

多色单分子定位超分辨显微成像术

潘雷霆^{1,2}, 胡 芬¹, 张心正^{1,3}, 许京军^{1,3*}

¹南开大学物理科学学院, 泰达应用物理研究院弱光非线性光子学教育部重点实验室, 天津 300457;

²南开大学生物治疗协同创新中心, 天津 300457;

³山西大学极端光学协同创新中心, 山西 太原 030006

摘要 多色成像作为超分辨成像技术的重要延伸, 极大地增强了人们研究亚细胞结构定位与交互关系的能力, 从而有助于研究者深入理解细胞内复杂的生命现象与过程。基于单分子定位超分辨显微成像术(SMLM)工作原理的特殊性, 已实现了激发依赖、激活依赖、分光依赖等数种有特点的多色成像方法。介绍 6 种主要的多色单分子定位超分辨显微成像技术, 从分色能力、光谱串扰、数据采集效率等角度分析了各方法的优缺点, 并讨论了与多色成像相关的细胞固定方法, 帮助研究人员根据自身实验需求选择合适可靠的多色成像手段研究相应的科学问题。

关键词 显微; 荧光成像; 单分子定位显微成像; 多色成像; 随机光学重建显微术; 光敏定位显微术

中图分类号 Q63 **文献标识码** A

doi: 10.3788/AOS201737.0318010

Multicolor Single-Molecule Localization Super-Resolution Microscopy

Pan Leiting^{1,2}, Hu Fen¹, Zhang Xinzheng^{1,3}, Xu Jingjun^{1,3}

¹Key Laboratory of Weak-Light Nonlinear Photonics, Ministry of Education,

TEDA Institute of Applied Physics and School of Physics, Nankai University, Tianjin 300457, China;

²Collaborative Innovation Center for Biological Therapy, Nankai University, Tianjin 300457, China;

³Collaborative Innovation Center of Extreme Optics, Shanxi University, Taiyuan, Shanxi 030006, China

Abstract Multicolor imaging is an important extension of super-resolution microscopy, which greatly enhances the investigation ability of the relationship between localization and interaction of sub-cellular structures. Therefore, it is beneficial for researchers to go deep into understanding of complicated biological phenomena and processes in cells. Based on the special working principle of single-molecule localization super-resolution microscopy (SMLM), several characteristic multicolor imaging technologies including excitation-dependent, activation-dependent, split-dependent multicolor SMLM and so on are accomplished. In this paper, we analyze the advantages and disadvantages among six main multicolor SMLM from the views of color separation ability, spectrum cross-talk and data collection efficiency. In addition, we discuss the cell fixation method in relation to the multicolor imaging. This review may be helpful for researchers to seek suitable and reliable multicolor imaging methods to study corresponding scientific problem according to their own experimental conditions.

Key words microscopy; fluorescence microscopy; single molecule localization microscopy; multi-color imaging; stochastic optical reconstruction microscopy; photo-activation localization microscopy

OCIS codes 180.2520; 110.2970; 170.2655; 170.6280

1 引 言

远场光学显微镜因具备非侵入性、实时、可视放大观察样品等特点, 自出现以来便成为细胞及微生物学研究中无可替代的常规技术手段。然而早在一百多年前德国物理学家 Abbe 就指出由于光的波动性和衍射效应, 使得远场成像系统横向分辨率存在约 200 nm 的极限, 导致人们无法有效观测纳米尺度的生命现象。这一限制终于在 21 世纪初被打破, 诞生了两大类超分辨荧光显微成像技术: 1) 基于激发光源改造[也称点扩展函数工程

收稿日期: 2016-10-13; **收到修改稿日期:** 2016-11-23

基金项目: 国家自然科学基金(11574165)、111 计划(B07013)、长江学者和创新团队发展计划(IRT_13R29)

作者简介: 潘雷霆(1983—), 男, 博士, 副教授, 主要从事光生物医学光子学方面的研究。E-mail: plt@nankai.edu.cn

* **通信联系人。** E-mail: jjxu@nankai.edu.cn

(PSF)]技术的受激发射损耗显微术(STED)^[1-3]和结构光照明显微术(SIM)^[4-5];2)基于单分子定位技术的光激活定位显微术(PALM)^[6-8]和随机光学重建显微术(STORM)^[9-12]。这些超分辨显微成像技术使得远场成像横向分辨率轻松达到了百纳米以下,进而大大丰富了显微镜对细胞微纳结构与功能的研究^[13-18]。

基于单分子定位技术的超分辨显微成像(简称单分子定位超分辨显微术, SMLM)通过“计算”实现,横向分辨率目前已达 10 nm 左右^[19]。具体工作原理是:基于全内反射照明光路,用激活光和激发光控制成像区每次仅有少量、随机、离散的单个荧光分子发光,再通过高斯拟合分析单个荧光分子点扩展函数中心实现高精度的空间定位,最后将图片进行叠加形成一幅超分辨图像^[20-21]。利用荧光探针标记细胞内不同的目标物进行多色超分辨成像,不仅可以获得单个目标物的超分辨信息,还可以精确分析不同目标物的空间结构与相互关系,极大地加强人们对细胞内复杂的生命现象与过程的探索能力。目前, SMLM 由于其工作方式的特殊性,已产生了数个不同原理的多色成像方法,并广泛地应用到生命科学各个研究领域中。其中具有代表性的工作是 2013 年哈佛大学 Xu K 等^[22]采用双色 STORM 揭示神经细胞轴突部分微丝-帽蛋白复合物与血影蛋白交替构成间距为 180~190 nm 的周期性结构,这是传统研究手段无法观察到的。本文介绍几种主要的多色 SMLM,依次阐述各种方法的优缺点,同时探讨与多色相关的样品固定处理方法,期望为不同实验需求的研究人员提供选择依据。

2 多色 SMLM 发展现状

多色 SMLM 按照采集方式主要可分为两大类,即依次采集和同步采集方式。目前存在以下几种主要的多色 SMLM。

2.1 基于不同激发光的多色 SMLM

依靠不同的激发光让不同染料分子发射出不同颜色的荧光是进行多色成像最常规的思路,已在 PALM^[23-24]与 STORM^[22,25-27]中获得了较好的应用。尤其对于 STORM,目前与商业有机荧光探针匹配的激光器波段主要包括 488,561,647,750 nm 等,因此理论上可实现四色成像。该方法的优点在于工作原理简单,实施方便,不同颜色间串扰较小。但缺点也比较明显,首先其属于依次采集方式,不同颜色间数据获取存在一定的时间间隔,则样品位置在数据采集过程中难免发生漂移,因而颜色叠加时需进行校正才能得到准确的相互关系。该问题目前可通过在样品中添加少量具有宽发射带宽的荧光微球解决^[26]。其次,具有较强闪烁性的荧光探针对于 SMLM 技术的实现至关重要^[28],然而并不是每个激发波段对应的荧光探针都具有优良的闪烁能力。已有的闪烁性能较好的探针都集中在红外激发波段如 Cy5, Alexa 647 等,绿光和蓝光还没有对应闪烁性较好的染料,因而会严重影响组合成像分辨率,这也是该多色方法目前最大的问题。

2.2 基于不同激活光的多色 SMLM

2006 年, Rust M J 等^[9]利用 Cy3-Cy5(激活子-报告子)组成的可控开关荧光分子对实现了单色 STORM。2007 年, Bates M 等^[29]通过设计不同的荧光分子对组合,发展出基于不同激活光的多色 STORM。如图 1 所示,同一个报告子 Cy5 分别连接上不同的激活子如 Alexa 405, Cy3 和 Cy2,依次被 405 nm(紫色曲线), 532 nm(绿色曲线)和 457 nm(蓝色曲线)光激活后可发射出相同的红色荧光。图 1(b)所示为 405, 457, 532 nm 激光分别对三对激活子-报告子探针 Alexa 405-Cy5, Cy2-Cy5 和 Cy3-Cy5 的归一化激活率。这些荧光分子对通过连接二抗标记样品,依次切换上述不同波段的激活光,再由相同的激发光探测同一个报告子 Cy5 发出的荧光,从而实现多色成像。该方法的特点是:1)可以自主选择闪烁能力最好的红外区报告子染料(如 Cy5, Alexa 647 等)进行单分子定位成像,有利于在每个激活通道获得高分辨率数据;2)属于同步采集方式,即一次数据采集过程中获得所有颜色通道的数据,不同颜色间位置基本无位移,不需专门校正;3)把基于激发光和激活光多色成像联合使用,理论上可实现高达九色成像,目前已实现六色^[30]和七色^[31]成像。该方法的缺点也比较明显,就是激发光本身会进行非特异性地激活不同颜色通道,导致较高的串扰率(10%~20%)^[30],造成实验假象,尤其是待成像的两个目标物密度差异较大时,高密度目标物信号可能淹没低密度目标物^[32]。

2.3 基于荧光淬灭技术的多色 SMLM

2014 年 7 月, Tam J 等^[33]发文报道了一种基于荧光淬灭技术的多色 STORM。该方法原理简单,即分

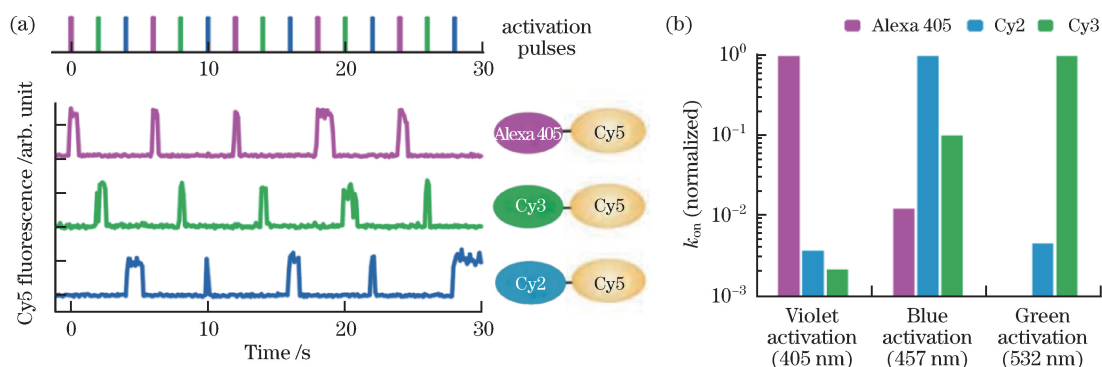


图 1 激活子-报告子构成的光可控开关荧光分子对探针^[29]。(a) 不同的荧光分子对探针；(b) 归一化激活率

Fig. 1 Photo-switchable fluorescent molecule pairs probes built from activator-reporter pairs^[29].

(a) Different fluorescent molecule pairs probes; (b) normalized activation rate

批次免疫荧光标记不同目标蛋白并采集数据,从而实现多色成像。整个实验过程需借助还原剂硼氢化钠淬灭上一轮目标蛋白二抗上的染料分子以避免串扰,具体流程为:免疫荧光标记目标蛋白 1→数据采集→硼氢化钠淬灭→免疫荧光标记目标蛋白 2→数据采集→硼氢化钠淬灭→免疫荧光标记目标蛋白 3→数据采集→…。该方法属于依次采集,但只需一个激发光源和一个激活光源即可实现多色成像,颜色数只跟一抗种属(如 mouse, rat, rabbit, chicken 等)数有关。此方法的最大优点是不同目标蛋白二抗连接的染料分子是同一种,且选自闪烁能力最好的红外激发波段如 Alexa 647,因而保证了每个通道都具有较好的成像分辨率(优于激发依赖的多色成像),且由于淬灭技术,几乎无串扰(优于激活依赖的多色成像)。但是,不难看出整个实验过程非常费时费力,本质上属于更加极端地采用了以时间换空间的策略。此外,由于需要多次费时标记,对于不同颜色成像,需专门解决同一视野采集及位置校正问题。另外,由于是靠依次荧光淬灭实现多色成像,因此不适合 PALM。

2.4 基于分光技术的多色 SMLM

基于分光技术的多色成像是指采用不同发射谱的荧光探针标记样品,然后经同一个激发光辐照发射出的混合荧光被二向色镜分为透射和反射两路光,再分别被透镜聚焦到同一个 CCD 靶面左右两侧进行成像,如图 2 所示。图 2 中 DM 是二向色镜, L 是棱镜, M 是反射镜。数据采集后再利用比率法对每个荧光点进行颜色分类^[34-35],最终获得双色图像,该方法已被应用于 STORM^[36-37], PALM^[38] 和 STED^[39] 等多色成像。该方法的主要优点是:1)属于同步采集方式,只需要一个激发光源,一次数据采集过程同时获得两个颜色通道的数据,不仅节省实验时间,图片叠加也不需进行额外位置校正;2)可以选择闪烁能力较好的红外激发染料(如 Alexa 647, CF680, Alexa 700 等)标记样品,从而获得高分辨率数据。该方法的缺点是两个颜色间串扰明显,尤其是待成像物密度较高的情况下更为糟糕。造成串扰的原因主要有两方面:1)由于是一个激发光源,为了保证激发效率,所选的两个荧光探针的吸收谱必然近似,则它们的发射谱必然发生交叠从而导致串扰,这是靠二向色镜和发射滤色片无法消除的;2)为了对两个通道的图片进行正确叠加,光路中二向色镜截止波段的选择往往刻意把其中一个波段的荧光分给另一个通道,使得两个通道数据产生关联性,进而实现校正叠加,但也带来串扰,甚至是数据的丢失。该分光光路可以自行搭建,也可购买成品,如英国 Andor 公司的 OptoSplit II 和美国 Photometrics 公司的 DV2。

2.5 基于光谱技术的多色 SMLM

2015 年 8 月,加州大学伯克利分校 Zhang Z 等^[40]发文报道利用三棱镜分光原理,发展出一种名为光谱分辨的随机光学重建显微成像术(SR-STORM)。早在 2013 年, Xu K 等^[19]利用双物镜成像系统提高荧光采集效率从而把 STORM 横向分辨率提高到 10 nm 左右。基于该成像系统,他在其中一束光路中加入三棱镜[图 3(a)],对荧光信号进行横向空间光谱展开[图 3(c)],另一路进行正常的单分子空间定位成像[图 3(b)]。最终计算出的超分辨图片中每个像点不仅具有空间信息,还拥有光谱信息,再通过单分子光谱比对与分类最终实现多色成像。为了降低光谱串扰,筛选出 Dy634, DL650, CF660 和 CF680 4 个荧光探针,在 PtK2 细胞中对过氧化物酶体、波形蛋白、微管和线粒体实现了四色同步超分辨成像[图 3(d),标尺为 2 μm]。

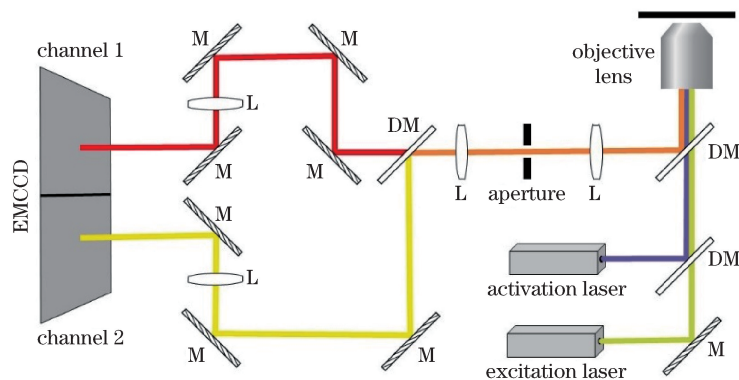


图 2 双通道多色超分辨成像光路示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the two-channel multicolor super resolution imaging light path

该方法的特点是:1)属于同步采集方式,只需一个激发光源和一个激活光源,可同时获得多达四色超分辨图像,且窜扰很低($<2\%$);2)双物镜系统实现高通量荧光信号采集,获得光谱数据,同时不影响空间定位分辨。问题是后期数据处理较为复杂。随后, Mlodzianoski M J 等^[41]基于相似的光谱成像方法,发现 PALM 成像过程中荧光蛋白的发射光谱可随时间发生变化。2016 年 6 月,美国西北大学 Dong B 等^[42]发文报道利用光栅分光原理实现了光谱分辨的 SMLM,并在 Cos7 细胞中对微管和线粒体进行了双色同步成像(图 4)。如图 4(c)所示是微管(红色)与线粒体(绿色)的超分辨成像图,标尺为 $1\ \mu\text{m}$ 。该方法主要的特点是光谱展开较大,可获得较高的光谱分辨率。但由于是单物镜成像系统,光谱光路分流了原本用于空间定位光路的荧光信号,影响空间分辨率;而且光谱光路只采用了 1 级衍射光,高级或者-1 级没有利用,这在某种程度上降低了光谱分辨率。

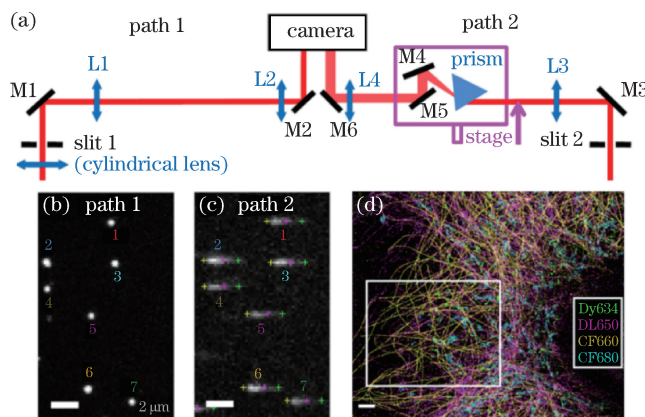


图 3 高通量光谱分辨的随机光学重建显微成像术^[40]。(a) 基于棱镜分光原理的光路示意图;(b) 单分子荧光成像图;

(c) 单分子荧光光谱展开成像图;(d) 四色超分辨成像图

Fig. 3 High-throughput SR-STORM^[40]. (a) Schematic diagram of the light path based on the prismatic decomposition principle;

(b) single molecule fluorescence imaging; (c) single molecule fluorescence spectrum imaging;

(d) four-colors super resolution image

不难理解,若希望光谱分辨率高,则光谱展开越大越好,这样光栅较三棱镜有明显的优势。但若展开过大,分到每个像素的荧光强度变低,导致光谱信噪比降低。当然,若展开不足,光谱分辨率太低,则无法进行光谱分析。此外,每个成像点进行光谱横向展开后,会占据较多的电荷耦合器件(CCD)靶面像素,荧光点随机闪烁过程中横向空间容易发生交叠,导致光谱数据失真,且原始图像点密度越高,交叠概率越大。因此,不管是光栅还是棱镜分光技术,数据处理过程中必须把这些发生光谱交叠的数据点剔除,这导致对应的空间信息丢失,损失空间分辨率。此时存在一个三方博弈,即光谱信噪比、光谱分辨率与空间分辨率的取舍。对于细胞内结构的研究,各个目标蛋白位置和结构错综复杂,且密度较高,则棱镜法或许更为合适,可在保证足够的空间分辨率情况下实现多色同步成像。若只是分析单分子荧光光谱动力学过程,且目标物密度较低,或许光栅法较合适。

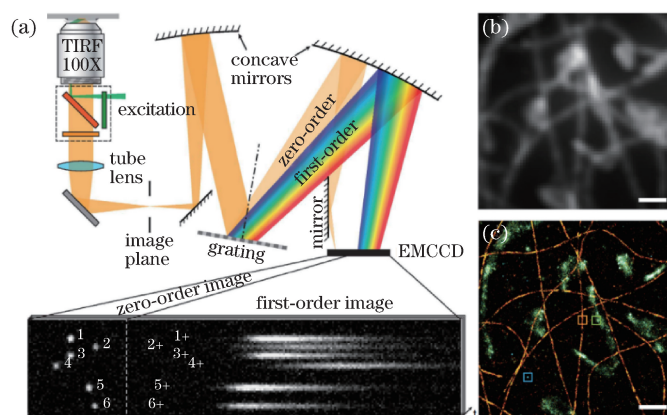


图 4 光栅光谱分辨的单分子定位超分辨显微成像术^[42]。(a) 基于光栅分光原理的光路示意图；

(b) Cos7 细胞中微管与线粒体普通荧光成像图；(c) 微管与线粒体超分辨成像图

Fig. 4 Single-molecule localization super-resolution microscopy with grating spectroscopic resolution^[42].

(a) Schematic diagram of the light path based on the grating decomposition principle;

(b) conventional fluorescence image of microtubule and mitochondria in Cos7 cell;

(c) super resolution image of microtubule and mitochondria

2.6 基于点扩展函数工程技术的多色 SMLM

2016 年 8 月, Shechtman Y 等^[43] 发文报道了一种基于点扩展函数工程技术的双色 SMLM。早在 2009 年, Pavani S R P 等^[44] 利用空间光调制器对单分子荧光进行点扩展函数双螺旋工程改造, 使得荧光分子在不同的 Z 轴深度呈现不同的双螺旋调制信息, 从而实现了三维 SMLM。随后, Gahlmann A 等^[45] 又基于分光技术进行点扩展函数双螺旋改造, 实现了可定量分析的双色三维 PALM。2015 年, Shechtman Y 等^[46] 利用四脚相位板对点扩展函数实现高精度超深三维调制。2016 年这篇文章综合上述研究成果, 采用单光路成像系统, 设计出一种光谱依赖的四脚相位板, 可调制不同颜色荧光的点扩展函数形状, 同时该形状与 Z 轴深度相关, 进而实现双色三维 SMLM, 如图 5 所示, 标尺为 5 μm 。该方法概念新颖, 属同步采集方式, 但不依赖于分光技术, 而是利用光学工程手段调制点扩展函数的形状实现多色成像, 颜色间串扰较低。但也存在一定的缺点, 那就是被调制过的点扩展函数占据了较多的 CCD 成像面积, 限制了每帧图片采集的分子数(否则信号易发生交叠), 降低了采集效率, 因此比较适合低密度目标物的成像。

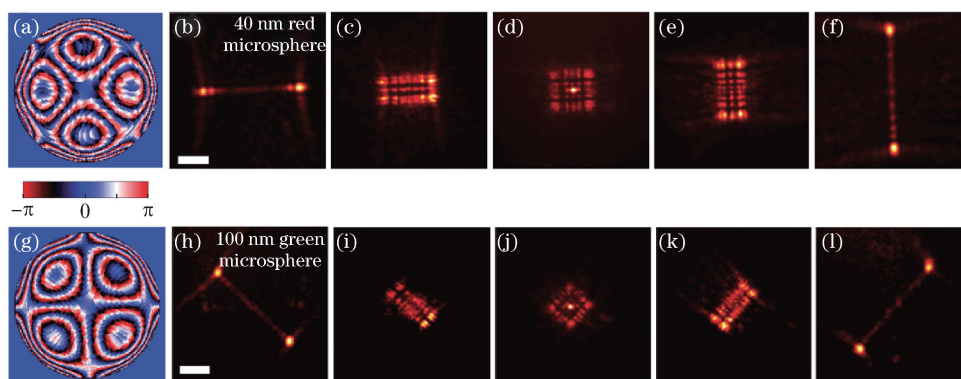


图 5 基于四脚相位板调控的双色三维成像^[43]。(a) 红光通过四脚相位板后相位延迟图案；40 nm 红色荧光微球在(b) $z = -10 \mu\text{m}$ ；

(c) $z = -3 \mu\text{m}$ ；(d) $z = 0$ ；(e) $z = 3 \mu\text{m}$ ；(f) $z = 10 \mu\text{m}$ 的点扩展函数形状；(g) 绿光通过四脚相位板后相位延迟图案；

100 nm 绿色荧光微球在(h) $z = -10 \mu\text{m}$ ；(i) $z = -3 \mu\text{m}$ ；(j) $z = 0$ ；(k) $z = 3 \mu\text{m}$ ；(l) $z = 10 \mu\text{m}$ 的点扩展函数形状

Fig. 5 Dual-color three-dimensional imaging modulated by tetrapod phase plate^[43]. (a) Phase delay pattern of the red light

passing through tetrapod phase plate; point-spread-function for a 40 nm red fluorescent microsphere at (b) $z = -10 \mu\text{m}$;

(c) $z = -3 \mu\text{m}$; (d) $z = 0$; (e) $z = 3 \mu\text{m}$; (f) $z = 10 \mu\text{m}$; (g) phase delay pattern of the green light passing through

tetrapod phase plate; point-spread-function shape for a 100 nm green fluorescent microsphere at (h) $z = -10 \mu\text{m}$;

(i) $z = -3 \mu\text{m}$; (j) $z = 0$; (k) $z = 3 \mu\text{m}$; (l) $z = 10 \mu\text{m}$

以上介绍了 6 种多色 SMLM, 原理各异, 优缺点共存, 具体比较如表 1 所示。论多色能力强、各通道成像效果均一、低窜扰等特点, 应选基于棱镜分光原理的 SR-STORM, 但是其数据处理较为复杂, 不易上手; 论原理简单、低窜扰特点, 当属基于不同激发光的多色 SMLM, 但不是每个通道都有适合超分辨成像的探针, 稍有缺憾; 论信号采集效率高及不需额外校正特点, 当属基于分光技术的多色 SMLM, 但颜色窜扰固有存在。

表 1 不同多色单分子定位超分辨显微成像术的比较
Table 1 Comparison of different methods for multicolor SMLM

Type	Acquisition mode	Multicolor ability	Cross-talk	Resolution	Time cost	Alignment	User-friendliness
Excitation-dependent	Sequential	2~4 colors	Less	Normal	Normal	Yes	Straightforward
Activation-dependent	Simultaneous	2~7 colors	More	Better	Normal	No	Sophisticated
Quenching-dependent	Sequential	2~4 colors	Less	Better	Higher	Yes	Straightforward
Split-dependent	Simultaneous	2~4 colors	More	Better	Normal	No	Intermediate
Spectrum-dependent	Simultaneous	2~4 colors	Less	Better	Normal	No	Sophisticated
PSF engineering-dependent	Simultaneous	2 colors	Less	Normal	Normal	No	Sophisticated

3 多色成像中细胞固定问题

对于 SMLM, 工作原理要求被观察蛋白不能移动, 因此一般需对细胞样品进行固定处理。PALM 是利用内源表达的荧光蛋白成像, 对固定要求不高。STORM 是依靠免疫荧光标记技术, 对样品固定要求比较严格, 可以说适当的固定方法直接决定 STORM 图片质量^[47-48]。目前细胞免疫染色常用的固定试剂有多聚甲醛溶液、戊二醛溶液、多聚甲醛+戊二醛混合液、冰甲醇等。以上固定试剂对细胞内不同的目标物会有不同的固定效果。多聚甲醛溶液是最常用的固定试剂, 渗透能力强, 固定均匀, 对目标蛋白本身结构影响不大, 一般不影响一抗识别; 但对膜的固定作用较差, 不适合固定膜相关的结构, 如内质网和膜关联蛋白。戊二醛溶液是蛋白强固定剂, 细微结构保持更好, 对膜也有较好的固定作用, 可真实地保存细胞的形态; 但会影响目标蛋白空间构型, 从而影响一抗识别, 造成实验假象。冰甲醇通过蛋白沉淀固定样品, 蛋白抗原性保存非常好, 不影响抗体识别, 但其会溶解膜结构, 破坏细胞真实形态。对于多色 STORM, 本质是对多个目标蛋白进行成像, 但各个蛋白结构特点不同, 且对应抗体的性能和结合位点也不同, 因此需根据具体实验目的探索合理的固定方法。研究经验表明, 血影蛋白、帽蛋白、原肌球蛋白、带 4.1 蛋白等多色成像用多聚甲醛溶液固定(~4%); 微丝一般用戊二醛溶液固定(0.1%~2%); 微管、线粒体、内质网等多色成像常用 3%多聚甲醛+0.1%戊二醛混合液固定。但若进行微丝与血影蛋白多色成像, 此时单纯的多聚甲醛溶液(固定不住微丝)或者戊二醛溶液(影响血影蛋白抗原性)可能都不合适, 二者的混合液可能比较合适, 但需摸索出合适的浓度比。此外, 戊二醛溶液本身会导致细胞有较强的背景荧光, 需用还原剂如硼氢化钠处理后方可进行实验, 否则严重影响超分辨成像效果。

4 结 论

介绍了 6 种多色 SMLM 的工作原理, 比较了它们的优缺点, 并探讨了多色成像中的细胞固定问题。多色成像是超分辨成像技术的重要补充, 若想进一步推广多色 SMLM 在生物医学研究中的应用, 可在以下三个方面寻求突破: 1) 开发出闪烁能力强、发光效率高、颜色多样的有机荧光染料或荧光蛋白; 2) 开发出更适合探针闪烁的成像缓冲液; 3) 摸索出合理可靠的细胞固定试剂和方法。总之, 技术本身无绝对的孰优孰劣, 关键根据自身研究需求选择合适的成像方法。

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] Klar T A, Jakobs S, Dyba M, *et al.* Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated

- emission[C]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(15): 8206-8210.
- [3] D'Este E, Kamin D, Göttfert F, *et al.* STED nanoscopy reveals the ubiquity of subcortical cytoskeleton periodicity in living neurons[J]. Cell Reports, 2015, 10(8): 1246-1251.
- [4] 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.
- [5] Gustafsson M G. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution[C]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(37): 13081-13086.
- [6] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution[J]. Science, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [7] Shtengel G, Galbraith J A, Galbraith C G, *et al.* Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure[C]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(9): 3125-3130.
- [8] Shroff H, White H, Betzig E. Photoactivated localization microscopy (PALM) of adhesion complexes[J]. Current Protocols in Cell Biology, 2008, 4: 4-21.
- [9] Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. Nature Methods, 2006, 3(10): 793-796.
- [10] Heilemann M, van de Linde S, Schüttpeiz M, *et al.* Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes[J]. Angewandte Chemie (International Edition), 2008, 47(33): 6172-6176.
- [11] Zhuang X. Nano-imaging with STORM[J]. Nature Photonics, 2009, 3(7): 365-367.
- [12] Xu K, Shim S H, Zhuang X. Super-resolution imaging through stochastic switching and localization of single molecules: An overview[M]. Far-field Optical Nanoscopy, Berlin: Springer, 2015: 27-64.
- [13] Yao Baoli, Lei Ming, Xue Bin, *et al.* Progress and applications of high-resolution and super-resolution optical imaging in space and biology[J]. Acta Photonica Sinica, 2011, 40(11): 1607-1618.
姚保利, 雷 铭, 薛 彬, 等. 高分辨和超分辨光学成像技术在空间和生物中的应用[J]. 光子学报, 2011, 40(11): 1607-1618.
- [14] Xia Peng, Dou Zhen, Yao Xuebiao. Progress of super-resolution microscopy[J]. Chemistry of Life, 2015, 35(3): 430-437.
夏 鹏, 窦 震, 姚雪彪. 超高分辨率显微技术研究进展[J]. 生命的化学, 2015, 35(3): 430-437.
- [15] Li D, Shao L, Chen B C, *et al.* Advanced imaging. Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics[J]. Science, 2015, 349(6251): aab3500.
- [16] Böhme M A, Beis C, Reddy-Alla S, *et al.* Active zone scaffolds differentially accumulate Unc13 isoforms to tune Ca²⁺ channel-vesicle coupling[J]. Nature Neuroscience, 2016, 19(10): 1311-1320.
- [17] French J B, Jones S A, Deng H, *et al.* Spatial colocalization and functional link of purinosomes with mitochondria[J]. Science, 2016, 351(6274): 733-737.
- [18] Huang F, Sirinakis G, Allgeyer E S, *et al.* Ultra-high resolution 3D imaging of whole cells[J]. Cell, 2016, 166(4): 1028-1040.
- [19] Xu K, Babcock H P, Zhuang X. Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actincytoskeleton[J]. Nature Methods, 2012, 9(2): 185-188.
- [20] Betzig E. Proposed method for molecular optical imaging[J]. Optics Letters, 1995, 20(3): 237-239.
- [21] Dickson R M, Cubitt A B, Tsien R Y, *et al.* On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein[J]. Nature, 1997, 388(6640): 355-358.
- [22] Xu K, Zhong G, Zhuang X. Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons[J]. Science, 2013, 339(6118): 452-456.
- [23] Shroff H, Galbraith C G, Galbraith J A, *et al.* Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes[C]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(51): 20308-20313.
- [24] Subach F V, Patterson G H, Manley S, *et al.* Photoactivatable mCherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy[J]. Nature Methods, 2009, 6(2): 153-159.
- [25] Dempsey G T, Vaughan J C, Chen K H, *et al.* Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based

- super-resolution imaging[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(12): 1027-1036.
- [26] 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.
- [27] Leterrier C, Potier J, Caillol G, *et al.* Nanoscale architecture of the axon initial segment reveals an organized and robust scaffold[J]. *Cell Reports*, 2015, 13(12): 2781-2793.
- [28] Lippincott-Schwartz J, Patterson G H. Photoactivatable fluorescent proteins for diffraction-limited and super-resolution imaging[J]. *Trends in Cell Biology*, 2009, 19(11): 555-565.
- [29] Bates M, Huang B, Dempsey G T, *et al.* Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes [J]. *Science*, 2007, 317(5845): 1749-1753.
- [30] Bates M, Dempsey G T, Chen K H, *et al.* Multicolor super-resolution fluorescence imaging via multi-parameter fluorophore detection[J]. *Chem Phys Chem*, 2012, 13(1): 99-107.
- [31] Lubeck E, Cai L. Single-cell systems biology by super-resolution imaging and combinatorial labeling [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 743-748.
- [32] Dani A, Huang B, Bergan J, *et al.* Superresolution imaging of chemical synapses in the brain[J]. *Neuron*, 2010, 68(5): 843-856.
- [33] Tam J, Cordier G A, Borbely J S, *et al.* Cross-talk-free multi-color STORM imaging using a single fluorophore[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101772.
- [34] Bossi M, Fölling J, Belov V N, *et al.* Multicolor far-field fluorescence nanoscopy through isolated detection of distinct molecular species[J]. *Nano Letters*, 2008, 8(8): 2463-2468.
- [35] Kim D, Curthoys N M, Parent M T, *et al.* Bleed-through correction for rendering and correlation analysis in multi-colour localization microscopy[J]. *Journal of Optics*, 2013, 15(9): 094011.
- [36] Baddeley D, Crossman D, Rossberger S, *et al.* 4D super-resolution microscopy with conventional fluorophores and single wavelength excitation in optically thick cells and tissues[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e20645.
- [37] Lampe A, Haucke V, Sigrist S J, *et al.* Multi-colour direct STORM with red emitting carbocyanines[J]. *Biology of the Cell*, 2012, 104(4): 229-237.
- [38] Gunewardene M S, Subach F V, Gould T J, *et al.* Superresolution imaging of multiple fluorescent proteins with highly overlapping emission spectra in living cells[J]. *Biophysical Journal*, 2011, 101(6): 1522-1528.
- [39] Testa I, Wurm C A, Medda R, *et al.* Multicolor fluorescence nanoscopy in fixed and living cells by exciting conventional fluorophores with a single wavelength[J]. *Biophysical Journal*, 2010, 99(8): 2686-2694.
- [40] Zhang Z, Kenny S J, Hauser M, *et al.* Ultrahigh-throughput single-molecule spectroscopy and spectrally resolved super-resolution microscopy[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(10): 935-938.
- [41] Młodzianowski M J, Curthoys N M, Gunewardene M S, *et al.* Super-resolution imaging of molecular emission spectra and single molecule spectral fluctuations[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0147506.
- [42] Dong B, Almossalha L, Urban B E, *et al.* Super-resolution spectroscopic microscopy via photon localization[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12290.
- [43] Shechtman Y, Weiss L E, Backer A S, *et al.* Multicolour localization microscopy by point-spread-function engineering [J]. *Nature Photonics*, 2016, 10: 590-595.
- [44] 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[C]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(9): 2995-2999.
- [45] 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.
- [46] 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.
- [47] Allen J R, Ross S T, Davidson M W. Sample preparation for single molecule localization microscopy[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2013, 15(43): 18771-18783.
- [48] Whelan D R, Bell T D. Image artifacts in single molecule localization microscopy: why optimization of sample preparation protocols matters[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 7924.