

量子点闪烁与MINFLUX技术结合在生物成像中的突破

许靖瑶, 寇鑫垒, 王 晶*

上海理工大学智能科技学院, 上海

收稿日期: 2025年9月22日; 录用日期: 2025年11月13日; 发布日期: 2025年11月24日

摘 要

在超分辨显微技术中, 最小荧光光子纳米显微镜(MINFLUX)以其卓越的空间分辨率和光子利用效率成为近年来的重大突破。然而, 该方法对荧光探针的光物理特性提出了极为严格的要求, 尤其是在发射稳定性、闪烁动态的可控性以及与生物标记体系的兼容性方面。半导体量子点(QDs)凭借其出色的光稳定性、宽光谱可调性和长时间成像能力, 为满足这些要求并拓展MINFLUX的应用潜力提供了理想的候选。本研究首次将QDs应用于MINFLUX, 并利用抗体标记的量子点纳米探针对固定U-2OS细胞微管蛋白实现了二维成像。结果表明, 基于QDs的探针在MINFLUX下可实现约1.2 nm的定位精度(原始数据中位数), 清晰呈现了微管的基本结构特征。本研究验证了QDs在MINFLUX成像中的可行性, 显示出其作为新型超分辨探针在单分子定位显微与纳米尺度生物学研究中的应用潜力。

关键词

QDs, 闪烁, 最小荧光光子纳米显微镜, 纳米成像, 生物成像

First Application of Quantum Dots in MINFLUX Nanoscopy for Biological Imaging

Jingyao Xu, Xinlei Kou, Jing Wang*

School of Artificial Intelligence Science and Technology, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai

Received: September 22, 2025; accepted: November 13, 2025; published: November 24, 2025

Abstract

In the field of super-resolution microscopy, minimal photon fluxes nanoscopy (MINFLUX) has emerged

*通讯作者。

文章引用: 许靖瑶, 寇鑫垒, 王晶. 量子点闪烁与 MINFLUX 技术结合在生物成像中的突破[J]. 生物医学, 2025, 15(6): 1143-1152. DOI: 10.12677/hjbm.2025.156123

as a major breakthrough due to its outstanding spatial resolution and photon efficiency. However, this method imposes stringent requirements on the photophysical properties of fluorescent probes, particularly in terms of emission stability, controllable blinking dynamics, and compatibility with biological labeling systems. Semiconductor quantum dots (QDs), with their exceptional photostability, broad spectral tunability, and long-term imaging capability, represent promising candidates to meet these demands and further extend the applicability of MINFLUX. In this study, we demonstrate for the first time the application of QDs in MINFLUX by employing antibody-conjugated QD nanoprobe to achieve two-dimensional imaging of microtubules in fixed U-2OS cells. The results show that QD-based probes can achieve a localization precision of approximately 1.2 nm (median value of raw data) under MINFLUX, clearly resolving the fundamental structural features of microtubules. This work validates the feasibility of QDs as novel probes for MINFLUX and highlights their potential in single-molecule localization microscopy and nanoscale biological research.

Keywords

QDs, Blinking, Minimal Photon Fluxes Nanoscopy, Nanoscale Imaging, Bioimaging

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

自从最近出现超分辨率显微镜以来,对超过光学衍射极限的亚细胞结构进行成像的能力已经彻底改变了我们对细胞的想法,超分辨率显微镜通过图案化照明(如受激发射耗尽(STED)) [1] [2]或通过图像重建(如光活化定位显微镜(PALM)和随机光学重建显微镜(STORM))来实现[3] [4]。依赖于单分子定位的PALM/STORM 几乎达到了细胞中分子定位的最终空间分辨率,由目前可用的荧光探针确定。然而,最近引入了最小光子通量(MINFLUX) [5]纳米显微镜,它结合了 STED 和 PALM/STORM 的特定优势。在MINFLUX 纳米显微镜中,通过将中心强度最小的甜甜圈形激发光束主动引导至荧光团并对其进行三角测量来确定单个荧光团的定位。到目前为止,MINFLUX 可以更有效地利用荧光团的有限光子预算,并在 1~5 nm 范围内实现迄今为止已知的所有纳米显微镜方法中最高定位精度。然而,这一技术对荧光探针的性能提出了极高要求,特别是在闪烁行为的可控性、发光稳定性以及与标记体系的适配性方面。目前常用的光开关型有机染料如 Alexa Fluor 647 [6]、CF660C 等已广泛用于 DNA-PAINT [7]与免疫标记体系中,但其依赖特殊缓冲液[8]实现受控闪烁,且易出现漂白与伪定位问题。自发闪烁型染料(如 SiR-amine) [9]虽实现了部分缓冲液独立性,但其闪烁行为仍受限于分子结构设计,成像速率和信噪比提升空间有限。

半导体量子点(QDs) [10]因其小尺寸(通常为<10 nm)、高量子产率、窄且可调的发射光谱和抗漂白能力在生物系统中的单分子成像方面具有很大的前景。特别是,QDs 也是超分辨率荧光成像的合适候选者。这主要得益于在大多数量子点中观察到的自然闪烁现象[11]。实际上,基于量子点闪烁的超分辨率最早是在 2005 年报道的[12] [13]。量子点与 4Pi 显微镜一起使用,以实现 100 nm 的轴向分辨率[14]。量子点闪烁已被用于在称为超分辨率光学波动成像(SOFI)的技术中将空间分辨率提高到 50 nm,由此通过不同阶数的相关函数来评估记录帧的开-关波动[15]。CdSe QDs 还用于通过利用其自然闪烁或增强闪烁特性与超分辨率光学波动成像来增强空间分辨率,在具有三维成像的量子点闪烁技术(QDB3)中,具有闪烁 QDs

的 3D 超分辨率成像通过减去后续帧来提取各个 QDs 的 PSF 来实现,再次利用 QDs 的随机闪烁[16]。Hoyer 等人[17]使用生物结合的 CdSe/ZnS QDs 获得了 12 nm 单点大小的分辨能力。Wang 等[18]报道了一种具有纳米分辨率的 3D 成像技术新方法,在 x-y 平面上实现了 8 至 17 nm 的成像分辨率,在 z 方向上实现了 58 至 81 nm 的成像分辨率。

然而,尽管 QDs 半导体量子点在生物领域的应用潜力和成功,但最具代表性的 CdSe/ZnS QDs 闪烁行为的短时间“关闭”和长时间“打开”状态成为研究难点之一,尤其是在 CdSe/ZnS QDs 核壳体系中因表面缺陷和电荷俘获更易观测闪烁现象。这种特性限制了在 PSF 的区域内可以区分的 QDs 的数量,从而使得难以利用自然 QDs 闪烁进行单分子超分辨率成像。但是,对于 MINFLUX,它是理想的每个荧光探针的关断时间比 on-time 限制处于 on 状态的荧光基团的数量在单个成像帧内。为了解决低闪烁 QDs 的问题,CdSe/ZnS QDs 的蓝化已被用于微管的超分辨率成像,如同使用两种尺寸的 QDs 对微管和线粒体进行双色 QSTORM 成像一样(QD 705 nm 和 QD 565 nm) [19]。此外,在 MINFLUX 的定位精度范围内,探针的大小对于超分辨成像也是尤为重要的。商业 CdSe/ZnS QDs 通常涂有厚壳和聚合物涂层,这使它们的大小达到 15~20 nm。这用于生物标记是相对较大的。这些涂层,虽然提供更高的亮度和化学稳定性,往往还可以减少闪烁,以便 QDs 大部分时间都位于 ON 状态,并且处于 OFF 状态的时间相当短,这是可取的适用于大多数生物成像应用。但对于 MINFLUX,每个分子的关闭时间必须远大于开启时间。

在本报告中,通过采用了一定壳厚比例并通过羧基封端的聚乙二醇配体对 CdSe/ZnS QDs 进行钝化,使其表现出低占空比和每次开关事件高光子输出的闪烁行为。这一光物理特性使得量子点能够在 MINFLUX 成像中实现有效的单分子定位,实现高灵敏度的量子点成像。结果表明,QDs 荧光探针能够在约 1.2 nm 的定位精度下分辨高度密集堆积的粒子,并组装得到高密度的超分辨率图像。本研究首次证明了 QDs 在 MINFLUX 中的可行性,为其作为新型荧光探针在高精度成像领域的进一步应用提供了实验依据。

2. 方法

2.1. 材料

对于细胞培养与样品制备,所用 MEM 培养基、胎牛血清以及非必需氨基酸均购自 Gibco;还原剂硼氢化钠购自 Sigma-Aldrich;固定剂多聚甲醛与戊二醛由 Electron Microscopy Sciences 提供。免疫荧光标记实验中,所采用的一抗为以 CdSe/ZnS QDs 标记的生物素化小鼠抗 α 微管蛋白抗体,二抗为由 CdSe/ZnS QDs 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体。

2.2. CdSe/ZnS QDs 的表征

高分辨率透射电子显微镜(HR TEM)图像和选定区域电子衍射(SAED)光谱在 Philips FEIT ec-naiG220S-TWIN 仪器上进行。简而言之,将稀释的 CdSe/ZnS QDs 溶液滴到 400 铜网格上,过量的溶剂立即蒸发,然后将样品放到显微镜中进行观察。

2.3. CdSe/ZnS QDs 与山羊抗小鼠 IgG 的偶联

CdSe/ZnS QDs 在甲醇(30 μ L, 50 mg/mL)中与 EDC (100 mg/mL)和 NHS (100 mg/mL)室温反应 30 min,活化后的 CdSe/ZnS QDs 与山羊抗小鼠 IgG 二抗(PBS 中 2.5 mg/mL)混合反应 4 h 以上,甲醇用量低于总反应体积的 4%~5%。使用分子量(MW)截止值为 100 kDa 的过滤膜对 PBS 缓冲液进行反复超滤。最后将纯化的 IgG-CD 偶联物保存在 4℃以供进一步使用。采用荧光相关光谱法(FCS)和动态光散射法(DLS, ZEN3600, Malvern 仪器公司,英国)评估 CdSe/ZnS QDs 与 IgG 的结合。

2.4. 细胞培养

BSC-1 细胞(ATCCCL-26, BeNa Culture Collection, China)在 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中进行维持, 使用 MEM 培养基(11095-080, Gibco), 并补充 10%胎牛血清(FBS, 10099-141, Gibco)及 1%非必需氨基酸(NEAA, 11140-050, Gibco)。细胞悬液接种于预先包被 14 mL-多赖氨酸(L-PLL)涂层盖玻片的 12 孔板中, 培养持续 48 小时后进行后续固定处理。

2.5. 样品制备

为实现细胞结构的初步固定, 使用 PBS 轻轻润湿细胞一次, 在室温下以预热的提取缓冲液(含 0.1 M PIPES、1 mM EGTA、1 mM MgCl₂ 和 0.2% TritonX-100)处理 60 秒以去除细胞膜。提取后迅速抽除溶液, 并立即加入预热至 37 °C 的固定液(4%多聚甲醛[157-8, Electron Microscopy Sciences]和 0.1%戊二醛[16220, Electron Microscopy Sciences]), 在室温下孵育 10 分钟以实现化学交联固定。固定完成后以 PBS 冲洗三次, 用含 10 mM 硼氢化钠(71320, Sigma)的 PBS 溶液处理 5 分钟以降低醛类残留自发荧光。再次以 PBS 清洗至完全无气泡残留。为封闭非特异性结合位点, 将细胞在室温下置于封闭液中孵育 20 min。封闭液配方为 50%BSA (由 10%BSA 在 PBS 中稀释)、5%驴血清和 10%TritonX-100 的混合溶液。之后以 PBS 清洗 30 分钟。二抗染色步骤中, 细胞与稀释于含 1%BSA 的 PBS 缓冲液中的二抗(1:50)在室温下孵育 45 分钟。进行 6 次 PBS 清洗, 每次持续 5 分钟, 以充分去除未结合抗体。将样品与金颗粒溶液共同孵育 20 分钟, 以 PBS 冲洗两次, 去除未结合的金颗粒, 以降低其在后续成像中的干扰。处理完成后, 样品储存在 4 °C 条件下直至成像。

3. 光学设置

3.1. MINFLUX 的原理

本研究中采用了 MINFLUX 超分辨显微成像系统[20] (图 1(A))。该系统的核心组件包括: 用于激发量子点的 642 nm 连续波激光器、高数值孔径物镜(NA = 1.4, 100×油浸物镜)、象限型单光子雪崩二极管(SPAD)探测器阵列, 以及基于声光调制器(AOM)的快速光束整形模块。为了实现纳米级的定位精度, 系统通过迭代优化环形(donut-shaped)激发光场完成分子定位。首先, 采用高斯光束进行粗略聚焦(图 1(B)步骤 1); 随后, 系统切换至二维环形激发光场(图 1(B)步骤 2~4), 在预设的四个坐标点(蓝色、紫色、红色和黄色)进行扫描, 以采集荧光光子计数的空间分布。最终, 目标量子点的精确位置通过最大似然估计(MLE)算法实时确定。图 1(C)显示不同维度的不同成像效果。在每一次迭代过程中, 荧光强度与目标坐标之间的空间相关性显著增强(图 1(D), 颜色梯度)。本实验采用的 MINFLUX 二维迭代序列, 其关键参数详列于表 1。

3.2. 数据采集

样品固定于高精度玻片中, 在配备 NA = 1.4, 100×的 Abberior MINFLUX 显微镜(Abberior×如前所述, 油性物镜。使用 642 nm 激发在 2D MINFLUX 成像模式下采集图像激光(60.7 μWcm⁻²)。测量激光功率使用 Thorlabs 在物镜背焦平面的位置配备 S100C 传感器头的 PM120D 功率计。所有 MINFLUX 图像显示导出的文件仅由记录的有效本地化参数组成, 不包括任何丢弃或无效的本地化记录。此外, 对于所有计算, 仅使用来自 MINFLUX 的最终迭代(2D 中的第四次迭代)。并使用 Imspector 和 ImageJ 渲染和采集(版本 16.3.11657, Abberior), 在直方图模式下具有 4 nm 像素大小。

为增强成像稳定性, 样品预先在 10%金纳米棒(A12-40-980-CTAB-DIH-125, Nano Stone Inc)的 PBS 缓冲液中孵育 15 分钟, 随后经 PBS 充分洗涤。在成像前, 启动系统的主动稳定模块, 漂移控制精度可达亚纳米级(<1 nm)。于共聚焦图像中选定感兴趣区域, 并在软件中调节激光功率和针孔大小后启动 MINFLUX

采集。激发波长设定为 642 nm，功率为 3%，检测波段设置为 650~685 nm。随后选择适当序列进行高精度定位数据的采集。对于微管半高宽值的测定，利用 Imspector 软件中的线分析函数对图像进行高斯拟合。将获得的结果导出到 Origin 2021，以确定半高宽。

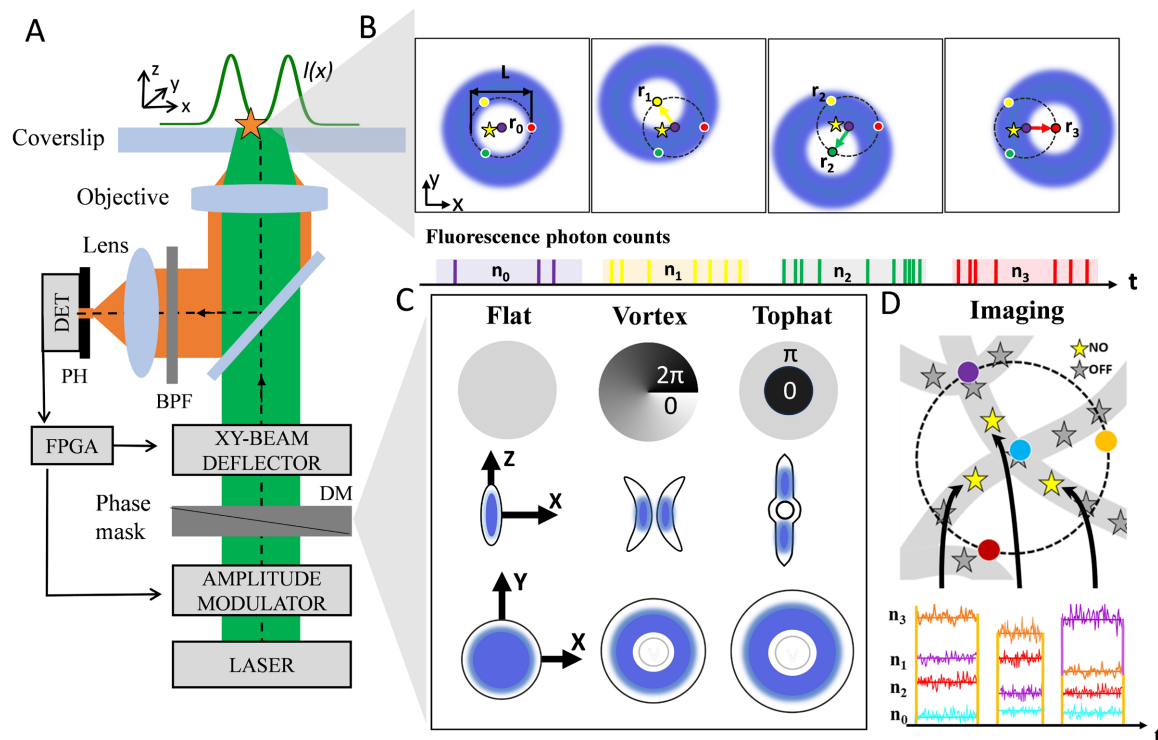


Figure 1. Schematic of the MINFLUX system. (A) Optical layout of the system. (B) The excitation beam sequentially targets four predefined coordinates to achieve iterative x-y localization; these coordinates form a tetrahedral calibration pattern (TCP; violet, red, yellow, and green indicate the beam positions). The localization procedure involves focus stabilization (Step 1) and two-dimensional donut-beam scanning (Steps 2~4). Typical photon count readouts for each iteration step are shown, with color coding corresponding to the target coordinates. (C) Imaging performance in different spatial dimensions. (D) Conceptual illustration of the MINFLUX nanoscopy principle

图 1. 自 MINFLUX 系统示意图。(A) 系统光路示意图。(B) 激发光束依次对准四个预设坐标，实现迭代式 x-y 定位，这些坐标点构成四面体校准图样(TCP；紫、红、黄、绿四个光束位置)。定位过程包括焦点稳定(步骤 1)以及二维环形光束扫描(步骤 2~4)。图中展示了各迭代步骤的典型荧光计数结果，并以目标坐标颜色标注。(C) 不同维度下的成像效果。(D) MINFLUX 纳米显微成像的原理示意图

Table 1. Key parameters of the MINFLUX 2D iteration sequence
表 1. MINFLUX 二维迭代序列的关键参数

2D imaging	Center frequency ratio limits (CFR)	Dwell time(ms)	L-size (nm)	Minimal Photon count	Laser power factor	TCP	Pattern repeat	Background Threshold (kHz)
Pre-scan	Off	≥ 1	288	160	1	Hexagon	1	15
1stiteration	0.5	≥ 1	288	150	1	Hexagon	5	10
2nditeration	Off	≥ 1	151.2	100	2	Hexagon	5	10
3rditeration	0.8	≥ 1	75.6	100	4	Hexagon	5	10
4thiteration	Off	≥ 1	39.6	150	6	Hexagon	5	10

3.3. 数据导出

实验数据由 Abberior MINFLUX 显微镜(Abberior Instruments)结合 Inspector 软件采集并处理。每组 MINFLUX 成像数据均通过 Inspector 软件导出, 所得数据文件包含全部有效定位事件的参数记录, 同时保留了因信号质量不足而被排除的无效定位尝试的相关信息。

4. 实验结果与分析

4.1. 结构与光学表征

众所周知, 富含羧基会使得 QDs 上闪烁循环减少[21]。基于此, 设计了一种颗粒表面羧基比例大于胺基的结构。其中, 少量胺基基团的保留产生了更多的表面状态, 以通过胺-硫醇偶联结合单价抗体片段。通过使用 EDC 和 NHS 作为零长度交联剂, QDs 的羧基基团容易与抗体表面的氨基基团反应(详细过程如图 2(A)所示, 图未按比例绘制), 这样 QDs 就更容易与蛋白质缀合。图 2(B)和图 2(C)分别显示了透射电子显微镜(TEM, 高分辨率)图像和 QDs 的尺寸分布。QDs 的尺寸主要集中在 1~4 nm 范围内, 平均直径约为 1.8 nm, 表现出较窄的分布特征。通常情况下, 较小的荧光探针尺寸更有利于在生物成像中的应用, 因为其能够在保持荧光性能的同时, 最大程度减少对生物体系的空间干扰。图 2(D)显示出 QDs 的吸收和辐射荧光光谱显示出 300 至 700 nm 范围内的宽光学吸收, 第一个激子峰值约为 650 nm。激发后, 在约 705 nm 处表现出一个尖锐的荧光发射峰。激发-发射矩阵显示了两个中心为 520 和 590 nm 的主要激发区(图 2(D))。

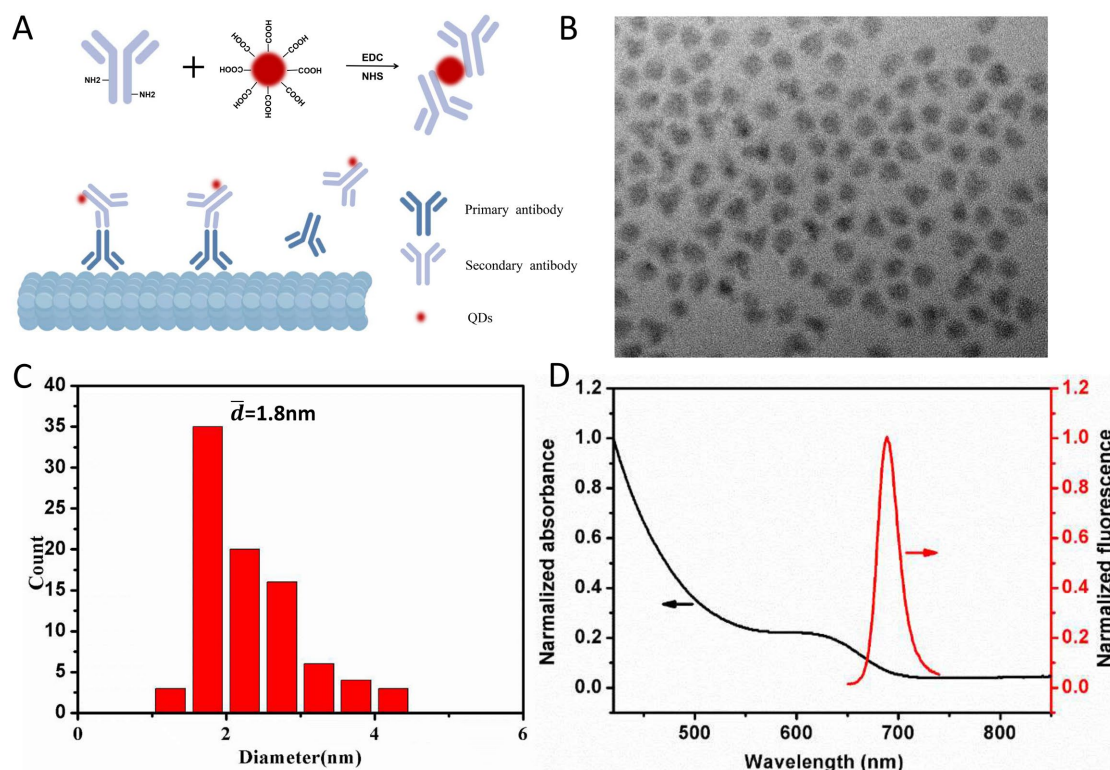


Figure 2. Structural design and optical properties of the prepared QDs. (A) Schematic illustration of QDs labeling microtubules. (B) Transmission electron microscopy (TEM) image of the QDs. (C) Size distribution of the QDs. (D) Absorption and photoluminescence spectra of the QDs

图 2. 制备的 QDs 的结构设计和光学特性。(A) 设计 QDs 标记微管蛋白的示意图; (B) QDs 的透射电子显微镜(TEM)图像; (C) QDs 的尺寸大小分布; (D) QDs 的吸收和辐射荧光光谱

4.2. QDs 的闪烁特性

接下来, 对未处理 QDs 培养物连续 10,000 帧的成像进行分析。实验使用 642 nm 的激光进行激发, 预期 QDs 在可见光中会呈现明显的闪烁。图 3(A)显示出了在激光激发下沿着时间轴的每个像素的最大强度投影。在单帧成像(1 帧)时即可观察到清晰的数据信号; 当累积至 1000 帧时, 大部分荧光探针进入关闭状态。在延长至 10,000 帧后, 仍可发现绝大多数量子点保持活跃的荧光闪烁, 且未出现显著的光漂白或永久性猝灭现象。这一现象表明, QDs 的表面修饰可能通过钝化表面缺陷态或抑制电荷分离, 有效增强了其抗光漂白能力, 这可以证明 QDs 的闪烁状态。同时, 图 3(B)显示的 QDs 修饰后的闪烁数据表明其非常适合 MINFLUX 成像应用。

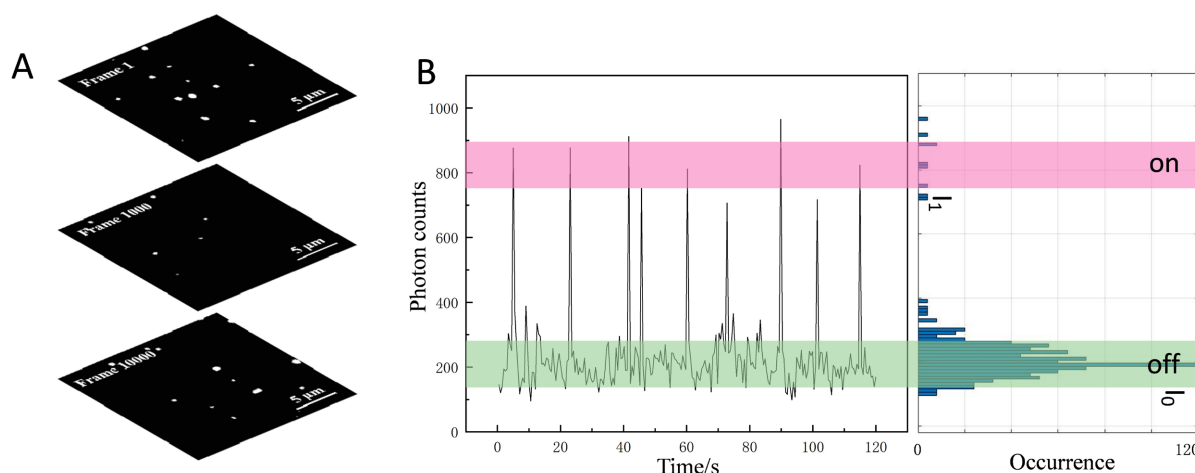


Figure 3. Blinking properties of QDs. (A) Time-lapse imaging of QDs over 10,000 consecutive frames. (B) Blinking characterization of surface-modified QDs

图 3. QDs 的闪烁特性。(A) QDs 培养物连续 10,000 帧的成像图。(B) 修饰后的 QDs 的闪烁表征图

4.3. QDs 的 MINFLUX 成像

4.3.1. 溶液中的 QDs

为了验证 QDs 在 MINFLUX 成像中的适用性, 首要步骤是对单个 QDs 的定位精度进行系统表征。在图 4(A)中对 QDs 的定位精度进行表征。定位精度计算公式为:

$$\sigma^2 = \frac{S^2}{N} + \frac{a^2}{12N} + \frac{8\pi S^2 b^2}{N^2 b^2}$$

其中 S 是 PSF 的标准差(SD), a 是给定像素的尺寸(在设置中为 130 nm), b 是背景噪声(通过分析图像中不包含量子点的像素), N 是从荧光团收集的光子数。图 4(B)是 QDs 的 MINFLUX 的成像结果图, 利用这些图像, 发现量子点的平均定位精度为 3.42 nm (未排除无效数据)。显然, 在这些理想条件下, QDs 可以定位到更高的精度, 这主要是由于他的亮度要高得多。目前 <5 nm 的定位精度用于基于 MINFLUX 的超分辨率成像的许多其他荧光团相当或更好。如图 4(C)所示, 单颗粒半高宽达到 35 nm, 显著优于传统共聚焦成像。超分辨率放大图像图进一步表明, MINFLUX 技术能够解析 QDs 的亚衍射极限空间分布, 即使在高密度标记区域(白框内)亦可清晰区分相邻纳米颗粒。

4.3.2. 微管蛋白上的 QDs

在本研究中, 我们应用固定的 U-2OS 细胞中对微管蛋白进行 MINFLUX 成像验证性实验。通过最大

视野成像获得了细胞内完整的微管网络分布(图 5(A)), 在此基础上, 进一步选取局部区域进行范围成像(图 5(B)), 以便放大观察局部纤维结构。在 MINFLUX 模式下, 获得了 QDs 标记下的微管图像(图 5(C)), 尽管整体成像的连续性和清晰度仍有待提升, 但依然能够辨识出纤维状的细胞骨架轮廓。值得注意的是, 这是 QDs 首次在 MINFLUX 系统中实现对细胞内骨架蛋白的成像, 结果表明 QDs 具备作为该类超分辨技术荧光探针的应用潜力。进一步地, 实验对成像的定位精度进行了统计, 结果显示 QDs 在 MINFLUX 下能够实现约 1.2 nm 的定位精度(图 5(D)-(E))。这一结果充分说明, 整体图像的清晰度已经接近有机染料或商业化探针, 表明 QDs 作为荧光团在 MINFLUX 中展现出了极高的空间分辨能力。结合其优异的光稳定性和可控的发光特性, QDs 在 MINFLUX 成像领域具有独特优势和进一步优化的可能性。

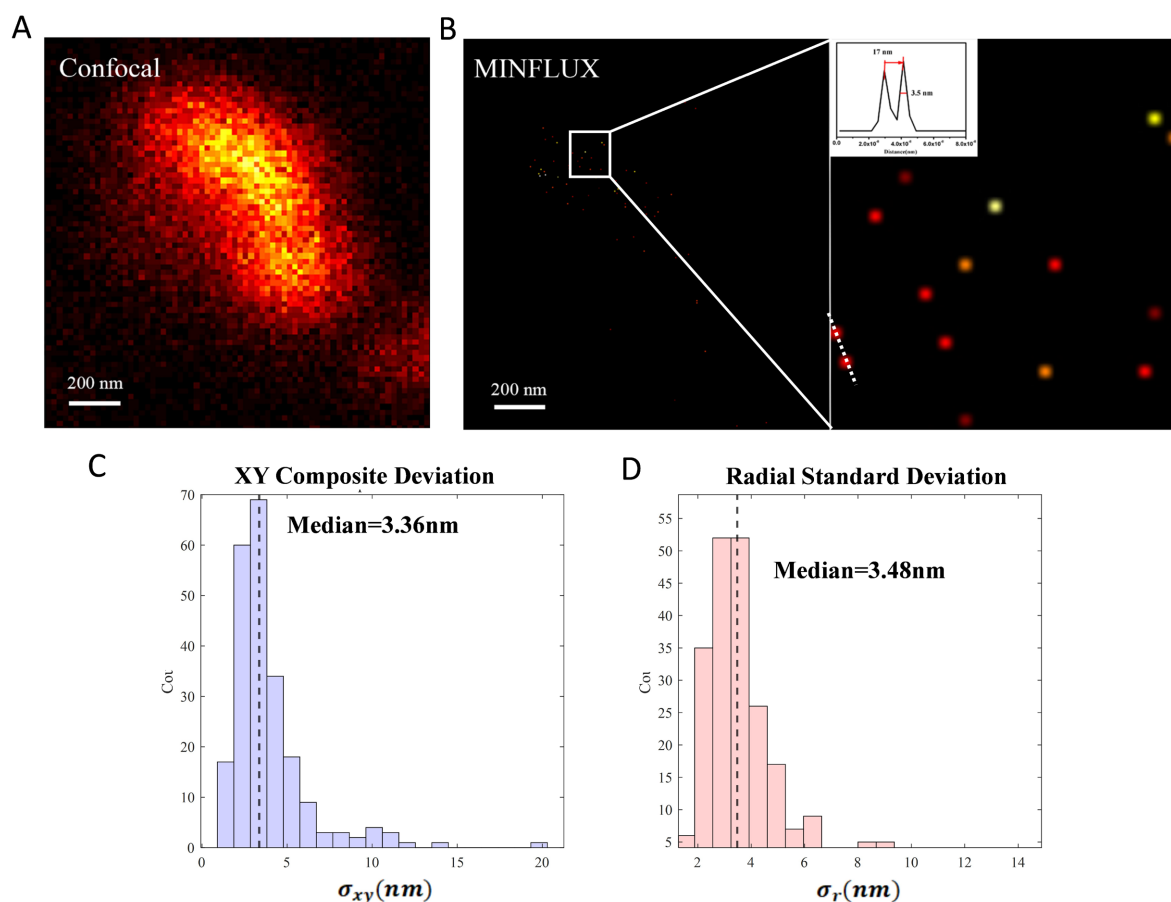


Figure 4. Localization precision of QDs. (A) Confocal image of QDs in solution. (B) MINFLUX image of QDs with a magnified view of the selected region (inset shows the intensity profile along the dashed line). (C) Histogram of QD localization precision in the lateral (x-y) direction. (D) Histogram of QD localization precision in the axial (z) direction

图 4. QDs 的定位精度测试。(A) QDs 在溶液中 confocal 成像图。(B) QDs 的 MINFLUX 成像图以及区域放大图像(插图为虚线部分的强度曲线图)。(C) QDs 在 XY 轴方向的定位精度直方图。(D) QDs 在 Z 轴方向的定位精度直方图

5. 总结

本文设计了一种特定壳层比例的 QDs, 在 642 nm 激发下表现出稳定且连续的荧光间歇性, 首次实现了 QDs 在 MINFLUX 技术中的应用。该方法在 PBS 缓冲液中即可观察到清晰的信号波动, 无需额外的特殊缓冲液。结合抗体标记制备的纳米探针, 实现了对固定 U-2OS 细胞中微管蛋白的 2DMINFLUX 成像。实验结果表明, 基于 QDs 的纳米探针能够实现约 1.2 nm 的定位精度(原始数据中位数), 并展现出良

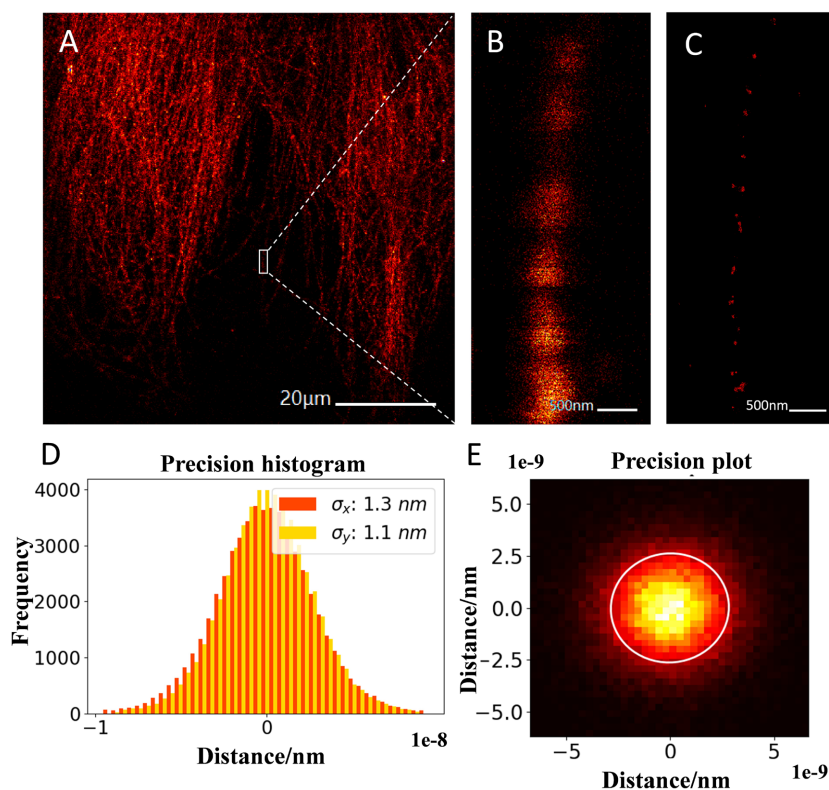


Figure 5. MINFLUX imaging of QDs-labeled microtubules. (A) Overview image showing the maximal microtubule region. (B) Selected region of interest. (C) MINFLUX reconstruction of the selected area. (D) Display $\sigma_x = 1.3$ nm, $\sigma_y = 1.1$ nm. (E) Localization precision map

图 5. QDs 标记微管的 MINFLUX 成像结果。(A) 微管最大区域显示图。(B) 选取区域图。(C) MINFLUX 对选取区域的成像图。(D) 显示 $\sigma_x = 1.3$ nm, $\sigma_y = 1.1$ nm。(E) 定位精度图

好的空间分辨能力。从获得的 MINFLUX 图像可以看出,所使用的量子点具备成为优良成像探针的潜力。尽管存在表面修饰(PEG、羧基)或轻微的团聚的现象,使可结合位点减少或变得不均匀导致部分 QDs 可能粘附在非靶标位置或被遮蔽,影响了图像连续性。另外,在数据处理过程中,严格的峰值筛选、位点合并和高光子数阈值会把低光子事件(真实但弱的 QDs 发光)剔除,放大“断裂”现象。为进一步改善成像连续性,后续工作将聚焦于优化偶联条件和表面配体比例,采用短链共价连接策略以减小空间位阻,并通过离心分级与膜过滤消除微量聚集体,同时结合单粒子闪烁动力学统计与时序重建算法,提高弱信号事件的回收率。但本研究已验证了 QDs 在 MINFLUX 平台上的可行性。未来,通过进一步改进表面修饰与化学特性, QDs 有望扩展至活细胞超分辨成像。凭借其优异的光稳定性、较小的尺寸以及超高分辨率,量子点在 MINFLUX 及其他纳米显微成像技术中具有广阔的发展前景。

参考文献

- [1] Hell, S.W. and Wichmann, J. (1994) Breaking the Diffraction Resolution Limit by Stimulated Emission: Stimulated-Emission-Depletion Fluorescence Microscopy. *Optics Letters*, **19**, 780-782. <https://doi.org/10.1364/ol.19.000780>
- [2] Klar, T.A. and Hell, S.W. (1999) Subdiffraction Resolution in Far-Field Fluorescence Microscopy. *Optics Letters*, **24**, 954-956. <https://doi.org/10.1364/ol.24.000954>
- [3] Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W., Olenych, S., Bonifacino, J.S., *et al.* (2006) Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*, **313**, 1642-1645. <https://doi.org/10.1126/science.1127344>
- [4] Rust, M.J., Bates, M. and Zhuang, X. (2006) Sub-Diffraction-Limit Imaging by Stochastic Optical Reconstruction

- Microscopy (Storm). *Nature Methods*, **3**, 793-796. <https://doi.org/10.1038/nmeth929>
- [5] Balzarotti, F., Eilers, Y., Gwosch, K.C., Gynnå, A.H., Westphal, V., Stefani, F.D., *et al.* (2017) Nanometer Resolution Imaging and Tracking of Fluorescent Molecules with Minimal Photon Fluxes. *Science*, **355**, 606-612. <https://doi.org/10.1126/science.aak9913>
- [6] Yao, L., Si, D., Chen, L., Li, S., Guan, J., Zhang, Q., *et al.* (2025) Gradual Labeling with Fluorogenic Probes: A General Method for MINFLUX Imaging and Tracking. *Science Advances*, **11**, eadv5971. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adv5971>
- [7] Ostersehl, L.M., Jans, D.C., Wittek, A., Keller-Findeisen, J., Inamdar, K., Sahl, S.J., *et al.* (2022) DNA-PAINT MINFLUX Nanoscopy. *Nature Methods*, **19**, 1072-1075. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01577-1>
- [8] Goossen-Schmidt, N.C., Schnieder, M., Hüve, J. and Klingauf, J. (2020) Switching Behaviour of dSTORM Dyes in Glycerol-Containing Buffer. *Scientific Reports*, **10**, Article No. 13746. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70335-0>
- [9] Gerasimaitė, R., Bucevičius, J., Kiszka, K.A., Schnorrenberg, S., Kostiuk, G., Koenen, T., *et al.* (2021) Blinking Fluorescent Probes for Tubulin Nanoscopy in Living and Fixed Cells. *ACS Chemical Biology*, **16**, 2130-2136. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00538>
- [10] Le, N., Routh, J., Kirk, C., Wu, Q., Patel, R., Keyes, C., *et al.* (2023) Red CdSe/ZnS QDs' Intracellular Trafficking and Its Impact on Yeast Polarization and Actin Filament. *Cells*, **12**, Article 484. <https://doi.org/10.3390/cells12030484>
- [11] Zhang, A., Bian, Y., Wang, J., Chen, K., Dong, C. and Ren, J. (2016) Suppressed Blinking Behavior of CdSe/CdS QDs by Polymer Coating. *Nanoscale*, **8**, 5006-5014. <https://doi.org/10.1039/c5nr08504g>
- [12] Chan, W.C.W. and Nie, S. (1998) Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. *Science*, **281**, 2016-2018. <https://doi.org/10.1126/science.281.5385.2016>
- [13] Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., Nitschke, R. and Nann, T. (2008) Quantum Dots versus Organic Dyes as Fluorescent Labels. *Nature Methods*, **5**, 763-775. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1248>
- [14] Bewersdorf, J., Schmidt, R. and Hell, S.W. (2006) Comparison of I⁵M and 4Pi-Microscopy. *Journal of Microscopy*, **222**, 105-117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01578.x>
- [15] Dertinger, T., Colyer, R., Iyer, G., Weiss, S. and Enderlein, J. (2009) Fast, Background-Free, 3D Super-Resolution Optical Fluctuation Imaging (SOFI). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 22287-22292. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907866106>
- [16] Wang, Y., Fruhwirth, G., Cai, E., Ng, T. and Selvin, P.R. (2013) 3D Super-Resolution Imaging with Blinking Quantum Dots. *Nano Letters*, **13**, 5233-5241. <https://doi.org/10.1021/nl4026665>
- [17] Herrera-Ochoa, D., Pacheco-Liñán, P.J., Bravo, I. and Garzón-Ruiz, A. (2022) A Novel Quantum Dot-Based Ph Probe for Long-Term Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy Experiments in Living Cells. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **14**, 2578-2586. <https://doi.org/10.1021/acsaami.1c19926>
- [18] Nguyen, A.T., Baucom, D.R., Wang, Y. and Heyes, C.D. (2023) Compact, Fast Blinking Cd-Free Quantum Dots for Super-Resolution Fluorescence Imaging. *Chemical & Biomedical Imaging*, **1**, 251-259. <https://doi.org/10.1021/cbmi.3c00018>
- [19] Xu, J., Tehrani, K.F. and Kner, P. (2015) Multicolor 3D Super-Resolution Imaging by Quantum Dot Stochastic Optical Reconstruction Microscopy. *ACS Nano*, **9**, 2917-2925. <https://doi.org/10.1021/nn506952g>
- [20] Salerno, M., Bazzurro, V., Angeli, E., Bianchini, P., Roushenas, M., Pakravan, K., *et al.* (2025) Minflux Nanoscopy: A “Brilliant” Technique Promising Major Breakthrough. *Microscopy Research and Technique*, **88**, 1264-1272. <https://doi.org/10.1002/jemt.24765>
- [21] Mao, J., Xue, M., Guan, X., Wang, Q., Wang, Z., Qin, G., *et al.* (2022) Near-Infrared Blinking Carbon Dots Designed for Quantitative Nanoscopy. *Nano Letters*, **23**, 124-131. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.2c03711>