

## 多维度单分子成像研究进展

李孟帆 陈剑威 石伟 傅爽 李昀泽 罗婷丹 陈俊帆 李依明

### Advances in multi-dimensional single molecule imaging

LI Meng-fan, CHEN Jian-wei, SHI Wei, FU Shuang, LI Yun-ze, LUO Ting-dan, CHEN Jun-fan, LI Yi-ming

引用本文:

李孟帆, 陈剑威, 石伟, 傅爽, 李昀泽, 罗婷丹, 陈俊帆, 李依明. 多维度单分子成像研究进展[J]. *中国光学*, 2022, 15(6): 1243–1257. doi: 10.37188/CO.2022–0088

LI Meng-fan, CHEN Jian-wei, SHI Wei, FU Shuang, LI Yun-ze, LUO Ting-dan, CHEN Jun-fan, LI Yi-ming. Advances in multi-dimensional single molecule imaging[J]. *Chinese Optics*, 2022, 15(6): 1243-1257. doi: 10.37188/CO.2022-0088

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.37188/CO.2022–0088>

---

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 双色荧光辐射差分超分辨显微系统研究

Dual-color fluorescence emission difference super-resolution microscopy

中国光学 (中英文). 2018, 11(3): 329 <https://doi.org/10.3788/CO.20181103.0329>

#### 实用化平面超振荡透镜的研究进展

Research progresses of planar super-oscillatory lenses for practical applications

中国光学 (中英文). 2019, 12(6): 1155 <https://doi.org/10.3788/CO.20191206.1155>

#### 简单光学系统的宽光谱点扩散函数估计

Wide-spectrum PSF estimation for simple optical system

中国光学 (中英文). 2019, 12(6): 1418 <https://doi.org/10.3788/CO.20191206.1418>

#### 结构光照明超分辨光学显微成像技术与展望

Structured illumination super-resolution microscopy technology: review and prospect

中国光学 (中英文). 2018, 11(3): 307 <https://doi.org/10.3788/CO.20181103.0307>

#### 超分辨率成像荧光探针材料应用进展

Advances in application of materials of super-resolution imaging fluorescent probe

中国光学 (中英文). 2018, 11(3): 344 <https://doi.org/10.3788/CO.20181103.0344>

#### 太赫兹波三维成像技术研究进展

Advances in terahertz three-dimensional imaging techniques

中国光学 (中英文). 2019, 12(1): 1 <https://doi.org/10.3788/CO.20191201.0001>

文章编号 2097-1842(2022)06-1243-15

## 多维度单分子成像研究进展

李孟帆, 陈剑威, 石伟, 傅爽, 李昀泽, 罗婷丹, 陈俊帆, 李依明\*  
(南方科技大学 生物医学工程系, 广东 深圳 518055)

**摘要:** 单分子成像方法被广泛应用于亚细胞结构的三维空间定位。点扩散函数是分析单分子信息的重要窗口, 除了能反映空间坐标外还蕴含着丰富的额外信息。本文介绍了从点扩散函数中解析空间位置、荧光波长、偶极子朝向及干涉相位等多维度单分子成像研究进展, 简要地概括了目前主流定位方法, 并对该技术的发展方向进行了展望。

**关键词:** 超分辨; 单分子定位显微方法; 多维度成像; 点扩散函数

中图分类号: TH742 文献标志码: A doi: 10.37188/CO.2022-0088

### Advances in multi-dimensional single molecule imaging

LI Meng-fan, CHEN Jian-wei, SHI Wei, FU Shuang, LI Yun-ze,  
LUO Ting-dan, CHEN Jun-fan, LI Yi-ming\*

(Department of Biomedical Engineering, Southern University of Science  
and Technology, Shenzhen 518055, China)

\* Corresponding author, E-mail: liym2019@sustech.edu.cn

**Abstract:** Single-molecule imaging is widely used for the reconstruction of three-dimensional subcellular structures. The point spread function is an important window to analyze the information of a single molecule. Besides 3D coordinates, it also contains abundant additional information. In this paper, we reviewed the recent progress of multi-dimensional single-molecule imaging, including spatial location, fluorescence wavelength, dipole orientation, interference phase, etc. We also briefly introduced the latest methods for molecule localization and proposed the further directions for its research.

**Key words:** super-resolution; single molecule localization microscopy; multi-dimensional imaging; point spread function

### 1 引言

光学显微镜作为人类利用光线进行生命探

索工具的历史悠久, 早在 300 多年前, 列文虎克就用自制显微镜, 对植物、动物细胞以及灰尘进行观察, 证明了微生物的存在, 揭开了生命最小

收稿日期: 2022-04-30; 修订日期: 2022-05-19

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金区域联合基金项目 (No. 2020A1515110380); 山东省重点研发计划项目 (No. 2021CXGC010212); 深圳市高层次人才团队项目 (No. KQTD20200820113012029)

Supported by Guangdong Natural Science Foundation Joint Fund (No. 2020A1515110380); Shandong Key Research and Development Program (No. 2021CXGC010212); Shenzhen Science and Technology Innovation Commission (No. KQTD20200820113012029)

单位的神秘面纱。随着科学理论的发展以及技术的进步,19世纪天文学家阿贝发现,限制显微镜成像极限的不再是透镜的放大倍数,而是系统对点光源会聚成像形成的圈状衍射光斑,这种光斑被称为艾里斑(Airy Disk)。即使是无限小的点光源经过透镜后也只能形成有限大小的艾里斑,当两个点光源离得比较近时就难以将它们分辨开。这种判断方法也被称为瑞利判据,在可见光范围内普通物镜的分辨能力约为200 nm。

近年来,随着对荧光分子开关的研究不断深入以及激光调制技术在生物医学领域的应用,已经出现了数种能够突破光学显微极限达到高分辨率成像的方法,包括:结构照明显微镜(SIM)<sup>[1-2]</sup>、受激发射损耗显微镜(STED)<sup>[3-5]</sup>,以及单分子定位显微镜(SMLM)<sup>[6-11]</sup>。其中,SIM技术的成像速度快,但分辨率提升较低;STED技术在分辨率和速度上表现都比较好,但缺点是对样品的光损伤较大。SMLM由于在三者中具有最高的分辨能力且不需要复杂的光路设计故被广泛应用于细胞器以及蛋白质结构的研究。但受限于其成像原理,SMLM的成像速度慢且对标记物要求较高。针对SMLM的上述缺点,近年来许多应对这些挑战的设计思路被提出,譬如:利用上转换荧光材料实现低能耗超分辨成像(STED)<sup>[12-14]</sup>,以及采用DNA互补特性实现任何染料都可成像的DNA-PAINT技术<sup>[15-16]</sup>等。

常规荧光显微镜在对目标荧光激发成像时往往会因为标记密度过大导致在受到激发且同时发光的情况下成像不可分辨。譬如线粒体内脊、微管以及核孔蛋白等纳米尺度下的结构在宽场成像中模糊不清。单分子定位显微镜则是通过激光不同步激活、激发,单分子荧光探针短时间内发生闪烁,保证相机的每一帧都能获取到稀疏少量的荧光点图像。通过计算机处理,解析获得的每一帧单分子信息,再将这些信息重新组合在一个图像空间上,最终获得高分辨图像。

光学系统的冲击响应被称为点扩散函数(PSF),其形态由光学系统的调制和发光点的物

理性质决定。譬如在光路中插入柱面镜、起偏器、相位板以及自适应光学器件,又或是点光源本身的特性如荧光探针的发射波长、空间位置、朝向等参数都会使PSF形态产生变化。因此,从单分子图像中分析出单分子点所包含的信息就是单分子成像方法的核心。点扩散函数工程(PSF Engineering)是将单分子点信息编码进PSF,已成了热门研究课题。

自单分子定位方法诞生以来,出现了许多的PSF工程设计与实现方法,也逐渐出现了能获得某一参数的更精确信息或是能够同时获取多种信息的PSF设计。本文将阐述多维度的PSF工程技术,主要概括了目前的多维点扩散工程在单分子定位技术中对荧光点各个信息的解析,包括三维位置、发射波长以及偶极子朝向等,并简单介绍了单分子信息提取方法,最后讨论了多维度的PSF工程目前在显微成像中的优缺点,并对其在未来的发展进行展望。

## 2 点扩散函数的多维度信息提取

### 2.1 单分子二维定位

在宽场成像中,由于所有荧光分子同时发光,纳米尺度的生物结构会被掩盖(图1(a)),因此只有200 nm分辨率。而单分子成像,则利用了荧光分子的开关特性,使荧光探针不同步发光。在持续的激发光照射下,一小部分的探针被“打开”,稀疏分布的单分子图像将会被相机收集(图1(a), $t_1$ )。而在下一时刻已经被“打开”的单分子可能会被关闭,同时另一部分的探针将被“打开”(图1(a), $t_2$ )。部分单分子荧光不断地“打开”、“关闭”,大量的稀疏单分子图片将被采集,通过解析它们所蕴含的信息,最终便可以重构成一张高密度高分辨率图像。单分子二维定位则通过计算每一帧图像中PSF质心<sup>[17]</sup>的位置并进行高斯拟合<sup>[18]</sup>,从而得出荧光探针的二维坐标信息<sup>[19-21]</sup>,最终组合为高分辨率的二维图像(图1(b))。理论上每一个单分子图像都有一个唯一的坐标位置,然而在每一次成像中,光子因遵从泊松分布而具有一定概率性,因此定位结果也具有不确定性。在这种情况下一般能获得20 nm的二维定位精度。

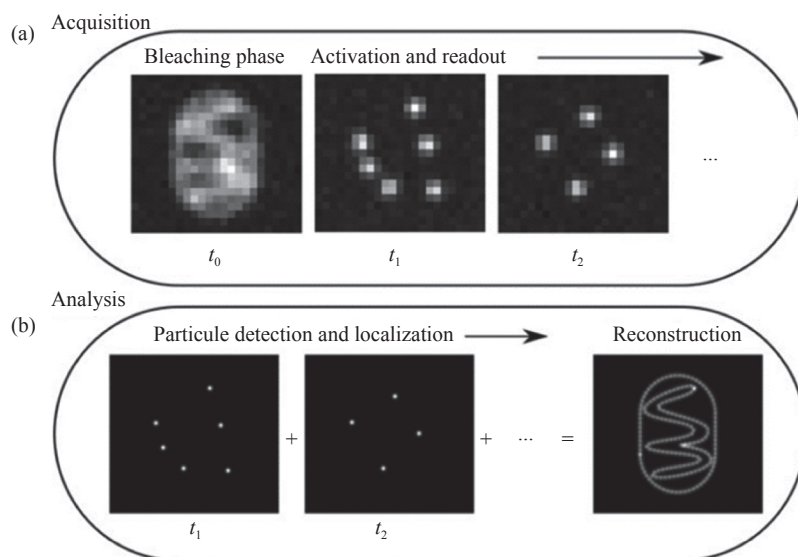


图 1 单分子二维定位<sup>[21]</sup>。(a) 在采集步骤中, 将会获取稀疏分布的单分子闪烁图像; (b) 分析步骤中, 从单帧图像中准确定位的单分子二维位置, 以及所有单分子点的合成图像。

Fig. 1 Two-dimensional localization of a single molecule<sup>[21]</sup>. (a) In the acquisition step, sparsely distributed single molecule images are recorded; (b) in the analysis step, the two-dimensional coordinates of the single molecules are precisely localized in each frame and then accumulated to reconstruct the super-resolution image

## 2.2 单分子三维位置信息的提取

生物研究中, 对细胞器空间分布以及蛋白质三维结构的研究具有重要意义, 因此获取单分子三维位置尤为重要。沿荧光探针不同轴向位置单分子图像的变化情况如图 2(a)所示。然而, 在焦点附近的标准 PSF 随轴向位置改变而产生的形态变化非常不明显(图 2(a))。同时, 处于焦点上方的单分子点产生的图像与下方的单分子图像形态过于相似, 难以区分单分子点轴向位置是处于焦平面上方还是下方。所以, 标准 PSF 通常不能获得较为精准的定位。

在早期 Huang 等<sup>[22-23]</sup>通过巧妙地在物镜后焦面插入柱面镜来打破焦点上下难以区分的困境。通过人为引入散光像差(astigmatism)将子午面焦点与弧矢面焦点错位, 在焦点平面上产生横、纵向拉伸的 PSF(图 2(b)), 拉伸幅度会随着单分子点与焦点距离的不同而有所不同。她们采用椭圆高斯拟合精准定位单分子点的三维位置, 焦点位置横向和轴向的定位精度为 10 nm 和 22 nm。由于其在焦点附近具有较高的轴向分辨率以及实现方式较为简单, 时至今日这都是单分子成像方法的最常用 PSF 工程之一。

比起借助已有透镜来调制不同形状的 PSF,

使用相位板(phase plate)、空间光调制器(Spatial Light Modulator, SLM)和可变形镜(Deformable Mirror, DM)<sup>[24]</sup>设计不同形状的 PSF 更灵活。2009 年, Moerner 实验室开发出了复杂的 PSF 并用于单分子成像领域, 他们基于高斯-拉盖尔模 PSF 调制理论<sup>[25-26]</sup>, 计算出一种旋转传播的 PSF 及其所需的相位, 并先后将 SLM 和相位板放置在物镜后焦面上, 成功将轴向位置信息编码进 PSF 中, 这种方法被命名为双螺旋(Double-Helix, D-H)PSF。图 2(c)两个旁瓣光斑会随着单分子点的轴向位置变化而发生旋转<sup>[27-28]</sup>。随后越来越多具有创意的 PSF 被应用在单分子成像领域, 例如在后焦面上放置相位斜坡(Phase ramp)产生能够发生相对滑动的 PSF<sup>[29]</sup>(图 2(d)), 单点旋转的螺旋(Corkscrew)PSF<sup>[30]</sup>(图 2(e)), 利用艾利光束的自弯曲性<sup>[31-32]</sup>开发的基于双通道无旁瓣 PSF<sup>[33]</sup>(图 2(f)), 图 2(g)为 SLM 调制下的光路布局图。

在上述 PSF 工程出现的数年间, 已经出现了许多能够随着三维位置出现较大变化的 PSF。它们虽然能够以各种形式解码出单分子的三维信息, 不过需要一个统一的指标来衡量 PSF 的定位精度。相机像素上收集到的光子数量在统计上服从泊松分布, 而克拉美罗下界(Cramér-Rao lower

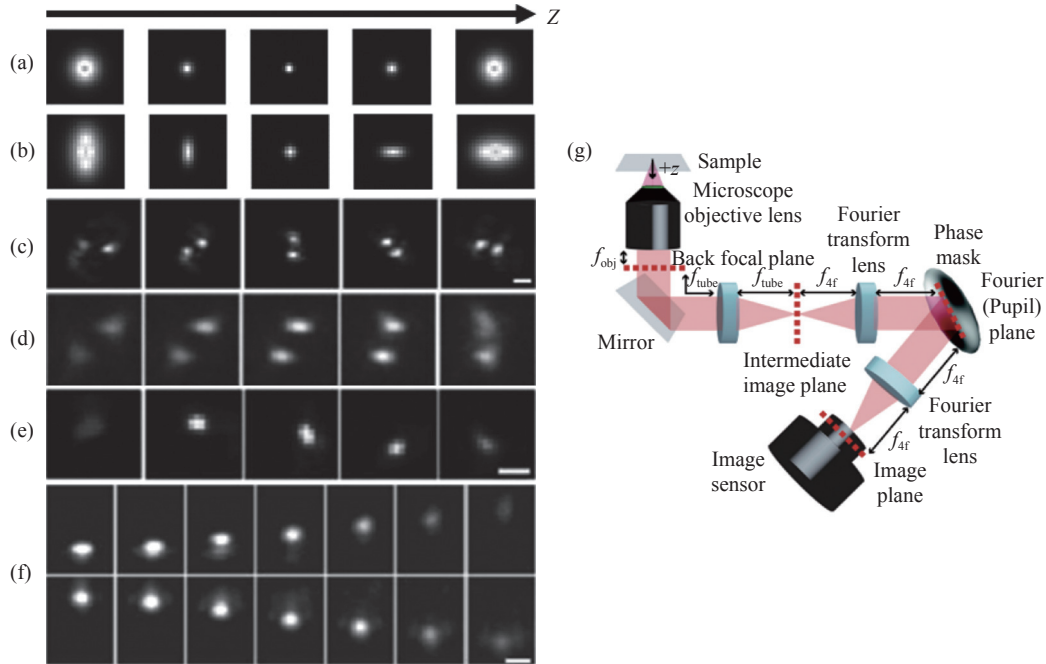


图 2 各 PSF 在不同轴向位置的变化及在 SLM 调制下的光路布局。(a)标准 PSF; (b)散光 PSF; (c)双螺旋 PSF<sup>[27-28]</sup>; (d)相位斜坡 PSF<sup>[29]</sup>; (e)螺旋 PSF<sup>[30]</sup>; (f)自弯曲 PSF<sup>[33]</sup>; (g) SLM 调制下的光路布局

Fig. 2 Changes of each PSF at different axial positions and optical path layout for SLM modulation. (a) The standard PSF; (b) astigmatism PSF; (c) double helix PSF<sup>[27-28]</sup>; (d) phase ramp PSF<sup>[29]</sup>; (e) spiral PSF<sup>[30]</sup>; (f) self-bending PSF<sup>[33]</sup>; (g) optical path layout for SLM modulation

bound, CRLB)是统计学上衡量无偏估计量是否有效的重要指标,如果一个拟合器有效,那么其拟合结果的标准差应该接近 CRLB,那么也可以说 CRLB 是该拟合器能达到的拟合精度极限<sup>[34-35]</sup>。

2014 年, Shechtman 等将光瞳函数的 55 项泽尼克(Zernike)多项式幅值作为优化参数<sup>[36]</sup>,以 CRLB 作为指标构建了一项损失函数:

$$\min_P \sum_{i=x,y,z} \sum_{z \in Z} \sqrt{CRLB_i(z)}, \quad (1)$$

其中  $i$  为 CRLB 的优化维度,  $z$  为单分子点轴向位置。利用该损失函数, Shechtman 等在  $1.5 \mu\text{m}$  的轴向范围内优化出了一个整体三维精度最优的鞍点(Saddle Point, SP)PSF,并用相位板实现了该 PSF,证明了其在三维坐标具有更高的定位精度。利用 CRLB 的优化方式具有维度选择性,譬如只以  $x, y$  的 CRLB 作为优化指标可以得到在二维坐标下定位精度较高的 PSF 或者只优化  $z$  维度 CRLB 得到轴向坐标定位精度较高的 PSF 等。

2015 年, Shechtman 等以轴向景深为优化目标,得出了可调节轴向定位范围的 Tetrapod PSF<sup>[37]</sup>(图 3,彩图见期刊电子版)。与  $1 \mu\text{m}$  轴向定位景

深的散光调制 PSF 相比,其景深能达到  $10 \mu\text{m}$ ,并实现了在微流通道(Microfluidic channel setup)中对单分子点追踪的应用。将光瞳函数的 Zernike 多项式系数作为优化参数的方法通常都会得到与 Tetrapod 类似的 PSF。虽然它们能获得较高的拟合精度,但是由于它们的光子分布较大,单个 PSF 可能占据几十个像素的宽度。当分子密度较高时,常会发生多个 PSF 重叠现象,传统的 PSF 提取程序很难将每个 PSF 完整分割。因此,这一类的 PSF 通常应用于密度较为稀疏的单分子追踪(Single Particle Tracking, SPT)或是平面轮廓分析<sup>[38-41]</sup>。近年来出现将深度学习应用在重叠 PSF 的分析方法<sup>[42-43]</sup>,使得大景深定位成像成为可能。

除了从荧光探针 PSF 中提取三维信息外,对激发光调制也能实现单分子三维定位。2017 年 Balzarotti 等基于探测局部最小激发光,借助 doughnut PSF 提出了 MINFLUX 成像技术,其横向分辨率能达到  $1 \text{ nm}$ <sup>[44]</sup>。2020 年, Klaus 等采用三维空心激发光 PSF,进一步使用 MINFLUX 实现了三维定位,其各项同性的定位精度甚至达到了  $3 \text{ nm}$ <sup>[45]</sup>。

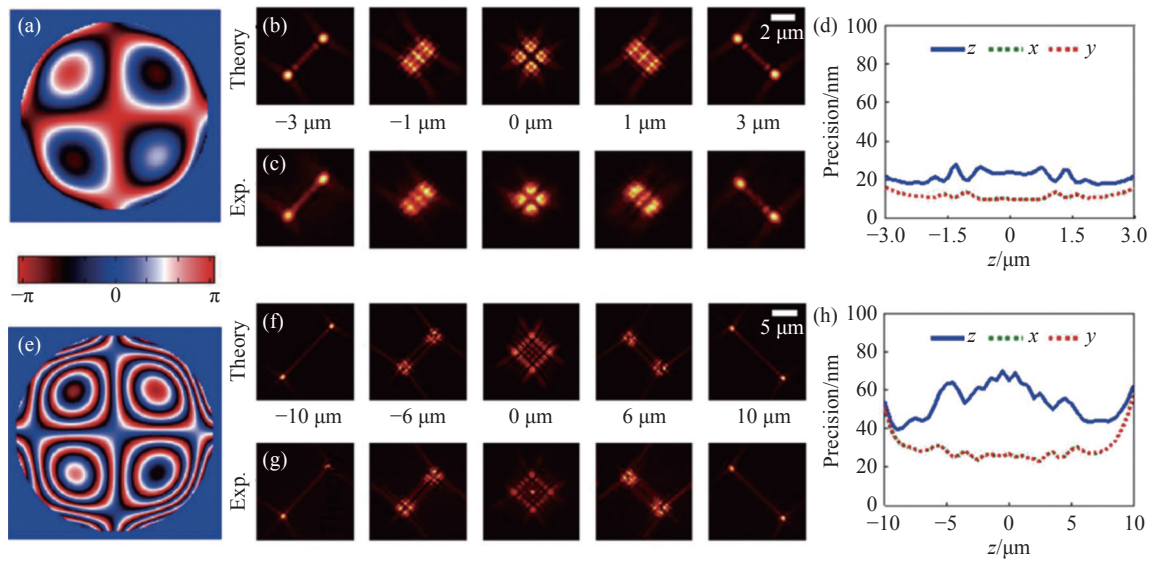


图 3 不同景深优化下的 Tetrapod PSF<sup>[37]</sup>。6  $\mu\text{m}$  优化景深下的光瞳函数(a), 理论 PSF(b), 实验 PSF(c), 定位精度(d)。(e) ~ (h)与(a) ~ (d)相同, 但是为 10  $\mu\text{m}$  优化景深下的 Tetrapod PSF。

Fig. 3 Tetrapod PSF optimized at different depths of field<sup>[37]</sup>. (a) The pupil function, (b) theoretical PSF, (c) experimental PSF, (d) localizing accuracy of Tetrapod PSF optimized for 6  $\mu\text{m}$  depth of field. (e) ~ (h) The same as (a) ~ (d), but for Tetrapod PSF optimized for 10  $\mu\text{m}$  depth of field.

### 2.3 单分子图像的波长信息提取

现代荧光标记技术十分灵活, 使用不同发射波长的荧光探针标记不同的细胞结构进行多色成像可以研究各细胞器的空间结构及相互作用。一般的实现手段是在光路上放置二向色镜, 将物镜接收到的发射光分为两路并分别成像在相机的两个区域, 根据两区域对应位置上的 PSF 强度比值即可推断出该点的发射波长。Ilaria 等根据这种方法实现了 PtK2 细胞的三色成像<sup>[46]</sup>。

虽然多通道分色能够区分发射波长十分接近的荧光探针, 但是这也意味着单一通道接收到的光子数降低, 与此同时, 其拟合精度就会下降, 而且采用不同发射波长的探针可能都要重新挑选二向色镜的分光波长, 适用性并不普遍。2016 年, Broeken 等借助衍射原理, 通过 SLM 调制的稀疏光栅, 令原本只有一个光点的 PSF 衍射为 +1、-1 和 0 级衍射亮点, 测量 1 级极大值间隔获取其波长大小。在 1000 光子数时其波长拟合精度可达到 10 nm, 实现了二维位置和荧光波长的同时测量<sup>[47]</sup>。2016 年, Smith 等借助 SLM 更进一步设计了弯曲光栅的后焦面调制, 如图 4(a)~4(b)所示, 开发出了能够同时拟合三维位置信息和波长信息的 PSF<sup>[48]</sup>。该设计同样是利用 1 级衍射距离判断波

长, 同时在不同的深度会发生显著变化(图 4(c)), 在平均光子数为 800 时其拟合光谱精度达 10~20 nm, 轴向精度达 25~50 nm。

除了采用干涉、衍射方法区分波长外, 还有基于色散原理设计 PSF。Zhang 等<sup>[49]</sup>通过在双通道分别插入柱面镜和分光棱镜的方法, 实现了三维位置和荧光光谱的同时定位, 并用该方法对差别为 10 nm 的 4 种染料进行无串扰三维成像。在 SLM 中, 即使施加电压相同, 不同波长的光经过后相位改变也略有差别, 针对这一问题, Shechtman 等通过最小二乘法计算出一种波长适应的 SLM 电压<sup>[50]</sup>, 在同一个 SLM 调制下, 实现了红光和绿光具有 45° 角度差的 Tetrapod PSF, 并进行了微管-线粒体的双色成像。2019 年, Hershko 等基于上述思路, 通过神经网络在仿真系统中优化出一组具有特定波长响应 SLM 电压<sup>[51]</sup>, 实现了同一视场分辨 4 种波长的单分子。

随着深度学习在成像领域的发展, 许多以往不被注意的细节都能被机器学习解析出来。2019 年, Kim 等将两份由不同染料单独标记的原始图片放入神经网络中进行训练<sup>[52]</sup>, 让网络学习到各 PSF 的轴向和颜色细节特征, 然后应用在未知样品的三维位置定位及颜色分辨上(图 5)。

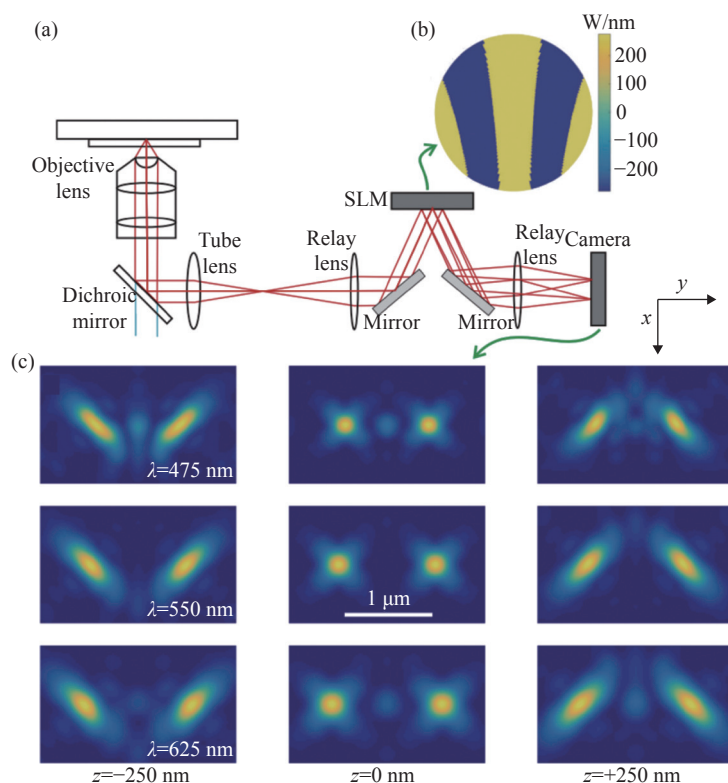


图 4 同时测量单分子的发射波长与三维位置<sup>[48]</sup>。(a)光路设计图, SLM 放置在后焦面上; (b)弯曲光栅的光瞳函数; (c)3 种波长在不同位置下的 PSF 分布, 波长越长 2 个旁瓣的距离越远

Fig. 4 Simultaneous measurement of emission wavelength and 3D position of single molecules<sup>[48]</sup>. (a) Optical path design with an SLM placed on the back focal plane; (b) pupil function of curved grating; (c) PSF distributions of three different wavelengths at different localizations. The longer the wavelength, the farther the distance between the two side lobes

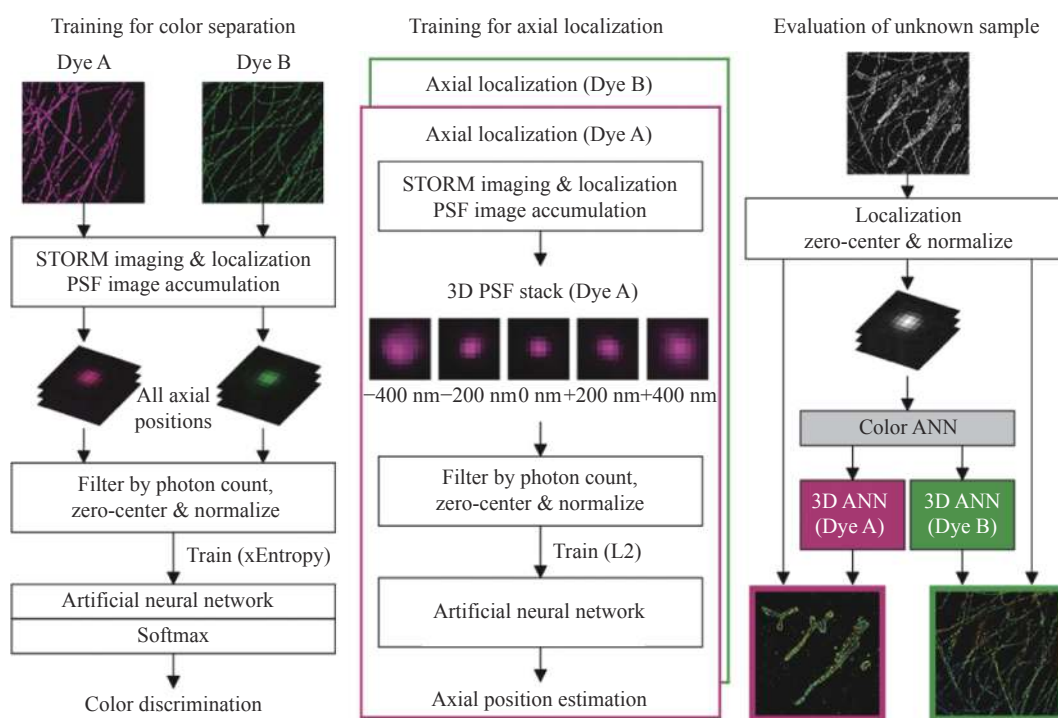


图 5 基于神经网络的信息提取方法<sup>[52]</sup>

Fig. 5 Information extraction method based on artificial neural network<sup>[52]</sup>

Kim 的报告进一步证明了即使对于标准 PSF, 也能解析出更多的信息, 展现了计算科学的发展对显微成像领域的推动作用。

#### 2.4 基于单分子图像的偶极子朝向的参数提取

在大部分的 PSF 建模过程中, 通常假设单分子点发射都是各向同性的。然而在许多情况下单分子点会表现出各向异性, 物理层面上表现为具有方向指向的偶极子。对于自由旋转的单分子点来说, 由于其朝向每时每刻都在改变, 故在相机曝光时间内能够收集到的光在各个方向的光强比例大致相同。但是如果单分子点被限制在某个方向上时偏振光强分布会发生偏移, 对应的 PSF 的中心会出现大约 100 nm 的偏差<sup>[53-54]</sup>。在如图 6(e)

所示偶极子模型中, 其在  $xy$  面的偏转角称为方位角 (azimuthal angle), 表示为  $\phi$ , 与光轴之间的夹角称为极角 (polar angle), 表示为  $\theta$ , 同时由于偶极子可能并未完全固定, 自身也会发生旋转振动, 转动角度称为转动角  $\alpha$ 。当转动角较小时, 偶极子光强分布较不均匀, 反之, 则更偏向于各向同性, 如图 6(a) ~ 6(c) (彩图见期刊电子版)。此外, 极角大小也会影响 PSF 偏移量的大小 (图 6(d))。因此, 获取偶极子朝向可以补偿 PSF 的横向偏移, 提高定位精度; 而偶极子朝向在研究膜蛋白相互作用以及排列方式上也具有非常重要的指示作用<sup>[55-57]</sup>。

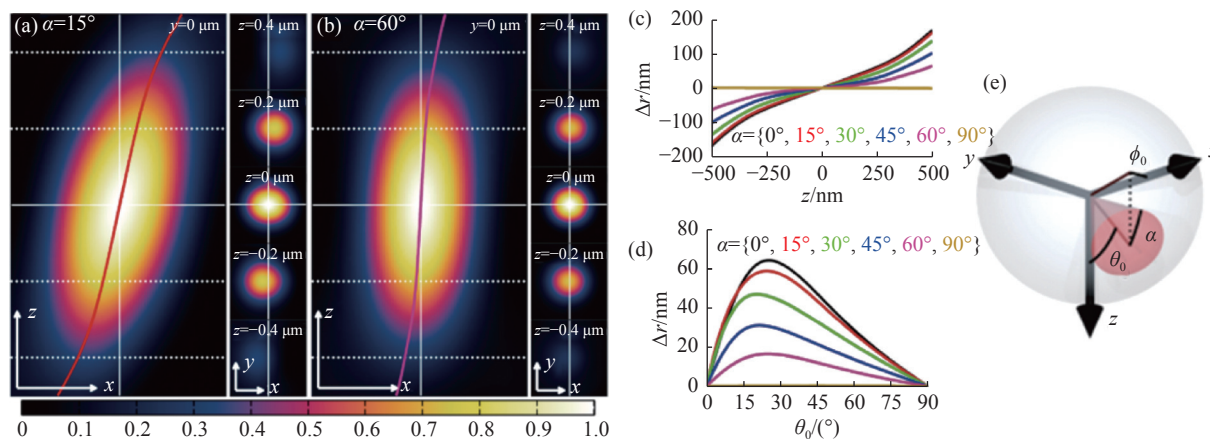


图 6 偶极子方向引起的定位偏差<sup>[53]</sup>。(a) 转动角、极角、方位角分别为  $15^\circ$ 、 $45^\circ$ 、 $0^\circ$  时单分子点的 PSF  $xz$  切面 (左图),  $xy$  切面 (右图), 以及其定位偏差; (b) 极角、方位角与 (a) 相同的情况下转动角为  $60^\circ$  的 PSF; (c) 和 (d) 分别为不同转动角, 极角产生的横向偏移值; (e) 转动角、极角、方位角在偶极子中的物理意义

Fig. 6 Localization deviation caused by the dipole's direction<sup>[53]</sup>. (a) PSF  $xz$  section (left) and  $xy$  section (right) of single molecule with a rotation angle, polar angle and azimuth angle of  $15^\circ$ ,  $45^\circ$  and  $0^\circ$  respectively, and corresponding localization deviations; (b) PSF with the same polar angle and azimuth angle as (a) and rotation angle of  $60^\circ$ . (c) and (d) are the lateral offsets generated by different rotation angles and polar angles, respectively; (e) physical meaning of rotation angle, polar angle and azimuth angle of the dipole

2012 年, Mikael 等尝试通过双螺旋 PSF 来获得偶极子朝向<sup>[58]</sup>, 他们运用偏振分束棱镜将两正交偏振光分开实现双通道成像 (图 7, 彩图见期刊电子版)。虽然利用各通道的光子比例 LD (Linear Dichroism) 可以大致推断出方位角  $\phi$  的朝向, 但偶极子极角  $\theta$  还未确定。接着, 他们根据双螺旋 PSF 特征引入了旁瓣不对称性 LA (Lobe Asymmetry) 用以描述极角大小。LA 指标的引入, 解决了只考虑光子比率 LD 时定位结果简并的问题。

当两参数确定时能够得到唯一的偶极子朝向结果。

涡旋相位板 (Vortex phase plate) 是一种能将高斯光束调制为空心圆环的螺旋递增相位板, 通常应用在 STED 显微镜<sup>[59]</sup> 的激发光整形中。2021 年, Hulleman 等将涡旋相位板放置在成像光路的傅立叶面上<sup>[60]</sup>, 调制出 Vortex PSF, 如图 8(a) (彩图见期刊电子版) 所示。Vortex PSF 与标准 PSF 相比, 其偶极子朝向拟合精度有所提高, 如图 8(b)~



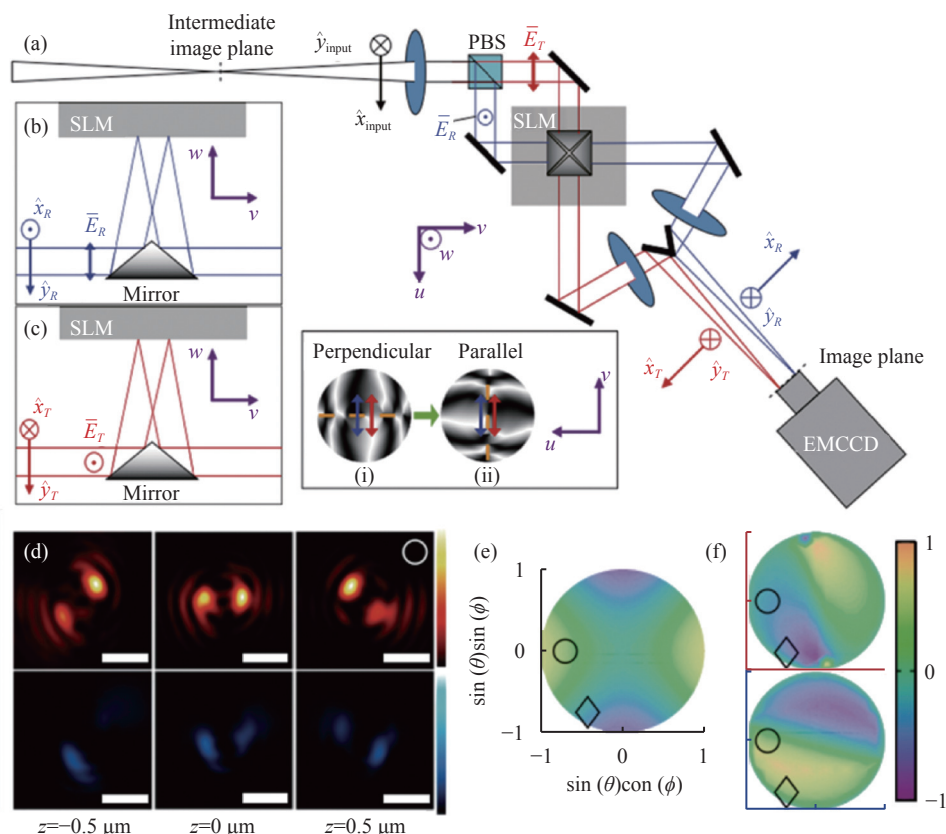
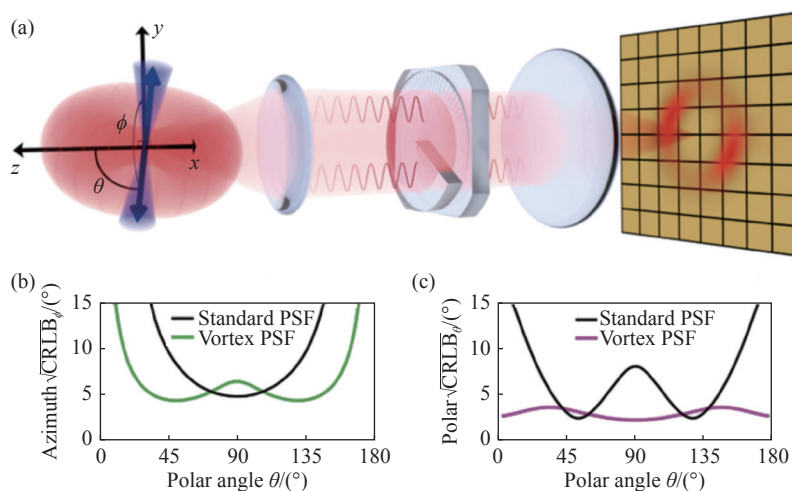


图 7 基于双螺旋 PSF 的偶极子方向定位方法<sup>[58]</sup>。(a)光路布局;(b)和(c)分别为两个偏振方向的成像通道,它们的光瞳函数分别为(i)、(ii);(d)上下图分别为水平和垂直通道的 PSF;(e)和(f)分别为 LA、LD 指标,只考虑 LA 指标时会出现 4 种可能的朝向结果。红色和蓝色分别代表透射通道和反射通道的 LD 指标

Fig. 7 Dipole orientation localization method based on double helix PSF<sup>[58]</sup>. (a) Optical path layout; (b) and (c) are imaging channels in two polarization directions, respectively, and their pupil functions are (i) and (ii) respectively; (d) the upper and lower figures are PSF of horizontal and vertical channels, respectively; (e) and (f) are LA and LD indicators respectively. There are four possible orientations when only the LA indicator is considered. Red and blue represent LD indexes of transmission channel and reflection channel respectively

8(c)所示,由于 PSF 较为紧凑,单分子图像的信噪比得到提高。他们利用这种方法实现了  $\lambda$ -DNA

的偶极子朝向和三维位置的同时定位(图 8(d) (彩图见期刊电子版))。



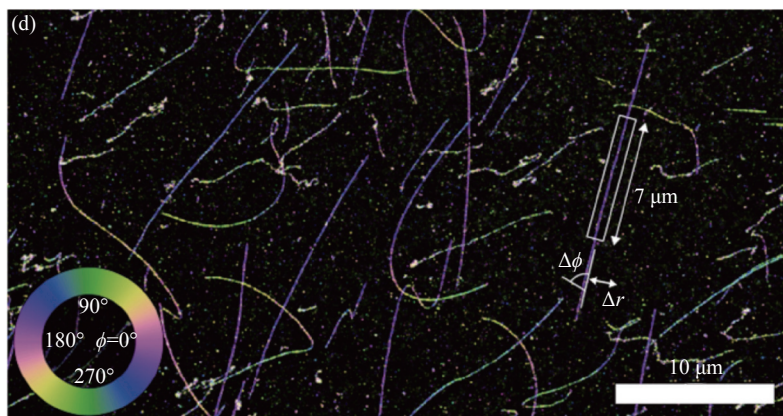


图 8 基于 vortex PSF 的朝向与三维位置同时定位<sup>[60]</sup>。(a)Vortex PSF 光路; 在 4000 个光子 10 个背景光子的单分子图像中, (b)方位角  $\phi$  和(c)极角  $\theta$  的 CRLB; (d) $\lambda$ -DNA 的二维位置及方位角, 伪色代表该点方位角, 大小如左下角

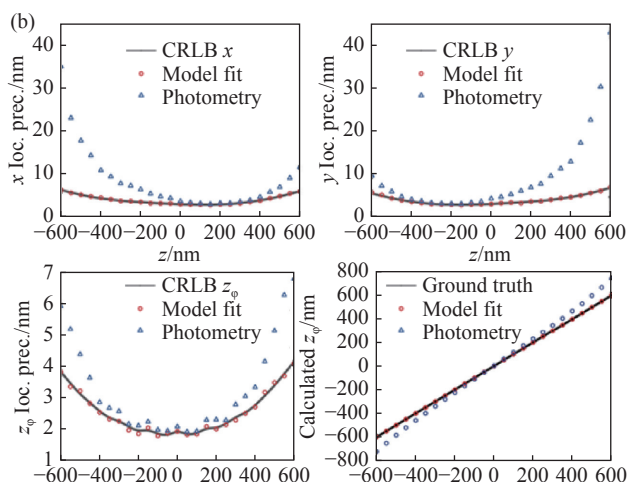
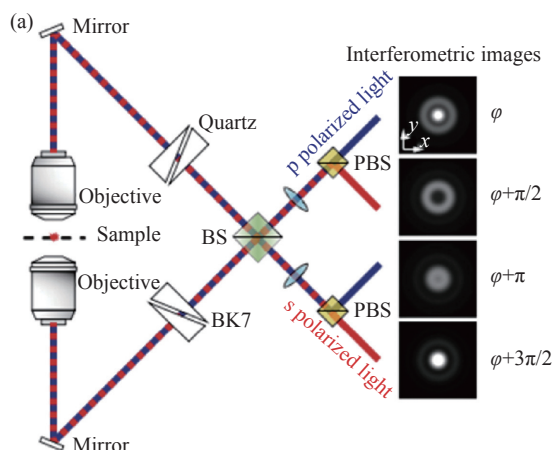
Fig. 8 Simultaneous localization of the single-molecule orientation and three-dimensional location based on vortex PSF<sup>[60]</sup>. (a) Vortex PSF's optical path; CRLB of azimuth angle (b) and polar angle (c) in single molecule imaging with 4000 photons and 10 background photons; (d) 2D position and azimuthal angle of the  $\lambda$ -DNA. The false color represents the azimuthal angle, as shown in the lower left corner

### 2.5 4Pi 显微镜的相位提取

20 世纪 90 年代, Hell 等提出了一种双物镜成像系统架构<sup>[61]</sup>。与单物镜系统相比, 其几乎接收了全立体角( $4\pi$ )的荧光并发生自干涉, 因此被称为 4Pi 显微镜。其轴向分辨率比宽场时提高了数倍。将单分子定位成像法与 4Pi 显微镜的结合可使轴向分辨率达到纳米级别<sup>[62]</sup>, 这种成像方式被称为 4Pi-SMLM。利用分束器将上下物镜的光重叠并进行干涉成像是 4Pi-SMLM 的光路设计特点<sup>[63-64]</sup>。将上下通道分别延迟不同的相位并在多个通道成像, 各个通道的单分子图像相对光强反映了其干涉相位。由于各通道光强对于相位变化十分敏感, 轴向分辨率能达到单物镜系统的 6 ~ 10 倍, 实现亚 10 nm 精度的轴向定位<sup>[10]</sup>。

在 4Pi PSF 中存在 4 个相互独立的维度, 即

$x$ 、 $y$ 、 $z$  和两物镜接收到单分子荧光的相位延迟  $\phi$ 。因此, 建立 4Pi PSF 模型就需要获取各个轴向位置和干涉相位下的 4Pi PSF, 然而这需要精确的相位延迟方法, 这在操作上是难以实现的。2020 年 Li 等在相同光路中(图 9(a)), 通过 IAB 模型从轴向位置中解耦出干涉相位项, 从实验采集的 PSF 中建立更真实的 4Pi PSF 模型<sup>[65]</sup>, 如图 9(c) 所示。IAB 模型可以将四通道实验 PSF 分成 3 个与相位  $\phi$  无关的矩阵  $I$ 、 $A$ 、 $B$ , 只需要校准 3 个三维矩阵就可以完整表达一个实验型的四维的 4Pi-PSF, 避免了对四维 4Pi-PSF 的直接校准。解决了由于温度变化对光程的改变所引起的定位偏移, 结果证明了 IAB 模型能够达到理论定位精度, 如图 9(b)(彩图见期刊电子版)所示。



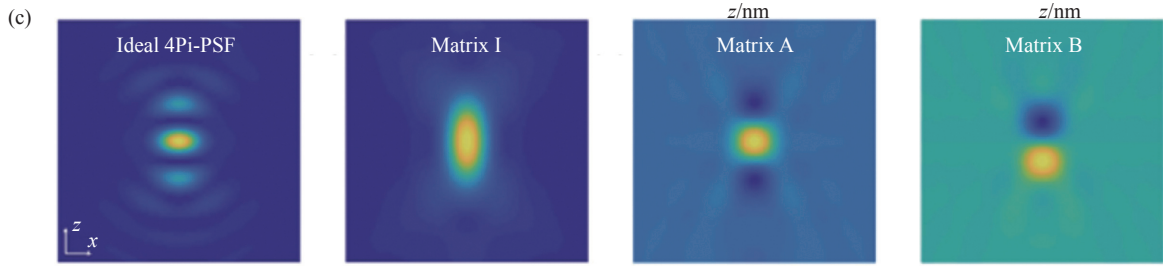


图 9 IAB 模型分解的 4Pi-PSF<sup>[65]</sup>。(a)四通道 4Pi-SMLM 光路结构以及各通道的 PSF; (b)每个物镜接收 2000 光子以及 20 个背景光子下,通过光度法和 IAB 模型拟合得到的各维度定位精度; (c)理想的 4Pi-PSF 与分解出来的 IAB 矩阵

Fig. 9 4Pi-PSF decomposed by IAB model<sup>[65]</sup>. (a) The optical path layout of 4-channel 4Pi-SMLM and the PSFs of each channel; (b) localization accuracy of each dimension obtained by photometric method and IAB model fitting for single molecule of 2,000 photons collected by each objective lens; (c) ideal 4Pi-PSF and decomposed IAB matrix

此外, IAB 模型还克服了光度法(photometry)在高数值孔径物镜产生定位偏差的问题。由于 4Pi 实验装置是一个多通道光路,天然适合进行多色单分子成像。2022 年, Chen 等提出只需在原有 4Pi 实验装置中  $\pi/2$  和  $3\pi/2$  光路插入滤光片, 就能实现目前最简洁的多色 4Pi 成像系统<sup>[66]</sup>, 并且相比传统的多色 4Pi 方法<sup>[67]</sup> 提升了光子利用率。

### 3 点扩散函数模型和分析方法

#### 3.1 点扩散函数建模

##### 3.1.1 高斯模型拟合

虽然从光学计算角度出发,点光源在像平面的光强分布并非是高斯分布,但是因为艾瑞(Airy)光斑与高斯的形状相似,且高斯模型的计算更为简单而被广泛使用<sup>[68]</sup>。二维高斯计算模型为:

$$I(x, y, x_0, y_0) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} \exp\left[-\frac{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2}{2\sigma^2}\right] \quad (2)$$

式(2)中,  $x_0, y_0$  为高斯中心位置,  $\sigma$  为二维高斯宽度。

不过高斯拟合结构简单,对于存在由像差、特定偏振等导致的不对称的 PSF 并不适用。随着单分子点远离焦点位置,艾瑞光斑会显示出明显的衍射环图案,高斯模型已不足以描述其变化。总的来说,高斯模型拟合在单分子点处于焦点附近百纳米的对称 PSF 时,能够实现理论的二维定位精度。然而在复杂的光学调制情况下,还需要更为真实的 PSF 模型。

##### 3.1.2 三次样条插值的实验点扩散函数模型拟合

为了还原 PSF 的精细结构,通常根据光场分布建立 PSF 模型,对于大数值孔径物镜的成像系

统,还需要使用考虑电场偏振的矢量模型<sup>[69-70]</sup>。然而它们的计算较为复杂,并且光学系统与理想系统存在偏差,通常需要进一步校准。采用图形处理将离散模型连续化的样条插值建模则可以避免这样的问题<sup>[71-72]</sup>:

$$f_{i,j,k}(x, y, z) = \sum_{m=0}^3 \sum_{n=0}^3 \sum_{p=0}^3 a_{i,j,k,m,n,p} \cdot \left(\frac{x-x_i}{\Delta x}\right)^m \left(\frac{y-y_j}{\Delta y}\right)^n \left(\frac{z-z_k}{\Delta z}\right)^p, \quad (3)$$

其中  $\Delta x, \Delta y, \Delta z$  分别为  $x, y$  方向像素大小和轴向步长,  $m, n, p$  为各维度阶数,  $a_{i,j,k,m,n,p}$  为插值系数。每一个位置的 PSF 强度至多需要 64 个多项式参与计算。

通过在载玻片上放置荧光珠,移动  $z$  轴位移台,可以获得三维实验 PSF 图像。随后采用插值算法将其连续化,便可建立更真实的插值 PSF 模型。通过将实验采集图像与插值 PSF 进行极大似然估计或是最小二乘法,找出最为相似的 PSF 模型,从而解析单分子图像中的信息。由于插值算法形式固定,因此可以便捷地采用硬件辅助, Li 等利用 GPU 加速计算实现了每秒拟合十万个单分子点的高速拟合<sup>[72]</sup>。

#### 3.2 神经网络的信息提取

深度学习算法的出现解决了密集且复杂的 PSF 无法进行单分子定位成像的问题。2018 年, Nehme 等开发出一套基于卷积神经网络算法的单分子定位工具 Deep-STORM<sup>[42]</sup>。通过提前设置单分子点密度和信噪比生成单分子图片,训练出能够从重叠的单分子图片中还原二维位置的神经网络。他们演示了通过这种方法解析信噪比较低的

仿真图像以及实验成像的微管二维定位。

2020 年 Nehme 等进一步开发出能够进行三维定位的神经网络 Deep STORM3D<sup>[43]</sup>。他们随机生成大量不同轴向位置的高密度单分子仿真图像,不断优化网络直到能够有效还原单分子点的真实位置,训练网络对重叠 PSF 的三维定位能力,从而实现高密度单分子定位(如图 10 所示)。通过这种方法他们实现了使用 Tetrapod PSF 对 COS-7 细胞上高标记密度线粒体的三维成像。由于训练模型的可选择性,他们也实现了该系统对多种 PSF 的三维定位。

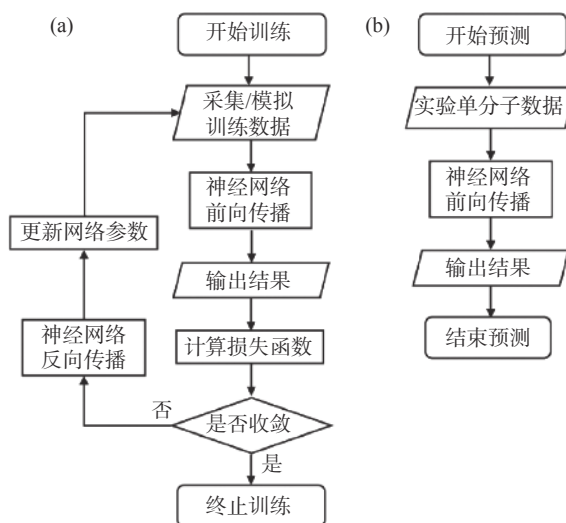


图 10 基于卷积神经网络的单分子定位流程图。(a)网络训练步骤;(b)定位步骤

Fig. 10 Flowchart of single molecule localization based on convolutional neural network. (a) Network training steps; (b) localizing steps

2021 年, Artur 等基于上述定位方法,考虑了跨邻帧中所蕴含的信息的相关性(Temporal Context),开发出上下文依赖的深度学习定位方法 DE-CODE<sup>[73]</sup>。与 Deep STORM3D 相比,其高密度 PSF 的定位速度提高了 10 倍,准确率提高了 2 倍,在达到理论定位精度的同时对定位结果还可做出不

#### 参考文献:

- [1] GUSTAFSSON M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 198(2): 82-87.
- [2] GUSTAFSSON M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(37): 13081-13086.
- [3] BLOM H, WIDENGREN J. Stimulated emission depletion microscopy[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(11): 7377-

确定度预测。虽然基于深度学习的单分子定位能够实现快速计算,但是每当光学系统发生变化时,都需要花费数小时重新训练网络,不过迁移学习能够缩短新网络建立成本,随着算法的进一步发展,神经网络可能将会被广泛应用于单分子成像中。

## 4 结束语

在成像技术中,PSF 一直都被视为解析单分子点信息的窗口之一。本文介绍了二维单分子定位,多种三维 PSF 工程设计,以及从 PSF 提取出的多维度信息,包括荧光发射波长、偶极子朝向、自干涉相位,最后介绍了常用的定位方法。

需要指出的是,对 PSF 进行改造虽然提高了其对于某一维度的定位精度,但是同时也常需要对另外一些性能做出取舍,譬如增大了 PSF 面积,或是降低了其他维度的定位精度、缩短了定位范围等。因此,常常需要结合应用场景以及需要解析的单分子信息,挑选合适的 PSF 进行单分子成像。

由于单分子定位成像涉及到成像原理、材料特性、数据处理等多领域,因此进一步探索多维度信息可以从以下几个方面出发:通过添加额外的光学设备以增加研究维度,譬如通过检偏器测量单分子朝向<sup>[48]</sup>;通过荧光材料特征反映细胞微环境,解析荧光寿命分辨标记的染料类型<sup>[74]</sup>;从需要探究的问题中寻找定位维度,譬如单分子追踪中的运动模型参数<sup>[75]</sup>;从具有误差的图像中还原单分子信息,如校准由于折射率不匹配导致的定位误差<sup>[76]</sup>;通过高效的算法提升成像质量,譬如多通道全局拟合定位<sup>[77]</sup>等。总的来说,多维度单分子成像研究是一个多领域、多方向的课题,随着更多学科的加入,已经展现出了巨大的研究潜能和宽广的应用前景。

- 7427.
- [4] HELL S W, WICHMANN J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy[J]. *Optics Letters*, 1994, 19(11): 780-782.
- [5] KLAR T A, JAKOBS S, DYBA M, *et al.*. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(15): 8206-8210.
- [6] RUST M J, BATES M, ZHUANG X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-796.
- [7] HEILEMANN M, VAN DE LINDE S, SCHÜTTPELZ M, *et al.*. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, 47(33): 6172-6176.
- [8] ZHUANG X W. Nano-imaging with STORM[J]. *Nature Photonics*, 2009, 3(7): 365-367.
- [9] BETZIG E, PATTERSON G H, SOUGRAT R, *et al.*. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution[J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [10] SHTENDEL G, GALBRAITH J A, GALBRAITH C G, *et al.*. Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(9): 3125-3130.
- [11] SHROFF H, WHITE H, BETZIG E. Photoactivated localization microscopy (PALM) of adhesion complexes[J]. *Current Protocols in Cell Biology*, 2013, 58(1): 4.21.1-24.21.28.
- [12] LIU Y J, LU Y Q, YANG X S, *et al.*. Amplified stimulated emission in upconversion nanoparticles for super-resolution nanoscopy[J]. *Nature*, 2017, 543(7644): 229-233.
- [13] ZHAN Q Q, LIU H CH, WANG B J, *et al.*. Achieving high-efficiency emission depletion nanoscopy by employing cross relaxation in upconversion nanoparticles[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 1058.
- [14] LIANG L L, FENG Z W, ZHANG Q M, *et al.*. Continuous-wave near-infrared stimulated-emission depletion microscopy using downshifting lanthanide nanoparticles[J]. *Nature Nanotechnology*, 2021, 16(9): 975-980.
- [15] SCHNITZBAUER J, STRAUSS M T, SCHLICHTHAERLE T, *et al.*. Super-resolution microscopy with DNA-PAINT[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(6): 1198-1228.
- [16] SCHUEDER F, LARA-GUTIÉRREZ J, BELIVEAU B J, *et al.*. Multiplexed 3D super-resolution imaging of whole cells using spinning disk confocal microscopy and DNA-PAINT[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 2090.
- [17] JIA H, YANG J K, LI X J. Minimum variance unbiased subpixel centroid estimation of point image limited by photon shot noise[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2010, 27(9): 2038-2045.
- [18] STALLINGA S, RIEGER B. Accuracy of the gaussian point spread function model in 2D localization microscopy[J]. *Optics Express*, 2010, 18(24): 24461-24476.
- [19] SMALL A, STAHLHEBER S. Fluorophore localization algorithms for super-resolution microscopy[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(3): 267-279.
- [20] PATTERSON G, DAVIDSON M, MANLEY S, *et al.*. Superresolution imaging using single-molecule localization[J]. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2010, 61: 345-367.
- [21] HERBERT S, SOARES H, ZIMMER C, *et al.*. Single-molecule localization super-resolution microscopy: deeper and faster[J]. *Microscopy and Microanalysis*, 2012, 18(6): 1419-1429.
- [22] HUANG B, WANG W Q, BATES M, *et al.*. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy[J]. *Science*, 2008, 319(5864): 810-813.
- [23] HOLTZER L, MECKEL T, SCHMIDT T. Nanometric three-dimensional tracking of individual quantum dots in cells[J]. *Applied Physics Letters*, 2007, 90(5): 053902.
- [24] FU SH, LI M F, ZHOU L L, *et al.*. Deformable mirror based optimal PSF engineering for 3D super-resolution imaging[J]. *Optics Letters*, 2022, 47(12): 3031-3034.
- [25] PIESTUN R, SCHECHNER Y Y, SHAMIR J. Propagation-invariant wave fields with finite energy[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2000, 17(2): 294-303.
- [26] GREENGARD A, SCHECHNER Y Y, PIESTUN R. Depth from diffracted rotation[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(2): 181-183.
- [27] PAVANI S R P, PIESTUN R. High-efficiency rotating point spread functions[J]. *Optics Express*, 2008, 16(5): 3484-

- 3489.
- [28] PAVANI S R P, THOMPSON M A, BITEEN J S, *et al.*. Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(9): 2995-2999.
- [29] BADDELEY D, CANNELL M B, SOELLER C. Three-dimensional sub-100 nm super-resolution imaging of biological samples using a phase ramp in the objective pupil[J]. *Nano Research*, 2011, 4(6): 589-598.
- [30] LEW M D, LEE S F, BADIEIROSTAMI M, *et al.*. Corkscrew point spread function for far-field three-dimensional nanoscale localization of pointlike objects[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(2): 202-204.
- [31] SIVILOGLOU G A, BROKLY J, DOGARIU A, *et al.*. Observation of accelerating airy beams[J]. *Physical Review Letters*, 2007, 99(21): 213901.
- [32] SIVILOGLOU G A, CHRISTODOULIDES D N. Accelerating finite energy airy beams[J]. *Optics Letters*, 2007, 32(8): 979-981.
- [33] JIA SH, VAUGHAN J C, ZHUANG X W. Isotropic three-dimensional super-resolution imaging with a self-bending point spread function[J]. *Nature Photonics*, 2014, 8(4): 302-306.
- [34] LIU SH, KROMANN E B, KRUEGER W D, *et al.*. Three dimensional single molecule localization using a phase retrieved pupil function[J]. *Optics Express*, 2013, 21(24): 29462-29487.
- [35] ZELGER P, KASER K, ROSSBOTH B, *et al.*. Three-dimensional localization microscopy using deep learning[J]. *Optics Express*, 2018, 26(25): 33166-33179.
- [36] SHECHTMAN Y, SAHL S J, BACKER A S, *et al.*. Optimal point spread function design for 3D imaging[J]. *Physical Review Letters*, 2014, 113(13): 133902.
- [37] SHECHTMAN Y, WEISS L E, BACKER A S, *et al.*. Precise three-dimensional scan-free multiple-particle tracking over large axial ranges with tetrapod point spread functions[J]. *Nano Letters*, 2015, 15(6): 4194-4199.
- [38] GORDON-SOFFER R, WEISS L E, ESHEL R, *et al.*. Microscopic scan-free surface profiling over extended axial ranges by point-spread-function engineering[J]. *Science Advances*, 2020, 6(44): eabc0332.
- [39] ZHOU Y ZH, CARLES G. Precise 3D particle localization over large axial ranges using secondary astigmatism[J]. *Optics Letters*, 2020, 45(8): 2466-2469.
- [40] WEISS L E, SHALEV EZRA Y, GOLDBERG S, *et al.*. Three-dimensional localization microscopy in live flowing cells[J]. *Nature Nanotechnology*, 2020, 15(6): 500-506.
- [41] JIN D Y, XI P, WANG B M, *et al.*. Nanoparticles for super-resolution microscopy and single-molecule tracking[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(6): 415-423.
- [42] NEHME E, WEISS L E, MICHAELI T, *et al.*. Deep-STORM: super-resolution single-molecule microscopy by deep learning[J]. *Optica*, 2018, 5(4): 458-464.
- [43] NEHME E, FREEDMAN D, GORDON R, *et al.*. DeepSTORM3D: dense 3D localization microscopy and PSF design by deep learning[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(7): 734-740.
- [44] BALZAROTTI F, EILERS Y, GWOSCH K C, *et al.*. Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes[J]. *Science*, 2017, 355(6325): 606-612.
- [45] GWOSCH K C, PAPE J K, BALZAROTTI F, *et al.*. MINFLUX nanoscopy delivers 3D multicolor nanometer resolution in cells[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(2): 217-224.
- [46] TESTA I, WURM C A, MEDDA R, *et al.*. Multicolor fluorescence nanoscopy in fixed and living cells by exciting conventional fluorophores with a single wavelength[J]. *Biophysical Journal*, 2010, 99(8): 2686-2694.
- [47] BROEKEN J, RIEGER B, STALLINGA S. Simultaneous measurement of position and color of single fluorescent emitters using diffractive optics[J]. *Optics Letters*, 2014, 39(11): 3352-3355.
- [48] SMITH C, HUISMAN M, SIEMONS M, *et al.*. Simultaneous measurement of emission color and 3D position of single molecules[J]. *Optics Express*, 2016, 24(5): 4996-5013.
- [49] ZHANG ZH Y, KENNY S J, HAUSER M, *et al.*. Ultrahigh-throughput single-molecule spectroscopy and spectrally resolved super-resolution microscopy[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(10): 935-938.
- [50] SHECHTMAN Y, WEISS L E, BACKER A S, *et al.*. Multicolour localization microscopy by point-spread-function engineering[J]. *Nature Photonics*, 2016, 10(9): 590-594.
- [51] HERSHKO E, WEISS L E, MICHAELI T, *et al.*. Multicolor localization microscopy and point-spread-function

- engineering by deep learning[J]. *Optics Express*, 2019, 27(5): 6158-6183.
- [52] KIM T, MOON S, XU K. Information-rich localization microscopy through machine learning[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1996.
- [53] LEW M D, BACKLUND M P, MOERNER W E. Rotational mobility of single molecules affects localization accuracy in super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Nano Letters*, 2013, 13(9): 3967-3972.
- [54] ENGELHARDT J, KELLER J, HOYER P, *et al.*. Molecular orientation affects localization accuracy in superresolution far-field fluorescence microscopy[J]. *Nano Letters*, 2011, 11(1): 209-213.
- [55] ZHANGHAO K, CHEN L, YANG X S, *et al.*. Super-resolution dipole orientation mapping via polarization demodulation[J]. *Light: Science & Applications*, 2016, 5(10): e16166.
- [56] ZHANGHAO K, GAO J T, JIN D Y, *et al.*. Super-resolution fluorescence polarization microscopy[J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2018, 11(1): 1730002.
- [57] ZHANGHAO K, CHEN X Y, LIU W H, *et al.*. Super-resolution imaging of fluorescent dipoles via polarized structured illumination microscopy[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 4694.
- [58] BACKLUND M P, LEW M D, BACKER A S, *et al.*. Simultaneous, accurate measurement of the 3D position and orientation of single molecules[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(47): 19087-19092.
- [59] WILLIG K I, RIZZOLI S O, WESTPHAL V, *et al.*. STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis[J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 935-939.
- [60] HULLEMAN C N, THORSEN R Ø, KIM E, *et al.*. Simultaneous orientation and 3D localization microscopy with a Vortex point spread function[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 5934.
- [61] HELL S, STELZER E H K. Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 1992, 9(12): 2159-2166.
- [62] HAO X, LI Y M, FU SH, *et al.*. Review of 4Pi fluorescence nanoscopy[J]. *Engineering*, 2022, 11: 146-153.
- [63] AQUINO D, SCHÖNLE A, GEISLER C, *et al.*. Two-color nanoscopy of three-dimensional volumes by 4Pi detection of stochastically switched fluorophores[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(4): 353-359.
- [64] HUANG F, SIRINAKIS G, ALLGEYER E S, *et al.*. Ultra-high resolution 3D imaging of whole cells[J]. *Cell*, 2016, 166(4): 1028-1040.
- [65] LI Y M, BUGLAKOVA E, ZHANG Y D, *et al.*. Accurate 4Pi single-molecule localization using an experimental PSF model[J]. *Optics Letters*, 2020, 45(13): 3765-3768.
- [66] CHEN J W, YAO B X, YANG ZH CH, *et al.*. Ratiometric 4Pi single-molecule localization with optimal resolution and color assignment[J]. *Optics Letters*, 2022, 47(2): 325-328.
- [67] ZHANG Y D, SCHROEDER L K, LESSARD M D, *et al.*. Nanoscale subcellular architecture revealed by multicolor three-dimensional salvaged fluorescence imaging[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(2): 225-231.
- [68] STETSON P B. DAOPHOT: A computer program for crowded-field stellar photometry[J]. *Publications of the Astronomical Society of the Pacific*, 1987, 99(613): 191.
- [69] LEUTENEGGER M, RAO R, LEITGEB R A, *et al.*. Fast focus field calculations[J]. *Optics Express*, 2006, 14(23): 11277-11291.
- [70] HANSER B M, GUSTAFSSON M G L, AGARD D A, *et al.*. Phase retrieval for high-numerical-aperture optical systems[J]. *Optics Letters*, 2003, 28(10): 801-803.
- [71] BABCOCK H P, ZHUANG X W. Analyzing single molecule localization microscopy data using cubic splines[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 552.
- [72] LI Y M, MUND M, HOESS P, *et al.*. Real-time 3D single-molecule localization using experimental point spread functions[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(5): 367-369.
- [73] SPEISER A, MÜLLER L R, HOESS P, *et al.*. Deep learning enables fast and dense single-molecule localization with high accuracy[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(9): 1082-1090.
- [74] THIELE J C, HELMERICH D A, OLEKSIIEVETS N, *et al.*. Confocal fluorescence-lifetime single-molecule localization microscopy[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(10): 14190-14200.
- [75] LIN Y, SHARIFI F, ANDERSSON S B. Three-dimensional localization refinement and motion model parameter estimation for confined single particle tracking under low-light conditions[J]. *Biomedical Optics Express*, 2021, 12(9):

5793-5811.

- [76] LI Y M, WU Y L, HOESS P, *et al.*. Depth-dependent PSF calibration and aberration correction for 3D single-molecule localization[J]. *Biomedical Optics Express*, 2019, 10(6): 2708-2718.
- [77] LI Y M, SHI W, LIU SH, *et al.*. Global fitting for high-accuracy multi-channel single-molecule localization[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 3133.

#### 作者简介:



李孟帆(1998—),男,广东佛山人,硕士研究生,2020年于黑龙江大学获得学士学位,主要从事多维度单分子定位成像方面研究。E-mail: limf2020@mail.sustech.edu.cn



李依明(1988—),男,福建莆田人,博士,南方科技大学研究员,博士生导师,2009、2010、2015年分别于上海交通大学、海德堡大学、卡尔斯鲁厄理工学院获得生物医学工程学士、医学物理硕士和生物物理博士学位。2016—2019年受玛丽居里博士后奖学金资助,分别在欧洲分子生物实验室和耶鲁大学任职博士后和访问学者。2020年底入选国家高层次人才青年项目。长期从事三维亚 10 nm 多色超分辨成像相关研究,近五年来发表高影响力论文 13 篇,其中第一/通讯作者论文 7 篇,包括 Nature Methods, Nature Communications, Optics Letters, Engineering 等。E-mail: liym2019@sustech.edu.cn