

随机光学重构显微术及其应用研究进展

杨建宇¹, 潘雷霆^{1,2}, 胡 芬¹, 张心正¹, 许京军¹

(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 300071; 2. 南开大学 生物治疗协同创新中心, 天津 300071)

摘要: 在光学显微成像领域, 涌现出一批可以突破衍射极限的超分辨显微成像技术, 极大地增强了人们研究亚细胞结构的能力。基于单分子定位技术的随机光学重构显微术 (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM) 具有易懂的成像原理、简单的工作方式以及超高的分辨率等特点, 受到越来越多的研究者青睐。首先, 介绍了单分子定位技术的原理, 讨论了 STORM 光路的搭建, 阐述了二维和三维 STORM 超分辨显微成像原理。其次, 探讨了多色 STORM 以及 STORM 与电镜关联成像现状。最后介绍了 STORM 技术现阶段的应用进展。

关键词: 超分辨成像; 单分子定位; 随机光学重构显微术; 关联成像

中图分类号: O439 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3788/IRLA201746.1103008

Stochastic Optical Reconstruction Microscopy and its application

Yang Jianyu¹, Pan Leiting^{1,2}, Hu Fen¹, Zhang Xinzheng¹, Xu Jingjun¹

(1. Key Laboratory of Weak-Light Nonlinear Photonics, Ministry of Education, TEDA Institute of Applied Physics, School of Physics, Nankai University, Tianjin 300071, China;

2. The 2011 Project Collaborative Innovation Center for Biological Therapy, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: A batch of super-resolution fluorescence microscopy technologies have been invented to overcome the diffraction limit of traditional optical microscopy. It thereby greatly enhances the capacity of sub-cellular structure investigation. Among these super-resolution microscopy, Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) based on single molecule localization has attracted more and more attention by researchers due to its straightforward principle, simple operation mode as well as super-high resolution. First, the basic principle of single molecule localization was introduced, the design of the light path of STORM was discussed, and the principles of 2D-STORM and 3D-STORM were provided. Then, the development of multi-color imaging as well as correlative STORM and electron microscopy were discussed. Finally, some recent typical researches depending on STORM were presented.

Key words: super-resolution imaging; single molecule localization; Stochastic Optical Reconstruction Microscopy; correlative imaging

收稿日期: 2017-10-10; 修订日期: 2017-11-20

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资助课题(IRT_13R29)

作者简介: 杨建宇(1993-), 男, 硕士生, 主要从事超分辨成像方面的研究。Email: yangjy@mail.nankai.edu.cn

导师简介: 潘雷霆(1983-), 男, 副教授, 博士, 主要从事超分辨成像、微流控等方面的研究。Email: plt@nankai.edu.cn

0 引言

光学显微镜自诞生以来受到广大生物医学工作者的青睐,无奈受到衍射极限的影响,成像分辨率被限制在细胞水平。但是进入 21 世纪,先后发展出两类光学超分辨成像技术:一是基于激发光源改造技术的受激发射损耗显微技术 (Stimulated Emission Depletion Microscopy, STED)^[1-2] 和结构光照明显微术 (Structured Illumination Microscopy, SIM)^[3];二是基于单分子定位技术的光激活定位显微术 (Photo-activated Localization Microscopy, PALM)^[4]和随机光学重构显微术 (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM)^[5]。这些技术均使成像分辨率达到百纳米以下,极大地增强了人们获得亚细胞水平信息的能力。

STORM 技术由哈佛大学华裔科学家庄小威于 2006 年首次提出,当时横向分辨率已达 20 nm。2012 年,庄小威组又构建出双物镜成像系统,所得荧光光子数是单物镜的两倍,通过复杂的计算拟合,将 STORM 横向分辨率提高至 10 nm,是世界上分辨率最高的超分辨显微成像技术^[6]。此外,相比其他超分辨显微术,STORM 还具有原理易懂,光路易搭建,工作方式易掌握等优点,迅速发展为主流的超分辨显微成像技术。

时至今日,STORM 技术已经发展出 3D-STORM、光谱 STORM 等技术,为人们研究亚细胞尺度生命体活动提供了强有力的保障。文中从单分子定位原理出发,介绍 STORM 技术发展现状以及其在相关科学领域的应用。

1 单分子定位原理

受物镜数值孔径的限制,物光通过物镜成像时发生衍射,物点所成的像是一个圆形且光强分布不均匀的光斑如图 1 所示,这个光斑被称为“艾里斑”,其光强分布可用如下公式来描述^[7]:

$$I(\theta)=I(0)\left[\frac{2J_1(kas\sin(\theta))}{kas\sin(\theta)}\right]^2 \quad (1)$$

式中: a 为圆孔半径; I 为光强; θ 为衍射角; $I(0)$ 为中央主极大光强; J_1 为一阶贝塞尔函数; k 为波矢。艾里斑是一个成像系统的点扩散函数 (Point Spread Function,

PSF),它的半高宽 (Full Width at Half Maximum, FWHM)尺寸决定了显微成像系统的空间分辨率,为 $0.61 \lambda/NA$,其中 λ 为入射光的波长, NA 为物镜的数值孔径。根据瑞利判据,一个物点衍射图样的中央极大与另一个物点衍射图样的第一极小重合时的距离作为光学成像系统的分辨极限(见图 1)。油浸物镜数值孔径通常在 1.40~1.49,在可见光范围内,PSF 的 FWHM 大小约为 200 nm,此为普通光学显微镜的分辨极限。当两个物体间的距离小于 200 nm 时,它们同时发光产生的艾里斑发生重合,显微镜将无法区分该两物体。

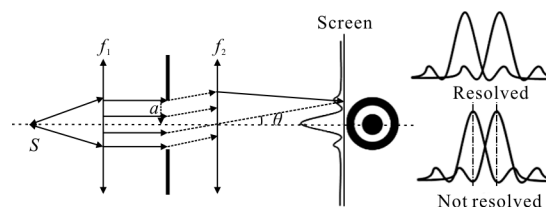


图 1 艾里斑及瑞利判据

Fig.1 Airy disk and Rayleigh criterion

随着荧光探针的发展,具有良好闪烁特性的荧光探针相继问世。利用荧光分子的闪烁性可使原本密集且同时发光的荧光在时间上产生分离,同一时间视野内仅有稀疏的荧光分子发光。如果在某一时间某一区域范围内只有一个荧光分子发光,虽然点光源经过成像系统后变成模糊的光斑,但光斑中心汇聚了 85%的信号。考虑到背景荧光,探测器散粒噪声等影响,Thompson 等^[7]推导出精确的二维高斯定位公式:

$$\sigma_{\mu_i}=\sqrt{\left(\frac{s_i^2}{N}+\frac{a^2}{12N}+\frac{8\pi s_i^4 b^2}{a^2 N^2}\right)} \quad (2)$$

式中: σ_{μ_i} 为平均标准偏差; a 为像素大小; b^2 为背景噪声; N 为物镜收集到的总光子数; s_i 为在 i (x 或 y) 方向标准差,根号里面第一项是探测器散粒噪声的影响,第二项是探测器像素大小的影响,第三项是探测器背景噪声的影响。基于该方程已成功将 Cy3 探针的定位精度控制到 1.24 nm。

2 STORM 光路搭建

STORM 简易光路如图 2 所示,不同颜色激光通过反射镜与二向色镜进行合束,再将光耦合入单模光纤。利用凸透镜将光纤出射的发散光转变为准

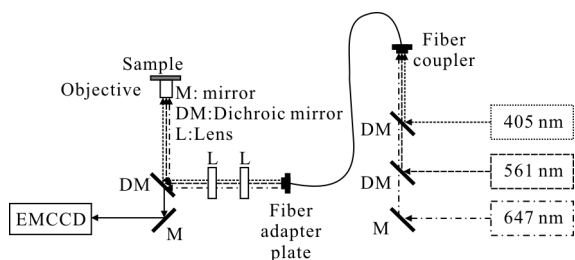


图 2 STORM 光路示意图

Fig.2 Schematic diagram of STORM light path

直光,再用另一个凸透镜把光斑聚焦于物镜后焦面,基本完成 STORM 光路的搭建。STORM 一般基于全内反射显微术 (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy, TIRFM), 利用 TIRF 物镜在基底表面产生一层极薄的(约 100 nm)倏逝波,只激发紧贴在基底上的一层荧光探针,有效地减少了背景噪声,提高 STORM 成像的分辨率。STORM 技术的实现离不开探测器装置的进步,数据采集需要强信噪比的空间成像器,如 EMCCD (Electron-Multiplying CCD, EMCCD) 和 sCMOS (Scientific Complementary Metal-Oxide-Semiconductor, sCMOS)。

合束过程中使用到的二向色镜可以用三棱镜替代,调整各束激光相对棱镜的入射角度实现合束。此外,合束光耦合入光纤不是必须的,但优点是明显的:一是单模光纤本身具有滤波作用,保证出射光斑呈完美的高斯分布,便于后期耦合到显微镜光路;二是光纤可以把激光光路和成像光路分开,增强光路摆放的灵活性。当然,光纤同样存在缺点,光纤出射光的能量相比于入射光存在较大的损耗,要求激光器的出光功率需较大,增加搭建成本。如不使用光纤,可将合束后的激光通过物镜进行扩束准直,优点是光的能量损耗较小,缺点是物镜扩束光斑质量相对较差。

STORM 成像过程需要对激发光和激活光强进行实时调制。比较高级的方法是在光纤耦合器前增加一个多通道声光可调谐滤波器 (Acousto-optic Tunable Filter, AOTF), 可同时控制多束激光一级衍射光的强度。比较简单的方法是在每个激光器出光口设置带有衰减片的机械或电动转盘。

3 2D-STORM

2D-STORM 数据采集过程中,激活光和激发光控制成像区每次仅有少量、随机、离散的荧光探针发

光,采集上万张图片记录闪烁的荧光所发出的强度和位置信息,再通过高斯拟合分析单个荧光分子点扩散函数中心,实现高精度的空间定位,最后将所有图片进行叠加形成一幅超分辨图像^[8],如图 3 所示。若要精准分析出单分子定位信息,需估算出图像的背景信号。通常选择较少荧光分子被激活的图像,计算出该图像内像素强度的中值及标准差,并以此为依据设定阈值,高于该阈值的信号分子被筛选出来用于分析,通常高于三倍标准差效果更佳。除此之外,还要对所有图像进行空间滤波以减少低频自荧光和易被 CCD 误识为峰的高频噪点。

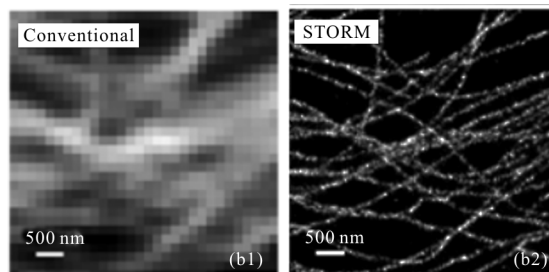
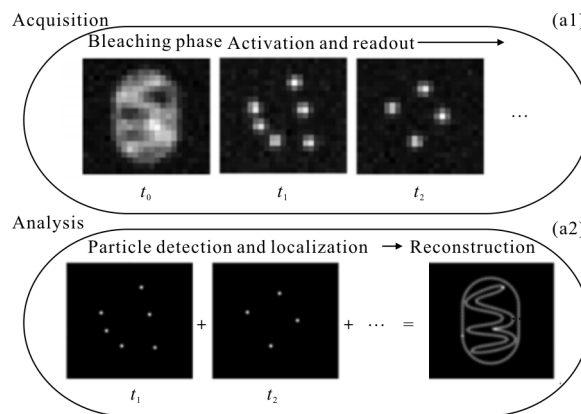


图 3 (a1)、(a2) 基于单分子定位技术 2D-STORM 超分辨成像过程示意图^[8]; (b1)、(b2) 微管的传统成像与 STORM 成像对比^[9]

Fig.3 (a1)、(a2) Schematic diagram of 2D-STORM super-resolution imaging process based on single-molecule localization method^[8]; (b1), (b2) Comparison of conventional imaging and STORM imaging of microtubule^[9]

被识别的荧光及其周边区域通过 2D 高斯拟合来精确定位其中心点 x 、 y 坐标,高斯拟合方程为^[7]:

$$G(x,y)=h \exp \left[-2 \frac{(x-x_0)^2}{w_x^2} - 2 \frac{(y-y_0)^2}{w_y^2} \right] + b \quad (3)$$

式中: h 为峰高; b 为背景; (x_0, y_0) 为中心坐标; (w_x, w_y)

分别为高斯图像在 x 方向和 y 方向的 FWHM。还需计算高斯峰的锐度和圆度以去除高频噪声并分辨出其中重叠的信号分子。此外,采集到的相邻帧图像中,同一荧光团所发出的光会出现在 CCD 相同像素点或附近。可将帧与帧之间的数据串联起来,一旦所有 PSF 峰都已经被识别并拟合,便将这些峰的质心位置连接成序列。检测到 PSF 峰的第一帧被定义为序列的开始,出现相同峰的最后帧作为序列的结尾。对于给定的序列,根据每帧中收集的光子数计算加权的平均重心位置。最终那些被有效识别并定位的点合成一幅完整的超分辨图像。

4 3D-STORM

2008 年,庄小威组提出 3D-STORM 成像方法^[10]。基本原理是在显微镜与 EMCCD 之间添加一面柱透镜(见图 4(a)),使得点扩散函数图像在远离或靠

近焦平面处发生不同程度的形变(见图 4(b)),即当荧光分子正好处于平均焦平面时图像呈圆形;;当荧光分子高于焦平面时,其图像在 y 方向上比在 x 方向上更为聚焦,其形状沿 x 轴呈椭圆形;相反,当荧光分子低于焦平面时,其形状沿着 y 轴呈椭圆形。则可通过分析椭圆率和取向从而获得荧光分子的 z 轴空间信息,实现三维成像。

3D 数据分析依赖于 z 轴校准曲线的获得。将 20 nm 荧光微球放在可以精密调节 z 轴的载物台上,以很小的步长(~ 10 nm)上下移动一定距离($-1 \sim 1 \mu\text{m}$)拍摄获得一组图片。通过特定程序识别每一帧图片中的各个荧光点的形状,以确定它们的 FWHM,结合载物台 z 轴位置信息,可得到含有 z 轴信息的校准曲线:

$$w_{(x,y)}(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z-c}{d}\right)^2 + A\left(\frac{z-c}{d}\right)^3 + B\left(\frac{z-c}{d}\right)^4} \quad (4)$$

式中: w_0 为焦平面处分子的图像的 FWHM; c 为 x 、 y 方向相对于平均焦平面产生焦移的补偿参数(平均焦平面是图像为球形即 $w_x = w_y$ 时焦面,并定义为 $z=0$), d 为显微镜的焦深; A 和 B 为考虑成像光学器件非理想性的高阶项的系数(理想的散焦曲线 A 和 $B=0$)。校准曲线是经验性的,也可以使用其他公式表达。

3D-STORM 原始数据中不同形状的点扩散函数将通过对比 z 轴校准曲线获得 z 轴信息。当下列表达式取最小值时

$$\sqrt{(\sqrt{w_x} - \sqrt{w_{x,\text{calib}}})^2 + (\sqrt{w_y} - \sqrt{w_{y,\text{calib}}})^2} \quad (5)$$

得到最佳 z 轴位置,其中 w_{calib} 为校准曲线定义宽度。该方法的 z 轴工作范围只有几百纳米,远离焦面的样品,像点会变得更宽(即更加散焦),使得 z 轴定位精度下降(不会影响 x 、 y 轴精度),但对于使用 TIRF 物镜的 STORM 来说已经足够。

5 多色 STORM 技术

目前已发展出数种有特点的多色 STORM 技术,帮助研究者精确分析不同目标物的空间结构与相互关系^[12]。

多色成像最常见的思路是使用不同激发光激发不同波段荧光探针发射出不同颜色的荧光。目前主流商业荧光探针激发波段有 488、561、647、750 nm 等。该方法的优点是实施方便,不同颜色间串扰较

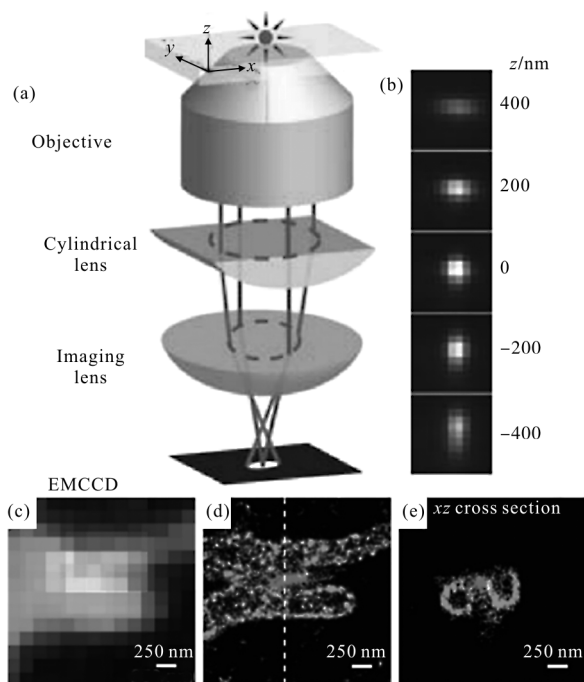


图 4 (a)基于柱透镜光路的 3D-STORM 的成像原理^[10]; (b)不同 z 轴深度的荧光点扩散函数图像^[10]; (c)线粒体传统荧光成像(C 型结构)^[11]; (d)线粒体 2D-STORM 成像(C 型结构)^[11]; (e)线粒体 3D-STORM 成像(环状结构)^[11]

Fig.4 (a) Schematic diagram of 3D-STORM based on cylindrical lens^[10]; (b) PSF images of a fluorophore at various z positions^[10]; (c) conventional fluorescence image of mitochondria (C type structure)^[11]; (d) 2D-STORM image of mitochondria (C type structure)^[11]; (e) 3D-STORM image of mitochondria (ring like structure)^[11]

小。缺点是采用依次采集方式,不同颜色间数据获取存在一定的时间间隔,样品位置在数据采集过程中会发生漂移,需进行校正才能得到准确的相互关系。其次,已有的闪烁性能较好的探针都集中在红外激发波段,蓝光和绿光激发波段还没有闪烁性较好的染料,严重影响组合成像分辨率。

2007 年,庄小威组通过设计不同的荧光分子对组合(激活子-报告子),发展出基于不同激活光的多色 STORM^[9]。将闪烁性较好的荧光探针作为报告子,再绑定不同种类的激活子,依靠不同颜色的脉冲激活光对样品进行多色成像。该方法优点是各个通道成像分辨率均较高,但激发光本身非特异性激活导致在不同颜色间存在 10%~20%的窜扰,造成实验假象。

2008 年,Bossi M 等发展出基于分光技术的多色 STORM^[3]。使用吸收谱相近但发射谱不同的荧光探针标记样品,样品被激发后同时发出两种颜色的混合光,被二向色镜分为透射和反射两路光,分别被透镜聚焦到同一个 CCD 靶面左右两侧进行成像。数据采集后利用比率法对每个荧光点进行颜色分类,最终得到双色成像。该方法特点是同时得到两种颜色的数据,图片合成时不需要额外校正;还可以选择闪烁较好的红外激发波段,图像分辨率好。但相近的荧光吸收谱易造成不可逆的窜扰。

2015 年,Xu K 组在双物镜成像光路的其中一束光路中加入三棱镜,对荧光信号进行横向光谱展开,另一路进行正常 STORM 成像,采得的超分辨数据既包含空间信息又包含光谱信息,通过单分子光谱比对与分类,最终实现多色成像^[4]。该方法只需要一束激发光和一束激活光便可得到最高四色且分辨率良好的超分辨图像,窜扰极低(<2%),但后期数据处理十分复杂。2016 年,Dong B 等^[15]使用光栅进行光谱展开,实现双色同步成像。该方法主要特点是光谱分辨率较高,但充分展开的光谱也占用了较多像素,成像点易重合,数据无法使用而丢失信息。

2016 年,Shechtman Y 等^[6]报道了基于 PSF 工程技术的双色成像方法。使用一种光谱依赖的四角相位板,改变不同颜色 PSF 的形状,且形状与 z 轴深度相关。该方法使用同步采集方式且窜扰低,但改造后的 PSF 较大,占用太多 CCD 面积,降低了采集效率,适合低密度标记的样本。

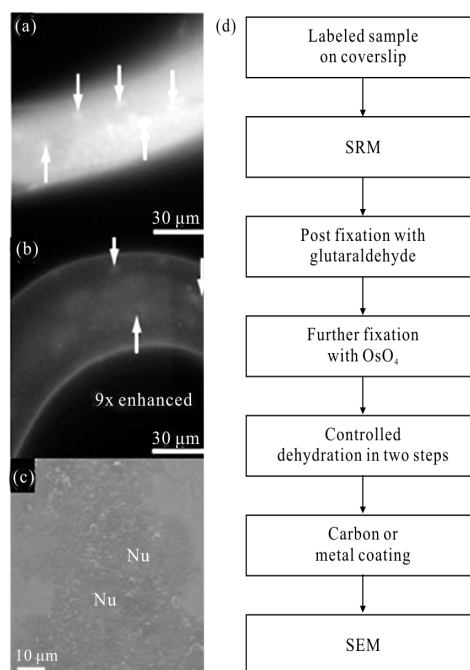
上述各种多色 STORM 成像手段在时间分辨率、空间分辨率和窜扰率之间各有所长,研究者可根据自身需求选择合适的多色成像方法。

6 STORM 与电镜联合成像

为了得到细胞的形态、功能及成分等多维度信息,超分辨-电镜关联显微成像^[17-18](Correlative Super-resolution Microscopy and Electron Microscopy)技术应运而生。电子显微镜 (Electron Microscope, EM),使用电子束成像,分辨率轻松达到纳米级,但只能观察干燥的样品,且得到的形貌图像没有分子特异性。STORM 依赖于免疫染色技术,不仅是形貌成像,更是功能成像,但是分辨率相对电镜仍有差距。因此,将二者有机结合起来,取长补短,可有效增强人们对亚细胞结构的解析能力。

6.1 联合成像样品的制备

样品制备是 STORM 与电镜关联成像面临的最大挑战。对于电镜,其复杂的制样步骤每一步都至关重要,包括高强度化学固定(防止之后的脱水步骤破坏样品超微结构),重金属负染(增强样品衬度),树脂包埋(样品切片),这些步骤基本都会淬灭荧光,并可能产生较强的自体荧光^[18]。如使用高浓度(1%)戊二醛固定表达 Citrine-histone 的线虫肠核样品表现出强烈的背景自体荧光(见图 5(a)),相似样品使用 0.1%四氧化锇固定后荧光强度下降 90%(见图 5(b))。



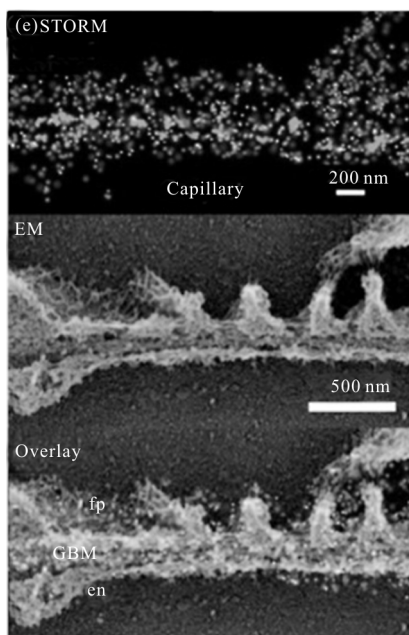


图 5 超分辨-电镜关联显微成像示意图^[17-19]

Fig.5 Schematic diagram of correlative super-resolution microscopy and electron microscopy^[17-19]

但对于 STORM 来说,较强的荧光信号和干净的背景是基本要求。而且,EM 制样步骤还会改变荧光闪烁性^[18],而荧光闪烁恰恰是 STORM 成像的关键。如果单纯弱化 EM 制样流程,仅使用常规免疫荧光染色手段处理样品,又无法得到令人满意的 EM 图像(见图 5(c))。因此,解决上述问题的一个常见策略是将样品先按照光镜流程进行成像,再按照电镜流程进行成像^[17](见图 5(d))。2013 年,Suleiman H 等^[19]成功对肾小球毛细血管区域进行 STORM 与电镜联合成像(见图 5(e))。

6.2 含水样品的 SEM 关联成像

对于 STORM,需使用玻璃基底配合高数值孔径油浸物镜最大程度地获取荧光信号,从而实现超高成像分辨率。但常规的玻璃基底不导电,直接进行扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM)成像会使电荷在玻璃基底上堆积,造成不稳定的电子信号。因此,常规处理方法是对样品进行干燥并喷涂导电介质,但此过程易二次破坏样品。2015 年,Xu K 组在 STORM 成像后不进行脱水处理,而是直接在样品上方覆盖一层只有一个原子厚度的石墨烯进行 SEM 成像^[20]。得益于石墨烯导电和隔水特性,对该含水样品获得了较高分辨率的 SEM 图像,虽然图片分辨率与常规处理方法相比有所下

降,但是足够与 STORM 图像进行关联分析,且避免了样品的二次破坏。

6.3 STORM 图像与 EM 图像校准

STORM 与 EM 成像分辨率均在纳米级别,因此关联图像的精确校准至关重要。首先数据采集阶段,如何在两种成像模式下定位到相同视野是个问题。实际操作中一般采用网格状基底或在基底上划痕进行视野复位。还可采用固定标记物,如纳米金颗粒标记样品,其在电镜和光镜下都具有良好分辨^[18],通过对比同一固定标记物的位置实现图像校准。另外,如果两种成像模式下样品的特定结构都可以被识别出来,或者如果很好地定义了两种模式下样品结构的相对位置,那么图像的校准可以在图像本身基础上实现^[21]。

7 STORM 研究进展

2013 年庄小威组采用双色 STORM 首次揭示海马神经细胞轴突部分微丝-帽蛋白复合物与血影蛋白交替排布成间距为 180~190 nm 的周期性结构(见图 6)^[22],为神经电生理活动研究提供了新的思考

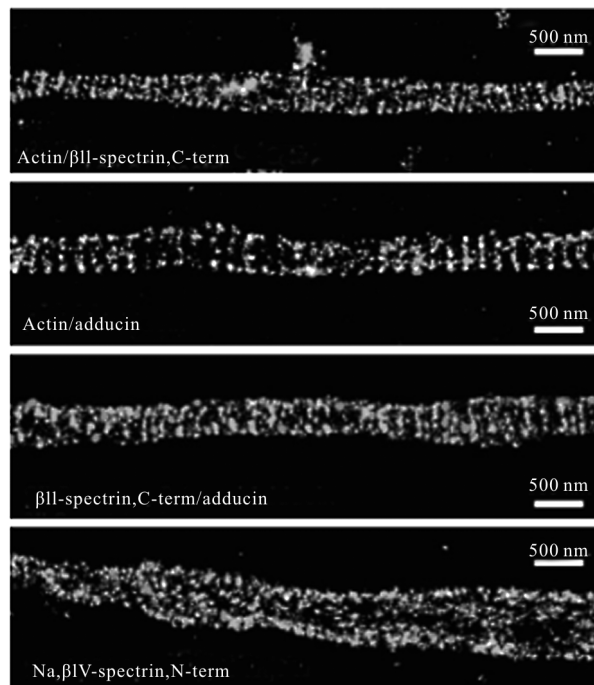


图 6 双色 STORM 结果表明神经细胞轴突部分血影蛋白与微丝、帽蛋白复合物形成结构交替的周期性结构^[22]

Fig.6 Two-color STORM data indicate that actin, spectrin and adducin form a coordinated, quasi-1D lattice structure in axons are distributed in a periodic pattern^[22]

视角,引起极大轰动,堪称教科书级工作。2016年,该组基于 STORM 技术发现线粒体与嘌呤体存在共定位关系,对研究 Lesch-Nyhan 综合症具有重要意义^[11]。

2017年,Xu K 组基于自身研发的光谱多色 STORM 成像技术^[14],利用光谱敏感的尼罗红(Nile Red)染料实现对 Cos-7 细胞器膜与细胞质膜的区分成像^[23]。同年使用光谱 STORM 技术在单分子水平揭示螺吡喃(Spiropyran,一种光开关)的多种反应途径^[24]。

2017年,Ge L 等通过 3D-STORM 观察到饥饿细胞中原本存在于内质网输出位点(Endoplasmic Reticulum Exit Sites, ERES)上的 II 型跨膜蛋白 SEC12 与内质网高尔基体中间区(ER-Golgi Intermediate Compartment, ERGIC)产生共定位关系,直观记录到了 SEC12 的迁移,为自噬体的形成提供了证据^[25]。2016年,Karanasios E 等使用 STORM 技术拍摄到 ATG9 蛋白在自噬诱导条件下,即使没有第二信使 PIP3 合成的情况下,依然包围了前期自噬特异性结构 ULK1 复合物,表明 ATG9 蛋白有助于前期自噬体成核^[26]。

2016年,Hu Y 等^[27]借助片光照明 STORM 技术,拍摄到 T 细胞上 T 细胞受体(T Cell Receptor, TCR)原本为随机分布,激活后 24 h 内变为明显的岛状分布。确定了被活化的 T 细胞膜上受体的时空变化关系。

2017年,Schöneberg J 等使用计算机模拟内吞过程并使用 3D-STORM 技术观察到 Ω 型网格蛋白小窝中 Dnm2 蛋白、SNX9 蛋白以及网格蛋白的内外层级关系^[28]。

2017年,Suleiman H Y 等成功对健康和受损的足细胞(Podocyte)上多种蛋白与相关结构进行 STORM 与 SEM 关联显微成像,揭示了足细胞骨架受伤重组机制^[29]。

8 结束语

文中先后介绍了单分子定位原理、STORM 光路构建、2D-STORM 和 3D-STORM 原理,简述了多色成像与光电联合成像的发展,最后介绍了现阶段应用 STORM 技术的研究成果。STORM 空间分辨率虽然远高于其他超分辨成像技术,但主要适用

于死的固定样品,如何实现低损伤、视频级时间分辨 STORM 仍是亟待解决的科学问题。此外,目前 STORM 所使用的荧光探针仅有红外区探针闪烁效率较高,迫切需要蓝绿可见光波段闪烁性良好的荧光探针。STORM 技术与电镜的联合成像在制样等诸多过程中均存在妥协之处,优化制样流程或研发出具有强大耐受能力的荧光探针对于凸显各自优势也十分关键。

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] 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.
- [3] Wei Tongda, Zhang Yunhai, Yang Haomin. Super resolution imaging technology of stimulated emission depletion [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2016, 45(6): 0624001. (in Chinese)
魏通达, 张运海, 杨皓旻. 受激辐射损耗超分辨成像技术研究[J]. *红外与激光工程*, 2016, 45(6): 0624001.
- [4] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [5] Bates M, Huang B, Rust M J, et al. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-796.
- [6] Xu K, Babcock H P, Zhuang X. Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(2): 185-188.
- [7] Hinterdorfer P, Oijen A. Handbook of Single-Molecule Biophysics [M]. New York: Springer, 2009.
- [8] Herbert S, Soares H, Zimmer C, et al. Single-molecule localization super-resolution microscopy: deeper and faster [J]. *Microscopy and Microanalysis*, 2012, 18(6): 1419-1429.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Pan Leiting, Hu Fen, Zhang Xinzheng, et al. Multicolor single-molecule localization super-resolution microscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(3): 0318010. (in Chinese)
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.
- [13] 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(3): 2463–2468.
- [14] Zhengyang Z, Samuel J K, Margaret H, et al. Ultrahigh-throughput single-molecule spectroscopy and spectrally resolved super-resolution microscopy [J]. *Nature Methods*, 2015, 12(10): 935–938.
- [15] Dong B, Luay A, Urban B E, et al. Super-resolution spectroscopic microscopy via photon localization [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12290.
- [16] Shechtman Y, Weiss L E, Backer A S, et al. Multicolour localization microscopy by point-spread-function engineering [C]//SPIE Bios, 2016, 9714: 971400L.
- [17] Hauser M, Wojcik M, Kim D, et al. Correlative super-resolution microscopy: new dimensions and new opportunities [J]. *Chemical Review*, 2017, 117: 7428–7456.
- [18] Watanabe S, Punge A, Hollopeter G, et al. Protein localization in electron micrographs using fluorescence nanoscopy [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(1): 80–84.
- [19] Suleiman H, Zhang L, Roth R, et al. Correction: Nanoscale protein architecture of the kidney glomerular basement membrane [J]. *Elife*, 2013, 2(2): e01149.
- [20] Wojcik M, Hauser M, Wan L, et al. Graphene-enabled electron microscopy and correlated super-resolution microscopy of wet cells [J]. *Nature Communications*, 2015, 6(3): 7384.
- [21] Löschberger A, Franke C, Krohne G, et al. Correlative super-resolution fluorescence and electron microscopy of the nuclear pore complex with molecular resolution [J]. *Journal of Cell Science*, 2014, 127(20): 4351–4355.
- [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] Moon S, Yan R, Kenny S J, et al. Spectrally resolved, functional super-resolution microscopy reveals nanoscale compositional heterogeneity in live-cell membranes [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(32): 10944–10947.
- [24] Kim D, Zhang Z, Xu K. Spectrally resolved super-resolution microscopy unveils multipath reaction pathways of single spiropyran molecules [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(28): 9447–9450.
- [25] Ge L, Zhang M, Kenny S J, et al. Remodeling of ER-exit sites initiates a membrane supply pathway for autophagosome biogenesis [J]. *EMBO Reports*, 2017, 18(9): 1586–1603.
- [26] Karanasios E, Walker S A, Okkenhaug H, et al. Autophagy initiation by ULK complex assembly on ER tubulovesicular regions marked by ATG9 vesicles [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12420.
- [27] Hu Y, Cang H, Lillemeier B F. Superresolution imaging reveals nanometer- and micrometer-scale spatial distributions of T-cell receptors in lymph nodes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(26): 7201–7206.
- [28] Schöneberg J, Lehmann M, Ullrich A, et al. Lipid-mediated PX-BAR domain recruitment couples local membrane constriction to endocytic vesicle fission [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15873.
- [29] Suleiman H Y, Roth R, Jain S, et al. Injury-induced actin cytoskeleton reorganization in podocytes revealed by super-resolution microscopy [J]. *JCI Insight*, 2017, 2(16): 94137.