PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2021,48(11):1301~1315
www.pibb.ac.cn

超分辨显微成像技术在活细胞成像中的应用与发展*

张 娇 何 勤 武泽凯 于 斌 屈军乐 林丹樱**
（深圳大学生物医学光子学研究中心/物理与光电工程学院，光电子器件与系统重点实验室，深圳 518060）

摘要 超分辨显微成像技术（super-resolution microscopy，SRM）可以绕过光学衍射极限对成像分辨率的限制，让以前观察不到的纳米级结构实现可视化，这一重大研究进展推动了现代生命科学和生物医学研究的进步与发展. 细胞是生物体的基本组成单位，对活细胞内部的细微结构和动力学过程进行研究是掌握生命本质必不可少的途径. 但由于成像原理或条件的限制，早期的SRM技术在活细胞成像应用方面受到了不同程度的限制. 近几年来，随着SRM和相关技术的发展，SRM在活细胞成像研究中的应用也越来越多. 本文简要介绍目前常见的几种SRM技术的基本原理和特点，并在此基础上着重阐述它们在活细胞成像应用中所取得的最新研究进展和发展方向.

关键词 随机光学重构显微术，受激发射损耗显微术，结构光照明显微术，超分辨成像，活细胞成像
中图分类号 Q81，Q63 **DOI**：10.16476/j.pibb.2020.0427

细胞是生物体的基本组成单位，对细胞内部结构、相互作用以及动力学过程等进行研究，有助于人们对生命本质的理解与探索. 光学显微镜以及后来结合荧光标记发展起来的各种荧光显微成像技术，是在细胞水平研究生命科学和生物医学问题时必不可少的手段之一. 然而，由于光学系统中不可避免地存在衍射现象，这类技术的成像分辨率被限制在探测光波长的一半左右（即200~300 nm），最多只能分辨到细胞器水平，如线粒体、内质网等，而对于细胞器的内部结构以及细胞器间的相互作用等要求更高分辨率的情形则无能为力. 因此，想要观察到这些细微结构，通常需要采用电子显微镜（electron microscope，EM）等分辨率更高的技术手段. 但是，EM成像时必须固定细胞，且通常还需要进行脱水、包埋等特殊处理，无法适用于活细胞成像，得到的图像能否真实反映活细胞中的结构信息也不得而知. 近十几年来，超分辨显微成像技术（super-resolution microscopy，SRM）空前崛起，这种技术既利用了光学显微成像原有的无损性质，又可以很好地绕过衍射极限对成像分辨率的限制，实现对细胞中纳米级结构的超分辨成像，因此SRM技术的发明和发展对于生命科学和生物医学研究具有非常重要的意义.

目前常见的SRM技术从成像原理上可以分为三类（图1）：第一类基于单分子定位，包括随机光学重构显微术[1-3]（stochastic optical reconstruction microscopy，STORM）（图1a）和光激活定位显微术[4-5]（photo activated localization microscopy，PALM）等；第二类基于对成像系统点扩散函数（point spread function，PSF）的调制，典型代表为受激发射损耗显微术[6-7]（stimulated emission depletion microscopy，STED）（图1b）；第三类基于频域调制，主要指结构光照明显微术[8-9]（structured illumination microscopy，SIM）（图1c）等. 这些不同的SRM技术在生物样品中获得的空间分辨率通常在10~70 nm之间[10].

然而，对于大多数SRM技术而言，对活细胞直接进行超分辨成像到目前为止仍然是个不小的挑战. 这是因为，对于活细胞成像，需要考虑的除了

* 国家自然科学基金（61775144，61975131，61620106016，61525503，61835009）、广东省自然科学基金（2018A030313362）和深圳市科技计划（JCYJ20170818144012025，JCYJ20200109105411133，JCYJ20170818141701667，JCYJ20170412105003520）资助项目.
** 通讯联系人.
Tel：0755-26531592，E-mail：dylin@szu.edu.cn
收稿日期：2020-12-05，接受日期：2021-04-26

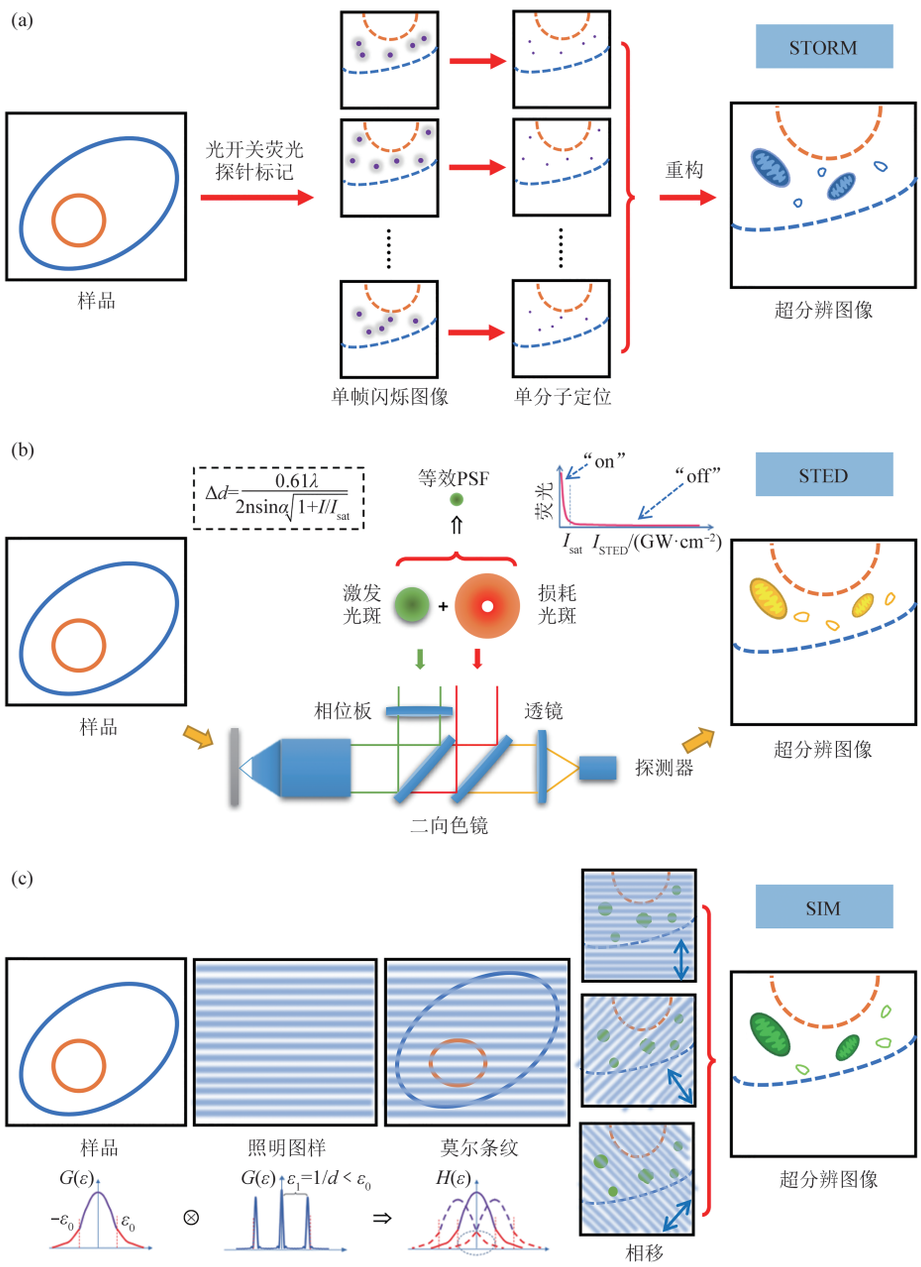


Fig. 1　Schematic diagram of three common super-resolution microscopic imaging technologies

图1　三种常见超分辨显微成像技术的原理示意图

（a）STORM；（b）STED；（c）SIM.

空间分辨率以外，还有时间分辨率和成像时长、荧光探针的光漂白和细胞的光损伤、图像信噪比等诸多问题. 不同的SRM技术在应用于活细胞超分辨成像时会遇到不同的困难，例如：相比于STED和SIM来说，STORM分辨率较高，但是对荧光探针的特殊要求和采集时间长的特点限制了其在活细胞应用中的发展；STED和SIM虽然不需要特殊的荧光探针，但是也存在空间分辨率和细胞活性或时间分辨率等不能同时兼顾的问题. 针对这些问题，近年来科学家们开展了大量的研究并取得了很好的进展. 本文从三种常见SRM技术的基本原理和特点出发，着重阐述它们在活细胞成像应用中的难点，并举例说明研究者们如何克服这些难点实现它们在活细胞中的超分辨成像，同时通过这些活细胞成像应用的介绍，展示SRM技术在生命科学和生物医学研究中更为广阔的应用前景. 此外，近几年来结合不同SRM技术的优势，研究者们还发展出了一些新型的SRM技术，本文将选取几种在活细胞超分辨成像方面有较大应用潜力的新型SRM技术加以介绍，展示活细胞SRM技术的最新发展趋势.

1　随机光学重构显微术（STORM）

1.1　基本原理及特点

2006年，Zhuang团队[1]首次提出STORM这一项SRM技术，基本原理是利用某些荧光团可在“开态”和“关态”间相互转换的性质，处于开态时可被激发产生荧光，而处于关态时即使在激发光照射下也不发射荧光. 利用这种性质，STORM在其成像的每一个周期内可以只随机让一小部分荧光团打开，其余荧光团暂时关闭，这样每一幅图像中荧光团的光斑不会重叠，可以高精度地定位出每个荧光团的位置. 重复这个过程，使每个周期内都随机打开一部分荧光团，这样就可以确定许多荧光团的位置. 最后将所有的定位信息叠加起来，就能重构出一幅超分辨图像. 可见，光开关荧光探针在STORM成像中扮演着非常重要的角色. 最初Zhuang团队使用的是他们在2005年设计的一对花菁染料[11]，即Cy3-Cy5，利用一个染料对另一个染料的激活实现光开关，得到了20 nm的成像分辨率. 后来，他们通过设计不同的花菁染料对，还实现了20~30 nm分辨率的多色STORM成像[12]. 2011年，他们对26种有机染料进行筛选，发现一些红色染料（如Alexa Fluor 647、Cy5和Dyomics 654）非常适合STORM成像[13]. 此后，van de Linde等[14]发现Alexa Fluor 647可以在不需要其他染料和激活光的前提下直接利用高强度激发光实现光开关，从而实现只需要一束激光的直接STORM成像（direct STORM，dSTORM），使样品标记和实验系统都进一步简化. 目前，荧光强度高、闪烁效果和光稳定性表现优良的Alexa Fluor 647作为商用探针已被广泛应用于STORM成像实验.

由于STORM实现超分辨是基于对每个荧光团的定位，因此这种技术也被称为单分子定位显微（single molecule localization microscopy，SMLM）[15-17]. 除了STORM，典型的SMLM技术还有Betzig等[4]提出的PALM技术等. PALM的基本原理和STORM相似，主要区别在于所采用的光开关荧光团不同，STORM采用的是花菁类荧光染料等有机分子进行标记和成像，而PALM采用的是光激活绿色荧光蛋白（photo activated green fluorescent protein，PA-GFP）等[18].

由于STORM等SMLM技术相比其他SRM方法对实验设备要求不高，而分辨率又较高，近十年来一直是SRM领域的研究热点，且发展非常迅速，在生物医学领域已有较广泛的应用. 然而，受荧光探针和成像过程特点的限制，STORM在活细胞成像中的应用仍然面临巨大的挑战. 首先，如前所述，STORM实现超分辨的第一个关键要素是光开关荧光探针[19]. 以商用染料Alexa Fluor 647为例，传统STORM实验中通常会将其耦联在抗体蛋白上，通过免疫荧光标记的方法标记到待识别的细胞结构上，因此细胞需要先固定，且实验过程中通常还需要加入成像缓冲液，其中过氧化氢酶、葡萄糖和葡萄糖氧化酶等构成的氧清除体系用于隔绝氧气以避免探针过早发生光漂白，而β-巯基乙醇等还原剂则可以使探针通过光化学反应实现光开关，但这种缺氧环境会使活细胞快速凋亡，因此并不适合长时间活细胞成像. 其次，STORM的单分子定位算法要求闪烁的荧光团光斑不能互相重叠，这就决定了每重构出一幅超分辨图像需要至少采集几万帧原始图像，从而导致成像的时间分辨率过低，在过长的成像过程中活细胞的内部结构会逐渐裂解. 所以，要想实现STORM在活细胞成像中的应用，至少需要从以下两个方面入手：a. 发展适合于高密度STORM数据处理的新算法；b. 更根本的，是从亮度、对比度以及光稳定性等方面筛选或开发适合活细胞标记和成像的光开关探针[20].

1.2　高密度算法的开发和应用

算法方面，早期发展的基于单分子定位的算法，如质心法[21]、高斯拟合法[22]和极大似然法[23]等主要用于处理低密度的STORM数据图像. 然而，这种单分子定位算法导致成像时间分辨率低，不适合活细胞成像实验. 2011年，Holden等[24]首先提出了一种高密度算法——DAOSTORM，可在荧光分子存在部分重叠时实现分子定位，不仅可以提高生物样品的超分辨图像质量，还能提高成像速度，相比单分子定位算法更适合活细胞超分辨成像. 2012年，Zhuang团队[25]提出了基于压缩感知（compressed sensing，CS）的高密度算法——CSSTORM，使得重构一幅超分辨图像的原始数据减少到169帧，从而很大程度上提高了成像的时间分辨率. 此后，研究者们陆续开发了多种适合高密度数据的新算法，例如FALCON[26-27]、ThunderSTORM[28]、TVSTORM[29]和WindSTORM[30-31]等，并用于STORM活细胞成像.

2020年，深圳大学屈军乐团队在CSSTORM算法基础上，进一步利用噪声校正主成分分析

（noise-corrected principal component analysis，NC-PCA）和K因子算法对原始数据进行噪声校正预处理，从而成功观察到活HeLa细胞线粒体的超精细结构及其在不同时间点的动力学过程[32]（图2）. 从图中可以看出，相对于传统的CSSTORM，结合了NC-PCA和K因子去噪预处理的CSSTORM算法不仅使分辨率得到明显提升（图2a），还可以很好地反映不同时间点线粒体的运动状态（图2b，不同颜色代表不同时间点）.

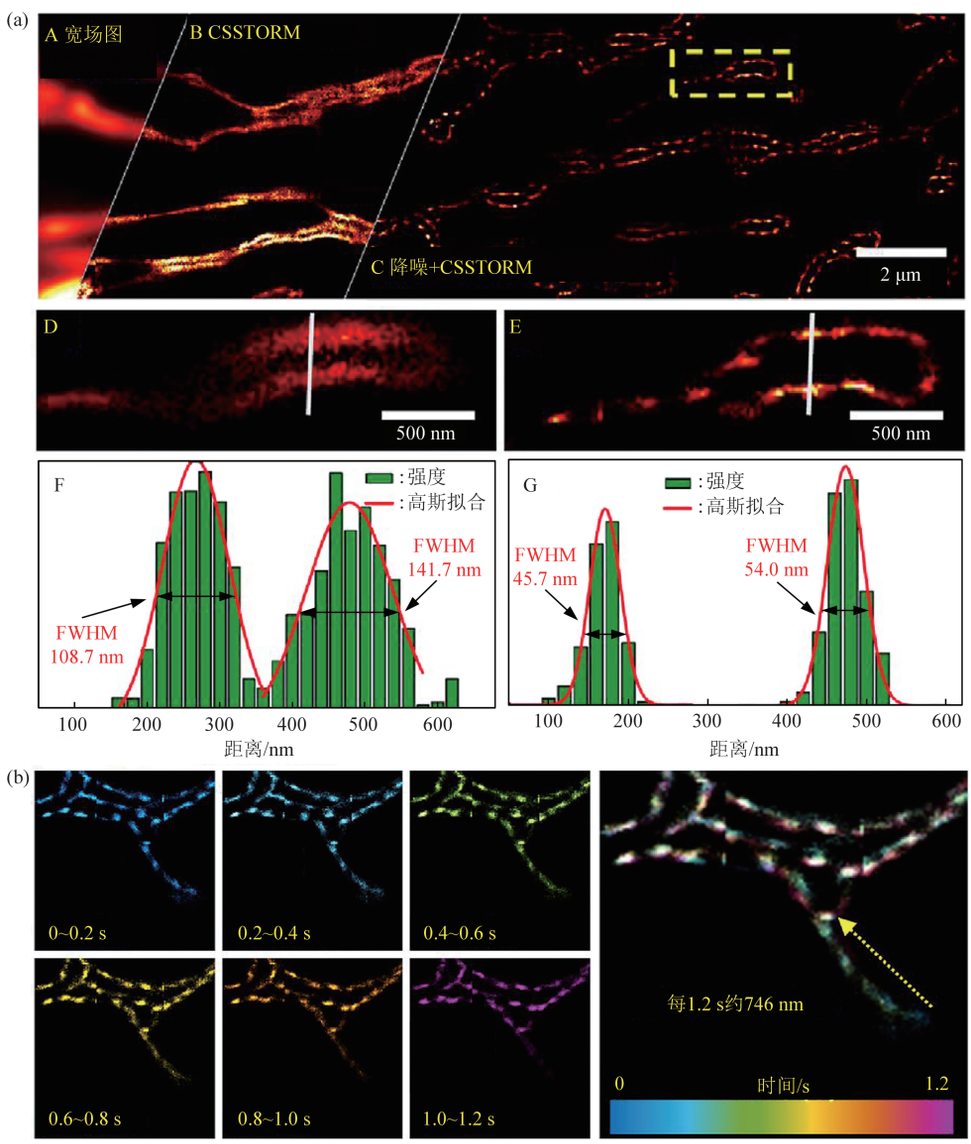


Fig. 2　Super-resolution image of mitochondria in live HeLa cells using De-noised CSSTORM algorithms[32]

图2　降噪CSSTORM算法用于活HeLa细胞线粒体超分辨成像[32]

（a）与传统CSSTORM结果的比较；（b）不同时间点线粒体的运动状态.

1.3　活细胞标记探针的开发和应用

然而，从上面的例子可以看出，即使有了高密度算法，要想很好地将STORM成像技术应用于活细胞超分辨成像，依然离不开适合活细胞标记和成像的光开关荧光探针的开发和使用. 目前应用比较成熟的方法有两大类：a. 采用蛋白质标签的方式，实现光开光荧光分子在特定目标蛋白质上的特异性标记，从而避免仅适用于固定细胞的免疫荧光标记流程；b. 膜染料的应用，这类探针大多是现有的商业探针，具有一定的光开关性质，且可以直接标记于活细胞质膜和细胞器膜，优点是获取和使用均比较方便，但缺点是这类探针的光开关性质通常也需要成像缓冲液，在长时间的活细胞成像中仍有一定限制. 以下分别介绍这两种方法在STORM活细胞

成像中的应用实例.

1.3.1　采用蛋白质标签的STORM活细胞成像

2009年，Heilemann等[33]发现ATTO655有机荧光团在含有巯基的溶液中处于一个较稳定的荧光关闭状态，例如β-巯基乙胺（MEA）或谷胱甘肽（GSH），当与氧气接触后，又可以切换到荧光打开状态. 2010年，Wombacher等[34]将ATTO655和甲氧苄啶标签（trimethoprim tag，TMP-tag）耦联在一起，对活HeLa细胞核中的H2B蛋白进行标记，实现了20 nm分辨率的活细胞STORM成像，成功观察到细胞核内的核蛋白复合物中有H2B的存在，而这种细节结构利用衍射受限的技术是观察不到的（图3a）. 另外，由于ATTO655在成像过程中需要氧气参与，从而成为适合活细胞长时间STORM超分辨成像的一个有利条件.

2011年，Zhuang团队利用类似的方法实现了活细胞的三维STORM超分辨成像[35]. 他们利用SNAP（stage-specific neurite associated protein）标签将光开关探针Alexa Flour 647标记于BS-C-1活细胞中的网格蛋白上，获得了30 nm的横向分辨率和50 nm的纵向分辨率. 2013年，Lukinavicius等[36]将SNAP标签和近红外荧光团硅罗丹明SiR耦联在一起，标记到活U2OS细胞核中的H2B蛋白上用于STORM活细胞成像，观察到了H2B蛋白在细胞核中的分布（图3b）. 随后他们还进一步验证了SiR-SNAP的特性，证明它是STORM活细胞实验的优良探针[37].

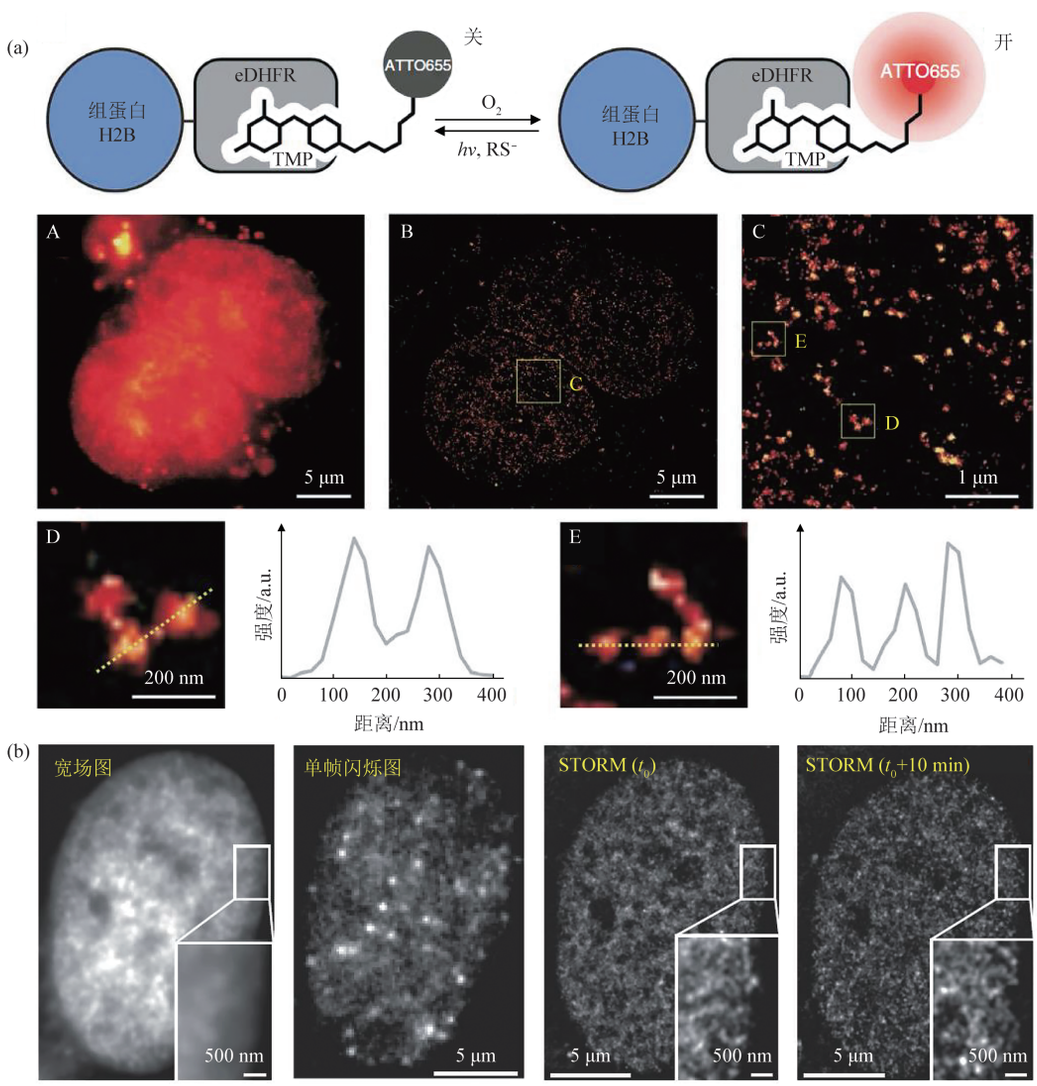


Fig. 3　STORM imaging of H2B proteins in live cell nuclei using protein tags [33, 35]

图3　蛋白标签用于活细胞核H2B蛋白的STORM成像[33, 35]

（a）TMP标签耦联ATTO655；（b）SNAP标签耦联SiR.

1.3.2　基于膜探针的STORM活细胞成像

细胞膜在细胞中扮演着重要的角色，细胞通过细胞膜与外界环境进行物质和能量交换等. 细胞中的许多细胞器也存在着膜结构并且形状各异，如线粒体内膜形成的嵴结构和内质网的网状结构等. 早期人们对细胞器膜细微结构的了解，大多是通过EM获得的，EM观察时细胞已固定并经过特殊处理，EM图像是否真实反映了活细胞中细胞器膜的结构无从知晓. 2012年，Shim等[38]利用STORM实现了对活细胞中细胞器膜的超分辨成像，空间分辨率达到20~60 nm，已接近EM的分辨率水平. 在该工作中，他们通过大量的实验，筛选出了适合对各种细胞器膜进行活细胞标记和STORM成像的膜探针，最终采用DiI标记细胞膜、MitoTracker Red标记线粒体膜、ER-Tracker Red标记内质网膜、LysoTracker Red标记溶酶体膜（图4a~d）. 利用STORM成像获得了许多衍射受限技术无法观察到的现象，首次测出了活神经元中树突棘颈的宽度，

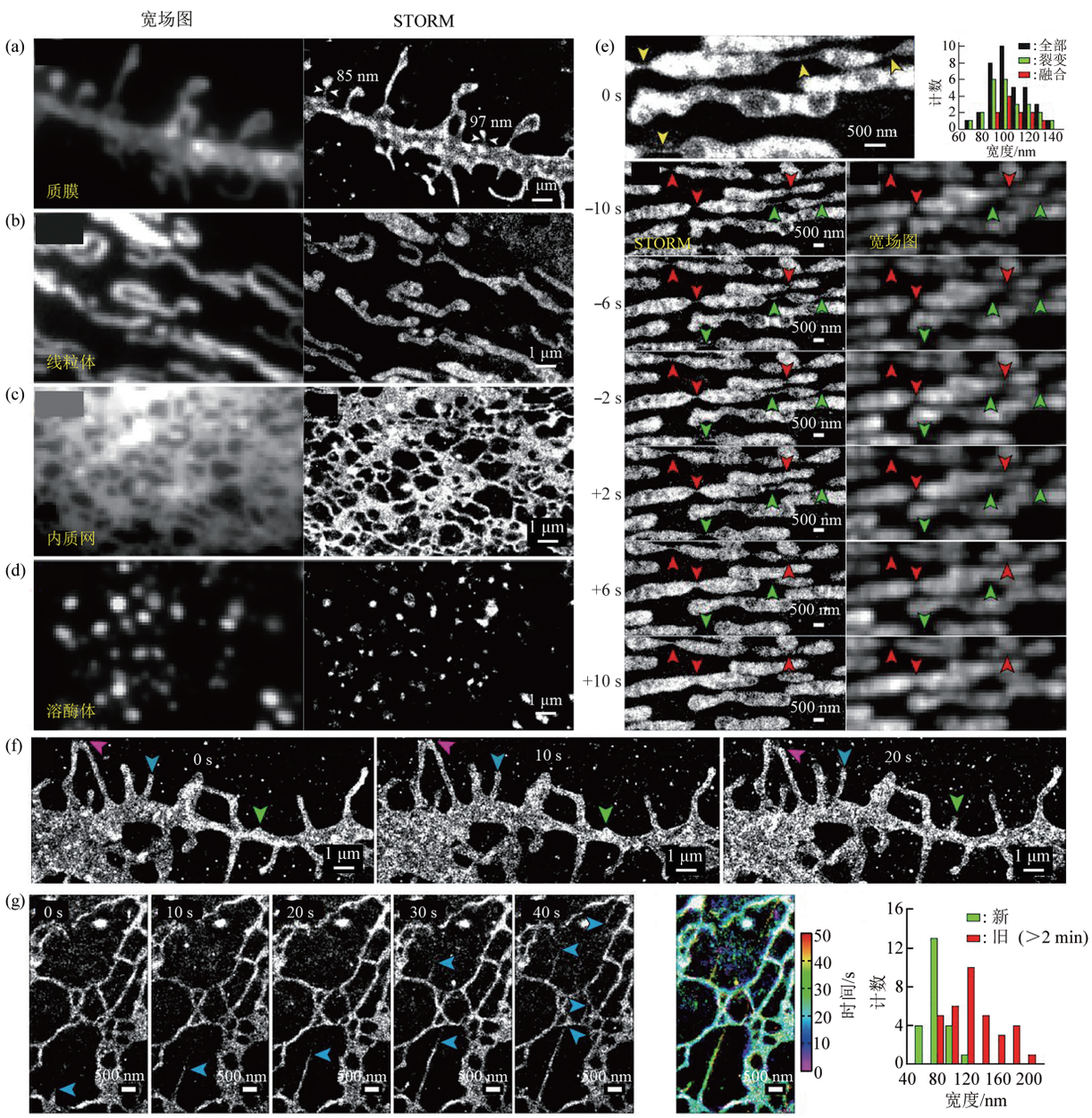


Fig. 4　STORM imaging of membrane structures in live cells using membrane probes[37]

图4　膜探针用于活细胞膜结构的STORM成像[37]

（a）DiI标记质膜；（b）MitoTracker Red标记线粒体；（c）ER-Tracker Red标记内质网；（d）LysoTracker Red标记溶酶体；（e）线粒体动力学过程；（f）海马神经元树突动态过程；（g）内质网动力学过程.

并对细胞器膜的动力学过程开展了研究，揭示了海马神经元树突的动态变化过程（图4f，绿色箭头指示一个新生长的树突棘结构，蓝色和紫色箭头分别指示伸展和缩回的树突棘结构）和活BS-C-1细胞线粒体（图4e，黄色箭头指示正在连接相邻线粒体的小管，绿色和红色箭头分别指示线粒体的裂变和融合过程，右上角为线粒体间连接小管的宽度分布统计）、内质网（图4g，蓝色箭头指示正在延伸的小管，右侧为时间序列叠加图和内质网小管的宽度分布统计）的纳米尺度动力学过程等.

与上述采用蛋白质标签方法不同的是，这些膜探针都是商用染料，操作简单，只需和活细胞共孵育几分钟就可以高密度标记细胞器膜，适合活细胞标记. 实验中他们发现在激发功率为10 kW/cm^{2}的561 nm激光照明下，这4种探针均能够迅速转变为关态，然后利用低功率405 nm激光可将其稀疏激活，从而实现光开关. 但是，与Alexa Flour 647探针类似，这些探针在成像时需要在含有氧清除系统的成像缓冲液环境中进行（无硫醇试剂），从而一定程度限制了活细胞成像的时长.

2　受激发射损耗显微术（STED）

2.1　基本原理及特点

STED是由Hell等[39]于1994年首次从理论上提出并在2000年通过实验验证[40]的一种利用非线性效应实现远场超分辨显微的扫描成像技术. 其基本原理是采用共线的两束光（激发光和损耗光）同时照射样品，样品中的荧光团被激发光激发，紧接着损耗光通过受激发射让处于激发态的荧光团迅速返回基态而淬灭荧光. 损耗光经过相位板调制后形成的是一个中心光强为0的环形光斑，因此只有位于环形损耗光中心很小区域内的荧光团可以发射出荧光，从而起到缩小系统PSF尺寸、提高分辨率的效果. 2000年，Hell团队利用该技术对荧光珠进行成像[40]，结果表明STED在突破衍射极限的基础上可以将横向和纵向分辨率分别提高2倍和6倍左右. 2006年，他们又利用STED技术对绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）标记的病毒颗粒以及固定的哺乳动物细胞的内质网进行成像[41]，获得了70 nm的横向分辨率，从而标志着STED成为一种纳米级生物显微镜.

相比STORM，STED对荧光探针没有光开关的特殊要求，且可以在采集完图像后立即生成超分辨图像，不需要像STORM那样采集大量的原始图像进行定位重构，因而成像的时间分辨率高，在活细胞成像应用中有一定的优势. 然而，STED的分辨率取决于施加在样品上的损耗光功率与探针饱和激发功率的比值，相对功率越高，成像分辨率越高. 但是高功率损耗光不仅会造成样品中荧光团过快的光漂白，也会对活细胞造成严重的光损伤，不利于活细胞的超分辨成像. 因此，STED应用于活细胞超分辨成像的研究虽然起步很早，但至今在活细胞应用研究中依然存在较大的挑战. 解决的主要办法，一是开发耐漂白、低损耗光阈值的荧光探针以适用于活细胞动力学研究，如神经元树突棘和内质网等细胞器结构变化的动态过程[42]、细胞中蛋白质的分布和动力学[43-44]等；二是通过其他方法在不降低分辨率的前提下设法降低损耗光功率，如基于时间门控技术的g-STED[45]等. 但与STORM技术类似，新型荧光探针的开发在STED的活细胞超分辨成像应用中有着更为直接和重要的影响.

2.2　新型探针助力STED活细胞成像

前文提到的罗丹明衍生物SiR具有良好的耐漂白性和膜渗透性，可用于STORM成像，同时也可用于STED成像. 2015年，Hell团队利用该探针构建肌动蛋白（actin）标签SiR-Actin，对活海马神经元进行标记并进行STED成像[46]，不仅观察到了活神经元树突中存在的周期性细胞骨架结构（2013年由Zhuang团队利用STORM技术首次在固定神经元中观察到[47]），还发现其轴突中也存在着细胞骨架. STED在活神经元中的成功应用，推进了神经生物学的研究，也极大地刺激了STED活细胞成像应用的需求. 此后，不少研究组致力于开发耐漂白的STED探针，以助力STED在活细胞成像中的应用[48-50]. 2018年，深圳大学屈军乐团队成功合成了一种基于砷酸盐的荧光探针[51]，该探针具有较好的耐漂白性，且可以优先与线粒体膜的邻二硫醇蛋白VDPs特异性结合，可用于活HeLa细胞线粒体的STED成像，能够很好地观察到VDPs在线粒体上的分布情况.

然而活细胞超分辨成像的意义更多还在于能够对其动力学过程进行较长时程的监测，这对探针的耐漂白性要求就更加严格. 2019年，Wang等[52]开发了一种光稳定性好、荧光寿命长并能对活细胞线粒体内膜进行特异性标记的探针MitoPB Yellow. 利用该探针，他们对活细胞中线粒体的动力学过程进行了STED超分辨成像和监测，并观察到了单个线粒体内嵴的快速融合过程（持续约2 s，图5a）和

两个线粒体之间相互融合的过程（持续约70 s，图5b）. 他们还发现，虽然成像过程中线粒体形状发生了巨大变化，但探针的荧光强度在长达约 390 s的成像过程中并没有太大变化（图5c），说明光漂白问题得到较好解决；但与此同时，他们也观察到长时间成像后随着内嵴的消失，线粒体开始膨胀变圆，这种现象有可能是较高功率损耗光强导致的光损伤造成的. 2020年，Yang等[53]研发出一种增强的芳酸变体染料（MitoESq-635），低饱和强度和高光稳定性的优势使之成为STED活细胞长时程成像的理想选择. 通过对活HeLa细胞中的线粒体内膜进行标记，他们以35.2 nm的分辨率实现了长达50 min的STED超分辨成像.

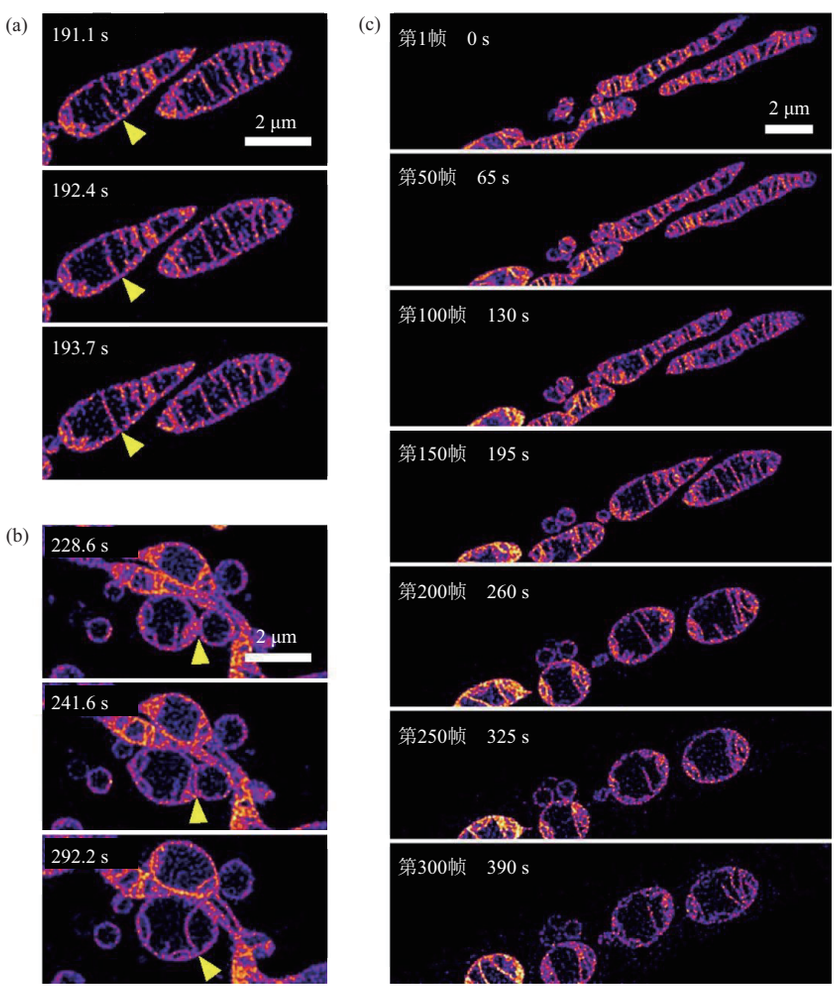


Fig. 5　STED super-resolution imaging of mitochondrial dynamics in living cells[52]

图5　活细胞中线粒体动力学过程的STED超分辨成像[52]

（a~c）三个不同区域的实时成像.

活细胞中不同细胞器间相互作用过程的研究是需要超分辨成像发挥其优势的另一个领域. 2020年，安徽大学Zhu团队[54]开发了一种可同时对活细胞中的线粒体和内质网进行特异性标记并通过荧光强度对二者加以区分的新型探针，即吡啶盐衍生物TpsPym. 该探针光稳定性好，适合STED活细胞成像. 利用该探针，他们对活细胞进行了标记和STED成像，不仅观察到了内质网-线粒体接触位点的超分辨结构（图6a），而且实时观察到了对细胞进行饥饿处理后其内质网和线粒体相互作用的三维动态过程（持续45 min，图6b）. 通过分析其内质网面积、内质网-线粒体接触面积、线粒体长度和直径、嵴的距离等不同参数随时间的变化规律（图6c），他们还得出内质网-线粒体接触面积有可能是细胞发生自噬重要指标的结论.

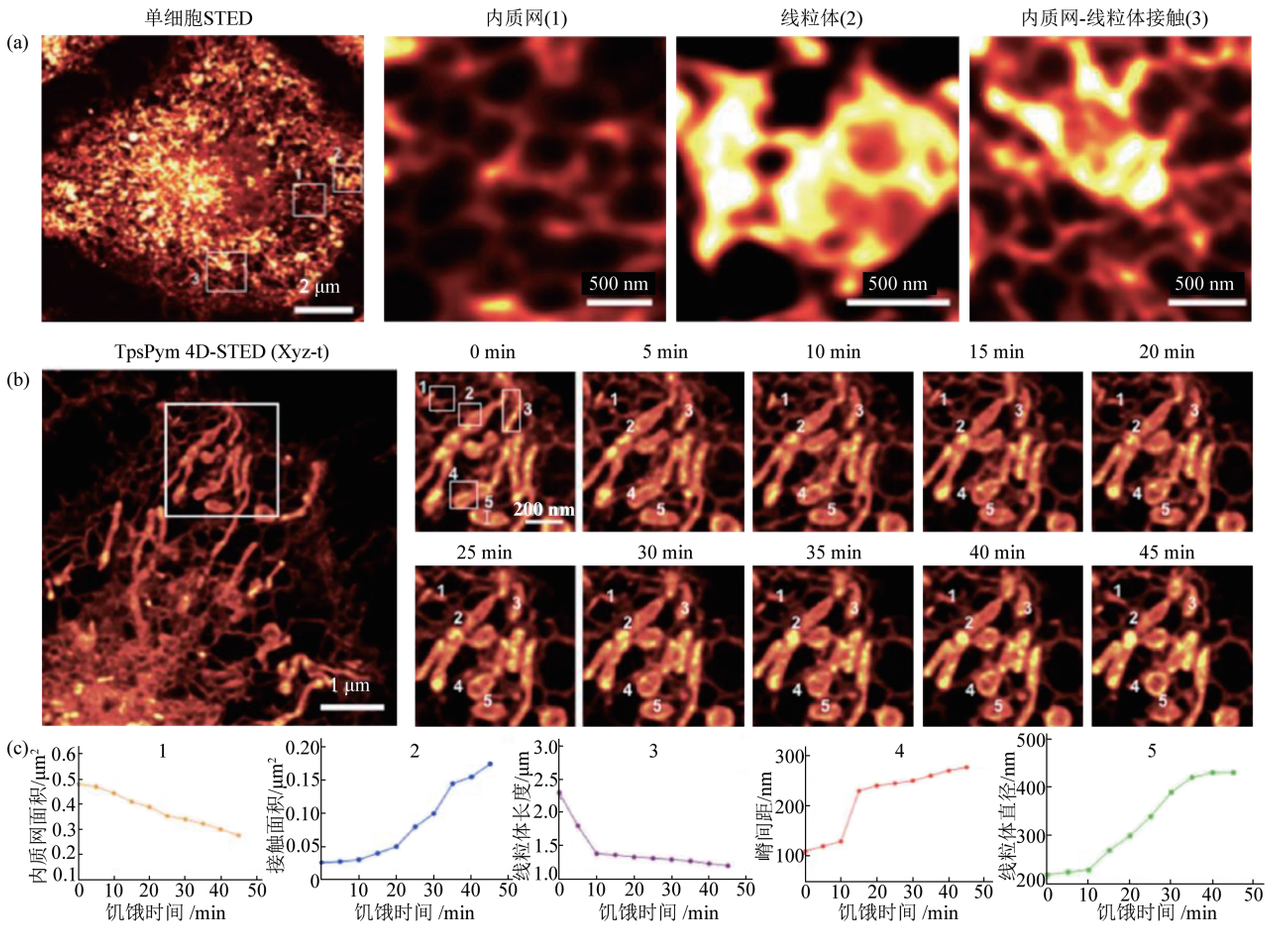


Fig. 6　STED super-resolution imaging of the interaction between mitochondria and endoplasmic reticulum in living cells[54]

图6　活细胞中线粒体和内质网相互作用的STED超分辨成像[54]

（a）单细胞STED成像及三个局部放大图（1：内质网；2：线粒体；3：内质网与线粒体接触位点）；（b）TpsPym 4D-STED动态成像及饥饿处理不同时间后的局部放大图；（c）图（b）中数字1~5对应的结构参数随时间变化的分析.

3　结构光照明显微术（SIM）

3.1　基本原理及特点

SIM是2000年Gustafsson[8]提出的一种基于频域调制的SRM技术，基本原理是利用莫尔条纹将原本超出系统截止频率的高频信息（对应高空间分辨率结构）移到低频部分从而能够被系统探测到，实现分辨率的提升. 在SIM实验中，激发光透过可横向移动的光栅产生正弦条纹图案照射样品，因此称为结构光照明. 这样，正弦条纹照明图案与样品本身的信息叠加形成莫尔条纹，将样品结构中的高空间频率信息转变为可通过物镜收集的较低空间频率信息，最后通过后期数据处理得到样品的高分辨图像. SIM和STORM一样基于宽场成像，因此单幅原始图像的采集速度只取决于样品的荧光信号强度和探测器的采集速度，可以非常快，且SIM通常只需要采集9帧原始图像，比起STORM需要采集几万帧原始图像的情况可显著提高成像的时间分辨率，同时相比基于扫描成像的STED也要快得多.

但SIM受其成像原理的制约，最多只能将横向分辨率提升为传统显微镜的2倍[55]（即150 nm左右），因此分辨率远不及其他SRM技术. 但是，SIM对荧光探针没有光开关的特殊需求[56]，所需激发光强也较低，成像速度相对较快，这些优点使SIM很快被应用于活细胞成像，也是目前在活细胞成像中应用得最早、最多、最成熟的SRM技术. 例如，2009年，Hirvonen等[57]就利用SIM技术实现了对活细胞内线粒体的动力学观察；同年，Kner等[58]利用SIM实时记录了活细胞有丝分裂过程中

纺锤体和中心体的变化等. 然而，研究人员并不满足于传统SIM的分辨率，因此在可以实现活细胞超分辨成像的同时，也在追求分辨率的进一步提高.

早期对SIM技术分辨率的提高主要是利用非线性效应使得条纹变细来实现的，如2005年Gustafsson提出的饱和SIM（saturated SIM，SSIM）技术[59]，但由于需要采用功率很强的结构激发光才能产生足够的非线性效应，SSIM技术虽然可以将分辨率提高到50 nm左右，但却不利于发挥SIM的活细胞成像优势，因此应用并不多. 近几年来，研究人员尝试采用一些巧妙的方法，在提高SIM分辨率的同时能够保持其活细胞成像优势，例如图案激活非线性结构光照明显微（patterned activation nonlinear SIM，PA NL-SIM）[60]和掠入射结构光照明显微（glazing incidence SIM，GI-SIM）[61]等，都可以将分辨率提升到优于100 nm.

3.2　PA NL-SIM及其在活细胞成像中的应用

2015年，Li等[60]将全内反射荧光（total internal reflection fluorescence，TIRF）激发引入SIM，利用TIRF只能激发样品表面一小薄层，可以很好地消除离焦背景信号的特点，同时结合高数值孔径（NA=1.7）物镜，提出了高NA TIRF-SIM方法，实现了对活细胞质膜的动态超分辨成像，在采集速度仅为亚秒级的前提下分辨率达到84 nm左右，还观察到了小鼠胚胎成纤维细胞中肌动蛋白与肌球蛋白之间的动态联系. 进而，他们又在此基础上提出了PA NL-SIM方法[60]，可以获得更高的分辨率. PA NL-SIM利用可逆光开关荧光蛋白Skylan-NS-Lifeact转染活COS-7细胞，对其细胞骨架肌动蛋白进行标记，然后利用结构光进行激活，在亚秒级采集时间内获得了F肌动蛋白的超分辨成像，空间分辨率为62 nm（图7a~b，其中图7b的4个小图对应不同的成像模式和数据处理方法），实现了细胞表面小窝不同形态的观察和动力学过程的监测（图7c~e）. 通过与TIRF-SIM结合，他们实现了实时双色超分辨成像（图7f，绿色为mCherry-Rab5a标记的内涵体TIRF-SIM图像）；而通过与点阵光片显微结合，他们还实现了活细胞的三维超分辨成像. 在该技术中，可逆光开关荧光蛋白起到了非常关键的作用，其性能使得PA NL-SIM可以在低照明强度条件下实现超分辨成像. 关于这一点，2016年Zhang等[62]进一步做了补充验证. 他们比较了不同的可逆光开关荧光蛋白（Skylan-NS、Dronpa和rsEGFP2）的开关性能，结果发现Skylan-NS的开关状态转换时间短（即闪烁特性好）且对比度高，相同条件下用Skylan-NS获得超分辨图像仅需要100 W/cm^{2}的照明强度，而使用Dronpa需要250 W/cm^{2}才能获得一幅信噪比相对较好的图像；rsEGFP2虽然在　50 W/cm^{2}时就可以快速切换开关状态，但对比度低、背景噪声高，难以获得单个肌动蛋白丝的超分辨图像.

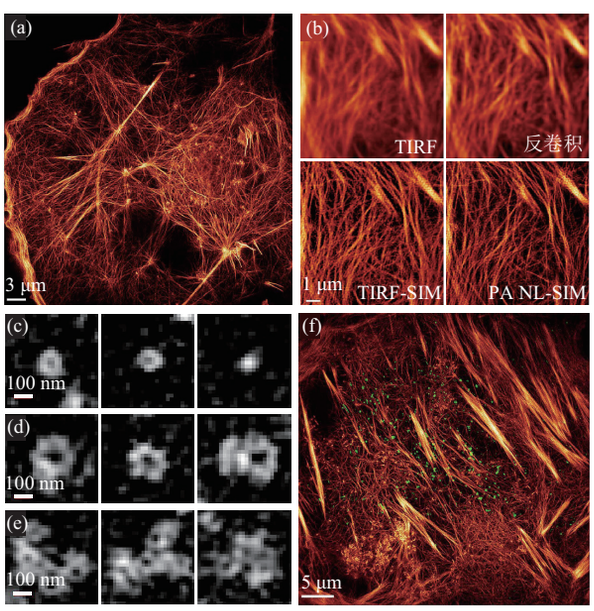


Fig. 7　Live cell super-resolution imaging using PA NL-SIM[60]

图7　PA NL-SIM用于活细胞超分辨成像[60]

（a）活细胞F肌动蛋白成像；（b）四种成像模式的对比；（c~e）小窝不同形态观察和动力学监测；（f）F肌动蛋白（橙色，PA NL-SIM）/内涵体（绿色，TIRF-SIM）双色成像.

3.3　GI-SIM及其在活细胞成像中的应用

TIRF成像方式可以很好地消除背景的影响，但它的成像深度只有100 nm左右，无法对活细胞内部的许多细胞器进行成像. 为了克服该问题，2018年，Guo等[61]提出了基于掠入射结构光照明的GI-SIM技术，实现了对活细胞中多种细胞器结构的超分辨成像以及细胞器间相互作用动态过程的观察，获得了许多只有在成像速度足够快且分辨率足够高的前提下才有可能获得的新发现（图8），为进一步研究内质网等细胞器的结构和功能以及不同细胞器之间的相互作用过程提供了非常宝贵的资料. 例如，他们以9.2 fps的采集速度得到了活COS-7细胞中的细胞骨架微管的超分辨结构（分辨率97 nm），有利于观察细胞骨架微管的动态变化；以266 fps的采集速度得到了活COS-7细胞内质网的

超分辨结构，不仅可以观察到内质网大部分是由管状矩阵组成（图8a），而且通过对内质网小管的实时成像，他们还观察到了内质网收缩部位的形成与消失（图8b，青色和橙色箭头指示两个收缩位点），并通过多色成像（图8c）观察到内质网与线粒体接触位点处的线粒体裂变（图8d）和融合（图8e），以及内质网包裹溶酶体并沿着微管运输（图8f白色箭头所示）等动力学过程.

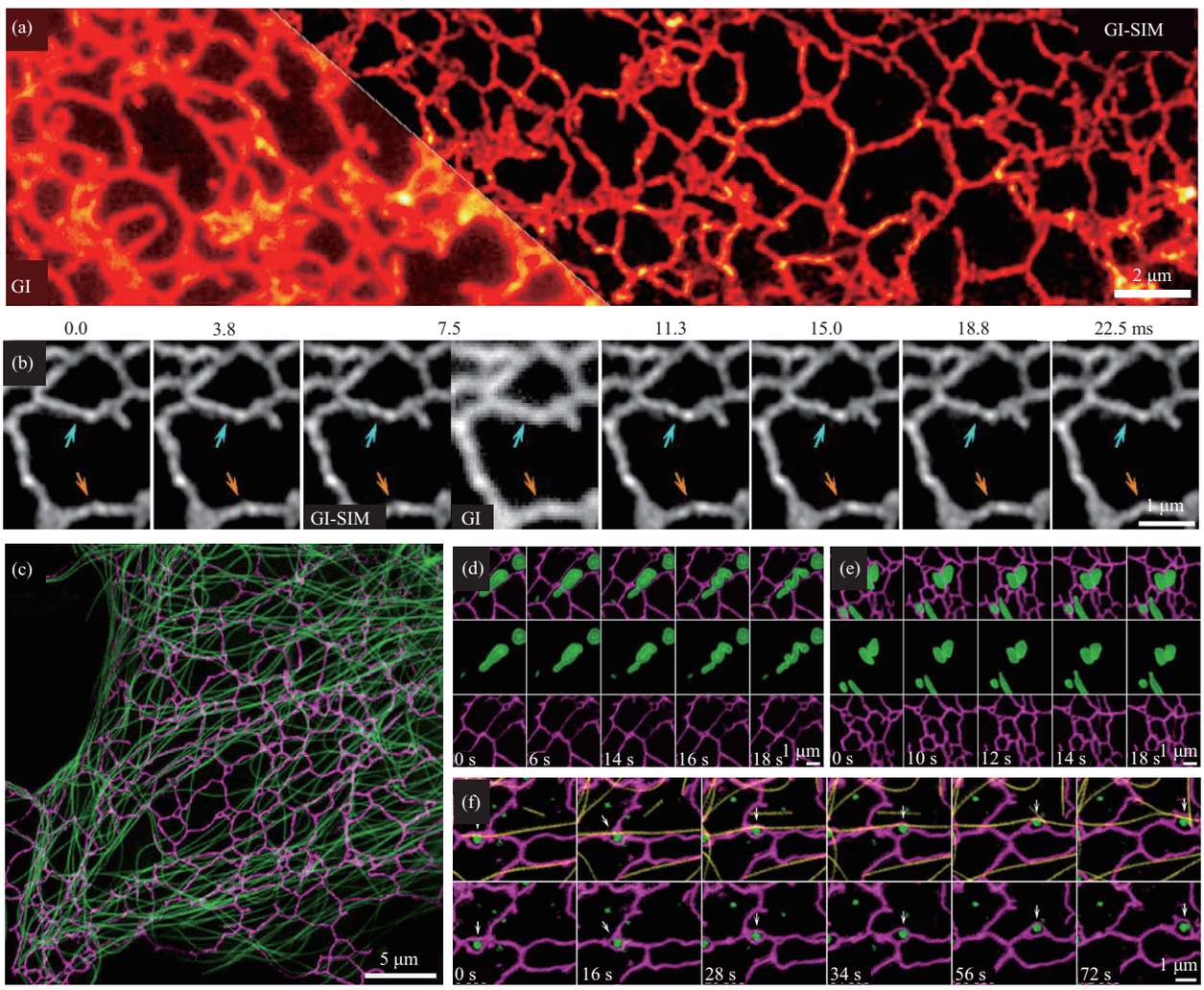


Fig. 8　Live cell super-resolution imaging using GI-SIM[61]

图8　GI-SIM用于活细胞超分辨成像[61]

（a）活细胞内质网成像；（b）内质网小管实时成像；（c）内质网（紫色）/ 微管（绿色）双色成像；（d~e）内质网（紫色）/ 线粒体（绿色）双色成像；（f）内质网（紫色）/ 溶酶体（绿色）/ 微管（黄色）三色成像.

4　几种新型SRM技术

近几年来，结合不同SRM技术的优势，研究者们还发展出了一些新型的SRM技术. 例如，2017年Hell团队[63]利用STED中的环形光扫描激发样品，提出了一种新的单分子定位方法，即利用中心强度为0的环形光在4个特定位置时采集的同一个荧光分子光子数之间的比例关系，来确定荧光分子的位置，称为最小光子通量（minimal photon fluxes，MINFLUX）技术，并将其用于超分辨成像和单分子追踪. 传统SMLM技术中定位精度与光子数有关，光子数越多定位精度越高，但相应需要较长的采集时间，一方面限制了成像的时间分辨率，另一方面样品存在的不可避免的漂移也会反过来影响定位精度. MINFLUX定位方法，使得单分子定位所需要的光子数大幅减少（仅为传统质心定位法的1/22），从而可显著提升成像的定位精度和时间分辨率. 基于MINFLUX的超分辨成像定位精度高

达1 nm左右，能够很好地分辨出间距仅6 nm的DNA折纸结构，而基于MINFLUX的单分子追踪在对活大肠杆菌中单个30S核糖体蛋白亚单位进行追踪时也表现出了高达100倍的时间分辨率提升. 随后，他们利用该方法进行单分子追踪，可在分辨率高达几纳米水平的前提下将采集时间间隔缩短到1 ms以内，从而展示了该方法的高时空分辨能力[64]. 2020年，他们进一步利用该方法实现了活细胞的三维多色超分辨成像，以高达2 nm的分辨率观察到了活U2OS细胞中的核孔复合物Nup96[65].

MINFLUX的最大优势是在大幅减少光子数的前提下实现高精度定位，但是环形光移动区域有限，限制了视场大小. 2019年，借鉴MINFLUX的思想，将单分子定位与SIM中的结构光照明结合，Gu等[66]和Cnossen等[67]分别提出了基于重复光学选择曝光（repetitive optical selective exposure，ROSE）的超分辨成像技术和SIMFLUX技术，用*X*、*Y*两个方向分别相移3次得到的6个正弦照明图案激发SMLM样品，在单分子定位的基础上，利用不同照明图案得到同一个荧光分子的光子数与照明图案的关系对定位结果加以优化，在光子数相同的情况下，定位精度可比单纯的单分子定位提高2倍. 反之，如果利用这些方法实现与传统SMLM相同的定位精度，则可将所需的光子数减少为原来的1/4，从而可实现更快的超分辨成像速度，在活细胞超分辨成像中具有较大的应用潜力. 同时相比于MINFLUX，由于采用宽场结构光照明，可在提高定位精度的同时实现较大视场的超分辨成像.

5 总结与展望

经过二十多年的发展，SRM已成为探索细胞内部纳米级结构的主要手段. 它可以突破光学成像的衍射极限，分辨率达到几十纳米数量级，并且可以实现三维和多色成像. 但由于成像原理或条件的限制，各种SRM技术在活细胞成像应用方面存在不同程度的限制. 本文以STORM、STED和SIM三种常见的SRM技术为例，从其基本原理和特点出发，着重阐述其在活细胞成像应用方面受限的原因以及近年来研究者们针对这些限制所做的努力，并通过具体的应用实例展示了改进后的SRM技术在活细胞成像中的最新应用与发展. 此外，选取近几年来结合不同SRM技术的优势发展起来的几种新型技术并介绍其在活细胞超分辨成像方面的优势和潜力，展示了活细胞SRM成像技术的最新发展趋势.

STORM分辨率可以达到几十纳米数量级，对实验设备要求不高，应用广泛，但其对荧光探针的特殊要求以及定位算法对标记密度和采集帧数的要求限制了其在活细胞应用中的发展，通过开发高密度算法以及筛选和开发适用于活细胞标记和成像的STORM探针，研究者们初步实现了STORM的活细胞成像应用，和对活细胞中细胞核内特定蛋白质分布和变化的监测，也实现了活细胞中细胞器膜动力学过程的超分辨成像；STED虽对荧光探针没有光开关的特殊要求，且成像时间分辨率较高，但是其高功率损耗光不仅会使荧光团过快光漂白，也容易对活细胞造成光损伤，不利于活细胞成像，通过开发光稳定性和耐漂白性好、低损耗光阈值的新型荧光探针，或通过时间门控技术等其他方法降低损耗光功率，研究者们实现了对活细胞中特定细胞器的动力学过程较长时程的超分辨监测，也初步实现了对活细胞中不同细胞器间相互作用过程的超分辨成像；SIM同样对荧光探针没有光开关的特殊要求，成像速度相比STORM和STED都要更快，具有较好的活细胞成像优势，但缺点是分辨率远不及其他SRM技术，通过采用TIRF照明、图案激活、掠入射等一些巧妙的方法，研究者们在保留SIM活细胞成像优势的同时，设法提高了其分辨率，实现了活细胞中100 nm尺度以内的、成像速度较快的动态超分辨成像.

虽然目前具有超高分辨率的SRM技术在活细胞的成像应用方面仍然还不能像衍射受限的宽场荧光成像、共聚焦成像一样成熟和普及，但毫无疑问，研究者们针对其各自的特点所做的各种努力正在推动着该领域的逐步发展. 相信在各领域研究者们的不懈努力之下，SRM技术必将在活细胞成像应用的道路上越走越远，也越走越宽，从而在生物医学领域的研究中发挥越来越大的作用，为人们探索生命和健康问题提供越来越多其他传统手段所无法获取的宝贵数据和材料.

参 考 文 献

[1] Rust M J, Bates M, Zhuang X W, *et al*. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). Nat Methods, 2006, **3**(10): 793-795

[2] Huang B, Wang W Q, Bates M, *et al*. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. Science, 2008, **319**(5864): 810-813

[3] Xu K, Babcock H P, Zhuang X W. Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton. Nat Methods, 2012, **9**(2): 185-188

[4] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, *et al*. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. Science, 2006, **313**(5793): 1642-1645

[5] 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

[6] Klar T A, Jakobs S, Dyba M, *et al*. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, **97**(15): 8206-8210

[7] Hell S W. Far-field optical nanoscopy. Science, 2007, **316**(5828): 1153-1158

[8] Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. J Microsc, 2000, **198**: 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] Sigal Y M, Zhou R B, Zhuang X W. Visualizing and discovering cellular structures with super-resolution microscopy. Science, 2018, **361**(6405): 880-887

[11] Rust M J, Blosser T R, Zhuang X W. Short-range spectroscopic ruler based on a single-molecule optical switch. Phys Rev Lett, 2005, **94**(10) : 108101

[12] Bates M, Huang B, Dempsey G T, *et al*. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. Science, 2007, **317**(5845): 1749-1753

[13] Dempsey G T, Vaughan J C, Chen K H, *et al*. Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. Nat Methods, 2011, **8**(12): 1027-1036

[14] van de Linde S, Loeschberger A, Klein T, *et al*. Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. Nat Protoc, 2011, **6**(7): 991-1009

[15] Yildiz A, Forkey J N, McKinney S A, *et al*. Myosin V walks hand-over-hand: Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. Science, 2003, **300**(5628): 2061-2065

[16] Gould T J, Hess S T, Bewersdorf J. Optical nanoscopy: from acquisition to analysis. Annu Rev Biomed Eng, 2012, **14**: 231-254

[17] Thompson M A, Lew M D, Moerner W E. Extending microscopic resolution with single-molecule imaging and active control. Annu Rev Biophys, 2012, **41**: 321-342

[18] 付云, 王天乐, 赵森 . 超分辨光学显微的成像原理及应用进展 . 激光与光电子学进展, 2019, **56**(24): 21-33
Fu Y, Wang T L, Zhao S. Laser & Optoelectronics Progress, 2019, **56**(24): 21-33

[19] Li H L, Vaughan J C. Switchable fluorophores for single-molecule localization microscopy. Chem Rev, 2018, **118**(18): 9412-9454

[20] Samanta S, Gong W J, Li W, *et al*. Organic fluorescent probes for stochastic optical reconstruction microscopy (STORM): recent highlights and future possibilities. Coordination Chemistry Reviews, 2019, **380**: 17-34

[21] Cheezum M K, Walker W F, Guilford W H. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. Biophys J, 2001, **81**(4): 2378-2388

[22] Thompson R E, Larson D R, Webb W W. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. Biophys J, 2002, **82**(5): 2775-2783

[23] Aguet F, van de Ville D, Unser M. A maximum-likelihood formalism for sub-resolution axial localization of fluorescent nanoparticles. Opt Express, 2005, **13**(26): 10503-10522

[24] Holden S J, Uphoff S, Kapanidis A N. DAOSTORM: an algorithm for high-density super-resolution microscopy. Nat Methods, 2011, **8**(4): 279-280

[25] Zhu L, Zhang W, Elnatan D, *et al*. Faster STORM using compressed sensing. Nat Methods, 2012, **9**(7): 721-723

[26] Min J H, Vonesch C, Kirshner H, *et al*. FALCON: fast and unbiased reconstruction of high-density super-resolution microscopy data. Sci Rep, 2014, **4**: 4577

[27] Min J H, Holden S J, Carlini L, *et al*. 3D high-density localization microscopy using hybrid astigmatic/biplane imaging and sparse image reconstruction. Biomed Opt Express, 2014, **5**(11): 3935-3948

[28] Ovesny M, Krizek P, Borkovec J, *et al*. ThunderSTORM a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging. Bioinformatics, 2014, **30**(16): 2389-2390

[29] Huang J Q, Sun M Z, Ma J J, *et al*. Super-resolution image reconstruction for high-density three-dimensional single-molecule microscopy. IEEE Transactions On Computational Imaging, 2017, **3**(4): 763-773

[30] Ma H Q, Xu J Q, Liu Y. WindSTORM: robust online image processing for high-throughput nanoscopy. Sci Adv, 2019, **5**(4): eaaw0683

[31] Sage D, Pham T A, Babcock H, *et al*. Super-resolution fight club: assessment of 2D and 3D single-molecule localization microscopy software. Nat Methods, 2019, **16**(5): 387-395

[32] Chen B L, Gong W J, Yang Z G, *et al*. STORM imaging of mitochondrial dynamics using a vicinal-dithiol-proteinstargeted probe. Biomaterials, 2020, **243**: 119938

[33] Heilemann M, van de Linde S, Mukherjee A, *et al*. Super-resolution imaging with small organic fluorophores. Angew Chem Int Ed Engl, 2009, **48**(37): 6903-6908

[34] Wombacher R, Heidbreder M, van de Linde S, *et al*. Live-cell super-resolution imaging with trimethoprim conjugates. Nat Methods, 2010, **7**(9): 717-719

[35] Jones S A, Shim S H, Zhuang X W, *et al*. Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells. Nat Methods, 2011, **8**(6): 499-505

[36] Lukinavicius G, Umezawa K, Olivier N, *et al*. A near-infrared fluorophore for live-cell superresolution microscopy of cellular proteins. Nat Chem, 2013, **5**(2): 132-139

[37] Klein T, Loschberger A, Proppert S, *et al*. Live-cell dSTORM with

SNAP-tag fusion proteins. Nat Methods, 2011, **8**(1): 7-9

[38] Shim S H, Xia C L, Zhong G S, *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

[39] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. Opt Lett, 1994, **19**(11): 780-782

[40] Klar T A, Jakobs S. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, **97**(15): 8206-8210

[41] Willig K I, Kellner R R, Hell S W, *et al*. Nanoscale resolution in GFP-based microscopy. Nat Methods, 2006, **3**(9): 721-723

[42] Nagerl U V, Willig K I, Hein B, *et al*. Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, **105**(48): 18982-18987

[43] Hein B, Willig K I, Hell S W, *et al*. Stimulated emission depletion nanoscopy of living cells using SNAP-tag fusion proteins. Biophys J, 2010, **98**(1): 158-163

[44] Masch J M, Steffens H, Fischer J, *et al*. Robust nanoscopy of a synaptic protein in living mice by organic-fluorophore labeling. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, **115**(34): 8047-8056

[45] Willig K I, Rizzoli S O, Hell S W, *et al*. STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. Nature, 2006, **440**(7086): 935-939

[46] D'Este E, Kamin D, Hell S W, *et al*. STED nanoscopy reveals the ubiquity of subcortical cytoskeleton periodicity in living neurons. Cell Rep, 2015, **10**(8): 1246-1251

[47] Xu K, Zhong G S, Zhuang X W. Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. Science, 2013, **339**(6118): 452-456

[48] Li D Y, Qin W, Xu B, *et al*. AIE nanoparticles with high stimulated emission depletion efficiency and photobleaching resistance for long-term super-resolution bioimaging. Adv Mater, 2017, **29**(43): 1703643

[49] Liu Y J, Lu Y Q, Yang X S, *et al*. Amplified stimulated emission in upconversion nanoparticles for super-resolution nanoscopy. Nature, 2017, **543**(7644): 229-233

[50] Ye S, Yan W, Zhao M J, *et al*. Low-saturation-intensity, high-photostability, and high-resolution STED nanoscopy assisted by CsPbBr3 quantum dots. Adv Mater, 2018, **30**(23): e1800167

[51] Yang Z G, Kang D H, Lee H, *et al*. A fluorescent probe for stimulated emission depletion super-resolution imaging of vicinal-dithiol-proteins on mitochondria membrane. Bioconjug Chem, 2018, **29**(4): 1446-1453

[52] Wang C G, Taki M, Sato Y, *et al*. A photostable fluorescent marker for the superresolution live imaging of the dynamic structure of the mitochondrial cristae. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, **116**(32): 15817-15822

[53] Yang X S, Yang Z G, Wu Z Y, *et al*. Mitochondrial dynamics quantitatively revealed by STED nanoscopy with an enhanced squaraine variant probe. Nat Commun, 2020, **11**(1): 3699

[54] Zhu F F, Yang Z H, Wang F, *et al*. 4-dimensional observation ER-mitochondria interaction in living cells under nanoscopy by a stable pyridium salt as biosensor. Sensors and Actuators B: Chemical, 2020, **305**: 127492

[55] Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. J Microsco, 2000, **198**(2): 82-87

[56] 陈廷爱, 陈龙超, 李慧, 等. 结构光照明超分辨光学显微成像技术与展望. 中国光学, 2018, **11**(3): 307-328
Chen T, Chen L, Li H, *et al*. Chinese Optics, 2018, **11**(3): 307-328

[57] Hirvonen L M, Wicker K, Mandula O, *et al*. Structured illumination microscopy of a living cell. Eur Biophys J, 2009, **38**(6): 807-812

[58] Kner P, Chhun B B, Eric R G, *et al*. Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination. Nat Methods, 2009, **6**(5): 339-342

[59] 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

[60] Li D, Shao L, Chen B C, *et al*. ADVANCED IMAGING. Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics. Science, 2015, **349**(6251): aab3500

[61] Guo Y T, Li D, Zhang S W, *et al*. Visualizing intracellular organelle and cytoskeletal interactions at nanoscale resolution on millisecond timescales. Cell, 2018, **175**(5): 1430-1442

[62] Zhang X, Zhang MS, Li D, *et al*. Highly photostable, reversibly photoswitchable fluorescent protein with high contrast ratio for live-cell superresolution microscopy. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, **113**(37): 10364-10369

[63] Balzarotti F, Eilers, Y, Hell S W, *et al*. Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes. Science, 2017, **355**(6352): 606-612

[64] Eilers Y, Ta H, Gwosch K C, *et al*. MINFLUX monitors rapid molecular jumps with superior spatiotemporal resolution. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, **115**(24): 6117-6122

[65] Gwosch K C, Pape J K, Hell S W, *et al*. MINFLUX nanoscopy delivers 3D multicolor nanometer resolution in cells. Nat Methods, 2020, **17**(2): 217-224

[66] Gu L S, Li Y Y, Ji W, *et al*. Molecular resolution imaging by repetitive optical selective exposure. Nat Methods, 2019, **16**(11): 1114-1118

[67] Cnossen J, Hinsdale T, Stallinga S, *et al*. Localization microscopy at doubled precision with patterned illumination. Nat Methods, 2020, **17**(1): 59-63

Application and Development of Super−resolution Microscopy in Live Cell Imaging*

ZHANG Jiao, HE Qin, WU Ze-Kai, YU Bin, QU Jun-Le, LIN Dan-Ying**

(*Center for Biomedical Photonics & College of Physics and Optoelectronic Engineering, Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems, Shenzhen University, Shenzhen* 518060, China)

Abstract　Super-resolution microscopy (SRM) can bypass the optical diffraction limitation to imaging resolution and visualize previously unobservable nanoscale structures. This significant breakthrough has promoted the progress and development of modern life science and biomedical research. Cell is the basic unit of living organisms, and studying the fine structures and dynamic processes inside living cells is an indispensable way to grasp the essence of life. However, due to the limitations of imaging principles or conditions, the applications of early SRM technologies in live cell imaging were limited in different degrees. In recent years, with the development of SRM technology and related technologies, the application of SRM in live cell imaging research has also been increasingly developed. This paper briefly introduces the basic principles and characteristics of several common SRM technologies, and on this basis, focuses on the latest research progress and development trend in their live-cell-imaging applications. For STORM, the developments of high-density localization algorithms and new blinking fluorescent probes promote its application in live cell super-resolution imaging, realizing the monitoring of the distribution and changes of specific proteins in the nucleus of living cells, as well as the super-resolution imaging of the dynamic process of organelle membranes in living cells. For STED, the developments of new fluorescent probes with high photostability, good bleaching resistance and low saturation threshold, and the utilization of new methods such as time-gated technology for reducing the depletion power help with its application in live cell imaging. The long-term super-resolution monitoring of the dynamic process of specific organelles in living cells and the super-resolution imaging of the interactions between different organelles in living cells are realized. For SIM, by introducing ingenious methods such as TIRF illumination, pattern activation and grazing incidence, researchers try to improve its resolution while retaining its advantage of live cell imaging, and realize the dynamic super-resolution imaging within 100 nm scale and with fast imaging speed in living cells.

Key words　stochastic optical reconstruction microscopy, stimulated emission depletion microscopy, structured illumination microscopy, super-resolution imaging, live cell imaging

DOI：10.16476/j.pibb.2020.0427

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (61775144, 61975131, 61620106016, 61525503, 61835009), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2018A030313362) and the Shenzhen Research Project (JCYJ20170818144012025, JCYJ20200109105411133, JCYJ20170818141701667, JCYJ20170412105003520).

** Corresponding author.

Tel：86-755-26531592，E-mail：dylin@szu.edu.cn

Received：December 5，2020　Accepted：April 26，2021