(9): 604-615.
- [24] Mau A, Friedl K, Leterrier C, et al. Fast widefield scan provides tunable and uniform illumination optimizing super-resolution microscopy on large fields[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 3077.
- [25] Holden S J, Pengo T, Meibom K L, et al. High throughput 3D super-resolution microscopy reveals *Caulobacter crescentus in vivo* Z-ring organization[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(12): 4566-4571.
- [26] Beghin A, Kechkar A, Butler C, et al. Localization-based super-resolution imaging meets high-content screening[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(12): 1184-1190.
- [27] Jones T R, Kang I H, Wheeler D B, et al. CellProfiler Analyst: data exploration and analysis software for complex image-based screens[J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 482.
- [28] Mund M, van der Beek J A, Deschamps J, et al. Systematic nanoscale analysis of endocytosis links efficient vesicle formation to patterned actin nucleation[J]. *Cell*, 2018, 174(4): 884-896.
- [29] Pinkard H, Phillips Z, Babakhani A, et al. Deep learning for single-shot autofocus microscopy[J]. *Optica*, 2019, 6(6): 794-797.
- [30] Lightley J, Görlitz F, Kumar S, et al. Robust deep learning optical autofocus system applied to automated multiwell plate single molecule localization microscopy [J]. *Journal of Microscopy*, 2022, 288(2): 130-141.

- [31] Chalfoun J, Majurski M, Blattner T, et al. MIST: accurate and scalable microscopy image stitching tool with stage modeling and error minimization[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 4988.
- [32] Chang H Z, Fu S, Li Y M. Optimal sampling rate for 3D single molecule localization[J]. *Optics Express*, 2023, 31(24): 39703-39716.
- [33] van de Linde S, Löschberger A, Klein T, et al. Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes[J]. *Nature Protocols*, 2011, 6(7): 991-1009.
- [34] 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.
- [35] Diekmann R, Deschamps J, Li Y M, et al. Photon-free (s)CMOS camera characterization for artifact reduction in high- and super-resolution microscopy[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 3362.
- [36] 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.
- [37] von Diezmann A, 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.
- [38] Yan T, Richardson C J, Zhang M, et al. Computational correction of spatially variant optical aberrations in 3D single-molecule localization microscopy[J]. *Optics Express*, 2019, 27(9): 12582-12599.
- [39] Douglass K M, Sieben C, Archetti A, et al. Super-resolution imaging of multiple cells by optimized flat-field epi-illumination[J]. *Nature Photonics*, 2016, 10: 705-708.
- [40] Rowlands C J, Ströhl F, Ramirez P P V, et al. Flat-field super-resolution localization microscopy with a low-cost refractive beam-shaping element[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 5630.
- [41] Stehr F, Stein J, Schueder F, et al. Flat-top TIRF illumination boosts DNA-PAINT imaging and quantification[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1268.
- [42] Khaw I, Croop B, Tang J L, et al. Flat-field illumination for quantitative fluorescence imaging[J]. *Optics Express*, 2018, 26(12): 15276-15288.
- [43] Ibrahim K A, Mahecic D, Manley S. Characterization of flat-fielding systems for quantitative microscopy[J]. *Optics Express*, 2020, 28(15): 22036-22048.
- [44] Zhao Z Y, Xin B, Li L C, et al. High-power homogeneous illumination for super-resolution localization microscopy with large field-of-view[J]. *Optics Express*, 2017, 25(12): 13382-13395.
- [45] Deschamps J, Rowald A, Ries J. Efficient homogeneous illumination and optical sectioning for quantitative single-molecule localization microscopy[J]. *Optics Express*, 2016, 24(24): 28080-28090.
- [46] Kwakwa K, Savell A, Davies T, et al. easySTORM: a robust, lower-cost approach to localisation and TIRF microscopy[J]. *Journal of Biophotonics*, 2016, 9(9): 948-957.
- [47] Ramachandran S, Cohen D A, Quist A P, et al. High performance, LED powered, waveguide based total internal reflection microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 2133.
- [48] Archetti A, Glushkov E, Sieben C, et al. Waveguide-PAINT offers an open platform for large field-of-view super-resolution imaging[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1267.
- [49] Diekmann R, Helle Ø I, Øie C I, et al. Chip-based wide field-of-view nanoscopy[J]. *Nature Photonics*, 2017, 11: 322-328.
- [50] Helle Ø I, Coucheron D A, Tinguely J C, et al. Nanoscopy on-a-chip: super-resolution imaging on the millimeter scale[J]. *Optics Express*, 2019, 27(5): 6700-6710.
- [51] Foylan S, Amos W B, Dempster J, et al. MesoTIRF: a prism-based total internal reflection fluorescence illuminator for high resolution, high contrast imaging of large cell populations[J]. *Applied Physics Letters*, 2023, 122(11): 113701.
- [52] McConnell G, Trägårdh J, Amor R, et al. A novel optical microscope for imaging large embryos and tissue volumes with sub-cellular resolution throughout[J]. *eLife*, 2016, 5: e18659.
- [53] Rames M J, Kenison J P, Heineck D, et al. Multiplexed and millimeter-scale fluorescence nanoscopy of cells and tissue sections via prism-illumination and microfluidics-enhanced DNA-PAINT[J]. *Chemical & Biomedical Imaging*, 2023, 1(9): 817-830.
- [54] 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.
- [55] Thompson M A, Casolari J M, Badieirostami M, et al. Three-dimensional tracking of single mRNA particles in *Saccharomyces cerevisiae* using a double-helix point spread function[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(42): 17864-17871.
- [56] Fu S, Li M F, Zhou L L, et al. Deformable mirror based optimal PSF engineering for 3D super-resolution imaging[J]. *Optics Letters*, 2022, 47(12): 3031-3034.
- [57] 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.
- [58] Backlund M P, Lew M D, Backer A S, et al. The double-helix point spread function enables precise and accurate measurement of 3D single-molecule localization and orientation[J]. *Proceedings of SPIE*, 2013, 8590: 85900L.
- [59] Pavani S R P, Thompson M A, Biteen J S, et al. Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function[J]. *Proceedings of the National Academy*

- of Sciences of the United States of America, 2009, 106(9): 2995-2999.
- [60] 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: 302-306.
- [61] 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.
- [62] Shechtman Y, Weiss L E, Backer A S, et al. Multicolour localization microscopy by point-spread-function engineering[J]. *Nature Photonics*, 2016, 10: 590-594.
- [63] Shechtman Y, Gustavsson A K, Petrov P N, et al. Observation of live chromatin dynamics in cells via 3D localization microscopy using Tetrapod point spread functions[J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 8(12): 5735-5748.
- [64] Jusuf J M, Lew M D. Towards optimal point spread function design for resolving closely spaced emitters in three dimensions[J]. *Optics Express*, 2022, 30(20): 37154-37174.
- [65] Yang B, Chen X Y, Wang Y N, et al. Epi-illumination SPIM for volumetric imaging with high spatial-temporal resolution[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(6): 501-504.
- [66] Yang B, Lange M, Millett-Sikking A, et al. DaXi-high-resolution, large imaging volume and multi-view single-objective light-sheet microscopy[J]. *Nature Methods*, 2022, 19(4): 461-469.
- [67] Huisken J, Swoger J, del Bene F, et al. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy[J]. *Science*, 2004, 305(5686): 1007-1009.
- [68] Keller P J, Schmidt A D, Wittbrodt J, et al. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy[J]. *Science*, 2008, 322(5904): 1065-1069.
- [69] Navikas V, Descloux A C, Grussmayer K S, et al. Adaptive optics enables multimode 3D super-resolution microscopy via remote focusing[J]. *Nanophotonics*, 2021, 10(9): 2451-2458.
- [70] Basumatary J, Baro N, Joshi P, et al. Scanning single molecule localization microscopy (scanSMLM) for super-resolution volume imaging[J]. *Communications Biology*, 2023, 6: 1050.
- [71] Žurauskas M, Barnstedt O, Frade-Rodriguez M, et al. Rapid adaptive remote focusing microscope for sensing of volumetric neural activity[J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 8(10): 4369-4379.
- [72] Huang Z L, Zhu H Y, Long F, et al. Localization-based super-resolution microscopy with an sCMOS camera[J]. *Optics Express*, 2011, 19(20): 19156-19168.
- [73] Quan T W, Li P C, Long F, et al. Ultra-fast, high-precision image analysis for localization-based super resolution microscopy[J]. *Optics Express*, 2010, 18(11): 11867-11876.
- [74] Wang Y N, Quan T W, Zeng S Q, et al. PALMER: a method capable of parallel localization of multiple emitters for high-density localization microscopy[J]. *Optics Express*, 2012, 20(14): 16039-16049.
- [75] Munro I, García E, Yan M, et al. Accelerating single molecule localization microscopy through parallel processing on a high-performance computing cluster[J]. *Journal of Microscopy*, 2019, 273(2): 148-160.
- [76] Hu Y S, Nan X L, Sengupta P, et al. Accelerating 3B single-molecule super-resolution microscopy with cloud computing[J]. *Nature Methods*, 2013, 10: 96-97.
- [77] Cox S, Rosten E, Monypenny J, et al. Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics[J]. *Nature Methods*, 2011, 9(2): 195-200.
- [78] Li L C, Xin B, Kuang W B, et al. Divide and conquer: real-time maximum likelihood fitting of multiple emitters for super-resolution localization microscopy[J]. *Optics Express*, 2019, 27(15): 21029-21049.
- [79] Ovesný M, Křížek P, Borkovec J, et al. ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(16): 2389-2390.
- [80] Gui D, Chen Y J, Kuang W B, et al. Accelerating multi-emitter localization in super-resolution localization microscopy with FPGA-GPU cooperative computation [J]. *Optics Express*, 2021, 29(22): 35247-35260.
- [81] Du Y, Wang C Z, Zhang C, et al. Computational framework for generating large panoramic super-resolution images from localization microscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2021, 12(8): 4759-4778.
- [82] Cardona A, Saalfeld S, Schindelin J, et al. TrakEM2 software for neural circuit reconstruction[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38011.
- [83] Fu S, Shi W, Luo T D, et al. Field-dependent deep learning enables high-throughput whole-cell 3D super-resolution imaging[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(3): 459-468.