

## 单分子三维取向超分辨成像技术进展(特邀)

赵睿航, 卢晋\*

国家纳米科学中心中国科学院纳米生物效应与安全性重点实验室, 北京 100190

**摘要** 超分辨显微成像技术自诞生以来, 凭借其优异的纳米级空间分辨率, 已成为生命科学研究中精准揭示复杂生命现象的重要成像技术。其中, 基于单分子定位的超分辨成像策略, 使得定位、观察、研究单个探针分子独特的理、化、光学性能成为可能。偏振作为荧光信号的一个重要特性, 近年来伴随着单分子三维取向成像技术的发展, 逐步在单分子成像和超分辨领域中展示出诸多新颖且重要的应用特性。本文总结了单分子三维取向超分辨成像技术的最新进展, 介绍并分析了两大类主要的单分子三维取向荧光显微技术——基于荧光吸收与辐射偏振调制的单分子三维取向成像方法以及利用点扩散函数工程将单个荧光分子的三维取向信息编码到荧光图像上的成像策略。此外, 还探讨了应用于活细胞或单颗粒的其他类型的超分辨取向成像技术。最后, 针对单分子三维取向超分辨成像技术发展与应用前景面临的挑战, 进行了总结与展望。

**关键词** 显微; 单分子荧光; 超分辨成像; 单分子空间取向; 单分子定位显微术

中图分类号 O436 文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP232713

## Three-Dimensional Orientation and Localization Microscopy of Single Molecules Using Super-Resolution Imaging Technology (Invited)

Zhao Ruihang, Lu Jin\*

Key Laboratory for Biomedical Effects of Nanomaterials and Nanosafety, Chinese Academy of Sciences, National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China

**Abstract** Super-resolution microscopy with nanoscale spatial resolution has become an important imaging tool in life science research. As a super-resolution technique, single-molecule localization microscopy enables us to localize, identify, and study the unique behaviors of single molecules. At the single-molecule level, the emitted fluorescence signal is highly anisotropic. Resolving the polarization or three-dimensional orientation of single fluorescent molecules is an emerging field in super-resolution microscopy. In this review, we describe the three-dimensional orientation of single molecules through super-resolution imaging techniques. These techniques include fluorescence polarization microscopy and single-molecule orientation imaging through point spread function engineering. Furthermore, we discuss other polarization super-resolution imaging approaches for the applications of live cells and single nanoparticle studies. Finally, we discuss the potential challenges and future research needs of single-molecule orientation localization microscopy. These challenges and requirements can provide in-depth insights into future research in life sciences.

**Key words** microscopy; single-molecule fluorescence; super-resolution microscopy; single-molecule orientation; single-molecule localization microscopy

## 1 引言

随着超分辨荧光显微成像技术的发展、新的生物标记方法与新的荧光探针的开发, 以及纳米光学器件制造技术的进步, 光学显微成像技术层出不穷。从最初衍射受限的系综成像, 到突破衍射极限, 解析纳米尺

度和更多维度信息, 实现超分辨三维空间成像和三维取向成像, 超分辨成像技术已经逐渐成为生物物理学和生物化学等研究中精准揭示复杂生命现象不可或缺的一项重要技术。

目前的超分辨荧光成像技术大致可分为三类。第一类是基于单分子定位的超分辨显微(SMLM)技术。

收稿日期: 2023-12-22; 修回日期: 2024-02-07; 录用日期: 2024-02-18; 网络首发日期: 2024-02-20

基金项目: 国家自然科学基金(22274032)

通信作者: \*luj@nanoctr.cn

以 Zhuang 等<sup>[1]</sup>提出的 STORM 和 Betzig 等<sup>[2]</sup>提出的 PALM 技术为主,基于不同的闪烁机理,Sharonov 等<sup>[3]</sup>提出的 PAINT 技术和 Jungmann 等<sup>[4]</sup>提出的 DNA-PAINT 技术也是 SMLM 技术中常用的成像策略。基于单分子定位的超分辨荧光成像技术具有较高的空间分辨率,但需要更长的成像时间以累计更多帧数中单分子定位信息,时间分辨率较差。第二类是结构光照明显微成像(SIM)技术<sup>[5-6]</sup>。SIM 技术是目前在活细胞成像领域应用最广泛的一种超分辨显微成像技术,成像速度快、光子利用率高,适用于多种荧光染料,但受其理论限制,最高分辨率大约只能达到衍射极限的 1/2。第三类是由 Hell 等<sup>[7-8]</sup>提出的受激辐射损耗(STED)超分辨显微技术。该技术使用一束高强度的环形损耗光与激发光斑重叠成像,通过抑制损耗光斑区域内的荧光信号,达到提升荧光成像分辨率的效果;但空间分辨率的提升需要损耗激光强度,在实际应用中需要充分考虑高功率激光对样品产生的光毒性以及较严重的光漂白效应。此外,2017 年 Balzarotti 等<sup>[9]</sup>开创性地提出最低光子通量(MINIFLUX)超分辨成像策略,使用类似的环形激发光对同一个荧光分子进行多个特定位置的信号采集,以使用尽可能小的激发强度和最少的荧光光子数为目标,实现了低至 1 nm 的定位精度和 6 nm 的成像分辨率。

在不断追求更高的荧光成像空间分辨率,使得观察 100 nm 尺寸以下细胞微纳形貌和单分子动态逐渐成为研究活细胞生命体系的常规成像手段的同时,我们意识到在生物大分子组成生物自组装结构、参与生化反应及其分子间识别相互作用、发挥特定生物功能的过程中,往往涉及单个生物大分子构象或生物分子间相对取向的细微变化<sup>[10-11]</sup>。当把这些变化映射到空间距离域时,往往只有几纳米甚至埃米级别的位移变化,小于目前超分辨显微技术普遍能达到的空间分辨率;而如果映射到取向角度域,则会产生极其显著的角度变化<sup>[12]</sup>。因此,能够在超分辨荧光成像技术的基础上,在单个分子三维取向层面定量解析远小于光学衍射极限的生物大分子微观结构甚至单个分子构象的变化,对深入阐释相关生命过程机制具有更重要的意义。

本文以单分子荧光成像及 SMLM 技术为核心,阐述在此基础上发展而来的各类单分子三维取向超分辨成像技术,并重点介绍近年来的技术进展。依照技术原理及发展历程,主要分为两大类进行概述。第一类是基于荧光偏振特性开发的荧光偏振显微技术,通过分析单分子荧光激发与发射的多个偏振通道的信号强度差异,获取单分子的三维取向信息;第二类是利用点扩散函数(PSF),尤其以傅里叶面调制技术为主,将荧光探针分子的三维取向信息编码到单分子荧光图像上,借助这种“特征 PSF”图样分析单分子的三维取向,进而开发出一系列对单分子三维取向敏感的单分子定位取向荧光显微术(SMOLM)。此外,还简要介绍了

应用于活细胞或单颗粒的其他类型的超分辨取向成像技术。最后,针对单分子三维取向超分辨成像技术的发展现状和应用前景面临的挑战,进行总结与展望。

## 2 单分子三维取向成像

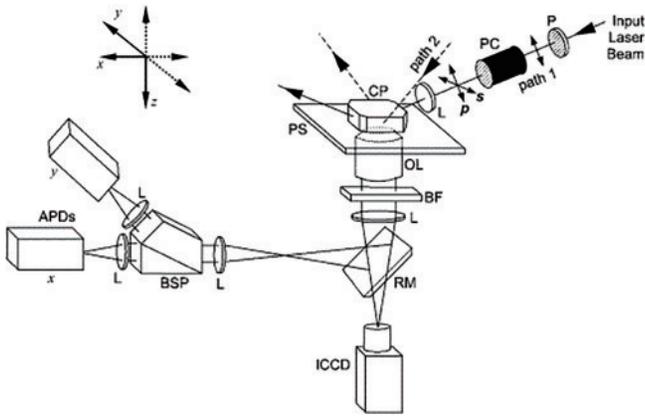
偏振是荧光分子吸收与辐射过程的重要特性。绝大多数有机小分子荧光探针可视为荧光偶极子,其吸收偶极矩和发射偶极矩与其分子结构(通常为共轭结构的长轴方向)有固定的对应关系。因此,测量荧光的偏振信号可以反映荧光偶极子的取向信息。当测量对象从系综水平的大量荧光探针分子降低到单分子水平时,荧光偶极取向更加直接地与单个分子的指向和摆动等三维空间动态行为密切相关。单分子的这些动态行为受到纳米-介观尺度的分子间共价、非共价相互作用及分子-微环境等多重作用力的调控,参与构成生物软物质结构、大分子自组装体系,并深刻影响发生在单个或几个分子之间的各类生物化学反应<sup>[13-15]</sup>。因此,近年来,利用单分子荧光手段开展单分子三维取向的研究受到越来越广泛的关注。

### 2.1 基于荧光吸收与辐射偏振调制的单分子三维取向成像方法

在单个荧光偶极子的激发过程中,其对不同偏振方向激发光吸收效率不同<sup>[16]</sup>。因此,可以通过在荧光激发光路中加入荧光偏振调制模块,将入射激发光分为正交或特定夹角的偏振方向,通过分析偏振调制荧光信号获取荧光探针的取向信息<sup>[17]</sup>。另一方面,单个荧光偶极子的辐射光场也呈线性偏振,利用偏振分光装置,将荧光发射信号分为相互垂直或更多方向( $0^\circ$ 、 $45^\circ$ 、 $90^\circ$ 、 $135^\circ$ )的线偏振光,得到荧光偶极子的发射取向信息<sup>[18]</sup>。

将上述荧光吸收与辐射偏振调制策略相结合,Quinlan 等<sup>[19-21]</sup>报道了单分子荧光偏振(SMFP)技术。该技术将激发偏振光分为平行(p)和垂直(s)的两束偏振光束,交替激发肌动蛋白(actin)样品;产生的荧光信号经由偏振分光棱镜分为  $x$ 、 $y$  偏振两路,由对应的探测器同时接收,如图 1 所示。由于肌动蛋白是肌动蛋白单体聚合而成的长链,具有高度的极性和方向性,因此通过拟合不同激发与发射偏振通道的荧光信号强度,可以确定肌动蛋白中单个分子和群体的取向和动力学。

S-DNA 是一种特殊构象,相比于经典的(沃森-克里克)B-DNA 构象更加细长<sup>[22-23]</sup>。这种构象可以通过对 DNA 两端施加拉力来获得,也同样适合采用荧光偏振显微技术测量单分子三维取向变化,从而进一步解析不同 DNA 构象间的差异。Backer 等<sup>[24]</sup>使用双光束光镊对 DNA 进行拉伸,并使用荧光染料 YOYO-1 标记 DNA,通过对电光调制器施加不同电压得到正交线偏振光,利用偏振方向相互垂直的激发光研究 S-DNA 分子中碱基对的取向变化。荧光染料镶嵌于 DNA 的

图 1 SMFP 技术成像示意图<sup>[20]</sup>Fig. 1 Schematic of SMFP technique<sup>[20]</sup>

碱基对之间,其取向会根据 DNA 碱基对的取向变化而变化。因此,可以根据偏振分束器解析检测到的荧光染料发射光  $x$ 、 $y$  偏振分量来确定 DNA 取向信息。荧光偏振的计算公式如下:

$$\begin{cases} P_x = \frac{I_x - I_y}{I_x + I_y} \\ P_y = \frac{I_x - I_y}{I_x + I_y} \end{cases} \quad (1)$$

式中:前缀表示激发极化,后缀表示发射极化; $I_x/I_y$  指使用  $x/y$  偏振光激发,在  $x/y$  偏振荧光发射通道中记录的荧光强度; $P_x/P_y$  为正值,表示分子沿实验参考系的  $x$  轴附近排列,负值表示在  $y$  轴附近排列。

上述单分子三维取向成像研究采用正交或多个特定角度的线偏光激发单分子样品,意味着该单分子需要在一个激发序列中(如连续的两帧或多帧)保持常亮且取向固定;若与 SMLM 技术结合,则需要从随机闪烁的大量单分子中筛选出极小部分保持多帧常亮的单分子信号用于数据分析<sup>[25]</sup>,极大地限制了基于线偏振激发调制的取向超分辨成像的效率。

另一方面,如果仅对单分子荧光发射信号进行偏振分光成像(如投影到  $x$ 、 $y$  偏振通道),则可以更为便捷地与 SMLM 技术结合<sup>[26]</sup>,但很难从中同时获取单分子三维取向、摆动行为等多个未知参数。因此,这种方法只适用对研究样品的取向分布有先验信息的情形。Cruz 等<sup>[27]</sup>在 2016 年将单分子荧光偏振分光与 SMLM 技术结合,应用于双链 DNA、细胞微丝等有序细丝状结构。在这类结构中,荧光探针分子具有未知但摆动受限的空间取向,依据此先验信息,实现了基于单分子偏振分光的三维取向超分辨成像。

这类荧光激发、发射偏振调控方法实验装置简洁,通常只需获取并比较不同偏振通道内荧光信号强度而非 PSF 图像形状,能够实现较高成像信噪比。但在与 SMLM 技术结合或同时获取单分子三维取向未知参数等方面存在一定局限性。

## 2.2 基于 PSF 工程的单分子三维取向成像方法

### 2.2.1 单分子三维取向对 SMLM 定位精度的影响

基于单分子定位的超分辨显微成像技术的核心之一是优化单分子的定位精度。随着超分辨技术的发展,其空间分辨率向纳米甚至埃米级提升<sup>[28]</sup>,因此需要考虑单分子三维取向对定位精度的影响。大多数单分子定位技术背后的假设是单分子的真实位置对应它在成像图像平面中所采集到的光子分布的中心,但单个荧光分子以振荡电偶极子的各向异性辐射模式发射<sup>[29]</sup>,在空间中产生不对称的细长的三维 PSF,如图 2(A)所示,而相机捕捉的是三维 PSF 成像平面的二维( $x$ 、 $y$ )投影。如果不考虑单分子空间取向,直接对成像平面二维光子分布进行定位,定位结果会与单分子真实位置产生定位偏差<sup>[30]</sup>。例如,当单分子荧光基团不是各向同性,而是呈现约  $60^\circ$  的锥体半角摆动时,就会带来 10 nm 左右的定位偏差。

为了消除单分子荧光三维取向对定位精度的影响,直接从单分子荧光成像的图像中准确获取单分子定位信息,Backlund 等<sup>[31]</sup>设计并在 4f 成像系统中使用了一种基于新型高效介电超表面的掩模,称为“ $y$ - $\phi$ ”掩模,如图 2(B)、(C)所示。其超表面由一系列具有椭圆形横截面的非晶硅纳米柱阵列组成,可调控荧光光场中局部偏振光的偏振及相位信息<sup>[32]</sup>。这个掩模被放置于 4f 光学系统的共轭 BFP 平面上,将 BFP 局部的径向偏振光  $\rho$  转换为  $x$  方向,如图 2(D-b)所示,将方位角偏振光  $\phi$  转换为  $-y$  方向。为了进一步去除  $\rho$  偏振光,再于紧邻“ $y$ - $\phi$ ”掩模的位置放置一个线性偏振器,形成图 2(D-e)中的光强分布。图 2(D-c)中蓝色箭头所示的方位角  $\phi$  偏振经过“ $y$ - $\phi$ ”掩模被转换为  $-y$ ,图 2(D-d)中所示的径向  $\rho$  偏振被转换为  $x$ ,线性偏振器仅通过  $y$  偏振光,因此最终产生的图 2(D-j)中  $y$ - $\phi$ -PSF 是对称的,且其强度分布与图 2(D-h)中  $\phi$ -PSF 相同。这种方法巧妙地消减了造成定位偏差的光子,保留了大部分光子,使定位精度提升了约 7 倍。

### 2.2.2 离焦成像策略

尽管通过移除径向偏振分量可有效避免单分子三维取向引起的定位偏差,极大地提升获取 SMLM 重构图像的准确度,但这种方法会减少荧光信号强度,也会很大程度上丢失单分子取向信息。另一方面,如何精准直接地获取单分子三维取向信息,利用单分子三维取向信息理解单分子动态、单分子与微环境相互作用,逐渐成为热点研究方向。

对单分子荧光 PSF 图样形状而言,在某些特定取向向下,其 PSF 会呈现与各向同性荧光分子呈现的二维高斯(或艾里)光斑迥然不同的 PSF 图样。在这种情况下,可以利用最大似然估计方法,从单分子 PSF 图样获取单分子三维取向信息<sup>[34]</sup>。不过这种方法常常对分子取向的轴向( $z$  方向)分量不敏感,导致很难准确获取单分子的面外取向信息。另一个常用的策略是在

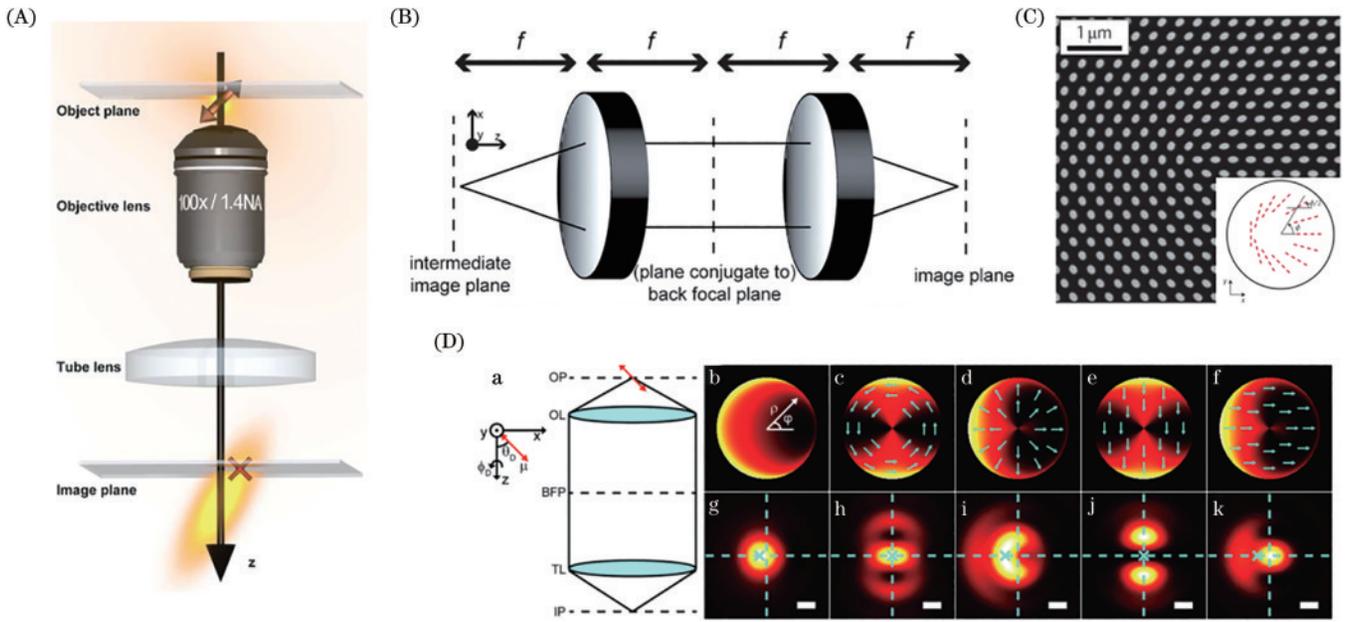


图 2 单分子三维取向对定位精度的影响与校正。(A)具有固定取向的单分子荧光在像空间中形成了不对称的细长三维 PSF,轻微的散焦会导致图像平面中的光子分布相对于真实分子位置发生横向移动<sup>[30]</sup>; (B)4f 光学系统示意图<sup>[33]</sup>; (C)“y-phi”掩模,将方位角偏振光转换为 y 偏振光; (D)“y-phi”掩模将径向偏振光转换为 x 方向,将方位角偏振光转换为 -y 方向的 BFP 和 PSF 仿真示意图,标尺: 200 nm<sup>[31]</sup>

Fig. 2 Single-molecule localization affected by molecular orientation. (A) Single-molecule fluorescence with a fixed orientation forms an asymmetric, elongated three-dimensional PSF in the image space, where slight defocus can cause a lateral shift in the photon distribution relative to the true molecular position<sup>[30]</sup>; (B) schematic of 4f system<sup>[33]</sup>; (C) the “y-phi” mask, which converts square polarization light into y-polarized light; (D) schematic diagram of the “y-phi” mask converting radial polarization light into x-direction and converting azimuthal polarization light into -y direction BFP and PSF simulation, scale bar: 200 nm<sup>[31]</sup>

离焦情况下成像,单分子 PSF 的图样形状能够更加显著地展示出单分子不同取向的差异,可以通过单帧图像中单分子 PSF 图样得到单分子三维取向成像<sup>[35-37]</sup>。然而离焦条件下成像会显著增加 PSF 尺寸,降低单分子成像信噪比,也会增加单分子定位的不准确性。

### 2.2.3 傅里叶面调制策略

如何人为地调控单荧光分子(或单偶极子)PSF 图样,将分子的三维坐标(x、y、z)信息,取向信息中的方位角 φ、极角 θ,以及表征非固定偶极子摆动状态的摆动立体角 Ω 信息[图 3(A)]<sup>[38]</sup>更加高效地编码到 PSF 形状之中,是近年来基于 PSF 工程的单分子三维取向成像方法的主要聚焦策略。这些策略主要是通过对成像系统的傅里叶面调制实现的。

2020 年,Curcio 等<sup>[39]</sup>设计了一种具有抖动和定向的坐标和高度超分辨成像(CHIDO)方法。该技术使用双折射掩模对 PSF 进行编码,在光瞳位置放置一个应力工程光学器件(SEO)。当对其边缘施加三角对称的作用力时,可产生一种编码 PSF 偏振信息的双折射图案<sup>[40]</sup>,其在成像光路傅立叶面上的双折射图样可以用琼斯矩阵(Jones matrix)来描述:

$$J(u) = \cos \frac{cu}{2} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} + i \sin \frac{cu}{2} \begin{pmatrix} \cos \varphi & -\sin \varphi \\ -\sin \varphi & -\cos \varphi \end{pmatrix}, \quad (2)$$

式中:(u, φ)是归一化的极瞳(polar pupil)坐标,当 u=1 时对应光瞳边缘;c 为系数,取决于 SEO 内的应力和所使用的瞳孔半径。当 c 较小时,可以限制 PSF 的扩散,但会减少所携带的 z 方向位移和取向的信息量;当 c 较大时,则可携带更多定位取向信息,但会增加 PSF 扩散。在 SEO 之后,放置一个四分之一波片(QWP);然后,再使用沃拉斯顿棱镜(Wollaston prism)将 QWP 产生的圆偏振光分离成两束振动方向相互垂直的分量,形成两个图像,如图 3(B)所示。最终,由两个通道分别形成右旋圆(RHC)和左旋圆(LHC)PSF。尽管多数 PSF 工程会增大 PSF 尺寸,而越大的 PSF 会导致越低的分辨率,但是在 CHIDO 技术中,编码这些偏振信息的 PSF 大小只有衍射极限 PSF 的大约两倍,也几乎不涉及光子损失,依然保留了较高的横向空间分辨率。图 3(C)显示了焦平面顶部(z=0)和底部(z=300 nm)处分别对应不同取向和摆动情况偶极子的 PSF。当不使用 SEO 时,对应的衍射极限 PSF 形状几乎与 φ 角变化无关;当使用 SEO 时,得到近似新月形状的 PSF,随着 φ 角的旋转,导致 PSF 随之近似地反向旋转。z 方向上的高度变化导致 RHC 和 LHC 沿着彼此相反的方向旋转,而摆动导致 PSF 模糊。为了验证 CHIDO 检测单分子三维取向和三维位置的能力,使用 AF488-鬼笔环肽偶联标记的 F-肌动蛋白细丝实现了单分子三维取向成像,如图 3(D)所示,实验获取的

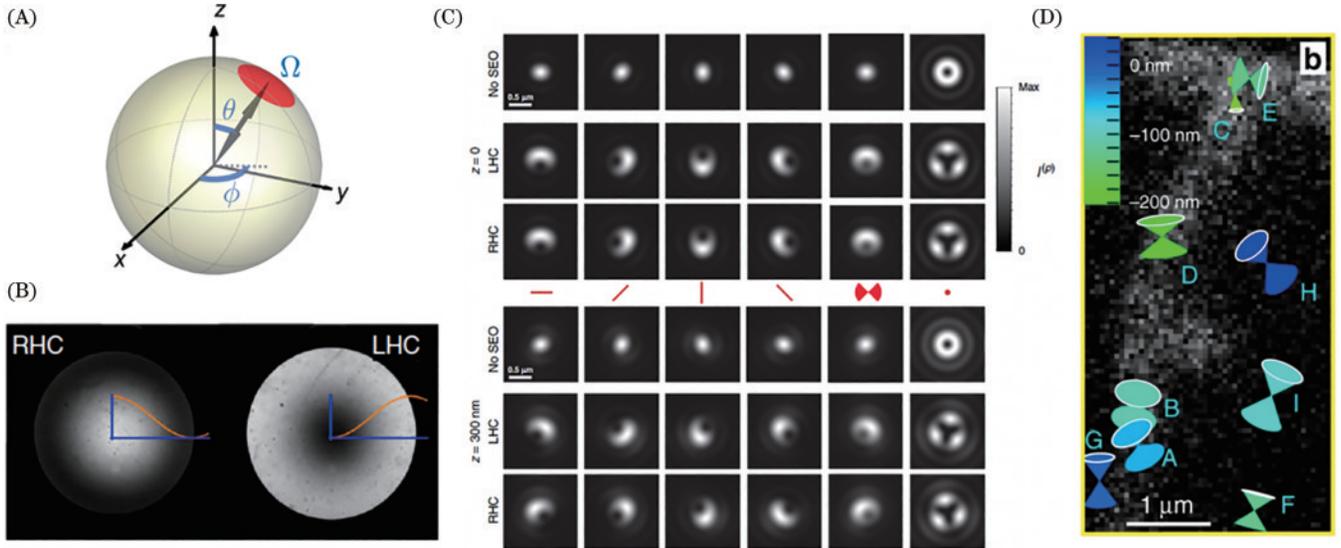


图 3 单分子三维取向<sup>[38]</sup>及 CHIDO 技术<sup>[39]</sup>示意图。(A)方位角  $\varphi$ 、极角  $\theta$ ，以及表征非固定的偶极子摆动状态的摆动立体角  $\Omega$ ；(B)CHIDO 技术中使用的 RHC 与 LHC 后焦平面成像；(C)在标称焦平面  $z = 0$  (顶部)和  $z = 300 \text{ nm}$  (底部)处具有不同空间取向的普通 PSF 和 CHIDO(RHC、LHC)PSF；(D)对 F-肌动蛋白细丝的单分子三维定位和取向成像

Fig. 3 Schematic diagrams of single-molecule three-dimensional orientation<sup>[38]</sup> and CHIDO technique<sup>[39]</sup>. (A) Azimuthal angle  $\varphi$ , polar angle  $\theta$ , and solid angle  $\Omega$ ; (B) back-focal plane images of RHC and LHC; (C) the PSFs and CHIDO PSFs at the nominal focal plane  $z = 0$  (top) and at  $z = 300 \text{ nm}$  (bottom), corresponding to five different dipole orientations; (D) single-molecule three-dimensional localization and orientation imaging of F-actin filaments

RHC/LHC PSF 与模拟 PSF 也具有良好相关性。

涡旋相位掩模 (VPM) 通常应用于 STED 和 MINIFLUX 中以生成环形的激发光<sup>[41]</sup>，而 Hulleman 等<sup>[42]</sup>于 2021 年将 VPM 用于工程化改造单分子荧光 PSF。通过在荧光成像光路的共轭后焦平面处加入涡旋相位板 [图 4(A)、(B)] 获得 Vortex PSF，可以同时确定分子的三维位置、空间取向与摆动信息，从而定量解析检测荧光探针与待成像样品间的相互作用。

Vortex PSF 仅比标准 PSF 大 1.5~2 倍，也具有较高的信噪比和定位精度。

不使用涡旋相位板且当分子处于面外取向 ( $\theta = 0^\circ$ ) 时，由于相消干涉，荧光偶极发射子形成环形 PSF。图 4(C) 显示了从近平面外方向 ( $\theta = 10^\circ$ ) 到近平面内方向 ( $\theta = 80^\circ$ ) 的模拟标准 PSF，从图中可以看到，由于方位角方向 ( $\varphi = 45^\circ$ ) 引起的 PSF 的轻微不对称性很难用肉眼识别。由于存在对称性，使用标准 PSF 对荧

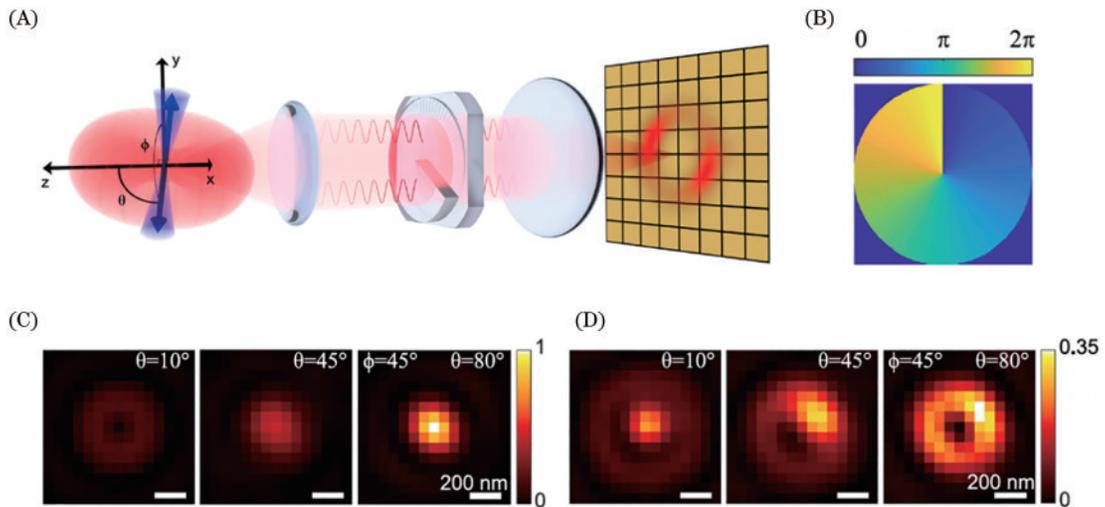


图 4 Vortex PSF 成像示意图<sup>[42]</sup>。(A)成像光路图，涡旋相位板位于发射光路后焦平面，固定偶极子在相机上产生不对称环状 Vortex PSF；(B)涡旋相位板；(C)不同取向的偶极子不使用涡旋相位板得到的 PSF；(D)不同取向的偶极子使用涡旋相位板形成的 Vortex PSF

Fig. 4 Schematic of Vortex PSF<sup>[42]</sup>. (A) Microscope with a vortex phase plate generates asymmetric donut-like shape, Vortex PSF, for fixed emitters on the camera; (B) phase profile of the vortex phase plate; (C) PSF obtained without using a vortex phase plate for dipoles of different orientations; (D) Vortex PSF formed by dipoles of different orientations using a vortex phase plate

光偶极子取向的拟合非常困难:除  $\theta=90^\circ$  以外所有极角的 PSF 几乎都是旋转对称的;在  $\theta=90^\circ$  时,不同方位角也只会使得 PSF 在一个方向上比另一个方向上略宽。涡旋相位板具有一个相位延迟从 0 到  $2\pi$  的螺旋斜坡,其中,镜像相对的点之间总是具有  $\pi$  的相位差,如图 4(B) 所示,导致固定的荧光分子最终在相机上呈现不对称的甜甜圈形状,即 Vortex PSF。分子处于面外方向( $\theta=0^\circ$ )时,在中心由于相长干涉,形成一个被暗环和附加暗环包围的中心点;而分子处于面内方向( $\theta=90^\circ$ )时,在中心处由于相消干涉,中心零光强的点被一个明亮的环包围,其强度分布沿着该环随着方位角  $\theta$  的变化而变化;当  $\theta$  从  $0^\circ$  变化到  $90^\circ$  时,中心亮点由内向外进行不对称的移动,明显改变了作为极角函数的 PSF 的形状。模拟 PSF [图 4(D)] 显示:在这种情况下, Vortex PSF 形状对极角  $\theta$  的改变非常敏感,并且方位角 ( $\varphi=45^\circ$ ) 对 PSF 形状的影响也非常明显。通过实验证实,当使用 Sytox Orange 作为嵌入染料标记  $\lambda$ -DNA 超分辨成像时, Vortex PSF 对单分子定位和取向都有良好的精度:其横向和轴向定位精度分别为 5.4 nm 和 29.7 nm,方位角和极角精度分别为  $6.0^\circ$  和  $3.9^\circ$ ,方位约束精度为 0.06。

#### 2.2.4 基于傅里叶面调制的单分子显微成像系统性策略

相比于常规或离焦 PSF 策略,傅里叶面相位调制方法可以以更高的精准度获取单分子三维取向(甚至包括单分子三维空间定位)信息。而作为 PSF 工程中的一类重要方法,傅里叶面调制策略依然有极大的空间发展出更多元的调制方法,应对不同的单分子三维取向成像应用场景。

2014 年,Backer 等<sup>[43]</sup>开创性地提出以傅里叶光学为主要理论框架的单分子显微成像方法,尤其考虑到 SMLM 技术中常常使用高数值孔径物镜以及荧光偏振分光的情形,系统性地展示了通过单分子荧光成像系统的傅里叶面调制手段将偶极子的三维取向和摆动等信息编码到单分子荧光图像中的策略。这篇文章展示了极其严格的理论推导,提出的理论框架可以更有力地指导傅里叶面调制的振幅或相位掩模设计与优化,建立完备的单分子三维取向成像仿真模型及估计算法。在这个系统性理论框架基础上,Lu 等<sup>[38,44-51]</sup>逐步提出并发展了 SMOLM,实现了单分子三维取向与三维定位同时精确成像。

2020 年,Lu 等<sup>[38]</sup>使用亲脂性荧光染料尼罗红(NR)并利用 SMOLM 对磷脂膜成像,发现 NR 的取向对磷脂膜的组成和堆积状态极其敏感,其特征取向是由脂膜的化学结构和脂质微环境决定的。首先使用偏振分束器(PBS)将荧光分为  $x$  偏振和  $y$  偏振两个通道,然后通过在后焦平面中加入空间光调制器(SLM)形成的相位掩模(Tri-spot<sup>[44]</sup>或 Duo-spot)实现对发射光相位的调制,如图 5(A) 所示。经 SLM 调制后的 PSF

称为 Tri-spot PSF 或 Duo-spot PSF [图 5(B)],可以根据每个光斑的相对亮度推断单分子的位置、取向及摆动。在进行估计时,首先使用正则化的最大似然估计来确定单分子的位置和 6 个方位的二阶矩<sup>[43,49]</sup>,然后将二阶矩投影到一阶矩的角方向空间,从而获得极角  $\theta$ 、方位角  $\varphi$  和摆动角  $\Omega$ 。Tri-spot PSF 可以将光子重新分布到 3 个点,对方向和摆动测量具有高准确度,而 Duo-spot PSF 可以对信噪比低的单分子进行灵敏的取向测量。

这项工作以支撑磷脂双层膜(SLBs)为模型体系,可系统性地改变磷脂组分来控制其脂质膜的形态与内部微环境的有序度。实验发现:在缺乏胆固醇的 DPPC 中,NR 表现出倾斜取向,且具有较大的摆动角;随着胆固醇浓度增加至 40%,SLBs 的有序度增加,引起 NR 极角和摆动立体角急剧减小,如图 5(C) 所示。而加入褪黑素则会产生相反的效果,因为褪黑素会增加脂酰链的紊乱程度,并减弱胆固醇的作用。这说明 NR 单分子三维取向对脂膜的化学成分改变有很好的响应。该研究还揭示了 NR 探针的空间取向对脂质的疏水酰基链比头部的亲水区域更敏感。在比较具有两个饱和酰基链的 DPPC、具有一个饱和和一个不饱和酰基链的 POPC,以及具有两个不饱和酰基链的 DOPC 的 SLBs 时,发现更加无序的 DOPC 疏水区域表现出较大的极角和摆动角,如图 5(D) 所示。SMOLM 只需要测量一个 NR 分子的定位和取向,就可以得到区分 SLBs 的有序结构域和无序结构域信息,比使用 MC540 探针的 SMLM 方法具有更高的成像效率、分辨率和对比度。该方法最终实现了对磷脂膜有序、无序微区的超分辨成像及其动态变化跟踪成像,如图 5(E) 所示。

2021 年,Ding 等<sup>[45]</sup>将 Vortex PSF 应用到 SMOLM 中并对双层脂膜中的 NR 分子进行单分子三维取向成像。该方法在成像光路后焦平面处加入由 SLM 生成的 VPM,并使用偏振分束器将荧光发射信号分为  $x$ 、 $y$  两个正交偏振通道来提高取向成像的灵敏度,如图 6(A) 所示,得到的点扩散函数称作偏振涡旋 PSF。偏振涡旋 PSF 会随着分子的取向而改变形状,可以使用单个相机来精确估计每个单分子的三维取向与摆动。此外,该技术独特之处在于可量化单分子摆动的各向异性程度,并借此剖析生物样品结构特征。单分子摆动的各向异性在此处定义为沿着极向( $\alpha$ )和垂直于极向( $\beta$ )的两个摆动方向( $\alpha, \beta \in [0, \pi]$ ),如图 6(A) 所示。当  $\alpha=\beta$  时,则认为摆动是各向同性的。偏振涡旋 PSF 首次实现了对单个分子进行 7 个信息参数测量:单分子的平面位置( $x, y$ )、三维取向(球面上的  $\theta, \varphi$ )、它在三维空间中的摆动各向异性( $\alpha, \beta$ ),以及单分子的亮度。相比前文提到的非偏振涡旋 PSF<sup>[42]</sup>,偏振涡旋 PSF 对亮度较低的单分子具有更好的精度,能够清楚地分辨出自由旋转分子和固定分子,以及在  $\alpha$  方

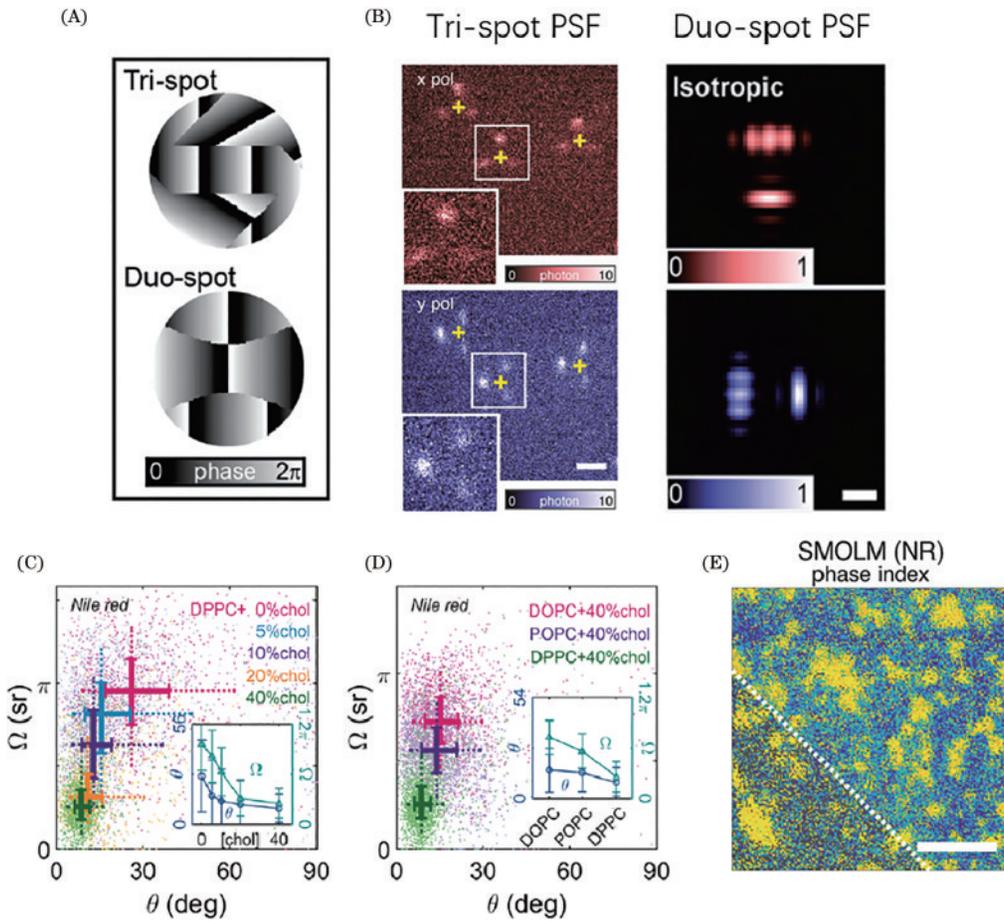


图 5 利用 SMOLM 技术对磷脂膜微区超分辨成像<sup>[38]</sup>。(A) Tri-spot 与 Duo-spot 相位掩模；(B) Tri-spot 与 Duo-spot PSF, 标尺: 2  $\mu\text{m}$  (左)、500 nm (右)；(C) NR 取向受胆固醇浓度的影响；(D) NR 取向受磷脂分子疏水基团的影响；(E) 磷脂膜微区超分辨 SMOLM 成像, 标尺: 2  $\mu\text{m}$

Fig. 5 Super-resolution SMOLM imaging of lipid nanodomains<sup>[38]</sup>. (A) Tri-spot and Duo-spot phase masks; (B) Tri-spot and Duo-spot PSFs, scale bars, 2  $\mu\text{m}$  (left) and 500 nm (right); (C) Nile red orientation with different cholesterol levels; (D) Nile red orientation with various acyl chain structures; (E) SMOLM imaging of SLB nanodomains, scale bars, 2  $\mu\text{m}$

向和  $\beta$  方向摆动的单分子, 如图 6(B) 所示。如果不采用偏振敏感的成像系统, 则很难对各向异性的摆动进行测量。

使用偏振涡旋 PSF 和 NR 对 SLBs 进行 PAINT 成像, 发现 DPPC SLBs 中的 NR 的旋转摆动表现出很大的灵活性, 并且分子沿着平行于酰基链的方向 ( $\alpha$ ) 摆动比垂直方向 ( $\beta$ ) 表现出更多的旋转扩散; 然而, 在含有高胆固醇浓度的 DPPC SLBs 中, NR 的摆动变得更加各向同性。在使用 NR 对淀粉样蛋白 amyloid- $\beta$  (A $\beta$  42) 的成像中, 该方法可以有效区分淀粉样蛋白聚集形成的延伸纤维状结构和寡聚球状结构中探针分子的摆动各向异性特征。在纤维状结构中, 局部的 NR 分子方位角  $\varphi$  的标准差较小, 即 NR 分子的取向角  $\varphi$  趋近于一致, 并且趋向于各向异性摆动, 如图 6(C) 所示; 而在寡聚球状结构中, NR 分子的取向标准偏差较大。这些数据展示出偏振涡旋 PSF 技术在深度解析 NR 探针与 amyloid- $\beta$  自组装体间相互作用中的应用, 所揭示的信息是传统 SMLM 方法很难达到的。

2022 年, Zhang 等<sup>[50]</sup> 提出一种径向-方位偏振

(raPol) 显微镜。该方法使用了一种类似于  $y$ -phi 掩模的涡旋半波片 (VWP) [图 7(A)], 将径向偏振光和方位角偏振光分别转换为  $x$  和  $y$  偏振光。VWP 位于后焦平面处, 而后使用偏振分束器将荧光信号分为径向和方位偏振两个图像通道 (即 raPol PSF)。在形成的 raPol PSF 中, 当单分子向平面外旋转时, 随着  $\theta$  角的减小, 收集的光子从方位角偏振通道转移到径向偏振通道; 当单分子三维取向与光轴对齐, 即  $\theta$  角为 0 时, 所有的荧光光子都处于径向偏振通道中, 如图 7(B) 所示。与大多数 SMOLM 技术中使用的 PSF 工程化策略相比, raPol 可以更准确地检测较暗淡的单分子; 且由于单分子的环形偏振荧光发射模式, 接近  $z$  方向的单分子三维取向, 能量集中在径向偏振通道中, 因此 raPol 的检测率比常规的 xyPol (只进行  $x$ 、 $y$  偏振分光) 高出很多。在只收集到 500 个光子的信号时, raPol 的检测率达到 92.5%, 而 xyPol 的检测率只有不到 1%, 如图 7(C) 所示。与此相反, raPol 对于平面内分子的检测率与 xyPol 相比较差, 但由于 raPol 的对称特性, 其检测可以不受方位角  $\varphi$  的影响, 而 xyPol 的检测效率

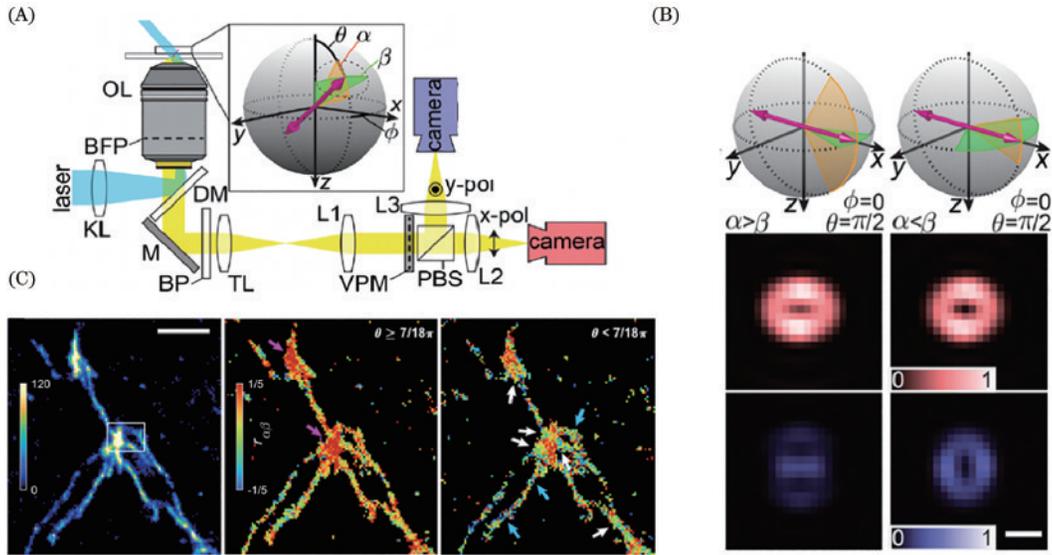


图 6 基于偏振涡旋 PSF 的 SMOLM 成像原理图<sup>[45]</sup>。(A) 成像装置示意图；(B) 具有相同取向和不同摆动各向异性的单分子偏振涡旋 PSF，标尺：300 nm；(C) 淀粉样蛋白聚集形成的纤维状结构中，探针分子的摆动各向异性成像，标尺：1 μm  
 Fig. 6 Principle for polarized vortex imaging<sup>[45]</sup>. (A) schematic of the optical setup; (B) representative dipole orientations (top) and corresponding polarized vortex PSFs (bottom), scale bar, 300 nm; (C) molecular binding orientations and rotational diffusion on an amyloid fibrillar network, scale bar, 1 μm

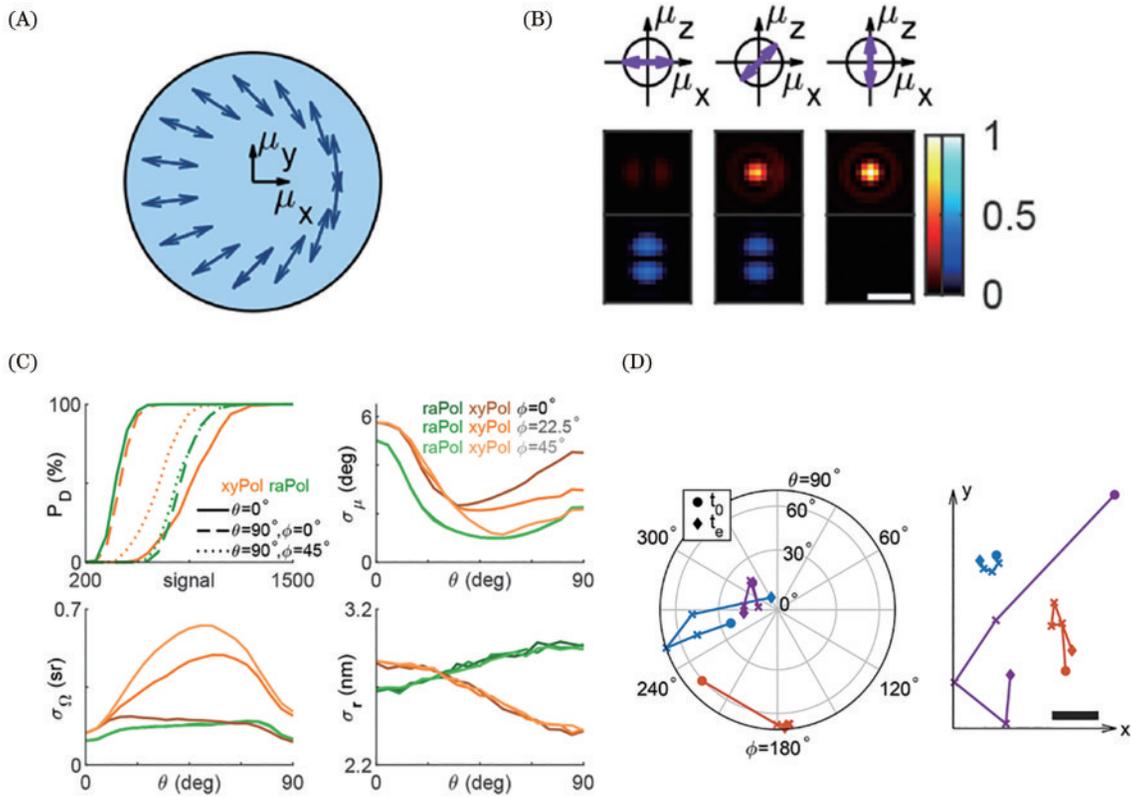


图 7 raPol 显微镜<sup>[50]</sup>。(A) 放置在成像系统的后焦平面处的 VWP；(B) 具有不同取向荧光分子的径向 (红色) 和方位角 (蓝色) 偏振 PSF，标尺：500 nm；(C) raPol 与常规 xyPol PSF 方法对单分子三维取向与摆动测量精度对比；(D) 在高胆固醇条件下，尽管探针分子的取向和摆动强烈受限，但表现出更加明显的平移扩散行为，标尺：50 nm  
 Fig. 7 raPol microscope<sup>[50]</sup>. (A) VWP placed at the back focal plane of the imaging system; (B) representative radially (red) and azimuthally (blue) polarized PSFs of rotationally fixed molecules, scale bar, 500 nm; (C) detection and orientation estimation performance of raPol and xyPol PSFs; (D) rotational and translational diffusion of single molecules with increasing cholesterol concentration, scale bar, 50 nm

则会由于不同的  $\varphi$  角而产生大幅变化。几乎在所有的单分子三维取向方向上, raPol 的取向测量精度和摆动测量精度都要优于 xyPol, 而 raPol 的二维定位精度平均仅比 xyPol 差 12%。在使用 raPol 研究在 DPPC 的 SLBs 中胆固醇诱导磷脂结构有序化的能力的实验中, 连续两次使用 M $\beta$ CD-chol 增加 DPPC 中胆固醇浓度, 使得 NR 摆动角  $\Omega$  显著减小。与此同时, 在高胆固醇引起的 NR 摆动强烈受限的情况下, NR 依然表现出更加明显的平移扩散行为, 如图 7(D) 所示。因此, 研究人员推测 M $\beta$ CD-chol 处理是以一种高度不均匀的方式溶解进入 SLBs 的, 导致 NR 分子能够在完整的有序微区之间表现出跳跃扩散。

为了更有效地利用荧光光子, 研究人员开发了一种空间紧凑的偶极扩散函数(DSFs), 以实现更高精度和准确度的单分子三维位置和三维取向(6D)成像<sup>[46]</sup>。2023 年, Zhang 等<sup>[47]</sup>在 raPol 的基础上提出一种结合了偏振调制和光瞳分裂的技术, 称为径向和方位偏振多视角反射(raMVR)显微镜。与单分子 6D 荧光成像技术相比, raMVR 方法具有各向同性的分辨率, 并且具有良好的抗像差能力。首先, 使用 VWP 和 PBS 将径向和方位两个分量的偏振光分离到两个正交偏振通道, 如图 8(A) 所示; 然后, 分别在每个通道的 BFP 处使用一种称为玻璃金字塔的方形锥面镜将荧光光束分离成 4 个反射光束; 然后, 经过被称为空气金字塔的空心方形反射镜再次反射, 如图 8(B) 所示; 最终, 投射在

相机上分别形成 4 个成像通道, 如图 8(C) 所示。信号光子和背景光子在这个过程中同时被分开, 从而保持与标准非偏振荧光显微镜同等的信号-背景比, 并且其光子效率接近 100%, 优于超表面相位掩模和 SLM。

通过每个通道中形成 DSF 的不同亮度, 可以区分每个单分子的取向和摆动程度, 每个通道中的 DSF 会随着单分子三维取向轴向位置的变化而产生横向移动, 如图 8(D) 所示。在每个 66.8 nm<sup>2</sup> 大小的像素中收集的 5000 个信号光子和 50 个背景光子的典型单分子信噪比中, raMVR 的平均取向摆动、横向及轴向平均精度均优于 CHIDO 和 Vortex PSF, 并且无论单分子的位置和取向如何, raMVR 在整个深度内的精度都优于其他定位方法。虽然由于每个成像通道的有效数值孔径减小, raMVR 的横向定位精度略有降低(比 CHIDO 和 Vortex PSF 分别相差 3.0 nm 和 1.2 nm), 但 raMVR 具有更紧凑的 DSF, 比 CHIDO 和 vortex PSF 更容易检测到暗淡的单分子。在使用 NR 对含有 DPPC 和 40% 胆固醇的 SLBs 进行 PAINT 成像时, 可以成功地对半径从 150 nm 到 1000 nm 的单个球状 SLBs 进行 6D 定位与取向超分辨成像, 如图 8(E) 所示。使用该方法在解析 A $\beta$ 42 聚集体嵌入脂膜的过程中, 发现结合在寡聚体-脂膜混合物上的 NR 分子比结合在纯脂质膜上的 NR 分子具有更大旋转扩散, 而在 A $\beta$ 42 原纤维上的 NR 分子则倾向于更加固定和定向地与  $\beta$ -sheet 凹槽结构平行结合。该技术还成功地应

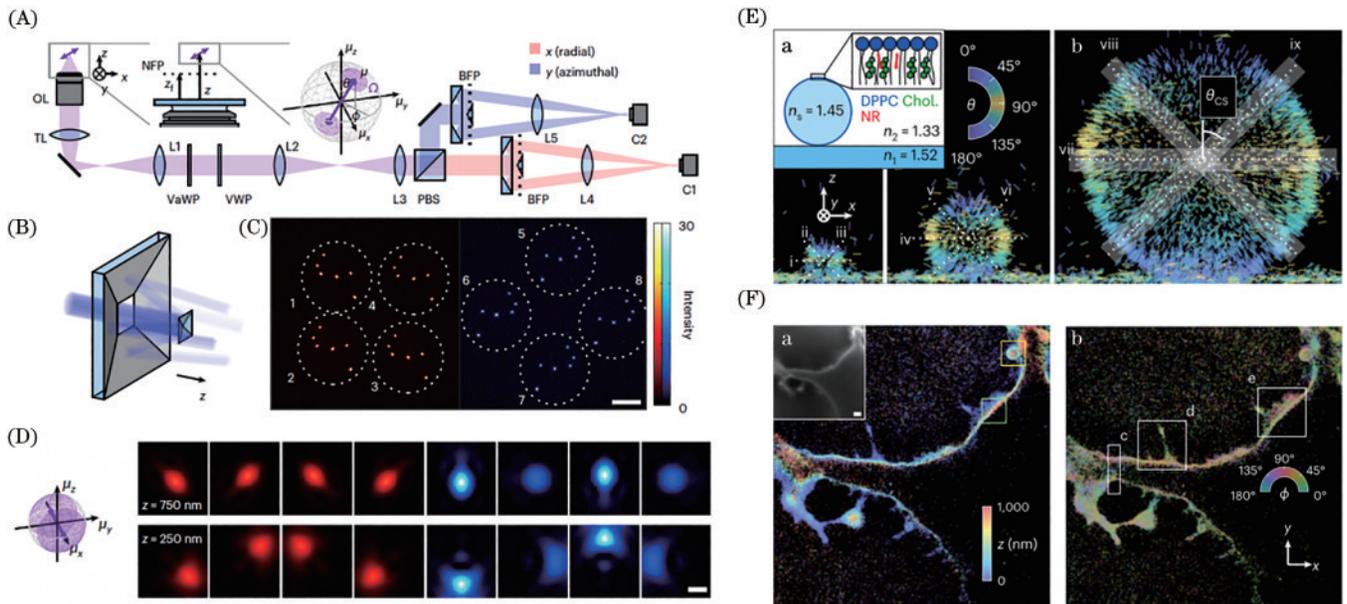


图 8 raMVR 显微镜<sup>[47]</sup>。(A) 成像装置示意图; (B) raMVR 技术中使用的玻璃金字塔和空气金字塔反射镜及光束反射示意图; (C) 相机在  $x, y$  偏振方向上得到的 4 个成像通道, 标尺: 20  $\mu\text{m}$ ; (D) raMVR 方法得到的单分子三维取向 DSF 成像, 标尺: 500 nm; (E) 半径为 150 nm、350 nm、1000 nm 球形磷脂膜的 6D 定位与取向超分辨成像; (F) HEK-293T 细胞的 6D 定位与取向超分辨成像, 标尺: 2  $\mu\text{m}$

Fig. 8 raMVR microscope<sup>[47]</sup>. (A) Schematic of the raMVR setup; (B) the pyramidal and air pyramid mirrors in raMVR; (C) raw images projected on the detectors, scale bar, 20  $\mu\text{m}$ ; (D) representative DSF in each channel for one molecule, scale bars, 500 nm; (E) 6D SMOLM images of lipid-coated spheres with with radii of 150 nm, 350 nm and 1,000 nm; (F) 6D SMOLM images of HEK-293T cell, scale bar, 2  $\mu\text{m}$

用于细胞膜的 6D 超分辨成像,如图 8(F)所示。

### 2.3 应用于活细胞或单颗粒的超分辨取向成像技术

除了基于单分子定位的超分辨三维取向技术之外,近年来也出现了许多其他引人注目的超分辨取向成像研究方法。例如, Xi 课题组<sup>[52]</sup>于 2016 年提出超分辨偶极取向映射(SDOM)方法,通过调制偏振激发光,可从更少的荧光分子中有效地解析出荧光偶极子的取向。这种荧光偏振显微技术具有亚衍射极限的分辨率,成像速度可以达到每秒 5 帧,更适用于活细胞成像,使得获取超分辨率高动态的细胞结构成像成为可能。2019 年, Xi 与 Dai 课题组<sup>[53]</sup>共同将荧光偏振调制方法和结构光照明技术结合,提出偏振 SIM(pSIM)技术,实现了在超分辨尺度下解析生物分子的取向与结构信息,并对该技术持续迭代更新,与三维 SIM 结合,实现了快速的偏振三维 SIM(polar-3DSIM)成像<sup>[54]</sup>。随后, Xi 与 Jin 课题组<sup>[55]</sup>报道了光谱和偏振光学层析成像(SPOT)技术。SPOT 可同时从荧光强度、光谱和偏振三个维度解析膜的形态、极性和相组分等信息,用于活细胞亚细胞尺度的脂质组学研究。SPOT 的原理是通过两个或多个相移结构照明,然后使用 HiLo 方法将每个不同图样方向的高频低频信息融合。类似于 pSIM 技术, SPOT 也需要使用 3 个不同方向的结构光,采集 6 幅图像<sup>[53]</sup>,但比常规的 SIM 需要的 9 幅图像更少。使用 SPOT 方法实现了对细胞分裂过程中多细胞器相互作用活动的实时监测,并成功揭示了它们在质膜分离、隧道纳米管形成和线粒体嵴解离过程中复杂的脂质动力学。

在单颗粒催化成像相关研究中,2019 年, Fang 课题组<sup>[56]</sup>将单分子荧光偏振显微镜应用于纳米限域效应的单分子三维取向研究。单分子偏振成像实验在具有多层结构的纳米催化剂上进行,该催化剂由透明的固体 SiO<sub>2</sub>核、具有线性孔道结构的多孔 SiO<sub>2</sub>壳和夹在核壳之间的铂纳米颗粒组成。其中,非荧光的反应物分子荧光红染料(AR)会在纳米孔内转化为具有高荧光活性的产物——试卤灵(Re)。Re 分子的成像结果表明, Re 分子的长轴平行于线性纳米孔方向,孔内分子的取向受到限制; AR 分子结构与 Re 分子相似,这种取向偏好性也适用于 AR 分子。由此解释 AR 吸附强度降低是由接近并吸附在具有固定取向的铂纳米颗粒造成的。该研究在核壳纳米催化剂上发现了不寻常的催化活性,即在纳米多孔壳存在的情况下吸附强度较低但催化活性较高,并在单分子水平上定量解释了纳米限制对纳米多孔材料化学转化的影响。

## 3 总结与展望

从早期的偏振调制方法,到 PSF 工程与超分辨显微成像技术的结合,单分子三维取向成像技术对单个探针分子的三维空间取向与三维空间定位的精准度均得到了极大的提高,在解析生物样品的纳米尺度结构

与有序度、生物大分子构象等方面展示出独特的技术优势。成像技术的发展为我们提供了更多可选择的工具,然而将单分子三维取向超分辨成像技术更广泛地应用于生命科学、化学、材料等领域依然存在多重挑战,需要未来更深入的研究和可信的数据来展示该技术多元的应用场景和在科学与应用层面的重要性。

首先,需要发展适用于单分子三维取向超分辨成像的荧光标记策略。通常情况下,待研究生物大分子对象本身是没有荧光信号的,需要使用有机小分子荧光探针或荧光蛋白对成像目标物进行共价[如(d)STORM、PALM 技术]或非共价(如 PAINT 技术)标记;如果涉及特异性标记,还常常需要使用多个较大尺寸的抗体蛋白。在 SMLM 技术中,这样会导致荧光标记位点与待成像目标物存在几纳米或更小的间距;这个距离常常小于目前 SMLM 技术的定位精度,所以一般情况下不会对 SMLM 成像结果产生影响。然而,当测量参数转变为分子三维取向时,例如在基于(d)STORM 的 SMOLM 技术中,对待成像目标物的共价标记需要使用双/多连接基团修饰探针,以确保小分子荧光探针的取向与待研究目标物的空间取向保持平行或固定的角度关系<sup>[12,57]</sup>。而目前最常使用的荧光探针修饰方式只使用单个连接基团,由于单连接基团在三维空间内存在自由转动,SMOLM 技术只能获取该探针的三维取向,而不是待研究目标物的三维取向。在基于 PALM 的 SMOLM 技术中,需确保荧光蛋白的荧光团与待标记目标蛋白之间为刚性连接<sup>[53]</sup>。在基于 PAINT 的 SMOLM 技术中,由于荧光探针与待研究目标物仅通过短暂、随机的非共价相互作用,所以更需要大量筛选不同种类的荧光探针,以选取对待研究目标物三维取向变化更为敏感的荧光探针<sup>[38]</sup>,或者设计、合成对三维取向敏感的新型 SMOLM 探针。因此,在 SMOLM 技术中,为了获取有意义的单分子三维取向信息,一定要确保荧光探针的三维空间取向与待研究生物大分子、自组装体的取向或构象存在固定或可知的定量关系,这是制约单分子三维取向超分辨成像应用的难点和关键因素。

其次,需要提升单分子荧光亮度或成像信噪比。在单分子三维取向成像策略中,使用荧光偏振分光将单分子荧光信号分为多个偏振通道,或利用 PSF 工程将单分子 PSF 转变为多个亮点或更大尺寸的图样,都会不同程度地降低 SMOLM 原始图像信噪比,对单分子识别率、定位精度、三维取向计算精准度带来负面影响。对于某些在 SMLM 技术中表现优秀的荧光探针,应用于 SMOLM 成像则会带来较差的信噪比甚至导致成像图像不可用。目前有一些实例,通过优化筛选荧光探针,得到更加适合 SMOLM 技术的更亮的荧光探针。例如,2020 年, Mora 等<sup>[58]</sup>提出一种比硫黄素 T(Thioflavin T)更适用于  $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )成像的荧光探针 SYPRO Orange,解决了 Thioflavin T 荧

光强度低和背景信号高等问题,并进一步由 Manoj Kumbhakar 应用于 SMOLM 成像<sup>[51]</sup>。

再次,存在将单分子三维取向超分辨成像应用于活细胞成像的难点。尽管目前已有 SMOLM 技术开展了对活细胞三维取向的初步成像尝试<sup>[47]</sup>,但受到样品复杂程度、探针浓度、荧光背景干扰、成像速度等因素的影响,将 SMOLM 等技术应用于活细胞成像,尤其用于解析胞内纳米尺度结构时,依然充满挑战。为了应对该挑战,一方面可以借鉴在活细胞 SMLM 成像中,已被广泛应用的(d)STORM 和 PALM 等实验方案策略<sup>[59-60]</sup>,以提升单分子荧光成像信噪比。另一方面,活细胞内部复杂微环境会使单分子三维取向荧光信号偏离理论 PSF,使精准解析单分子三维取向信息及其实时动态变化变得更加困难。基于单分子定位的 SMOLM 方法往往需要较长的成像时间,其对于三维空间和三维取向的分析精度较高,但在解析高动态的生物分子相互作用过程具有一定困难。利用深度学习等策略为化解上述困难提供了新颖且有效的破题思路<sup>[61-62]</sup>。Wu 等<sup>[63]</sup>于 2022 年展示的 Deep-SMOLM 技术,实现了对单分子三维取向和二维空间定位的精准快速解析,对于含有高度重叠 PSF 的原始 SMOLM 成像数据,分析处理时间比迭代估计方法提速了近 10 倍。2023 年,Shechtman 课题组<sup>[64]</sup>提出一种基于深度学习的 SMLM 数据重建方法 DBlink,实现了活细胞的高动态过程超分辨成像。

最后,实现多色成像或拓展单分子三维取向成像在波长维度的信息也是从技术层面上将其推广应用于复杂生命过程研究的趋势之一。例如,Auer 等<sup>[65]</sup>将 DNA-PAINT 与 FRET 技术结合,实现了更加快速、更低背景的单分子定位成像;Ostersehl 等<sup>[66]</sup>于 2022 年提出 DNA-PAINT 与 MINFLUX 技术结合,将 MINFLUX 技术扩展到多个分子靶标,实现了线粒体三色成像。

总之,随着超分辨成像技术的快速发展,基于单分子定位的单分子三维取向超分辨成像技术为我们在单个分子的层次上研究多维度、复杂的单分子行为提供了更多的可能性。未来,在技术层面提升单分子三维取向超分辨技术的成像精准度、进一步推进技术应用的广度和深度等方面具有持续广阔的发展前景。

### 参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(37): 13081-13086.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Boehr D D, Nussinov R, Wright P E. The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition[J]. *Nature Chemical Biology*, 2009, 5(11): 789-796.
- [11] Adachi K, Oiwa K, Nishizaka T, et al. Coupling of rotation and catalysis in F1-ATPase revealed by single-molecule imaging and manipulation[J]. *Cell*, 2007, 130(2): 309-321.
- [12] Lewis J H, Lu Z. Resolution of ångström-scale protein conformational changes by analyzing fluorescence anisotropy[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2019, 26(9): 802-807.
- [13] Wen J T, Hong L, Krainer G, et al. Conformational expansion of tau in condensates promotes irreversible aggregation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(33): 13056-13064.
- [14] Brouwer I, Lenstra T L. Visualizing transcription: key to understanding gene expression dynamics[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2019, 51: 122-129.
- [15] Wang T, Hu J J, Li Y N, et al. Bloom syndrome helicase compresses single-stranded DNA into phase-separated condensates[J]. *Angewandte Chemie: International Edition*, 2022, 61(39): e202209463.
- [16] Lakowicz J R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [M]. Boston: Springer, 2006.
- [17] Fourkas J T. Rapid determination of the three-dimensional orientation of single molecules[J]. *Optics Letters*, 2001, 26(4): 211-213.
- [18] Ohmachi M, Komori Y, Iwane A H, et al. Fluorescence

- microscopy for simultaneous observation of 3D orientation and movement and its application to quantum rod-tagged myosin V[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(14): 5294-5298.
- [19] Quinlan M E, Forkey J N, Goldman Y E. Orientation of the myosin light chain region by single molecule total internal reflection fluorescence polarization microscopy [J]. *Biophysical Journal*, 2005, 89(2): 1132-1142.
- [20] Forkey J N, Quinlan M E, Goldman Y E. Measurement of single macromolecule orientation by total internal reflection fluorescence polarization microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2005, 89(2): 1261-1271.
- [21] Rosenberg S A, Quinlan M E, Forkey J N, et al. Rotational motions of macro-molecules by single-molecule fluorescence microscopy[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2005, 38(7): 583-593.
- [22] Cluzel P, Lebrun A, Heller C, et al. DNA: an extensible molecule[J]. *Science*, 1996, 271(5250): 792-794.
- [23] Smith S B, Cui Y, Bustamante C. Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules[J]. *Science*, 1996, 271(5250): 795-799.
- [24] Backer A S, Biebricher A S, King G A, et al. Single-molecule polarization microscopy of DNA intercalators sheds light on the structure of S-DNA[J]. *Science Advances*, 2019, 5(3): eaav1083.
- [25] Backer A S, Lee M Y, Moerner W E. Enhanced DNA imaging using super-resolution microscopy and simultaneous single-molecule orientation measurements[J]. *Optica*, 2016, 3(6): 659-666.
- [26] Gould T J, Gunewardene M S, Gudheti M V, et al. Nanoscale imaging of molecular positions and anisotropies [J]. *Nature Methods*, 2008, 5(12): 1027-1030.
- [27] Cruz C A V, Shaban H A, Kress A, et al. Quantitative nanoscale imaging of orientational order in biological filaments by polarized superresolution microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(7): E820-E828.
- [28] Reinhardt S C M, Masullo L A, Baudrexel I, et al. Ångström-resolution fluorescence microscopy[J]. *Nature*, 2023, 617(7962): 711-716.
- [29] Bartko A P, Dickson R M. Three-dimensional orientations of polymer-bound single molecules[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1999, 103(16): 3053-3056.
- [30] Lew M D, Backlund M P, Moerner W E. Rotational mobility of single molecules affects localization accuracy in super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Nano Letters*, 2013, 13(9): 3967-3972.
- [31] Backlund M P, Arbabi A, Petrov P N, et al. Removing orientation-induced localization biases in single-molecule microscopy using a broadband metasurface mask[J]. *Nature Photonics*, 2016, 10: 459-462.
- [32] Arbabi A, Horie Y, Bagheri M, et al. Dielectric metasurfaces for complete control of phase and polarization with subwavelength spatial resolution and high transmission[J]. *Nature Nanotechnology*, 2015, 10(11): 937-943.
- [33] Backlund M P, Lew M D, Backer A S, et al. The role of molecular dipole orientation in single-molecule fluorescence microscopy and implications for super-resolution imaging[J]. *ChemPhysChem*, 2014, 15(4): 587-599.
- [34] 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.
- [35] Böhmer M, Enderlein J. Orientation imaging of single molecules by wide-field epifluorescence microscopy[J]. *Journal of the Optical Society of America B*, 2003, 20(3): 554-559.
- [36] Aguet F, Geissbühler S, Märki I, et al. Super-resolution orientation estimation and localization of fluorescent dipoles using 3-D steerable filters[J]. *Optics Express*, 2009, 17(8): 6829-6848.
- [37] Patra D, Gregor I, Enderlein J. Image analysis of defocused single-molecule images for three-dimensional molecule orientation studies[J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2004, 108(33): 6836-6841.
- [38] Lu J, Mazidi H, Ding T B, et al. Single-molecule 3D orientation imaging reveals nanoscale compositional heterogeneity in lipid membranes[J]. *Angewandte Chemie: International Edition*, 2020, 59(40): 17572-17579.
- [39] Curcio V, Alemán-Castañeda L A, Brown T G, et al. Birefringent Fourier filtering for single molecule coordinate and height super-resolution imaging with dithering and orientation[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5307.
- [40] Vella A, Alonso M A. Optimal birefringence distributions for imaging polarimetry[J]. *Optics Express*, 2019, 27(25): 36799-36814.
- [41] 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.
- [42] Hulleman C N, Thorsen R Ø, Kim E, et al. Simultaneous orientation and 3D localization microscopy with a Vortex point spread function[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 5934.
- [43] Backer A S, Moerner W E. Extending single-molecule microscopy using optical Fourier processing[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2014, 118(28): 8313-8329.
- [44] Zhang O M, Lu J, Ding T B, et al. Imaging the three-dimensional orientation and rotational mobility of fluorescent emitters using the Tri-spot point spread function[J]. *Applied Physics Letters*, 2018, 113(3): 031103.
- [45] Ding T B, Lew M D. Single-molecule localization microscopy of 3D orientation and anisotropic wobble using a polarized vortex point spread function[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2021, 125(46): 12718-12729.
- [46] Wu T T, Lu J, Lew M D. Dipole-spread-function

- engineering for simultaneously measuring the 3D orientations and 3D positions of fluorescent molecules[J]. *Optica*, 2022, 9(5): 505-511.
- [47] Zhang O M, Guo Z J, He Y Y, et al. Six-dimensional single-molecule imaging with isotropic resolution using a multi-view reflector microscope[J]. *Nature Photonics*, 2023, 17(2): 179-186.
- [48] Ding T B, Wu T T, Mazidi H, et al. Single-molecule orientation localization microscopy for resolving structural heterogeneities between amyloid fibrils[J]. *Optica*, 2020, 7(6): 602-607.
- [49] Mazidi H, King E S, Zhang O M, et al. Dense super-resolution imaging of molecular orientation via joint sparse basis deconvolution and spatial pooling[C]//2019 IEEE 16th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI 2019), April 8-11, 2019, Venice, Italy. New York: IEEE Press, 2019: 325-329.
- [50] Zhang O M, Zhou W Y, Lu J, et al. Resolving the three-dimensional rotational and translational dynamics of single molecules using radially and azimuthally polarized fluorescence[J]. *Nano Letters*, 2022, 22(3): 1024-1031.
- [51] Sarkar A, Namboodiri V, Kumbhakar M. Single-molecule orientation imaging reveals two distinct binding configurations on amyloid fibrils[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2023, 14(21): 4990-4996.
- [52] Zhanghao K, Chen L, Yang X S, et al. Super-resolution dipole orientation mapping via polarization demodulation [J]. *Light, Science & Applications*, 2016, 5(10): e16166.
- [53] Zhanghao K, Chen X Y, Liu W H, et al. Super-resolution imaging of fluorescent dipoles via polarized structured illumination microscopy[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4694.
- [54] Li Y N, Cao R J, Ren W, et al. High-speed autopolarization synchronization modulation three-dimensional structured illumination microscopy[J]. *Advanced Photonics Nexus*, 2023, 3(1): 016001.
- [55] Zhanghao K, Liu W H, Li M Q, et al. High-dimensional super-resolution imaging reveals heterogeneity and dynamics of subcellular lipid membranes[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5890.
- [56] Dong B, Pei Y C, Mansour N, et al. Deciphering nanoconfinement effects on molecular orientation and reaction intermediate by single molecule imaging[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4815.
- [57] Mortensen K I, Sung J, Flyvbjerg H, et al. Optimized measurements of separations and angles between intramolecular fluorescent markers[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8621.
- [58] Mora A K, Nath S. SYPRO Orange-a new gold standard amyloid probe[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2020, 8(35): 7894-7898.
- [59] Jones S A, Shim S H, He J, et al. Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(6): 499-508.
- [60] Henriques R, Griffiths C, Hesper Rego E, et al. PALM and STORM: Unlocking live-cell super-resolution[J]. *Biopolymers*, 2011, 95(5): 322-331.
- [61] 罗婷丹, 李依明. 深度学习在单分子定位显微镜中的应用[J]. *中国激光*, 2022, 49(24): 2407206.
- Luo T D, Li Y M. Deep learning in single-molecule localization microscopy[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(24): 2407206.
- [62] 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): 0307106.
- Hou M D, Hu F, Yang J Y, et al. Screening and reconstruction for single-molecular localization superresolution images of nuclear pore complexes[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2024, 51(3): 0307106.
- [63] Wu T T, Lu P, Rahman M A, et al. Deep-SMOLM: deep learning resolves the 3D orientations and 2D positions of overlapping single molecules with optimal nanoscale resolution[J]. *Optics Express*, 2022, 30(20): 36761-36773.
- [64] Saguy A, Alalouf O, Opatovski N, et al. DBlink: dynamic localization microscopy in super spatiotemporal resolution via deep learning[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(12): 1939-1948.
- [65] Auer A, Strauss M T, Schlichthaerle T, et al. Fast, background-free DNA-PAINT imaging using FRET-based probes[J]. *Nano Letters*, 2017, 17(10): 6428-6434.
- [66] Osterschl L M, Jans D C, Wittek A, et al. DNA-PAINT MINFLUX nanoscopy[J]. *Nature Methods*, 2022, 19(9): 1072-1075.