

用于活细胞成像的超分辨光学显微镜方法与应用

方 何, 谢 红

上海理工大学智能科技学院, 上海

收稿日期: 2025年2月28日; 录用日期: 2025年4月29日; 发布日期: 2025年5月7日

摘 要

细胞是生命体活动的基本单元, 对活细胞的实时观测有助于在更接近生理的条件下观察其细微结构及其动力学过程, 理解生命的本质。近三十年, 超分辨光学显微成像技术(Super-Resolution Microscopy, SRM)和相关技术的发展, 允许人们在突破衍射极限的尺度下对活细胞进行观察与研究, 然而这些技术早期应用于活细胞成像领域时遭受到了不同程度的挑战, 而随着后续荧光染料等相关技术的发展, SRM在活细胞成像领域的应用愈加广泛。本文通过简要介绍目前常见的几种SRM以及近年来受到广泛关注的最小光子通量(MINFLUX)等显微技术的基本原理和特点, 梳理了其在活细胞成像领域的最新应用。

关键词

结构光照明显微技术, 受激发射损耗显微技术, 单分子定位显微技术, 最小光子通量显微技术, 超分辨成像, 活细胞成像

Super-Resolution Optical Microscopy for Live-Cell Imaging: Methods and Applications

He Fang, Hong Xie

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

Received: Feb. 28th, 2025; accepted: Apr. 29th, 2025; published: May 7th, 2025

Abstract

As the fundamental unit of life activities, the real-time observation of live cells facilitates the investigation of their intricate structures and dynamic processes under conditions closer to physiological states, thereby advancing our understanding of life's essence. Over the past three decades, advance-

ments in super-resolution microscopy (SRM) and related technologies have enabled the observation and study of live cells at scales surpassing the diffraction limit. However, the initial application of these techniques in live-cell imaging faced significant challenges. With subsequent advancements in fluorescent dyes and other ancillary technologies, SRM has become increasingly applied in live-cell imaging. This review provides a concise introduction to the principles and characteristics of several widely used SRM techniques, as well as emerging methodologies such as minimal photon flux (MINFLUX) microscopy, which has garnered substantial attention in recent years. Additionally, we summarize their latest applications and breakthroughs in the field of live-cell imaging.

Keywords

Structured Illumination Microscopy, Stimulated Emission Depletion Microscopy, Single-Molecule Localization Microscopy, Minimal Photon Flux Microscopy, Super-Resolution Imaging, Live-Cell Imaging

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

细胞作为生命体的基本结构与功能单元,其内部精细结构、分子间相互作用及动态调控机制的研究是揭示生命本质规律的关键。在探索细胞功能的过程中,生物学家力求观察那些使细胞维持稳态并对外部和内部信号做出动态响应的过程,这些过程不仅涉及分子水平的精确调控,还包括在完整活细胞环境下的复杂相互作用网络[1]。

光学显微镜及其与荧光标记相结合的多种荧光显微成像技术,已成为现代细胞生物学研究的重要工具。然而,由于光学系统衍射极限的存在,传统光学显微镜的分辨能力通常被限制在探测光波长的一半左右(约 200~300 纳米),这使得它们对于生物体的纳米结构域难以提供清晰的视图。尽管可以使用电子显微镜(Electron Microscopy, EM)获得纳米分辨率的结构图像,但其严苛的样品制备要求(包括固定、脱水、包埋等处理)以及电子辐照的侵入性特性阻碍了对活细胞的动态成像。相比之下,光学显微成像技术凭借其非侵入性和实时观测优势,在活细胞研究领域展现出独特价值。

近年来,超分辨显微成像技术(Super-Resolution Microscopy, SRM)的快速发展,不仅保留了传统光学显微的无损观测特性,更成功突破了衍射极限的束缚,实现了纳米尺度的活细胞成像。如 2014 年诺贝尔化学奖得主 S. W. Hell 团队在 2017 发表的 MINFLUX 显微技术已经将光学显微分辨率提升至接近 1 纳米的水平[2]。SRM 的发展显著增强了研究者对细胞内部精细结构和动态过程的解析能力,为生命科学研究提供了新的视角,对于推动生命科学和生物医学研究具有重要意义。

实时成像的四个主要考虑因素为样本健康、对比度、空间分辨率和时间分辨率。对比度、空间分辨率和时间分辨率是相互依存的——任何单一因素的改变都会影响其他两个因素。这些参数的优化通常需要伴随着光照强度的增加,而光剂量的增加可能导致样本受到光毒性损伤等潜在风险[3],影响细胞存活率和体内的 ROS (Reactive Oxygen Species, 氧代谢的天然副产物,参与细胞内的信号传递和调节,并且在细胞周期、基因表达和机体内环境稳态的维持中发挥着重要作用)水平。如何平衡多个因素更好地获取所需实时成像图像成为 SRM 的重要研究方向。

目前的 SRM 主要分为三大主流技术:第一类是基于空间频率调制原理,代表技术是超分辨结构光照明显微术(Super-resolution Structured Illumination Microscopy, SR-SIM);第二类是基于点扩散函数(Point

Spread Function, PSF)调制原理, 代表技术是受激辐射损耗(stimulated emission depletion, STED)显微术; 第三类是基于单分子定位原理, 代表技术是光激活定位显微(Photo-Activation Localization Microscopy, PALM)和随机光学重建显微(Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM), 以及由此衍生的最小光子通量(MINIFLUX)显微术。本文将阐述这几种主流技术的基本原理和特点及其在活细胞成像中的应用进展, 并对 SRM 技术的发展趋势及其在生命科学研究中的应用前景进行展望。

2. 超分辨结构光照明显微术(SIM)

2.1. 基本原理与特点

显微成像系统的成像过程本质上是待测物体与该光学系统点扩散函数(PSF)的卷积运算。从频域角度来看, PSF 相当于一个低通滤波器, 仅允许低频信息通过, 而抑制了高频信息。然而, 由于样品在频域空间中的信息分布是无限延伸的, 传统显微成像系统难以有效采集样品中的高频信息成分, 这与研究者希望通过显微观测获取样品精细结构(即高频成分)的研究目标相矛盾。然而, 通过利用莫尔条纹(Moiré fringe)的概念能够使我们巧妙地绕过这一限制。当两个具有略微不同频率 f_0 和 f_1 的周期性图案发生叠加时, 会产生一个频率低于任何一个原始图案的莫尔条纹图案[4] [5]。相反的, 当已知其中一个图案时, 可以通过莫尔条纹图案代数地解算出另一个图案。这一特性使得研究者能够将样品的高频结构信息通过莫尔条纹效应转移到低频区域, 从而被物镜有效采集。

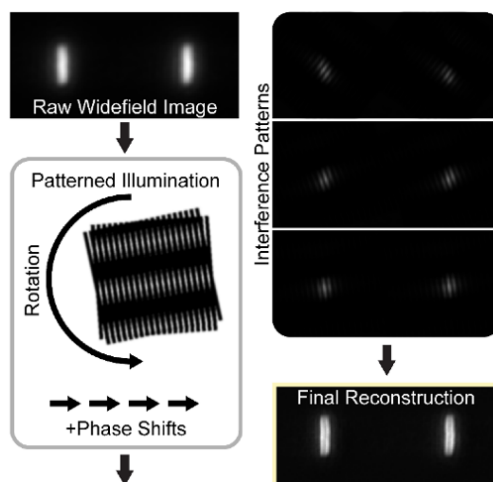


Figure 1. Schematic diagram illustrating the imaging principle of SIM [8] (licensed under CC BY 4.0)

图 1. SIM 的成像原理示意图[8] (根据 CC BY 4.0 获得许可)

最早提出基于上述概念实现光学超分辨是 1960 年代 Lukosz 和 Marchand 等人[6], 然而受限于硬件, 直到 2000 年才由 Gustafsson 等人[7]详细介绍了如何利用结构化照明将横向分辨率提高一倍的方法。如图 1 所示, SIM 利用一系列正弦激发照明模式对未知样本进行照明, 使原本无法被传统显微系统采集的样品精细结构信息编码到物镜可探测的低频区域。发射光包含了在衍射受限图像中观察不到的样本的精细结构信息并被物镜采集。随后, 通过采用一系列 SIM 重建过程来提取这些未知的样本信息[4]。这一创新性方法不仅突破了传统光学显微镜的分辨率限制, 还为活细胞成像研究提供了新的技术手段。

2.2. 在活细胞成像中的发展与应用

结构光照明显微技术(SIM)在活细胞成像中展现出显著优势。通常, SIM 只需要拍摄 9 张(2D-SIM)或

15 张(3D-SIM)具有不同相位和旋转角度的结构化照明的宽场图像即可重建出一张超分辨图像[9][10], 与大多数其他基于激光束扫描或单分子定位的超分辨率技术相比, 采集时间更短, 这意味着相对更高的时间分辨率, 此外, SIM 较低的激发光强[11] ($1\sim 10\text{ W/cm}^2$)以及与通用荧光标记方案的兼容性, 使其成为三类主要超分辨显微技术中最适合活细胞成像的方法, 也是目前应用最广泛的超分辨成像技术之一[12]。

尽管 SIM 早期版本由于成像原理的限制, 只能将横向分辨率提高至传统荧光显微镜的 2 倍(约为 100 nm)[13]。但为了追求更高的时空分辨率, 研究者通过多种技术改进显著提升了其性能。例如, 通过使用空间光调制器(SLM)或数字微镜(DMD)实现照明模式的高速切换, 提高图像采集速率, 采用非线性结构光照明技术[14]以及开发多种图像重建算法[4]。此外深度学习的应用提升了 SIM 的成像速度, 进而降低了光损伤, 同时也能够进一步提升分辨率。例如, 2021 年, Qiao 等人[15][16]基于 GAN 网络架构, 建立了一种通道注意力网络(caGAN)进行 3D-SIM 重建, 在重建图像分辨率不受影响的情况下, 将所需重建图像数目降低到传统 SIM 的 1/7.5, 总光子数降低到 1/15。2023 年, Wang 等人[17]将物理反演模型与总深度变分(Total Deep Variation, TDV)正则化相结合, 提出一种混合复原方法(TDV-SIM), 用深度学习的方法抑制了 SIM 在处理低信噪比图片时产生的伪影。这些技术的进步不仅提高了 SIM 的空间分辨率, 还显著提升了成像速度, 降低了光毒性, 使其在活细胞成像领域更具竞争力。

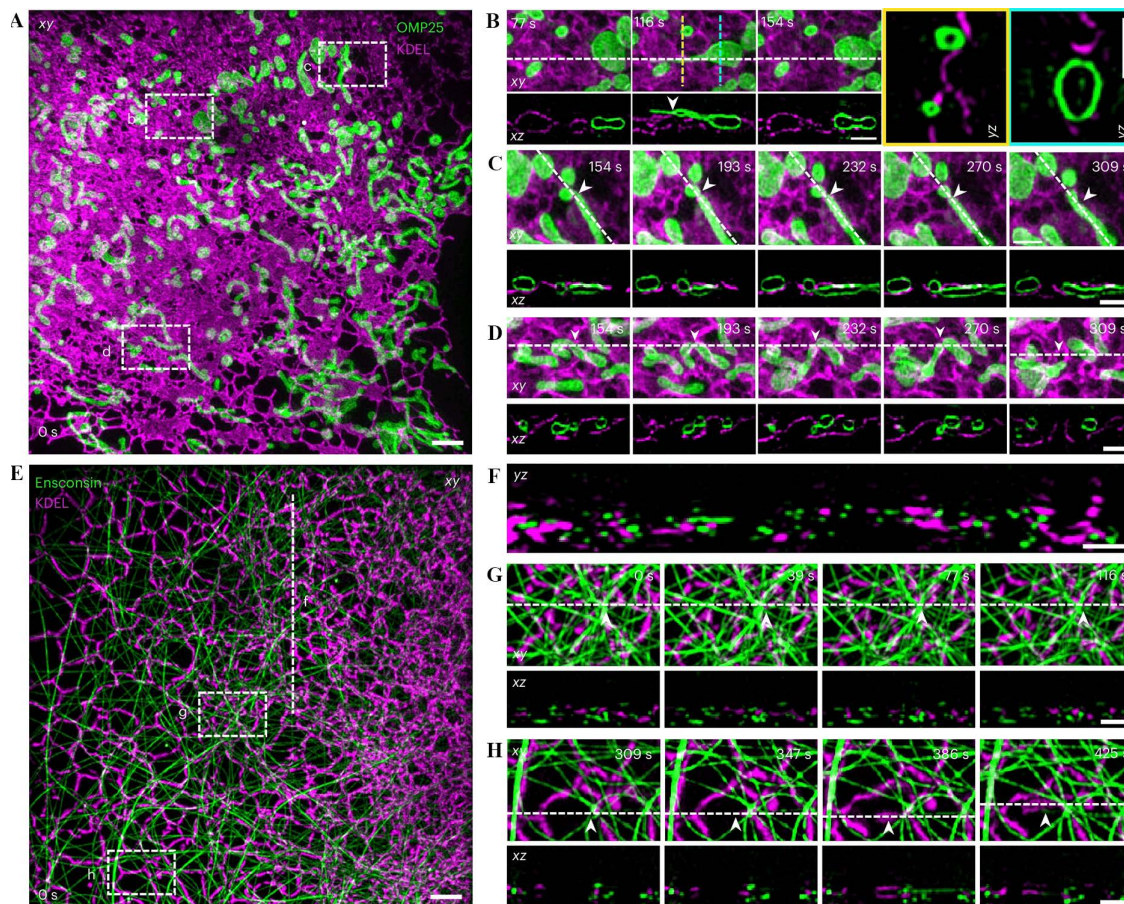


Figure 2. Visualization of organelle interactions through synchronized dual-color imaging using 4Pi-SIM [22] (licensed under CC BY 4.0)

图 2. 4Pi-SIM 通过同步双色成像可视化细胞器相互作用[22] (根据 CC BY 4.0 获得许可)

在技术应用方面, 2009 年, Peter Kner 等人展示了其开发的 2D-SIM 能够以 11 Hz 的速率捕捉细胞内

部 100 nm 分辨率的动态图像, 并能够对黑腹果蝇 S2 活细胞中的微管蛋白和驱动蛋白的动力学过程进行约 100 个时间点的实时成像[18]。2011 年 Lin Shao 等人将 3D-SIM 应用于活细胞成像, 实现了 120 nm 横向分辨率和 360 nm 轴向分辨率以及超过 50 个时间点的成像时长[19]。2015 年, Dong Li 等人通过使用模式化激活的非线性 SIM (PA NL-SIM), 在亚秒级采集时间内实现了 COS-7 活细胞 62 nm 分辨率约 50 个时间点的实时成像[20]。2018 年, Dong Li 等人开发了新型的掠入射结构照明显微镜(GI-SIM), 拓展了 SIM 的成像深度, 使其能够对细胞内的多种细胞器进行成像, 在 COS-7 活细胞中实现了 97 nm 分辨率和 266 帧/秒的采集速度以及数千个时间点的超分辨成像[21]。此外, 如图 2 展示了西湖大学章永登团队于 2024 年 12 月开发的 4Pi-SIM [22]技术, 通过将 3D-SIM 与干涉显微术结合, 在照明和探测中引入干涉效应, 首次实现活细胞三维各向同性 100 nm 分辨率成像, 并支持长达 5~7 小时(500~600 个时间点)的延时观测及双色同步成像。该技术利用 StayGold 及其变体荧光蛋白的超强光稳定性, 在室温下对双盖玻片夹层的活细胞进行三维动态追踪, 典型持续时间约为 5~7 小时, 并成功解析内质网(ER)与微管等细胞器在三维空间内的快速互作网络, 揭示了其复杂交织的动态机制。图 2(A)与图 2(E)展示了 ER(品红色)分别与线粒体(绿色)和微管(绿色)的最大强度投影图, 显示出显著的共定位分布。图 2(B~D)进一步揭示了 ER 与线粒体之间的纳米接触位点(箭头所示)、以及线粒体的融合(图 2(C))与分裂(图 2(D))过程的动态变化。图 2(F~H)则呈现了 ER 与微管在三维空间内的共定位结构(图 2(F))及其同步运动轨迹(箭头所示为接触区域), 显示两者在细胞动态调控中的高度协同行为。比例尺: 图 2(A)与图 2(E)为 2 μm , 图 2(B~D)及图 2(F~H)为 1 μm 。

随着 SIM 理论体系的不断完善, 科学家们不断地追求更高的时空分辨率和更低的光毒性, 使之更好的应用于活细胞生物成像领域。

3. 受激发射损耗显微术(STED)

3.1. 基本原理与特点

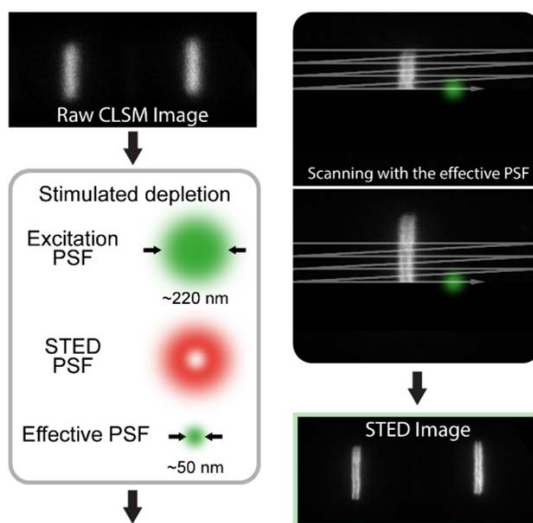


Figure 3. Schematic diagram illustrating the imaging principle of STED [8] (licensed under CC BY 4.0)

图 3. STED 的成像原理示意图[8] (根据 CC BY 4.0 获得许可)

1994 年, Stefan Hell 教授等人开发了 STED 显微镜[23], 于 1999 年进行了实验展示[24], 并在 2014 年因开发 STED 显微镜而获得诺贝尔化学奖。如图 3 所示, STED 采用两束激光同时照射样品, 一束用

于激发样品中标记的荧光分子, 使其在艾里斑范围内的荧光分子跃迁至激发态, 另一束为中心光强为零的环形损耗光(通常称为“甜甜圈”光束), 在皮秒级时间尺度内, 将艾里斑边缘(即环形损耗光照射区域)处于激发态的荧光分子通过受激辐射损耗返回基态[25], 从而使艾里斑中心很小的区域(环形损耗光中心强度为 0 的区域)内发出荧光, 将发光区域限制在衍射极限以下, 并通过点扫描的方式实现超分辨成像。由于环形损耗光的光强符合高斯分布, 通过瑞利判据可知 STED 的横向分辨率公式为

$$d \approx \frac{\lambda}{2NA\sqrt{1+I/I_s}} \quad (1)$$

其中, d 为系统横向分辨率, λ 为激发光波长, NA 为系统的数值孔径, I 和 I_s 为环形损耗光强度和荧光分子的饱和激发强度, 两者比值为相对功率。环形损耗光的质量特别是功率以及荧光分子的选择是影响 STED 分辨率的关键, 尽管高相对功率能够显著提升 STED 的横向分辨率, 达到远超衍射极限的水平(大约几十纳米), 但与之而来的是显著的光损伤风险, 包括对活细胞的光毒性和热效应, 以及加速荧光分子的光漂白现象, 不利于 STED 系统应用于活细胞成像。

为了应对这些挑战, 研究人员正在开发新型荧光探针材料、优化损耗光功率参数以及提高成像速度等, 以期在保持高分辨率的同时降低对活细胞的光损伤。这些技术改进将显著提升 STED 在活细胞成像中的应用潜力。

3.2 在活细胞成像中的发展与应用

为提升 STED 显微术在活细胞成像中的适用性, 研究者主要从硬件优化、算法改进和荧光探针开发三个方向进行技术革新, 并产生了诸多变体。在硬件和算法层面中, 比较重要的一项是 2017 年 Stefan W. Hell 团队展示了一种基于自适应照明的新型 STED 显微镜(Dynamic Intensity Minimum STED, DyMIN STED) [26], 其核心为根据激光扫描位置的局部结构特征动态调整 STED 损耗光的强度和驻留时间: 当 STED 损耗接近和远离荧光分子时, 根据两者距离同步增大或减小对应的 STED 损耗光功率, 以所需的分辨率进行成像, 减少过量的光子对荧光分子造成光漂白和对活细胞造成的光损伤。在常见的生物成像条件下, DyMIN-STED 可将扫描区域上的 STED 光剂量降低多达~20 倍, 对于较稀疏的 2D 和 3D 样品, 可降低多达 100 倍, 并可实现约 30 nm 的高分辨率成像。此外, 深度学习算法对于 STED 的发展起到了重要作用。2020 年, 年伦斯勒理工大学的 Li [27] 等人使用深度对抗网络(DAN-based), 对较低分辨率图像使用物理建模进行计算, 并输出对应的高分辨率图像, 可将 60 nm 分辨率的 STED 图像提升至 30 nm。2023 年, 美国 Ebrahimi 等人[28]将多阶段渐进图像恢复(MPRNet)的方法用于 STED 中, 并结合基于 U-Net 和残差通道注意力网络(RCAN)架构将样品的曝光时间减小到原来的 3.125%, 成像速度大幅提升。

相比于从硬件和算法本身优化 STED, 新型荧光探针的开发对推动 STED 的活细胞成像适配则更为直接, 是超分辨成像研究领域的热点方向[12]。当前用于 STED 活细胞成像的荧光探针主要分为有机荧光染料、荧光蛋白以及荧光纳米探针[29]。有机荧光染料具有较好的光稳定性和生物兼容性, 但目前的有机荧光染料种类还较少, 大多靶向线粒体; 荧光蛋白作为一种可通过基因编码和靶向蛋白一起表达的荧光探针, 不需额外标记, 在活细胞成像领域应用愈加广泛, 但其较差的光漂白能力使之很难用于长时程活细胞成像; 荧光纳米探针出色的光稳定性和较小的受激辐射功率使其具有独特的优势, 但特异性差的缺陷限制了其广泛应用。不同荧光探针的共同发展促进了 STED 在活细胞成像中的应用。2013 年 Gražvydas Lukinavičius 团队开发的硅罗丹明(Silicon-Rhodamine, SiR)染料具有里程碑意义[30]。它是第一个可以用于 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[29]。2016 年, Francesca Bottanelli 团队开发了基于 SiR 和 ATTO590 的 Halo/SNAP 双色标记系统, 成功实现了线粒体、内质网等细胞器的 STED 活细胞成像, 并以 2 秒时间分辨率连续采集长达 3 分钟[31]。2019 年, Chenguang Wang

团队报道了具有长荧光寿命的 MitoPB Yellow 探针, 首次通过 STED 在 60 nm 分辨率下观察到活细胞线粒体嵴的超微结构[29] [32]。2020 年, Xusan Yang 团队开发的 Mito ESq-635 探针实现了 HeLa 细胞线粒体内膜 35.2 nm 分辨率、50 分钟的延时成像, 清晰捕捉了线粒体融合和裂变过程中嵴的动态变化[33]。2022 年, Tianyan Liu 等人报道了一种与 STED 兼容的线粒体内膜荧光标志物 PK Mito Orange (PKMO), 其特点是延时成像的光毒性显著降低, 还与绿色和远红外荧光团兼容[34]。如图 4 所示, 该团队利用 PKMO 实现了 HeLa 和 COS-7 细胞中线粒体多个结构的多色 STED 成像, 包括线粒体内膜(IM)与线粒体 DNA (mtDNA)、外膜(OM)、嵴连接(CJs)、内质网(ER)的双色成像, 以及 IM 与细胞微管、mtDNA 的三色成像, 充分展示了 PKMO 在多色 STED 活细胞成像中的应用潜力。

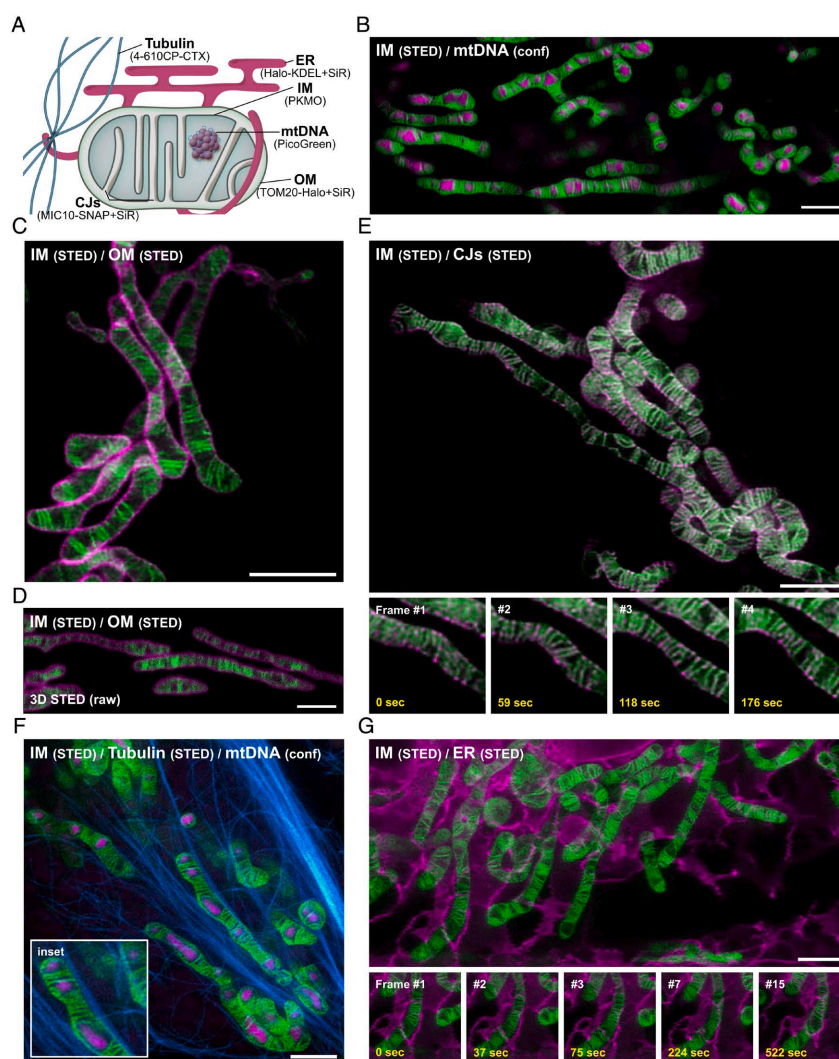


Figure 4. PKMO, in combination with fluorescent rhodamine probes, enables nanoscale mapping of mitochondria and analysis of mitochondria-organelle interactions using multicolor STED [34] (licensed under CC BY 4.0), (A) Multicolor labeling strategy for mitochondria. (B~G) Multicolor live-cell STED nanoscopy imaging: IM (green)/mtDNA (red), IM (green)/OM (red), IM (green)/CJs (red), IM (green)/OM (red), IM (green)/Tubulin (blue)/mtDNA (red), and IM (green)/ER (red). (Scale bar: 2 μm)

图 4. PKMO 与荧光罗丹明探针相结合, 能够使用多色 STED 纳米显微镜对线粒体进行纳米映射和分析线粒体 - 细胞器相互作用[34] (根据 CC BY 4.0 获得许可), (A)线粒体多色标记策略, (B~G)多色活细胞 STED 纳米成像。IM (绿)/mtDNA (红)、IM (绿)/OM (红)、IM (绿)/CJs (红)、IM (绿)/OM (红)、IM (绿)/Tubulin (蓝)/mtDNA (红)、IM (绿)/ER (红) (比例尺, 2 μm)

4 单分子定位显微术(SMLM)

4.1 基本原理与典型代表

要分辨两个距离小于衍射极限的发光分子有种很巧妙的方式——从时间上分开。获得这种时间分离最常见的方法是利用荧光分子的光开关特性：如图 5 所示，荧光分子可在发光态(“开”态)和非发光态(“关”态)之间可逆转换(闪烁)。通过精确控制激光照射或调节化学环境保证荧光分子的闪烁以及调控闪烁的速率[35]，确保同一时间内仅有个别分子处于发光状态，便可通过质心定位算法和高斯拟合方法[36]等算法确定单个荧光分子的精确位置，最后，叠加所有获得的单分子位置从而获得一幅超分辨图像，这就是单分子定位的核心构思。

这一技术的典型代表是 Xiaowei Zhuang 团队于 2006 年提出的随机光学重建显微镜(Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM) [37]和 Eric Betzig 等人在同年展示的光激活定位显微镜(photoactivated Localization Microscopy, PALM) [38]，并使超分辨成像进入横向分辨率 20 nm，纵向分辨率 50 nm 时代。两项技术的基本原理相似，主要区别在于 PALM 技术利用荧光蛋白(Photo Activated Green Fluorescent Protein, PA-GFP)的光激活效应实现开关，而 STORM 技术利用荧光探针(花菁类荧光染料对，Cy3~Cy5)和免疫荧光技术进行标记，PALM 技术通过细胞自身表达荧光蛋白的方式进行成像，因此更适合用于活细胞内蛋白的超分辨成像[12]。

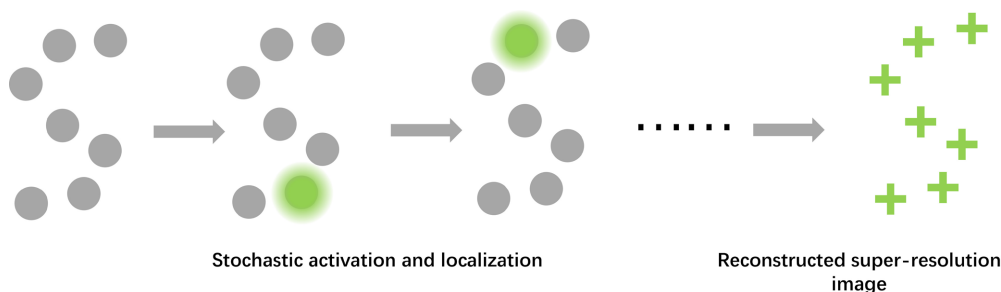


Figure 5. Schematic diagram illustrating the imaging principle of SMLM

图 5. SMLM 的成像原理图

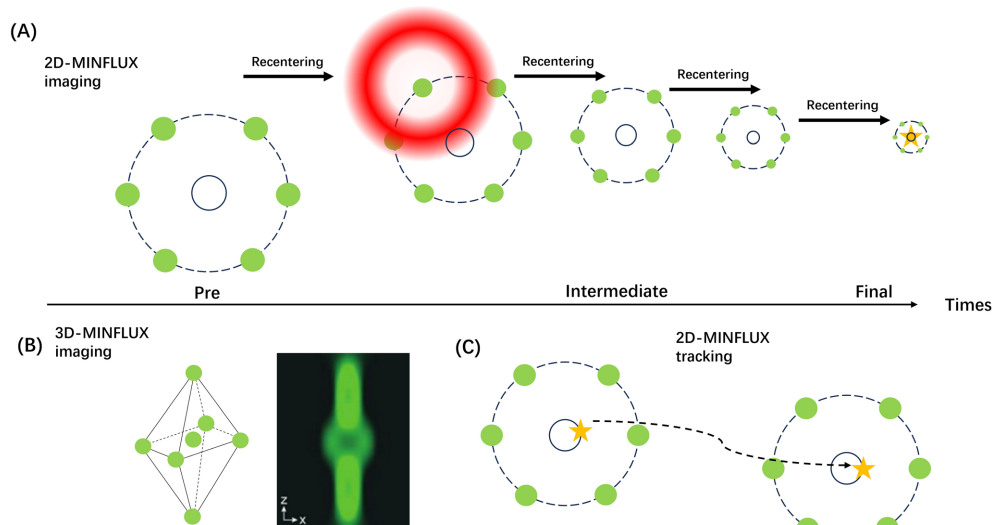


Figure 6. Localization principle and application modes of MINFLUX [40]

图 6. MINFLUX 的定位原理及应用模式[40]

值得注意的是, 2017 Hell 团队发布的最低光子通量显微术(Minimal Photon Fluxes, MINFLUX)将光学显微分辨率推进至约 1 nm 水平[2], 成为 SMLM 的新型代表。如图 6 所示, MINFLUX 虽然与 STORM 和 PALM 一样利用荧光团的随机开关特性实现单分子稀疏成像, 但其定位原理与传统方法有本质区别。不同于流行的质心定位, MINFLUX 采用了类似于 STED 的环形光斑, 但其功能不在于损耗, 而是激发。理想情况下, 当环形激发光束的中心零点精确地对准荧光分子, 那么点探测器将不会检测到光子; 当环形激发光束的中心零点接近单个荧光分子位置时, 二者距离越近(激发光强越低), 收集到的光子数就越少, 产生的荧光不仅体现了荧光强度信息, 还携带了有关单个分子与激光光束中心相对位置的信息[2]。实际上, 荧光可以看作是分子位置与零点位置不匹配所要付出的代价, 这也意味着错配越小, 定位所需的荧光光子就越少, 这种定位方式以较少的光子数就可以获得极高的定位精度, 有效降低了样品的光漂白效应[39], 在活细胞成像领域展现出显著优势。

4.2. 在活细胞成像中的发展与应用

SMLM 逐帧稀疏信号累积的成像策略以及早期的质心定位等方式使之存在着时间分辨率低和强光毒性等问题, 开发更快的成像算法以及荧光探针, 结合新型的定位方式能提高 SMLM 在活细胞成像中的应用价值。

算法方面, 早期常见的定位算法包括质心法[41]、高斯拟合[36]、最大似然估计[42]等, 然而这些方法主要用于处理低分子密度的图像, 时间分辨率低, 适用于高分子密度的定位算法可以缓解这一限制。2012 年, Zhu 等人[43]开发的压缩感知定位算法允许活化的荧光团密度比传统的单分子拟合方法所能处理的密度高一个数量级, 并对果蝇活细胞中的微管蛋白实现了 3 s (169 帧)的动态成像。近年来, 深度学习的发展也将 SMLM 的发展带到了一个新高度。2018 年, Nehme 等人[44]提出了 DeepSTORM 算法, 算法首次将深度学习引入单分子定位领域, 以 10 Hz 的频率在 50 秒内同时追踪了活小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)中 48 个分散的端粒, 为研究其动态行为提供了新视角。此外, Thunder STORM [45]、DECODE [46]、ANNA-PALM [47]等算法的不断发展, 进一步提升了 SMLM 在活细胞成像中的适用性。

荧光探针方面, 同前面提到的一样, 也分为有机荧光染料、荧光蛋白以及荧光纳米探针, 但基于成像原理的不同, SMLM 所需的荧光探针对于闪烁性, 占空比以及循环次数等有额外的要求。早期使用的花菁类荧光染料 Cy5 与 Cy3 和 Alexa 647 等存在着易光漂白, 依赖具有细胞毒性的巯基缓冲液(如 β -巯基乙醇、MEA)以及膜穿透性差, 需要固定后透膜处理(如 Triton X-100)的缺陷, 不利于活细胞成像。因此, 新型荧光探针的开发对于 SMLM 在活细胞成像中的应用起着至为关键的作用, 也是当前领域研究的热点问题。2009 年, Heilemann 等人[48]使用 ATTO655 荧光探针代替外源性巯基化合物, 对人肺癌活细胞(A549)中的 RNA 进行了长达 500 s 的动态成像。2013 年, Gražvydas 等人[30]开发了硅基罗丹明(SiR)探针, 可使用不同的标记技术特异性偶联到蛋白质上, 如 SiR-SNAP、SiR-CLIP 和 SiR-Halo 等, 并对活细胞组蛋白实现了 3 分钟动态成像。此外, 一些基于荧光探针的新型标记方法也推动了 SMLM 的发展。2014 年, Ralf Jungmann 等人[49]提出了 DNA-PAINT, 通过固定链(标记目标蛋白的 DNA 单链)和成像链(带有荧光分子的 DNA 互补链)的随机结合产生荧光以满足 SMLM 的稀疏性, 实现了固定细胞的超分辨成像。2023 年, 该团队[50]进一步开发了基于双色 DNA-PAINT 的单粒子跟踪技术(DNA-PAINT-SPT), 对活细胞膜中蛋白质 FKBP 进行数分钟的稳定追踪。DNA-PAINT-SPT 使用 Cy3B 标记的成像链(扩散常数 $0.093 \pm 0.017 \mu\text{m}^2/\text{s}$), 不仅能在长时间(>6 分钟)内保持可观察分子的数量不变(>85%), 还能增加单个轨迹的持续时间(Cy3B-DNA-PAINT-SPT: $\tau_{1/2} = 31 \pm 13 \text{ s}$; Cy3B-单染料: $\tau_{1/2} = 17 \pm 3 \text{ s}$), 这种方式比传统单染标记仅能实现的几秒相互作用追踪时间有了显著提高。

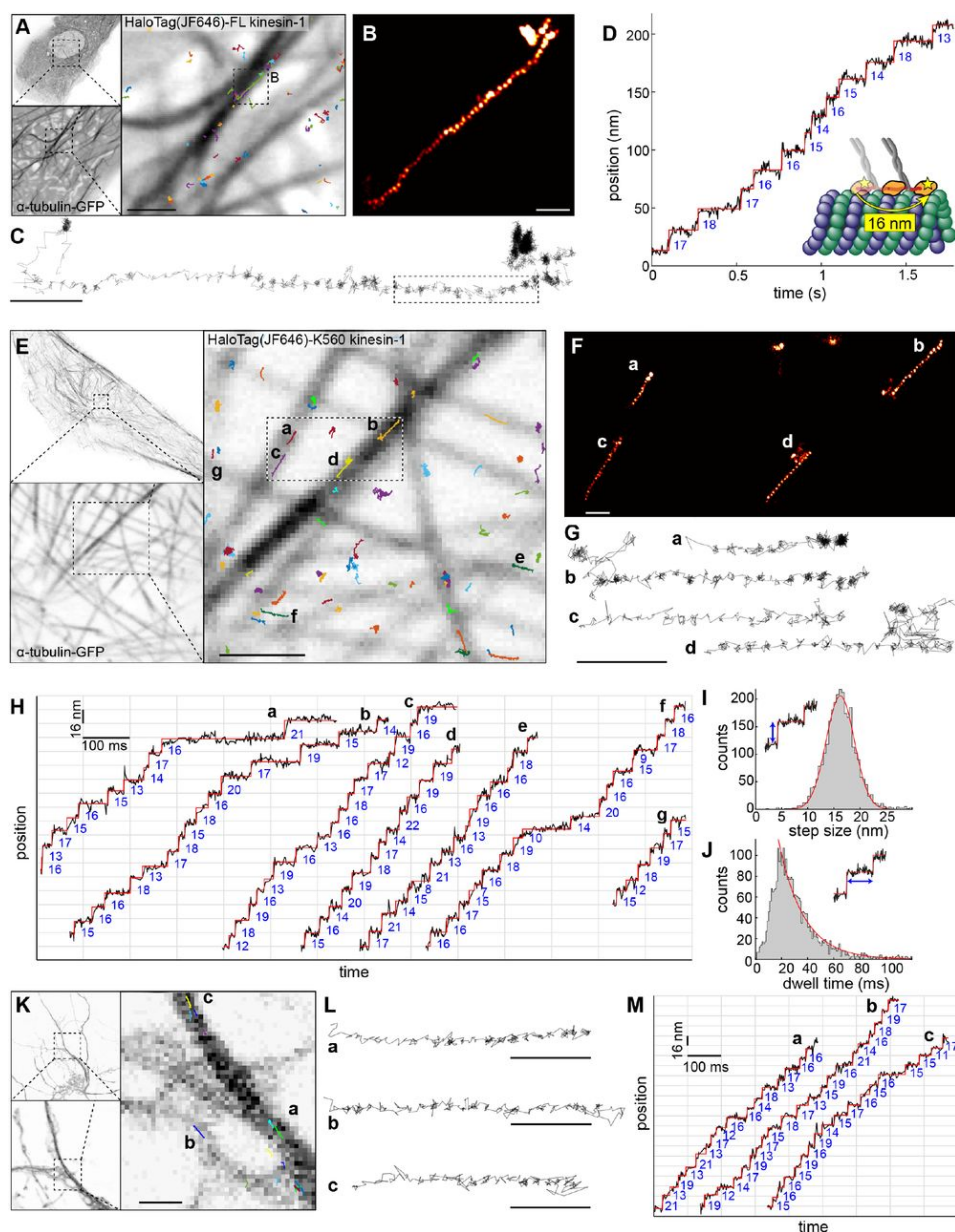


Figure 7. MINFLUX tracking of kinesin-1 movement in live cells [52] (licensed under CC BY 4.0), (A~D) Live-cell tracking of full-length kinesin-1 (Halo-JF646); (E~J) Live-cell tracking of truncated kinesin-1 (Halo-K560); (K~M) Tracking of truncated kinesin-1 (Halo-K560) in untreated live primary mouse cortical neurons

图 7. MINFLUX 追踪活细胞内 kinesin-1 运动[52] (根据 CC BY 4.0 获得许可), (A~D) 全长 kinesin-1 (Halo-JF646)的活细胞追踪; (E~J) 截短型 kinesin-1 (Halo-K560)的活细胞追踪; (K~M) 未处理活体原代小鼠皮层神经元中截短型 kinesin-1 (Halo-K560)追踪

定位算法方面, 基于新型的最小光子通量定位方式开发的 MINFLUX 与基于流行的质心定位开发的超分辨显微镜相比, 所需的荧光光子减少了 22 倍, 实现了约 1 纳米的定位精度, 并将追踪单个荧光蛋白的时间分辨率提升 100 倍[2]。2017 年, Hell 团队首次利用开发的 MINFLUX 追踪了活大肠杆菌中融合 mEos2 荧光蛋白的 30 S 核糖体亚基蛋白质[2]。2022 年, Hell 团队和 Jonas Ries 团队[51]同时发表了利用 MINFLUX 对活细胞中马达蛋白 kinesin-1 在微管上行走时的精确步进运动进行研究的相关文章。马达蛋白作为细胞内物质运输的关键执行者, 参与转运多种细胞器(如线粒体、溶酶体)和蛋白质复合体等重要货

物, 在胞内运输、细胞分裂等基本生命活动中发挥不可或缺的作用。过去的单分子技术在体外重构实验中, 对马达蛋白的动力学研究取得了巨大的成功, 而上述团队则在活细胞中对其动态行为进行了精确的追踪。如图 7 所示, Jonas Ries 课题组先在固定细胞中观测到 kinesin-1 的 C 末端结构域时的表观步长为 8 nm, 而附着在 N 末端结构域时的表观步长为 16 nm, 后用 JF646 染料对活的 U2OS 细胞中构建表达的 Halo-kinesin-1 (全长) 进行标记追踪, 清晰地观测到 N 端约 16 nm 的步进长度和 31.8 ms 的步进停留时间。此外, 团队对活的初级小鼠皮层神经元轴突中的 kinesin-1 进行了相同的研究, 同样清楚地量化了 kinesin-1 的 16 nm 步进动力学。2024 年, Hell 团队[52]又在活的神经元细胞中对动力蛋白(dynein)的步进动力学进行了研究, 展示了 MINFLUX 在活细胞成像领域的巨大潜力。

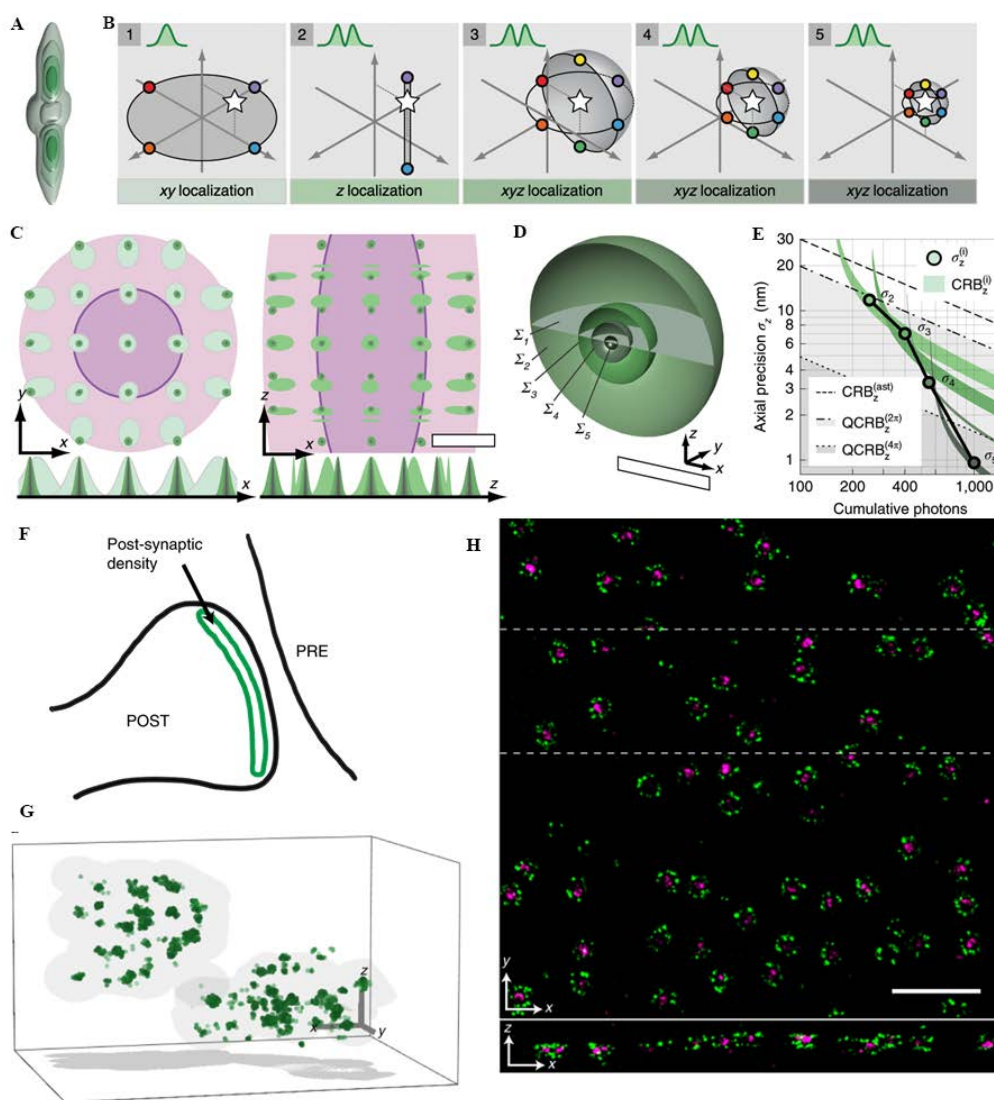


Figure 8. MINFLUX nanoscopy delivers 3D multicolor nanometer resolution in cells, (A~E) Principle of 3D localization and localization precision of MINFLUX; (F~G) 3D imaging of the postsynaptic protein PSD-95; (H) 3D dual-color imaging of nuclear pores in U-2 OS cells: Nup96-SNAP (green)/NPC (red) (reproduced with permission from Springer Nature)
图 8. MINFLUX 在细胞中提供 3D 多色纳米分辨率, (A~E) MINFLUX 的 3D 定位原理以及定位精度(F~G)突触后蛋白 PSD-95 的 3D 成像(H) U-2 OS 细胞核孔 3D 双色成像, Nup96-SNAP (绿)/NPC (红) (获 Springer Nature 出版社许可)

MINFLUX 在 3D 定位和多色成像中也展示出巨大的潜力。如图 8 所示, 通过将 MINFLUX 升级为

3D 环形激发光, 使用常规聚焦光束探测 XY 位置, 使 3D 环形激发光的中心轴尽可能接近荧光分子, 后在 XY 平面上下增加额外的检测位点, 能够实现具有高度均匀和各向同性的约 1 nm 3D 定位精度; 通过选择具有相同激发波长, 不同发射波长的荧光团, 结合偏振镜进行光谱分类实现双色成像。2022 年, Hell 团队展示了通过 MINFLUX 对海马神经元培养中的蛋白质 PSD-95 进行了定位精度约为 2~3 nm 的 3D 成像, 并成功使用 Alexa Fluor 647 标记表达 Nup96–SNAP 与 CF680 偶联的大麦胚芽凝集素(WGA)标记 NPC, 观察到了 U-2 OS 细胞核孔的双色 3D 图像[53]。

最后, 我们将各种超分辨技术的主要特点总结如下表 1 所示。

Table 1. Key advantages and disadvantages of different techniques [54] [55]

表 1. 不同技术的主要优缺点[54] [55]

Super-resolution Method	SIM	STED	SMLM			
			STORM	PALM	DNA-PAINT	MINFLUX
Lateral resolution/nm	50~100	40~110	10~30	10~30	10~30	1~3
Axial resolution/nm	250~350	Down to 40	Down to 10	~10	~80	1~3
Acquisition	Seconds	Seconds	Minutes	Minutes	Minutes-hours	Minutes-hours
Live cell imaging	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes

5. 总结与展望

随着超分辨光学显微技术(SRM)的快速发展, 生命科学研究已迈入纳米尺度动态观测的新时代。本文回顾了结构光照明显微术(SIM)、受激发射损耗显微术(STED)、单分子定位显微术(SMLM)以及近些年受到广泛关注的微小光子通量(MINFLUX)的基本原理与在活细胞成像领域中的发展和应用, 揭示了这些技术在突破衍射极限、解析生物纳米结构域动态变化的独特优势。它们的互补性特征为研究者提供了多样化的选择: SIM 凭借高时间分辨率和低光毒性成为亚百纳米尺度像的首选, 但较低的空间分辨率限制了其在更小尺度研究中的应用; STED 虽然具有较高的空间和时间分辨率以及对荧光探针的高兼容性, 但高光毒性成为了 STED 活细胞成像的阻碍; SMLM 凭借最为出色的空间分辨率成为了亚纳米尺度活细胞成像的强有力工具, 而早期低时间分辨率和高光毒性的缺陷也通过开发合适的荧光探针以及改进成像策略进而逐渐克服, MINFLUX 作为 SMLM 中的新型代表, 也在不断冲击着超分辨荧光显微镜在实际生物研究中的观测极限。

当前, 荧光探针的开发以及成像模式的改进推动着 SRM 往更高的时空分辨率发展, 并更好地适配活细胞成像, 为人类揭示生命本质规律、攻克疾病难题提供了前所未有的微观利器。

未来, SRM 无疑将继续扮演重要角色, 推动更多的基础研究向临床转化, 为人类的健康科学发展开拓新视野。

参考文献

- [1] Schermelleh, L., Ferrand, A., Huser, T., Eggeling, C., Sauer, M., Biehlmaier, O., *et al.* (2019) Super-Resolution Microscopy Demystified. *Nature Cell Biology*, **21**, 72-84. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0251-8>
- [2] 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>
- [3] Laissue, P.P., Alghamdi, R.A., Tomancak, P., Reynaud, E.G. and Shroff, H. (2017) Assessing Phototoxicity in Live Fluorescence Imaging. *Nature Methods*, **14**, 657-661. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4344>
- [4] Chen, X., Zhong, S., Hou, Y., Cao, R., Wang, W., Li, D., *et al.* (2023) Superresolution Structured Illumination Micros-

- copy Reconstruction Algorithms: A Review. *Light: Science & Applications*, **12**, Article No. 172. <https://doi.org/10.1038/s41377-023-01204-4>
- [5] 乔良, 唐远河, 张昊. 多维度结构光显微成像及其生物应用[D]: [硕士学位论文]. 西安: 西安理工大学, 2021.
 - [6] Lukosz, W. and Marchand, M. (1963) Optischen Abbildung Unter Überschreitung der Beugungsbedingten Auflösungsgrenze. *Optica Acta: International Journal of Optics*, **10**, 241-255. <https://doi.org/10.1080/713817795>
 - [7] Gustafsson, M.G.L. (2000) Surpassing the Lateral Resolution Limit by a Factor of Two Using Structured Illumination Microscopy. *Journal of Microscopy*, **198**, 82-87. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x>
 - [8] Szikora, S., Görög, P., Kozma, C. and Mihály, J. (2021) Drosophila Models Rediscovered with Super-Resolution Microscopy. *Cells*, **10**, Article 1924. <https://doi.org/10.3390/cells10081924>
 - [9] Cox, S. (2015) Super-Resolution Imaging in Live Cells. *Developmental Biology*, **401**, 175-181. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.11.025>
 - [10] Richter, V., Piper, M., Wagner, M. and Schneckenburger, H. (2019) Increasing Resolution in Live Cell Microscopy by Structured Illumination (SIM). *Applied Sciences*, **9**, Article 1188. <https://doi.org/10.3390/app9061188>
 - [11] Fiolka, R., Shao, L., Rego, E.H., Davidson, M.W. and Gustafsson, M.G.L. (2012) Time-Lapse Two-Color 3D Imaging of Live Cells with Doubled Resolution Using Structured Illumination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 5311-5315. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119262109>
 - [12] 张娇, 何勤, 武泽凯. 超分辨显微成像技术在活细胞成像中的应用与发展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2021, 48(11): 1301-1315.
 - [13] 陈婕, 刘文娟, 徐兆超. 多种超分辨荧光成像技术比较和进展评述[J]. 色谱, 2021, 39(10): 1055-1064.
 - [14] Hirvonen, L., Mandula, O., Wicker, K. and Heintzmann, R. (2008) Structured Illumination Microscopy Using Photoswitchable Fluorescent Proteins. *SPIE Proceedings*, **6861**, 68610L. <https://doi.org/10.1117/12.763021>
 - [15] Qiao, C., Chen, X., Zhang, S., Li, D., Guo, Y., Dai, Q., et al. (2021) 3D Structured Illumination Microscopy via Channel Attention Generative Adversarial Network. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, **27**, 1-11. <https://doi.org/10.1109/jstqe.2021.3060762>
 - [16] 鲁心怡, 黄昱, 张梓童, 等. 深度学习在超分辨显微成像中的研究进展(特邀) [J]. 激光与光电子学进展, 2024, 61(16): 31-48.
 - [17] Wang, J., Fan, J., Zhou, B., Huang, X. and Chen, L. (2023) Hybrid Reconstruction of the Physical Model with the Deep Learning That Improves Structured Illumination Microscopy. *Advanced Photonics Nexus*, **2**, Article 016012. <https://doi.org/10.1117/1.apn.2.1.016012>
 - [18] Kner, P., Chhun, B.B., Griffis, E.R., Winoto, L. and Gustafsson, M.G.L. (2009) Super-Resolution Video Microscopy of Live Cells by Structured Illumination. *Nature Methods*, **6**, 339-342. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1324>
 - [19] Shao, L., Kner, P., Rego, E.H. and Gustafsson, M.G.L. (2011) Super-Resolution 3D Microscopy of Live Whole Cells Using Structured Illumination. *Nature Methods*, **8**, 1044-1046. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1734>
 - [20] Li, D., Shao, L., Chen, B., Zhang, X., Zhang, M., Moses, B., et al. (2015) Extended-Resolution Structured Illumination Imaging of Endocytic and Cytoskeletal Dynamics. *Science*, **349**, aab3500. <https://doi.org/10.1126/science.aab3500>
 - [21] Guo, Y., Li, D., Zhang, S., Yang, Y., Liu, J., Wang, X., et al. (2018) Visualizing Intracellular Organelle and Cytoskeletal Interactions at Nanoscale Resolution on Millisecond Timescales. *Cell*, **175**, 1430-1442.E17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.057>
 - [22] Ouyang, Z., Wang, Q., Li, X., Dai, Q., Tang, M., Shao, L., et al. (2024) Elucidating Subcellular Architecture and Dynamics at Isotropic 100-Nm Resolution with 4Pi-SIM. *Nature Methods*, **22**, 335-347. <https://doi.org/10.1038/s41592-024-02515-z>
 - [23] 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>
 - [24] 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>
 - [25] Hell, S.W., Willig, K.I., Dyba, M., Jakobs, S., Kastrop, L. and Westphal, V. (2006) Nanoscale Resolution with Focused Light: Stimulated Emission Depletion and Other Reversible Saturable Optical Fluorescence Transitions Microscopy Concepts. In: Pawley, J., Ed., *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Springer, 571-579. https://doi.org/10.1007/978-0-387-45524-2_31
 - [26] Heine, J., Reuss, M., Harke, B., D'Este, E., Sahl, S.J. and Hell, S.W. (2017) Adaptive-Illumination STED Nanoscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114**, 9797-9802. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708304114>
 - [27] Li, M. (2020) Deep Adversarial Network for Super Stimulated Emission Depletion Imaging. *Journal of Nanophotonics*, **14**, Article 016009. <https://doi.org/10.1117/1.jnp.14.016009>

- [28] Ebrahimi, V., Stephan, T., Kim, J., Carravilla, P., Eggeling, C., Jakobs, S., *et al.* (2023) Deep Learning Enables Fast, Gentle STED Microscopy. *Communications Biology*, **6**, Article No. 674. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05054-z>
- [29] 周汉秋, 朱殷铨, 韩鸿怡, 等. 基于受激发射损耗显微术的活细胞和活体超分辨成像[J]. 生物化学与生物物理进展, 2023, 50(3): 513-528.
- [30] Lukinavičius, G., Umezawa, K., Olivier, N., Honigsmann, A., Yang, G., Plass, T., *et al.* (2013) A Near-Infrared Fluorophore for Live-Cell Super-Resolution Microscopy of Cellular Proteins. *Nature Chemistry*, **5**, 132-139. <https://doi.org/10.1038/nchem.1546>
- [31] Bottanelli, F., Kromann, E.B., Allgeyer, E.S., Erdmann, R.S., Wood Baguley, S., Sirinakis, G., *et al.* (2016) Two-Colour Live-Cell Nanoscale Imaging of Intracellular Targets. *Nature Communications*, **7**, Article No. 10778. <https://doi.org/10.1038/ncomms10778>
- [32] Wang, C., Taki, M., Sato, Y., Tamura, Y., Yaginuma, H., Okada, Y., *et al.* (2019) A Photostable Fluorescent Marker for the Superresolution Live Imaging of the Dynamic Structure of the Mitochondrial Cristae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **116**, 15817-15822. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905924116>
- [33] Yang, X., Yang, Z., Wu, Z., He, Y., Shan, C., Chai, P., *et al.* (2020) Mitochondrial Dynamics Quantitatively Revealed by STED Nanoscopy with an Enhanced Squaraine Variant Probe. *Nature Communications*, **11**, Article No. 3699. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17546-1>
- [34] Liu, T., Stephan, T., Chen, P., Keller-Findeisen, J., Chen, J., Riedel, D., *et al.* (2022) Multi-Color Live-Cell STED Nanoscopy of Mitochondria with a Gentle Inner Membrane Stain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **119**, e2215799119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2215799119>
- [35] Lelek, M., Gyparakis, M.T., Beliu, G., Schueder, F., Griffié, J., Manley, S., *et al.* (2021) Single-Molecule Localization Microscopy. *Nature Reviews Methods Primers*, **1**, Article No. 39. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00038-x>
- [36] Thompson, R.E., Larson, D.R. and Webb, W.W. (2002) Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes. *Biophysical Journal*, **82**, 2775-2783. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(02\)75618-x](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(02)75618-x)
- [37] 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>
- [38] 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>
- [39] 何辰颖, 詹政以, 李传康, 等. 亚 20nm 荧光超分辨显微技术研究进展(特邀) [J]. 激光与光电子学进展, 2024, 61(2): 64-76.
- [40] Carsten, A., Failla, A.V. and Aepfelbacher, M. (2025) MINFLUX Nanoscopy: Visualising Biological Matter at the Nanoscale Level. *Journal of Microscopy*, **298**, 219-231.
- [41] Cheezum, M.K., Walker, W.F. and Guilford, W.H. (2001) Quantitative Comparison of Algorithms for Tracking Single Fluorescent Particles. *Biophysical Journal*, **81**, 2378-2388. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(01\)75884-5](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(01)75884-5)
- [42] Aguet, F., Van De Ville, D. and Unser, M. (2005) A Maximum-Likelihood Formalism for Sub-Resolution Axial Localization of Fluorescent Nanoparticles. *Optics Express*, **13**, 10503-10522. <https://doi.org/10.1364/optex.13.010503>
- [43] Zhu, L., Zhang, W., Elnatan, D. and Huang, B. (2012) Faster STORM Using Compressed Sensing. *Nature Methods*, **9**, 721-723. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1978>
- [44] Nehme, E., Weiss, L.E., Michaeli, T. and Shechtman, Y. (2018) Deep-STORM: Super-Resolution Single-Molecule Microscopy by Deep Learning. *Optica*, **5**, 458-464. <https://doi.org/10.1364/optica.5.000458>
- [45] Ovesný, M., Křížek, P., Borkovec, J., Švindrych, Z. and Hagen, G.M. (2014) Thunderstorm: A Comprehensive ImageJ Plug-in for PALM and STORM Data Analysis and Super-Resolution Imaging. *Bioinformatics*, **30**, 2389-2390. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu202>
- [46] Speiser, A., Müller, L., Hoess, P., Matti, U., Obara, C.J., Legant, W.R., *et al.* (2021) Deep Learning Enables Fast and Dense Single-Molecule Localization with High Accuracy. *Nature Methods*, **18**, 1082-1090. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01236-x>
- [47] Kumar Gaire, S., Zhang, Y., Li, H., Yu, R., Zhang, H.F. and Ying, L. (2020) Accelerating Multicolor Spectroscopic Single-Molecule Localization Microscopy Using Deep Learning. *Biomedical Optics Express*, **11**, 2705-2721. <https://doi.org/10.1364/boe.391806>
- [48] Heilemann, M., van de Linde, S., Mukherjee, A. and Sauer, M. (2009) Super-Resolution Imaging with Small Organic Fluorophores. *Angewandte Chemie International Edition*, **48**, 6903-6908. <https://doi.org/10.1002/anie.200902073>
- [49] Jungmann, R., Avendaño, M.S., Woehrstein, J.B., Dai, M., Shih, W.M. and Yin, P. (2014) Multiplexed 3D Cellular Super-Resolution Imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT. *Nature Methods*, **11**, 313-318.

-
- <https://doi.org/10.1038/nmeth.2835>
- [50] Niederauer, C., Nguyen, C., Wang-Henderson, M., Stein, J., Strauss, S., Cumberworth, A., *et al.* (2023) Dual-Color DNA-PAINT Single-Particle Tracking Enables Extended Studies of Membrane Protein Interactions. *Nature Communications*, **14**, Article No. 4345. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40065-8>
- [51] Deguchi, T., Iwanski, M.K., Schentarra, E.M., *et al.* (2022) Direct Observation of Motor Protein Stepping in Living Cells Using MINFLUX. *bioRxiv*: 2022.07.25.500391.
- [52] Schleske, J.M., Hubrich, J., Wirth, J.O., D'Este, E., Engelhardt, J. and Hell, S.W. (2024) MINFLUX Reveals Dynein Stepping in Live Neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **121**, e2412241121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2412241121>
- [53] Gwosch, K.C., Pape, J.K., Balzarotti, F., Hoess, P., Ellenberg, J., Ries, J., *et al.* (2020) MINFLUX Nanoscopy Delivers 3D Multicolor Nanometer Resolution in Cells. *Nature Methods*, **17**, 217-224. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0688-0>
- [54] Valli, J., Garcia-Burgos, A., Rooney, L.M., Vale de Melo e Oliveira, B., Duncan, R.R. and Rickman, C. (2021) Seeing Beyond the Limit: A Guide to Choosing the Right Super-Resolution Microscopy Technique. *Journal of Biological Chemistry*, **297**, Article 100791. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100791>
- [55] Nosov, G., Kahms, M. and Klingauf, J. (2020) The Decade of Super-Resolution Microscopy of the Presynapse. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, **12**, Article 32. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00032>