

# 基于MINFLUX超分辨成像与改进聚类算法的突触纳米结构解析

杨雯婷, 林 剑

上海理工大学智能科技学院, 上海

收稿日期: 2025年3月21日; 录用日期: 2025年4月14日; 发布日期: 2025年4月21日

## 摘 要

在细胞尺度的生物成像中, 高密度荧光标记导致的信号重叠和结构错误解析限制了纳米级生物复合体的精准建模。本研究结合MINFLUX成像技术, 整合现有计算方法并优化参数, 提出一种针对突触纳米簇的标准化分析流程。基于现有的三步DBSCAN框架, 我们通过参数分级优化与体积筛选策略, 提升了密集荧光团的分割精度。利用DCR数据的双峰特性, 通过双高斯拟合实现了CaMKII-T286与PSD95标记的高效分色。进一步将多项式回归曲面拟合与AlphaShape表面重构结合, 并在MINFLUX数据中实现了突触后膜纳米结构的空映射。应用该流程分析固定神经元样本, 发现PSD95团块与CaMKII-T286寡聚体的高度结合, 且PSD95纳米簇呈现网状拓扑。本研究提供了可复用的参数组合方案, 为超分辨数据的复杂结构解析提供了参考依据。

## 关键词

MINFLUX超分辨成像, 聚类算法, 突触后表面重构, CaMKII-T286, PSD95

# Nanoscale Synaptic Structure Analysis Using MINFLUX Super-Resolution Imaging and an Improved Clustering Algorithm

Wenting Yang, Jian Lin

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

Received: Mar. 21<sup>st</sup>, 2025; accepted: Apr. 14<sup>th</sup>, 2025; published: Apr. 21<sup>st</sup>, 2025

## Abstract

In cellular-scale biological imaging, high-density fluorescent labeling causes signal overlap and

structural misinterpretation, hindering nanoscale biological complex modeling. This study combines MINFLUX imaging with optimized computational methods to develop a standardized analysis workflow for synaptic nanoclusters. We enhance the three-step DBSCAN framework with parameter optimization and volume screening to improve segmentation of dense fluorophores. Using the bimodal property of DCR data and dual Gaussian fitting, we achieve efficient separation of CaMKII-T286 and PSD95 signals. We also combine polynomial regression surface fitting with AlphaShape surface reconstruction for the spatial mapping of postsynaptic membrane nanostructures in MINFLUX data. Applying this workflow to fixed neuronal samples reveals tight association between PSD95 clusters and CaMKII-T286 oligomers, with PSD95 nanoclusters showing a reticular topology. This study offers reusable parameter combinations, providing a reference for analyzing complex structures in super-resolution data.

## Keywords

MINFLUX Super-Resolution Imaging, Clustering Algorithm, Postsynaptic Surface Reconstruction, CaMKII-T286, PSD95

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

在细胞尺度的生物成像研究中, 纳米级生物复合体的精准建模面临重大挑战: 高密度荧光标记引发的信号重叠现象会显著干扰结构解析的准确性[1]。传统荧光显微镜受光学衍射极限制约, 横向分辨率约为 250 nm, 轴向分辨率仅达 500 nm [2], 这使得科研人员在观测突触等亚细胞结构时, 难以清晰呈现其纳米尺度的三维构象与动态功能关联。在此背景下, 具有单分子检测能力的超分辨成像技术因其突破衍射极限的独特优势成为研究热点——这类技术不仅能实现大视场高通量检测, 更可显著提升空间分辨率[3]。最小光子通量显微技术(Minimal Photon Fluxes, MINFLUX)是一种新兴的光学超分辨成像方法, 能够在极低的光子通量下实现纳米级分辨率的荧光成像。其单分子定位精度可降至 1 nm, 成功实现单分子纳米尺度的分辨率[4] [5], 是揭示生物大分子复合体纳米空间排布与相互作用机制的有力工具。

然而传统分析方法在处理高密度荧光标记数据时, 仍面临信号重叠导致的结构误解析、纳米结构细节丢失等挑战。在固定细胞样本中, 高密度荧光标记易导致信号重叠与定位模糊: 抗体标记的空间位阻可能使邻近分子间距小于衍射极限分辨率, 传统单分子定位算法在密集信号下的分割误差会干扰纳米团簇定量分析[6]。例如, 常规的基于密度的聚类算法(Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise, DBSCAN)可能将邻近多聚体合并为单一超大团簇, 导致寡聚体数量与尺寸的统计偏差。其次, 双色标记体系中共定位分析常受限于二抗分子尺寸(~25 nm)与光谱串扰[7], 当标记间距接近二抗长度时, 传统分色方法的可靠性显著下降。

鉴于此, 本研究结合 MINFLUX 超分辨成像技术, 整合现有计算方法并优化参数, 提出一种针对突触纳米簇的标准化分析流程。通过参数分级优化与体积筛选策略, 显著提升了密集荧光团的分割精度, 有效应对高密度荧光标记带来的信号重叠问题。利用 DCR 数据的双峰特性, 通过双高斯拟合实现了 CaMKII-T286 与 PSD95 标记的高效分色, 进一步将多项式回归曲面拟合与 AlphaShape 表面重构结合, 在 MINFLUX 数据中实现了突触后膜纳米结构的空问映射。应用该流程分析固定神经元样本时, 发现 PSD95 团块与 CaMKII-T286 寡聚体的共定位率高达 46%, 且 PSD95 纳米簇呈现网状拓扑。通过这种改

进的聚类算法和超分辨成像技术, 更准确地解析突触纳米结构, 为突触可塑性机制研究和神经疾病模型构建提供新的视角和方法。

## 2. 方法

基于 MATLAB 平台构建了一套基于 MINFLUX 超分辨成像与改进聚类算法的纳米结构解析体系, 其核心创新点在于将数学建模、生物物理约束与多尺度分析相结合, 探索性解决高密度标记、膜面拟合与共定位判定的技术挑战。方法框架如下。

### 2.1. 双色通道解析与分子归属判定

针对高密度标记导致的光谱交叉干扰问题, 我们提出了一种基于探测器通道比(Detector Channel Ratio, DCR)的双峰分布特性的解决方案。DCR 通过比较两个不同探测器通道的信号强度比值, 能够有效区分不同荧光信号。通过构建双高斯混合模型(Gaussian Mixture Model, GMM)并结合期望最大化(Expectation-Maximization, EM)优化算法, 实现了分子的精准分色, 具体过程如下。

双高斯混合分布的概率密度函数为:

$$p(x) = \pi_1 \mathcal{N}(x | \mu_1, \sigma_1^2) + \pi_2 \mathcal{N}(x | \mu_2, \sigma_2^2) \quad (1)$$

其中,  $\pi_1 + \pi_2 = 1$  为混合系数,  $\mu_1, \mu_2$  与  $\sigma_1^2, \sigma_2^2$  分别对应 f1680 nm (CaMKII-T286)与 f1640 nm (PSD95)通道的 DCR 均值与方差。

通过 EM 算法迭代优化模型参数:

$$\theta = \{\pi_k, \mu_k, \sigma_k^2\} \quad (2)$$

E 步(期望计算), 计算样本  $x_i$  归属第  $k$  个高斯分量的后验概率:

$$Z_{i,k} = \frac{\pi_k \mathcal{N}(x_i | \mu_k, \sigma_k^2)}{\sum_{j=1}^M \pi_j \mathcal{N}(x_i | \mu_j, \sigma_j^2)} \quad (3)$$

M 步(最大化似然), 更新参数  $\mu_k, \sigma_k^2, \pi_k$ :

$$\mu_k = \frac{\sum_{i=1}^N Z_{i,k} x_i}{\sum_{i=1}^N Z_{i,k}}, \sigma_k^2 = \frac{\sum_{i=1}^N Z_{i,k} (x_i - \mu_k)^2}{\sum_{i=1}^N Z_{i,k}}, \pi_k = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N Z_{i,k} \quad (4)$$

通过求解双高斯分布交点确定最优分色阈值  $x_{th}$ :

$$\pi_1 \mathcal{N}(x | \mu_1, \sigma_1^2) = \pi_2 \mathcal{N}(x | \mu_2, \sigma_2^2) \quad (5)$$

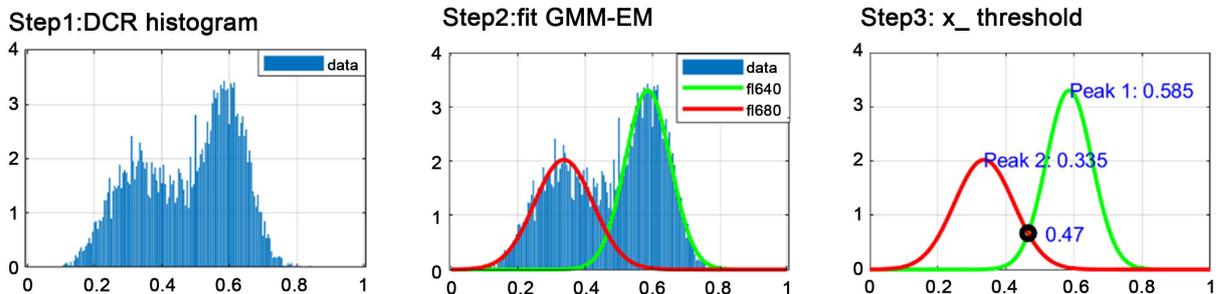


Figure 1. Illustration of double gaussian mixture fitting for separation of fluorescent signals (f1640 and f1680)

图 1. 双高斯混合拟合分离荧光信号(f1640 和 f1680)示意图

利用上述方法对神经元细胞 MINFLUX 双色成像数据进行处理, 通过对 CaMKII-T286 与 PSD95 蛋白荧光信号的 DCR 数据进行拟合分析, 确定了最优分色阈值为  $x_{th} = 0.43$  (RMSE = 0.0326), 成功实现 fl680 (CaMKII-T286)与 fl640 (PSD95)的荧光信号进行了有效的分离, 图 1 显示了分离的三个主要步骤, 对于样品制备的具体信息见附录。

## 2.2. 多级密度聚类与分子体积筛选

为了解决对高密度标记数据带来的抗体分子交联导致的团块融合现象, 我们采用了 Jasmin K. Pape 和 Till Stephan 提出的三步 DBSCAN 聚类方法[8], 如图 2 所示。该方法在参考文献[8]中已经经过模拟验证, 其中正确识别的分子比例(>90%), 识别的分子中真实分子的比例(>85%), 识别位置与真实位置的平均距离(<2.5 nm)。同时结合电子断层扫描(ET)进行生物学验证, 双重验证确保该方法的可重复性。

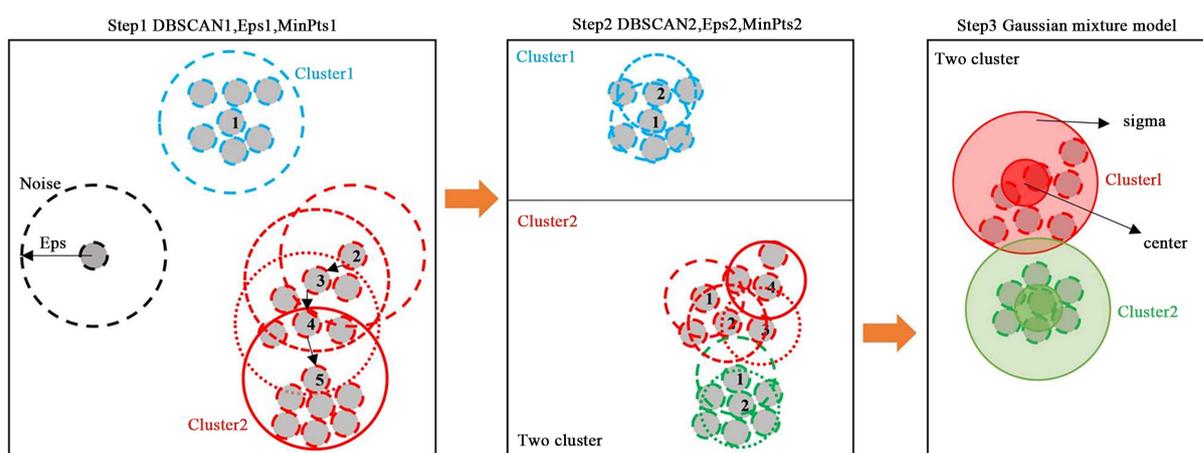


Figure 2. Schematic diagram illustrating the working principle of the three-step DBSCAN clustering algorithm [9]

图 2. 三步 DBSCAN 聚类算法的工作原理示意图[9]

对于单分子定位数据, DBSCAN 的 eps 参数的设置主要取决于 MINFLUX 定位精度和分子间距, minPts 参数的设置主要基于单分子定位次数和噪声水平。

MINFLUX 测得单分子定位的三维标准差  $\sigma_x = \sigma_y = \sigma_z \approx 3 \sim 6$  nm, 对于三维各向同性定位误差, 总误差为:  $\sigma_{total} = \sqrt{\sigma_x^2 + \sigma_y^2 + \sigma_z^2} \approx 5.2$  nm (若  $\sigma_x = \sigma_y = \sigma_z = 3$  nm)。实验中分子密度为  $\rho = 10000 \mu\text{m}^3$  (即每立方微米约 10,000 个分子), 平均分子间距  $d_{avg} = \sqrt{\frac{1}{\rho}} \approx 46.4$  nm。为避免邻近分子簇的误合并, eps 的上限被严格限制为  $d_{avg}$  的一半就是 23 nm; 同时结合 MINFLUX 系统的三维定位精度, 将 eps 的下限设为 5 nm, 确保单分子因定位误差产生的多次测量点能够被有效聚合。

基于这一物理约束框架, 在初始去噪阶段, eps 被设定为 10 nm (约为平均间距的 1/4.5), 覆盖 MINFLUX 定位误差上限(5 nm)的 2 倍范围, 既能滤除孤立噪声点(噪声密度  $< 400/\mu\text{m}^3$ ), 又可保留潜在的分子簇信号; 在后续细化阶段, eps 进一步缩小至 6 nm (约为平均间距的 1/7.5), 通过捕捉局部密度梯度差异, 分离密集亚簇结构(如抗体交联形成的二聚体), 将空间分辨率进一步提升。

结合 MINFLUX 单分子平均定位次数(10 次/分子, 对应 20,000~30,000 光子)与背景噪声的统计特性, 在去噪阶段设定 minPts = 4, 细化阶段维持相同阈值 minPts = 4, 避免因多次定位信号分割导致的分子完整性损失。

高斯混合模型(GMM)将 DBSCAN 次级聚类结果直接映射为高斯分量, 分量数由局部密度自适应确

定, 无需参数优化。高斯核的协方差矩阵宽度设定为  $\sigma_{\text{GMM}} = 5 \text{ nm}$ , 匹配 MINFLUX 系统的三维定位精度 (3~6 nm), 完整覆盖单分子多次定位点的扩散范围。

本实验严格复现了三步 DBSCAN 聚类方法的参数配置与处理流程。首先进行初级粗分割( $\text{eps} = 10 \text{ nm}$ ,  $\text{minPts} = 4$ )。这一步用较大搜索半径执行 DBSCAN, 通过密度阈值筛选初步识别潜在荧光团, 同时剔除稀疏噪声点。此步骤通过预分配定位点, 为后续精细化处理提供高质量候选集。在第二步中, 算法对第一步中识别出的分子进行进一步聚类( $\text{eps} = 6 \text{ nm}$ ,  $\text{minPts} = 4$ )。在初级分割基础上, 缩小搜索半径对候选分子进行二次聚类, 解决密集区域的误合并问题。该步骤利用局部密度梯度差异, 分离因抗体交联形成的融合团块, 提升亚结构分辨率。最后引入高斯模型优化。针对次级聚类结果, 引入高斯混合模型(GMM)对定位点云进行概率建模。其中高斯分量的数量  $M$  值等于 DBSCAN 第二步识别出的簇的数量, 同时  $\sigma_{\text{GMM}}$  设为  $5 \text{ nm}$ 。基于单分子定位点的高斯分布特性[10], 再通过最大化似然估计将定位点精确分配给特定分子。此步骤突破了传统密度聚类对规则形状的依赖性, 有效解析非球形或不规则分布的纳米团块, 实现亚纳米级精度的分子归属。最终输出结果满足单分子体积约束(直径  $\leq 25 \text{ nm}$ ), 小于标准二抗荧光分子大小。

### 2.3. 空间能量约束与寡聚态判别

针对突触后蛋白在三维空间中的寡聚态分析与纳米域边界界定问题, 本研究提出一种多尺度空间约束判别框架, 结合几何特征与统计能量模型, 实现蛋白质聚集状态的定量解析。对于不同蛋白类型, 采用差异化策略: 1) CaMKII-T286 寡聚体判定: 基于单分子定位点云, 计算聚团质心间的最近邻距离分布, 设定阈值  $d_{\text{NN}} \leq 40 \text{ nm}$  界定寡聚态(二聚体及以上), 且该阈值匹配其已知的磷酸化位点空间耦合特征。2) PSD95 纳米域边界提取: 先通过已有 DBSCAN 聚类参数对 PSD95 纳米簇识别的参数( $\text{eps} = 75 \text{ nm}$ ,  $\text{minPts} = 20$ ) [11], 结合二抗体积约束(直径  $\approx 25 \text{ nm}$ )过滤异常簇, 确保单分子对应性。然后利用能量密度建模。以团块质心为核心, 统计半径  $R = 150 \text{ nm}$  内的分子密度分布, 构建归一化能量密度函数。最后通过密度梯度阈值( $\nabla\rho > 2 \times 10^{-7} \text{ nm}^{-1}$ )精确划分纳米域边缘, 量化团块的空间聚集强度与分布特征。该方法通过整合几何约束与统计能量模型, 实现了突触后蛋白寡聚态(单体/多态)与纳米域形态(致密/弥散)的多参数解析, 为研究突触可塑性的分子机制提供了三维空间定量分析工具。

### 2.4. 曲面拟合映射与表面重建

为实现突触后膜曲面的高精度三维重建及纳米簇拓扑特征提取, 本研究提出一种融合多项式曲面拟合与几何拓扑分析的计算框架。首先基于 PSD95 团块质心空间坐标, 采用三维三次多项式回归模型 (poly33) 突触后膜曲面进行高阶拟合, 量化局部曲率特征。在此基础上, 经过上一步 DBSCAN 聚类分析识别出的 PSD95 纳米簇团块, 结合 AlphaShape ( $\alpha = 1$ ) 曲面映射算法构建非均匀三角网格表面, 进一步利用 AlphaShape 函数生成拓扑三角形网络, 实现突触后膜曲面的亚纳米级几何重构。进一步, 基于 Delaunay 三角剖分原理提取纳米簇间的连接关系, 并通过 trisurf 函数可视化其三维形态特征。该方法通过融合几何建模与拓扑分析方法, 突破传统平面投影的局限, 可精准表征突触后膜的非均匀曲率分布(拟合残差  $R^2 = 0.75 \pm 0.03$ ), 同时解析纳米簇间的三维拓扑参数(如最近邻距离), 为突触纳米域的空间构效关系研究提供了高精度曲面建模工具。

### 2.5. 共定位定量与空间关联分析

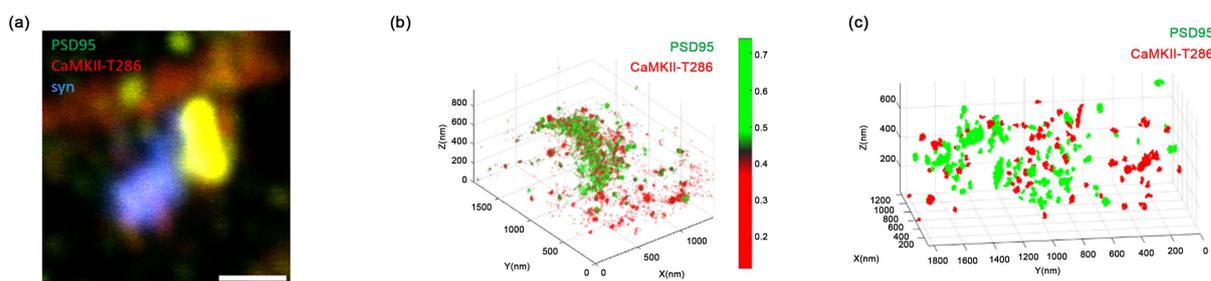
在基于前面聚类分析分离荧光团和突触后表面重构的结果, 本研究建立了基于多尺度距离阈值的共定位定量体系, 以纳米级精度解析蛋白质动态相互作用。具体而言, 首先从荧光团聚类分析中提取各质

心的三维空间坐标, 随后针对每个质心计算其到其他质心的最小欧氏距离, 定义为最近邻距离; 通过对所有质心的最近邻距离进行统计分析(如均值、标准差), 建立动态阈值判定标准: 基于抗体结合长度与膜波动特征[11], 设定 CaMKII-T286 与 PSD95 膜面结合态的距离阈值为 $\leq 75$  nm; 而依据 PSD95 跨膜结构域的空间特性, 将其成膜态阈值定义为 $\leq 50$  nm。该方法通过量化蛋白质质心间的空间邻近性, 不仅精准捕捉了 CaMKII-T286 与 PSD95 的相互作用, 还揭示了二者在突触后膜上的分布规律, 为纳米尺度共定位研究提供了高分辨率的定量框架。

### 3. 结果

本研究构建的改进聚类算法的纳米结构解析体系实现了从原始 MINFLUX 点云到三维生物结构建模的一系列处理。如图 3(a)、图 3(b)所示, 在共聚焦共定位成像的基础上, MINFLUX 以其单分子定位成像的属性, 能够定量分析成像结果图中的荧光簇数量和位置信息[10], 从而评估 CaMKII-T286 和 PSD95 蛋白质分子在突触后位置的数量信息和空间分布情况。

经分色、去噪与三步聚类分割处理后, 对 CaMKII-T286 和 PSD95 在突触后荧光簇数量进行具体统计, 结果如图 3(c)所示。CaMKII-T286 荧光聚团主要以单体形式存在, 分布在突触后的各个区域, 没有显著的聚集情况, 而 PSD95 的荧光聚团出现小范围集中, 形成少量小型离散的荧光团簇。



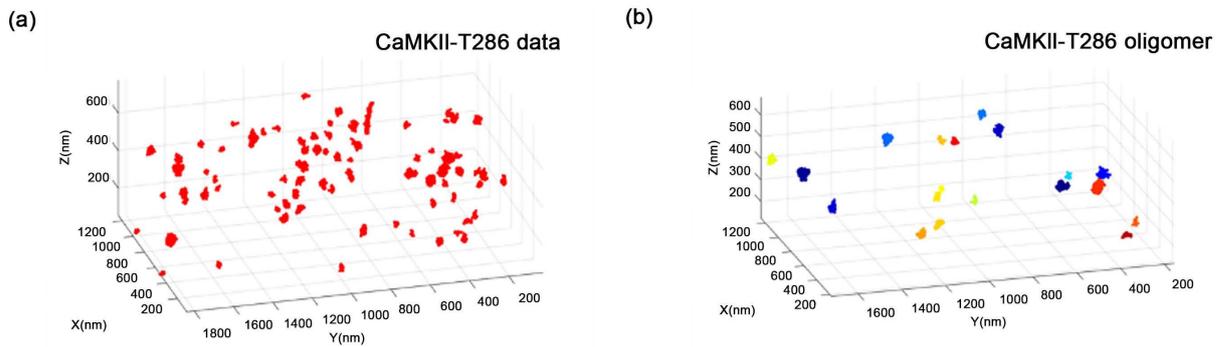
**Figure 3.** MINFLUX dual-color imaging data processing results of CaMKII and PSD95 on dendritic spines. (a) Confocal tricolor imaging of CaMKII and PSD95 at the postsynaptic site. Scale bar: 2  $\mu\text{m}$ ; (b) Super-resolution imaging of CaMKII and PSD95 at the postsynaptic site after separation; (c) Super-resolution imaging of CaMKII and PSD95 after three-step DBSCAN clustering segmentation

**图 3.** 树突棘上 CaMKII 和 PSD95 的 MINFLUX 双色成像数据的分色、去噪声和聚类分割后结果。(a) CaMKII 和 PSD95 在突触后位置的共聚焦三色成像, 比例尺为 2  $\mu\text{m}$ ; (b) CaMKII 和 PSD95 在突触后共定位位点分色后的超分辨成像; (c) CaMKII 和 PSD95 经三步 DBSCAN 聚类分割后的超分辨成像

在神经元突触后区域, CaMKII 激酶通过 Thr286 位点的自磷酸化获得持续活性这一现象, 对其信号传递功能具有关键调控作用[12]。磷酸化过程不仅延长激酶活性周期, 还可能促使多个 CaMKII 单体通过寡聚化组装成稳定的纳米级信号复合体[13]。利用 MINFLUX 超分辨成像技术这一处理在神经元突触后位置 CaMKII-T286 的寡聚化事件可视化, 并通过数据分析后精确揭示了该过程在突触后空间的实际发生比例与结构特征, 结果如图 4 所示。

经过数据定量分析后可以得到, 突触后区域的 CaMKII-T286 仍以单分子形式为主导, 占比为 64.9% (如图 4(a)), 而寡聚化总体发生率约为 35.1% (如图 4(b))。但在形成寡聚体的群体中, 二聚体占据显著优势(63.9%), 其分子间距稳定在 40 nm 范围, 显示出特异的结合位点选择。

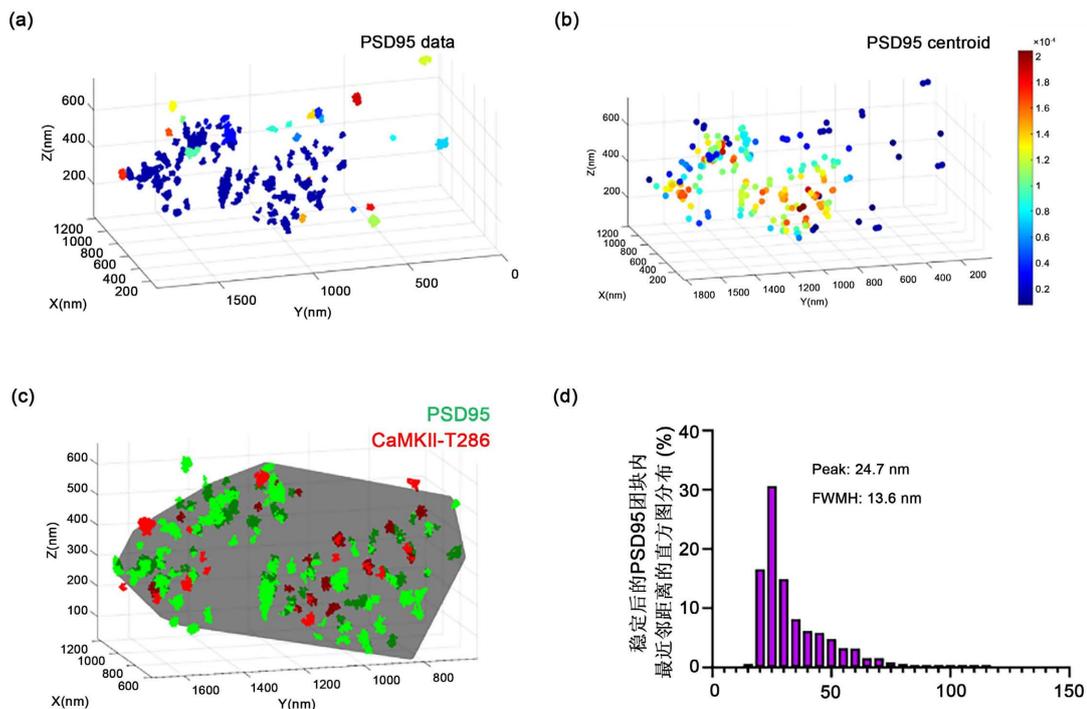
在解析突触后纳米级结构的机制研究中, PSD95 蛋白的团块整合特性成为关键切入点。经过 DBSCAN 聚类算法和能量密度分布联合分析(图 5(a)、图 5(b)), 我们发现图 3(c)中, 原本离散的小型 PSD95 荧光团簇在突触后区域呈现向连续表面整合的倾向——其空间分布密度梯度与突触后膜曲率高度耦合, 呈现有



**Figure 4.** Oligomerization state of CaMKII-T286 analyzed by the nearest neighbor analysis. (a) Original clusters of CaMKII-T286; (b) Oligomeric clusters of CaMKII. Colors in the figure indicate different oligomer categories

**图 4.** CaMKII-T286 经最近邻分析的寡聚态结果。(a) CaMKII-T286 原始聚团; (b) CaMKII 的寡聚体聚团, 图中颜色表示不同寡聚体类别

重组上膜的趋势。进一步通过三维点云重构技术对突触后表面亚结构进行空间建模, 精准定位 PSD95 团块的分布特征, 并验证并量化了 PSD95 团块的立体分布特征[14]。重构结果显示(图 5(c)), PSD95 单体在团块内并非随机堆积, 而是形成具有周期性规律的拓扑网状结构——最近邻距离分布呈现单峰窄带特征(半峰宽 15.6 nm), 峰值间距稳定在 30.6 nm (图 5(d))。这种高度有序的空间排布展现出明确的几何特征, 为 CaMKII 等酶分子提供了精确的锚定参照系。而高精度突触后表面模型的重构, 为分析 CaMKII-T286 与 PSD95 的共定位关系及其功能关联提供了空间基准[15]。



**Figure 5.** Post-synaptic surface reconstruction based on PSD95 clusters. (a) Clustering results of PSD95 clusters; (b) Energy density distribution of PSD95 clusters; (c) Co-localization of CaMKII-T286 and PSD95 at the post-synaptic site; (d) Histogram of nearest neighbor distances within PSD95 nano-clusters

**图 5.** 基于 PSD95 团块的突触后表面重构。(a) PSD95 聚团的聚类结果; (b) PSD95 聚团的能量密度分布图; (c) CaMKII-T286 与 PSD95 在突触后共定位显示; (d) PSD95 纳米簇内部的最近邻距离的直方图分布

结合上述 CaMKII-T286 寡聚体的分析结果显示, 磷酸化后的 CaMKII-T286 寡聚体呈现的离散簇状结构, 其空间分布与突触后致密区的 PSD95 团块存在显著空间重叠。值得注意的是, 这些寡聚体并非随机分布, 而是倾向于在 PSD95 团块边缘排列。这种纳米级的对应关系表明, PSD95 的周期性网状结构可能通过预设的几何排布模式, 引导 CaMKII-T286 分子在特定节点形成信号传递的定向通路。该发现不仅揭示了 PSD95 蛋白在突触后信号网络中的动态重组功能, 更为解析突触可塑性过程中 PSD95 与 CaMKII-T286 的协同作用机制提供了新的视角: PSD95 的拓扑结构可能通过空间限制作用调控 CaMKII-T286 寡聚体的结合位置, 从而影响突触强度的动态调节。

## 4. 讨论

本研究建立的 MINFLUX 成像计算框架成功揭示了 PSD95 纳米团簇的网状拓扑特征及其与 CaMKII-T286 寡聚体的空间互作关系。这些静态结构特征为理解突触后致密区的纳米组织架构提供了重要基准, 但同时也凸显出现有超分辨技术在动态过程解析中的局限性。

生物分子的功能实现是分子间相互作用的结果, 其本质上是动态过程。CaMKII-T286 的磷酸化激活、寡聚体组装及其与 PSD95 的互作均伴随突触可塑性发生毫秒至分钟级的时空变化[16]。MINFLUX 静态超分辨成像技术虽能捕捉蛋白分子的结构细节, 却模糊了分子活动的“动作轨迹”。

为此, 未来研究将重点拓展 MINFLUX 的活细胞成像的动态追踪能力[17]: 通过集成自适应聚类参数调整系统与隐马尔可夫模型(Hidden Markov Model, HMM), 构建面向活细胞动态过程的分析框架。自适应模型可依据实时荧光信号强度与分子运动速率, 动态优化激光功率, 避免活细胞成像中的光毒性干扰。结合 HMM 模型, 可对寡聚体的瞬态组装事件(如二聚体形成/解离)进行概率化建模, 从而区分随机波动与功能性构象变化。这种动态分析框架与本研究已开发的静态突触后表面特征提取模块形成互补: 前者捕捉时间维度上的分子行为异质性, 后者保障空间维度上的纳米级结构解析。基于 MINFLUX 技术, 二者的协同将实现“时空高分辨”(空间分辨率  $\leq 3$  nm, 高时间分辨率  $\leq 10$  ms)的活细胞成像, 有望揭示 PSD95 拓扑框架引导 CaMKII 寡聚体定向组装的动态机制, 例如突触强化过程中二者纳米级排列模式的同步重构规律。这一技术路线的推进, 不仅可突破当前静态成像对功能机制解释的局限性, 更将为建立突触可塑性的多尺度动力学模型提供关键实验证据。

## 5. 结论

本研究基于 MINFLUX 固定细胞成像数据构建改进的 DBSCAN 聚类与曲面重构算法在 MINFLUX 数据中实现了突触后致密区(PSD)纳米级信号复合体的空间排布规律, 揭示了 PSD95 的网状拓扑框架与 CaMKII-T286 寡聚体的定位耦合可视化。未来的研究可以结合 MINFLUX 的动态追踪, 探索更多突触相关蛋白的动态相互作用机制, 为突触可塑性机制研究提供更全面的视角和方法。

## 参考文献

- [1] Daly, S., Ferreira Fernandes, J., Bruggeman, E., Handa, A., Peters, R., Benaissa, S., *et al.* (2024) High-Density Volumetric Super-Resolution Microscopy. *Nature Communications*, **15**, Article No. 1940. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45828-5>
- [2] Li, Y.Z., Li, C.K., Hao, X., Liu, X. and Kuang, C.F. (2020) Review and Prospect for Single Molecule Localization Microscopy. *Laser & Optoelectronics Progress*, **57**, Article ID: 240002. <https://doi.org/10.3788/lop57.240002>
- [3] 林婉妮, 金璐红, 许迎科. 超分辨显微成像中荧光单分子定位算法的研究进展[J]. 中国生物医学工程学报, 2020, 39(2): 229-237.
- [4] 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>

- 
- [5] Prakash, K. (2022) At the Molecular Resolution with Minflux? *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, **380**, Article ID: 20200145. <https://doi.org/10.1098/rsta.2020.0145>
- [6] Liu, S., Hoess, P. and Ries, J. (2022) Super-resolution Microscopy for Structural Cell Biology. *Annual Review of Biophysics*, **51**, 301-326. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-102521-112912>
- [7] 林昭珺, 常桓栎, 李依明. 高通量单分子定位显微成像技术进展(特邀) [J]. 激光与光电子学进展, 2024, 61(6): 72-86. <https://doi.org/10.3788/lop232570>
- [8] Pape, J.K., Stephan, T., Balzarotti, F., Büchner, R., Lange, F., Riedel, D., *et al.* (2020) Multicolor 3D MINFLUX Nanoscopy of Mitochondrial MICOS Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **117**, 20607-20614. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009364117>
- [9] Yang, Y. (2025) Research Progress of Data Analysis Methods for Single Molecule Localization Microscopy. *Operations Research and Fuzziology*, **15**, 613-636. <https://doi.org/10.12677/orf.2025.151055>
- [10] 杨建宇, 董浩, 邢福临, 等. 单分子定位超分辨成像技术进展及应用[J]. 激光与光电子学进展, 2021, 58(12): 1-35. <https://doi.org/10.3788/lop202158.1200001>
- [11] Gürth, C.M., Do Rego Barros Fernandes Lima, M.A., Palacios, V.M., *et al.* (2023) Neuronal Activity Modulates the Incorporation of Newly Translated PSD-95 into a Robust Structure as Revealed by STED and MINFLUX. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.10.18.562700>
- [12] Coultrap, S.J. and Bayer, K.U. (2012) Camkii Regulation in Information Processing and Storage. *Trends in Neurosciences*, **35**, 607-618. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.05.003>
- [13] Leung, K. and Hinkle, P. (1975) Reconstitution of Ion Transport and Respiratory Control in Vesicles Formed from Reduced Coenzyme Q-Cytochrome C Reductase and Phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, **250**, 8467-8471. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)40782-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)40782-5)
- [14] Chen, X., Winters, C., Azzam, R., Li, X., Galbraith, J.A., Leapman, R.D., *et al.* (2008) Organization of the Core Structure of the Postsynaptic Density. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 4453-4458. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800897105>
- [15] Taft, C.E. and Turrigiano, G.G. (2014) PSD-95 Promotes the Stabilization of Young Synaptic Contacts. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **369**, Article ID: 20130134. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0134>
- [16] Bin Ibrahim, M.Z., Benoy, A. and Sajikumar, S. (2021) Long-Term Plasticity in the Hippocampus: Maintaining within and 'Tagging' between Synapses. *The FEBS Journal*, **289**, 2176-2201. <https://doi.org/10.1111/febs.16065>
- [17] Schmidt, R., Weihs, T., Wurm, C.A., Jansen, I., Rehman, J., Sahl, S.J., *et al.* (2021) MINFLUX Nanometer-Scale 3D Imaging and Microsecond-Range Tracking on a Common Fluorescence Microscope. *Nature Communications*, **12**, Article No. 1478. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21652-z>
- [18] Cramer, T.M.L. and Tyagarajan, S.K. (2024) Protocol for the Culturing of Primary Hippocampal Mouse Neurons for Functional *in Vitro* Studies. *STAR Protocols*, **5**, Article ID: 102991. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2024.102991>

## 附录

### 1) 细胞培养与转染

原代皮层神经元的培养按照已建立的方案进行[18], 略有修改。首先选择怀孕两周的孕鼠, 对其解剖取出胎鼠放入 0°C, 含有 2% HEPES (Gibco) 的 HBSS (Gibco) 缓冲液中, 并快速剥离出胎鼠的大脑皮层组织。随后使用 0.125% 胰蛋白酶和 0.05% DNA 酶(Sigma)在 37°C 下消化 10 分钟。消化完成后, 离心收集组织沉淀, 弃上清并用预神经元培养基(PM, 含 10% FBS (EX Cell)、1% GlutaMAX (Gibco) 和 1% 青霉素 - 链霉素(Gibco) 的 Neurobasal 培养基(Gibco))终止消化。轻柔吹打组织至均匀悬液后, 以 20 万细胞/mL 的密度接种于 12 孔板(Corning)中的 18 mm 盖玻片(Assistent)上。盖玻片预先用 0.1 mg/mL 多聚赖氨酸(PDL, Sigma)和 1  $\mu$ g/mL 层粘连蛋白(Laminin, Corning)包被 4 小时以上。接种 4 小时后, 完全更换为神经元维持培养基(NM, 含 2% B27 (Gibco)、1% GlutaMAX 和 1% 青霉素 - 链霉素的 Neurobasal 培养基), 并将培养物置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。在体外培养第 5 天(DIV-5)时, 更换 50% 培养基为新鲜 NM 培养基, 并加入重组腺相关病毒 rAAV-hsyn-mGFP-T2A-Synaptophysin-mRuby-WPRE-hGHpA(BraInVTA)用于基因过表达, 此后的每 4 天更换一次培养基以维持神经元生长。

### 2) 化学性 LTP 的诱导

在体外培养 10~14 天(DIV 10~14)的神经元样品处理流程如下: 将生长在 12 孔板盖玻片上的神经元转移至无 Mg<sup>2+</sup> 的神经元培养基中, 该培养基包含 150 mM NaCl、3 mM KCl、3 mM CaCl<sub>2</sub>、10 mM HEPES、5 mM 葡萄糖、0.5  $\mu$ M 河豚毒素(TTX)、1  $\mu$ M 土的宁(strychnine)和 20  $\mu$ M 双环醇甲酯(bicuculline methiodide, 均购自 Sigma), 在室温条件下孵育 10 分钟, 使神经元活动恢复至基线状态。随后, 在相同无 Mg<sup>2+</sup> 培养基中加入 100  $\mu$ M 甘氨酸(Sigma)刺激 5 分钟, 以模拟长时程增强(LTP)的诱导过程。甘氨酸刺激结束后, 将盖玻片转移回原始无 Mg<sup>2+</sup> 培养基中, 分别在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续孵育 30 分钟和 12 小时, 以模拟 LTP 的中期和后期阶段。最后, 对样品进行免疫荧光染色和显微成像分析。

### 3) 免疫组化与荧光标记

神经元固定与免疫染色步骤如下: 首先, 将待固定的神经元样品置于预冷至 -20°C 的甲醇中固定 5 分钟, 随后使用 1  $\times$  PBS 缓冲液清洗 3 次, 每次 5 分钟。接着, 用含 0.3% Triton-X100 的 PBS 溶液对细胞进行透化处理 5 分钟, 以增强抗体的渗透性。为减少非特异性结合, 样品在含 5% BSA 的 PBS 封闭液中室温封闭 25 分钟。

免疫染色过程包括: 将样品与特异性一抗(Anti-CaMKII (phospho T286)抗体和重组 Anti-PSD95 抗体, 均来自 abcam)在 4°C 条件下孵育过夜, 一抗使用 5% BSA/PBS 溶液稀释。次日, 使用相应的荧光标记二抗(Abberior FLUX 640 和 FLUX 680)室温避光孵育 40 分钟, 随后用 1  $\times$  PBS 清洗 3 次, 每次 5 分钟。为进行超分辨率成像, 在样品表面均匀分散纳米金颗粒作为定位标记。待样品自然干燥后, 配制含有光开关荧光分子的成像缓冲液, 并完成封片处理, 以备后续的超分辨率显微成像分析。

### 4) 共聚焦以及 MINFLUX 成像装置

MINFLUX 超分辨率成像实验在 Abberior 3D MINFLUX 系统(Abberior Instruments GmbH)上完成。该成像系统以 Olympus IX83 电动倒置显微镜为平台, 配备多波长激光光源系统, 包括 640 nm、561 nm、485 nm 和 405 nm 激发激光, 以及用于实时样品稳定的 975 nm 红外激光定位系统[4]。荧光信号的检测通过两个高灵敏度雪崩光电二极管(APD)探测器实现, 分别设置 650~685 nm 和 685~720 nm 两个光谱检测窗口, 以实现多通道荧光信号的同步采集与精确定位。