

荧光蛋白与超分辨显微成像

彭鼎铭^{1,2}, 付志飞^{1,2}, 徐平勇¹

¹中国科学院核酸生物学重点实验室, 北京 100101;

²中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049

摘要 超分辨显微成像技术使细胞生物学进入到了一个全新的时代,但如何进一步提高超分辨显微成像技术的时空分辨率仍是光学领域需要解决的重要问题。目前为止几乎所有的超分辨显微成像技术都依赖于荧光探针,光调控荧光蛋白作为一类特殊的荧光探针,可以被不同波长的激发光所激活,产生随机或者特殊结构样式的信号。利用这些信息,透镜系统的空间分辨率得到了提高。通过总结光调控荧光蛋白的各类参数,从荧光探针入手,寻找进一步提高成像系统空间分辨率的方法与策略,为选取适当的荧光探针提供建议,并且阐述了荧光蛋白与超分辨显微成像技术之间的关系。

关键词 显微; 超分辨显微成像; 荧光探针; 光调控荧光蛋白; Skylan-S; Skylan-NS

中图分类号 Q632 **文献标识码** A

doi: 10.3788/AOS201737.0318008

Fluorescent Proteins and Super-Resolution Microscopy

Peng Dingming^{1,2}, Fu Zhifei^{1,2}, Xu Pingyong¹

¹Key Laboratory of RNA Biology, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract Cell biology has come into a new era by the hand of super-resolution microscopy. However, how to improve the temporal-spatial resolution of super-resolution microscopy is still an important problem to be resolved in the field of optics. So far, almost all of the super-resolution microscopies are depend on fluorescent probes. As a unique series of fluorescent probes, light regulated fluorescent proteins can be activated by excitation light of different wavelengths to produce stochastic or specially patterned signals. Using this information, the spatial resolution of lens system is improved. By summarizing different parameters of light regulated fluorescent proteins, we focus on fluorescent probes to discuss the way of improving spatial resolution of imaging system. It provides advices to choose proper fluorescent probes, and the relationship between fluorescent proteins and super-resolution microscopy is expounded.

Key words microscopy; super-resolution microscopy; fluorescent probes; light regulated fluorescent proteins; Skylan-S; Skylan-NS

OCIS codes 180.2520; 110.0180; 170.2520

1 引 言

衍射现象的存在导致任何一个点光源在经过透镜系统过程中都会被光学传递函数所调制,其亮度分布在像平面上符合光学系统强度点扩展函数,即点光源在透过成像系统之后会变成具有一定半径的光斑。当多个点光源靠得足够近时,其在像平面上就无法得到区分,从而导致细节信息的丢失。这使得普通的光学显微镜的空间横向分辨率被限制在 200 nm 左右,这个限制一直制约着科研工作者对微观世界的进一步观察。

收稿日期: 2016-12-27; **收到修改稿日期:** 2017-02-09

基金项目: 国家自然科学基金(31370851)、国家 973 计划(2016YFA0501500)

作者简介: 彭鼎铭(1993—),男,硕士研究生,主要从事超分辨显微成像方面的研究。E-mail: biopdm@163.com

导师简介: 徐平勇(1974—),男,博士,研究员,主要从事超分辨成像探针以及能量代谢机制等方面的研究。

E-mail: pyxu@ibp.ac.cn(通信联系人)

超分辨显微成像技术的出现极大地促进了人们对未知世界的探索。Hell 等^[1]利用修正光学系统强度点扩展函数的方法实现了纳米级别空间分辨率的超分辨成像,打破了人们对于光学极限的认识。科研工作者利用超分辨成像可以发现之前发现不了的信息,Xu 等^[2]正是利用随机光学重构显微技术(STORM)提出了神经元轴突中微丝与血影蛋白的组装模型。

超分辨显微成像技术打破了普通光学显微镜横向 200 nm、轴向 500 nm 的分辨率极限,在众多超分辨显微成像技术之中,很多成像方法依赖于荧光蛋白,而荧光蛋白在某些方面甚至起到了不可或缺的作用。荧光蛋白相比于荧光染料有较高的特异性,同时不需要染色等处理操作^[3],并且相较于目前的量子点来说体积更小^[4],能够更小程度地干扰细胞内部的原始活动。传统荧光蛋白像普通荧光分子一样,对于特定波长的光照会进行荧光发射的响应,但还有一类荧光蛋白对于特定波长的光照则会进行其他行为的响应。如图 1 所示,这些荧光蛋白可以受光调控在亮与暗之间进行转换,称作光开关蛋白^[5];也可以从不发荧光状态进入发射荧光状态,称作光激活蛋白^[6];荧光蛋白的发射光颜色还可以在不同波长光的调控下发生变化,称作光转换蛋白^[7]。目前受照射光影响而产生不同响应的荧光蛋白只有这三类,统一称作光调控荧光蛋白或者光变换荧光蛋白。

荧光蛋白所具有的这种受光调控的特性很大程度上依赖于荧光蛋白独特的桶状结构^[8]。荧光蛋白在结构上类似于一个中空的椭圆柱体,发色团则位于椭圆柱体的内部。构成荧光蛋白桶壁的肽链上依次分布着向内以及向外的氨基酸侧链基团,这便提供了发色团与不同侧链上的不同基团进行相互作用的机会。对于光调控荧光蛋白来说,目前提供的模型是发色团会与侧链基团和水之间维持一种稳定的构象,但是在外界能量输入的情况下,例如特定波长光的照射,发色团便会从稳定的构象转换到其他的构象。构象之间的差异导致发色团的性质发生变化,共轭结构变大则会使发射光红移,发色团的破坏则会使荧光蛋白丧失发光特性^[9-12]。本文总结了光调控荧光蛋白的各种参数,阐述了荧光蛋白与超分辨显微成像技术之间的关系。

2 超分辨显微成像的基本概念

提高空间分辨率最直接的办法就是对光学系统强度点扩展函数进行修正,采取一定手段使光学系统强度点扩展函数的半峰全宽更窄,从而获得更高的空间分辨率。受激发射损耗(STED)荧光显微术便是基于这样的一种思想,当使用“损耗光”对荧光分子进行照射时,荧光分子便有一定概率无法回到基态能级,这部分的发射光波长会比荧光波长要长,利用特定的装置把这一部分光排除在外便对光学系统强度点扩展函数进行了修正,可以理解成荧光分子在激发光照射下的荧光发射响应不再是线性响应^[1]。最开始的 STED 成像只针对荧光染料,但是 STED“损耗光”的强度很强,不适合活细胞成像。随后的发展中,能够在开关两种状态之间进行可逆的转换的荧光蛋白被用在此种类型的超分辨成像中,这极大地降低了“损耗光”的强度,减少了细胞的光毒性,这种思想称作可逆饱和荧光转换(RESOLFT)显微术^[13]。

从频域的角度来看待成像的问题,空间分辨率限制的本质在于频域中高频信息的丢失。透镜系统在成像过程中扮演着低通滤波器的角色,光学传递函数的调制使得低频信息得以保留,高频信息则无法被获取。如果能够获得高频信息,那么就会获得更高的空间分辨率。一方面可以改造成像系统使其能够带通或者高通,但这一想法目前仍然无法实现。另一方面可以采取一定方式使得高频信息出现在低频窗口处。这便是结构光照明显微术(SIM)的成像原理,通过采用结构光照明使一部分荧光分子处于亮的状态而另一部分荧光分子处于暗的状态,它们亮暗之间形成的结构可以提供更多的信息^[14-15]。

点光源经过透镜会变成一个光斑,当两个点光源之间的距离小于艾里斑的半径时,则无法将其区分开来。但是在不同时间点采集这两个点光源时,就可以依次将其区分开来。实现这一点的关键是让荧光分子的时间以及空间分布尽量均匀,避免出现发光的荧光分子同时处于同一片区域的情况。这便是光激活定位显微术(PALM)以及 STORM 的思想^[16-17]。

超分辨光学波动成像(SOFI)技术通过采集连续的多帧图像,分析荧光分子随着时间变化的亮暗状态,对单个像素进行时间序列的自相关分析,得到的值输回原像素格。因为进行自相关分析有光学系统强度点扩展函数的参与,所以最后的计算值里面也带有光学系统强度点扩展函数这一参数,有趣的是光学系统强度点扩展函数经过运算得到了平方,半峰全宽变得更窄。如果进行高阶的运算就要运用高阶累积量来进行序列分析^[18]。

其他的超分辨显微成像技术,例如:3B 分析是对荧光分子的状态建立隐马尔可夫模型,然后通过贝叶斯条件概率计算哪一个点是荧光分子的概率最大^[19];扩张显微成像则是利用特殊的化学处理使得细胞的体积与原来相比得到了扩张,从而使细胞内部的分子之间的距离变大^[20];4Pi 以及干涉测量光激活定位显微术(iPALM)利用双物镜获得了更丰富的信息^[21-22]。Balzarotti 等^[23]通过把 STED 技术与单分子定位显微技术相结合,使定位精度达到了 1 nm。近场光学显微术通过采集表面的倏逝波来打破瑞利判据,从而提高空间分辨率^[24]。

3 通过荧光蛋白可以实现超分辨成像

荧光蛋白最大的特点之一在于其可以被光调控。荧光蛋白可以被猝灭,可以被激活,也可以在亮暗之间转换。从荧光蛋白的角度来考虑超分辨成像,需要思考的问题有三点,一是荧光蛋白哪些特性可以被利用,二是利用荧光蛋白的特性进行一种什么样的调控(不调控也是一种调控),三是可以通过所进行的调控获得什么样的信息,进行什么样的信号处理,以及常规的参数与荧光蛋白经过调控产生的信号进行叠加之后产生了什么样的变化。

目前大部分的超分辨显微成像技术都基于光调控荧光蛋白,这类蛋白是最容易被调控的且调控样式最丰富,如图 1 所示。通过控制调控光的强度来使得荧光蛋白以单分子点的形式出现,或者通过特定结构光照明,使采集的图像呈现出非均一的信号,以及周期性地开关荧光蛋白并分析所采集到的一系列连续图像,就可以获得常规显微成像所不能获得的信息。

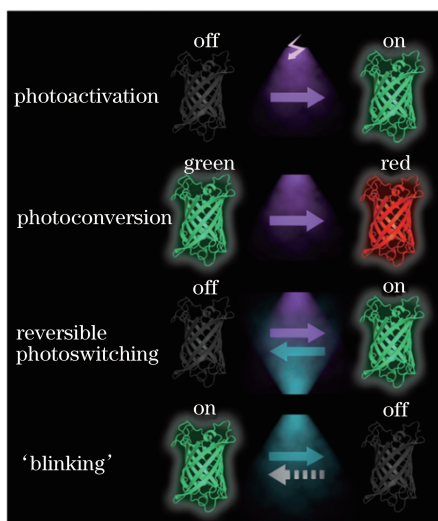


图 1 光调控荧光蛋白的调控示意图^[25]

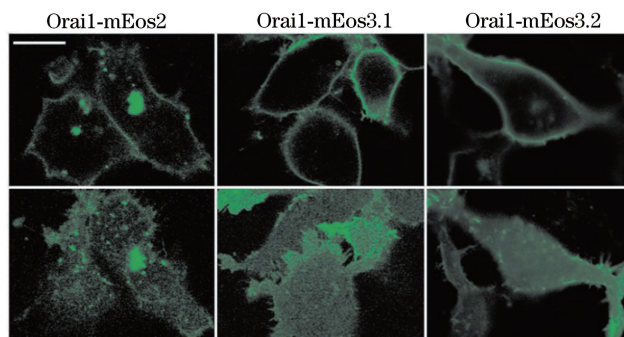
Fig. 1 Sketch map of light regulated fluorescent protein^[25]

3.1 荧光蛋白的单分子特性

单分子特性是 PALM 实现的关键,现有的三类光调控荧光蛋白均可以形成单分子。单分子所呈现的位置应当尽量随机没有偏好性,同时单幅图像中的单分子数不能太多,否则重构出的结果就会出现误差;同时单分子数也不能太少,否则时间成本就会提高。一次 PALM 成像所需要采集帧数的依据是采样定理,在一定定位精度以及单分子密度的条件下,可以根据目的空间分辨率来反推出采集帧数。

荧光蛋白的单体性质是选择以及改造荧光需要考虑的首要因素。糟糕的单体性质会对目标分子的定位以及功能产生影响,从而提供错误信息。可以通过改变荧光蛋白的表面电荷来使其表现出良好的单体性质,例如,Zhang 等^[26]通过对 mEos2 进行结构解析,在特定的位点进行突变,从而开发出了更适合 PALM 成像的真正单体荧光蛋白 mEos3.1 和 mEos3.2。如图 2 所示,用荧光蛋白标记 Orail 蛋白,单体性质良好的荧光蛋白会最大程度减少因为聚合性质导致的假象。

全光子数决定着 PALM 的定位精度^[16],同时也表征着荧光蛋白的亮度,而追求更高亮度永远是荧光蛋

图 2 三种荧光蛋白的单体性质^[26]Fig. 2 Monomeric properties of three fluorescent proteins^[26]

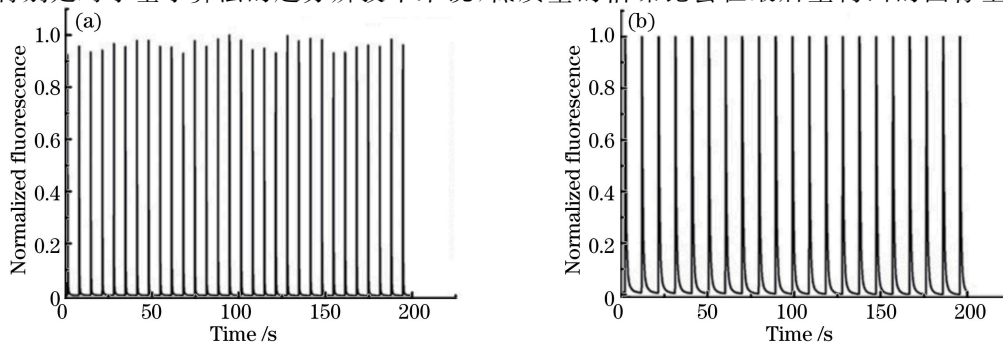
白开发的目标。高的亮度意味着更高的信噪比。目前来说制约超分辨显微成像技术的一大瓶颈就是信噪比不够。差的信噪比会对一幅超分辨图像最终的重构带来很多麻烦。同时更高的亮度意味着更少的曝光时间,也就意味着更高的时间分辨率。

3.2 荧光蛋白的调控特性

本研究引入荧光蛋白的调控速率概念,比如对于光转换蛋白来说调控速率是指在光照射下荧光蛋白由红转绿的速率,对于光开关蛋白来说就是荧光蛋白变亮与变暗的速率。如图 3 所示, Skylan-NS 相对于 Skylan-S 来说调控速率更大。对于 RESOLFT、非线性 SIM 以及 PALM 来说,越大的调控速率意味着点扫描速率、结构光调制的速率以及采集单分子点的速率都可以随着调控速率的增大而增大,采集信号的时间就会缩短很多。如果荧光亮度以及硬件控制速度可以跟上,那么就可以用尽可能短的曝光时间来采集图像,这样对于活细胞的超分辨成像来说意义重大,一方面可以提高时间分辨率,另一方面可以减少光毒性带来的损害。对于固定细胞来说也可以节约时间成本,同时减少强光对荧光蛋白的光漂白作用。调控速率同时也直接影响着荧光蛋白的“暗状态寿命”,不同于追求大调控速率,小调控速率可以提供更长的“暗状态寿命”,从而使得“离相位”信息更显著,提高了图像的信噪比以及荧光分子选择性^[27]。

荧光蛋白的调控敏感度指荧光蛋白对于不同强度的光所产生响应的程度。活细胞超分辨成像需要外加光强尽可能弱,这样光毒性会降到最低,但同时也会降低图像的信噪比。如果荧光蛋白的调控敏感度足够高的话,活细胞成像的质量就会有大的提高。

荧光蛋白的调控深度指荧光蛋白不同状态之间荧光强度的比值,对于光开关蛋白来说是指开状态亮度与关状态亮度的比值。在利用光开关蛋白进行 PALM 成像过程中,单分子会处在亮状态,单分子周围的分子虽然处于暗状态但是在激发光照射下还是会进行荧光的发射。大的调控深度可以使亮状态分子从周围的暗状态分子中区分出来,从而突出单分子形态。鉴于光开关蛋白的调控深度不够导致 PALM 成像效果不理想,光转换蛋白被应用在 PALM 超分辨成像中。利用红绿两个通道的信号不会相互干扰的优点,实现更加完美的单分子定位成像^[28]。大的调控深度会大幅度提高成像的信噪比,成像信噪比的好坏决定着超分辨成像的质量,特别是对于基于算法的超分辨技术来说,低质量的信噪比会在最后重构出的图像上添加很多伪

图 3 (a) Skylan-NS 和 (b) Skylan-S 的光开关特性^[29]Fig. 3 Photoswitching properties of (a) Skylan-NS and (b) Skylan-S^[29]

迹,这对后续的工作会造成大的麻烦,甚至会提供虚假的信息。对于 SOFI 技术来说,足够的调控深度可以使得后期进行高阶累积量计算的时候信号更加突出,从而提高 SOFI 成像的空间分辨率。现在制约非线性 SIM 的难点之一为信噪比不够高,这就使得更高次的谐波信息被淹没在噪声之中无法重构出来,在这种情况下,一个拥有足够大的调控深度的荧光蛋白会极大地提高非线性 SIM 的分辨率。大的调控深度对于 RESOLFT 来说同样至关重要。

荧光蛋白的调控循环数以及光稳定性是长时程图像采集或者高能量图像采集的决定因素。更多的循环数以及更健壮的光稳定性对 SOFI 技术来说意味着可以采集足够数量的图像来进行自相关分析或者高阶累积量分析,同时有用的信号不会在采集图像的后半程湮没在噪声之中,重构出来的质量以及空间分辨率会更高^[30]。对于 RESOLFT,足够多的循环数使得更加精细的扫描成为可能,而不用担心荧光蛋白丧失光开关的特性^[31]。对于非线性 SIM 成像,优良的调控循环数以及光稳定性也非常重要,这使得后半程的图像采集过程中信噪比依然能够维持在较高的水平。最近新开发出来的荧光蛋白 Skylan-NS,其每个循环内的光子数是 rsEGFP2 的 10 倍,并且荧光调控深度也就是亮暗对比度也比 rsEGFP2 以及 Dronpa 要高,在其荧光强度降到初始荧光强度的 $1/e$ 之前能提供大约 700 个调制循环数,这些特性使得非线性 SIM 能够获得大约 60 nm 的空间分辨率^[29,32]。如图 4 所示,在开关多次之后对比 Dronpa 和 Skylan-S 的有效信号,依然维持在比较高的水平。在活细胞成像中,好的光稳定性使得长时长采样成为可能,可以实现长时间追踪某一细胞活动的发生以及变化过程。

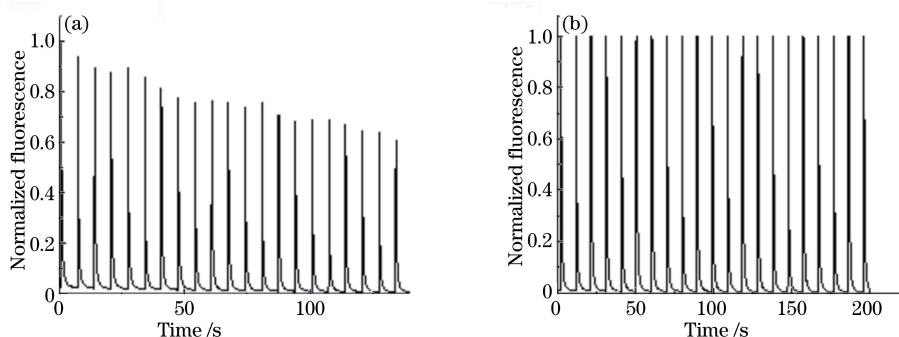


图 4 (a) Dronpa 和 (b) Skylan-S 荧光蛋白的光稳定性^[30]

Fig. 4 Photostability of (a) Dronpa and (b) Skylan-S fluorescent proteins^[30]

3.3 荧光蛋白的成熟时间以及非线性特性

成熟时间是荧光蛋白的另一个重要的性质。成熟时间是指在荧光蛋白的结构折叠好之后,发色团经过化学反应最终形成所消耗的时间。一般来说理想荧光蛋白的成熟时间应尽可能短,这样荧光蛋白在生命科学的研究中就会有更广泛的应用^[33]。某些荧光蛋白的发射波长会随着发色团的成熟过程进行改变,这类荧光蛋白有着其自身独特的作用^[34]。

荧光蛋白的非线性响应是一个有待挖掘的领域。如果存在着一种能够产生非线性响应的荧光蛋白,不论对于调控光还是激发光,超分辨成像的步骤就会变得非常简便。对于非线性 SIM 来说,得以运行的关键是非线性响应结构光的照明。为了实现非线性响应结构光的照明,Li 等^[32]给出了三种调控方式,前两种是利用正弦条纹的调控光进行激活,然后再进行同样相位的正弦条纹的激发光进行信号采集,这两种方式对前后两次正弦条纹光的对齐提出了很大的要求。第三种调控方法是运用宽场调制光进行激活,然后用正弦条纹光照射使荧光蛋白部分进入暗状态,最后错开 π 相位进行正弦调制光的信号采集,从而在频域获得更高频率的信息。但是这三种调控方式耗时相对较长,时间以及操作成本偏大。利用 Kohinoor 荧光蛋白来简化调控方式,同样能够实现非线性 SIM 的照明方式^[35]。相比其他的光开关荧光蛋白来说,Kohinoor 荧光蛋白的特点是:激发光同时会使其进入亮状态而其他类型的光开关荧光蛋白则正好相反。利用这一特性,只需要一个波长的正弦条纹光就满足条件,可以同时为 Kohinoor 荧光蛋白进行激活以及激发,这样处于激活状态的分子同时被激发,相当于荧光蛋白对激发光产生了非线性响应。但回到最开始的讨论,如果存在这样的一种荧光蛋白,其本身就会对激发光产生非线性响应的发射,那么非线性 SIM 的操作就变得与 SIM 大同小异

了。对于 RESOLFT 来说,非线性响应同样重要,若是存在对于激发光非线性响应发射的荧光蛋白,那么点扫描的那一圈“甜甜圈”便可以去掉,直接进行点扫描就会对光学系统强度点扩展函数进行修饰。

4 结 语

荧光蛋白被应用于超分辨显微成像已经发展了 10 年,这 10 年中,绝大部分关于荧光蛋白的性质均与荧光强度有关,但是对于荧光蛋白来说,除了荧光强度以外,荧光寿命、荧光光谱以及荧光偏振极性在利用得当的情况下都可以实现不同的调控以得到更好的超分辨显微成像效果^[36]。除此之外,多色荧光蛋白应用于超分辨成像一直是人们所期望的。虽然超分辨显微成像目前可以使得空间分辨率最小(能够达到几纳米),但所付出的代价是长时间的数据采集,这对于极短时间内的事件捕捉无能为力,而且几纳米的空间分辨率对于一些细微结构的解析还略显不足。对于荧光蛋白来说,由于其生物大分子的性质,人们无法像合成分子探针那样随心所欲地对其进行改造,这无疑是荧光蛋白的致命缺点之一。对于荧光蛋白以及超分辨显微成像来说,未来的发展道路将是沿着交叉的路线前进,这同样也是未来科研的思路。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Lippincott-Schwartz J, Patterson G H. Development and use of fluorescent protein markers in living cells[J]. *Science*, 2013, 300(5616): 87-91.
- [4] Medintz I L, Uyeda H T, Goldman E R, *et al.* Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing[J]. *Nature Materials*, 2005, 4(6): 435-446.
- [5] Ando R, Mizuno H, Miyawaki A. Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting[J]. *Science*, 2004, 306(5700): 1370-1373.
- [6] Patterson G H, Lippincott-Schwartz J. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells[J]. *Science*, 2002, 297(5588): 1873-1877.
- [7] Ando R, Hama H, Yamamoto-Hino M, *et al.* An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(20): 12651-12656.
- [8] Ormö M, Cubitt A B, Kallio K, *et al.* Crystal structure of the *aequorea victoria* green fluorescent protein[J]. *Science*, 1996, 273(5280): 1392-1395.
- [9] Stiel A C, Trowitzsch S, Weber G, *et al.* 1.8 Å bright-state structure of the reversibly switchable fluorescent protein Dronpa guides the generation of fast switching variants[J]. *Biochemical Journal*, 2007, 402(1): 35-42.
- [10] Subach F V, Malashkevich V N, Zencheck W D, *et al.* Photoactivation mechanism of PAmCherry based on crystal structures of the protein in the dark and fluorescent states[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(50): 21097-21102.
- [11] Hayashi I, Mizuno H, Tong K I, *et al.* Crystallographic evidence for water-assisted photo-induced peptide cleavage in the stony coral fluorescent protein Kaede[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 372(4): 918-926.
- [12] Habuchi S, Dedecker P, Hotta J, *et al.* Photo-induced protonation/deprotonation in the GFP-like fluorescent protein Dronpa: mechanism responsible for the reversible photoswitching[J]. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2006, 5(6): 567-576.
- [13] Hofmann M, Eggeling C, Jakobs S, *et al.* Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(49): 17565-17569.
- [14] 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.
- [15] Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(37): 13081-13086.
- [16] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J].

- Science, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [17] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. Nature Methods, 2006, 3(10): 793-795.
- [18] Dertinger T, Colyer R, Iyer G, *et al.* Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI) [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(52): 22287-22292.
- [19] Cox S, Rosten E, Monypenny J, *et al.* Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics [J]. Nature Methods, 2012, 9(2): 195-200.
- [20] Chen F, Tillberg P W, Boyden E S. Expansion microscopy[J]. Science, 2015, 347(6221): 543-548.
- [21] Shtengel G, Galbraith J A, Galbraith C G, *et al.* Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(9): 3125-3130.
- [22] Bewersdorf J, Schmidt R, Hell S W. Comparison of I5M and 4Pi-microscopy[J]. Journal of Microscopy, 2006, 222(Pt 2): 105-117.
- [23] Balzarotti F, Eilers Y, Gwosch K C, *et al.* Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes[J]. Science, 2016, 355(6325): 606-612.
- [24] Betzig E, Trautman J K. Near-field optics: microscopy, spectroscopy, and surface modification beyond the diffraction limit[J]. Science, 1992, 257(5067): 189-195.
- [25] Hell S W, Sahl S J, Bates M, *et al.* The 2015 super-resolution microscopy roadmap[J]. Journal of Physics D: Applied Physics, 2015, 48(44): 443001.
- [26] Zhang M S, Chang H, Zhang Y D, *et al.* Rational design of true monomeric and bright photoactivatable fluorescent proteins[J]. Nature Methods, 2012, 9(7): 727-729.
- [27] Chen Y C, Dickson R M. Improved fluorescent protein contrast and discrimination by optically controlling dark state lifetimes[J]. Journal of Physical Chemistry Letters, 2017, 8(4): 733-736.
- [28] Wang S Y, Moffitt J R, Dempsey G T, *et al.* Characterization and development of photoactivatable fluorescent proteins for single-molecule-based superresolution imaging [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(23): 8452-8457.
- [29] Zhang X, Zhang M S, Li D, *et al.* Highly photostable, reversibly photoswitchable fluorescent protein with high contrast ratio for live-cell superresolution microscopy[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, 113(37): 10364-10369.
- [30] Zhang X, Chen X Z, Zeng Z P, *et al.* Development of a reversibly switchable fluorescent protein for super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI)[J]. Acs Nano, 2015, 9(3): 2659-2667.
- [31] Wang S, Chen X Z, Chang L, *et al.* GMars-Q enables long-term live-cell parallelized reversible saturable optical fluorescence transitions nanoscopy[J]. Acs Nano, 2016, 10(10): 9136-9144.
- [32] Li D, Shao L, Chen B C, *et al.* Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics[J]. Science, 2015, 349(6251): 527.
- [33] Nagai T, Ibata K, Park E S, *et al.* A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications[J]. Nature Biotechnology, 2002, 20(1): 87-90.
- [34] Terskikh A, Fradkov A, Ermakova G, *et al.* "Fluorescent timer": protein that changes color with time[J]. Science, 2000, 290(5496): 1585-1588.
- [35] Lu-Walther H W, Hou W, Kielhorn M, *et al.* Nonlinear structured illumination using a fluorescent protein activating at the readout wavelength[J]. PloS One, 2016, 11(10): e0165148.
- [36] 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.