

二抗物种特异性对双色 STORM 成像的影响(特邀)

邓师禹¹, 胡芬^{1*}, 侯梦迪¹, 杨建宇¹, 李任植¹, 潘雷霆^{1,2,3,4*}¹弱光非线性光子学教育部重点实验室, 南开大学物理科学学院, 泰达应用物理研究院, 天津 300071;²药物化学生物学全国重点实验室, 南开大学生命科学学院, 细胞应答交叉科学中心, 天津 300071;³南开大学深圳研究院, 广东 深圳 518083;⁴极端光学协同创新中心, 山西大学, 山西 太原 030006

摘要 随机光学重建显微术(STORM)基于免疫荧光标记技术,具有原理易懂、光路简单、分辨率极高等特点,一直受到科研工作者的青睐,但分辨率的提升对抗体的特异性提出了更高的要求。相较一抗直接标记,“一抗+二抗”的间接标记法在实际应用中普适性更强。二抗相对一抗存在物种特异性的问题,生产时需要对其进行预吸附来提升物种特异性。为了探究二抗物种特异性对双色 STORM 成像的影响,基于经典的红细胞骨架模型中血影蛋白 N 端和 C 端的互斥位置关系,对二者使用高、低吸附二抗标记后分别进行双色 STORM 成像,对照模拟中无信号串扰条件下的互相关分析结果,结果表明低吸附二抗会造成二者共定位的假象。进一步,分别通过高、低吸附二抗对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞 CD47 和 PD-L1 两种膜蛋白进行双色 STORM 成像,结果揭示两种蛋白无共定位关系。本研究为二抗物种特异性的评估提供了一种基于红细胞骨架结构模型的超分辨成像新策略,助力双色 STORM 成像精准阐明蛋白分子互作关系。

关键词 超分辨成像; 随机光学重建显微术; 免疫荧光; 红细胞膜骨架; 互相关分析

中图分类号 O436

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP232601

Effect of Species Specificity of the Secondary Antibody on Two-Color STORM Imaging (Invited)

Deng Shiyu¹, Hu Fen^{1*}, Hou Mengdi¹, Yang Jianyu¹, Imshik Lee¹, Pan Leiting^{1,2,3,4*}¹Key Laboratory of Weak-Light Nonlinear Photonics, Ministry of Education, School of Physics and TEDA Institute of Applied Physics, Nankai University, Tianjin 300071, China;²Frontiers Science Center for Cell Responses, State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China;³Shenzhen Research Institute of Nankai University, Shenzhen 518083, Guangdong, China;⁴Collaborative Innovation Center of Extreme Optics, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi, China

Abstract Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM), a super-resolution imaging technology based on immunofluorescence, has gained popularity owing to its straightforward principle, simple optical path, and excellent spatial resolution. However, the enhanced resolution demands greater specificity from antibodies. While direct labeling with primary antibodies is an option, indirect labeling using a “primary + secondary antibody” combination is more commonly employed in practical applications. Considering the issue of species specificity with secondary antibodies, preadsorption is required to increase specificity during production. In this study, we aim to explore the effect of secondary antibody species specificity on dual-color STORM imaging. In the classical erythrocyte skeleton model, based on the mutually exclusive localization between the N-terminal and C-terminal of β -spectrin, we performed two-color STORM imaging of them by labeling them with low- and high-adsorption secondary antibodies, respectively. A comparison with cross-correlation data from simulations revealed that low-adsorption secondary antibodies led to colocalization artifacts in

收稿日期: 2023-12-01; 修回日期: 2024-01-09; 录用日期: 2024-01-15; 网络首发日期: 2024-02-02

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFC3400600)、国家自然科学基金(32227802, 12174208)、广东省基础与应用基础研究重大项目(2020B0301030009)、南开大学中央高校基本科研业务费专项资金(2122021337, 2122021405)、高等学校学科创新引智计划(B23045)

通信作者: *plt@nankai.edu.cn; **hufen@nankai.edu.cn

the STORM results. Furthermore, when employing high- and low-adsorption secondary antibodies, two-color STORM results of CD47 and PD-L1 on the MDA-MB-231 cell membrane indicated no colocalization relation between the two proteins. Therefore, this study provides an innovative super-resolution imaging strategy for evaluating secondary antibody species specificity using an erythrocyte skeleton structure model. Additionally, this approach paves the way for accurate identification of biomolecular interactions through dual-color STORM imaging.

Key words super-resolution imaging; stochastic optical reconstruction microscopy; immunofluorescence; erythrocyte membrane skeleton; cross-correlation analysis

1 引言

免疫荧光成像^[1]以直观可视、高特异性标记等特性在细胞生物学研究中广泛应用。常见的免疫荧光标记方法包括直接法^[2]和间接法^[3]。直接法通过带荧光探针的一抗直接标记目标蛋白分子,并采集荧光信号对其进行成像。而间接法通过一抗标记目标蛋白,再使用带荧光探针的二抗去标记一抗,形成抗原-一抗-荧光二抗复合物。由于二抗是物种特异性,相同的二抗可标记不同的一抗,使用起来更加灵活,因此间接法在多色成像中的适应性更强。

传统荧光成像受衍射极限限制,分辨率只有 200 nm,而本世纪初提出的超分辨成像的分辨率达数纳米,极大地促进了人们对亚细胞结构与功能的研究^[4-8]。其中单分子定位成像(SMLM)因分辨率最高、原理易懂、光路易搭建、工作方式易掌握等优点,迅速发展为主流的超分辨成像技术^[9-12]。SMLM包括随机光学重构显微术(STORM)^[13]、光激活定位显微术(PALM)^[14]及纳米尺度点累积形貌成像(PAINT)^[15]。其中 STORM 基于免疫荧光标记,是利用二抗偶联具有闪烁能力的荧光探针进行单分子定位的成像技术,由于抗体技术的成熟,是应用较多的 SMLM。多色 STORM^[16]在揭示生物分子互作关系方面发挥着重要作用。Xu 等^[17]通过双色 STORM 成像,揭示了神经轴突上微丝-帽蛋白复合物与血影蛋白交替构成的间距为 180~190 nm 的周期性结构。Lopes 等^[18]通过双色 STORM 成像观察到人巨噬细胞活化时 Fc γ 受体与信号调节蛋白 α 的分离。Hu 等^[19]通过双色 STORM 成像,阐明了巨噬细胞伪足小体结构中肌球蛋白和桩蛋白 90 nm 的轴向高度差。然而,STORM 超高的分辨率也对抗体的特异性提出了更高的要求,尤其是双色成像中二抗物种特异性。为了提高二抗的物种特异性,在生产时需要对其进行预吸附。低吸附二抗可能会结合不同物种抗体,导致双色 STORM 两个通道之间出现信号串扰。亟需发展有效的评估二抗物种特异性的方法,避免实验假象的发生。

经典的红细胞骨架具有三角晶格网络结构,其中血影蛋白 N 端在网络的节点处,血影蛋白 C 端在网络的中间处,二者在空间上具有明确的互斥位置关系^[20],这为判断双色成像结果中蛋白互作关系的正确性提供了良好的参照。因此,本文基于红细胞骨架结

构模型,选择血影蛋白 N 端和 C 端进行双色 STORM 成像,通过模拟和实验探究低吸附二抗对成像结果的影响。

2 原理与方法

2.1 免疫荧光标记和二抗预吸附原理

抗体一般呈“Y”字形结构,“Y”的两臂末端为抗原结合片段(Fab),柄部为结晶片段(Fc),如图 1(a)所示。二抗通常与一抗的 Fc 段相结合,Fc 段与物种来源相关,因此需根据一抗的物种来源选择相应抗该物种的二抗。然而实际情况中二抗往往会与非特异性物种的一抗结合。此外,为了起到放大信号的作用,二抗一般是多克隆抗体,结合到一抗 Fc 段的多个不同位点后,导致特异性不够显著,如图 1(a)所示。因此,与一抗相比,二抗的特异性较弱,在生产二抗时需要对其进行预吸附处理提高物种特异性。

预吸附指对二抗与潜在非特异性结合物种的固定蛋白血清进行处理,保留未结合的二抗,进而提高二抗物种特异性,图 1(b)所示。当二抗预吸附不充分,使用间接法同时标记目标生物分子时,低吸附二抗会结合其他种属的一抗或二抗,导致信号串扰,如图 1(c)所示。

2.2 人红细胞膜骨架的 STORM 成像

人成熟红细胞结构简单,仅有一层膜及依附于膜的三角晶格网络状的细胞骨架结构,内部填充着血红蛋白,呈双凹圆饼形状,直径约为 8 μm ,边缘和中心厚度分别约为 2.8 μm 和 1 μm ,如图 2(a)所示^[21]。红细胞膜骨架的主体是由肌动蛋白连接体复合物(actin junctional complexes)和血影蛋白(spectrin)构成的三角晶格网络。其中血影蛋白包含两个相似的亚基,即 α 亚基(α -spectrin)和 β 亚基(β -spectrin),二者反平行排列,螺旋缠绕形成异二聚体。异二聚体再头对头结合,形成四聚体,这些四聚体构成三角晶格网络的每一条边。肌动蛋白连接体复合物是三角晶格网络的节点,每个节点与最邻近节点的距离约 80 nm,如图 2(b)所示^[20]。 β -spectrin N 端与肌动蛋白复合物结合,位于四聚体两端,而 C 端则位于四聚体中间,因此二者之间的距离大约为 40 nm。二者这种确定的互斥位置关系为双色成像时判断二抗信号串扰提供了参照。

由于正常红细胞 β -spectrin C 端密度过高,故利用

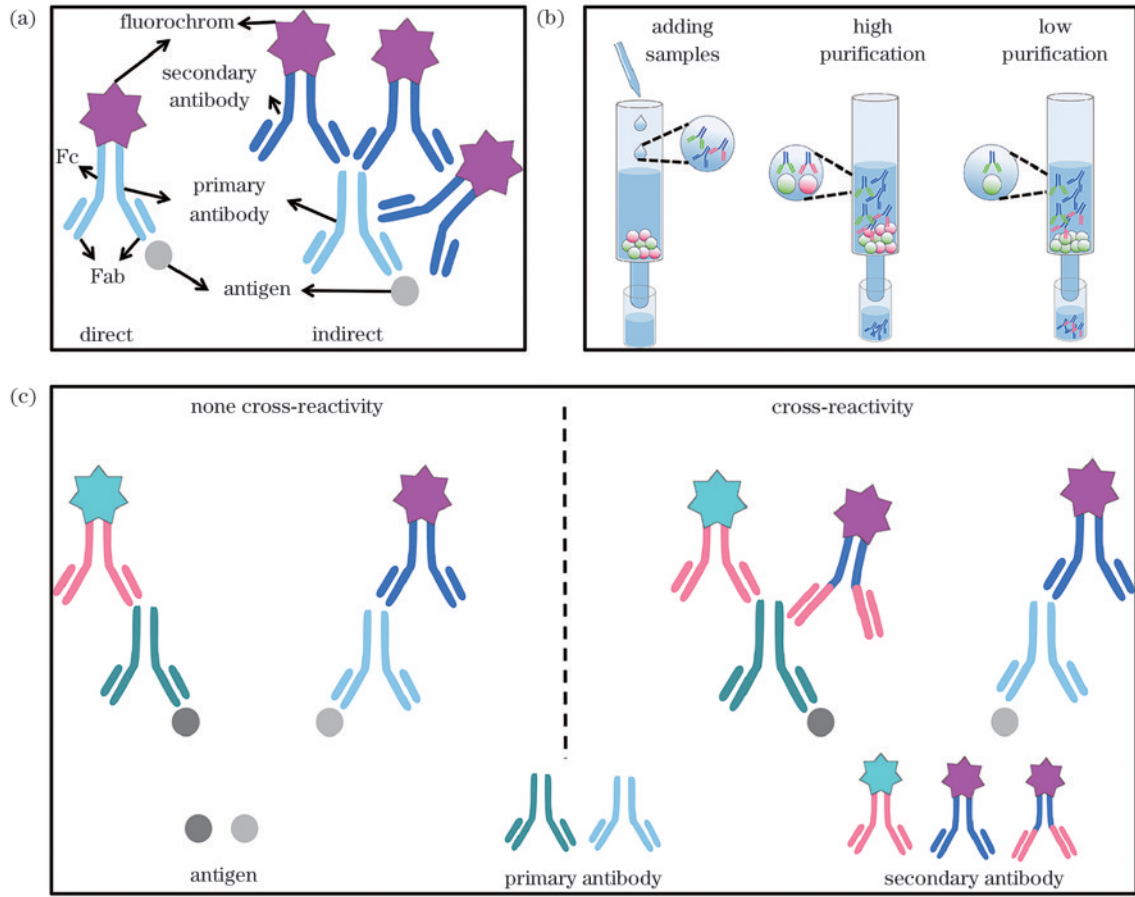


图 1 免疫荧光标记与二抗预吸附原理示意图。(a)直接与间接免疫荧光标记法;(b)二抗预吸附过程;(c)二抗发生交叉反应
Fig. 1 Immunofluorescent labeling and secondary antibody pre-adsorption. (a) Direct and indirect immunofluorescent labeling methods;
(b) secondary antibody pre-adsorption; (c) cross-reactivity of secondary antibodies

超微结构保留的膨胀显微技术(U-ExM)膨胀红细胞(约膨胀 4.3 倍),然后对膨胀后的 β -spectrin N 端和 C 端进行双色 STORM 成像^[22]。利用自主搭建的 STORM 成像系统对制备好的样品进行信号采集,首先寻找到合适的成像视野,选择 2 kW/cm^2 功率密度的激光激发该视野范围内的荧光分子,使之发生稀疏闪烁,并依次对两个通道进行采集。期间适当加入低强度紫外光,以提高荧光闪烁能力。每个通道约采集 50000 帧图片,随后使用单分子定位算法对每一帧图片中的离散荧光分子进行精准定位,叠加所有定位后的坐标点,并进行漂移校正,最终得到重构的高分辨率 STORM 图像。

2.3 互相关分析

互相关分析通常用于分析双色 STORM 成像后两个通道点簇之间的相互关系。互相关分析是通过两个通道的点进行距离相关性的量化,来揭示它们在空间上的关联性的过程。首先,对于每一对来自两个通道的点,计算它们之间的成对距离,然后统计半径为 r 、宽度为 dr 的环形区域内的成对点数,再通过与该区域的平均成对点数进行比较得到互相关系数,以此对两个通道的点进行距离相关性的量化。互相

关函数^[23]为

$$C(r) = \frac{M(r)}{\rho_0 \Delta A(r) W(r)}, \quad (1)$$

式中: r 是两个不同通道点的成对距离; $M(r)$ 是半径为 r 、宽度为 dr 的环形区域内的成对点数; ρ_0 为整个互相关区域内成对点数的平均密度; $\Delta A(r)$ 是环形区域的面积; $W(r)$ 是整个互相关区域的径向平均自相关系数。 $\rho_0 \Delta A(r) W(r)$ 代表两通道的点随机分布时半径为 r 、宽度为 dr 的环形区域内的成对点数,用以对 $M(r)$ 进行归一化。图 2(c)所示的互相关分析算法流程为:输入两个通道的数据,计算两通道点与点之间的距离,然后根据设定的环形区域宽度 dr 获得不同环形区域的成对点数 $M(r)$ 以及计算两通道的点随机分布时不同环形区域的成对点数 $\rho_0 \Delta A(r) W(r)$,最后利用互相关函数计算出不同环形区域的互相关系数。互相关系数越高则代表两个通道点簇在此处的共定位关系越强。若互相关系数大于 1,代表两个通道点簇之间存在共定位;若互相关系数接近 1,代表两个通道点簇之间关系随机;若互相关系数小于 1,代表两个通道点簇之间存在互斥^[23-24]。

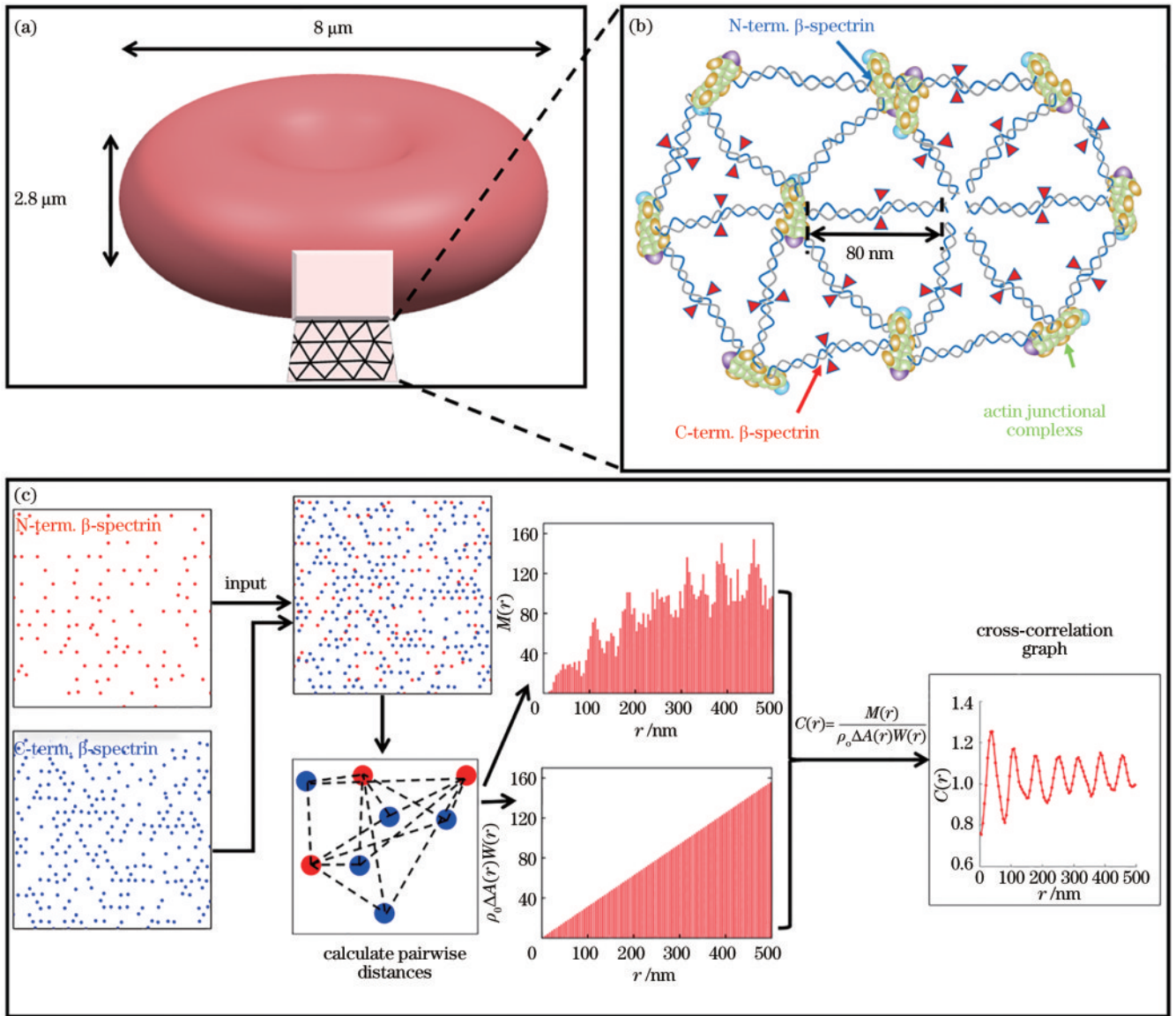


图 2 红细胞骨架结构和互相关分析流程。(a)红细胞形态示意图,插图为依附于膜内侧的三角晶格网络状的膜骨架示意图;(b)红细胞骨架模型;(c)互相关分析算法流程

Fig. 2 Schematic of erythrocyte skeleton and flowchart of the cross-correlation analysis algorithm. (a) Morphology of erythrocyte. The inset shows the membrane skeleton in the form of a triangular lattice network; (b) model of erythrocyte skeleton; (c) flowchart of the cross-correlation analysis algorithm

3 结果与讨论

3.1 双色 STORM 成像中信号串扰的模拟和分析

首先利用 Matlab 软件模拟了有无信号串扰时红细胞膜骨架蛋白 β -spectrin N 端和 C 端的双色 STORM 成像结果,并通过互相关算法进行分析。具体步骤如下:在 $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ 的区域内生成间距为 320 nm 的三角晶格网络来模拟膨胀约 4.3 倍后的红细胞骨架,设置两个通道,分别代表红细胞膜骨架蛋白 β -spectrin N 端(红色)和 C 端(蓝色);基于红细胞膜骨架存在 15% 的扰动^[25],对其中一个通道的点簇设定该定位扰动,再通过移除两个通道 60% 的点簇来模拟真实情况下的数据缺失。根据 STORM 的单分子定位成

像原理以及其 20 nm 的分辨率,将每个点簇的点数设为 20,其内部点坐标的标准差设为 10 nm,得到最终 STORM 成像的模拟定位数据,如图 3(a)所示。图 3(b)所示的局部放大图显示出典型的三角晶格网络,通过互相关分析发现,互相关系数在初始位置小于 1,代表两通道点簇之间是互斥位置关系。互相关系数较大的位置约为 150 nm,接近三角晶格骨架周期长度的 1/2,如图 3(c)所示。同时,最近距离统计峰值对应的横坐标约为 172 nm,同样接近三角晶格骨架周期长度的 1/2,如图 3(d)所示,与设定模型相符。

随后,对其中一个通道添加另一个通道 1% 的共定位点来模拟真实的 1% 信号串扰情况。得到的双通道定位数据如图 3(e)所示,图 3(f)所示的局部放大图

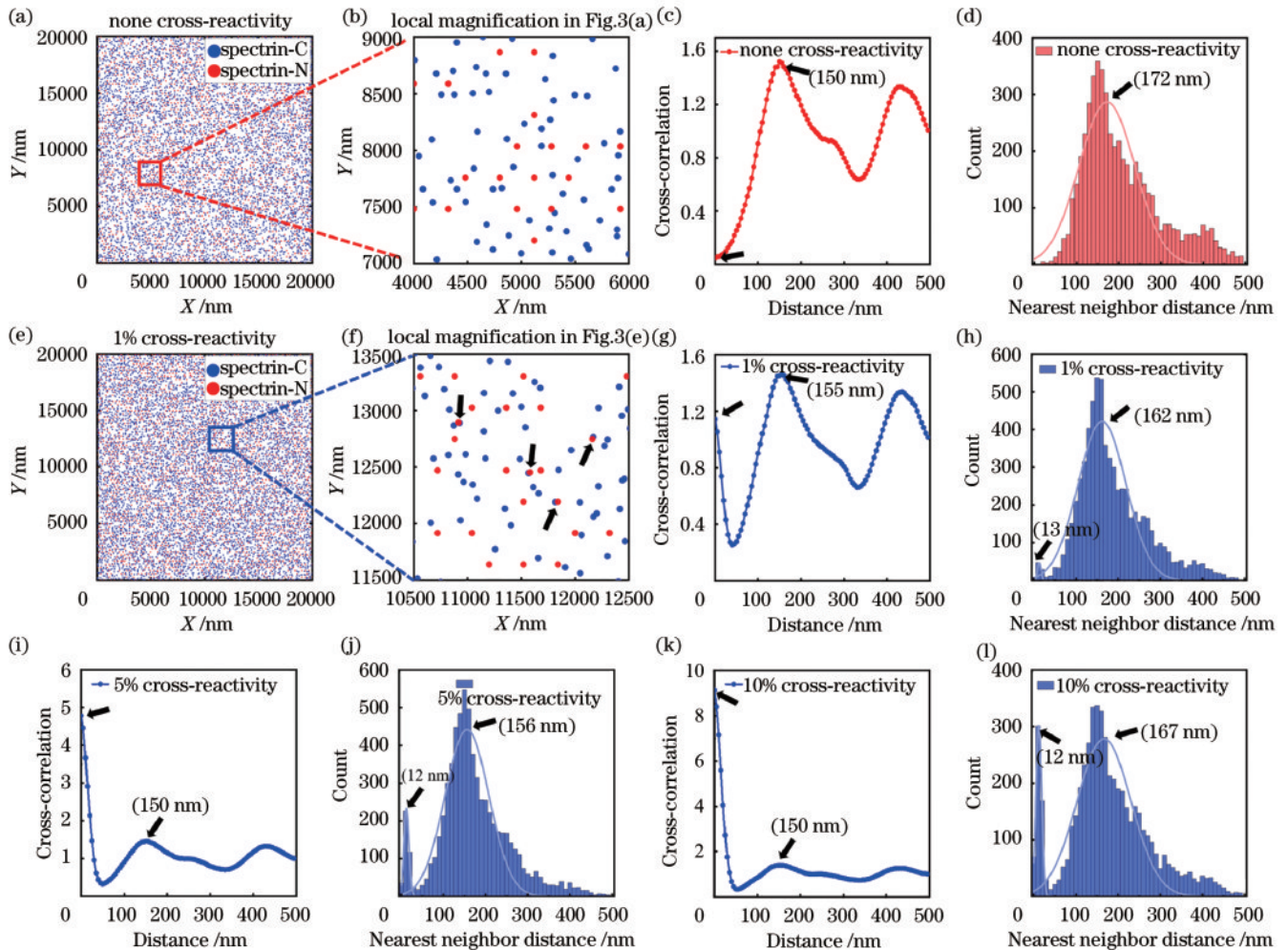


图3 红细胞 β -spectrin N 端和 C 端的双色 STORM 成像的模拟。(a) 没有信号串扰时的双色 STORM 成像结果的模拟；(b) 图 3(a) 的局部放大；(c) 图 3(a) 中两个通道点的互相关分析；(d) 图 3(a) 中两个通道中点的最近距离分析；(e) 1% 信号串扰时双色 STORM 成像结果的模拟；(f) 图 3(e) 的局部放大；(g)~(l) 1%、5% 和 10% 信号串扰时的互相关和最近距离分析

Fig. 3 Simulations for two-color STORM imaging of erythrocyte β -spectrin N-terminal and C-terminal. (a) Simulation of two-color STORM imaging with zero cross-reactivity; (b) local magnification in Fig. 3(a); (c) cross-correlation analysis between points in two channels in Fig. 3(a); (d) nearest neighbor analysis between points in two channels in Fig. 3(a); (e) simulation of two-color STORM imaging with 1% cross-reactivity; (f) local magnification in Fig. 3(e); (g)~(l) cross-correlation analysis and nearest neighbor analysis with 1%, 5%, 10% cross-reactivity

显示两个通道的点存在部分共定位情况,得到的互相关系数在初始位置大于 1,代表两通道点簇之间存在共定位关系,如图 3(g) 所示。考虑到抗体的摆动,设置串扰信号点的定位扰动为 10 nm,所以当发生信号串扰时,两通道之间存在部分点簇重叠,最近距离分析会在 10 nm 附近出现峰值,如图 3(h) 所示。随后又模拟了 5% 和 10% 信号串扰的情况,发现初始位置的互相关系数(大于 1)、最近距离在约 12 nm 处的峰值都随着信号串扰比例的增加而增大,如图 3(i)~(l) 所示,表明信号串扰导致模拟结果中 β -spectrin N 端和 C 端出现共定位关系假象,且共定位比例随着信号串扰比例的增加而增大。

3.2 双色 STORM 成像中低吸附二抗造成实验假象

随后,分别使用高、低吸附二抗标记 β -spectrin C

端(洋红色),并使用高吸附二抗标记 β -spectrin N 端(青色),首先进行双色普通免疫荧光成像,如图 4(a) 和图 4(b) 所示,通过计算 Manders 共定位系数和 Spearman 秩相关系数来评价两个通道的共定位关系,发现低吸附情况下 Manders 共定位系数 M^C 和 M^N 分别为 0.479 ± 0.150 和 0.495 ± 0.206 , Spearman 秩相关系数 S 为 0.340 ± 0.092 ,高吸附情况下 M^C 和 M^N 分别为 0.469 ± 0.017 和 0.406 ± 0.035 , S 为 0.363 ± 0.022 ,如图 4(c) 所示。这些结果表明,双色普通免疫荧光成像对二抗物种特异性不敏感,且高、低吸附二抗均得到 β -spectrin N 端和 C 端具有一定共定位关系的错误结果。这可能是由于膨胀后 β -spectrin N 端和 C 端的距离约为 160 nm,小于衍射极限,使得普通免疫荧光成像时难以区分,导致两者呈共定位关系。

进一步探究二抗物种特异性对双色 STORM 实际

成像的影响。 β -spectrin N 端都是使用高吸附二抗(青色)。 β -spectrin C 端使用低吸附二抗情况下(洋红色),双色成像显示 β -spectrin N 端和 C 端存在部分共定位的情况,如图 4(d)和图 4(e)所示。而后对两个通道的点进行互相关分析,得到的互相关曲线的初始位置大于 1,如图 4(f)所示,最近距离分析在 15 nm 附近出现了峰值,如图 4(g)所示,与发生信号串扰的模拟结果相似。 β -spectrin C 端也使用高吸附二抗,双色 STORM 成像结果表明 β -spectrin N 端和 C 端没有明

显共定位,如图 4(h)和图 4(i)所示。其互相关系数在初始位置最小,约为 0.4,说明 β -spectrin N 端和 C 端为互斥关系,且在约 170 nm 处达到相关性最大值,如图 4(j)所示,最近距离分析在 174 nm 左右出现峰值,如图 4(k)所示,与没有信号串扰的模拟结果相似,符合已有的红细胞骨架模型。这些结果表明低吸附二抗会导致信号串扰,造成双色 STORM 成像出现 β -spectrin N 端和 C 端共定位假象,因此二抗的物种特异性对双色 STORM 成像至关重要。

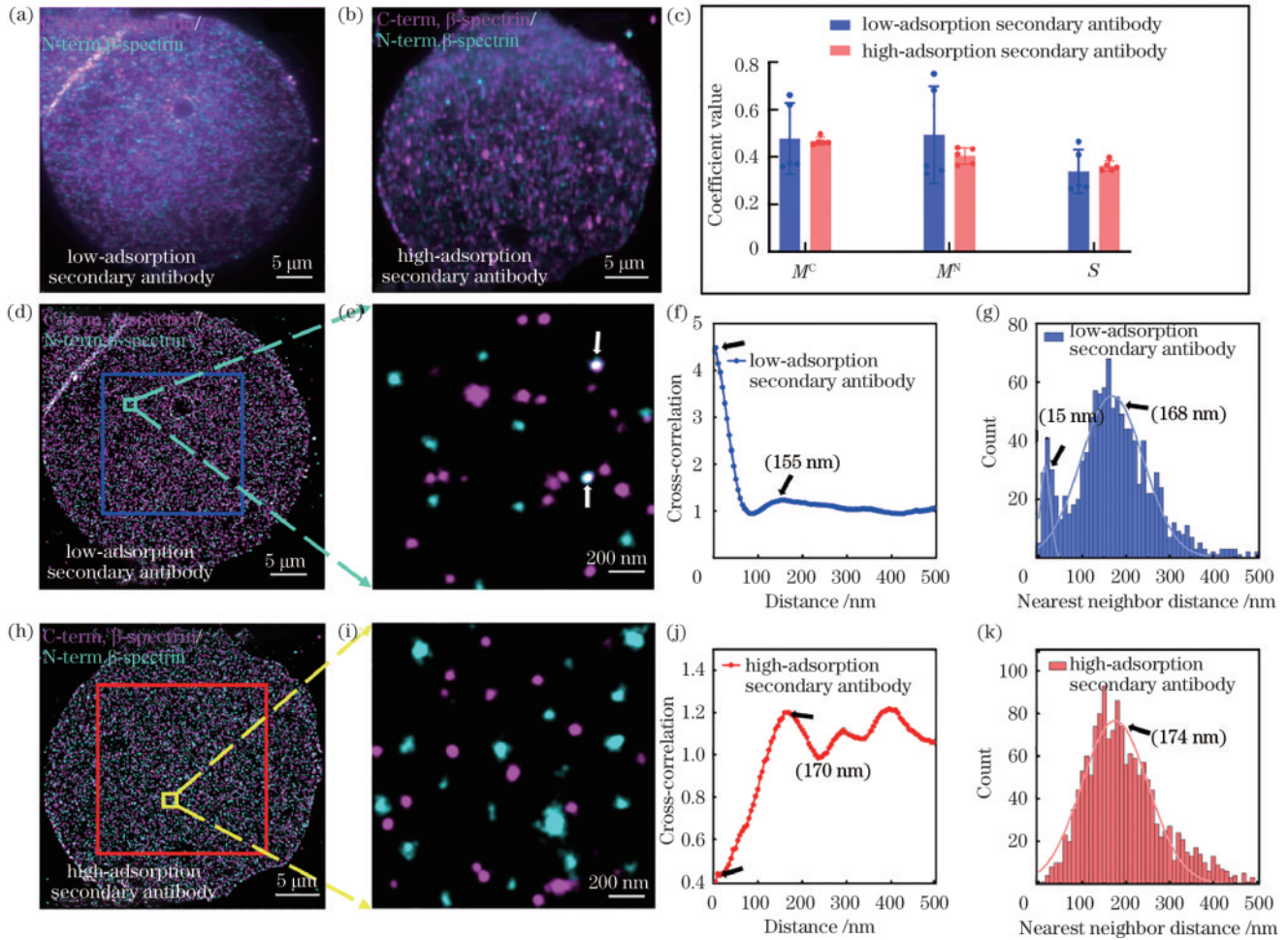


图 4 二抗物种特异性对双色普通免疫荧光成像和 STORM 成像的影响。(a)(b)低吸附和高吸附二抗标记的红细胞 β -spectrin N 端和 C 端的双色普通免疫荧光图像;(c)图 4(a)和图 4(b)中 5 个不同区域的 Manders 共定位和 Spearman 秩相关分析;(d)图 4(a)对应的 STORM 图像;(e)图 4(d)的局部放大;(f)(g)图 4(d)矩形框区域的互相关和最近距离分析;(h)图 4(b)对应的 STORM 图像;(i)图 4(h)的局部放大;(j)(k)图 4(h)矩形框区域的互相关和最近距离分析

Fig. 4 Effect of secondary antibody species specificity on two-color conventional immunofluorescence and STORM imaging. (a)(b) Two-color conventional immunofluorescence imaging of erythrocyte β -spectrin N- and C-terminal labeled with low- or high-adsorption secondary antibody; (c) Manders' correlation analysis and Spearman's rank correlation analysis for five different regions in Fig. 4(a) and Fig. 4(b); (d) STORM image corresponding to Fig. 4(a); (e) local magnification in Fig. 4(d); (f)(g) cross-correlation analysis and the nearest neighbor distance analysis for the data in the rectangular box in Fig. 4(d); (h) STORM image corresponding to Fig. 4(b); (i) local magnification in Fig. 4(h); (j)(k) cross-correlation analysis and the nearest neighbor distance analysis for the data in the rectangular box in Fig. 4(h)

3.3 双色 STORM 成像中高吸附二抗揭示目标蛋白真实位置关系

CD47(Cluster of Differentiation 47)^[26]和程序性死

亡配体 1(Programmed Death-Ligand 1, PD-L1)^[27]是重要的免疫检查点蛋白。前者通过与信号调节蛋白 α (SIRP α)结合,释放“别吃我”信号,抑制巨噬细胞的吞噬

作用^[26]。后者通过与程序性死亡蛋白 1(PD-1)结合,抑制 T 细胞的活性,使得 T 细胞不能有效地攻击被标记为“自体”的细胞^[27]。肿瘤细胞可通过过度表达 CD47 或 PD-L1 来逃避免疫系统的攻击,然而两种蛋白在膜上的位置关系以及是否存在相互作用,目前尚未清楚阐明。

为此,使用高吸附二抗对 MDA-MB-231 三阴乳腺癌细胞的 CD47 和 PD-L1 进行双色 STORM 成像,探究它们在膜上的准确位置关系。使用高吸附二抗标记 CD47(洋红色)、高吸附二抗标记 PD-L1(青色)进行双色 STORM 成像,结果显示 CD47 和 PD-L1 没有明显

的共定位现象,如图 5(a)和图 5(b)所示。对两个通道的点进行互相关分析后,得到的互相关系数初始位置大小在 1 的附近,随后基本在 1 附近扰动,如图 5(c)所示,也说明 CD47 和 PD-L1 在膜上的位置无共定位关系。作为对照,使用低吸附二抗标记 CD47(洋红色)、高吸附二抗标记 PD-L1(青色)进行双色 STORM 成像,明显观察到两个通道有部分点位置重叠,如图 5(d)和图 5(e)所示,互相关分析曲线也表明两个通道存在共定位,如图 5(f)所示。这些结果再次验证二抗信号串扰导致双色 STORM 实验假象。

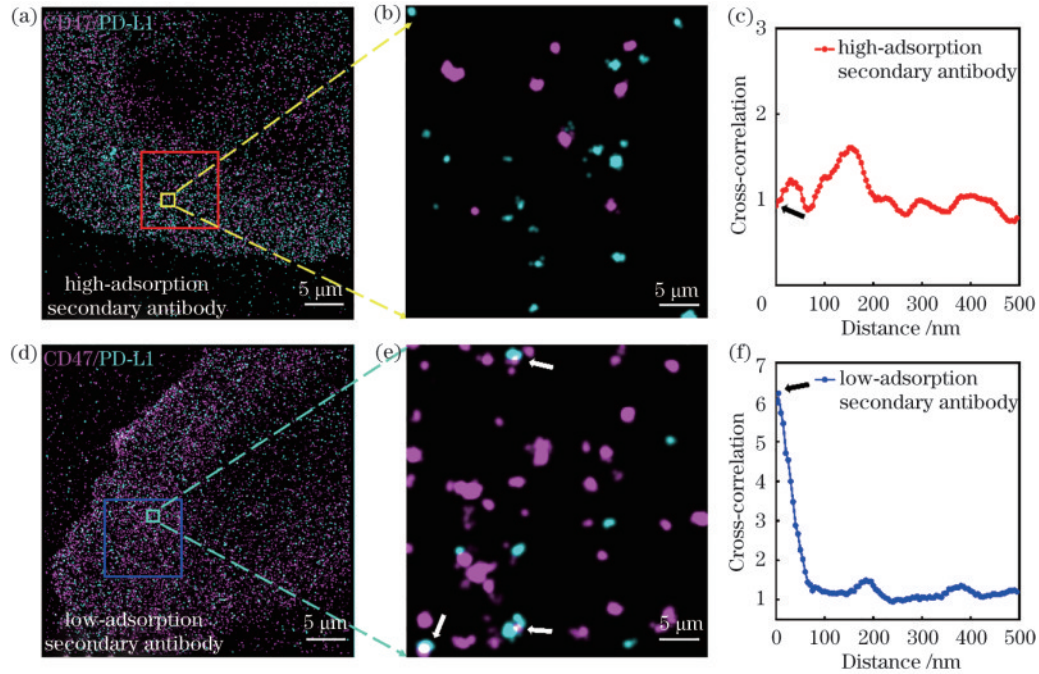


图 5 MDA-MB-231 细胞中 CD47 和 PD-L1 的双色 STORM 成像。(a)高吸附二抗标记的双色 STORM 图像;(b)图 5(a)的局部放大;(c)图 5(a)矩形框区域的互相关分析;(d)低吸附二抗标记的双色 STORM 图像;(e)图 5(d)的局部放大;(f)图 5(d)矩形框区域的互相关分析

Fig. 5 Two-color STORM imaging of CD47 and PD-L1 in MDA-MB-231 cells. (a) Two-color STORM image obtained by high-adsorption secondary antibody labeling; (b) local magnification in Fig. 5(a); (c) cross-correlation analysis for the data in the rectangular box in Fig. 5(a); (d) two-color STORM image obtained by low-adsorption secondary antibody labeling; (e) local magnification in Fig. 5(d); (f) cross-correlation analysis for the data in the rectangular box in Fig. 5(d)

4 结 论

基于红细胞骨架模型中 β -spectrin N 端和 C 端的互斥位置关系,通过模拟和实验探讨了低吸附二抗对双色 STORM 成像结果的影响,从而建立了一种评估二抗物种特异性的超分辨成像标准解决方案。低吸附二抗进行双色 STORM 成像时会发生信号串扰,导致出现 β -spectrin N 端和 C 端共定位的实验假象,而高吸附二抗则可得到正确的位置关系。相较而言,抗体物种特异性的差别无法通过普通免疫荧光成像体现。进一步,使用高吸附二抗进行双色 STORM 成像,揭示出 MDA-MB-231 细胞免疫逃逸相关的两种膜蛋白 CD47 和 PD-L1 无共定位关系。综上,高物种特异性的二抗

在 STORM 成像中尤为重要。本文提出的基于已知互斥位点进行双色 STORM 成像的检验方法将有助于判断二抗的物种特异性,提高结果的可靠性和稳定性,从而为利用双色 STORM 成像探究生物分子间的精准互作关系提供坚实的保障。

参 考 文 献

- [1] Coons A H. Fluorescent antibody methods[J]. General Cytochemical Methods, 1958, 1: 399-422.
- [2] Coons A H, Creech H J, Jones R N, et al. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody[J]. The Journal of Immunology, 1942, 45(3): 159-170.
- [3] Kelen A E, Ayllon-Leindl L, Labzoffsky N A. Indirect

- fluorescent antibody method in serodiagnosis of toxoplasmosis [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1962, 8(4): 545-554.
- [4] 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.
- [5] Schermelleh L, Ferrand A, Huser T, et al. Super-resolution microscopy demystified[J]. *Nature Cell Biology*, 2019, 21(1): 72-84.
- [6] Liu S, Hoess P, Ries J. Super-resolution microscopy for structural cell biology[J]. *Annual Review of Biophysics*, 2022, 51: 301-326.
- [7] Bond C, Santiago-Ruiz A N, Tang Q, et al. Technological advances in super-resolution microscopy to study cellular processes[J]. *Molecular Cell*, 2022, 82(2): 315-332.
- [8] Sun Y L, Zhu H F, Yin L, et al. Fluorescence interference structured illumination microscopy for 3D morphology imaging with high axial resolution[J]. *Advanced Photonics*, 2023, 5(5): 056007.
- [9] 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.
- [10] Lelek M, Gyparaki M T, Beliu G, et al. Single-molecule localization microscopy[J]. *Nature Reviews: Methods Primers*, 2021, 1: 39.
- [11] 杨建宇, 董浩, 邢福临, 等. 单分子定位超分辨成像技术进展及应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(12): 1200001.
Yang J Y, Dong H, Xing F L, et al. Single-molecule localization super-resolution microscopy and its applications [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(12): 1200001.
- [12] 侯梦迪, 胡芬, 杨建宇, 等. 核孔复合物单分子定位超分辨图像的筛选和重构[J]. *中国激光*, 2024, 51(3): 0307101.
Hou M D, Hu F, Yang J Y, et al. Screening and reconstruction for single molecular localization super-resolution images of nuclear pore complexes[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2024, 51(3): 0307101.
- [13] 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.
- [14] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [15] Sharonov A, Hochstrasser R M. Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes[J]. *Proceedings of the National Academy of Science*, 2006, 103(50): 18911-18916.
- [16] 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.
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.
- [17] Xu K, Zhong G S, Zhuang X W. Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons[J]. *Science*, 2013, 339(6118): 452-456.
- [18] Lopes F B, Bálint Š, Valvo S, et al. Membrane nanoclusters of FcγRI segregate from inhibitory SIRPα upon activation of human macrophages[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2017, 216(4): 1123-1141.
- [19] Hu F, Zhu D L, Dong H, et al. Super-resolution microscopy reveals nanoscale architecture and regulation of podosome clusters in primary macrophages[J]. *iScience*, 2022, 25(12): 105514.
- [20] Pan L T, Yan R, Li W, et al. Super-resolution microscopy reveals the native ultrastructure of the erythrocyte cytoskeleton[J]. *Cell Reports*, 2018, 22(5): 1151-1158.
- [21] Lux S E. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions[J]. *Blood*, 2016, 127(2): 187-199.
- [22] Hou M D, Xing F L, Yang J Y, et al. Molecular resolution mapping of erythrocyte cytoskeleton by ultrastructure expansion single-molecule localization microscopy[J]. *Small Methods*, 2023, 7(2): e2201243.
- [23] Stone M B, Veatch S L. Steady-state cross-correlations for live two-colour super-resolution localization data sets [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7347.
- [24] 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.
- [25] 杨建宇, 胡芬, 侯梦迪, 等. 人红细胞膜骨架超分辨图像的 Voronoi 分析[J]. *中国激光*, 2023, 50(15): 1507104.
Yang J Y, Hu F, Hou M D, et al. Voronoi analysis for super-resolution image of human erythrocyte membrane skeleton[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2023, 50(15): 1507104.
- [26] Veillette A, Chen J. SIRPα-CD47 immune checkpoint blockade in anticancer therapy[J]. *Trends in Immunology*, 2018, 39(3): 173-184.
- [27] Dermeni F K, Samadi P, Rahmani G, et al. PD-1/PD-L1 immune checkpoint: potential target for cancer therapy [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(2): 1313-1325.