

引用格式: AN Sha, DAN Dan, YU Xiang-hua, *et al.* Progress and Prospect of Research on Single-molecule Localization Super-resolution Microscopy(Invited Review)[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2020, **49**(9):0918001

安莎, 但旦, 于湘华, 等. 单分子定位超分辨显微成像技术研究进展及展望(特邀综述)[J]. 光子学报, 2020, **49**(9):0918001

单分子定位超分辨显微成像技术研究 进展及展望(特邀综述)

安莎^{1,2}, 但旦¹, 于湘华¹, 彭彤^{1,2}, 姚保利^{1,2}

(1 中国科学院西安光学精密机械研究所 瞬态光学与光子技术国家重点实验室, 西安 710119)

(2 中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要:随着新型荧光探针、先进激光、高灵敏光电探测器等相关领域的不断发展,突破衍射极限的超分辨光学显微技术为现代生物医学研究提供了新的有力工具,其中的单分子定位技术利用荧光分子的光开关效应,实现了亚细胞结构的纳米精度超分辨成像.本文介绍了单分子定位超分辨显微技术的基本原理与实现,例举了其在细胞生物学、组织生物学以及神经科学等方面的应用,讨论了该技术目前的发展趋势及可能的改进方向,为相关领域科学研究提供参考.超分辨光学显微技术的不断创新将推动生命科学的新发展.

关键词:光学显微; 荧光显微; 超分辨显微; 单分子定位; 生物成像

中图分类号: O439

文献标识码: A

doi:10.3788/gzxb20204909.0918001

Progress and Prospect of Research on Single-molecule Localization Super-resolution Microscopy(Invited Review)

AN Sha^{1,2}, DAN Dan¹, YU Xiang-hua¹, PENG Tong^{1,2}, YAO Bao-li^{1,2}

(1 State Key Laboratory of Transient Optics and Photonics, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Xi'an 710119, China)

(2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Super-resolution optical microscopy breaks through the diffraction limit and becomes a powerful tool for the modern biomedical research with the development of novel fluorescence probes, advanced lasers, high sensitivity photodetectors, etc. Single-molecule Localization Microscopy (SMLM), as one of the super-resolution technologies, can resolve the subcellular structures in nanoscale by using the photoswitching effect of certain fluorescence probes. In this paper, the principle and implementation of SMLM are introduced, the applications in the fields of cytobiology, tissue biology and neuroscience are presented, furthermore, the development trends and the further investigated directions of this technique are discussed, providing references for the relevant research fields. The continuous innovation of super-resolution microscopy will promote the development of life science.

Key words: Optical microscopy; Fluorescence microscopy; Super-resolution microscopy; Single-molecule localization; Biological imaging

OCIS Codes: 180.2520; 170.0180; 170.2520; 110.0180

基金项目: 国家自然科学基金(Nos. 81427802, 91750106, 11704405)

第一作者: 安莎(1991—), 女, 博士研究生, 主要研究方向为超分辨光学显微成像、光学微操纵. Email: ansha@opt.cn

导师(通讯作者): 姚保利(1968—), 男, 研究员, 博士, 主要研究方向为超分辨光学显微、三维光学显微、数字全息显微、光学微操纵、光场调控等. Email: yaobl@opt.ac.cn

收稿日期: 2020-06-04; 录用日期: 2020-08-06

<http://www.photon.ac.cn>

0 引言

在人类探索微观世界的进程中,光学显微技术扮演着至关重要的角色.相对于原子力显微镜^[1]、电子显微镜^[2,3]等成像手段,光学显微镜凭借其非接触性、对样品损伤小、丰富的成像机制等优点,已成为生物医学领域中必不可少的研究工具^[4-6].然而,早在19世纪末,德国物理学家阿贝(Abbe)就指出:光学显微镜的分辨率极限与光波长成正比,与显微物镜的数值孔径(Numerical Aperture, NA)成反比^[7].对于传统光学显微镜而言,其横向分辨率极限只能达到200 nm左右,轴向分辨率极限约为500 nm左右,这阻碍了人们对于亚细胞结构的进一步探索和研究.

自20世纪90年代以来,随着新型荧光探针、先进激光、高灵敏光电探测器等相关领域的不断发展,科学家们提出了多种突破光学衍射极限的超分辨显微成像方法^[8-10].按成像原理的不同,这些超分辨成像方法大致可以分为两大类,即物理超分辨(基于纯物理原理的超分辨成像)和化学超分辨(基于光与物质分子相互作用的超分辨成像).物理超分辨要求被测样品不做特殊化学处理和标记,而化学超分辨则正是利用对样品的特殊标记来实现超分辨成像.物理超分辨经过一百多年的努力虽然取得了一些进展,如近场显微成像^[11,12]、矢量光场显微成像^[13-15]、量子显微成像^[16-18]等,但由于探测距离、成像速度、分辨率等因素,实际应用很有限.而化学超分辨近几十年来发展十分迅猛,基于光与物质分子相互作用的各种光学效应对比度机制的显微成像方法层出不穷,其中荧光标记成像为突破光学衍射极限打开了一扇大门.2014年诺贝尔化学奖授予了在超分辨荧光显微方面做出突出贡献的三位科学家 BETZIG E、STEFAN W H 和 MOERNER W E,表彰他们把光学显微技术带入了纳米尺度,由此可见超分辨荧光显微技术在现代生命科学领域中的重要性.目前超分辨荧光显微主要分为三大主流技术:第一类是基于点扩散函数(Point Spread Function, PSF)压缩的激光扫描成像方法,代表性技术是受激发射损耗(Stimulated Emission Depletion, STED)显微^[19,20];第二类是基于空间频谱扩展的宽场成像方法,代表性技术是结构光照明显微(Structured Illumination Microscopy, SIM)^[21-25];第三类是基于单分子定位的显微成像方法(Single-Molecule Localization Microscopy, SMLM),代表性技术是光激活定位显微(Photo-Activation Localization Microscopy, PALM)^[26]和随机光学重建显微(Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM)^[27]以及由此衍生出的其它技术^[28-30].三类技术在成像空间分辨率、成像速度、对生物样品的光损伤等方面各有优缺点.SMLM技术的空间分辨率高,但成像速度较慢,且需要特殊的荧光分子标记;SIM技术的成像速度快,但分辨率提升较低;STED技术在分辨率和速度上都表现比较好,但缺点是对样品的光损伤较大.

本文主要讨论单分子定位超分辨显微成像技术.它利用特殊荧光分子探针的光开关效应,采集并定位大量时空分离的单分子荧光信号,通过荧光分子的坐标信息重建出样品的超分辨图像.根据单分子的定位精度,分辨率可以达到几个纳米^[31-33],远突破衍射极限,可以揭示纳米尺度下的亚细胞细节.本文将详细说明SMLM的超分辨成像原理与实现,包括荧光分子的光开关效应、单分子定位原理、常用的定位算法、光学照明系统以及探测器等,并例举SMLM在细胞生物学、组织生物学和神经科学等领域的应用,讨论SMLM技术的发展趋势及未来可能的改进方向.

1 单分子定位超分辨显微成像原理

1.1 荧光分子的光开关效应

在SMLM技术中,荧光分子探针的光开关效应是实现超分辨成像的基础.目前常用的荧光探针包括荧光蛋白^[34]、荧光染料^[35]和荧光量子点^[36]等.单个荧光分子持续发光时,发光强度会出现随机涨落现象,称之为荧光闪烁.在传统的荧光显微技术中,研究的重点是如何抑制闪烁这一不利因素以获得持续的荧光发射.然而,在SMLM技术中,需要通过改变外部条件有效控制荧光闪烁特性,使得荧光分子在荧光态(ON/开)和非荧光态(OFF/关)之间转换,利用这种光开关特性实现荧光分子的稀疏激发.

荧光蛋白的光开关机制^[37]可以分为三类,如图1所示.第一类光激活荧光蛋白在特定波长光的作用下从非激活状态转变为可发射荧光的激活状态;第二类光转化荧光蛋白在特定波长光的作用下发射光谱频移;前两类都属于不可逆过程.第三类光开关荧光蛋白在两束特定波长光的交替作用下,能够在荧光态和非荧光态之间发生可逆转换.常用的荧光蛋白有PA-GFP、EosFP、DronPa等.荧光染料分子的光开关机制^[38]主要包括

三线态、负电激子态、顺反异构等可逆转换,常用的荧光染料有 Alexa 系列、Atto 系列、Cy 系列等.荧光量子点的闪烁机制^[39]普遍认为由非辐射俄歇复合(Auger Recombination)、俄歇电离作用(Auger Ionization)、直接隧穿效应和热激发等多种因素造成,其发射谱可通过改变量子点的尺寸和成分加以调节.随着研究者对各种荧光探针开关机制的不断探索,荧光分子处于荧光态和非荧光态的持续时间可以通过改变其自身结构、外部微环境等因素得到有效控制,从而实现有利于 SMLM 的荧光信号分布密度.

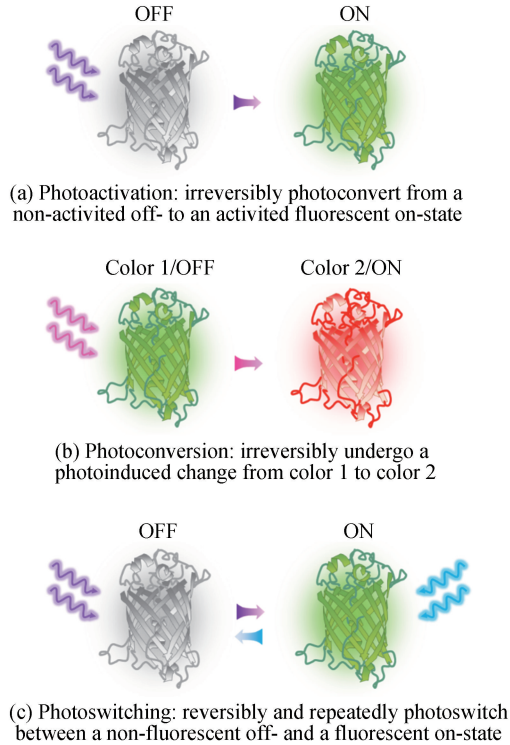


图 1 荧光蛋白的几种光开关机制示意图

Fig.1 Schematic diagram of various photoswitching modes of fluorescence proteins

1.2 单分子定位原理

根据阿贝衍射理论^[40],理想的点光源经光学成像系统后,在焦平面上会弥散成一个光斑(艾里斑),即系统的点扩散函数(PSF),其大小可以用半高全宽(Full Width at Half Maximum, FWHM)来表示.系统可分辨的两个物点之间的最小距离,即光学系统的极限分辨率,等于 PSF 的 FWHM,可由公式 $\Delta_{x,y} = \lambda / (2n \sin \alpha) = \lambda / (2NA)$ 计算,其中 λ 为波长, n 为介质折射率, α 为物镜的半孔径角, $NA = n \sin \alpha$ 为物镜的数值孔径;沿光传播方向的轴向分辨率计算公式为 $\Delta_z = 2\lambda / NA^2$.

单分子定位技术使用特定的荧光分子探针标记样品,通过改变分子所处的外部环境有效控制其光开关特性,将空间上重叠的多分子荧光图像在时间上分离为一系列子图像,使得每一帧子图像中只有少量稀疏分布的单分子发射荧光,即每个衍射极限范围内只有一个荧光分子被激发.采集成千上万帧荧光信号随机分布的图像,利用单分子定位算法精确定位每个分子的中心位置.最后,将所有获得的定位点进行叠加,重建出一幅突破衍射极限的超分辨图像,原理如图 2 所示.假设探测到的单个荧光分子所发射的光子数为 N ,定位该分子视为对其位置进行了 N 次测量,每次测量的不确定性由系统的 PSF 尺寸决定.一般系统 PSF 近似呈高斯分布,对应的高斯函数标准差 s 与 PSF 尺寸 FWHM 满足关系 $FWHM = 2\sqrt{2 \ln 2} s \approx 2.355s$.定位精度由公式 $\sigma_{loc} \approx s / \sqrt{N}$ 来估算,对应分辨率 $\Delta \approx FWHM / \sqrt{N} \approx 2.355\sigma_{loc}$.由此可见, SMLM 的定位精度与系统 PSF 尺寸成正比,与单个荧光分子所发射的光子数成反比.

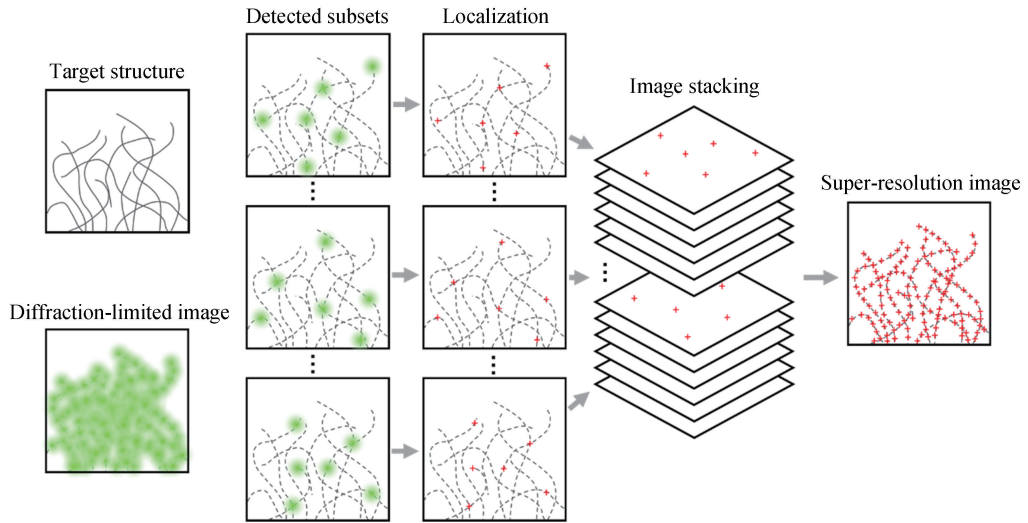
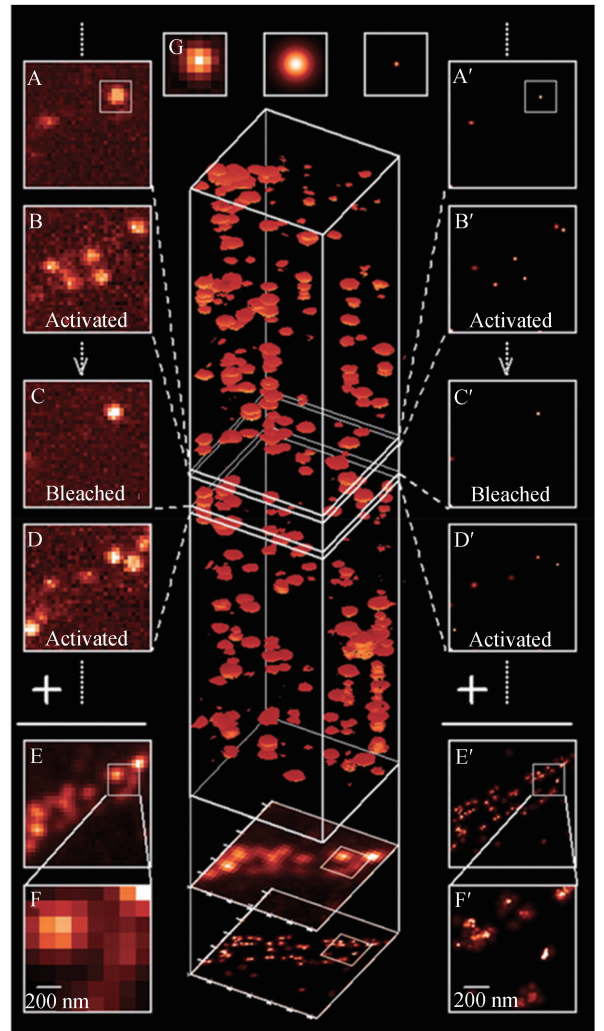


图2 单分子定位原理示意图

Fig.2 Schematic diagram of single-molecule localization

早在 1995 年^[41], BETZIG E 就提出了利用单分子定位技术提高空间分辨率的概念, 并于 2006 年^[26] 基于该理论首次开发出了利用光激活荧光蛋白的光开关特性实现超分辨的 PALM 技术, 基本原理如图 3 所示. 利用光激活绿色荧光蛋白(PA-GFP) 标记样品, 此类荧光蛋白在未被激活前, 激发时不发光或发微弱荧光. 加载样品后, 采用 405 nm 激活光以低能量脉冲方式照射目标区域, 从而激活稀疏分布的少量荧光分子, 之后切换 561 nm 激发光连续照射, 此时只有那些之前被激活的荧光分子发射荧光, 即处于 ON 态(图 3 B, D), 而其它未被激活的分子则处于不发光的 OFF 态, 采集并定位这些单分子位置, 直至这些发光分子被漂白, 在下次循环中不会再被激活(图 3 A, C). 多次重复该“激活-激发-定位-漂白”过程, 最终将所有定位点叠加后重构出目标结构的超分辨图像(图 3 E', F').

庄小威等^[27] 提出的基于单分子定位的 STORM 技术, 其原理(如图 4 所示)与 PALM 十分相似, 主要区别在于所使用的荧光分子探针不同. STORM 使用光转换荧光染料(Cy3-Cy5 分子对) 标记样品, 通过交替使用 633 nm 的红光和 532 nm 的绿光实现荧光分子 Cy5 的 ON-OFF 态转换, 具体过程如图 4(a)所示. 首先利用高强度 633 nm 红光持续照射样品, 在此过程中 Cy5 分子被激发至 ON 态并迅速变为 OFF 态, 此时利用低强度 532 nm 绿光照射, 使少部分随机分布的 Cy5 分子恢复至 ON 态, 然后切换 633 nm 红光照射, 使得这些 Cy5 分子发射荧光并转换为 OFF 态, 采集并定位这些单分子信号, 不断重复该过程直至大部分荧光分子被漂白. 在此过程中, 激活分子 Cy3 可以加速荧光分子 Cy5 从 OFF 态到 ON 态转换的响应时间.

图3 PALM 的基本原理^[26]Fig.3 Principle of PALM^[26]

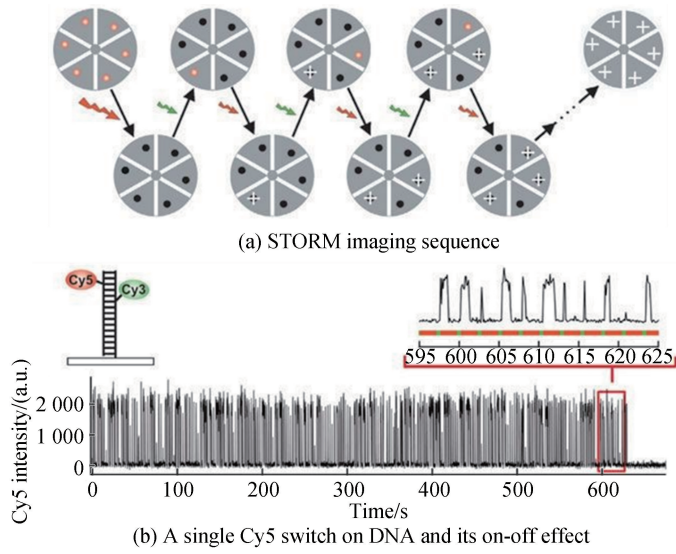


图 4 STORM 的基本原理^[27]

Fig.4 Principle of STORM with photo-switchable fluorophores^[27]

此外,采用 SMLM 可以实现多色成像,其先决条件是,不同光开关荧光探针在激发光、发射光或激活光波长上有明显区分,如花青素染料 Cy5、Cy5.5、Cy7 等作为荧光分子,Alexa Fluor 405、Cy2、Cy3 等作为激活分子,两者组合配对后即可形成多种符合要求的光开关荧光探针.采用不同荧光探针标记样品的不同目标组分,即可实现多色成像^[42-45].2007 年,MARK B W 等^[46]以此为基础发展出了多色 STORM,并成功实现了 DNA 样品的三色成像以及 BS-C-1 细胞的双色成像,分辨率达到 20~30 nm.同年,SHROFF H 等^[47]将内源表达的光激活荧光蛋白 Dronpa/EosFP 和 PS-CFP2/EosFP 应用到 PALM 技术中,实现了 HFF-1 细胞中相关蛋白结构的双色超分辨成像.

2008 年,庄小威课题组^[48]将传统的横平面(xy)单分子定位技术扩展至轴向(z),利用光学像散实现了三维空间上的超分辨成像,该技术被称为 Three-dimensional STORM(3D STORM).如图 5(a)所示,3D STORM 在传统的荧光显微成像光路中插入一个焦距 1 m 的长焦柱面镜,使得荧光分子在 x 和 y 方向上的焦平面不同,因此探测到的单分子荧光图像为椭圆状的弥散斑,只有当分子处于两个焦平面中间的位置时($z=0$),成像所得的弥散斑才呈圆形.弥散斑的椭圆率与角度由荧光分子的轴向位置决定,通过二维椭圆高斯函数拟合可计算出光斑在 xy 平面的中心位置以及不同方向的尺寸 w_x 和 w_y ,根据如图 5(b)所示的校准曲线,即可获得相应荧光分子的轴向信息 z .该 3D STORM 技术能够同时定位单个分子的横向及轴向坐标,无需扫描即可获得具有纳米精度的三维图像,已经实现的横向分辨率约为 20~30 nm,轴向分辨率约为

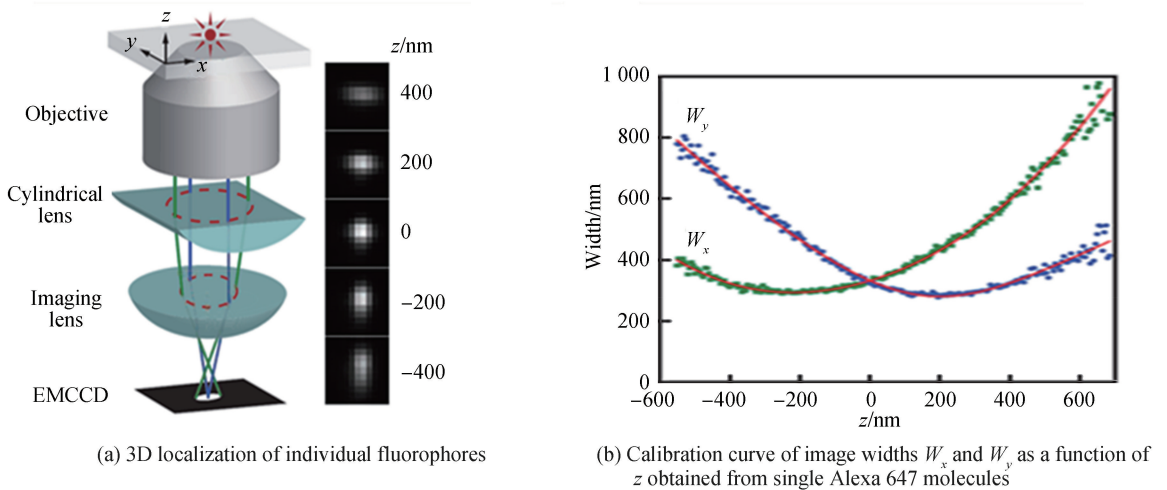


图 5 3D STORM 的基本原理^[48]

Fig.5 Principle of 3D STORM^[48]

50~60 nm, 成像深度约为 600 nm. 除上面所述的柱面镜像散外, 实现三维超分辨成像的方法还有双螺旋点扩散函数^[49]、自弯曲点扩散函数^[50]、双焦面探测^[51]和荧光干涉^[52]等.

1.3 几种典型的单分子定位超分辨显微技术

目前普遍使用的 direct STORM(dSTORM)技术^[30]由 STORM 进一步发展而来, 区别在于不需要使用专门设计的荧光探针, 所采用的荧光染料分子无需额外的激活分子辅助即可直接实现 ON-OFF 态转换. 采用荧光量子点标记样品的 Quantum dot STORM(QSTORM)技术^[53], 利用量子点发射光谱的随机性蓝移实现光开关特性, 从而得到 SMLM 所需要的荧光信号的稀疏分布, 荧光量子点良好的耐光性和发光强度有利于进一步提高 SMLM 的空间分辨率.

近年来发展的 DNA-Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography (DNA-PAINT) 技术^[54-56], 主要依赖两条互补的短 DNA 单链之间的可重复瞬时结合产生荧光开关现象, 其中一类 DNA 单链标记于目标分子上, 另一类与之互补的 DNA 单链结合荧光染料存在于成像缓冲液中. 较传统的荧光分子开关特性而言, DNA-PAINT 可通过控制单链长度、缓冲液各组分浓度等因素调节其荧光态持续时间, 且溶液中大量存在的荧光染料使得 DNA-PAINT 几乎不存在漂白问题, 从而能够获得足够亮足够多的有效单分子荧光信号, 以此形成高质量的超分辨图像. 2014 年, JUNG MANN R 等^[57]基于 DNA 分子的可编辑性, 提出了多目标成像的 Exchange-PAINT 技术, 以此实现了十种 DNA 折纸结构的依次成像, 分辨率小于 10 nm, 同时在 HeLa 细胞中实现了微管、线粒体、高尔基体和过氧化物酶体四种结构的二维成像以及其中三种结构的三维成像. 如图 6 所示, 采用多种不同的 DNA 序列 P1、P2、...、P_n 分别标记样品的不同目标组分, 成像每种目标时, 加入与之对应的缓冲液(包含互补 DNA 单链), 单分子信号采集结束后, 清洗样品并加入下一目标对应的缓冲液, 依次重复该过程, 直至所有目标成像完成. 缓冲液中的互补 DNA 单链 P1*、P2*、...、P_n* 均联结同一种荧光分子, 整个实验过程中亦采用同一激发光源, 因此, 一般采用 Exchange-PAINT 技术实现多目标成像时的发射光通道相同, 重建图像时则无需进行色差校正.

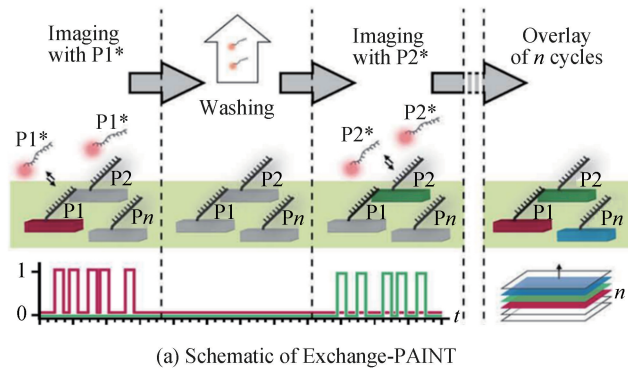


图 6 Exchange-PAINT 原理示意图及超分辨实验结果^[57]

Fig.6 Schematic of Exchange-PAINT and super-resolution results^[57]

2017 年, HELL S W 团队^[58]创造性地将环形光束用于 SMLM 照明, 提出了以最小光流为检测目标, 拥有~1 nm 定位精度的 MINFLUX 技术, 该技术成功将光学显微镜从“显微”带到了“显纳”水平. 表 1 从分辨率、荧光探针等方面对比了几种典型的 SMLM 技术的性能指标.

表 1 几种典型的 SMLM 技术的性能对比
Table 1 Comparison of several SMLM methods

SMLM method	Resolution	Fluorophores	Detected photon counts	References
PALM/FPALM	~10~80 nm	Photoactivatable fluorescent proteins	Low (several hundred)	[26],[28]
STORM/dSTORM	~20~50 nm	Photoswitchable organic dyes	Medium (several thousand)	[27],[30]
QSTORM	~24 nm	Quantum dots	High (several thousand)	[53]
DNA-PAINT	~5 nm	Any single-molecule-compatible dye	Extremely high (hundreds of thousands)	[54],[55],[56]
MINFLUX	~2 nm	Any single-molecule-compatible dye	Low (zero to several hundred)	[58],[59],[60]

同样采用中心光强为 0 的环形光束,STED 用来擦除荧光以在小于衍射极限的中心区域获得高强度信号,而 MINFLUX 则用来激发荧光.当环形光束中心位置与目标分子完全重合时,无荧光发射,而当两者之间存在微小位移时,目标分子发射荧光,荧光强度与两者之间的位置不匹配有关,在已知环形光束位置的前提下,探测到的荧光强度就可以揭示目标分子位置,并且两者位移越小,精确定位所需的光子数越少.如图 7(a)所示,二维 MINFLUX 理论上最少需要将环形光束移动三个位置(r_1, r_2, r_3)即可定位单分子,这里在中间额外增加一个位置 r_0 来消除定位的不确定性,此外,如图 7(b)所示,缩小光束移动范围 L 能够有效提高定位精度.实验上,如图 7(c)所示,MINFLUX 成功分辨出间隔 6 nm 的 DNA 折纸结构,并实现了对活体大肠杆菌内单个 30S 核糖体亚基蛋白的跟踪成像,空间分辨率小于 48 nm,时间分辨率达到 125 μ s.随后,2018 年,该团队采用 MINFLUX 技术^[59]实现了定位精度 2.4 nm、时间分辨率 400 μ s 的快速单分子追踪.2019 年,采用 MINFLUX 技术^[60]实现了 U2OS 固定细胞和活体细胞中核孔复合物 Nup96 的超分辨成像,定位精度达到~2 nm,并开发出具有各向同性分辨能力(2~3 nm)的 3D MINFLUX,以此分别实现了 Nup96 和 PSD-95 两种蛋白结构的三维超分辨纳米成像,以及 WGA 和 Nup96 的双色三维超分辨纳米成像.

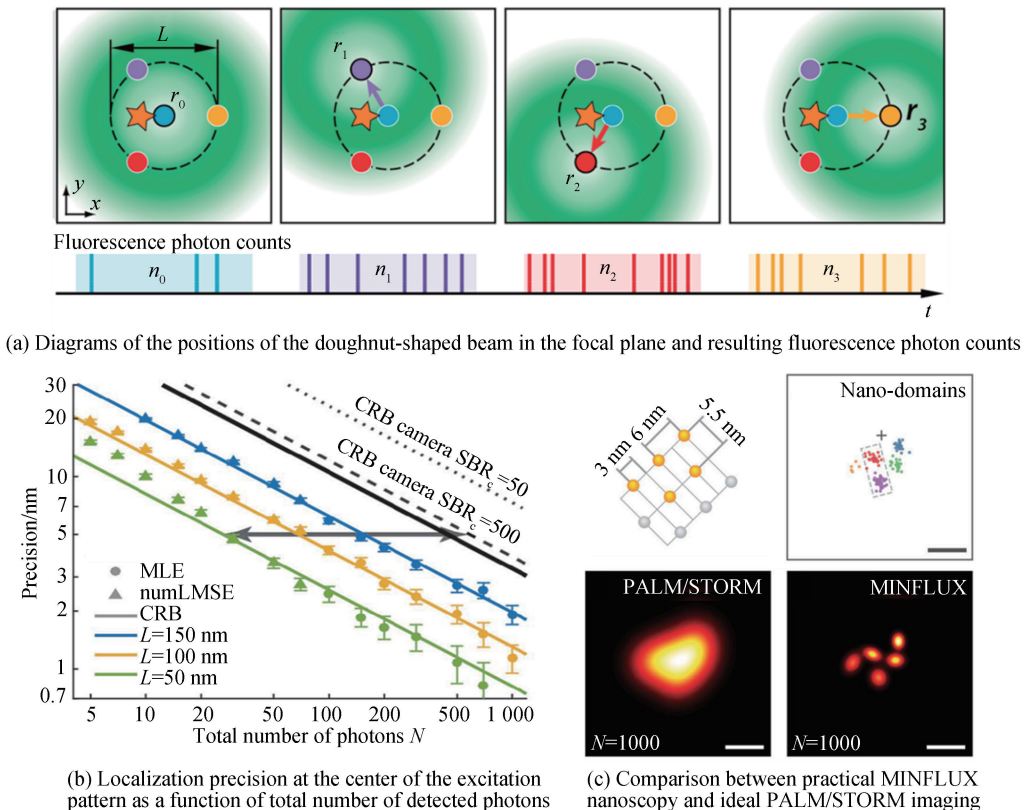


图 7 二维 MINFLUX 超分辨显微成像^[58]

Fig.7 Imaging implementation of 2D MINFLUX super-resolution nanoscopy^[58]

2 单分子定位超分辨显微成像技术的实现

2.1 单分子定位算法

在实现 SMLM 过程中,利用荧光分子的光开关特性获得分子的稀疏分布后,需要通过单分子定位算法确定探测到的发光分子的位置,常用的定位算法包括质心法^[61-64]、高斯拟合^[27,65]、最大似然估计^[66-68]、压缩感知^[69,70]等。

质心法^[61]以单分子荧光图像强度为基准通过加权平均的方法获得分子的空间位置 C_x, C_y , 其计算表达式分别为

$$\begin{aligned} C_x &= \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (x_i I_{i,j})}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (I_{i,j})} \\ C_y &= \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (y_j I_{i,j})}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (I_{i,j})} \end{aligned} \quad (1)$$

式中, x_i, y_j 表示像素 (i, j) 在不同方向上的坐标, $I_{i,j}$ 表示荧光图像在该像素位置的光强, m, n 表示计算所提取的图像区域(覆盖 PSF)大小。质心法针对稀疏分布的单分子图像简单有效,但受背景噪声和计算区域选取的影响较大,导致定位精度较差,所以一般还需要与其它降噪算法配合使用,如 BERGLUND A J 等^[62]开发的 VWCM 算法,以前一次质心法确定的荧光分子位置作为参考点来提取新的计算区域,通过不断迭代消除背景噪声。HENRIQUES R 等^[63]开发出的 QuickPALM 算法,将高斯差分降噪算法与质心法相结合来提高定位精度。

高斯拟合^[65]是目前 SMLM 应用最广泛的一种定位方法,对于常规显微镜而言,单分子荧光图像强度分布可近似由一个二维高斯函数表示为

$$I_p(x, y) = I_0 \exp\left[-\frac{(x-x_0)^2}{2s_x^2} - \frac{(y-y_0)^2}{2s_y^2}\right] + b \quad (2)$$

式中, I_0 为 PSF 峰值强度, (x_0, y_0) 为单分子位置坐标, s_x 和 s_y 分别代表 PSF 在 x 和 y 方向上的标准差, b 为背景光强。通过二维高斯函数最小二乘法(Least Squares)^[26,27]拟合单分子荧光图像,采用迭代逼近的办法即可求得分子位置,其定位精度受多个因素限制,包括光子散粒噪声(Photon Shot Noise)、像素化噪声(Pixelation Noise)、背景噪声(Background Noise,如探测器读出噪声、暗电流噪声、离焦荧光信号等)等,可表示为

$$\sigma_{\text{loc}} = \sqrt{\frac{s^2 + a^2/12}{N} + \frac{8\pi s^4 \sigma_b^2}{a^2 N^2}} \quad (3)$$

式中, s 为衍射受限系统 PSF 的标准差, a 为探测器有效像元尺寸, N 为探测到的单个荧光分子所发射的光子数, σ_b 为背景噪声。由式(3)可知,单分子定位精度突破了衍射极限的限制,理论上只要探测到的单个荧光分子所发射的光子数足够多,就可以无限提高 SMLM 的空间分辨率。但高斯拟合算法要求所选拟合区域内每次只能定位一个分子,当多个荧光分子图像发生重叠时,定位精度将迅速降低或无法确定分子位置,所以在实际操作中,需要牺牲时间以保证所探测到的单分子图像具有算法可处理的低密度分布特征。

最大似然估计法(Maximum Likelihood Estimation)^[66,67]与高斯拟合法类似,基于 PSF 的二维高斯强度分布,假设像素 (i, j) 处的光子数为 $u_{i,j}(x, y)$, 实际探测到的光子数为 $d_{i,j}$, 对于具有泊松分布特征的荧光分子发射模型,可以通过迭代计算似然函数 $L(\theta | D)$ 的最大值来精确定位分子位置

$$L(\theta | D) = \prod_{i,j} \frac{u_{i,j}(x, y)^{d_{i,j}} e^{-u_{i,j}(x, y)}}{d_{i,j}!} \quad (4)$$

式中, θ 表示需要被估计的参量, D 代表探测到的原始数据。2011 年, HUANG F 等^[68]利用最大似然估计法实现了多分子同时定位,在一定程度上允许单帧图像具有较高分子密度($10 \mu\text{m}^{-2}$),从而提高数据采集速度约一个数量级。

压缩感知^[69],也被称为压缩采样或稀疏采样,在远小于奈奎斯特采样率的条件下,获取和重构具有稀疏性或可压缩性的信号。2012 年, ZHU L 等^[70]首次将压缩感知引入到定位算法中,该方法将原始图像像素分割成尺寸更小的网格以增加位置变量,用来估计分子位置的目标函数为其 L1 范数,计算模型为

$$\min \| \mathbf{x} \|_1, \text{subject to } \| \mathbf{Ax} - \mathbf{B} \|_2 \leq \epsilon \cdot \left(\sum \mathbf{B}_j \right)^{1/2} \quad (5)$$

式中, \mathbf{x} 表示亚像素下的荧光分子分布, \mathbf{A} 表示系统 PSF, \mathbf{B} 表示采集到的衍射受限图像, \mathbf{B}_j 表示分割后的子图像, ϵ 表示光子散粒噪声. 该方法能够同时定位相互重叠的多个荧光分子, 实现了高密度的分子定位, 但要求高密度采集的荧光信号在亚像素级别仍然满足稀疏分布的条件, 与高斯拟合定位算法相比, 其单帧图像分子定位密度可提高一到两个数量级, 从而可以减少采集帧数, 提高时间分辨率, 有利于快速活细胞成像.

此外, 具有高密度分子定位能力的算法还有 DAOSTORM 算法^[71,72]、贝叶斯统计 (SSM-BIC) 算法^[73,74]、快速无偏 (FALCON) 算法^[75]、去卷积 STORM 算法^[76]、Bayesian analysis of the Blinking and Bleaching (3B) 算法^[77,78] 以及中科院计算技术研究所的 FAN X 等^[79] 提出的 SIMBA 算法等.

2.2 单分子定位超分辨显微常用的照明方式

为了获取 SMLM 单分子荧光信号, 探测图像需要保持高的信噪比 (Signal-to-Noise Ratio, SNR). 因此在选择照明方式时, 如何抑制离焦信号的产生以降低背景噪声成为一个重点考虑因素. 目前 SMLM 常用的光学照明方式有全内反射照明 (Total Internal Reflection Fluorescence, TIRF)^[80]、高倾斜光片照明 (High Inclined Laminated Optical sheet, HILO)^[81]、转盘共聚焦 (Spinning Disk Confocal, SDC) 照明^[82-84] 等.

如图 8 所示, 传统的落射式照明 (Epi-illumination) 会激发处于不同深度的荧光分子, 大量离焦信号造成的背景噪声严重影响探测图像的信噪比, 有效荧光信号被淹没在强背景中而无法进行精确定位, 因此不适合应用在 SMLM 成像中. TIRF 照明利用全内反射在样品表面形成倏逝场, 其穿透深度只有几百纳米, 因此背景光强极低, 但只能探测到紧贴盖玻片的荧光信号. HILO 则可以照明更深层的样品, 其倾斜角度越大, 照明区域越深, 但光片厚度也随之增大, 信噪比降低. SDC 即多点同时扫描的共聚焦, 利用配对的微透镜阵列转盘和针孔阵列转盘实现选择平面照明及探测, 具有信噪比高、成像速度快、三维成像等优势. 但 SDC 是落射式照明, 离焦部分的荧光分子仍会被激发, 在一定程度上增加了光漂白, 降低了信噪比. 因此, 在进行 SMLM 成像时, 需要综合考虑样品结构、目标区域、成像速度等多方面因素, 选择合适的照明方式及光学系统设置. 例如, 2017 年, SCHUEDER F 等^[84] 将 SDC 与 DNA-PAINT 技术相结合, 并利用 3D SMLM 实现了全细胞的多目标三维超分辨成像, 横向及轴向分辨率分别达到 20 nm 和 80 nm, 成像深度达到 10 μm .

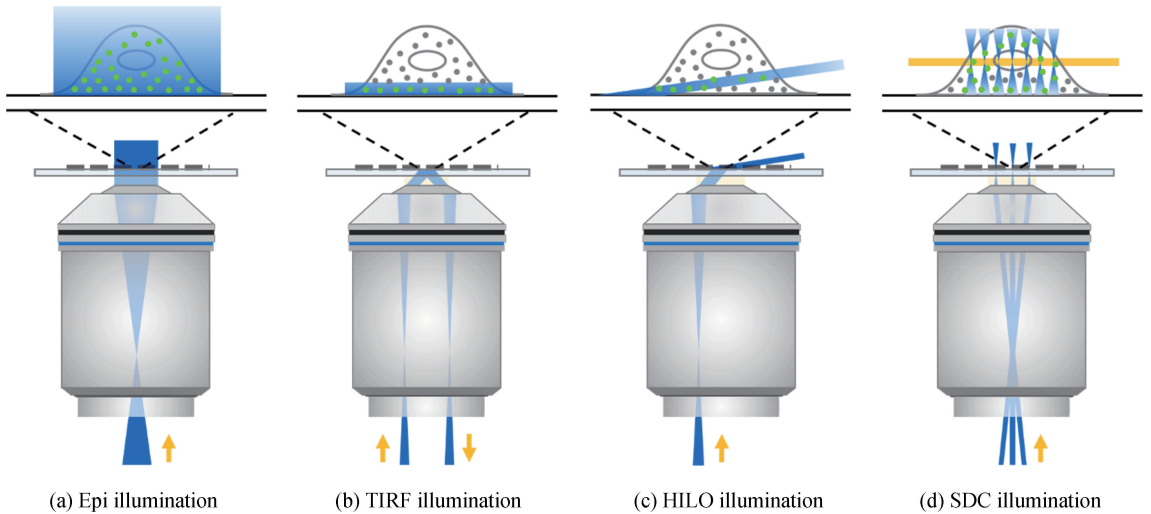


图 8 荧光显微技术常用的几种照明方式

Fig.8 Different illumination modalities of fluorescence microscopy

除上述照明方式外, 受光片荧光显微成像技术 (Light-Sheet Fluorescence Microscopy, LSFM)^[85-89] 启发, 研究者们将光片照明引入到 SMLM 技术中, 具有光学切片功能的光片照明能够有效提高信噪比, 减小光损伤, 便于实现大尺寸和活体生物样品的快速三维成像. 2014 年, CHEN B C 等^[90] 利用二维光学晶格产生的超薄光片 (Lattice Light-Sheet), 在信噪比、光毒性等方面具有比普通光片更优越的性能, 同时还具有无衍射、大视场等优势, 将其与 PALM 技术相结合, 实现了 U2OS 细胞的快速三维超分辨成像, 在 x, y, z 方向上的定位精度分别为 10.4 nm、8.2 nm 和 45.4 nm, 成像尺寸为 51 $\mu\text{m} \times 26 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$. 2019 年, YANG B

等^[91]提出的 eSPIM 系统利用高斯和贝塞尔光片对样品进行斜平面照明,结合共轭的远端成像模块和 STORM 技术,实现了 S2 细胞微管的三维超分辨成像.GALLAND R 等^[92]提出的 soSPIM 技术利用微镜腔将光片反射到垂直于物镜光轴的平面,使得光片照明与信号探测共用一个物镜,分别结合 PALM、STORM、dSTORM 实现了不同样品的超分辨成像,并利用基于像散的三维定位技术重构了 S180 细胞间联结点的三维超分辨图像.

2.3 单分子定位超分辨显微常用的探测器

SMLM 技术所依赖的单分子荧光信号比较微弱,一般单个荧光分子的发光强度在几百至几千个光子之间,且成像光斑覆盖多个像素,此类微弱信号的探测要求探测器具有高灵敏度,以获取超分辨重构所需要的大量稀疏分布的单分子荧光图像,从而保证 SMLM 的成像质量.目前 SMLM 普遍使用的探测器为电子倍增电荷耦合器件(Electron Multiplier Charge-Coupled Device, EMCCD)^[93,94]和科研级互补金属氧化物半导体(Scientific Complementary Metal Oxide Semiconductor, sCMOS)^[95,96].表 2 列举了市场上 SMLM 常用的几种主流弱光探测器的主要技术参数.

表 2 不同型号 EMCCD 和 sCMOS 主要技术参数对比
Table 2 Comparison of main parameters between certain EMCCD and sCMOS

Camera type	Quantum efficiency	Readout noise	Pixel number	Pixel size	Frame rate at full resolution
Andor iXon3 897 EMCCD	>90%	<1 e ⁻	512×512	16 μm×16 μm	35 fps
Andor iXon Ultra 897 EMCCD	>90%	<1 e ⁻	512×512	16 μm×16 μm	56 fps
Hamamatsu Orca-Flash 4.0 LT sCMOS	82%	1.3 e ⁻	2 048×2 048	6.5 μm×6.5 μm	30 fps
Hamamatsu Orca-Flash 4.0 V3 sCMOS	82%	1.0 e ⁻	2 048×2 048	6.5 μm×6.5 μm	100 fps
Photometrics Prime 95B sCMOS	95%	1.6 e ⁻	1 200×1 200	11 μm×11 μm	41 fps
Photometrics Prime BSI sCMOS	95%	1.6 e ⁻	2 048×2 048	6.5 μm×6.5 μm	43.5 fps

典型的 EMCCD(如 Andor iXon 897 系列)量子效率超过 90%,且采用电子倍增技术降低了读出噪声(<1e⁻),因此具有良好的弱光探测能力,特别是在一些极微弱信号探测时,仍然能够保持较高的成像信噪比,所以一直以来深受单分子荧光显微领域研究者的青睐^[26,27].但 SMLM 技术一般需要采集成千上万帧子图像以获得足够多的单分子累积,而 EMCCD 的串行工作方式限制了大量数据的读出速度,该缺陷在很大程度上降低了图像采集速度(512×512 像素,35 帧/秒),制约了其在快速定位成像方面的应用,如活细胞或大样品超分辨成像等.此外,EMCCD 的电子倍增过程还会引入额外噪声^[97],在一定程度上限制了其成像能力.

与 EMCCD 相比,sCMOS 采用并行工作的数据读出方式,具有像阵面大、采集速度快的明显优势.如日本 Hamamatsu 公司的 Orca Flash 4.0 系列 sCMOS 相机,其量子效率超过 80%,快速滚动模式下读出噪声约为 1.0~1.3e⁻,2 048×2 048 全像素图像采集速度最高可达 100 帧/秒,比 EMCCD 快 40 多倍.加拿大 Photometrics 公司的 Prime 系列 sCMOS 相机具有媲美 EMCCD 的超高量子效率,读出噪声约为 1.6 e⁻,2 048×2 048 全像素图像采集速度约为 43.5 帧/秒.由此可见,sCMOS 相机更加适合快速大视场成像^[98],但由于每个像素相当于一个独立的探测单元,因此不同像素的噪声表现不同,导致成像均匀性较差^[99].在单分子荧光显微成像领域,除极微弱信号需要用 EMCCD 探测外,其它情况下 sCMOS 凭借其高灵敏度、高信噪比、快速采集、大视场等优势,逐渐取代了 EMCCD,表现出更广泛的应用价值^[100-102].

3 单分子定位超分辨显微技术的应用

3.1 在细胞生物学中的应用

细胞是生物体基本的结构和功能单位,了解细胞是生物学研究的基础之一.目前,SMLM 技术已经广泛应用于细胞中各种细胞器结构、蛋白质分布以及分子运动过程等方面的研究,为细胞生物学领域提供了一种强有力的显微成像手段^[103-106].HUANG B 等^[107]通过轴向扫描物镜并结合 3D STORM 获得了非洲绿猴肾细胞 BS-C-1 厚度 3 μm 范围内线粒体网络的三维超分辨图像,结果如图 9(a)所示,横向及轴向分辨率分别为 25 nm 和 67 nm,从纳米尺度揭示了全细胞视野下的线粒体形态.BATES M 等^[43]利用多色 STORM 实现了 BS-C-1 细胞中微管与线粒体的双目标超分辨成像,如图 9(b)所示,清晰揭示了两者在细胞内的相互分布关系.SCHUEDER F 等^[84]利用 Exchange-PAINT 技术实现了 HeLa 细胞内线粒体中 TOM20 和 HSP60 两

种蛋白质分子的超分辨成像,如图 9(c)所示的结果表明 TOM20 主要分布于线粒体外膜上,HSP60 主要分布于线粒体基质中.ADHIKARI S 等^[108]使用种类丰富的 BODIPY 探针标记样品,利用 SMLM 分别实现了活体酵母菌细胞及哺乳动物细胞内单脂肪酸类似物及脂质小滴的超分辨成像,分辨率约为 30 nm,展示了细胞处于喂养状态和饥饿状态下脂肪酸的空间分布情况,揭示了细胞根据自身新陈代谢与能量需求及时调节脂肪酸分配的生命行为.与其它超分辨技术相比,SMLM 实验装置简单,易于操作,尤其在生物样品成像方面,采用 SMLM 技术能够获得更高的空间分辨率.此外,凭借日益丰富的光开关荧光探针种类和标记手段,以及更加先进的高密度定位算法等,SMLM 在多色成像、活细胞成像方面也表现出了优异的性能.

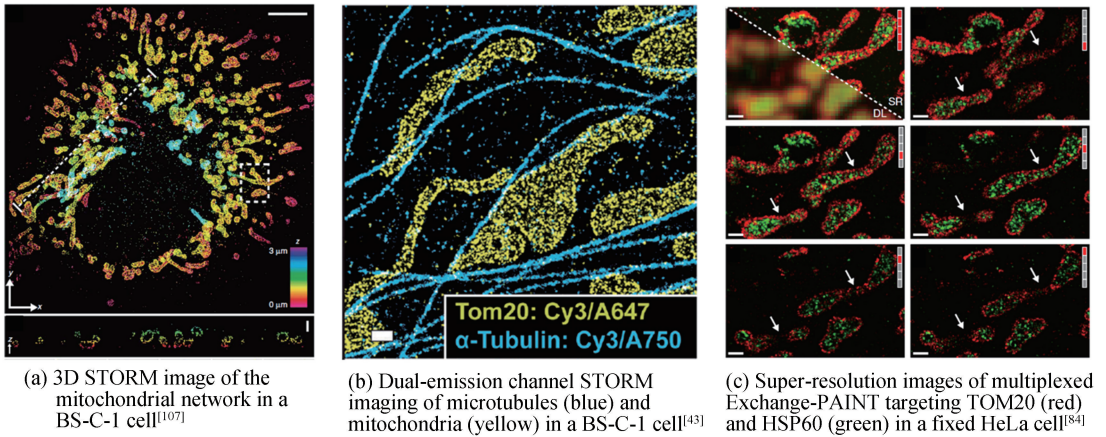


图 9 单分子定位显微技术在细胞生物学中的应用
Fig.9 Applications of SMLM in cytobiology

2020 年,我们开发出了针对样品轴向信息获取的轴平面 SMLM 系统^[109],并以此实现了成纤维细胞 COS-7 全细胞厚度(约 8 μm)下不同细胞器结构以及更大尺寸(厚度约 20 μm)的肿瘤细胞 GBM10 内核孔分布的轴平面超分辨成像,针对免疫标记的生物样品,实验测量的系统平均横向分辨能力约为 80 nm,轴向分辨能力约为 100 nm.图 10(a)分别为 COS-7 细胞中微管(上)、线粒体(中)、核孔复合物(下)在某一轴向截面上的衍射受限图像与超分辨图像的对比结果,图 10(b)展示了两个 GBM10 细胞的轴向核孔分布,轴向厚度

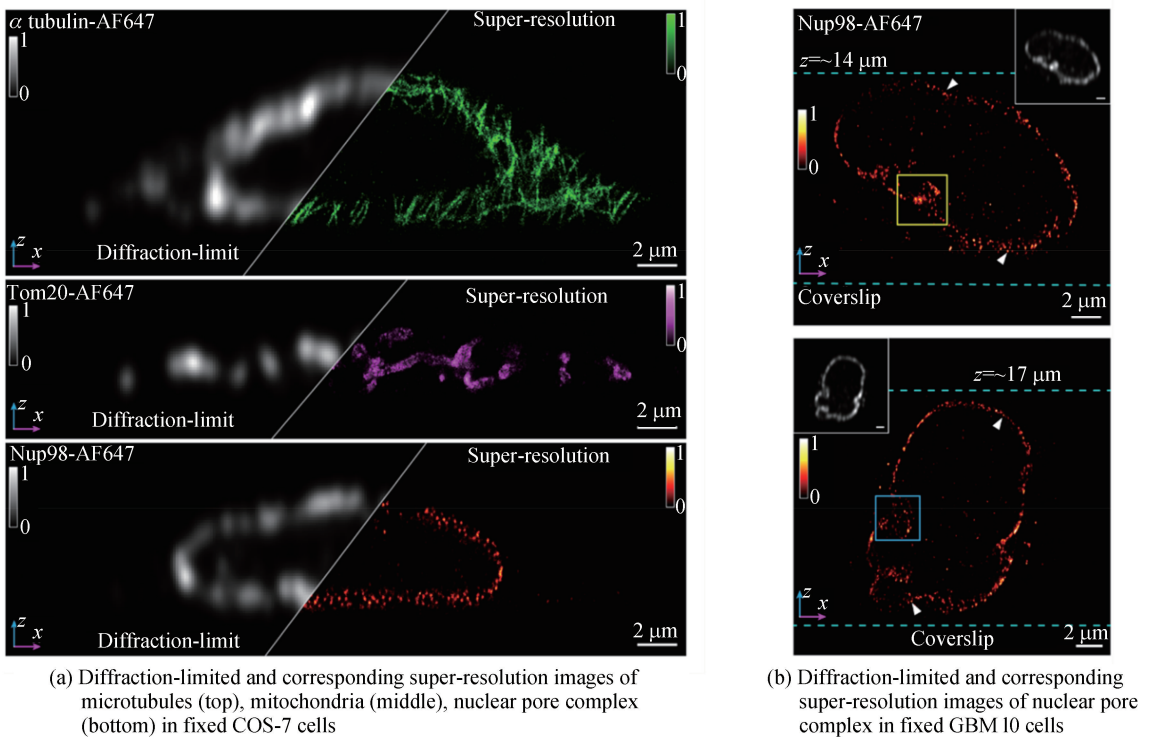


图 10 不同细胞器结构的轴平面衍射受限图像与超分辨图像对比结果^[109]

Fig.10 Comparison of axial plane diffraction-limited and corresponding super-resolution images of different targets^[109]

分别为 $14\ \mu\text{m}$ 和 $17\ \mu\text{m}$. 这些结果揭示了亚细胞结构在大视场范围内轴向空间的分布情况, 对进一步研究生物组织以及细胞内外生命活动具有重要意义.

3.2 在组织生物学中的应用

组织是介于细胞和器官之间的生物架构, 由许多属于同一器官的形态相似的细胞及细胞间质组成. 人类对器官功能的探索以及对各种疾病的病理研究都建立在充分了解组织的基础之上. 相比于传统的光学显微技术, SMLM 能够从纳米尺度出发, 揭示生物组织内部的超微结构及生命活动^[110,111]. BON P 等^[112] 利用单分子定位技术实现了厚度约 $50\ \mu\text{m}$ 的球状样品内部结构的三维超分辨成像, 实验结果如图 11(a) 所示, 揭示了球状组织中纤维状肌动蛋白的丝状网络结构以及转录因子 OCT4 在人体诱导多能干细胞内的空间分布. XU F 等^[113] 利用单分子定位技术实现了小鼠大脑切片以及软骨组织的三维超分辨成像, 横向分辨率达到 $7\sim 12\ \text{nm}$, 轴向分辨率达到 $21\sim 45\ \text{nm}$, 部分结果如图 11(b) 所示. XU J 等^[114] 将 STORM 技术用于研究病理组织, 在多种肿瘤模型中发现了肿瘤形成之前的早期癌症病变中染色质从高阶折叠结构逐渐松散并破碎的演化过程, 图 11(c) 展示了人类结直肠肿瘤组织中已破坏的异染色质与正常组织中的对比结果, 这些发现有利于癌症早期诊断以及更准确的风险分级, 将促进癌症预防与治疗方法的新发展. 总的来说, SMLM 技术的超高空间分辨率、较低的光场强度(相对于 STED)、高对比度信号以及普遍适用的宽场成像模式, 使其在生物组织等大样品研究领域备受青睐.

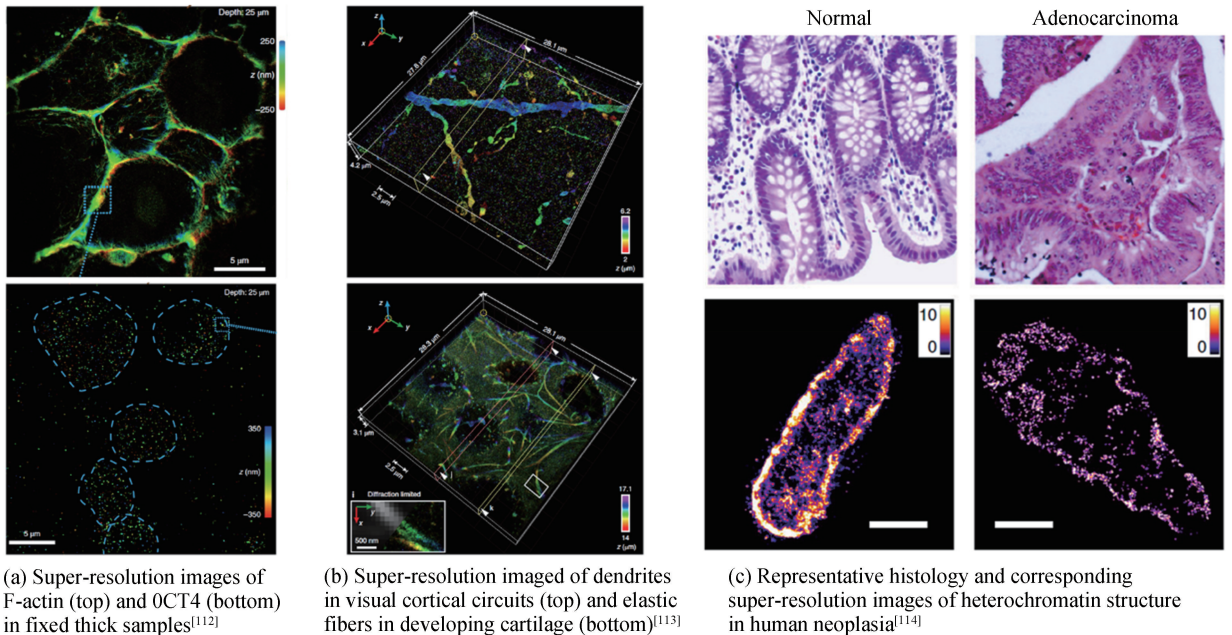


图 11 单分子定位显微技术在组织生物学中的应用

Fig.11 Applications of SMLM in tissue biology

3.3 在神经科学中的应用

神经科学的研究是生命科学领域最复杂的、难度最大的研究, 包括脑科学、遗传学、神经病理学等多个分支, 其中脑科学已经在全球兴起研究热潮, 21 世纪被科学界公认为是脑科学的时代. 在了解大脑中神经元细胞结构、相互之间的连接关系、行为活动模式等方面, 科学家们利用单分子定位超分辨显微技术解决了诸多科学问题^[115,116]. LU C 等^[117] 利用贝塞尔光片扫描显微镜结合单分子定位技术, 实现了 MC3T3-E1 细胞、活体 HeLa 细胞、海马神经元等多种生物样品的快速、大视场、三维超分辨成像, 图 12(a) 展示了大鼠幼仔脑组织中原代培养神经元的网络结构, 清晰显示了细胞体、树突、轴突以及轴突末端等的分布情况. CHU L 等^[118] 利用 SMLM 技术实现了整个成年黑腹果蝇大脑内多巴胺能神经元的超分辨成像, 结果如图 12(b) 所示, 揭示了果蝇大脑中多巴胺神经在椭球体、扇形体以及蕈形体中的分布情况与连接关系. KLEVANSKI M 等^[119] 利用多通道的 dSTORM 技术研究了大鼠脑片神经组织中谷氨酸模型的突触前端杯状结构, 揭示了该结构中 16 种蛋白质目标的分布情况及相互关系, 分辨率达到 $25\ \text{nm}$, 结果如图 12(c) 所示, 该研究得出了肌动蛋

白动态调节神经活动、肌动蛋白与血影蛋白合作实现神经突触功能、肌球蛋白分布与谷氨酸转运体有关等一系列结论,为神经科学领域中复杂生物分子系统的研究提供了一种通用而有效的方法.SMLM 实现超分辨的前提条件十分简单,只需采用具有随机开关能力的荧光分子标记样品即可,因此其实验装置平台具有高度开放性,与其它照明系统、采集系统或探测系统兼容性强.在结合新型光片照明、多通道序列成像等技术手段之后,SMLM 对于研究复杂度高、目标区域大的神经系统具有一定优势.

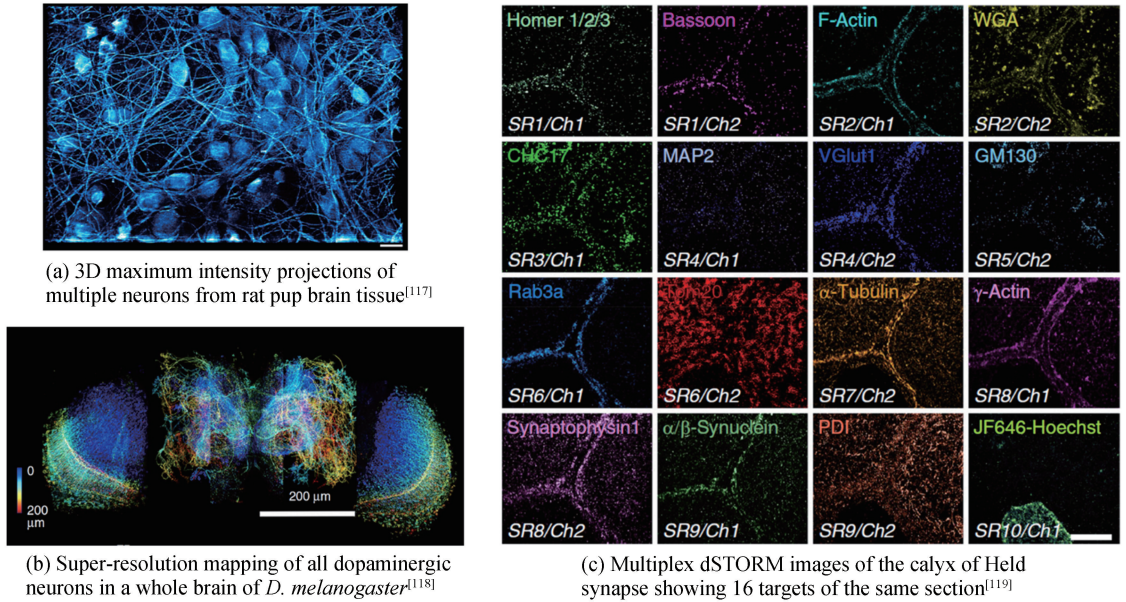


图 12 单分子定位显微技术在神经科学中的应用

Fig.12 Applications of SMLM in neuroscience

4 展望

单分子定位超分辨显微成像技术凭借其超高分辨率、特异性和非侵入性等优点,已被广泛应用于生命科学等领域的研究中,但是,其成像模式及性能还没有达到尽善尽美的状态.近年来,研究者们尝试将 SMLM 技术与其它技术相结合,以各取所长、互补集成的方式,将 SMLM 的分辨率进一步向几个纳米甚至亚纳米尺度推进.例如,德国马普生物物理化学研究所诺奖得主 HELL S W 课题组开发的 MINFLUX 技术^[58],将类似 STED 中的环形光束与 SMLM 技术相结合,实现了约 1 nm 的超高定位精度.中科院生物物理研究所徐涛课题组提出的 ROSE 技术^[120]以及荷兰代尔夫特理工大学 SMITH C S 课题组提出的 SIMFLUX 技术^[121],两者采用类似的研究思路,将 SIM 与 SMLM 技术相结合,实现了快速大视场超分辨成像,分辨能力提升为传统定位技术的 2 倍.此外,美国加州理工学院 JENSEN G J 课题组^[122]将冷冻电子断层扫描技术与 PALM 相结合,以优于 2 nm 的定位精度发现了黄色黏球菌内部 T6SS 的多种新结构以及动态伸缩现象.德国马普光科学研究所 SANDOGHDAR V 课题组^[123]研发的 COLD 技术同样将冷冻技术引入到 SMLM 中,在 4.3 K 的低温条件下实现了蛋白质分子埃米量级的分辨率.

除进一步提升分辨率之外,SMLM 技术在三维超分辨成像、快速实时成像、新型荧光探针、超高灵敏和分辨率探测器等方面还有很大的发展空间.具体可以从以下几个方面考虑:1)单分子的定位精度由衍射受限系统下荧光分子弥散斑图像大小以及探测到的单个分子所发出的光子数决定,因此,要设法通过光学设计压缩系统的 PSF 并减小像差,可以与其它超分辨技术(如 STED、SIM)结合使用;要设法提高探测到的单个分子所发出的光子数,如减缓荧光基团的光漂白、光开关等光化学过程,通过延长探测器曝光时间以获取足够多的光子数(如引入冷冻技术、DNA-PAINT),但该方式不适用于快速成像,此外,更有效的方法为开发新的更亮的荧光探针,提高其量子转换效率.2)三维超分辨和厚样品成像对生物体的观测和空间结构解析具有重要意义,因此需要通过新型光学系统设计(如设计新型 PSF、加入自适应光学)和新型图像重建算法(如神经网络深度学习)等手段提高轴向分辨率以及成像深度.3)提高 SMLM 的成像速度,一方面需要提高探测器的成像速度,另一方面需要开发具有高密度荧光信号或者弱信号分辨能力的定位算法,也可以考虑与其它超分

辨技术结合使用。4) 观测活体细胞内部结构以及生命活动对光学显微提出了更高的要求,不仅要同时具有高的空间分辨率和时间分辨率,还要求降低对细胞的损伤。因此需要不断发展活细胞内的荧光标记技术,降低光毒性及光漂白等不利因素;同时需进一步提高探测器的灵敏度、降低背景噪声、减小像素尺寸提高图像采样率。

总之,随着新的光学成像方式、新的荧光探针开关机制、新的光电探测器、以及新的图像重构算法等技术的不断发展和完善,基于单分子定位的超分辨显微成像技术将获得更广泛的应用,为人们探索生命的奥秘提供更有利的工具。

参考文献

- [1] GIESSIBL F J. Atomic force microscopy-(7x7) surface by atomic force microscopy[J]. *Science*, 1995, **267**(5194): 68-71.
- [2] BROWNING N D, CHISHOLM M F, PENNYCOOK S J. Atomic-resolution chemical analysis using a scanning transmission electron microscope[J]. *Nature*, 1993, **366**(6451): 143-146.
- [3] SOHDA Y, YAMANASHI H, FUKUDA M, *et al.* Scanning electron microscope[J]. *Science*, 2008, **183**(4120): 119-119.
- [4] STEPHENS D J, ALLAN V J. Light microscopy techniques for live cell imaging[J]. *Science*, 2003, **300**(5616): 82-86.
- [5] CZIROK A, RUPP P A, RONGISH B J, *et al.* Multi-field 3D scanning light microscopy of early embryogenesis[J]. *Journal of Microscopy*, 2002, **206**(3): 209-217.
- [6] KOBAT D, HORTON N G, XU C. In vivo two-photon microscopy to 1.6-mm depth in mouse cortex[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, **16**(10): 106014.
- [7] ABBE E. A contribution to the theory of the microscope and the nature of microscopic vision[J]. *Proceedings of the Bristol Naturalists' Society*, 1874, **1**: 200-261.
- [8] MAO Zheng-le, WANG Chen, CHENG Ya. Superresolution far-field fluorescence bio-imaging: breaking the diffraction barrier[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2008, **35**(9): 1283-1307
毛峥乐,王琛,程亚. 超分辨远场生物荧光成像——突破光学衍射极限[J]. *中国激光*, 2008, **35**(9): 1283-1307.
- [9] YAO Bao-li, 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.
- [10] HU Chun-guang, ZHA Ri-dong, LING Qiu-yu, *et al.* Super-resolution microscopy applications and development in living cell[J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2017, **46**(11): 1103002.
胡春光,查日东,凌秋雨,等. 超分辨显微技术在活细胞中的应用与发展[J]. *红外与激光工程*, 2017, **46**(11): 1103002.
- [11] BETZIG E, LEWIS A, HAROOTUNIAN A, *et al.* Near field scanning optical microscopy (NSOM): development and biophysical applications[J]. *Biophysical Journal*, 1986, **49**(1): 269-279.
- [12] BETZIG E, CHICHESTER R J. Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy[J]. *Science*, 1993, **262**(5138): 1422-1425.
- [13] WANG H, SHI L, YUAN G, *et al.* Subwavelength and super-resolution nondiffraction beam[J]. *Applied Physics Letters*, 2006, **89**(17): 171102.
- [14] XIE X, CHEN Y, YANG K, *et al.* Harnessing the point-spread function for high-resolution far-field optical microscopy [J]. *Physical Review Letters*, 2014, **113**(26): 263901.
- [15] KOZAWA Y, MATSUNAGA D, SATO S. Superresolution imaging via superoscillation focusing of a radially polarized beam[J]. *Optica*, 2018, **5**(2): 86-92.
- [16] MUTHUKRISHNAN A, SCULLY M O, ZUBAIRY M S. Quantum microscopy using photon correlations[J]. *Journal of Optics B: Quantum and Semiclassical Optics*, 2004, **6**(6): S575-S582.
- [17] SIDLES J A, GARBINI J L, DOUGHERTY W M, *et al.* The classical and quantum theory of thermal magnetic noise, with applications in spintronics and quantum microscopy[J]. *Proceedings of the IEEE*, 2003, **91**(5): 799-816.
- [18] CUI J M, SUN F W, CHEN X D, *et al.* Quantum statistical imaging of particles without restriction of the diffraction limit[J]. *Physical Review Letters*, 2013, **110**(15): 153901.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.

- [23] DAN D, LEI M, YAO B, *et al.* DMD-based LED-illumination super-resolution and optical sectioning microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2013, **3**: 1116.
- [24] CHEN Liang-yi. Superresolution imaging of live cell dynamics using structured illumination microscopy[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2015, **45**(9): 903-904.
陈良怡. 运用结构光照明的活细胞超高分辨率成像技术[J]. 中国科学:生命科学, 2015, **45**(9):903-904.
- [25] SCHERMELLEH L, CARLTON P M, HAASE S, *et al.* Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy[J]. *Science*, 2008, **320**(5881): 1332-1336.
- [26] BETZIG E, PATTERSON G H, SOUGRAT R, *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution[J]. *Science*, 2006, **313**(5793): 1642-1645.
- [27] 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.
- [28] HESS S T, GIRIRAJAN T P K, MASON M D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2006, **91**(11): 4258-4272.
- [29] HEILEMANN M, VAN DE LINDE S, SCHÜTTPELZ M, *et al.* Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, **47**(33): 6172-6176.
- [30] VAN DE LINDE S, LÖSCHBERGER A, KLEIN T, *et al.* Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes[J]. *Nature Protocols*, 2011, **6**(7): 991-1009.
- [31] YILDIZ A, FORKEY J N, MCKINNEY S A, *et al.* Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization[J]. *Science*, 2003, **300**(5628): 2061-2065.
- [32] AQUINO D, SCHÖNLE A, GEISLER C, *et al.* Two-color nanoscopy of three-dimensional volumes by 4Pi detection of stochastically switched fluorophores[J]. *Nature Methods*, 2011, **8**(4): 353-359.
- [33] PERTSINIDIS A, ZHANG Y, CHU S. Subnanometre single-molecule localization, registration and distance measurements[J]. *Nature*, 2010, **466**(7306): 647-651.
- [34] SHANER N C, PATTERSON G H, DAVIDSON M W. Advances in fluorescent protein technology[J]. *Journal of Cell Science*, 2007, **120**(24): 4247-4260.
- [35] ZHENG Q, JUETTE M F, JOCKUSCH S, *et al.* Ultra-stable organic fluorophores for single-molecule research[J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, **43**(4): 1044-1056.
- [36] LIDKE K A, RIEGER B, JOVIN T M, *et al.* Superresolution by localization of quantum dots using blinking statistics [J]. *Optics Express*, 2005, **13**(18): 7052-7062.
- [37] GOULD T J, VERKHUSHA V V, HESS S T. Imaging biological structures with fluorescence photoactivation localization microscopy[J]. *Nature Protocols*, 2009, **4**(3): 291-308.
- [38] DEMPSEY G T, BATES M, KOWTONIUK W E, *et al.* Photoswitching mechanism of cyanine dyes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, **131**(51): 18192-18193.
- [39] NIRMAL M, DABBOUSI B O, BAWENDI M G, *et al.* Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals[J]. *Nature*, 1996, **383**(6603): 802-804.
- [40] ABBE E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung[J]. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 1873, **9**(1): 413-418.
- [41] BETZIG E. Proposed method for molecular optical imaging[J]. *Optics Letters*, 1995, **20**(3): 237-239.
- [42] WU M, HUANG B, GRAHAM M, *et al.* Coupling between clathrin-dependent endocytic budding and F-BAR-dependent tubulation in a cell-free system[J]. *Nature Cell Biology*, 2010, **12**(9): 902-908.
- [43] BATES M, DEMPSEY G T, CHEN K H, *et al.* Multicolor super-resolution fluorescence imaging via multi-parameter fluorophore detection[J]. *ChemPhysChem*, 2012, **13**(1): 99-107.
- [44] LUBECK E, CAI L. Single-cell systems biology by super-resolution imaging and combinatorial labeling[J]. *Nature Methods*, 2012, **9**(7): 743-748.
- [45] PAN Lei-ting, HU Fen, ZHANG Xin-zheng, *et al.* Multicolor single-molecule localization super-resolution microscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, **37**(3): 0318010.
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.
- [46] 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.
- [47] SHROFF H, GALBRAITH C G, GALBRAITH J A, *et al.* Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, **104**(51): 20308-20313.
- [48] HUANG B, WANG W, BATES M, *et al.* Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy[J]. *Science*, 2008, **319**(5864): 810-813.
- [49] PAVANI S R P, THOMPSON M A, BITEEN J S, *et al.* Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, **106**(9): 2995-2999.

- [50] JIA S, VAUGHAN J C, ZHUANG X. Isotropic three-dimensional super-resolution imaging with a self-bending point spread function[J]. *Nature Photonics*, 2014, **8**(4): 302-306.
- [51] RAM S, PRABHAT P, WARD E S, *et al.* Improved single particle localization accuracy with dual objective multifocal plane microscopy[J]. *Optics Express*, 2009, **17**(8): 6881-6898.
- [52] SHTENDEL 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 of the United States of America*, 2009, **106**(9): 3125-3130.
- [53] XU J, TEHRANI K F, KNER P. Multicolor 3D super-resolution imaging by quantum dot stochastic optical reconstruction microscopy[J]. *ACS Nano*, 2015, **9**(3): 2917-2925.
- [54] JUNGMANN R, STEINHÄUER 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.
- [55] STRAUSS S, NICKELS P C, STRAUSS M T, *et al.* Modified aptamers enable quantitative sub-10-nm cellular DNA-PAINT imaging[J]. *Nature Methods*, 2018, **15**(9): 685-688.
- [56] SCHNITZBAUER J, STRAUSS M T, SCHLICHTHÄERLE T, *et al.* Super-resolution microscopy with DNA-PAINT [J]. *Nature Protocols*, 2017, **12**(6): 1198-1228.
- [57] JUNGMANN R, AVENDAÑO M S, WOEHRSTEIN J B, *et al.* Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT[J]. *Nature Methods*, 2014, **11**(3): 313-318.
- [58] 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.
- [59] EILERS Y, TA H, GWOSCH K C, *et al.* MINIFLUX monitors rapid molecular jumps with superior spatiotemporal resolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, **115**(24): 6117-6122.
- [60] GWOSCH K C, PAPE J K, BALZAROTTI F, *et al.* MINIFLUX nanoscopy delivers 3D multicolor nanometer resolution in cells[J]. *Nature Methods*, 2020, **17**(2): 217-224.
- [61] CHEEZUM M K, WALKER W F, GUILFORD W H. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles[J]. *Biophysical Journal*, 2001, **81**(4): 2378-2388.
- [62] BERGLUND A J, MCMAHON M D, MCCLELLAND J J, *et al.* Fast, bias-free algorithm for tracking single particles with variable size and shape[J]. *Optics Express*, 2008, **16**(18): 14064-14075.
- [63] HENRIQUES R, LELEK M, FORNASIERO E F, *et al.* QuickPALM: 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ[J]. *Nature Methods*, 2010, **7**(5): 339-340.
- [64] QUAN Ting-wei, ZHENG Shao-qun, LU Xiao-hua. Comparison of algorithms for localization of single fluorescent molecule in super resolution imaging[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2010, **37**(11): 2714-2718.
全廷伟, 曾绍群, 吕晓华. 超分辨成像中荧光分子定位算法性能比较[J]. *中国激光*, 2010, **37**(11): 2714-2718.
- [65] THOMPSON R E, LARSON D R, WEBB W W. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes[J]. *Biophysical Journal*, 2002, **82**(5): 2775-2783.
- [66] OBER R J, RAM S, WARD E S. Localization accuracy in single-molecule microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2004, **86**(2): 1185-1200.
- [67] SMITH C S, JOSEPH N, RIEGER B, *et al.* Fast, single-molecule localization that achieves theoretically minimum uncertainty[J]. *Nature Methods*, 2010, **7**(5): 373-375.
- [68] HUANG F, SCHWARTZ S L, BYARS J M, *et al.* Simultaneous multiple-emitter fitting for single molecule super-resolution imaging[J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, **2**(5): 1377-1393.
- [69] CANDÈS E J, ROMBERG J, TAO T. Robust uncertainty principles: Exact signal reconstruction from highly incomplete frequency information[J]. *IEEE Transactions on Information Theory*, 2006, **52**(2): 489-509.
- [70] ZHU L, ZHANG W, ELNATAN D, *et al.* Faster STORM using compressed sensing[J]. *Nature Methods*, 2012, **9**(7): 721-723.
- [71] HOLDEN S J, UPHOFF S, KAPANIDIS A N. DAOSTORM: an algorithm for high-density super-resolution microscopy[J]. *Nature Methods*, 2011, **8**(4): 279-280.
- [72] BABCOCK H, SIGAL Y M, ZHUANG X. A high-density 3D localization algorithm for stochastic optical reconstruction microscopy[J]. *Optical Nanoscopy*, 2012, **1**: 6.
- [73] QUAN T, ZHU H, LIU X, *et al.* High-density localization of active molecules using structured sparse model and bayesian information criterion[J]. *Optics Express*, 2011, **19**(18): 16963-16974.
- [74] WANG Y, QUAN T, ZENG S, *et al.* PALMER: a method capable of parallel localization of multiple emitters for high-density localization microscopy[J]. *Optics Express*, 2012, **20**(14): 16039-16049.
- [75] MIN J, VONESCH C, KIRSHNER H, *et al.* FALCON: fast and unbiased reconstruction of high-density super-resolution microscopy data[J]. *Scientific Reports*, 2015, **4**: 4577.
- [76] MUKAMEL E A, BABCOCK H, ZHUANG X. Statistical deconvolution for superresolution fluorescence microscopy [J]. *Biophysical Journal*, 2012, **102**(10): 2391-2400.

- [77] COX S, ROSTEN E, MONYPENNY J, *et al.* Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics [J]. *Nature Methods*, 2012, **9**(2): 195-200.
- [78] HU Y S, NAN X, SENGUPTA P, *et al.* Accelerating 3B single-molecule super-resolution microscopy with cloud computing[J]. *Nature Methods*, 2013, **10**(2): 96-97.
- [79] XU F, ZHANG M, HE W, *et al.* Live cell single molecule-guided Bayesian localization super resolution microscopy[J]. *Cell Research*, 2017, **27**(5): 713-716.
- [80] MATTHEYSES A L, SIMON S M, RAPPOPORT J Z. Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist[J]. *Journal of Cell Science*, 2010, **123**(21): 3621-3628.
- [81] TOKUNAGA M, IMAMOTO N, SAKATA-SOGAWA K. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells[J]. *Nature Methods*, 2008, **5**(2): 159-161.
- [82] HOSNY N A, SONG M, CONNELLY J T, *et al.* Super-resolution imaging strategies for cell biologists using a spinning disk microscope[J]. *Public Library of Science One*, 2013, **8**(10): e74604.
- [83] CHEN X, ZENG Z, WANG H, *et al.* Three-dimensional multimodal sub-diffraction imaging with spinning-disk confocal microscopy using blinking/fluctuating probes[J]. *Nano Research*, 2015, **8**(7): 2251-2260.
- [84] SCHUEDER F, LARA-GUTIÉRREZ J, BELIVEAU B J, *et al.* Multiplexed 3D super-resolution imaging of whole cells using spinning disk confocal microscopy and DNA-PAINT[J]. *Nature Communications*, 2017, **8**: 2090.
- [85] HUISKEN J, SWOGER J, DEL BENE F, *et al.* Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy[J]. *Science*, 2004, **305**(5686): 1007-1009.
- [86] POWER R M, HUISKEN J. A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging [J]. *Nature Methods*, 2017, **14**(4): 360-373.
- [87] JIA H, YU X, YANG Y, *et al.* Axial resolution enhancement of light-sheet microscopy by double scanning of Bessel beam and its complementary beam[J]. *Journal of Biophotonics*, 2019, **12**(1): e201800094.
- [88] GUSTAVSSON A K, PETROV P N, LEE M Y, *et al.* 3D single-molecule super-resolution microscopy with a tilted light sheet[J]. *Nature Communications*, 2018, **9**: 123.
- [89] WU Y, KUMAR A, SMITH C, *et al.* Reflective imaging improves spatiotemporal resolution and collection efficiency in light sheet microscopy[J]. *Nature Communications*, 2017, **8**: 1452.
- [90] CHEN B C, LEGANT W R, WANG K, *et al.* Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution[J]. *Science*, 2014, **346**(6208): 1257998.
- [91] YANG B, CHEN X, WANG Y, *et al.* Epi-illumination SPIM for volumetric imaging with high spatial-temporal resolution[J]. *Nature Methods*, 2019, **16**(6): 501-504.
- [92] GALLAND R, GRENCI G, ARAVIND A, *et al.* 3D high-and super-resolution imaging using single-objective SPIM[J]. *Nature Methods*, 2015, **12**(7): 641-644.
- [93] COATES C G, DENVIR D J, MCHALE N G, *et al.* Optimizing low-light microscopy with back-illuminated electron multiplying charge-coupled device: enhanced sensitivity, speed, and resolution[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2004, **9**(6): 1244-1253.
- [94] RASNIK I, FRENCH T, JACOBSON K, *et al.* Electronic cameras for low-light microscopy[J]. *Methods in Cell Biology*, 2007, **81**: 219-249.
- [95] FOWLER B, LIU C, MIMS S, *et al.* A 5.5 Mpixel 100 frames/sec wide dynamic range low noise CMOS image sensor for scientific applications[C]. *Sensors, Cameras, and Systems for Industrial/Scientific Applications XI*, International Society for Optics and Photonics, 2010, **7536**: 753607.
- [96] COATES C. New sCMOS vs. current microscopy cameras[J]. *Biophotonics International*, 2011, **18**(5): 24-27.
- [97] ROBBINS M S, HADWEN B J. The noise performance of electron multiplying charge-coupled devices[J]. *IEEE Transactions on Electron Devices*, 2003, **50**(5): 1227-1232.
- [98] ALMADA P, CULLEY S, HENRIQUES R. PALM and STORM: Into large fields and high-throughput microscopy with sCMOS detectors[J]. *Methods*, 2015, **88**: 109-121.
- [99] LIU S, MLODZIANOSKI M J, HU Z, *et al.* sCMOS noise-correction algorithm for microscopy images[J]. *Nature Methods*, 2017, **14**(8): 760-761.
- [100] HUANG Z L, ZHU H, LONG F, *et al.* Localization-based super-resolution microscopy with an sCMOS camera[J]. *Optics Express*, 2011, **19**(20): 19156-19168.
- [101] YIN Y, LEE W T, ROTHENBERG E. Ultrafast data mining of molecular assemblies in multiplexed high-density super-resolution images[J]. *Nature Communications*, 2019, **10**(1): 119.
- [102] HUANG F, HARTWICH T M P, RIVERA-MOLINA F E, *et al.* Video-rate nanoscopy using sCMOS camera-specific single-molecule localization algorithms[J]. *Nature Methods*, 2013, **10**(7): 653-658.
- [103] HUANG F, SIRINAKIS G, ALLGEYER E S, *et al.* Ultra-high resolution 3D imaging of whole cells[J]. *Cell*, 2016, **166**(4): 1028-1040.
- [104] HESS S T, GOULD T J, GUDHETI M V, *et al.* Dynamic clustered distribution of hemagglutinin resolved at 40 nm in living cell membranes discriminates between raft theories[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

- the United States of America*, 2007, **104**(44): 17370-17375.
- [105] 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): 499-505.
- [106] SHROFF H, GALBRAITH C G, GALBRAITH J A, *et al.* Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics[J]. *Nature Methods*, 2008, **5**(5): 417-423.
- [107] HUANG B, JONES S A, BRANDENBURG B, *et al.* Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution[J]. *Nature Methods*, 2008, **5**(12): 1047-1052.
- [108] ADHIKARI S, MOSCATELLI J, SMITH E M, *et al.* Single-molecule localization microscopy and tracking with red-shifted states of conventional BODIPY conjugates in living cells[J]. *Nature Communications*, 2019, **10**: 3400.
- [109] AN S, ZIEGLER K F, ZHANG P, *et al.* Axial plane single-molecule super-resolution microscopy of whole cells[J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, **11**(1): 461-479.
- [110] ZANACCHI F C, LAVAGNINO Z, DONNORSO M P, *et al.* Live-cell 3D super-resolution imaging in thick biological samples[J]. *Nature Methods*, 2011, **8**(12): 1047-1049.
- [111] MLODZIANOSKI M J, CHENG-HATHAWAY P J, BEMILLER S M, *et al.* Active PSF shaping and adaptive optics enable volumetric localization microscopy through brain sections[J]. *Nature Methods*, 2018, **15**(8): 583-586.
- [112] BON P, LINARESLOYEZ J, FEYEUX M, *et al.* Self-interference 3D super-resolution microscopy for deep tissue investigations[J]. *Nature Methods*, 2018, **15**(6): 449-454.
- [113] XU F, MA D, MACPHERSON K P, *et al.* Three-dimensional nanoscopy of whole cells and tissues with in situ point spread function retrieval[J]. *Nature Methods*, 2020, **17**: 531-540.
- [114] XU J, MA H, MA H, *et al.* Super-resolution imaging reveals the evolution of higher-order chromatin folding in early carcinogenesis[J]. *Nature Communications*, 2020, **11**: 1899.
- [115] DANI A, HUANG B, BERGAN J, *et al.* Superresolution imaging of chemical synapses in the brain[J]. *Neuron*, 2010, **68**(5): 843-856.
- [116] WANG Y, WOEHRSTEIN J B, DONOGHUE N, *et al.* Rapid sequential in situ multiplexing with DNA exchange imaging in neuronal cells and tissues[J]. *Nano Letters*, 2017, **17**(10): 6131-6139.
- [117] LU C, TANG W, LIU Y, *et al.* Lightsheet localization microscopy enables fast, large-scale, and three-dimensional super-resolution imaging[J]. *Communications Biology*, 2019, **2**: 177.
- [118] CHU L, LU C, YANG S, *et al.* Rapid single-wavelength lightsheet localization microscopy for clarified tissue[J]. *Nature Communications*, 2019, **10**: 4762.
- [119] KLEVANSKI M, HERRMANNSDOERFER F, SASS S, *et al.* Automated highly multiplexed super-resolution imaging of protein nano-architecture in cells and tissues[J]. *Nature Communications*, 2020, **11**: 1552.
- [120] GU L, LI Y, ZHANG S, *et al.* Molecular resolution imaging by repetitive optical selective exposure[J]. *Nature Methods*, 2019, **16**(11): 1114-1118.
- [121] CNOSSEN J, HINSDALE T, THORSEN R O, *et al.* Localization microscopy at doubled precision with patterned illumination[J]. *Nature Methods*, 2020, **17**(1): 59-63.
- [122] CHANG Y, CHEN S, TOCHEVA E I, *et al.* Correlated cryogenic photoactivated localization microscopy and cryo-electron tomography[J]. *Nature Methods*, 2014, **11**(7): 737-739.
- [123] WEISENBURGER S, BOENING D, SCHOMBURG B, *et al.* Cryogenic optical localization provides 3D protein structure data with Angstrom resolution[J]. *Nature Methods*, 2017, **14**(2): 141-144.