



纳米级光学超分辨成像技术研究及展望*

潘天颖 谷陆生 纪伟**

(中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 荧光显微成像技术能够将细胞生理活动可视化,是现代生命科学研究的重要手段。超分辨成像技术的出现将研究推进到亚细胞结构层次,而具有纳米级分辨率的单分子定位成像技术成为了研究细胞器、大分子复合物空间分布及相互作用的有力工具。继2014年超分辨成像技术获得诺贝尔化学奖后,《自然》(Nature)发布的2024年值得关注的七大技术中再次将纳米级分辨率光学成像技术作为热点进行介绍,超高分辨率成像技术是重要的前沿研究领域。本文首先简要介绍了荧光显微成像技术的发展历史、荧光显微镜的基础概念、超分辨成像技术的基本概况,之后着重介绍了单分子超分辨成像技术的研究进展,并在最后对该技术的发展及应用做了展望。

关键词 超分辨成像技术, 单分子定位成像技术, 多色成像, 三维成像, 纳米级成像技术

中图分类号 Q2, TH742

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0367

1 超分辨光学成像技术

1.1 荧光显微成像技术

荧光显微技术的出现与发展促进了科学研究的进步,加深了人类对于微观生命世界的认知,是现代生命科学研究必不可少的工具。

通常,荧光显微镜系统由激发光路和成像光路两部分组成,激发光路实现样品荧光信号的激发,成像光路则是实现荧光信号的收集。样品焦面的荧光信号(可视的点光源)经过物镜、筒镜聚焦到相机,这个过程可以简化为夫琅禾费衍射系统。根据夫琅禾费衍射原理,理想点光源到达相机并非成像为一个点,而是一个艾里斑。当两个信号点所成像的艾里斑中心间距小于其半径时,将无法区分这两个点,即无法分辨。定义恰好能够分辨开两个点的距离为分辨率,故分辨率取决于艾里斑的大小。

艾里斑的大小定义为其一阶极小值的位置,这个范围内包含了整个艾里斑84%的能量。瑞利判据定义了一个艾里斑的极大值与另一个艾里斑的极小值位置重叠时相距的距离为分辨两个点的极限距离,根据该判据,系统横向分辨率为^[1-2]:

$$d_{xy} = \frac{0.61\lambda}{N.A.}$$

显微镜系统的轴向分辨率通过计算离焦信号的夫琅禾费来获得,根据瑞利判据,系统轴向分辨

率为^[1-2]:

$$d_z = \frac{2\lambda}{N.A.^2}$$

其中 $N.A.$ 表示物镜的数值孔径 (numerical aperture)。例如,在使用 $N.A.=1.5$ 的物镜,所收集荧光信号的发射波长在 450~700 nm 情况下,传统荧光显微镜所能够得到的横向分辨率为 180~285 nm,轴向分辨率为 400~625 nm。衍射极限的存在限制了荧光显微镜解析亚细胞结构的能力,分辨率的提升是显微成像领域最重要研究方向之一。

1.2 超分辨成像技术简介

进入本世纪,随着标记技术、光学成像技术、探测器灵敏度提升等领域进步,多种突破衍射极限的超分辨成像技术被提出,实现了亚细胞结构的精细成像,如细胞骨架、细胞器、核孔复合物等^[3],超分辨成像技术也在2014年被授予诺贝尔化学奖。

超分辨成像技术可以分为基于激发光空间调制技术和基于单分子定位两大类,前者主要包括受激发射损耗显微术 (stimulated emission depletion, STED)^[4-6]、结构光照明显微术 (structured illumination microscopy, SIM)^[7-10] 及衍生技术,

* 国家重点研发计划 (2022YFC3400602) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64888846, E-mail: jiwei@ibp.ac.cn

收稿日期: 2024-08-13, 接受日期: 2024-09-20

后者常统称为单分子定位显微术 (single molecule localization microscopy, SMLM), 包括光敏定位显微术 (photo-activated localization microscopy, PALM)^[11-12]、随机光学重构显微术 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)^[13]、纳米级形貌点积累技术 (point accumulation for imaging in nanoscale topography, PAINT) 及衍生技术^[14-16]。

STED技术通过圆形激发光与环形耗尽光相继照射样品进行成像, 耗尽光区域荧光分子由于受激辐射而发出与耗尽光相同波长的受激辐射光, 而中心区域的荧光分子能够发射出正常荧光信号被接收。通过耗尽光的光饱和作用, 能够达到缩小激发区域的效果, 使得系统点扩散函数 (point spread function, PSF) 更小, 实现更高分辨率。耗尽光的光功率决定了STED系统的分辨率, 目前商业化的STED显微镜可达到20~60 nm的空间分辨率^[17-18]。

SIM技术使用条纹状激发光照射样品, 条纹激发光与样品自身空间频率发生混频, 将包含样品细

节的高频信息调制到低频区域, 从而可以被显微镜收集。收集到的低频信号经过后处理还原为原始信号, 就可以获得更多样品细节信息, 提升成像分辨率。目前, 商业化的SIM显微镜可达到60~90 nm的空间分辨率。

SMLM技术利用能够进行亮态-暗态转换 (通常形容为“闪烁”) 的荧光分子, 将空间尺度上密不可分荧光信号在时间维度上分开。通过对一系列单分子图像中荧光分子信号的拟合与定位, 实现超分辨率图像重构。为了获取足够的单分子信号, 通常需要采集数千到数万帧的图像。目前, SMLM利用普通的全内反射照明显微镜可以达到10~20 nm的空间分辨率。

单分子定位成像技术的关键是实现荧光分子的稀疏激活、随机闪烁。PALM用荧光蛋白标记, 依靠激活光来控制处于激发态的单分子数目^[11] (图1a), STORM依靠具有光转换性质的Cy3-Cy5染料对来实现^[13] (图1b)。目前, 被广泛应用的单分子定位成像技术是dSTORM (direct-STORM), 这种

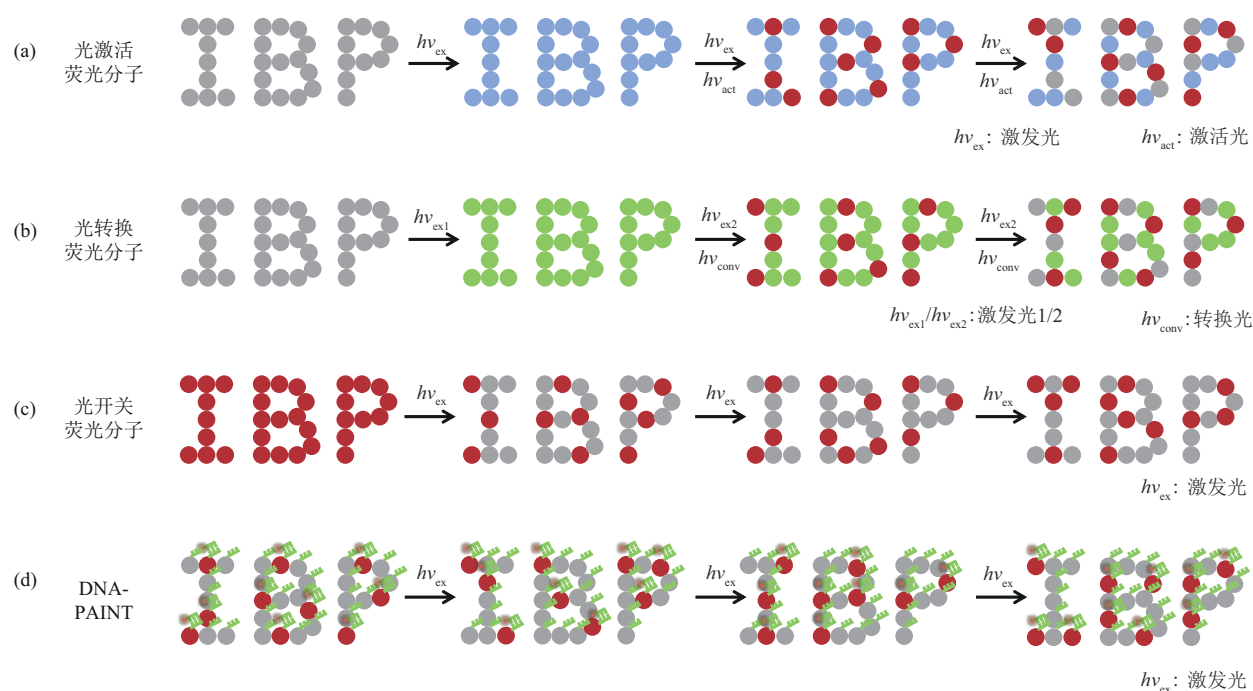


Fig. 1 Working principle of photo-activation, photo-conversion, and photo-switch fluorescent molecules, and DNA-PAINT imaging

图1 光激活、光转换、光开关荧光分子及DNA-PAINT原理示意图

(a) 光激活荧光分子的发光原理: 光激活荧光分子在激发光的照射下并不会直接发出所需波段的荧光信号, 在特定波长的激活光照射后部分荧光分子不可逆地变为发射所需波段的荧光状态, 通过激活光来调制处于发射所需波段的荧光分子的数目; (b) 光转换荧光分子的发光原理: 光转换荧光分子在第一种激发光下可发出一种波段的荧光信号, 在经过特定波段的转换光照射下, 会不可逆地转变为发射另一个波段的荧光分子; (c) 光开关荧光分子的发光原理: 光开关荧光分子在激发光的照射下能够在亮态和暗态之间切换; (d) DNA-PAINT标记技术的原理示意图, 目标结构被标记上短DNA单链 (docking strand), 成像溶液中弥散着连接染料的与docking strand序列互补的成像链 (imager), 当docking strand和imager结合时, 所标记位点则处于荧光状态, 未结合的imager形成图像的背景。

技术使用具有光开关性质的染料标记样品, 如目前常用的 Alexa Fluor 647 和 CF 660C 染料等 (图 1c)。

除了利用上述具有光激活、光转换、光开关性质的荧光分子或分子对来实现闪烁的效果, 还可以通过 PAINT 技术来实现。PAINT 的原理是借助荧光基团瞬时、反复与目标结构结合-解离达到闪烁的效果^[14-15]。目前, 常用的 DNA-PAINT 技术即利用 DNA 碱基互补配对的特性, 构建两条互补的 DNA 单链分别与样品、染料结合实现单分子闪烁的效果^[16] (图 1d), 这两条单链分别称为锚定链 (docking strand) 和成像链 (imager strand 或 imager)。

目前, 借助具有光开关性质的染料分子 (Alexa Fluor 647 及 CF 660C) 及借助 DNA-PAINT 技术是实现单分子定位成像的主要手段。单分子定位超分辨成像技术是能够获取最高分辨率的成像手段之一, 除了分辨率提升是其重要研究方向, 多色和三维成像的研究对于解决生命科学问题同样是关键的。

2 单分子定位超分辨成像技术发展

2.1 多色单分子定位超分辨成像技术

2.1.1 多色单分子定位超分辨成像技术简介

多色成像即用不同的荧光探针标记不同的结构, 获取同一区域内多种结构的位置信息, 可以用来研究细胞器相互作用、蛋白质共定位等。目前主要的多色成像方法包括: 顺序成像法^[19-20]、光谱分离法^[21-22]、光谱展开法^[23-25]、频率调制法^[26]等。

顺序成像法即利用不同通道的荧光探针去标记不同的结构, 依次对不同结构进行成像^[19], 双色 PALM 使用激活波长相同但是激发波长不同的两种光激活荧光蛋白, 一般会先成像长波长的荧光分子再成像短波长的荧光分子 (图 2a)。这种方法装置简单, 但需要较长的成像时间。性能优异的 STORM 荧光探针多在远红波段, 比如 Alexa Fluor 647 和 CF 660C, 常规基于带通滤光片的方法很难实现。Exchange-PAINT 通过使用不同序列的 docking 链标记不同结构, 用对应序列的 imager (可用相同染料修饰) 进行依次成像^[20], 每次更换 imager 需要进行清洗及换液。

光谱分离法基于荧光探针光谱的细微差异, 通过在成像光路中加入二向色镜, 将荧光信号分到两

路成像, 根据不同荧光探针在两路中光子数分布的差异实现多色成像 (图 2b)。基于发射光谱的光谱分离法依赖于荧光分子和二向色镜的组合, 一般能够同时成像的通道数不超过 3 个^[21]。除此, 基于荧光探针激发光谱的光谱分离技术通过高频振镜和声光可调谐滤波器的同步控制, 实现单个曝光时间内, 同一荧光分子在 620 nm、639 nm、671 nm 3 种激发光下的成像, 通过计算三路成像中光子数的差异实现了远红通道的四色成像^[22]。

光谱展开法通过将成像光路分成两路, 一路收集单分子信号, 另一路通过光学元件 (棱镜或光栅) 获取荧光探针的光谱曲线, 通过不同探针的光谱差异实现多色^[23-25] (图 2c)。通过光栅展开方法所获取的光谱范围更宽, 但因单分子重叠会带来串扰, 所以不适合标记密度高的样品。这类实现多色成像的方案需要多分出一路荧光信号用来做光谱展开, 所以用来进行定位的荧光信号光子数相应变少。2020 年, 对称分光的光谱展开法能够将两路对称展开的光谱叠加在一起进行单分子定位, 理论上能够避免光子数的浪费^[25]。

频率调制法主要是应用于 PAINT 成像领域, 通过分析荧光分子的亮-暗态转换频率来对目标分子做出区分 (图 2d), 对于 DNA-PAINT 来说, 可以通过调整锚定/成像链的 CG 含量、长度等来实现链结合-解离的时间差异从而实现多种目标分子成像^[26]。

2.1.2 多色单分子定位超分辨成像技术最新进展

2024 年 3 月,《细胞》(Cell) 期刊同时刊登了 Jungmann 课题组和 Bewersdorf 课题组在蛋白质空间分布相关的研究工作, 分别是 SUM-PAINT (Secondary label-based Unlimited Multiplexed DNA-PAINT) 技术^[28] 和 FLASH-PAINT (Fluorogenic Labeling in conjunction with transient Adapter-mediated Switching for High-throughput DNA-PAINT)^[29] 技术, 这两种技术为蛋白质空间分布研究提供可参考的方案设计。

SUM-PAINT^[28] 采取二级标记的方案设计, 目标结构标记上长度约 20 个碱基的单链 DNA, 称之为初级序列 (primary barcode), 二级标记序列 (secondary label) 设计为: 在与初级序列互补的单链 DNA 两端分别连接介导置换序列 (toehold) 及成像所需 docking strand 序列, docking strand 及对应的 imager 设计参考速度优化的快速 DNA-PAINT

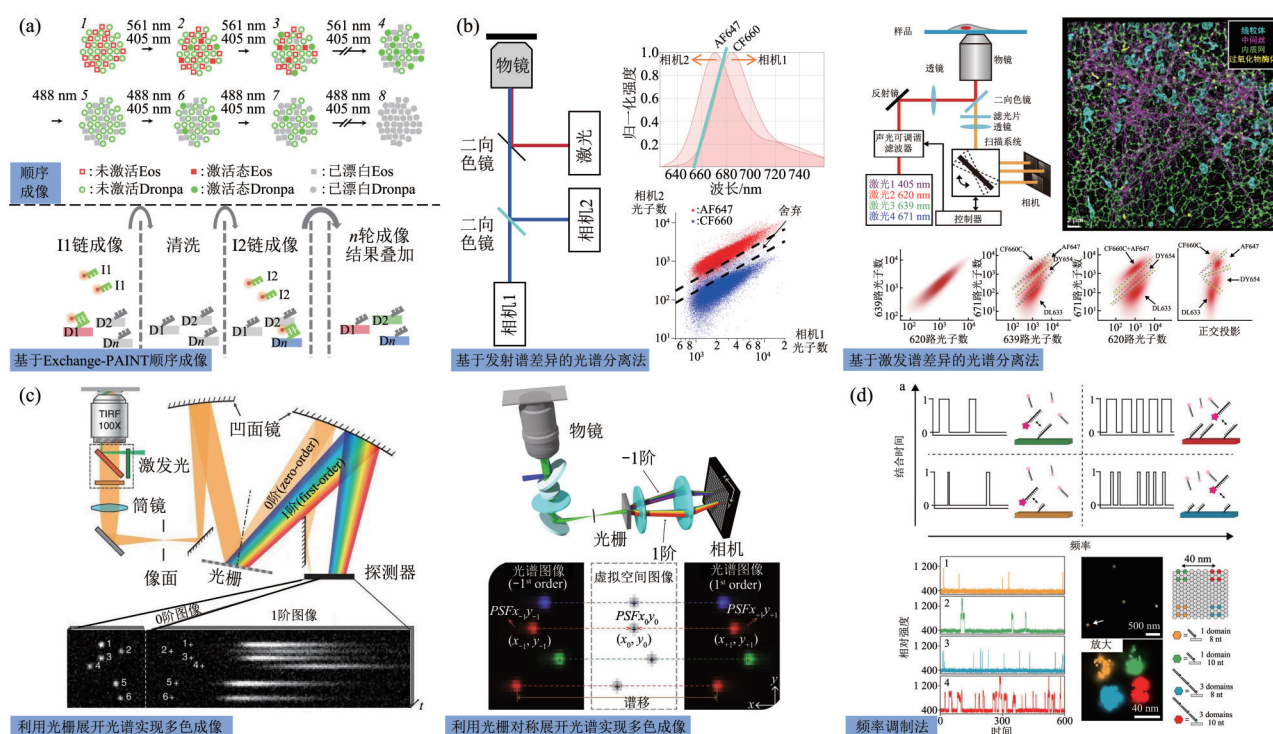


Fig. 2 Implementation methods of multi-color SMLM

图2 多色SMLM的实现方法

(a) 上下两部分分别展示为顺序成像的两种方法实现多色成像，上图：双色PALM^[19]，下图：Exchange-PAINT；(b) 左右两部分展示为基于光谱差异实现多色成像的方法，左图：基于发射谱差异的光谱分离技术（其中右下图来自于参考文献^[27]），右图：基于激发光谱差异的多色成像技术^[22]；(c) 左右两部分分别展示为基于光栅的光谱展开技术实现多色成像，左图：基于光栅展开光谱^[23]，右图：对称分光的光栅展开光谱^[25]；(d) 所示为DNA-PAINT技术利用频率调制方法来实现多色^[26]。

方案设计，toehold介导的链置换反应方便在多轮成像中间封闭已成像的二级标记序列（体外DNA折纸样品2 min达到大于98%信号封闭，细胞样品15 min达到约98%信号封闭），多轮成像之间会对样品进行清洗（图3）。Jungmann团队^[28]利用SUM-PAINT技术成像了海马神经元30种蛋白质（1个蛋白质成像需要17 min，平均定位精度为6.6 nm），加上成像两个蛋白质间的清洗时间，完成30种蛋白质成像所需时间在30 h左右。借助人工智能引导对890个突触的多种蛋白质含量的分析，发现了尚未报道的第三突触，其特征是兴奋性谷氨酸能突触囊泡池与抑制性突触后蛋白网络的核心骨架蛋白Gephyrin同时存在。

FLASH-PAINT^[29]原理上与SUM-PAINT相似，通过引入能够与瞬时结合链（transient adapter）互补配对的擦除链（eraser）来封闭已成

像的目标结构（封闭效率能达到98%），与SUM-PAINT对比，FLASH-PAINT引入擦除链后不需要清洗过程，减少了清洗可能带来的样品损伤，且多轮成像中相邻两个成像轮次间隔在1~10 min之间。利用该技术，Bewersdorf团队^[29]实现了U2OS细胞中9种蛋白质成像，平均定位精度约为11.2 nm。

SUM-PAINT和FLASH-PAINT本质上均是实现多色成像的技术，两种技术的成功应用表明了基于DNA-PAINT的单分子定位超分辨成像技术在空间蛋白质组学领域有很强的应用前景。

2.2 三维单分子定位超分辨成像技术

常用的三维单分子定位方法主要包括点扩散函数工程法（PSF engineering）^[30-31]，多层面成像法（multi-plane）^[32-33]，以及干涉测量法（interferometry）^[34-35]。

PSF工程法通过在成像光路中引入柱透镜或者

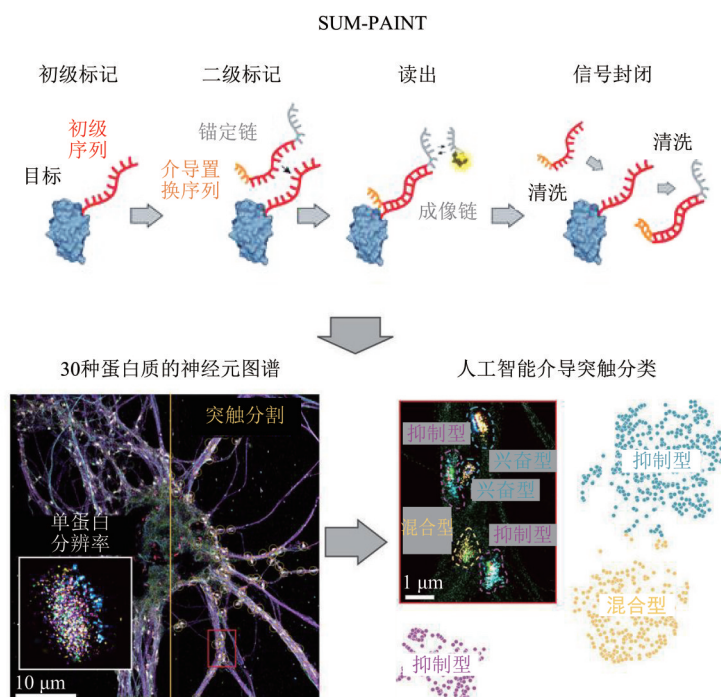


Fig. 3 Working principle of SUM-PAINT

图3 SUM-PAINT成像技术原理图

SUM-PAINT技术的原理及成像结果^[28], 上图: 原理图, 下图中左图所示为单蛋白分辨率成像了包含了30种蛋白质信息的神经元图谱, 图中小的黄色圆圈表示分割出的突触, 右图所示为放大的红色框, 并借助人工智能对突触进行分类。

空间光调制器等, 将单分子PSF改造为轴向位置变化而变化的形状。柱透镜法通过在成像光路中引入柱透镜, 使PSF产生像散, 像散的程度取决于信号的轴向位置 (图4a中(1))^[30]。双螺旋PSF (double-helix PSF, DH-PSF) 法通过空间光调制器法将PSF改造为双螺旋PSF, 通过解析两个点连线的角度即可获取分子的轴向位置 (图4a中(2))^[31]。

多层面成像法包括双平面法 (bi-plane) 和多焦面成像法 (multi-focus microscopy) 等, 双平面法是在成像光路中引入50:50分束器, 将荧光信号分成两路分别聚焦在相机上生成两个图像, 这两个图像的焦面有微小区别, 相对大小和亮度随着不同轴向位置产生变化, 通过这种变化也可以获得轴向位置信息 (图4a中(3))^[33]。多焦面成像法中利用多焦面衍射光栅获得间距相同的多个焦面, 多个焦面同时成像在相机不同区域实现三维成像^[32]。

干涉测量法主要是iPALM (interferometric-PALM) 技术^[34]和4Pi-SMS (4Pi-Single Marker Switching) 技术^[35], 以iPALM为例, 使用双物镜接收荧光信号, 两路荧光信号进入一个三路分光晶

体发生干涉, 所输出的三路荧光信号相位差为120度, 分别在相机获得单分子图像, 计算亮度的差异可获得荧光分子在轴向的位置信息 (图4b)^[34]。

2.3 纳米级超分辨光学成像技术

2.3.1 纳米级定位精度的MINFLUX技术

单分子定位精度公式可以近似表示为^[36]:

$$\sigma_{\text{SMLM}} \approx \frac{\sigma_{\text{PSF}}}{\sqrt{N}}$$

式中 σ_{PSF} 表示PSF在高斯拟合近似下的标准差, N 是单个荧光分子处于亮态时的光子数, 可以看出, 提升光子数是提升单分子定位的精度的重要手段之一。因此, 多个研究组通过低温成像^[37]、双物镜成像^[34]、新探针开发^[38]等手段来增加荧光分子的光子数, 以提高其定位精度, 但目前光子数的提升对于定位精度提升较为有限。

最小光通量显微镜 (minimal photon fluxes, MINFLUX)^[39]结合了STED环形激发光场及SMLM技术中所使用的光控荧光探针, 使用中心光强为0的环形激发光。若所检测的荧光分子处于该环形光中心, 则不会检测到荧光信号, 故实质上是定位荧光信号为0的位置来代表荧光分子的位

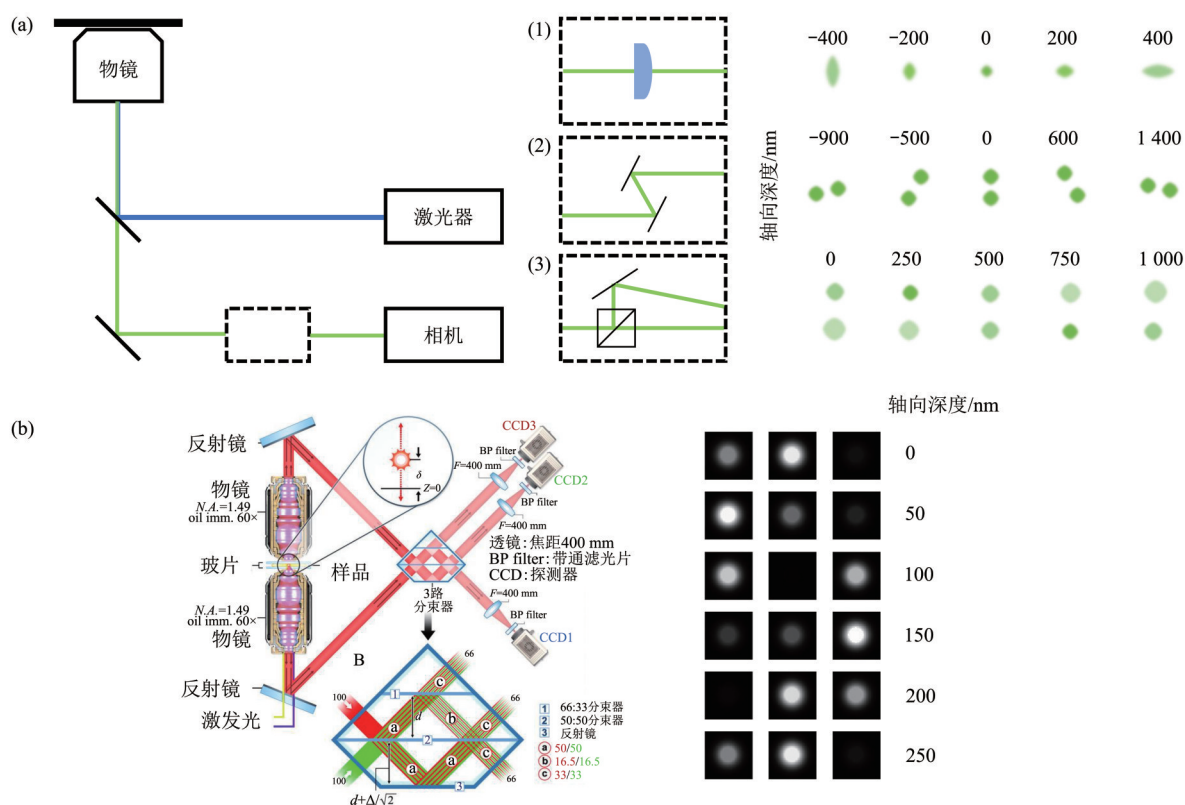


Fig. 4 Implementation methods of 3D SMLM

图4 三维SMLM的实现方法

(a) (1), (2), (3) 分别为柱透镜法、DH-PSF法、双平面法实现三维成像的光路示意图, 右侧所示分别为这几种方法的不同轴向位置PSF变化示意图; (b) iPALM^[34] 实现三维的光路示意图及不同轴向位置PSF的变化模拟图。

置。具体实现上, 通过将环形激发光中心分别与直径为 L 的圆心(初始位置)和圆周3等分点重合, 获取这4个位置的荧光信号, 通过荧光信号的差异(光子数差异)计算出荧光分子的位置, 其定位精度公式为:

$$\sigma_{\text{MINIFLUX}} \approx \frac{L}{2\sqrt{2N}}$$

式中 L 为视野大小, 理论上, 通过不断迭代减小 L , 可以获得更高的定位精度, 但是 L 值的减小限制了其成像视野和通量。该方法相比于STED只需要激发光不需要耗竭光, 具有更低的光毒性。

2.3.2 横向干涉单分子定位成像系统(ROSE)

中国科学院生物物理研究所的团队研制了重复光学选择性曝光技术(repetitive optical selective exposure, ROSE)^[40], ROSE技术基于单分子干涉测量的创新性原理, 采用3个不同相位的明暗相间的干涉条纹激发样品, 处于不同条纹激发状态的荧光分子会发出不同强度的信号, 结合已知的条纹周

期和相位, 可以计算出各荧光分子在条纹中的位置。

侧向干涉单分子定位成像系统(即ROSE系统)是一套二维定位系统, 采用共6组干涉条纹(x - y 每个方向各3组不同相位的条纹)照射样品, 根据成像所获取的6张子图像中目标分子荧光强度和干涉条纹相位可以计算出目标分子的精确位置信息。

系统设计的关键在于条纹切换时避免单分子荧光闪烁带来的影响, 因此需要足够快的干涉条纹切换速度和成像数据读出速度。该方法基于谐振振镜扫描的六条共轭成像光路, 通过将振镜与电光调制器同步实现6组干涉条纹与相机6个子区域相对应, 实现了高达8 kHz的分时成像, 确保了在相机单次曝光时间里将每个单分子发光状态均匀分配给6个干涉条纹, 避免了单分子毫秒级的亮度变化对定位精度的干扰(图5a)。理论上, ROSE定位精度是传统定位精度的2.4倍:

$$\sigma_{\text{ROSE}} \approx \frac{d}{\sqrt{2} \pi \sqrt{N}}$$

式中, d 表示干涉条纹的周期。首先, 经过纳米荧光微球实验验证在相同成像条件下, 使用干涉定位方法可以将定位精度提升2.4倍, 与理论计算相符合 (图5b)。进而, 利用稳定且可定量编程结构的DNA折纸 (DNA-Origami) 样品对系统性能进行

标定, 结果显示, 对于间距5 nm点阵结构, 干涉定位方法能够实现对各点进行分辨, 而传统的质心拟合方法无法分辨, 展示出ROSE系统接近分子水平的分辨率, 以及接近1 nm的定位精度 (图5c)。细胞微丝网络结构进行成像结果表明干涉定位方法对比传统拟合方法能够获得更高的分辨率 (图5d)。

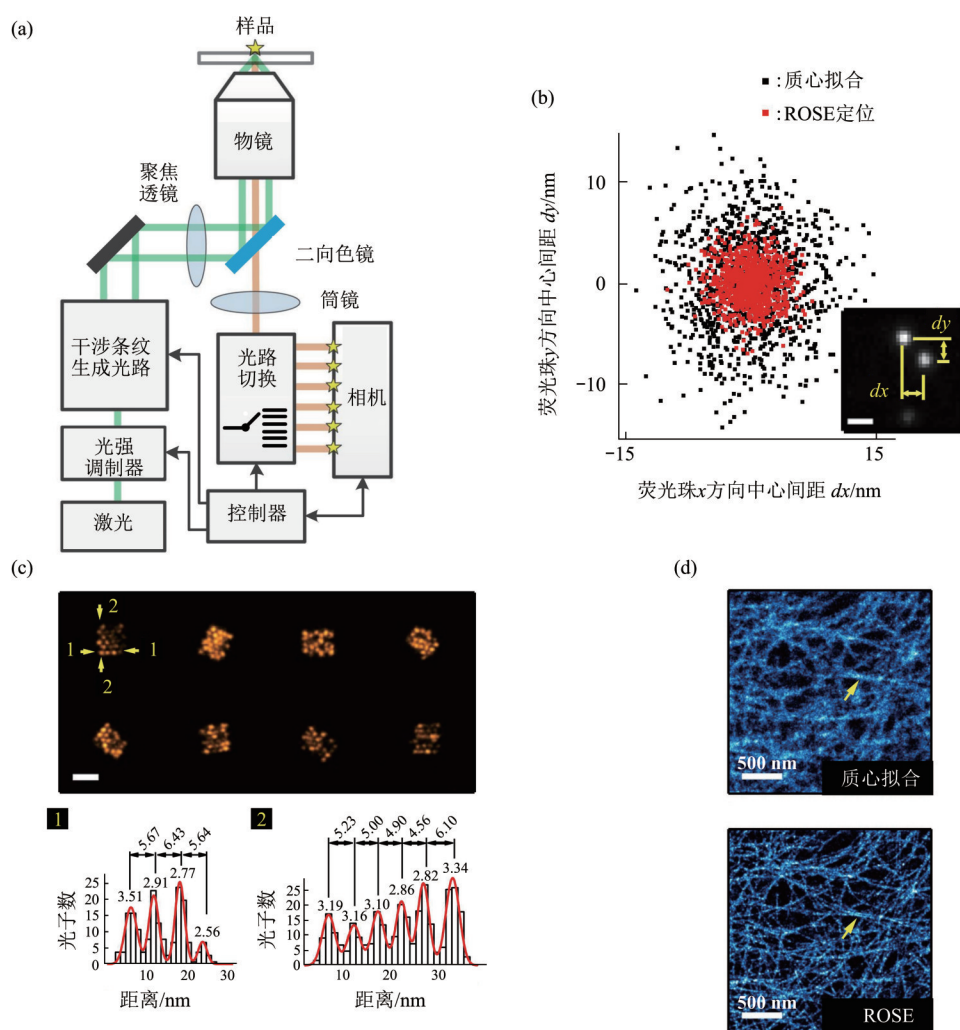


Fig. 5 Working principle and application of ROSE

图5 ROSE成像技术原理及应用

(a) ROSE技术光路图; (b) ROSE技术与质心拟合定位获取的两个荧光珠间距的二维分布; (c) ROSE技术成像间距5 nm点阵型DNA折纸的结果; (d) 质心拟合方法与ROSE技术对微丝结构的成像结果对比^[40]。

与ROSE同年发展的SIMFLUX和SIMPLE技术使用了和ROSE类似的干涉定位方法^[41-42], 实现了分辨率约1倍的提升。但是这两个方法未使用振镜, 而是通过顺序采集6个子图像进行定位, 因此无法避免荧光分子漂白、闪烁、发光时间短带来的误差和无效数据问题。

2.3.3 轴向干涉单分子定位成像系统 (ROSE-Z)

为了提高轴向定位精度, 团队又发展了ROSE-Z^[27]显微镜。ROSE-Z系统设计中采取非对称光路, 激光在照明光路中被分成两路, 一路通过物镜从下方照射样品, 另一路通过透镜等光学元件从上方照射样品, 在样品成像区域产生局部干涉条

纹(图6a),透镜的焦距较长,保证样品上方有足够的空间,规避了上述问题。

利用纳米荧光珠对系统进行验证,基于干涉测量的ROSE-Z技术同柱面镜法相比,轴向定位精度提高了6~8倍,可以实现轴向的超高分辨成像,利用ROSE-Z技术能够清晰分辨微管的中空管状结构(图6b)。

ROSE-Z技术已成功应用于多个生物学研究中。在和广州妇女儿童医疗中心合作的工作中,利用ROSE-Z技术揭示了精子鞭毛中卷曲螺旋结构域的176蛋白(coiled-coil domain-containing 176, CCDC176)定位在第1和第9组微管双联管内

侧^[43](图6c);在和中国科学院遗传与发育生物学研究所合作的工作中,利用ROSE-Z成像发现非中心体微管负端结合蛋白(calmodulin-regulated spectrin-associated proteins, CAMSAPs)定位于部分微管交叉处,CAMSAP2和CAMSAP3缺失会导致微管间距离减小^[44](图6d)。

与ROSE-Z同年发展的ModLoc技术^[45],使用斜向条纹进行干涉单分子定位成像,实现轴向定位精度的提升,但是该方法单次成像厚度内只能有一个条纹周期,导致定位精度约为ROSE-Z的1/3~1/2。

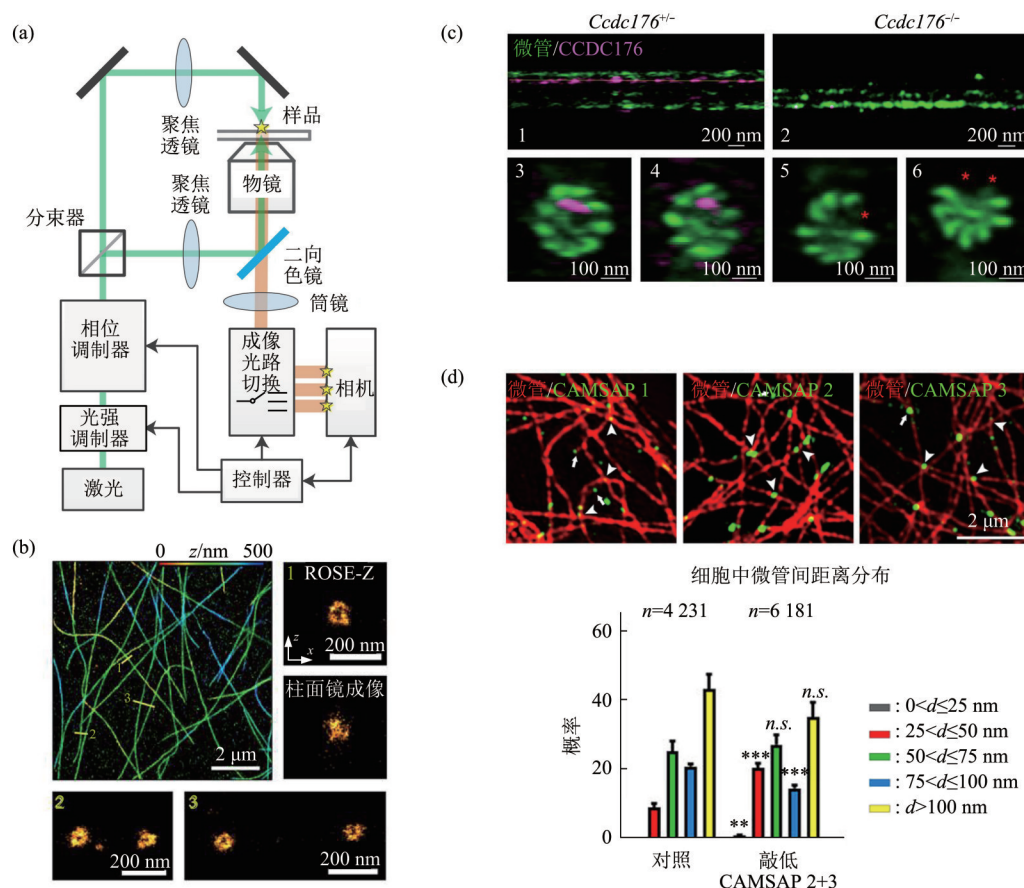


Fig. 6 Working principle and application of ROSE-Z

图6 ROSE-Z成像技术原理及应用

(a) ROSE-Z光路图^[27]; (b) ROSE-Z能够解析出微管中空结构^[27]; (c) ROSE-Z技术成像正常精子鞭毛轴丝的纵截面1和横截面3、4以及CCDC176敲除的精子鞭毛纵截面2和横截面5、6^[43]; (d) 借助ROSE-Z技术成像分析微管交叉处间距与CAMSAP 2和CAMSAP 3蛋白的关系,上图表示CAMSAP 2和CAMSAP 3与微管交叉处有共定位关系,下图所示为对照组和CAMSAP 2和CAMSAP 3敲低组微管交叉处间距的统计关系^[44]。

2.3.4 其他新型纳米成像技术方法

单分子定位成像技术及超分辨技术不断蓬勃发

展,也在不断地走向新的高度,如最新的MINSTED^[46]、RESI (resolution enhancement by

sequential imaging)^[47]、ONE (one-nanometer expansion microscopy)^[48] 技术。其中, RESI 成像技术通过随机标记目标结构并将多帧数据融合定位分析的方式实现了埃级分辨率^[47], 对核孔复合物进行成像能够清晰分辨双层结构及每个亚基的两个 Nup96 蛋白 (图 7a), 借助 DNA 折纸结构成像能够分辨出碱基间距约为 0.85 nm (图 7b)。

ONE 成像技术^[48], 通过将样品各向同性膨胀

10 倍 (体积膨胀 1 000 倍) 的技术与荧光波动分析结合, 获得了优于 1 nm 的分辨率。通过成像体外纯化蛋白质样品, 可以重构出免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)、免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA)、免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM) 单个蛋白质的形状 (图 7c)。

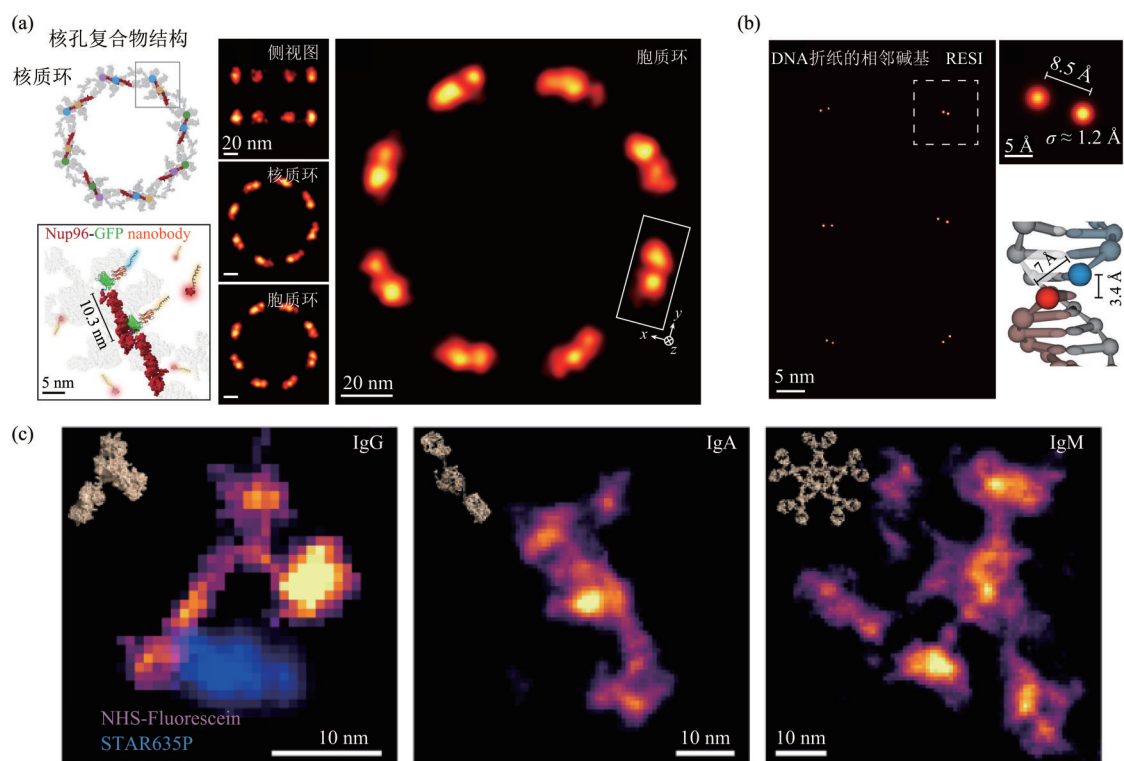


Fig. 7 Imaging results of RESI and ONE
图7 RESI和ONE技术成像效果图

(a, b) RESI技术成像单个核孔复合物结构及DNA相邻碱基的间距^[47]; (c) ONE技术成像IgG、IgA、IgM, 使用NHS-Fluorescein对3种蛋白质进行标记, IgG上面携带STAR635P染料^[48]。

3 展 望

单分子定位成像技术具有超高空间分辨率的优势, 在大分子复合物原位成像、定量分析等领域有广泛应用前景, 有望做到同时从细胞尺度和单分子尺度理解生命系统的空间组织架构和相互作用, 更深入地理解细胞生理机制。SMLM技术的成像模式以及本质“时间分辨率换空间分辨率”的策略使得其在高通量成像、厚样本成像、活细胞成像等方面的应用受限, 但相应的解决方案也一直在被发展, 包括硬件、算法的创新^[49-51], 以及样品制备、

荧光探针的改进^[52-54]。另外, 结合深度学习算法来提升SMLM技术的成像速度、成像通量是未来重要发展方向之一^[55-58]。综上, 单分子定位成像技术能够对亚细胞结构及大分子复合物进行纳米分辨率原位成像, 是生物医学研究的重要手段。

参 考 文 献

[1] Rayleigh. XXXI. Investigations in optics, with special reference to the spectroscope. The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, 1879, 8(49): 261-274

[2] Latychevskaia T. Lateral and axial resolution criteria in incoherent

- and coherent optics and holography, near- and far-field regimes. *Appl Opt*, 2019, **58**(13): 3597-3603
- [3] Lelek M, Gyparakis M T, Beliu G, *et al.* Single-molecule localization microscopy. *Nat Rev Methods Primers*, 2021, **1**: 39
- [4] Hell S W. Toward fluorescence nanoscopy. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(11): 1347-1355
- [5] Hell S W, Kroug M. Ground-state-depletion fluorescence microscopy: a concept for breaking the diffraction resolution limit. *Appl Phys B*, 1995, **60**(5): 495-497
- [6] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett*, 1994, **19**(11): 780-782
- [7] Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(37): 13081-13086
- [8] Gustafsson M G. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc*, 2000, **198**(Pt 2): 82-87
- [9] Gustafsson M G L, Shao L, Carlton P M, *et al.* Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys J*, 2008, **94**(12): 4957-4970
- [10] Neil M A, Juskaitis R, Wilson T. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope. *Opt Lett*, 1997, **22**(24): 1905-1907
- [11] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 2006, **313**(5793): 1642-1645
- [12] Hess S T, Girirajan T P K, Mason M D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys J*, 2006, **91**(11): 4258-4272
- [13] Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods*, 2006, **3**(10): 793-795
- [14] Giannone G, Hossy E, Levet F, *et al.* Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living cells at ultra-high density. *Biophys J*, 2010, **99**(4): 1303-1310
- [15] Sharonov A, Hochstrasser R M. Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(50): 18911-18916
- [16] Jungmann R, Steinhauer C, Scheible M, *et al.* Single-molecule kinetics and super-resolution microscopy by fluorescence imaging of transient binding on DNA origami. *Nano Lett*, 2010, **10**(11): 4756-4761
- [17] Willig K I, Rizzoli S O, Westphal V, *et al.* STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature*, 2006, **440**(7086): 935-939
- [18] Huang B, Bates M, Zhuang X. Super-resolution fluorescence microscopy. *Annu Rev Biochem*, 2009, **78**: 993-1016
- [19] Shroff H, Galbraith C G, Galbraith J A, *et al.* Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(51): 20308-20313
- [20] Jungmann R, Avendaño M S, Woehrstein J B, *et al.* Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT. *Nat Methods*, 2014, **11**(3): 313-318
- [21] Schönle A, Hell S W. Fluorescence nanoscopy goes multicolor. *Nat Biotechnol*, 2007, **25**(11): 1234-1235
- [22] Wu W, Luo S, Fan C, *et al.* Tetra-color superresolution microscopy based on excitation spectral demixing. *Light Sci Appl*, 2023, **12**(1): 9
- [23] Dong B, Almassalha L, Urban B E, *et al.* Super-resolution spectroscopic microscopy via photon localization. *Nat Commun*, 2016, **7**: 12290
- [24] Zhang Z, Kenny S J, Hauser M, *et al.* Ultrahigh-throughput single-molecule spectroscopy and spectrally resolved super-resolution microscopy. *Nat Methods*, 2015, **12**(10): 935-938
- [25] Song K H, Zhang Y, Brenner B, *et al.* Symmetrically dispersed spectroscopic single-molecule localization microscopy. *Light Sci Appl*, 2020, **9**: 92
- [26] Wade O K, Woehrstein J B, Nickels P C, *et al.* 124-color super-resolution imaging by engineering DNA-PAINT blinking kinetics. *Nano Lett*, 2019, **19**(4): 2641-2646
- [27] Gu L, Li Y, Zhang S, *et al.* Molecular-scale axial localization by repetitive optical selective exposure. *Nat Methods*, 2021, **18**(4): 369-373
- [28] Unterauer E M, Shetab Boushehri S, Jevdokimenko K, *et al.* Spatial proteomics in neurons at single-protein resolution. *Cell*, 2024, **187**(7): 1785-1800.e16
- [29] Schueder F, Rivera-Molina F, Su M, *et al.* Unraveling cellular complexity with transient adapters in highly multiplexed super-resolution imaging. *Cell*, 2024, **187**(7): 1769-1784.e18
- [30] Huang B, Wang W, Bates M, *et al.* Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, 2008, **319**(5864): 810-813
- [31] 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(9): 2995-2999
- [32] Abrahamsson S, Chen J, Hajj B, *et al.* Fast multicolor 3D imaging using aberration-corrected multifocus microscopy. *Nat Methods*, 2013, **10**(1): 60-63
- [33] Juetten M F, Gould T J, Lessard M D, *et al.* Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples. *Nat Methods*, 2008, **5**(6): 527-529
- [34] Shtengel G, Galbraith J A, Galbraith C G, *et al.* Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(9): 3125-3130
- [35] Huang F, Sirinakis G, Allgeyer E S, *et al.* Ultra-high resolution 3D imaging of whole cells. *Cell*, 2016, **166**(4): 1028-1040
- [36] Ober R J, Ram S, Ward E S. Localization accuracy in single-molecule microscopy. *Biophys J*, 2004, **86**(2): 1185-1200
- [37] Kaufmann R, Schellenberger P, Seiradake E, *et al.* Super-resolution microscopy using standard fluorescent proteins in intact cells under cryo-conditions. *Nano Lett*, 2014, **14**(7): 4171-4175

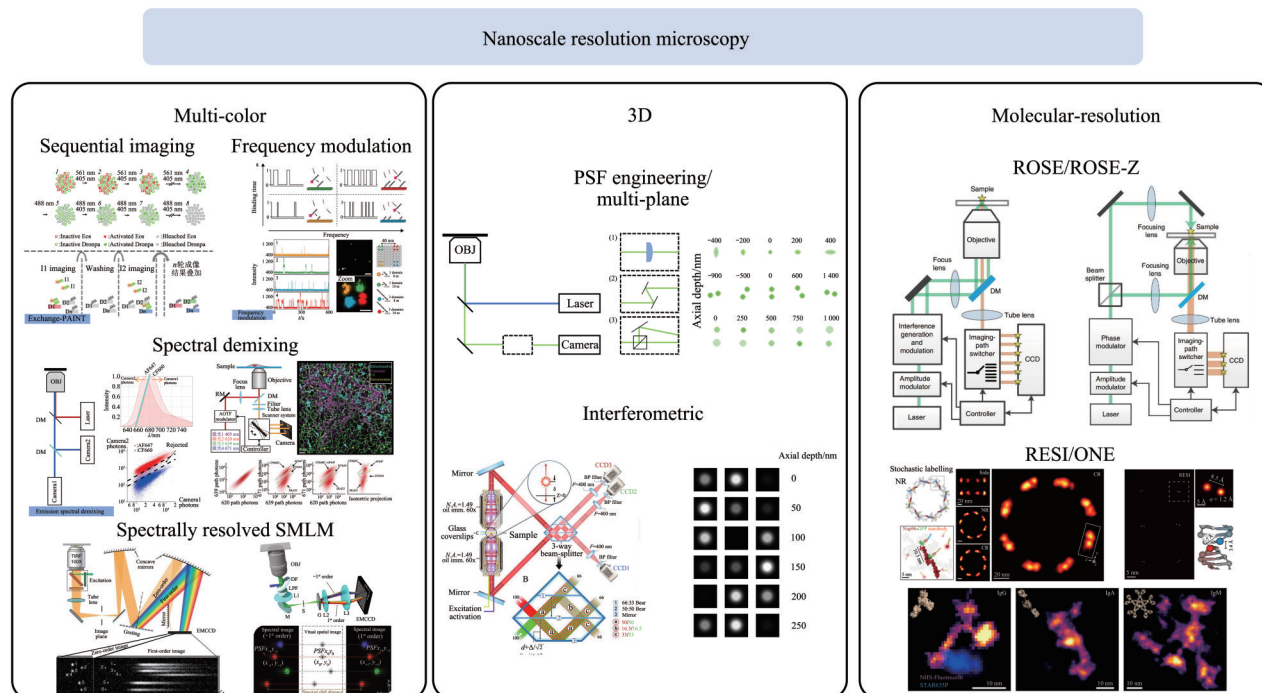
- [38] Grimm J B, English B P, Chen J, *et al.* A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy. *Nat Methods*, 2015, **12**(3): 244-250, 3pfollowing250
- [39] Balzarotti F, Eilers Y, Gwosch K C, *et al.* Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes. *Science*, 2017, **355**(6325): 606-612
- [40] Gu L, Li Y, Zhang S, *et al.* Molecular resolution imaging by repetitive optical selective exposure. *Nat Methods*, 2019, **16**(11): 1114-1118
- [41] Cnossen J, Hinsdale T, Thorsen R Ø, *et al.* Localization microscopy at doubled precision with patterned illumination. *Nat Methods*, 2020, **17**(1): 59-63
- [42] Reymond L, Ziegler J, Knapp C, *et al.* SIMPLE: structured illumination based point localization estimator with enhanced precision. *Opt Express*, 2019, **27**(17): 24578-24590
- [43] Liu C, Wang Q, Gu L, *et al.* CCDC176 stabilizes microtubule doublets 1 and 9 to ensure proper sperm movement. *Curr Biol*, 2023, **33**(16): 3371-3388.e7
- [44] Zhang R, Gu L, Chen W, *et al.* CAMSAP2 and CAMSAP3 localize at microtubule intersections to regulate the spatial distribution of microtubules. *J Mol Cell Biol*, 2024, **15**(8): mjad050
- [45] Jouchet P, Cabriel C, Bourg N, *et al.* Nanometric axial localization of single fluorescent molecules with modulated excitation. *Nat Photonics*, 2021, **15**: 297-304
- [46] Weber M, Leutenegger M, Stoldt S, *et al.* MINSTED fluorescence localization and nanoscopy. *Nat Photonics*, 2021, **15**(5): 361-366
- [47] Reinhardt S C M, Masullo L A, Baudrexel I, *et al.* Ångström-resolution fluorescence microscopy. *Nature*, 2023, **617**(7962): 711-716
- [48] Shaib A H, Chouaib A A, Chowdhury R, *et al.* Visualizing proteins by expansion microscopy. *bioRxiv*, 2023. DOI: 10.1101/2022.08.03.502284
- [49] Fu S, Li M, Zhou L, *et al.* Deformable mirror based optimal PSF engineering for 3D super-resolution imaging. *Opt Lett*, 2022, **47**(12): 3031-3034
- [50] Mund M, van der Beek J A, Deschamps J, *et al.* Systematic nanoscale analysis of endocytosis links efficient vesicle formation to patterned actin nucleation. *Cell*, 2018, **174**(4): 884-896.e17
- [51] Huang F, Hartwich T M P, Rivera-Molina F E, *et al.* Video-rate nanoscopy using sCMOS camera-specific single-molecule localization algorithms. *Nat Methods*, 2013, **10**(7): 653-658
- [52] Strauss S, Jungmann R. Up to 100-fold speed-up and multiplexing in optimized DNA-PAINT. *Nat Methods*, 2020, **17**(8): 789-791
- [53] Shim S H, Xia C, Zhong G, *et al.* Super-resolution fluorescence imaging of organelles in live cells with photoswitchable membrane probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(35): 13978-13983
- [54] Sigal Y M, Speer C M, Babcock H P, *et al.* Mapping synaptic input fields of neurons with super-resolution imaging. *Cell*, 2015, **163**(2): 493-505
- [55] Nehme E, Weiss L E, Michaeli T, *et al.* Deep-STORM: super-resolution single-molecule microscopy by deep learning. *Optica*, 2018, **5**(4): 458
- [56] Fu S, Shi W, Luo T, *et al.* Field-dependent deep learning enables high-throughput whole-cell 3D super-resolution imaging. *Nat Methods*, 2023, **20**(3): 459-468
- [57] Speiser A, Müller L R, Hoess P, *et al.* Deep learning enables fast and dense single-molecule localization with high accuracy. *Nat Methods*, 2021, **18**(9): 1082-1090
- [58] Kim T, Moon S, Xu K. Information-rich localization microscopy through machine learning. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 1996

Research and Prospect for Nanoscale Resolution Microscopy*

PAN Tian-Ying, GU Lu-Sheng, JI Wei**

(National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Graphical abstract



Abstract Fluorescence microscopy is a vital tool in life science research, but the diffraction nature of light limits further observation of cells. Super-resolution imaging techniques provide deeper insights into cellular structures, including stimulated emission depletion microscopy (STED), structured illumination microscopy (SIM), and single-molecule localization microscopy (SMLM). Each of these methods offers unique advantages and principles that push the boundaries of spatial resolution beyond conventional diffraction limits. Among these techniques, SMLM stands out for its exceptional resolution, offering nanometer resolution and becoming a powerful tool for obtaining high-resolution images. SMLM is particularly valuable for studying the spatial distribution and interactions of organelles and macromolecular complexes. Following the award of the Nobel Prize in Chemistry in 2014, super-duper resolution imaging techniques were listed as one of *Nature*'s seven technologies to watch in 2024. The development of these techniques remains an important area of research. We introduce the development of multi-color SMLM, three-dimensional (3D) SMLM, and nanoscale resolution microscopes. We describe

* This work was supported by a grant from National Key Research and Development Program of China (2022YFC3400602).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-64888846, E-mail: jiwei@ibp.ac.cn

Received: August 13, 2024 Accepted: September 20, 2024

several methods to achieve multi-color SMLM. Sequential imaging and Exchange-PAINT require image targets in sequence, excitation or emission spectral demixing can obtain multi-color images simultaneously based on spectral difference between fluorescent dyes, dual-channel spectroscopic SMLM to achieve simultaneous imaging and spectral analysis of each molecule, and techniques based on binding kinetics of PAINT achieve multi-color by designing the blinking behavior of targets with engineered binding frequency and duration in DNA-PAINT. We then discuss various approaches for 3D imaging. Point spread function (PSF) engineering techniques manipulate the shape and properties of the PSF to improve 3D localization accuracy. Multi-plane imaging methods capture images from different focal planes and reconstruct them to obtain 3D information. Interferometry methods use single molecule interference to achieve high precision in axial localization, providing another way for high resolution 3D nanoscopy. Finally, we highlight advances in new nanoscale resolution microscopes based on modulated illumination patterns, including minimal photon fluxes (MINFLUX), repetitive optical selective exposure (ROSE), ROSE-Z, SIMFLUX, SIMPLE, and ModLoc. MINFLUX is known for its ability to achieve ultra-high resolution by detecting minimal photon fluxes from single molecules using a doughnut-shaped excitation spot to spatially modulate excitation intensities. Typically, we focus on ROSE and ROSE-Z, which outperform other techniques, using a resonant mirror to eliminate localization errors caused by fluorescence blinking. Recently, resolution enhancement by sequential imaging (RESI) and one nanometre expansion (ONE) was introduced to achieve resolution down to the Ångström scale. Nanoscopy serves as a new role between super resolution microscopy and structural biology and will lead to more discoveries in complex biological systems. Overall, this article provides a comprehensive overview of current advances in super-resolution imaging techniques, highlighting their contributions to overcoming the diffraction limit and enabling detailed observation of nanoscale biological structures, and provides an outlook on promising new techniques and applications. Through detailed descriptions of the principles, benefits, and applications of multi-color and 3D techniques, the article highlights new nanoscale imaging techniques that are expanding our ability to visualize and understand the intricate details of molecular and cellular processes. We hope that this article can be a primer resource for both newcomers and seasoned practitioners of SMLM.

Key words super resolution microscopy, single molecule localization microscopy, multi-color imaging, 3D imaging, nanoscopy

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0367