

细胞内单颗粒示踪技术的进展

王德江^{1#}, 狄香君^{1#}, 王宝明¹, 王帆¹, 郭智勇², 金大勇^{1*}

(1. 悉尼科技大学 生物医学材料及仪器研究所, 澳大利亚 悉尼 2007;

2. 西南石油大学 机电工程学院, 四川 成都 610500)

摘要:单颗粒示踪(Single particle tracking, SPT)技术是应用显微镜系统对细胞内单个特定荧光或散射颗粒的定位和追踪。由于 SPT 能够实时监控活细胞内复杂、高度动态的组织结构的变化并提供结构—功能间的动力学关系,因此在细胞生物学上有重要的应用。本文总结了 SPT 的机理以及在细胞上的应用,首先介绍了 SPT 的动力学原理,包括单颗粒定位,轨道重建以及轨道分析,然后总结了 SPT 技术现阶段重点发展的光学材料及仪器,最后阐述了 SPT 在细胞膜、细胞内信号通路、分子转运机制、遗传信息表达以及病毒感染机制的应用。此外,本文还对 SPT 技术未来的发展进行了展望。

关键词:单颗粒示踪技术;细胞;动力学原理;光学材料及仪器

中图分类号:Q631; O439 **文献标识码:**A **doi:**10.3788/CO.20181103.0281

Advances in single particle tracking in living cells

WANG De-jiang^{1#}, DI Xiang-jun^{1#}, WANG Bao-ming¹, WANG Fan¹, GUO Zhi-yong², JIN Da-yong^{1*}

(1. *Institute for Biomedical Materials and Devices (IBMD), Faculty of Science, University of Technology Sydney, NSW 2007, Australia;*

2. *School of Mechatronic Engineering, Southwest Petroleum University, Chengdu 610500, China)*

corresponding author, E-mail: dayong.jin@uts.edu.au

#these authors contributed equally to this work

Abstract: Single particle tracking (SPT) technique locates and tracks individual fluorescent or scattering particles within a cell with the help of microscope system. Based on the ability of real-time monitoring of the complex and highly dynamic changes in tissue structure within living cells and the ability to provide dynamic relationships between structure and function, SPT has important applications in cell biology. In this review, the mechanism of SPT and its application on cells are summarized. Firstly, the dynamics of SPT are introduced, including single particle localization, trajectory reconstruction and analysis. Then the optical materials and instruments that SPT technology focuses on at the present stage are described. Finally, the application of SPT in cell membrane, intracellular signaling pathway, molecular transport mechanism, genetic information expression, and viral infection mechanism are proposed. In addition, the advance of SPT technology are prospected

in this paper.

Key words: SPT technology; cell; dynamics; optical materials and instruments

1 引言

细胞是生物体基本的结构和组成单位,了解细胞功能复杂性首先要清楚细胞内分子和颗粒的动力学特征。在活细胞中,分子和颗粒的运动具有时空多样性,因此要分析它们的具体特征需要对其进行高时空分辨率的长时间追踪。在过去的 30 多年里,各种各样的技术被用于探究细胞内分子和颗粒的动力学特征,其中,光漂白后的恢复技术 (Fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)^[1-2] 和荧光相关光谱技术 (Fluorescence correlation spectroscopy, FCS)^[3-4] 被人们广泛使用。FRAP 技术是将荧光标签与靶分子偶联,然后用强激光束小范围内照射带有标签的分子,被激光束照射的部分会发生荧光漂白现象,当激光照射停止后,该范围内的荧光强度被记录下来,而周围环境中的荧光分子由于布朗运动会扩散至漂白区域,通过计算该区域内随时间而变化的荧光强度,可以得到靶分子的扩散速率^[5]。FRAP 可以用于探究细胞膜上蛋白质的运动^[1] 和细胞内蛋白质的动力学^[2]。而 FCS 则是通过测定由于粒子进出微小的检测体积而造成的荧光信号的涨落来获取粒子的动态参数,如扩散系数,以及通过 Stokes-Einstein 方程计算分析物浓度,流体力学半径^[6-7]。FCS 也可以用于活细胞内的动力学研究^[3-4]。尽管 FRAP 和 FCS 可以实时的监测活细胞内快速的动态过程(时间分辨率小于毫秒),但是空间分辨率存在衍射极限的限制。此外,FRAP 和 FCS 只能提供分子的平均信息,不具有功能上的异质性。

另一种既具有高时间分辨率也能达到高空间分辨率的方法是单颗粒示踪技术 (Single Particle Tracking, SPT)。利用 SPT 技术,研究人员可以获得 FRAP 和 FCS 不具备的信息,因为 SPT 是在纳米精度上精确地定位每个单独的颗粒,并测量其个体动力学作为时间的函数,而不是在一定时间内整体的平均水平。SPT 技术起源于 20 世纪 80

年代,Brabander 课题组第一次在活细胞内观察到大小为 40 nm 的胶体金颗粒^[8-9]。将胶体金颗粒附着于靶分子上,借助具有视频功能的微分干涉差显微镜,通过连续记录获得颗粒中心的空间坐标。该方法比较简单,常用来追踪细胞膜上分子或颗粒的动态过程^[10]。但是金颗粒尺寸比较大,常常会影响细胞内生物分子正常的生理功能。1993 年,关于荧光显微镜的研究取得重大突破:可以在室温条件下检测单分子^[11],该技术推动了 SPT 的发展,荧光分子和荧光蛋白逐渐作为 SPT 的分子标签^[12-13]。1996 年,使用有机染料作为荧光标签,可以在合成膜上观察脂质的运动^[14]。2000 年,能够在活细胞内观察到信号受体和脂质的运动^[12,15]。2003 年,Dahan 第一次使用量子点 (QDs) 作为荧光标签,在活细胞膜上追踪单个甘氨酸受体的扩散过程^[16]。自此,量子点广泛用于 SPT 技术,例如细胞膜以及细胞内动态过程的追踪^[17-20],最近也用于脑切片中分子表面动力学的研究^[21]。在 SPT 中,QDs 是使用最广泛的荧光标签,近些年也有其他几种荧光标签兴起,例如,2011 年,Sang Hwan Nam 第一次在活细胞内追踪上转换纳米颗粒 (UCNPs) 的内吞过程,时间长达 6 h^[22]。

尽管 SPT 技术发展迅速,可以在活细胞内监测许多生物分子的动态行为,例如细胞内分子马达的运动^[23-24];细胞膜上分子的内吞机制^[25]等,这些发现帮助我们了解活细胞内生物分子的时空分布。但是,大多数都是有关细胞膜的研究,对于细胞内狭窄区域或者是更复杂的分子环境(例如细胞核,组织)则很难追踪,因此,研究人员也在算法,光学技术以及光学材料方面不断优化 SPT 技术,从而获得更多的生物信息。

本文主要介绍 SPT 技术动力学原理和其在活细胞内的应用,首先介绍了 SPT 技术的基础知识,包括单颗粒的定位,运动轨迹的重建以及数据分析,重点介绍了光学材料、显微镜的种类以及优缺点,然后分析了 SPT 在细胞内不同结构病毒上的应用,最后给出 SPT 未来可能的发展方向。

2 SPT 技术

2.1 动力学原理

2.1.1 运动轨迹重建

对 SPT 数据进行分析最主要的目的就是获得单个粒子的运动轨迹,进而通过对轨迹分析获得相应的生物信息,因此当高速摄像机采集到一系列连续的图像后,需要对每一帧图像中的颗粒进行定位,从而重建运动轨迹(图 1)。

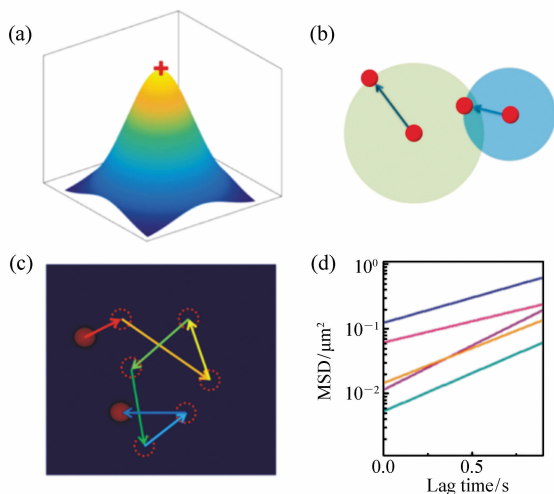


图 1 SPT 轨迹重建示意图^[27]。(a)借助 PSF 确定颗粒的位置;(b)只和邻近的点进行连接;(c)按照时间顺序连接形成一个轨迹;(d)对轨迹进行数据分析,提取出动力学信息

Fig. 1 Schematic representation of SPT^[27]. (a) Particles are localized by finding the central locations of their point spread functions; (b) localizations belonging to the same particle at different times are connected using algorithms such as nearest neighbor; (c) chronological series of linked localizations form a time series trajectory; (d) dynamic information is extracted based on a statistical analysis of the trajectories

目前常用的定位方法大多是通过点扩散函数(Point spread function, PSF)进行定位^[26],公式如下:

$$\text{PSF}(r) = \left(\frac{2J_1\left(\frac{2\pi NA r}{\lambda}\right)}{r} \right)^2, \quad (1)$$

式中, r 是点扩散函数 PSF 中心的距离, J_1 是一级

贝塞尔函数, λ 是入射光的波长, NA 代表数值孔径。在此基础上,有两种方法比较常用:质心法^[27]和高斯拟合法。质心法比较简单,直接计算选定区域的光斑强度,单次迭代,运算速度快,常用来追踪过程中即时的反馈,但是由于其边缘敏感性高,背景干扰多等因素,所以定位精确度较差。另一种方法是高斯拟和法^[28],常用的高斯曲线的公式:

$$I(x, y) \approx I_0 \exp\left[-\frac{(x-x_0)^2}{2\omega^2}\right] \cdot \exp\left[-\frac{(y-y_0)^2}{2\omega^2}\right], \quad (2)$$

式中, I_0 是光斑中心的强度, ω 是标准偏差,因此,光斑强度的分布可以很好的用高斯曲线拟合。该方法定位准确度高,常用于超分辨成像领域,缺点是计算过程中需要反复迭代,步骤繁琐,计算速度慢。

针对某一时间内连续的图像进行定位,可以得到多个点的精确位置,将各个点连接起来,可以得到该颗粒完整的运动轨迹。但是在连接点时存在一个问题:每个点都可以和多个点连接,常用的处理办法是只允许相邻的点进行连接^[29]。

2.1.2 运动轨迹分析

分子在细胞膜上的运动模式多种多样,有静止(Immobile)、正常扩散(Pure diffusion)、异常亚扩散(Anomalous subdiffusion)、局限性运动(Confined motion)以及定向运动(Directed motion)等多种类型。对运动轨迹进行分析可以清楚颗粒的运动模式并获得相关的运动参数,例如扩散系数,运动速度,异常扩散指数,围栏类型等。

最常用的一种数据分析方法是均方位移法(Mean square displacement, MSD)。MSD 指的是在整条轨迹内具有相同时间间隔的所有点对间距离的平均值^[28-30],因此我们可以借助 MSD 与时间间隔的依赖关系对运动模式进行分类,分类如下:

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt, \quad \text{正常扩散}, \quad (3)$$

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt^\alpha, \quad \text{异常扩散}, \quad (4)$$

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt + (Vt)^2, \quad \text{定向扩散}, \quad (5)$$

$$\langle r^2 \rangle \approx \langle r_c^2 \rangle \{ [1 - a_1 \exp(-4A_2Dt/\langle r_c^2 \rangle)] \}, \quad \text{围栏运动}, \quad (6)$$

式中, $\langle r^2 \rangle$ 是 MSD, t 是时间, D 是扩散系数, α 是

小于 l 的常数, V 是拟合得到的平均流速, $\langle r_c^2 \rangle$ 是围栏大小, A_1 、 A_2 是常数。

正常扩散 (Normal diffusion) 即为布朗运动, 扩散系数恒定不变, 我们可以根据公式 (3) 的斜率得到扩散系数 D ; 定向扩散模式 (Directed motion with diffusion) 是指细胞内物质沿细胞骨架的运动, 对应公式 (5), 将 MSD 作为时间的函数可以拟合得到一条二次函数曲线, 进而可以算出扩散系数 D 和流速 V ; 异常扩散模式 (Anomalous diffusion) 存在两种情况, 一种是颗粒受到阻碍而减速, 另外一种则是颗粒被捕获并发生相互作用, 如公式 (4), 大多数情况下 α 是在 0.2 ~ 0.9 之间, 此时属于异常亚扩散。对异常扩散的研究可以帮助我们了解细胞膜的结构。最后一种运动模式是围栏运动 (Corralled diffusion), 是颗粒在小范围区域内的运动 (公式 (6))。每种运动模式不是单独存在, 在一条轨迹中可能存在多种运动模式, 因此我们需要将轨迹拆分成几段, 每段单独进行 MSD 分析。

2.2 SPT 的光学材料

在 SPT 实验中, 针对单颗粒的光学检测仍然很困难, 我们需要从复杂的背景信号中找到靶分子的信号, 最直接的方法是将靶分子贴上标签。理想的标签又小又亮, 既能在光学显微镜下看得见又不影响靶分子的生理功能^[31-32]。

起初, SPT 使用的是散射标签, 例如: 乳胶微粒, 聚苯乙烯微粒, 二氧化硅微粒以及金颗粒^[33]。这些标签的优点是稳定, 既不存在光漂白现象, 也不存在生物降解, 散射面较大, 因此可以长时间监测单分子的运动 (时间尺度可以达到分钟级), 而且具有较高的时间分辨率 (帧速率可达到 40 kHz) 和空间分辨率 (1 ~ 10 nm)。然而, 由于标签的体积较大以及瑞利散射, 限制了它在生物领域的应用^[28]。

SPT 的另一类标签是荧光标签。有机荧光染料可能是最小的荧光标签, 直径在 1 nm 到 2 nm 之间, 可以对脂质、蛋白质、DNA 分子等进行荧光标记, 但是具有细胞毒性^[27]。荧光蛋白的尺寸略大于有机染料, 它可以通过基因编码的方式整合到生物分子上, 避免对生物分子进行化学修饰。然而, 荧光蛋白具有光闪性^[34]且稳定性差, 追踪

时间最多只有 1 s, 不能长时间观察细胞内生物分子的运动。另一个使用比较广泛的荧光标签是量子点 (Quantum Dots, QDs)^[16], 它是一种纳米级的半导体, 发出的波长可以随着尺寸改变而变化, 因而通过调节半导体的尺寸就可以控制其发出的光的颜色。与有机荧光染料与荧光蛋白相比, QDs 具有较好的光稳定性^[35], 可以对标记的分子长时间观察 (时间尺度长达几分钟), 而且具有宽的激发谱和窄的发射谱, 可以进行多色检测^[35]。QDs 的缺点是具有光闪性^[36], 大量存在无辐射的粒子^[36]以及潜在的毒性^[37], 因此研究人员也在努力寻找其他具有更好光学性能的标签。

近几年, 新兴起的标签正在逐渐引起人们的关注, 有碳量子点 (Carbon nanodots, CDs), 纳米钻石 (Nanodiamonds, NDs), 碳纳米管 (single-walled carbon nanotubes, SWNTs) 以及镧系掺杂的上转换纳米颗粒 (lanthanide ion doped upconverting nanoparticles, UCNPs)。CDs 是直径小于 10 nm 的碳纳米颗粒, 与传统的 QDs 相比, CDs 具有很多优点, 例如发光强度高, 水溶性好, 低毒, 抗漂白能力强, 因此 CDs 有很好的应用潜能^[38-39]。NDs 具有很高的光稳定性, 不存在光闪性和光漂白, 可用于细胞内长时间追踪 (长达几小时)^[40]。据报道, 在同等条件下激发, NDs 要比有机染料亮很多^[41]。然而, NDs 的激发波长是 488 nm 或 532 nm, 会对细胞造成光损伤而且组织穿透力较差^[22], 此外, 由于本身结构的问题, NDs 无法做特异性标记。相比之下, SWNTs 则更适用于细胞内成像, 因为它的激发和发射光谱都在近红外光谱区域, 但是 SWNTs 长达 100 nm 左右, 体积太大不适合做生物标签^[42-43]。UCNPs 因其独特的光学特性, 逐渐引起人们的关注。它被近红外光激发, 却发射可见光, 不具有光闪性和光漂白, 毒性低, 最重要的是近红外光激发不会引起细胞内的自发荧光, 也不会对细胞造成光损伤^[22, 44-45]。虽然与其他几种荧光材料相比, UCNPs 具有稳定的光学性能, 但是随着颗粒尺寸减小它的发光强度也会相应减弱, 因此研究人员也在尝试用不同的合成策略改善 UCNPs 的性质 (例如增大发光强度并缩小颗粒大小)^[46], 期望可以更好的用于生物领域。

SPT 的发展与标签库的丰富息息相关, 每种

标签都有优缺点以及适用的范围,研究人员应该根据研究对象,合理选择标签。

2.3 单分子判定原则

在 SPT 实验中,我们要追踪和分析的是细胞内单个分子的动力学行为,所以确保研究对象是单分子极其重要。依据分子标签和检测方式的不同,单分子判定原则也略有差别。有以下 3 个原则^[47]:

(1)被标记的靶分子在特定波长下发射荧光,而杂质的散射光波长范围很宽,可以通过更换不同的滤镜进行区分,在多个滤镜下均有信号的是杂质,反之,则为靶分子。

(2)对于 QDs,可以通过是否闪烁进行判断。如果是多个 QD 聚合在一起,荧光强度彼此互补,很难观察到闪烁现象。

(3)荧光分子存在光漂白现象,在发生光漂白之前,每个荧光团发射的光子数是一定的,可以统计每个光斑的光子数,如果数值与理论光子数一致,则说明是单分子。

满足的条件越多,则越能确定是单分子。目前,在判定单颗粒方面还存在一定的难度,科研人员也在尝试从多方面进行检验。

2.4 SPT 的光学系统

2.4.1 单分子宽场成像

由于常用荧光分子作标签,所以高灵敏度的检测器也是 SPT 成像装置的重要组成部分。最基本的检测器是宽场检测器(Wide-field detectors)^[48],多数是基于电荷耦合装置的照相机(CCD)。宽场检测可以提供分子的位置,轨迹,光谱等信息,既具有单分子检测的高灵敏优势,又具有操作简单,结果直观,实时监测的特点。按照照明方式的不同,主要可以分为落射式荧光成像,全内反射荧光成像和大入射角光学薄层照明成像。

2.4.1.1 落射式荧光成像

在常规荧光显微镜基础上安装高灵敏度的检测器,合适的滤镜和高数值孔径的物镜以后,即可以用于单分子检测。如(图 2(a)),一般情况下,激光束聚焦在物镜的后焦面上以便得到平行光束,可以在局部区域内穿透样品,然后将样品发射的荧光经滤镜过滤,最后用 CCD 检测。在 CCD

前面放置一个像增强器,即为 ICCD^[27],时间分辨率可以达到纳秒级别,但是量子效率很低(20%~50%)。其他比较灵敏的 CCD 有电子倍增 CCD(EMCCD)^[49]和科学型互补金属氧化物半导体(sCMOS)^[27],EMCCD 量子效率能够达到 90%以上,但是时间分辨率却远低于 ICCD,而 sCMOS 的量子效率是 70%,稍微低于 EMCCD,但是帧速很高,可以达到每秒几百帧。单光子雪崩光电二极管检测器(SPAD)是目前新兴的光子检测器,灵敏度极高,读出噪声为零,可以检测到极弱的信号,时间分辨率能够达到微秒级,非常适合活细胞内成像^[50]。

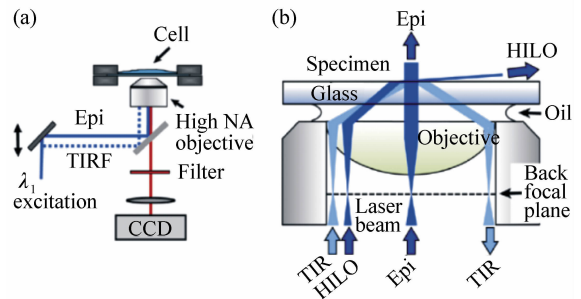


图 2 宽场成像的方法^[28]。(a) TIRF 或者 Epi 方法的简单装置图;(b)不同的照明方案,包括 Epi、TIRF 以及 HILO

Fig. 2 Different optical schemes for wide-field imaging^[28]. (a) Simplest implementation of Epi or TIRF mode; (b) different illumination schemes, including Epi, TIRF and HILO

2.4.1.2 全内反射荧光成像

对于活细胞内的 SPT 实验,大多数背景干扰来自于细胞的自发荧光,所以如何减少背景干扰是当务之急,最简单的方法就是减少照明。全内反射荧光(Total internal reflection fluorescence, TIRF)就是利用这一原理成像(图 2(b))。当激发光在玻璃-水界面处全反射后产生消逝波,消逝波成指数形式衰减,因此只有靠近全反射的样品区域才会产生荧光,观测深度通常在 200 nm 以内,避免了细胞内的自发荧光^[51]。TIRF 确保了高信噪比,并且由于基底细胞膜通常与玻璃表面接触,因此 TIRF 非常适合细胞膜的研究。然而,这也是该技术的局限,因为只有基底细胞表面和

质膜下方的细胞质区域才能被激发到。

2.4.1.3 大入射角光学薄层照明成像

大入射角光学薄层照明成像 (Highly Inclined and Laminated Optical Sheet, HILO) 可以观察到细胞内的不同区域^[52]。与全内反射荧光不同, HILO 是激光束以一个倾斜的薄层光束穿过样品中心 (图 2(b))。因为只有细胞内薄薄的一层被激光照射到, 因此在很大程度上减少了背景噪声, 但同时该方法也限制了其在细胞内检测的深度, 而且只能观察到样品的中心, 在样品的边缘处, 由于倾斜的激光束分别照在焦平面的上方和下方, 导致图像模糊。

2.4.2 共聚焦成像

传统的宽场荧光显微镜在观察细胞结构时可以达到亚微米级空间分辨率以及较好的时间分辨率, 但是无法规避掉焦平面外的荧光信号, 当对样品进行三维成像时, 会导致图像模糊。共聚焦显微镜解决了这个问题, 激光束经照明针孔形成点光源, 然后点光源对样品内焦平面的每一点进行扫描, 最后在探测针孔处成像, 有效的消除了焦平面以外的荧光 (图 3)。虽然这种方法在一定程度上提高了信噪比, 但是图像的重建需要对样品或者激发光进行扫描, 致使采集速率降低 (<10 帧/秒), 因此只适用于比较缓慢的动态分析。目前发展比较迅速的是转盘式共聚焦显微镜 (Spinning-disk confocal microscopy), 不仅保留了激光共聚焦的优点, 而且还可以对样品快速成像, 专门用来解决快速的动态检测问题, 与激光共聚

焦相比, 图像的采集速率可以提高一个数量级^[54-55]。

2.4.3 超分辨成像

光学显微镜的成像系统存在衍射限制, 即显微镜的分辨率具有物理极限, 为了获得更多细胞内的细节信息, 科研人员迫切需要超高分辨率的显微镜。发展最早的是受激发射损耗荧光显微镜 (Stimulated Emission Depletion Microscopy, STED), 一个典型的 STED 需要两束光, 一束为激发光, 一束为损耗光, 激发光照射使荧光分子被激发, 损耗光则使部分处于光斑外围的电子以受激发射的方式回到基态, 而位于光斑中心的电子仍以自发荧光的形式回到基态, 因此探测器只能收集来自光斑中心的光, 从而实现超高分辨率。2009 年, Schmidt 借助 STED 观察到线粒体嵴结构, 分辨率为 30 nm^[44]。

另一种超分辨显微镜是光激活定位显微镜 (Photoactivated Localization Microscopy, PALM), 1994 年由 Eric Betzig 提出。当 PALM 用于 SPT 时 (sptPALM), 通过激活、定位、光漂白多种可光活化的荧光蛋白子集来获得单分子的位置信息^[56]。通过探测分子的不同子集, sptPALM 可以提供细胞膜在空间和时间上的异质性^[56-58]。sptPALM 的缺点是荧光蛋白的光学物理性质较差, 而且, 需要高转染效率的荧光蛋白。

通用点积累纳米成像 (Universal Points-Accumulation-for-Imaging-in-nanoscale Topography, uPAINT) 利用溶液中的荧光配体对少量的生物分子进行连续、随机标记, 然后通过倾斜照明成像^[59]。该方法使用传统的有机染料作为荧光标签, 因此得到的轨迹 (几十秒) 要长于 PALM, 但是成像速度比 PALM 慢, 而且, 只适用于活细胞的体外标记。用于 SPT 技术中的显微技术多种多样, 我们可以在上述显微技术的基础上进行改造升级, 从而推动 SPT 的发展。

3 SPT 在活细胞中的应用

3.1 细胞膜表面蛋白动力学的研究

细胞膜由磷脂层和蛋白质组成, 将细胞内物质与外界环境隔离并控制物质的进出。细胞间的

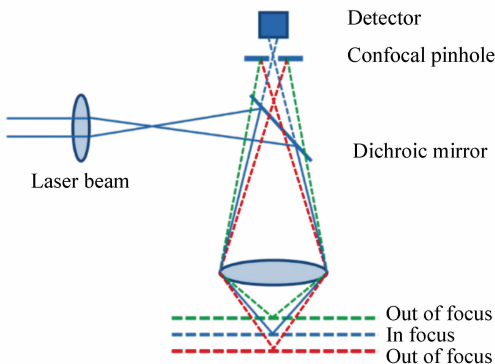


图 3 共聚焦显微镜原理示意图^[53]

Fig. 3 A schematic representation of the optical path in a confocal fluorescence microscope^[53]

交流以及细胞与周围环境的交流都是通过细胞膜上特定的蛋白质(也叫受体)完成,但是对于细胞膜的结构以及作用机制人们还不是很清楚。SPT的发展为研究细胞膜的结构及表面蛋白动力学提供了便利^[17]。

近些年 SPT 的研究结果表明,细胞膜是一个高度分层的结构:膜隔室,筏域和由膜相关蛋白、整合蛋白的低聚物组成的部分,不同的层次在不同的空间内发挥各自的作用^[17,60-62]。细胞膜上最大的区域是“膜隔室”,由靠近细胞内膜的肌动蛋白骨架和锚定在细胞膜骨架的跨膜蛋白组成(图 4(a))^[17,63]。1995年, Yasushi Sako 和 Akihiro Kusumi 用乳胶微珠(直径为 210 nm)和金颗粒(直径为 40 nm)标记转铁蛋白受体,对膜隔室的边界进行了研究,结果表明,膜隔室确实是由膜相关的细胞骨架组成^[64]。2002年, Akihiro Kusumi 将荧光染料 Cy3 标记的不饱和磷脂转入大鼠成纤维细胞中,观察它们在细胞膜上的运动,发现它们被限制在不同的隔室内,隔室大小在 30 ~ 250 nm 之间^[17,55]。该发现解释了为什么细胞膜上的长距离扩散速率要远远慢于在人造脂膜上的扩散速率,因为跨膜蛋白在膜骨架上排成一排,分子很难跨过不同的隔室边界,以“跳跃”扩散的形式跨过隔室需要一些时间^[65]。在每个隔室内的短距离扩散则很快,可能是布朗运动。

第二个区域是“筏域”(图 4(b)),由脂质和蛋白质组成,与细胞膜之间存在相互作用,可以被“筏”相关的受体调节^[17]。2012年, Akihiro Kusumi 课题组用荧光染料 Cy3 标记“筏”相关的糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白(GPI-APs)并追踪其在 CHO-K1 细胞中的动态过程,发现 GPI-APs 可以在几百毫秒内快速形成同源二聚体筏,而且该同源二聚体筏是极其动态的结构,存在时间短暂^[66]。第三个区域由膜相关蛋白以及整合蛋白的低聚物组成,大小在 3 ~ 10 nm 之间(图 4(c))。这些复合物可以与脂筏^[67-68],肌动蛋白骨架^[69]等发生相互作用。同时观察 QDs 标记的 FcεRI 和 GFP 标记的肌动蛋白的运动轨迹表明,肌动蛋白将 FcεRI 限制在了微米级的结构域内,而且肌动蛋白可以在几秒内重组,因此由肌动蛋白划分的 3 种结构域的位置、维度与时间相

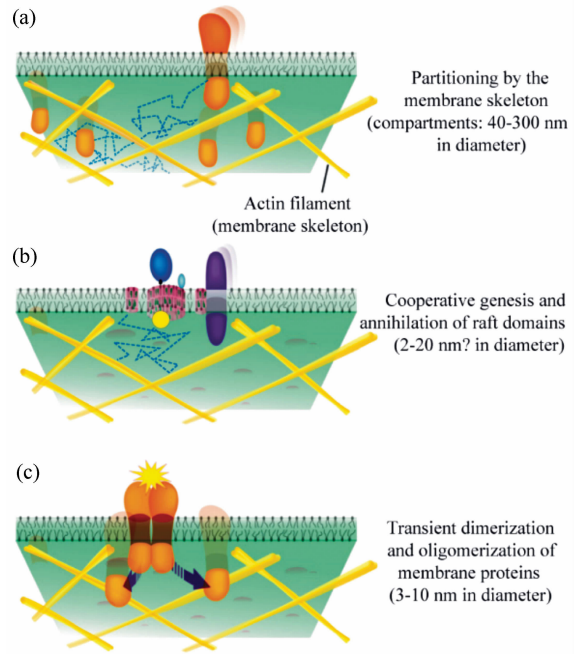


图 4 细胞膜的分层结构^[17]。(a)膜隔室层,由肌动蛋白骨架分隔整个细胞膜形成,并且跨膜蛋白锚定在肌动蛋白骨架上;(b)“筏域”,富含胆固醇,尺寸受到膜隔室的限制;(c)由膜相关蛋白以及整合蛋白的低聚物组成,存在时间非常短

Fig. 4 Three-tiered hierarchical structure of mesoscale domains in the plasma membrane^[17]. (a) Membrane compartments which stem from the partitioning of the entire plasma membrane by the membrane associated actin-based membrane skeleton (fence) and TM proteins anchored to the membrane skeleton fence (pickets); (b) cholesterol-containing raft domains, with sizes limited by the membrane compartments; (c) dimers and greater oligomers of membrane associated and integral membrane proteins, which might exist only transiently

关^[67]。

正是由于细胞膜独特的结构,脂质和蛋白质在膜上的运动是极其复杂的,多数情况是异常扩散。随着分子大小不同,持续时间不同,扩散也随之改变^[17,63,70]。Fujivara 认为,分子在细胞膜上以受限运动和跳跃式的扩散形式在运动^[65]。但是, Stefan Wieser 用单分子荧光显微镜追踪活细胞 T24 膜上 GPI 锚定蛋白 CD59 时,并没有观察到直

接的跳跃式扩散^[71]。因此,SPT 的发展将帮助我们获得更多的细节信息,不同课题组提出不同的观点,使研究更加深入。

除此之外,科研人员也利用 SPT 技术对细胞膜上的受体进行研究,例如甘氨酸,表皮生长因子受体(EGFR),GABA,人表皮生长因子受体-2(HER2),神经生长因子(NGF),干扰素,不同的跨膜蛋白和水通道蛋白等^[72]。基于金纳米颗粒的 SPT 技术用来追踪 $\beta 3$ -干扰素^[73]和 EGFR^[74]。2017 年,Kuangcai Chen 利用示差—微分干涉差显微镜实现了 5D SPT,追踪转铁蛋白—金纳米棒在人肺癌细胞 A549 细胞膜上的运动,发现转铁蛋白—金纳米棒在做横向扩散运动,同时又在做自旋运动^[25]。

3.2 细胞内信号通路和分子转运机制的研究

信号通路是指能将细胞外的分子信号经细胞膜传入细胞内并发挥效应的一系列酶促反应通路。这些细胞外的分子信号也可叫做配体,当配体特异性结合在细胞膜或者细胞内受体后会引起细胞内的信号传导过程,因此了解膜蛋白活化后的内化和转运机制对于理解信号通路至关重要。通过对 QDs 进行修饰,并作为配体与细胞膜上的受体结合从而激活通路,实现了对转运以及内化过程的观察^[75-76]。Dhiraj Bhatia 将 QDs 包裹在 DNA 多面体中,从而可以定量地修饰上配体(例如叶酸,半乳糖苷凝集素-3),追踪了细胞的内吞途径^[77]。Sang Hwan Nam 等人第一次在单囊泡水平上观察 UCNPs 的内吞过程,追踪时间长达 6 h,发现 UCNPs 内吞后存在 3 种运动方向:(1)受动力蛋白影响的 UCNPs,运动方向从细胞质向核周区;(2)受驱动蛋白影响的 UCNPs,运动方向从核周区向细胞质;(3)还存在一些 UCNPs,具有双向运动的特点^[22]。

SPT 技术也可以用于探究细胞内不同分子的动力学特征,例如对分子马达的追踪^[23-24,78],Fakhri 课题组用 SWNTs 标记 COS-7 细胞内的驱动蛋白,观察到驱动蛋白运输过程中的新型运动模式——一种主动的随机“搅拌”模式^[79]。David M. Warshaw 用两种具有不同发射光谱的 QDs 标记同一个肌球蛋白的两个头部,发现当肌球蛋白在肌动蛋白丝上运动时,它的两个头部以 72 nm 的步

长交替出现在肌动蛋白丝上,而且,在停止运动时,头间距为 36 nm,这说明肌球蛋白在肌动蛋白丝上的运动模式是两头交替运动式(Hand-over-hand)^[18]。Nan 等人用 QDs 追踪人类肺癌细胞 A549 中的马达蛋白,发现驱动蛋白和动力蛋白在微管上运动时步长为 8 nm,然而有时候还能观察到步长为 16 nm 或者 24 nm 的情况,可能是因为多个马达蛋白在运输同一个物质时存在相互合作^[19]。

将 SPT 技术与超分辨成像结合可以观察细胞内微管的运输^[80]以及细胞器内蛋白复合物的动态组织过程^[81]。Yoo 等人将 Anti-Tubulin 抗体修饰的 QDs 转入到细胞内并与微管结合,发现 anti-tubulin-QDs 向前或向后运动,平均速度为 50.3 nm/s,揭示了微管的动态运动^[82]。Courty 用 QDs 标记 HeLa 细胞内的驱动蛋白,发现驱动蛋白在微管上做定向运动(图 5),平均速率是 $(0.57 \pm 0.02) \mu\text{m/s}$ ^[20]。据 nature 报道,Alex M. Valm 利用共聚焦显微镜和栅格激光层析显微镜(lattice light sheet microscope)实现了对细胞器

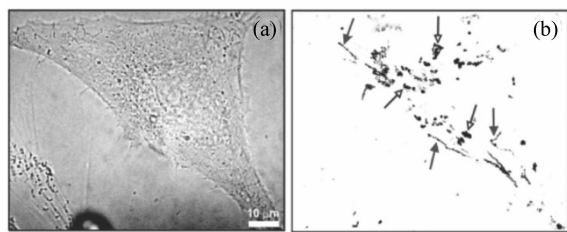


图 5 单个 QD-驱动蛋白在活细胞内的运动^[20]。(a) HeLa 细胞的明场图像;(b) 将连续的 600 帧图像叠加得到的最终图像,线性轨迹表示单个 QD-驱动蛋白做定向运动(实心箭头),空心箭头表示的是其他一些 QD-驱动蛋白做随机运动

Fig. 5 Single QD-kinesin motions in a living cell^[20]. (a) Bright-field image of a HeLa cell; (b) image obtained by superimposing the 600 consecutive frames in the image sequence. The linear trajectories are indicative of directed motions of individual QD-kinesin. Examples are marked by the full arrows. The trajectories of diffusing QD-Ks (marked by empty arrowheads) have a random shape in the superimposed image

(内质网,高尔基体,溶酶体,过氧化物酶体,线粒体和脂滴)数量、体积、速度、位置以及动态膜接触的观察,发现每个细胞器都有各自的分散特点,而且受微管和细胞内营养状态的影响,细胞器间的膜接触处于重复循环的模式^[83]。

3.3 遗传信息表达过程的研究

SPT也用于细胞核结构和动力学的研究,通过SPT追踪我们了解到细胞核是一个高度复杂、拥挤的环境^[84-86],因此分子在细胞核内的扩散也很复杂。研究人员开发了不同的光学技术以便探究细胞核的动力学,例如Levi课题组使用双光子显微镜与轨道追踪方法跟踪细胞核内的染色质的运动,发现染色质的运动交替出现限制性布朗运动,快速曲线运动以及跳跃式的扩散^[87]。还可以借助反光片显微镜(Reflected light sheet microscopy)观察细胞核内转录因子的动态过程,而且通过双色-SPT可以同时观察不同的转录因子以及它们的激活因子^[88]。Lowe和Siegel监测了蛋白修饰的QDs进入细胞核的过程,发现核孔复合物(NPC)控制颗粒进出细胞核的机制^[89]:(1)胞质丝增加了捕获颗粒的面积;(2)运输过程中存在大小的选择;(3)颗粒在核孔中央通道内的运动属于异常亚扩散,而且颗粒表面受体越多,越容易进入细胞核;(4)中央通道在功能上是不对称的,颗粒从中央通道进入细胞核需要Ran(小分子GTP结合蛋白)的帮助,而且Ran只存在于核表面。与SPT在细胞膜上的研究相比,对于细胞核的研究还不是很透彻,但是相信随着光学技术的成熟,标签库的丰富等一些技术的快速发展,人们会获得更多有关细胞核的细节信息。

3.4 病毒感染机制的研究

病毒是由一个核酸分子与蛋白质构成的非细胞形态,通过感染宿主细胞进行自我复制,但是对于病毒的感染机制还不是很清楚。近些年,SPT的发展使研究人员明确了解多种病毒内化的机制,例如传染性造血组织坏死病毒(IHNV)^[90]、包膜病毒^[91]、后代伪狂犬病病毒(PrV)^[92]、无包膜的腺相关病毒(AAV2)^[93]等等。Liu用QDs标记H9N2病毒,发现流感病毒进入细胞主要有5个阶段,首先病毒在细胞表面受到限制,然后慢慢地

向细胞周边区域移动,紧接着快速移向细胞核,在核周区做间歇性的运动,最后在该区域做局限运动^[94]。Li Qin等人将QDs包裹在HIV-1中,追踪HIV-1病毒感染巨噬细胞的过程(图6),发现HIV-1以网格蛋白介导的方式被内吞,然后移位至内体,最终通过病毒包膜介导的内体融合将核酸分子释放到宿主细胞中。他们还发现,HIV-1进入细胞需要内体和肌动蛋白的协助,对内体和肌动蛋白的抑制可以阻断HIV-1进入细胞^[95]。因此了解病毒内吞的机制能够帮助人们发展新型阻断剂,有效阻断病毒入侵人体。

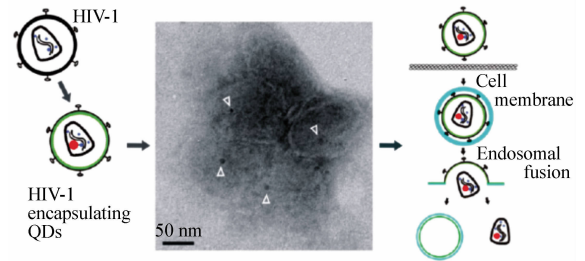


图6 HIV-1病毒侵染巨噬细胞的过程^[95]

Fig. 6 Process of HIV-1 entry into macrophages^[95]

4 结束语

SPT技术是研究活细胞内复杂的分子动态过程的重要手段,揭示了活细胞内生物分子的动力学特征。在过去30多年里,SPT技术的快速发展是物理、化学、材料、工程、生物等各个学科共同努力的结果。本文从基础技术和细胞内应用两方面介绍SPT,在基础技术中介绍了SPT轨迹追踪原理,光学材料以及光学仪器,使人们了解SPT是如何实现对复杂的细胞内环境进行实时的监控并提供生物信息;在应用方面重点介绍SPT在单细胞内的研究进展,基于这些研究,人们揭示了细胞内分子的运输特性,分子间的相互作用以及结构与功能间的机制等,帮助我们更好的了解活细胞内分子的时空分布。

虽然SPT在单细胞研究上取得了很大的成就,但是它的发展还不是很成熟,仍有许多需要完善的地方,例如在光学材料方面,我们可以对荧光

蛋白进行突变,从而获得具有更优异的光学物理性质的蛋白;通过优化 UCNP 的合成策略进而提高发光强度、降低粒径;还可以将不同的荧光材料组合,例如对于一些共轭聚合物,不仅对它们的表面进行修饰,还可以将有机染料小分子包裹进去(例如 NIR 染料^[96-97]),用于多光子检测。更亮、更稳定、低毒、多功能的光学材料必定会推动 SPT 技术的发展。

而为了更好的利用这些新型材料,我们也需要引入更有效和更高分辨率的光学技术,例如利用宽场追踪与超分辨的共定位测量。近几年,应用结构光照明超分辨显微技术(SIM)可以实现活细胞内二维和三维实时超分辨成像。将光片照明技术与 SIM 结合,实现了对厚样品的三维超分辨成像和活细胞内双色三维快速成像,分辨率也有了很大的提高。因此将不同的成像技术例如 SIM 跟 SPT 进行组合、改造,会进一步完善 SPT 的光学系统,光学的发展可以让我们在新的尺度上分

析问题。

复杂的光学系统可以实现快速超分辨成像,同时也需要自动化的数据处理来支持。我们需要对算法进行优化,减少计算时间,从而实现实时数据处理,获得更多的细节信息,例如实时分析追踪的颗粒数目以及颗粒所处的周围环境等。

借助具有优异的光学物理性质的荧光材料,超高分辨率的光学显微系统,以及自动化的数据处理,可以对细胞内或者组织中高度局限、复杂的分子环境进行实时追踪,从而获得任意时间长度的 3D 轨迹或者是小范围内超多个单颗粒的运动轨迹。同时,还可以将 SPT 扩展到其他领域,例如化学、物理等学科。最近报道用 SPT 探究自由基的聚合机理^[98]以及纳米材料中的扩散、吸收、分配以及测量的动力学问题^[99]。了解纳米材料合成以及运输机制可以帮助我们设计出先进的材料体系,进一步推动 SPT 的进步。

参考文献:

- [1] LIPPINCOTT-SCHWARTZ J, SNAPP E, KENWORTHY A. Studying protein dynamics in living cells[J]. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, 2001, 2(6):444-456.
- [2] REITS E A J, NEEFJES J J. From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells[J]. *Nat. Cell Biol.*, 2001 3(6):E145-E147.
- [3] DOMINGUEZ-MEDINA S, CHEN S, BLANKENBURG J, et al. . Measuring the hydrodynamic size of nanoparticles using fluctuation correlation spectroscopy[J]. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2016, 67:489-514.
- [4] YU TA, MARTINEZ MM, PAPPAS D. Fluorescence correlation spectroscopy: a review of biochemical and microfluidic applications[J]. *Applied Spectroscopy*, 2011, 65(4):115a-124a.
- [5] SPRAGUE B L, PEGO R L, STAVREVA DA, et al. . Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching[J]. *Biophysical Journal*, 2004, 86(6):3473-3495.
- [6] ELSON E L. Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future[J]. *Biophysical Journal*, 2011, 101(12):2855-2870.
- [7] HAUSTEIN E, SCHWILLE P. Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique[J]. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 2007, 36:151-169.
- [8] GEERTS H, DE BRABANDER M, NUYDENS R, et al. . Nanovid tracking: a new automatic method for the study of mobility in living cells based on colloidal gold and video microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 1987, 52(5):775-782.
- [9] DE BRABANDER M, NUYDENS R, GEERTS H, et al. . Dynamic behavior of the transferrin receptor followed in living epidermoid carcinoma(A431) cells with nanovid microscopy[J]. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 1988, 9(1):30-47.
- [10] DE BRABANDER M, NUYDENS R, ISHIHARA A, et al. . Lateral diffusion and retrograde movements of individual cell surface components on single motile cells observed with Nanovid microscopy[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1991, 112(1):111-124.
- [11] BETZIG E, CHICHESTER R J. Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy[J]. *Science*, 1993,

262(5138):1422-1425.

- [12] SAKO Y, MINOGHCHI S, YANAGIDA T. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells[J]. *Nature Cell Biology*, 2000, 2(3):168-172.
- [13] IINO R, KOYAMA I, KUSUMI A. Single molecule imaging of green fluorescent proteins in living cells: E-cadherin forms oligomers on the free cell surface[J]. *Biophysical Journal*, 2001, 80(6):2667-2677.
- [14] SCHMIDT T, SCHUTZ G J, BAUMGARTNER W, et al.. Imaging of single molecule diffusion[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(7):2926-2929.
- [15] SCHUTZ G J, KADA G, PASTUSHENKO V P, et al.. Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy[J]. *The EMBO Journal*, 2000, 19(5):892-901.
- [16] DAHAN M, LEVI S, LUCCARDINI C, et al.. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking[J]. *Science*, 2003, 302(5644):442-445.
- [17] KUSUMI A, SUZUKI K G, KASAI R S, et al.. Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2011, 36(11):604-615.
- [18] WARSHAW D M, KENNEDY G G, WORK S S, et al.. Differential labeling of myosin V heads with quantum dots allows direct visualization of hand-over-hand processivity[J]. *Biophysical Journal*, 2005, 88(5):L30-32.
- [19] NAN X, SIMS P A, CHEN P, et al.. Observation of individual microtubule motor steps in living cells with endocytosed quantum dots[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2005, 109(51):24220-24224.
- [20] COURTY S, LUCCARDINI C, BELLAICHE Y, et al.. Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum-dot imaging[J]. *Nano Letters*, 2006, 6(7):1491-1495.
- [21] BIERMANN B, SOKOLL S, KLUEVA J, et al.. Imaging of molecular surface dynamics in brain slices using single-particle tracking[J]. *Nature Communications*, 2014, 5.
- [22] NAM S H, BAE Y M, PARK Y I, et al.. Long-term real-time tracking of lanthanide ion doped upconverting nanoparticles in living cells[J]. *Angewandte Chemie*, 2011, 50(27):6093-6097.
- [23] KURAL C, KIM H, SYED S, et al.. Kinesin and dynein move a peroxisome *in vivo*: a tug-of-war or coordinated movement? [J]. *Science*, 2005, 308(5727):1469-1472.
- [24] YILDIZ A, FORKEY J N, MCKINNEY S A, et al.. Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization[J]. *Science*, 2003, 300(5628):2061-2065.
- [25] CHEN K, GU Y, SUN W, et al.. Characteristic rotational behaviors of rod-shaped cargo revealed by automated five-dimensional single particle tracking[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1):887.
- [26] CHEEZUM M K, WALKER W F, GUILFORD W H. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles[J]. *Biophysical Journal*, 2001, 81(4):2378-2388.
- [27] SHEN H, TAUZIN L J, BAIYASI R, et al.. Single particle tracking: from theory to biophysical applications[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(11):7331-7376.
- [28] MANZO C, GARCIA-PARAJO M F. A review of progress in single particle tracking: from methods to biophysical insights [J]. *Reports on Progress in Physics. Physical Society*, 2015, 78(12):124601.
- [29] SERGE A, BERTAUX N, RIGNEAULT H, et al.. Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(8):687-694.
- [30] SAXTON M J, JACOBSON K. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics[J]. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 1997, 26:373-399.
- [31] DEAN K M, PALMER A E. Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic cellular imaging[J]. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10(7):512-523.
- [32] FERNANDEZ-SUAREZ M, TING A Y. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells[J]. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2008, 9(12):929-943.
- [33] SHEETZ M P, TURNEY S, QIAN H, et al.. Nanometre-level analysis demonstrates that lipid flow does not drive mem-

- brane glycoprotein movements[J]. *Nature*,1989,340(6231):284-288.
- [34] GARCIA-PARAJO M F, SEGERS-NOLTEN G M, VEERMAN J A, *et al.*. Real-time light-driven dynamics of the fluorescence emission in single green fluorescent protein molecules[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2000,97(13):7237-7242.
- [35] BRUCHEZ M J R, MORONNE M, GIN P, *et al.* Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels[J]. *Science*, 1998,281(5385):2013-2016.
- [36] YAO J, LARSON D R, VISHWASRAO H D, *et al.*. Blinking and nonradiant dark fraction of water-soluble quantum dots in aqueous solution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2005,102(40):14284-14289.
- [37] DERFUS A M, CHAN W C W, BHATIA S N. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots[J]. *Nano Letters*, 2004,4(1):11-18.
- [38] MIAO P, HAN K, TANG Y G, *et al.*. Recent advances in carbon nanodots: synthesis, properties and biomedical applications[J]. *Nanoscale*,2015,7(5):1586-1595.
- [39] MIAO P, TANG Y G, HANA K, *et al.*. Facile synthesis of carbon nanodots from ethanol and their application in ferric (III) ion assay[J]. *J. Mater. Chem. A*,2015,3(29):15068-15073.
- [40] CHANG Y R, LEE H Y, CHEN K, *et al.*. Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds[J]. *Nature Nanotechnology*,2008,3(5):284-288.
- [41] FU C C, LEE H Y, CHEN K, *et al.*. Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2007,104(3):727-732.
- [42] JIN H, HELLER D A, STRANO M S. Single-particle tracking of endocytosis and exocytosis of single-walled carbon nanotubes in NIH-3T3 cells[J]. *Nano Letters*,2008,8(6):1577-1585.
- [43] JIN H, HELLER D A, SHARMA R, *et al.* Size-dependent cellular uptake and expulsion of single-walled carbon nanotubes: single particle tracking and a generic uptake model for nanoparticles[J]. *ACS Nano*,2009,3(1):149-158.
- [44] WU S, HAN G, MILLIRON D J, *et al.*. Non-blinking and photostable upconverted luminescence from single lanthanide-doped nanocrystals[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2009,106(27):10917-10921.
- [45] BAE Y M, PARK Y I, NAM S H, *et al.*. Endocytosis, intracellular transport, and exocytosis of lanthanide-doped upconverting nanoparticles in single living cells[J]. *Biomaterials*,2012,33(35):9080-9086.
- [46] WANG F, HAN Y, LIM C S, *et al.*. Simultaneous phase and size control of upconversion nanocrystals through lanthanide doping[J]. *Nature*,2010,463(7284):1061-1065.
- [47] LIU X J, TU Y, GAI H W. Imaging of single molecules by wide-field optical microscopy[J]. *Prog. Chem.*,2013,25(2-3):370-379.
- [48] MICHALET X, COLYER R A, SCALIA G, *et al.*. Development of new photon-counting detectors for single-molecule fluorescence microscopy[J]. *Philos. T. R. Soc. B*,2013,368(1611)
- [49] WIESER S, SCHUTZ G J. Tracking single molecules in the live cell plasma membrane-Do's and Don't's[J]. *Methods*, 2008,46(2):131-140.
- [50] MICHALET X, SIEGMUND O H W, VALLERGA J V, *et al.*. Detectors for single-molecule fluorescence imaging and spectroscopy[J]. *J. Mod. Optic*,2007,54(2-3):239-281.
- [51] AXELROD D. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology[J]. *Traffic*,2001,2(11):764-774.
- [52] TOKUNAGA M, IMAMOTO N, SAKATA-SOGAWA K. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells[J]. *Nature Methods*,2008,5(2):159-161.
- [53] STENDER A S, MARCHUK K, LIU C, *et al.*. Single cell optical imaging and spectroscopy[J]. *Chemical Reviews*,2013,113(4):2469-2527.
- [54] ARHEL N, GENOVESIO A, KIM K A, *et al.*. Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1

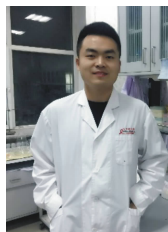
- complexes[J]. *Nature Methods*,2006,3(10):817-824.
- [55] LANGE S,KATAYAMA Y,SCHMID M,*et al.*. Simultaneous transport of different localized mRNA species revealed by live-cell imaging[J]. *Traffic*,2008,9(8):1256-1267.
- [56] MANLEY S,GILLETTE J M,PATTERSON G H,*et al.*. High-density mapping of single-molecule trajectories with photo-activated localization microscopy[J]. *Nature Methods*,2008,5(2):155-157.
- [57] PASZEK M J,DUFORT C C,ROSSIER O,*et al.*. The cancer glycocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival[J]. *Nature*,2014,511(7509):319-325.
- [58] ROSSIER O,OCTEAU V,SIBARITA J B,*et al.*. Integrins beta1 and beta3 exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions[J]. *Nature Cell Biology*,2012,14(10):1057-1067.
- [59] GIANNONE G,HOSY E,LEVET F,*et al.*. Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living cells at ultra-high density[J]. *Biophysical Journal*,2010,99(4):1303-1310.
- [60] GARCIA-PARAJO M F,CAMBI A,TORRENO-PINA J A,*et al.*. Nanoclustering as a dominant feature of plasma membrane organization[J]. *Journal of Cell Science*,2014,127(Pt 23):4995-5005.
- [61] LINGWOOD D,SIMONS K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle[J]. *Science*,2010,327(5961):46-50.
- [62] KUSUMI A,TSUNOYAMA T A,HIROSAWA K M,*et al.*. Tracking single molecules at work in living cells[J]. *Nature Chemical Biology*,2014,10(7):524-532.
- [63] KUSUMI A,NAKADA C,RITCHIE K,*et al.*. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules[J]. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*,2005,34:351-378.
- [64] SAKO Y,KUSUMI A. Barriers for lateral diffusion of transferrin receptor in the plasma membrane as characterized by receptor dragging by laser tweezers:fence versus tether[J]. *The Journal of Cell Biology*,1995,129(6):1559-1574.
- [65] FUJIWARA T,RITCHIE K,MURAKOSHI H,*et al.*. Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane[J]. *The Journal of Cell Biology*,2002,157(6):1071-1081.
- [66] SUZUKI K G,KASAI R S,HIROSAWA K M,*et al.*. Transient GPI-anchored protein homodimers are units for raft organization and function[J]. *Nature Chemical Biology*,2012,8(9):774-783.
- [67] ANDREWS N L,LIDKE K A,PFEIFFER J R,*et al.*. Actin restricts FcepsilonRI diffusion and facilitates antigen-induced receptor immobilization[J]. *Nature Cell Biology*,2008,10(8):955-963.
- [68] OWEN D M,WILLIAMSON D,RENTERO C,*et al.*. Quantitative microscopy: protein dynamics and membrane organization[J]. *Traffic*,2009,10(8):962-971.
- [69] TREANOR B,DEPOIL D,GONZALEZ-GRANJA A,*et al.*. The membrane skeleton controls diffusion dynamics and signaling through the B cell receptor[J]. *Immunity*,2010,32(2):187-199.
- [70] MURASE K,FUJIWARA T,UMEMURA Y,*et al.*. Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques[J]. *Biophysical Journal*,2004,86(6):4075-4093.
- [71] WIESER S,MOERTELMAIER M,FUERSTBAUER E,*et al.*. (Un)confined diffusion of CD59 in the plasma membrane determined by high-resolution single molecule microscopy[J]. *Biophysical Journal*,2007,92(10):3719-3728.
- [72] WEGNER K D,HILDEBRANDT N. Quantum dots: bright and versatile *in vitro* and *in vivo* fluorescence imaging biosensors[J]. *Chem. Soc. Rev.*,2015,44(14):4792-4834.
- [73] LEDUC C,SI S,GAUTIER J,*et al.*. A highly specific gold nanoprobe for live-cell single-molecule imaging[J]. *Nano Letters*,2013,13(4):1489-1494.
- [74] TAURAN Y,BRIOUDE A,COLEMAN A W,*et al.*. Molecular recognition by gold, silver and copper nanoparticles[J]. *World Journal of Biological Chemistry*,2013,4(3):35-63.
- [75] LIDKE DS,LIDKE KA,RIEGER B,*et al.*. Reaching out for signals:filopodia sense EGF and respond by directed retrograde transport of activated receptors[J]. *The Journal of Cell Biology*,2005,170(4):619-626.
- [76] RAJAN S S,LIU H Y,VU T Q. Ligand-bound quantum dot probes for studying the molecular scale dynamics of receptor

- endocytic trafficking in live cells[J]. *ACS Nano*,2008,2(6):1153-1166.
- [77] BHATIA D, ARUMUGAM S, NASIŁOWSKI M, *et al.*. Quantum dot-loaded monofunctionalized DNA icosahedra for single-particle tracking of endocytic pathways[J]. *Nature Nanotechnology*,2016,11(12):1112-1119.
- [78] PIEROBON P, ACHOURI S, COURTY S, *et al.*. Velocity, processivity, and individual steps of single myosin V molecules in live cells[J]. *Biophysical Journal*,2009,96(10):4268-4275.
- [79] FAKHRI N, WESSEL A D, WILLMS C, *et al.*. High-resolution mapping of intracellular fluctuations using carbon nanotubes[J]. *Science*,2014,344(6187):1031-1035.
- [80] BALINT S, VERDENY V I, SANDOVAL A A, *et al.*. Correlative live-cell and superresolution microscopy reveals cargo transport dynamics at microtubule intersections[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2013,110(9):3375-3380.
- [81] APPELHANS T, RICHTER C P, WILKENS V, *et al.*. Nanoscale organization of mitochondrial microcompartments revealed by combining tracking and localization microscopy[J]. *Nano Letters*,2012,12(2):610-616.
- [82] YOO J, KAMBARA T, GONDA K, *et al.*. Intracellular imaging of targeted proteins labeled with quantum dots[J]. *Experimental Cell Research*,2008,314(19):3563-3569.
- [83] VALM A M, COHEN S, LEGANT W R, *et al.*. Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome[J]. *Nature*,2017,546(7656):162-167.
- [84] MISTELI T. Beyond the sequence: cellular organization of genome function[J]. *Cell*,2007,128(4):787-800.
- [85] HANDWERGER K E, GALL J G. Subnuclear organelles: new insights into form and function[J]. *Trends in Cell Biology*,2006,16(1):19-26.
- [86] VIVANTE A, BROZGOL E, BRONSHTEN I, *et al.*. Genome organization in the nucleus: from dynamic measurements to a functional model[J]. *Methods*,2017,123:128-137.
- [87] LEVI V, RUAN Q, PLUTZ M, *et al.*. Chromatin dynamics in interphase cells revealed by tracking in a two-photon excitation microscope[J]. *Biophysical Journal*,2005,89(6):4275-4285.
- [88] GEBHARDT J C, SUTER DM, ROY R, *et al.*. Single-molecule imaging of transcription factor binding to DNA in live mammalian cells[J]. *Nature Methods*,2013,10(5):421-426.
- [89] LOWE A R, SIEGEL J J, KALAB P, *et al.*. Selectivity mechanism of the nuclear pore complex characterized by single cargo tracking[J]. *Nature*,2010,467(7315):600-603.
- [90] LIU H B, LIU Y, LIU S L, *et al.*. Clathrin-mediated endocytosis in living host cells visualized through quantum dot labeling of infectious hematopoietic necrosis virus[J]. *J. Virol.*,2011,85(13):6252-6262.
- [91] WEN L, LIN Y, ZHENG ZH, *et al.*. Labeling the nucleocapsid of enveloped baculovirus with quantum dots for single-virus tracking[J]. *Biomaterials*,2014,35(7):2295-2301.
- [92] LV C, LIN Y, LIU A A, *et al.*. Labeling viral envelope lipids with quantum dots by harnessing the biotinylated lipid-self-inserted cellular membrane[J]. *Biomaterials*,2016,106:69-77.
- [93] JOO K I, FANG Y, LIU Y, *et al.*. Enhanced real-time monitoring of adeno-associated virus trafficking by virus-quantum dot conjugates[J]. *ACS Nano*,2011,5(5):3523-3535.
- [94] LIU S L, ZHANG Z L, TIAN Z Q, *et al.*. Effectively and efficiently dissecting the infection of influenza virus by quantum-dot-based single-particle tracking[J]. *ACS Nano*,2012,6(1):141-150.
- [95] LI Q, LI W, YIN W, *et al.*. Single-particle tracking of human immunodeficiency virus type 1 productive entry into human primary macrophages[J]. *ACS Nano*,2017,11(4):3890-3903.
- [96] YU J, ZHANG X J, HAO X J, *et al.*. Near-infrared fluorescence imaging using organic dye nanoparticles[J]. *Biomaterials*,2014,35(10):3356-3364.
- [97] NI M, ZHUO S, SO P T, *et al.*. Fluorescent probes for nanoscopy: four categories and multiple possibilities[J]. *Journal of Biophotonics*,2017,10(1):11-23.
- [98] NOLLE J M, PRIMPKE S, MULLEN K, *et al.*. Diffusion of single molecular and macromolecular probes during the free

radical bulk polymerization of MMA-towards a better understanding of the Trommsdorff effect on a molecular level[J]. *Polym. Chem. -Uk*,2016,7(24):4100-4105.

- [99] HIGGINS D A,PARK S C,TRAN-BA K H,*et al.*. Single-molecule investigations of morphology and mass transport dynamics in nanostructured materials[J]. *Annu. Rev. Anal. Chem.*,2015,8:193-216.

作者简介:



王德江(1990—),男,河南平顶山人,博士,2014年、2017年于吉林大学分别获得学士、硕士学位。主要从事单颗粒示踪方面的研究。E-mail: djwang11@outlook.com



狄香君(1991—),女,吉林长春人,博士,2014年、2017年于吉林大学分别获得学士、硕士学位。主要从事单颗粒示踪方面的研究。E-mail: dixiangjun@hotmail.com



金大勇(1979—),男,澳大利亚,博士,杰出教授,博士生导师,澳大利亚国家自然科学基金委 Future Fellow; 澳洲国家可集成生物医疗仪器与技术转化基地所长; 澳大利亚悉尼科技大学生物医学材料及仪器研究所所长; 澳大利亚国家重点实验室-纳米生物光子学发起人、首席科学家,主要从事生物医疗材料和仪器方面的研究。E-mail: dayong.jin@uts.edu.au