



基于受激发射损耗显微术的活细胞和活体超分辨成像*

周汉秋 朱殷铷 韩鸿怡 王璐玮 杨志刚 严 伟** 屈军乐

(深圳大学物理与光电工程学院, 深圳市光子学与生物光子学重点实验室, 光电子器件与系统教育部/广东省重点实验室, 深圳 518060)

摘要 细胞作为生命体基本的结构和功能单元, 在生物、医学等领域有着非常重要的研究意义。随着现代科学和技术的发展, 科学家们借助电镜对细胞以及细胞器的空间结构已经有非常清晰的认识, 但是对它们的功能以及细胞之间的相互作用却了解得非常少, 而这恰恰又是疾病治疗和药物开发亟需了解的信息, 因此对离体活细胞(简称活细胞)和活体生物组织细胞(简称活体细胞)中亚细胞器的研究变得非常重要。然而细胞中许多细胞器的结构在纳米量级, 传统的光学成像技术由于受到光学衍射极限的限制是无法观察到纳米量级的生物结构, 因此光学超分辨成像技术是目前研究亚细胞器结构和功能的有效工具。在所有光学超分辨显微技术中, 受激发射损耗显微术(stimulated emission depletion microscopy, STED)由于具有实时成像、三维超分辨和断层成像的能力, 非常适合用于纳米尺度的活细胞和活体细胞成像研究, 而且STED超分辨成像技术经过近几十年的发展, 已经广泛用于活细胞甚至活体小鼠细胞的超分辨动态观测。本文总结了近年来活细胞和活体小鼠神经元细胞等领域STED超分辨成像的研究进展, 介绍了用于活细胞和活体细胞STED超分辨成像的荧光染料和荧光蛋白的发展现状, 讨论当前活细胞和活体细胞的超分辨成像面临的问题, 以及对未来发展的展望。

关键词 活细胞, 活体, 受激辐射损耗显微术, 超分辨率成像

中图分类号 Q-334, Q632

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0272

相衬显微镜的发明, 掀起了活细胞的研究热潮。随着科学进步和技术发展, 各种荧光显微镜陆续被发明, 用于进一步揭示细胞的内部结构和细胞器之间的相互作用及相关的生理过程。然而, 由于光学衍射极限的存在, 传统光学显微镜的横向空间分辨率被限制在约200 nm, 虽然这个水平的分辨率已经解决了许多生物和医学问题, 但仍然有非常多的亚细胞器结构和细胞的动态过程在这个水平上无法被清晰观察到^[1-2], 因此要想解决这些问题, 光学显微成像的分辨率需要进一步提升(即突破光学衍射极限)。在过去的几十年里, 经过科学家们的努力, 众多突破光学衍射极限的超分辨显微成像技术已经发展得越来越成熟, 甚至已经有许多超分辨成像技术开始商业化, 例如受激发射损耗显微术(stimulated emission depletion microscopy, STED)、随机光学重构显微术(stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)和结构光照明显微术(structured illumination microscopy,

SIM)等。光学超分辨显微成像技术克服了衍射极限带来的挑战, 使研究纳米结构可视化成为可能。目前主流的超分辨成像技术可以分为两大类。一类是基于荧光团的发光在开启和关闭状态之间的随机切换方式实现的单分子定位超分辨成像, 如光激活定位显微技术(photoactivated localization microscopy, PALM)和STORM超分辨成像; 另一类是通过光场调控的方式实现的超分辨成像, 如STED和SIM超分辨成像^[3]。而在这些超分辨成像方法中, 只有STED^[4]超分辨成像技术是基于纯光

* 国家重点基础研究发展计划(2021YFF0502900), 国家自然科学基金(61975127, 62005171, 61835009), 广东省教育厅重点专项(2021ZDZX2013), 广东省自然科学基金(2022A1515011954, 2020A1515010679)和深圳市基础研究项目(JCY20190808111418696)资助。

** 通讯联系人。

Tel: 15815519182, E-mail: weiyang@szu.edu.cn

收稿日期: 2022-06-10, 接受日期: 2022-07-13

学的方法实现超分辨的, 其具有实时动态成像、三维(3D)超分辨和断层成像的能力, 是目前最适合用于研究活细胞和活体细胞超分辨成像的工具。STED基本原理是利用两束激光来进行显微成像, 其中一束为激发光, 用于激发荧光分子, 另一束是中心强度为零的甜甜圈状环形STED光(也称为损耗光), 其与激发光共轴且波长与荧光分子发射波长匹配。激发光使基态能级 S_0 上的电子跃迁到激发态能级 S_1 , 在没有外界干扰的情况下, 这些激发态的电子将会以自发辐射荧光的形式回落到基态, 如

果处在激发态的电子在环形STED光照射下将会发生受激辐射效应, 导致STED光照射区域产生光子的波长有别于自发辐射区域的光子波长。相较于自发辐射区域, STED光照射区域分子处于暗态, 视为不发荧光, 而STED光没有照射的中心区域为亮态(图1a)。由于两束光重叠区域产生受激辐射, 只有中心区域发出荧光, 因此减小了发光光斑的有效面积, 即减小了点扩散函数(point spread function, PSF), 实现了成像空间分辨率的提高(图1b)。

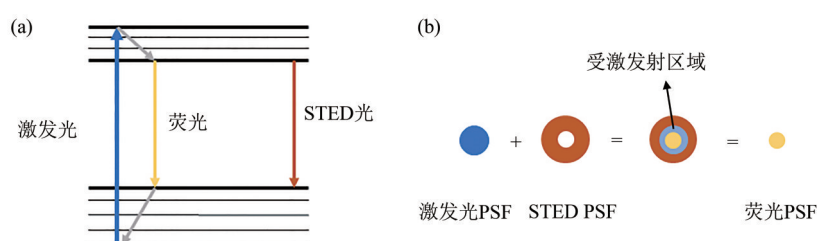


Fig. 1 Schematic diagram of STED

图1 STED原理图

(a) 能级辐射示意图; (b) 光束重合示意图。

STED超分辨成像技术是基于激光扫描共聚焦显微镜的基础上发展起来的, 因此STED特别适合快速和直接成像^[5-7], 这是研究活细胞动态运动过程的基本要求。STED进行生物样品成像时, 它的横向分辨率可以实现 $<50\text{ nm}$, 轴向分辨率可以达到 $<100\text{ nm}$ ^[8], 无需后期处理, 这使STED成为在纳米尺度研究活细胞或者活体细胞中生物学问题的理想选择。

在很长的一段时间里, STED超分辨显微镜只用于观察固定样品, 因为缺少同时具有光稳定性和细胞膜渗透性的荧光探针。然而 Westphal等^[9]在

2008年报道了突触小泡的实时动态成像。该团队通过标记针对神经元轴突中暴露于质膜表位的抗体, 证明了STED显微镜适用于活细胞成像。同年, Hain等^[10]提出在活PtK2细胞中用黄色荧光蛋白标记内质网实现STED超分辨成像(图2), 这标志着活细胞STED超分辨成像时代的到来。虽然活体细胞的超分辨成像研究对生命科学研究具有更加重大的意义, 目前也有很多基于STED的活细胞甚至活体的超分辨成像研究, 但是依然有许多的成像技术和生物学上的问题有待进一步的研究。

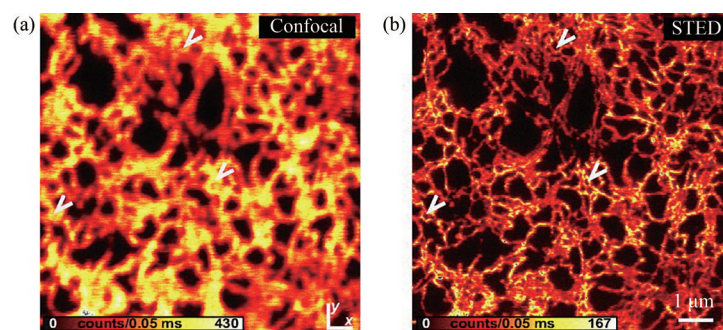


Fig. 2 Confocal (a) and STED (b) imaging of the endoplasmic reticulum in mammalian live cells

图2 哺乳动物活细胞内质网共聚焦成像(a)和STED成像(b)

本文将介绍STED超分辨成像技术在活细胞和活体生物样品超分辨成像领域近年的发展状况, 重点介绍不同标记方法情况下, 不同种类的活细胞和活体细胞超分辨成像的研究现状, 并对基于STED的活体超分辨成像的发展进行了展望。

1 活细胞STED超分辨成像

1.1 基于有机染料的STED活细胞超分辨成像

有机荧光染料在光稳定性、特异性、量子产率和生物兼容性方面都有优异的表现^[11-12], 例如大的斯托克斯位移、优秀的化学稳定性和很好的生物相容性, 这是所有超分辨率成像所需的特性。此外, 有机荧光染料的化学结构设计的自由度较高, 它的发光特性精细可调, 能在STED显微镜中表现出最佳的成像性能。

对于活细胞内部成像, 有机荧光染料本身是需要透过细胞膜或细胞器膜。最初用有机荧光染料进行活细胞STED成像研究仅限于细胞外的标记, 因为当时的大多数STED染料是不能渗透到细胞内的, 膜渗透染料硅罗丹明 (silicon-rhodamine, SiR) 于2013年由Lukinavicius等^[13-14]提出, 标志着活细胞STED显微镜进入了一个新的阶段。SiR是第一个可以用于STED超分辨成像, 且具有发光明亮、光稳定性好和细胞膜透过性高的荧光染料。所有的这些特点使SiR成为活细胞纳米显微镜的理想选择。SiR可以很容易地用775 nm的STED光进行擦除, 这个波长的光相对而言对细胞的伤害更小^[15-16]。尽管引入了SiR, 但对于研究细胞内部复杂结构和动态过程的多色STED显微镜是远远不够

的。最初的双色活细胞实验仅限于用一个SiR标记的细胞内靶点和另一个通过与橙色染料结合的抗体标记的细胞外靶点来实现^[17]。在固定细胞和活细胞的双色STED实验中, 最好使用大斯托克斯位移染料, 且这些染料可以在绿光范围内被激发, 用波长为775 nm的STED光进行耗尽^[18-22]。然而, 大斯托克斯位移染料通常亮度很低, 光稳定性也很差, 特别是在功率很强的STED光的照射下尤其明显^[23]。2013年Gottfert等^[24]报道了利用发射波长在橙色 (约590 nm) 和红色 (约640 nm) 范围内的染料进行双色STED超分辨成像的实验。这两种染料尽管发射光谱有重叠部分, 但是可以通过激发和发射来区分, 不需要后期处理, 并且可以用同一个775 nm的STED光来擦除。这使同一STED光对细胞内多个目标进行活细胞超分辨成像成为可能。2016年Butkevich等推出了可穿透细胞膜的罗丹明染料 (E_x/E_m : 580 nm/590 nm), 最终实现了使用单个损耗光对多个细胞内目标进行活细胞STED超分辨成像^[11, 25]。

细胞内的目标如细胞骨架微丝微管^[25-26]、高尔基体、线粒体和内质网等纳米尺度的动力学过程, 以及蛋白质介导的内吞作用 (图3)^[11], 都可以基于STED超分辨成像技术在活细胞中进行研究。在最近几年, 又相继开发了更多的用于STED超分辨成像的有机荧光染料, 例如SiR的衍生物以及结构相似的卡比罗宁和罗丹明^[25]。这扩展了适用于多色活细胞STED显微镜的探针范围。为了提高分辨率并能进行更长时间的成像, Spahn等^[27]提出一种通过可以逆结合到目标结构的可交换染

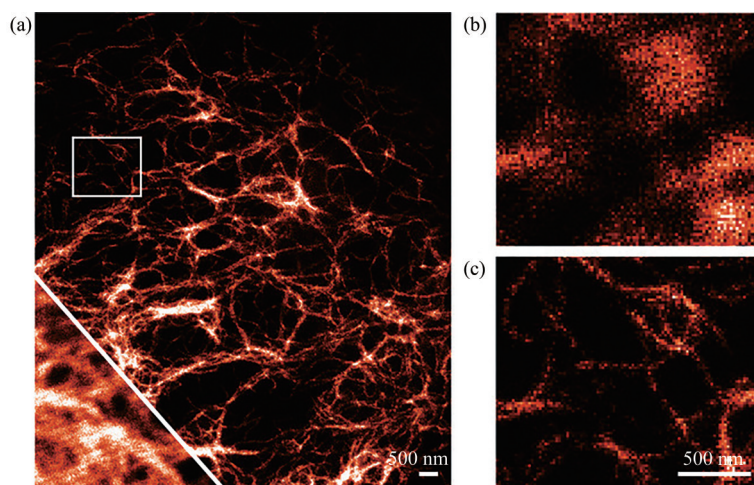


Fig. 3 Vimentin in live HeLa cells

图3 活HeLa细胞波形蛋白

(a) STED图像, 对应的共聚焦数据位于左下角; (b) 和 (c) 分别对应 (a) 中标记的区域放大的共聚焦和STED图像。

料,这种染料可以实现高密度标记,避免光漂白。并且可以应用于全细胞、多色和活细胞STED成像中。Butkevich等^[28-29]提出了一种可以被810 nm STED光耗尽的近红外染料。此外,为了在活细胞中引入第三种颜色,该团队又开发出来了一种新的、更稳定的大斯托克斯位移染料,这种染料可以被775 nm的STED光耗尽^[30],成功实现多色活细胞STED成像。

2019年Pajk团队^[31]报道的几种用于活细胞STED超分辨成像的新型膜探针不仅可以获得高分辨率的STED图像,而且可以相对快速的进入细胞内膜。并且与市面上的同类型商用染料相比,稳定性更好,没有明显毒性,并且可以应用于细胞器的超分辨成像和动态监测。随着各种有机小分子STED探针的开发,以及高质量的商用STED显微镜的发展,用有机小分子探针基于STED显微镜揭示新的生物现象陆续被报道。如Schroeder等^[32]成功利用STED显微镜揭示了活细胞内质网的动态纳米孔结构。Kondadi等^[33]也成功揭示了活细胞线粒体嵴的重塑。2019年Keyes团队^[34]报道了一种具有苡结构的探针mega-Stokes,其可以用于STED显微镜中定位活细胞中的脂滴(lipid droplets, LDs)。可以观察到在STED显微镜中分辨率较共聚焦显微镜有明显提高。此外,Zheng等^[35]和Xu等^[36]也进行了类似的研究,以萘酰亚胺为基础的NIM-3A和香豆素为基础的CM2P也表现出了出色的成像性能。

线粒体在细胞内能量的产生以及在生物细胞整个生命周期的活动中起着关键的作用,被称为细胞的“动力工厂”。但是目前人们对于它的形态结构是如何调节等功能尚未可知。线粒体嵴之间的距离约为100 nm,这意味着要观察线粒体的结构必须以远低于100 nm的分辨率进行成像,这也吸引了众多研究团队的广泛关注。2019年Wang团队^[37]开发了一种基于结构增强茶磷荧光团的特异性探针MitoPB Yellow,利用该染料进行STED活细胞线粒体的超分辨成像,得到了60 nm的分辨率,观察到了活细胞线粒体嵴的超微结构(图4)。他们利用STED显微镜通过MitoPB Yellow和四甲基罗丹明(TRM)标记获得了线粒体的双色超分辨成像,并且可以清楚观察到MitoPB Yellow的荧光出现在线粒体膜内。他们利用STED显微镜对活细胞中线粒体的动力学进行了长期的监测,清晰观察到了单个线粒体和线粒体间的嵴间融合。此外,他们还通过

STED显微镜成功的对线粒体形态变化进行了长达390 s的长时程动态观测。这为了解线粒体超微结构在活细胞中的动态变化提供了一种有效的方法。

2020年Zhang等^[6]报道了一种新型的具有良好线粒体靶向性的STED探针,其具有较好的抗光漂白特性和较低的STED光功率,实现了最高62 nm的分辨率。2020年Yang等^[38]开发了一种可以用于活细胞成像的芳酸染料衍生物(MitoESq-635),这种染料可以在相对低的STED光功率下被耗尽,使得细胞在STED超分辨成像期间保持它们的自然状态。利用该染料他们成功获得了线粒体35.2 nm分辨率的活细胞成像,并且线粒体的聚变过程和裂变过程可以清晰的被观察到(图5)。

2020年Zhu等^[39]推出了基于吡啶盐衍生物的新型探针TpsPym。该探针光稳定性好,能够对活细胞中的线粒体和内质网进行特异性标记,并且可以通过荧光强度的不同将两者区分出来,很适合活细胞STED超分辨成像。该团队利用该探针观察到了内质网和线粒体接触位点的超分辨结构,并且对内质网和线粒体相互作用进行了长时间的监测。

近年来,有机金属配合物^[40-43]以其独特的配位构型被广泛用于细胞成像领域。其具有的大斯托克斯位移和较好的光稳定性等特点表明其在STED超分辨成像领域具有巨大的潜力。2016年Keyes团队^[44]首次报告用金属配合物发光体作为探针应用于活细胞STED超分辨成像技术。他们以内质网和核靶向复合物为例,证明了Ru(II)配合物可以通过信号肽靶向,精确和选择性地传递到目标细胞器,且不需要考虑膜的通透性,从而得到活细胞细胞器的超分辨成像。2017年Thomas团队^[45]报道了一种双核Ru(II)配合物探针。该探针在低浓度时可以靶向线粒体,当浓度升高以后迁徙到核DNA中,可以很容易实现活细胞线粒体和核DNA双色成像。2018年Tian团队^[46]设计合成了两种基于噻吩单元的Zn(II)配合物(LC和OLC),它可以通过和线粒体DNA(mtDNA)结合来特异性地靶向活细胞线粒体。由于其具有优异的生物相容性、红光发射和光稳定性,成功得到了活细胞STED超分辨成像。

经过近年的发展,基于有机小分子和有机金属配合物的STED探针,虽然取得了一定的进步,但是用于活细胞研究的有机STED探针的种类依然较少,而且大部分都是靶向线粒体,因此开发多种激发波长的STED有机探针,尤其是近红外波长的STED探针是接下来要解决的问题,同时开发多种

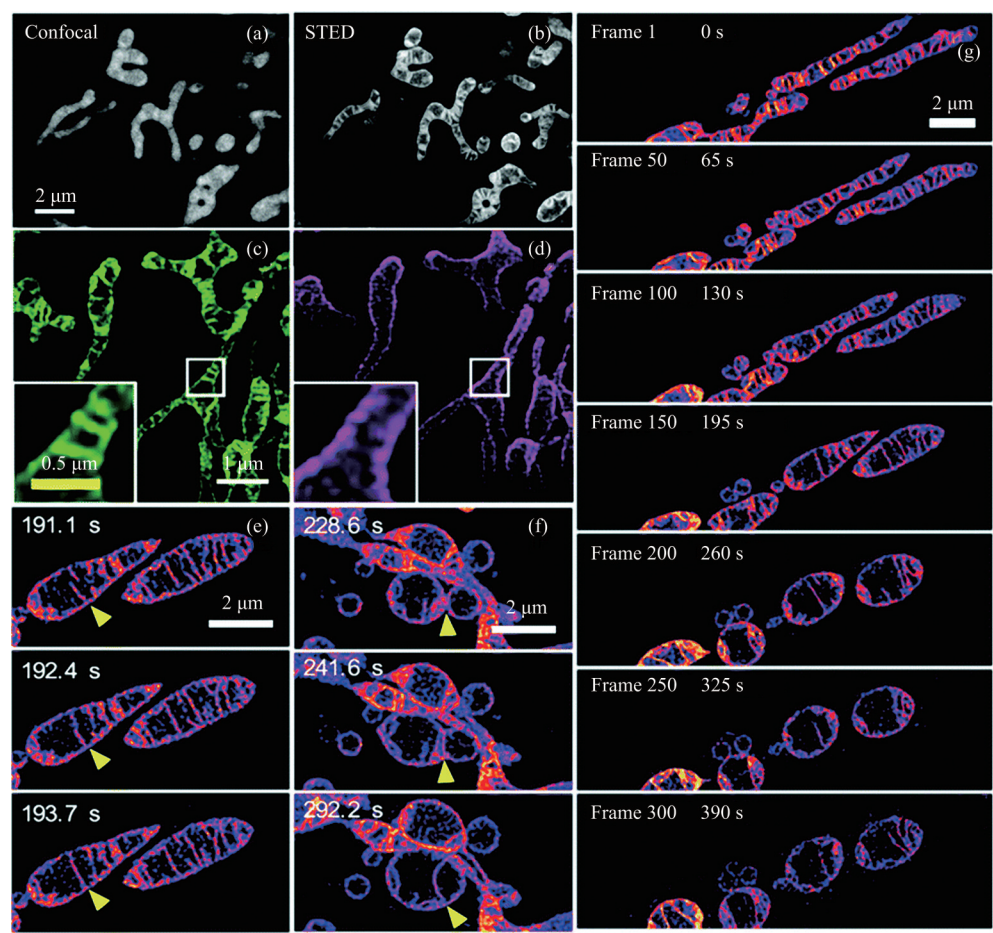


Fig. 4 Mitochondria in living HeLa cells

图4 活体Hela细胞线粒体

(a) 共聚焦和 (b) STED成像。(c) 用MitoPB Yellow标记的线粒体内膜。(d) 用TRM标记的线粒体外膜。(e-g) 线粒体动力学STED显微镜成像。

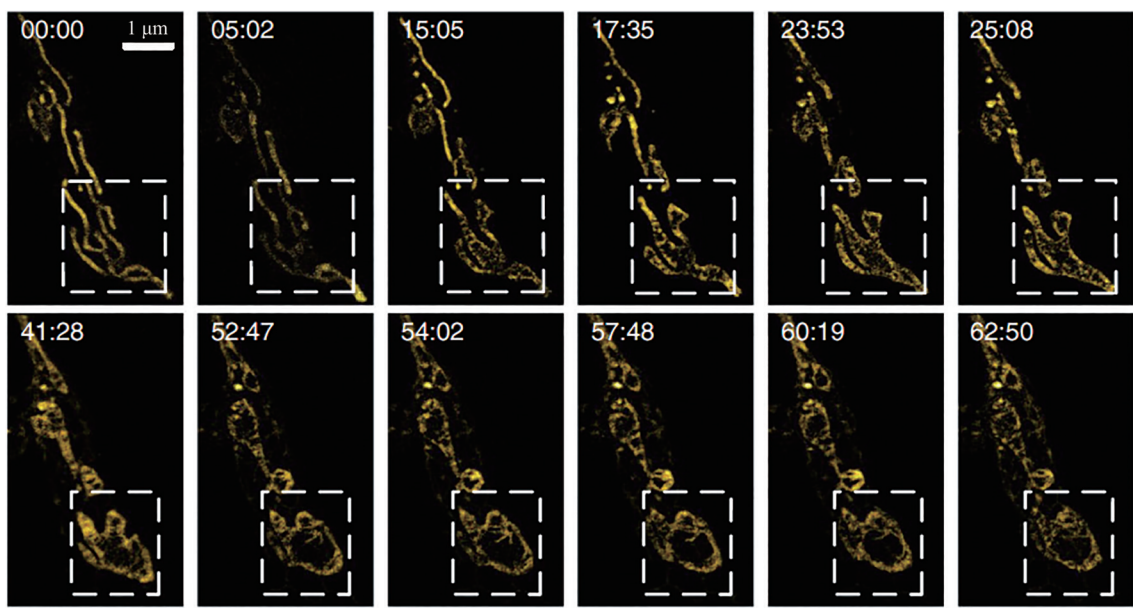


Fig. 5 Dynamic changes of cristae during mitochondrial fusion

图5 线粒体融合过程中嵴的动态变化

细胞器靶向的STED探针也是未来多色STED发展的需要。虽然,目前已开发的有机STED探针能够实现活细胞的长时程超分辨成像,但是这些探针目前还无法用于活体细胞的超分辨成像。目前能够用于活体细胞的超分辨探针依然只是荧光蛋白(fluorescent proteins, FP),因此开发用于活体超分辨成像的有机探针也是未来需要解决的问题。

1.2 基于荧光蛋白的STED活细胞超分辨成像

荧光蛋白是生物靶向性和生物兼容性都非常好的一种探针,因为它们可以被基因编码并与目的蛋白一起作为融合结构表达,而不需要额外的标记步骤。荧光蛋白特异性通常是通过基因编码的自标记蛋白质标签来实现的,这种标签可以选择性与有机荧光染料结合的底物反应。这些自标记蛋白质标签中应用比较广泛的是SNAP-tag^[47]、CLIP-tag^[48](具有正交底物特异性的SNAP-tag突变体)和Halo-tag^[49]。对自标记标签的研究表明,Halo-tag是最适合活体细胞STED成像的标签,因为Halo-tag标记的结构成像的亮度最高,所以它可以比基于SNAP的标记实现更长的成像时间^[50]。因此荧光蛋白是研究活细胞内结构和功能信息的良好探针,在STED超分辨成像领域也有较好的应用。例如,用抗体来标记暴露在神经元细胞外间隙的突触小泡,来研究它们的内吞作用和内吞后细胞内的生理运动^[9]。此外,在双色STED超分辨成像中,自标记的标签还被用来研究细胞质膜上表皮生长因子受体及其配体的动态过程^[51]。

近年来,活细胞STED超分辨成像在神经生物学领域被广泛应用。Naegerl等^[52]用黄色荧光蛋白(yellow fluorescent proteins, YFP)标记转基因小鼠的海马切片来进行活细胞STED超分辨成像,用于研究树突的一般动力学过程和结构。对于整个生物体的成像,荧光蛋白标记比基于染料的标记方法更有优势,因为直接标记可以降低非特异性背景。绿色荧光蛋白(green fluorescent proteins, GFP)和YFP的结合使用成功实现了活细胞双色STED超分辨成像^[51, 53]。但是这些荧光蛋白的光谱重叠导致荧光团采集后光谱分离存在明显的干扰,这虽然对体积成像有积极作用,但是在区分密集的亚细胞结构时会变得复杂。

2008年Heil等^[10]用YFP标记内质网来显示内质网的结构(图6),共聚焦的成像结果非常的模

糊,而STED超分辨成像的活细胞内质网结构的半高全宽为52 nm,相较于共聚焦显微镜分辨率提高了4倍。并且还可以通过YFP标记内质网实现超高分辨率的3D光学成像。还成功地以50 nm的横向分辨率动态监测了内质网的运动,揭示了内质网结构的变化,包括膜的形成和消失。

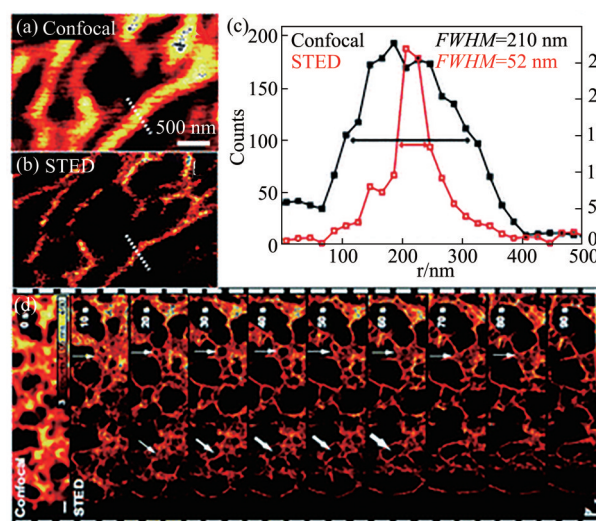


Fig. 6 Endoplasmic reticulum real-time dynamic imaging

图6 内质网实时动态成像

(a) 共聚焦和(b) STED图像,显示活细胞内质网的结构。(c) 利用计算的FWHM值对图(a)和图(b)进行线性分析。(d) 通过STED显微镜动态监测内质网运动,箭头表示采集过程中的结构变化。

2010年Heil等^[54]用基于商用红色荧光染料四甲基罗丹明(TMR)的商用底物TMR-Star标记了表达各种HAGT融合蛋白的哺乳动物细胞,不仅保持了良好的细胞完整性,并且通过STED超分辨成像能够清晰观察到细胞微丝结构,分辨率提高到了约40 nm。

荧光蛋白也可以作为生物传感器用于活细胞STED显微镜。Mishina等^[55-56]利用波形蛋白和HyPer2的融合可以在检测细胞 H_2O_2 水平的同时获得超分辨率成像(图7)。HyPer2是一种 H_2O_2 生物传感器,由突变的 H_2O_2 敏感细菌蛋白和循环排列的YFP组成。用类似的方式,Richardson等^[57]提出了基于荧光蛋白的超分辨pH指示器来研究内吞作用过程中内吞体的pH水平。

一般来说,GFP和YFP在活细胞STED超分辨

成像中已经得到了很好的应用, 因为它们易于使用, 并且具有高的量子产率。然而, 它们需要蓝色的激发光 (480 nm) 和橙色的损耗光 (595 nm), 与近红外 (>700 nm) 相比, 这两种光不是体内成像的理想光源, 因为它们的波长较短能量较高, 对

细胞有较强的光毒性^[16]。为了避免使用 595 nm 的损耗光, 目前已经开发了几种单体近红外荧光蛋白, 例如 TagRFP657^[58]、mNEPETUNE2.5^[59] 和 mGarnet^[60], 这些荧光蛋白很适合 STED 超分辨活细胞成像使用。

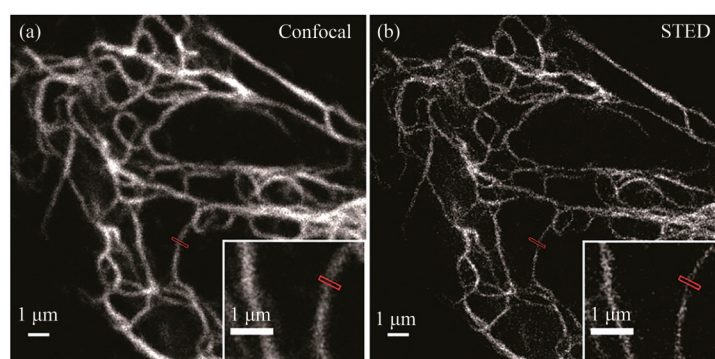


Fig. 7 Confocal (a) and STED (b) imaging of H_2O_2 by vimentin-Hyper2 in live HeLa cells

图7 活HeLa细胞的波形蛋白-Hyper2对 H_2O_2 的共聚焦 (a) 和STED (b) 成像

2017年Matela等^[61]制备了一个具有近红外发射光谱的mGarnet2荧光蛋白标签。最初应用于共聚焦显微镜对在活COS-7细胞中表达的多种融合结构进行成像, 以显示肌动蛋白、细胞骨架和结构, mGarnet2的特性显示了其作为融合标签的巨大潜力。此外, 还分别用共聚焦显微镜和STED显微镜对活细胞进行了成像, 活细胞中的微管可以通过STED显微镜清楚的观察到。

近红外区域吸收、散射和自发荧光较少, 可以很容易实现高质量的生物成像, 如深层组织成像^[58]。此外, 低光毒性和多色超分辨成像是这些荧光团在近红外窗口中的两个关键特征。Jakobs团队^[62]开发了一种可被列为融合标签的近红外荧光蛋白SNIFP, 并应用于共聚焦显微镜和STED显微镜进行活细胞成像。如图8所示, 与共聚焦显微镜相比, STED显微镜可以显示表达VIM-SNIFP和SNIFP-NUP50的活HeLa细胞的超分辨成像。共聚焦成像和其连续的STED图像显示了SNIFP非常好的光稳定性和它在动态监测和长期跟踪方面的巨大潜力。此外, 由于mCherry26在587 nm处激发的发射光谱与SNIFP的发射光谱互补, 可以由此通过STED显微镜获得红色/近红外双色超分辨成像。

Kamper等^[62]提出一种基于光敏色素的近红外荧光蛋白, 其激发和发射峰位于近红外光学窗口

内, 并在STED显微镜中得到了应用。Matlashov等^[63]也提出一组近红外荧光蛋白, 可以用于双色STED超分辨成像, 空间分辨率可达到50~70 nm, 与现有的STED染料的分分辨率相当。

虽然, 基于荧光蛋白的STED探针, 在活细胞中有较好的靶向性, 且可以根据需要靶向任何细胞器, 但是荧光蛋白也要明显的缺陷, 那就是抗光漂白能力较差, 很难用于长时程动态成像。同时, 发射波长在近红外的荧光蛋白探针也是未来荧光蛋白的重点发现方向。

1.3 基于荧光纳米探针的STED活细胞超分辨成像

根据STED超分辨成像的基本原理可知图像的分辨率与STED光的能量成反比, STED超分辨成像获得的分辨率越高需要的STED光的能量也就越高^[10, 64], 由于高STED光能量, 容易导致荧光探针的漂白和生物样品的光毒性。因此, 大多数常规的有机染料和荧光蛋白都无法承受长时间的动态成像^[65]。这限制了STED显微镜对活样品的长时间成像应用的发展。幸运的是, 材料科学的发展提供了大量光稳定性好的荧光纳米探针^[66-67]。一般来说, 这些纳米探针光稳定性较好且发光效率非常高, 并且具有较小的饱和受激辐射功率, 这使其在STED超分辨成像领域有广泛的潜在应用^[68]。

聚集诱导发射发光探针 (aggregation-induced

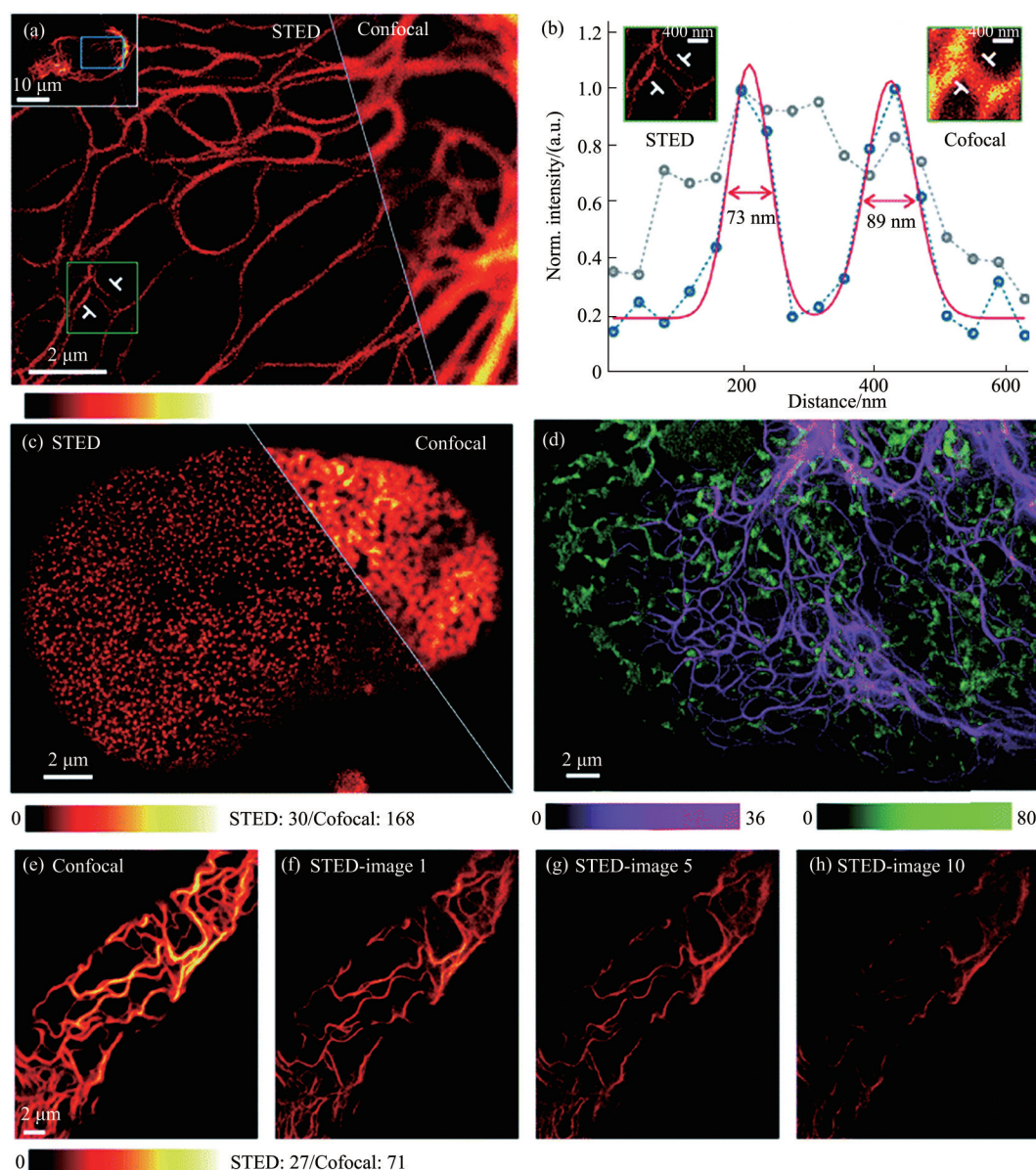


Fig. 8 Comparison of STED and confocal imaging

图8 STED与共聚焦成像对比

(a) STED和共聚焦显微镜在表达VIM-SNIFP的活细胞中的近红外成像。(b) 在插图中指示的位置检测到的线条轮廓及其计算的FWHM值。(c) STED和共聚焦显微镜在表达SNIFP-NUP50的活细胞核中的近红外成像。(d) 在STED模式下用VIM-SNIFP和在共聚焦模式下用mCherry标记内质网的双色成像。(e-h) 表达VIM-SNIFP的活体HeLa细胞的共聚焦成像 (e) 及其连续STED成像 (f-h)。

emission, AIE) 是一种理想的生物成像荧光剂, 已经被广泛的应用于细胞器靶向、细胞图谱和示踪。AIE纳米粒子由于其良好的光稳定性和抗光漂白的特性, 已经被广泛用于固定细胞的STED超分辨率成像。2017年Li等^[69]报道了一种AIE发光材

料(六苯基硅烷), 并研究了该探针的受激发射效率和抗漂白能力, 并将其应用于STED超分辨率成像。Li等^[70]在2018年首次使用AIE纳米粒子对活癌细胞中的特定细胞器进行动态STED超分辨率成像(图9), 其在STED中的量子产率可达80%以上,

使活 HeLa 细胞线粒体的超分辨成像成为可能, 横向分辨率可达 74 nm。这种染料使线粒体的动态可视化成为可能, 并且使线粒体的运动、融合和分裂在超分辨尺度上可以清楚的被观察到。

Xu 等^[71] 在 2020 年开发了一种含柔性烷基链的供体-受体型染料 DBTBT-4C8, 它不仅能发射

600~800 nm 的深红光, 而且还具有较高的荧光亮度, 光致发光量子产率为 25%。使用 DBTBT-4C8 可制备具有亮度高、生物相容性和光稳定性较好的球形纳米粒子, 该团队将制备的这种荧光有机纳米颗粒用于 STED 超分辨成像, 实现了玻璃鲶鱼的活细胞超分辨成像。

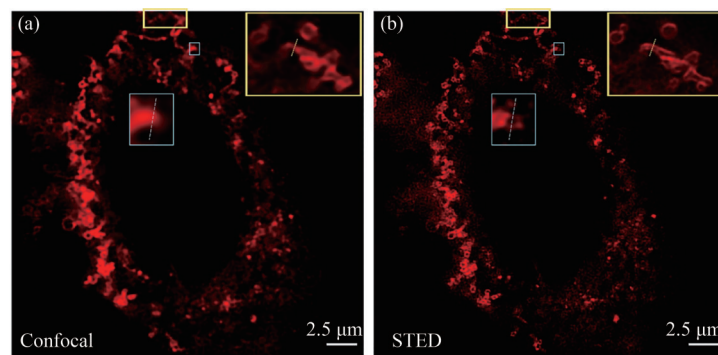


Fig. 9 Mitochondrial confocal (a) imaging and STED (b) imaging of TPA-T-CYP staining in live cells

图9 活细胞内TPA-T-CYP染色的线粒体共聚焦成像(a)和STED成像(b)

碳点(CDs)通常指的是主要由碳和其他非金属元素组成的小于 10 nm 的发光粒子。自 2006 年被 Sun 团队^[72] 首次报道以来, CDs 因其独特的光致发光、低毒/无毒、高水溶性、生物相容性好、原料丰富、合成简单和成本低等优点一直被认为是很有潜力的生物应用荧光探针。2019 年 Li 团队^[73] 报告了一种荧光碳点(FNCDs), 通过掺杂氟元素获得了适合活细胞成像的高光致发光量子产率(56%), 且具有低毒性、抗光漂白和良好的水溶性的碳点。此外, FNCDs 可以染色活细胞中的核仁和隧道纳米管(TNTs)。更重要的是, STED 超分辨成像有效抑制了背景信号并提高了成像分辨率。活细胞核仁中单个 FNCDs 分辨率可达 19.7 nm, 并且还获得具有约 75 nm 分辨率 TNTs 直径的精细活细胞荧光成像。此外, FNCDs 在 STED 超分辨成像中经过 1 000 次循环扫描后显示出优异的抗漂白特性。

2021 年 Liu 等^[74] 开发了一种核酸大分子响应型碳化聚合物点探针, 其结合 DNA/RNA 分子后在 488 nm 激发光照射下荧光强度大大增强(40~60 倍), 能在免洗条件下实现对活细胞中核酸结构的高亮标记。不仅如此, 该探针在 592 nm STED 光作用下显示出明显的受激发射损耗效应, 饱和受激发射强度仅为 0.68 mW (0.23 MW/cm²), 能在较低

的光强下(4.1 mW) 实现~2 倍衍射极限分辨率的超分辨成像, 抗光漂白能力相比于大部分小分子荧光分子探针有明显提升, 并用该探针实现了活细胞核的 STED 超分辨成像和荧光寿命成像。

2020 年 Liang 等^[75] 报道了一种基于荧光有机硅杂化荧光纳米点的 STED 超分辨成像探针, 该探针尺寸小于 2 nm, 光量子产率接近 1。该探针具有较低的饱和受激发射功率(0.54 mW), 且具有较好的光稳定性和抗光漂白特性。利用该探针最高可以获得 19.7 nm 的超高分辨率, 同时利用该探针实现了活细胞溶酶体的超分辨成像。

基于纳米点的 STED 荧光探针由于具有高的发光效率和较好的抗光漂白特性, 在近年来也得到了快速的发展, 开发出了许多用于 STED 成像的纳米探针, 相较于有机小分子和荧光蛋白, 这些纳米探针有一个共同缺陷那就是靶向性较差, 因此未来基于纳米点的荧光探针在表面修饰增强其靶向性上需要进一步发展。

1.4 低功率 STED 超分辨成像研究

在传统的 STED 中, 激发光束被环状光束覆盖, 通过受激辐射作用使得其有效 PSF 被压缩, 而环形光束的中心区域是通过螺旋相位板产生的, 因此 STED 光功率越高, 中心的区域就越小。这也导致了要增大 STED 光的强度才能提高 STED 的成像

分辨率。目前的商用STED超分辨成像系统通常需要高达数十毫瓦甚至数百毫瓦的STED光才能实现分辨率降至10~100 nm。遗憾的是,强激光会对样品造成严重的光损伤和对荧光探针的光漂白,这不仅破坏了样品的结构和功能,更限制STED系统在活细胞甚至活体细胞中的应用。因此,开发低STED光功率的超分辨成像方法,成为了新的研究热点。

Wang等^[76]在2019年提出基于深度学习的方法,利用共聚焦成像的结果得到了与STED超分辨成像相当的分辨率。该方法不需要对成像过程进行数值建模或估计点扩散函数,而是基于训练生成性对抗网络将衍射受限的输入图像转换为超分辨率图像。基于该团队提出的这个框架,可以使用低数值孔径物镜得到的分辨率可以与高数值孔径物镜相当。该团队还展示了跨模式超分辨率,转换共聚焦图像得到了与STED相当的分辨率,并且进一步证明细胞和组织内亚细胞结构的全内反射荧光(TIRF)显微图像也可以被转换,与基于TIRF的结构照明显微镜获得的结果相匹配。这个深层网络可快速输出超分辨图像,无需迭代或参数搜索,可以实现超分辨成像的低成本大众化。

2021年Wang等^[77]提出了一种调制STED(mSTED)的新方法,通过分别在时间域和空间域对荧光信号进行调制来降低STED技术对损耗功率的需求。该方法基于一套STED-FLIM

(fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM)成像系统,其中损耗光脉冲相对激发光脉冲有一个较长的时间延迟,此时在一个脉冲周期内荧光衰减曲线同时包含了共聚焦光子和STED光子。基于时间分辨检测(time-resolved detection)技术,可以对损耗光子进行加权差分,逐像素地从STED光子中去除衍射受限的残余信号,最后通过荧光信号的空间调制,进一步抑制激发光斑周围区域的自发辐射荧光,从而实现低功率条件下的STED超分辨成像。经验证,在损耗激光能量比传统STED技术低几十倍的情况下,调制STED分别在固定细胞和活细胞中实现了 $\sim\lambda/9$ 和 $\sim\lambda/7$ 的分辨率。最后利用该方法对活细胞微管的动态变化进行了超分辨动态观察(图10)。

Zhang等^[78]在2021年开发了一种低功率双色STED超分辨成像系统。其采用单束超连续白光激光器,结合数字增强方法^[79]成功实现了用于动态活细胞成像的低功耗双色DE-STED(digitally enhanced STED, DE-STED)超分辨成像。该方法首先通过从共焦图像减去STED图像来获得甜甜圈图像,然后对甜甜圈图像进行数字增强,以进一步获得更高的分辨率。通过从原始共聚焦图像减去增强的甜甜圈图像乘以增强系数来获得DE-STED图像。在双色DE-STED显微镜中,将两个通道的增强因子相乘,得到双色DE-STED图像,从而实现超低功率下的双色超分辨率成像。

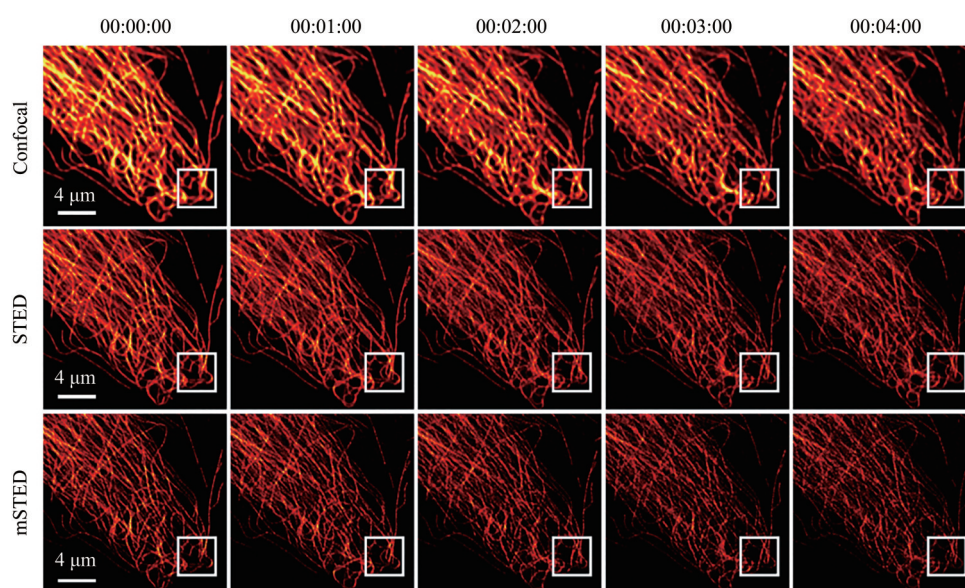


Fig. 10 Time-lapse confocal, STED and modulated STED imaging of microtubules

图10 微管的延时共聚焦、STED和调制STED成像

近年来, 在低功率超分辨成像技术的开发上, 有许多的新技术被提出, 也取得了不错的实验结果, 但是, 这些技术目前都只是停留在离体细胞的实验室上, 在活体细胞超分辨上的应用还很少见到。同时这些技术都还只是停留在实验室阶段, 在产品化和技术推广上依然有很长的路要走。

2 活体STED超分辨成像

虽然STED超分辨成像技术在活细胞的研究中已经得到广泛的应用, 但是细胞的很多功能在离体细胞和在体细胞中是完全不同, 因此最好的办法就进行在体研究细胞的结构和功能。目前活体STED研究最多的主要是针对神经元细胞, STED超分辨成像技术发明人Hell团队^[80]最早在2012年实现了用STED观察活体小鼠大脑皮层中的神经元。他们开发了一种直立扫描的STED荧光显微镜, 用增强型黄色荧光蛋白(EYFP)靶向神经元细胞。STED成像显示了小鼠大脑体感分子层内的树突, 成像深

度为10~15 μm , 分辨率小于70 nm。尽管EYFP对STED光束的吸收忽略不计, 但在该波长下组织中可能会发生逆向吸收, 偶尔可以观察到内部线粒体较多相对粗大的树突局部轻微肿胀。但是没有观察到树突状突起的降解或解聚, 这意味着也没有细胞死亡。避免这一现象的最好解决办法是采用波长更长的红色荧光蛋白作为成像探针。

STED显微镜具有超分辨能力和相对较高的成像速度, 是研究活体神经元细胞突触动态变化过程的理想方法。利用红光或者近红外光激发的荧光蛋白可以减少来自内源性荧光团本身的背景信号和减少对生物组织的光毒性, 并且散射截面很小使得组织穿透性增强。Wegner等^[81]报道了基于近红外荧光蛋白mNetune2的STED超分辨成像。对活体小鼠皮层肌动蛋白实现了分辨率约80 nm的超分辨成像, 成像时间长达1 h (图11), STED光功率低至27 mW。并且近红外荧光蛋白在活着的小鼠体内表达3~4周, 没有发现任何毒性效应。但是近红外荧光蛋白有一个缺点是相比于GFP变体亮度较低。

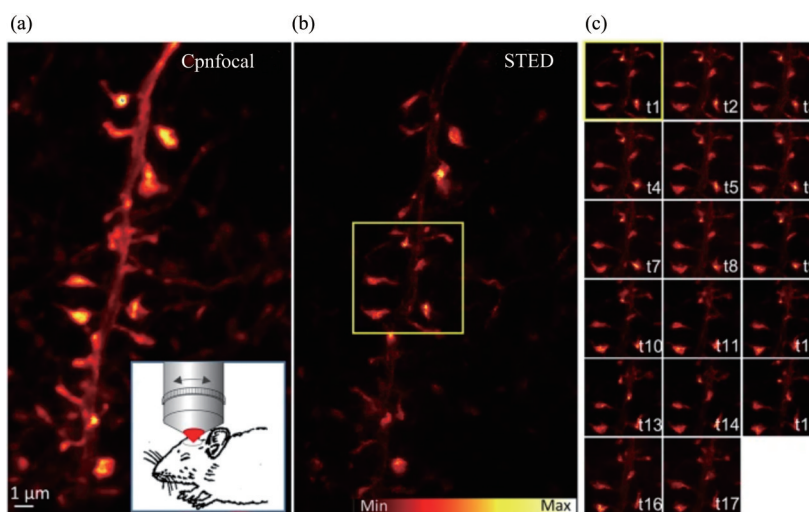


Fig. 11 *In vivo* STED microscopy using Lifeact-labeled filamentous actin fused to the far-infrared fluorescent protein mNetune2

图11 体内使用Lifeact标记的丝状肌动蛋白和近红外荧光蛋白mNetune2融合的STED显微镜

活体小鼠丝状肌动蛋白的STED超分辨成像。(a) 树突的共焦成像。(b) 树突的超分辨成像。(c) 图(b)标记区域的动态超分辨成像。

突触后密度(post-synaptic density, PSD)是由大约1 000个蛋白质组成的电子致密区, 位于兴奋性突触的突触后膜上, 其大小随突触强度的不同而变化, PSD95是PSD中的骨架蛋白。Wegner等^[82]将EGFP与内源性PSD95融合表达实现了从1 min到6 h的连续超分辨成像, 观察到了PSD95

的不同亚结构。Masch等^[83]又报道了一种应用于STED超分辨成像的近红外波段的荧光蛋白, 利用该蛋白质观察到了活体小鼠兴奋性突触后膜上丰富的PSD95的分布, 在小于25 μm 深度的视皮层中获得了高对比度和低背景的STED超分辨成像, 分辨率低至70 nm。

通过形成和消除突触来连接神经回路是哺乳动物大脑学习和记忆的关键机制。树突是兴奋性突触的后结构成分,其结构功能已经被广泛研究。相比之下,人们对海马体的脊柱可塑性知之甚少,海马体是大脑典型的记忆中心,很难在这种深度嵌入的结构中以足够的空间分辨率可视化树突。Pfeiffer等^[84]在小鼠海马体中构建了一个慢性2P-STED显微镜,使用基于切除皮质组织的“海马窗口”和工作距离较长的物镜。观察到的脊柱密度较之前的研究高出两倍,并测出4 d内脊柱的周转率约为40%,为突触电路的高水平结构重组提供了直接证据。使得通过遗传、分子和行为实验对纳米级神经解剖结构进行相关分析成为可能。锥体神经元脊椎上的兴奋性突触是皮层记忆痕迹的中心位置。Vrban等^[85]设计了一个慢性活体STED超分辨成像系统,实现了小鼠新皮质树突长达1个月的超分辨成像,观察到了纳米级的脊柱重塑过程,发现了脊柱重塑的多个独立驱动因素。首次在活体内观察脊柱、头部和颈部几何形状在长时间内持续动态波动的特征,提供了体内脊柱动力学的成像。为了便于进行活体STED超分辨成像,Steffens团队^[86]为活体STED超分辨成像研制了一种带加热的小鼠固定台,使小鼠的体温保持稳定,且可以根据显微镜的光轴进行调节。并且对设计进行了优化,避免引起热漂移。同时还安装了一个引流管来减少玻璃窗和大脑表面的液体,这大大减少了运动伪影。这些设计使得只需要简单的腹膜内麻醉,避免了静脉输液和人工辅助呼吸。

虽然STED显微镜能够对离体神经元细胞动态纳米级结构进行3D超分辨成像。但是,在对活体的神经元细胞进行3D-STED超分辨成是非常难的,因为在生物体中光的散射和像差是限制3D-STED超分辨成像关键因素。Velasco等^[87]提出了一种克服这些挑战的STED超分辨成像系统。通过双光子激发、自适应光学、红光有机染料和长距离水浸物镜的组合,实现了像差校正的3D超分辨率成像,在小鼠脑组织切片中实现了成像深度164 μm ,分辨率为70 nm的超分辨成像,同时在活体小鼠的脑组织中实现了成像深度76 μm 分辨率为150 nm的超分辨成像,并观察了活体小鼠的神经元细胞3D动态超分辨成像。

活体超分辨成像对生物本质的了解非常有意义,但是从STED超分辨成像技术提出到现在,已经有20多年,有关活体超分辨成像方面的文献还

是非常少,主要问题是能用于活体超分辨成像的探针非常少,目前主要集中在荧光蛋白上,但是荧光蛋白抗漂泊性较差,很难用于长时程动态观测。同时,活体超分辨成像的深度也非常有限,主要是受限于缺少红外波段的荧光探针。

3 未来展望

自2000年首次在细菌和酵母菌中演示后,活细胞STED超分辨成像迅速发展成为研究纳米生物结构和过程的一种多功能成像工具。与其他超分辨成像方式相比,STED超分辨成像技术的一个关键优势是成像速度快,不需要任何后期处理就可以实时成像。但是需要有抗光漂泊的探针和复杂的硬件条件。此外,自从STED超分辨显微镜发明以来,人们一直都在努力解决高激光能量和活细胞的兼容性,在保持较高分辨率的条件下降低STED光能量是进行长时程活细胞或活体超分辨成像的前提条件。因此开发降低STED光的新技术和开发低饱和受激辐射功率的探针是STED超分辨成像技术未来广泛应用的先决条件。

总之,近年来在新探针和新技术方面的快速发展,STED超分辨成像将为活细胞和在体细胞的长时程超分辨成像研究提供了新的工具,该技术将在分子水平研究细胞的功能和结构具有重大的意义,同时对纳米药物的开发、筛选和疾病治疗研究也具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Scorrano L, De Matteis M A, Emr S, *et al.* Coming together to define membrane contact sites. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 1287
- [2] Cosson P, Amherdt M, Rothman J E, *et al.* A resident Golgi protein is excluded from peri-Golgi vesicles in NRK cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(20): 12831-12834
- [3] 王璐玮. 受激发射损耗超分辨成像技术的性能优化及应用研究[D]. 深圳: 深圳大学, 2019
Wang L W. Study on Performance Optimization and Application of Stimulated Emission Depletion Super-resolution Microscopy [D]. Shenzhen: Shenzhen University, 2019
- [4] Lauterbach M A, Keller J, Schoenel A, *et al.* Comparing video-rate STED nanoscopy and confocal microscopy of living neurons. *J Biophotonics*, 2010, **3**(7): 417-424
- [5] Guo Y, Yan W, Huang Y R, *et al.* Research progress of FPGA technology in biomedical imaging. *Prog Biochem Biophys*, 2020, **47**(6): 483-497
- [6] Zhang J, Samanta S, Wang J L, *et al.* Study on a novel probe for stimulated emission depletion super-resolution imaging of mitochondria. *Acta Phys Chim Sin*, 2020, **69**(16): 168702

- [7] Wang J L, Yan W, Zhang J, *et al.* New advances in the research of stimulated emission depletion super-resolution microscopy. *Acta Phys-Chim Sin*, 2020, **69**(10): 108702
- [8] Osseforth C, Moffitt J R, Schermelleh L, *et al.* Simultaneous dual-color 3D STED microscopy. *Opt Express*, 2014, **22**(6): 7028-7039
- [9] Westphal V, Rizzoli S O, Lauterbach M A, *et al.* Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. *Science*, 2008, **320**(5873): 246-249
- [10] Hein B, Willig K I, Hell S W. Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(38): 14271-14276
- [11] Bottanelli F, Kromann E B, Allgeyer E S, *et al.* Two-colour live-cell nanoscale imaging of intracellular targets. *Nat Commun*, 2016, **7**(1): 10778
- [12] Wall K P, Dillon R, Knowles M K. Fluorescence quantum yield measurements of fluorescent proteins: a laboratory experiment for a biochemistry or molecular biophysics laboratory course. *Biochem Mol Biol Educ*, 2015, **43**(1): 52-59
- [13] Lukinavicius G, Umezawa K, Olivier N, *et al.* A near-infrared fluorophore for live-cell super-resolution microscopy of cellular proteins. *Nat Chem*, 2013, **5**(2): 132-139
- [14] Lukinavicius G, Reymond L, D'este E, *et al.* Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton. *Nat Methods*, 2014, **11**(7): 731-U168
- [15] Tosheva K L, Yuan Y, Pereira P M, *et al.* Between life and death: Strategies to reduce phototoxicity in super-resolution microscopy. *J Phys D Appl Phys*, 2020, **53**(16): 163001
- [16] Waeldechen S, Lehmann J, Klein T, *et al.* Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy. *Sci Rep*, 2015, **5**(1): 15348
- [17] D'este E, Kamin D, Goettfert F, *et al.* STED nanoscopy reveals the ubiquity of subcortical cytoskeleton periodicity in living neurons. *Cell Rep*, 2015, **10**(8): 1246-1251
- [18] Schmidt R, Wurm C A, Jakobs S, *et al.* Spherical nanosized focal spot unravels the interior of cells. *Nat Methods*, 2008, **5**(6): 539-544
- [19] Pellett P A, Sun X, Gould T J. Two-color STED microscopy in living cells. *Biomed Opt Express*, 2011, **2**(8): 2364-2371
- [20] Hua Y, Sinha R, Thiel C S, *et al.* A readily retrievable pool of synaptic vesicles. *Nat Rev Neurosci*, 2011, **14**(7): 833-839
- [21] Kremer K, Kamin D, Rittweger E, *et al.* An overexpression screen of *Toxoplasma gondii* Rab-GTPases reveals distinct transport routes to the micronemes. *PLoS Pathog*, 2013, **9**(3): e1003213
- [22] Lavieu G, Dunlop M H, Lerich A, *et al.* The Golgi ribbon structure facilitates anterograde transport of large cargoes. *Mol Cell Biol*, 2014, **25**(19): 3028-3036
- [23] Sednev M V, Belov V N, Hell S W. Fluorescent dyes with large Stokes shifts for super-resolution optical microscopy of biological objects: a review. *Methods Appl Fluoresc*, 2015, **3**(4): 2004
- [24] Goettfert F, Wurm C A, Mueller V, *et al.* Coaligned dual-channel STED nanoscopy and molecular diffusion analysis at 20 nm resolution. *Biophys J*, 2013, **105**(1): L1-L3
- [25] Butkevich A N, Mitronova G Y, Sidenstein S C, *et al.* Fluorescent rhodamines and fluorogenic carbopyronines for super-resolution STED microscopy in living cells. *Angew Chem Int Ed*, 2016, **55**(10): 3290-3294
- [26] Butkevich A N, Belov V N, Kolmakov K, *et al.* Hydroxylated fluorescent dyes for live-cell labeling: synthesis, spectra and super-resolution STED. *Chem Sci*, 2017, **23**(50): 12114-12119
- [27] Spahn C, Grimm J B, Lavis L D, *et al.* Whole-cell, 3D, and multicolor STED imaging with exchangeable fluorophores. *Nano Lett*, 2019, **19**(1): 500-505
- [28] Butkevich A N, Ta H, Ratz M, *et al.* Two-color 810 nm STED nanoscopy of living cells with endogenous SNAP-tagged fusion proteins. *ACS Chem Biol*, 2018, **13**(2): 475-480
- [29] Lukinavicius G, Reymond L, Umezawa K, *et al.* Fluorogenic probes for multicolor imaging in living Cells. *J Am Chem Soc*, 2016, **138**(30): 9365-9368
- [30] Butkevich A N, Lukinavicius G, D'este E, *et al.* Cell-permeant large stokes shift dyes for transfection-free multicolor nanoscopy. *J Am Chem Soc*, 2017, **139**(36): 12378-12381
- [31] Pajk S, Majaron H, Novak M, *et al.* New coumarin- and phenoxazine-based fluorescent probes for live-cell STED nanoscopy. *Eur Biophys J*, 2019, **48**(5): 485-490
- [32] Schroeder L K, Barentine A E S, Merta H, *et al.* Dynamic nanoscale morphology of the ER surveyed by STED microscopy. *J Cell Biol*, 2019, **218**(1): 83-96
- [33] Kondadi A K, Anand R, Hnsch S, *et al.* Cristae undergo continuous cycles of membrane remodelling in a MICOS-dependent manner. *EMBO Rep*, 2020, **21**(3): e49776
- [34] Connor D O, Byrne A, Berselli G B, *et al.* Mega-stokes pyrene ceramide conjugates for STED imaging of lipid droplets in live cells. *Analyst*, 2019, **144**(5): 1608-1621
- [35] Zheng X, Zhu W, Ni F, *et al.* A specific bioprobe for super-resolution fluorescence imaging of lipid droplets. *Sens Actuators B Chem*, 2018, **255**(Pt.3): 3148-3154
- [36] Xu H, Zhang H, Liu G, *et al.* Coumarin-based fluorescent probes for super-resolution and dynamic tracking of lipid droplets. *Anal Chem*, 2019, **91**(1): 977-982
- [37] Wang C, 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
- [38] Yang X, Yang Z, Wu Z, *et al.* Mitochondrial dynamics quantitatively revealed by STED nanoscopy with an enhanced squaraine variant probe. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 17546
- [39] Zhu F, Yang Z, Wang F, *et al.* 4-Dimensional observation ER-mitochondria interaction in living cells under nanoscopy by a stable pyridium salt as biosensor. *Sens Actuators B Chem*, 2020, **305**(1): 127492
- [40] Zhao Q, Huang C, Li F. Phosphorescent heavy-metal complexes for bioimaging. *Chem Soc Rev*, 2011, **40**(5): 2508-2524
- [41] Ma D L, He H Z, Leung K H, *et al.* Bioactive luminescent

- transition-metal complexes for biomedical applications. *Angew Chem Int Ed*, 2013, **52**(30): 7666-7682
- [42] Forster C, Heinze K. Photophysics and photochemistry with Earth-abundant metals - fundamentals and concepts. *Chem Soc Rev*, 2020, **49**(4): 1057-1070
- [43] Saha M L, Yan X, Stang P J. Photophysical properties of organoplatinum(II) compounds and derived self-assembled metallacycles and metallacages: fluorescence and its applications. *ACS Chem Res*, 2016, **49**(11): 2527-2539
- [44] Byrne A, Burke C S, Keyes T E. Precision targeted ruthenium(II) luminophores; highly effective probes for cell imaging by stimulated emission depletion (STED) microscopy. *Chem Sci*, 2016, **7**(10): 6551-6562
- [45] Sreedharan S, Gill M R, Garcia E, *et al.* Multimodal super-resolution optical microscopy using a transition-metal-based probe provides unprecedented capabilities for imaging both nuclear chromatin and mitochondria. *J Am Chem Soc*, 2017, **139**(44): 15907-15913
- [46] Shen Y, Shao T, Fang B, *et al.* Visualization of mitochondrial DNA in living cells with super-resolution microscopy using thiophene-based terpyridine Zn(II) complexes. *Chem Comm*, 2018, **54**(80): 11288-11291
- [47] Keppler A, Gendreizig S, Gronemeyer T, *et al.* A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(1): 86-89
- [48] Gautier A, Juillerat A, Heinis C, *et al.* An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chem Biol*, 2008, **15**(2): 128-136
- [49] Los G V, Encell L P, McDougall M G, *et al.* HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem Biol*, 2008, **3**(6): 373
- [50] Erdmann R S, Baguley S W, Richens J H, *et al.* Labeling strategies matter for super-resolution microscopy: a comparison between Halotags and SNAP-tags. *Cell Chem Biol*, 2019, **26**(4): 584
- [51] Tonnesen J, Nadrigny F, Willig K I, *et al.* Two-color STED microscopy of living synapses using a single laser-beam pair. *Biophys J*, 2011, **101**(10): 2545-2552
- [52] Naegerl U V, Willig K I, Hein B, *et al.* Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **48**(105): 18982-18987
- [53] Bethge P, Chereau R, Avignone E, *et al.* Two-photon excitation STED microscopy in two colors in acute brain slices. *Biophys J*, 2013, **104**(4): 778-785
- [54] Hein B, Willig K I, Wurm C A, *et al.* Stimulated emission depletion nanoscopy of living cells using SNAP-tag fusion proteins. *Biophys J*, 2010, **98**(1): 158-163
- [55] Mishina N M, Mishin A S, Belyaev Y, *et al.* Live-cell STED microscopy with genetically encoded biosensor. *Nano Lett*, 2015, **15**(5): 2928-2932
- [56] Mishina N M, Belousov V V. Live-cell STED imaging with the HyPer2 biosensor. *Methods Mol Biol*, 2017, **1663**(1): 21-28
- [57] Richardson D S, Gregor C, Winter F R, *et al.* SRpHi ratiometric pH biosensors for superresolution microscopy. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 577
- [58] Morozova K S, Piatkevich K D, Gould T J, *et al.* Far-red fluorescent protein excitable with red lasers for flow cytometry and superresolution STED nanoscopy. *Biophys J*, 2010, **99**(2): L13-15
- [59] Chu J, Haynes R D, Corbel S Y, *et al.* Non-invasive intravital imaging of cellular differentiation with a bright red-excitable fluorescent protein. *Nat Methods*, 2014, **11**(5): 572-578
- [60] Hense A, Prunsche B, Gao P, *et al.* Monomeric Garnet, a far-red fluorescent protein for live-cell STED imaging. *Sci Rep*, 2015, **5**(3): 18006
- [61] Matela G, Gao P, Guigas G, *et al.* A far-red emitting fluorescent marker protein, mGarnet2, for microscopy and STED nanoscopy. *Chem Commun*, 2017, **53**(5): 979-982
- [62] Kamper M, Ta H, Jensen N A, *et al.* Near-infrared STED nanoscopy with an engineered bacterial phytochrome. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 4762
- [63] Matlashov M E, Shcherbakova D M, Alvelid J, *et al.* A set of monomeric near-infrared fluorescent proteins for multicolor imaging across scales. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 239
- [64] Meyer L, Wildanger D, Medda R, *et al.* Dual-color STED microscopy at 30-nm focal-plane resolution. *Small*, 2008, **4**(8): 1095-1100
- [65] Wildanger D, Medda R, Kastrup L, *et al.* A compact STED microscope providing 3D nanoscale resolution. *J Microsc*, 2009, **236**(1): 35-43
- [66] Wolfbeis O S. An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. *Chem Soc Rev*, 2015, **44**(14): 4743-4768
- [67] Jin D, Xi P, Wang B, *et al.* Nanoparticles for super-resolution microscopy and single-molecule tracking. *Nat Methods*, 2018, **15**(6): 415-423
- [68] Liu Y, Peng Z, Peng X, *et al.* Shedding new lights into STED microscopy: emerging nanoprobe for imaging. *Front Chem*, 2021, **9**(1): 641330
- [69] Li D, 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**(1): 1703643
- [70] Li D, Ni X, Zhang X, *et al.* Aggregation-induced emission luminogen-assisted stimulated emission depletion nanoscopy for super-resolution mitochondrial visualization in live cells. *Nano Res*, 2018, **11**(11): 6023-6033
- [71] Xu Y, Zhang H, Zhang N, *et al.* Deep-red fluorescent organic nanoparticles with high brightness and photostability for super-resolution *in vitro* and *in vivo* imaging using STED nanoscopy. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**(6): 6814-6826
- [72] Sun Y P, Zhou B, Lin Y, *et al.* Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *J Am Chem Soc*, 2006, **128**(24): 7756-7757
- [73] Li H, Ye S, Guo J, *et al.* Biocompatible carbon dots with low-saturation-intensity and high-photobleaching-resistance for STED

- nanoscopy imaging of the nucleolus and tunneling nanotubes in living cells. *Nano Res*, 2019, **12**(12): 3075-3084
- [74] Liu Y F, Song Y W, Zhang J, *et al.* Responsive carbonized polymer dots for optical super-resolution and fluorescence lifetime imaging of nucleic acids in living cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, **13**(43): 50733-50743
- [75] Liang L, Yan W, Qin X, *et al.* Designing sub-2 nm organosilica nanohybrids for far-field super-resolution imaging. *Angew Chem Int Ed*, 2020, **59**(2): 746-751
- [76] Wang H, Rivenson Y, Jin Y, *et al.* Deep learning enables cross-modality super-resolution in fluorescence microscopy. *Nat Methods*, 2019, **16**(1): 103-110
- [77] Wang L W, Chen Y, Guo Y, *et al.* Low-power STED nanoscopy based on temporal and spatial modulation. *Nano Res*, 2022, **15**(4): 3479-3486
- [78] Zhang J, Gao X W, Wang L W, *et al.* Low-power two-color stimulated emission depletion microscopy for live cell imaging. *Biosensors*, 2021, **11**(9): 330
- [79] Wang L, Chen Y, Peng X, *et al.* Ultralow power demand in fluorescence nanoscopy with digitally enhanced stimulated emission depletion. *Nanophotonics*, 2020, **9**(4): 831-839
- [80] Berning S, Willig K I, Steffens H, *et al.* Nanoscopy in a living mouse brain. *Science*, 2012, **335**(6068): 551-551
- [81] Wegner W, Ilgen P, Gregor C, *et al.* *In vivo* mouse and live cell STED microscopy of neuronal actin plasticity using far-red emitting fluorescent proteins. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 11781
- [82] Wegner W, Mott A C, Grant S G N, *et al.* *In vivo* STED microscopy visualizes PSD95 sub-structures and morphological changes over several hours in the mouse visual cortex. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 219
- [83] 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): E8047-E8056
- [84] Pfeiffer T, Poll S, Bancelin S, *et al.* Chronic 2P-STED imaging reveals high turnover of dendritic Ines in the hippocampus *in vivo*. *Elife*, 2018, **7**(1): 17
- [85] Urban B E, Xiao L, Chen S, *et al.* *In vivo* superresolution imaging of neuronal structure in the mouse brain. *IEEE T Biomed Eng*, 2018, **65**(1): 232-238
- [86] Steffens H, Wegner W, Willig K I. *In vivo* STED microscopy: a roadmap to nanoscale imaging in the living mouse. *Methods*, 2020, **174**(1): 42-48
- [87] Velasco M G M, Zhang M Y, Antonello J, *et al.* 3D super-resolution deep-tissue imaging in living mice. *Optica*, 2021, **8**(4): 442-450

Live Cell and *In vivo* Super-resolution Imaging Based on STED*

ZHOU Han-Qiu, ZHU Yin-Ru, HAN Hong-Yi, WANG Lu-Wei, YANG Zhi-Gang,
YAN Wei**, QU Jun-Le

(College of Physics and Optoelectronic Engineering, Shenzhen Key Laboratory of Photonics and Biophotonics, Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract As the basic structural and functional unit of life, cells have very important research significance in biology, medicine and other fields. With the development of modern science and technology, scientists have a very clear understanding of the spatial structure of cells and organelles with the help of electron microscopes. However, very little is known about their functions and the interactions between cells, and this is precisely the information that disease treatment and drug development urgently need to know. Therefore, the study of subcellular organelles *in vitro* living cells and *in vivo* living cells have become very important. However, the structure of many organelles in living cells are at the nanoscale. Traditional optical imaging techniques cannot observe nanoscale biological structures due to the limitation of the optical diffraction limit. Therefore, optical super-resolution imaging technology is an effective tool to study the structure and function of subcellular organelles. Among all optical super-resolution microscopy techniques, stimulated emission depletion (STED) super-resolution imaging technology has the capabilities of real-time, three-dimensional super-resolution and tomographic imaging. Therefore, the STED is very suitable for nanoscale live cell and *vivo* imaging studies. Moreover, STED super-resolution imaging technology has been widely used for super-resolution dynamic observation of living cells and even living mouse cells after decades of development. This paper summarized the research progress of STED super-resolution imaging in the fields of *in vitro* living cells and *in vivo* mouse neurons in recent years, and introduces the development status of fluorescent dyes and fluorescent proteins for STED super-resolution imaging of *in vitro* and *in vivo* living cells. *In vivo* cells super-resolution imaging is very meaningful for understanding the nature of cells, but it has been more than 20 years since the STED super-resolution imaging technology was proposed to the present, and there are still very few literatures on *in vivo* cells super-resolution imaging. The main problem is that very few probes are available for *in vivo* cells super-resolution imaging. At the same time, the depth of *in vivo* cells super-resolution imaging is also very limited, mainly due to the lack of fluorescent probes in the infrared band. Finally, the future application prospects of *in vivo* cells super-resolution imaging are prospected.

Key words living cells, *in vivo*, STED, super-resolution imaging

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0272

* This work was supported by grants from the National Key R&D Program of China (2021YFF0502900), The National Natural Science Foundation of China (61835009, 62005171, 61975127), the Key Project of Guangdong Provincial Department of Education (2021ZDZX2013), the Guangdong Natural Science Foundation (2022A1515011954, 2020A1515010679), and Shenzhen Basic Research Project (JCYJ20190808111418696).

** Corresponding author.

Tel: 86-15815519182, E-mail: weiyan@szu.edu.cn

Received: June 10, 2022 Accepted: July 13, 2022