

文章编号

# 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。其中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,并简要地概括了目前主流的定位方法,以及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

## Advances in multi-dimensional single molecule imaging

Mengfan Li, Jianwei Chen, Wei Shi, Shuang Fu, Yunze Li, Tingdan Luo, Junfan Chen, Yiming Li\*

(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 reconstruction of three-dimensional subcellular structure. The point spread function is an important window to analyze the information of 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 and interference phase, etc. We also briefly introduced the latest methods for molecule localization and discussed the further directions.

**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的工具已经有了悠久的历史,早在三百多年前,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,限制显微镜的成像极限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,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不能将它们分辨开。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200nm。

近年来随着荧光分子开关研究的不断进展和激光调制技术在生物医学领域的应用,已经出现了数千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>。其中的单分子定位显微镜由于不需要复杂的光路设计以及在三者中具有最高的分辨能力被广泛应

用于细胞器以及蛋白质结构的研究中。

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,在受到激发的情况下同时发光导致成像不可分辨。比如线粒体内脊、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,解析每一帧获得的单分子信息,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(图1)。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。将单分子点信息编码进PSF也就是点扩散函数工程(PSF Engineering)成了热门研究课题。

自单分子定位方法出现以来,出现了许多的PSF

工程的设计与实现方法,也逐渐出现了能在某一参数上获得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。

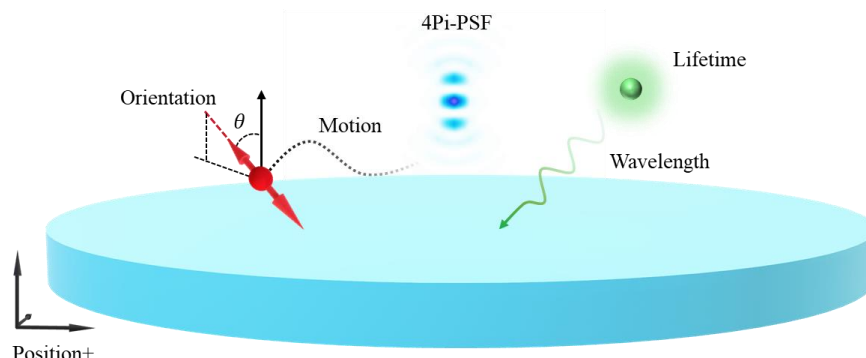


图 1 单分子蕴含着丰富的多维度信息。

Fig.1 Single molecule contains rich multidimensional information.

## 2 点扩散函数的多维度信息提取

### 2.1 单分子二维定位

200nm 分辨率的宽场成像通常看不到纳米尺度的生物如图 2A。在单分子成像中,每一次曝光只有少数的几个单分子点亮起,通过计算质心<sup>[12]</sup>位置或者高斯拟合<sup>[13]</sup>就可以得出荧光探针的二维坐标信息

<sup>[14; 15]</sup> (图 2B)。理论上每一个单分子图像都有唯一的坐标位置,然而每一次成像的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 20nm 的二维定位精度。

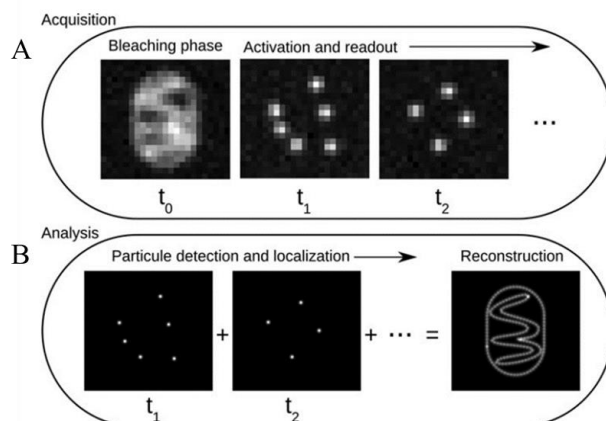


图 2 单分子二维定位<sup>[16]</sup>。(A)在采集步骤中,将会获取稀疏分布的单分子闪烁图像。(B)分析步骤中,从单帧图像中准确定位的单分子二维位置,以及所有单分子点的合成图像。

Fig. 2 Two-dimensional localization of single molecule<sup>[16]</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

生物研究中细胞器空间分布以及蛋白质三维结构具有重要的研究意义,因此获取单分子三维位置尤为重要。荧光探针所产生的单分子图像随轴向位置而改变(图 3A)。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 3A)。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 zhuang 等<sup>[17; 18]</sup>就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。通过人为地引入散光像差(astigmatism)将子午面焦点与弧矢面焦点错位,在焦点平面上上下产生横、纵向拉伸的 PSF (图 3B),并且拉伸幅度会随着单分子点随着焦

点距离发生变化。她们采用椭圆高斯拟合精准的定位单分子点的三维位置, 报告称在焦点位置横向和轴向的定位精度为 10nm 和 22nm。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。

比起借助已有的透镜来调制不同形状的 PSF 来说, 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) 设计不同形状的 PSF 更灵活。2009 年, Moerner 实验室等人开发出了复杂的 PSF 并运用进单分子成像领域, 他们基于高斯-拉盖尔模 PSF 调制理

论<sup>[19; 20]</sup>, 计算出一种旋转传播的 PSF 及其所需的相位。并先后使用 SLM 和相位板部署在物镜后焦面上, 成功实现将轴向位置信息编码进 PSF 中, 并命名为双螺旋 (Double-Helix, D-H) PSF。如图 3C 两个旁瓣光斑会随着单分子点的轴向位置变化发生旋转<sup>[21; 22]</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>[23]</sup> (图 3D); 单点旋转的螺旋 (Corkscrew) PSF<sup>[24]</sup> (图 3E); 利用艾利光束的自弯曲性<sup>[25; 26]</sup>开发的基于双通道无旁瓣 PSF<sup>[27]</sup> (图 3F)。

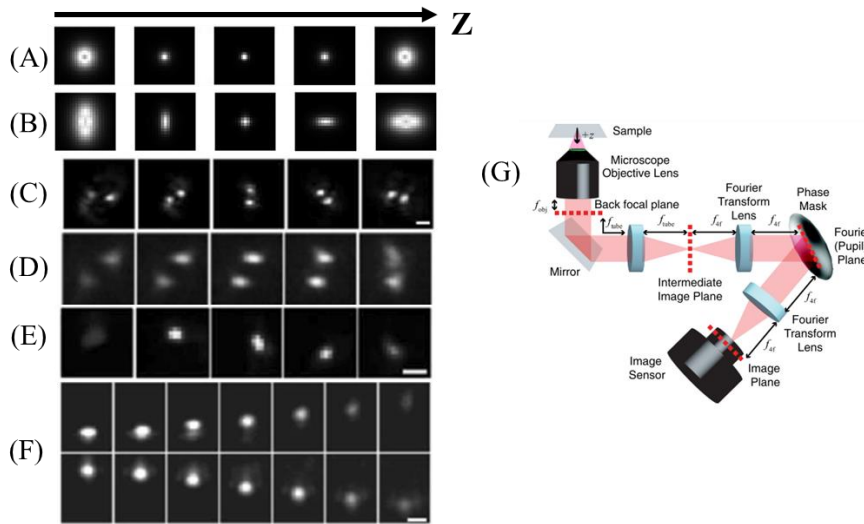


图 3 各 PSF 在不同轴向位置的变化。(A) 标准 PSF 在距离焦点上下位置所形成相似的 PSF。(B) 散光 PSF。(C) 双螺旋 PSF<sup>[21; 22]</sup>; (D) 相位斜坡 PSF<sup>[23]</sup>; (E) 螺旋 PSF<sup>[24]</sup>; (F) 自弯曲 PSF<sup>[25; 26]</sup>; (G) SLM 调制下的光路布局。

Fig. 3 Changes of each PSF at different axial positions. (A) The standard PSF is symmetry with respect to focus. (B) Astigmatism PSF. (C) Double helix PSF<sup>[21; 22]</sup>; (D) Phase ramp PSF<sup>[23]</sup>; (E) Spiral PSF<sup>[24]</sup>; (F) Self-bending PSF<sup>[25; 26]</sup>; (G) Optical path layout for SLM modulation.

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。在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 bound, CRLB) 是统计学上衡量无偏估计量是否有效的指标, 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>[28; 29]</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>[30]</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, 证明了其在三维坐标上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定位精度较高的 PSF 或者只优化  $z$  维度 CRLB 得到只有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基础, 得出了可调节轴向定位范围的 Tetrapod PSF<sup>[31]</sup> (图 4)。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单分子追踪 (Single Particle Tracking, SPT) 或是平面轮廓分析<sup>[32-35]</sup>。近年来出现将深度学习应用在重叠 PSF 的分析方法<sup>[36; 37]</sup>, 使得大景深定位成像成为可能。

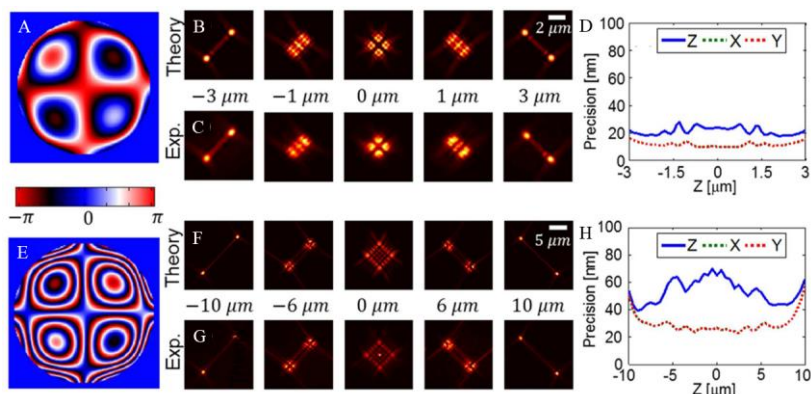


图 4 不同景深优化下的 Tetrapod PSF<sup>[31]</sup>。6 $\mu\text{m}$  优化景深下的光瞳函数 (A)，理论 PSF (B)，实验 PSF (C)，定位精度 (D)。(E-H) 与 (A-D) 相同，但是是 10 $\mu\text{m}$  优化景深下的 Tetrapod PSF。

Fig. 4 Tetrapod PSF optimized for different depth of field<sup>[31]</sup>. The pupil function (A), theoretical PSF (B), (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

由于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>[38]</sup>。

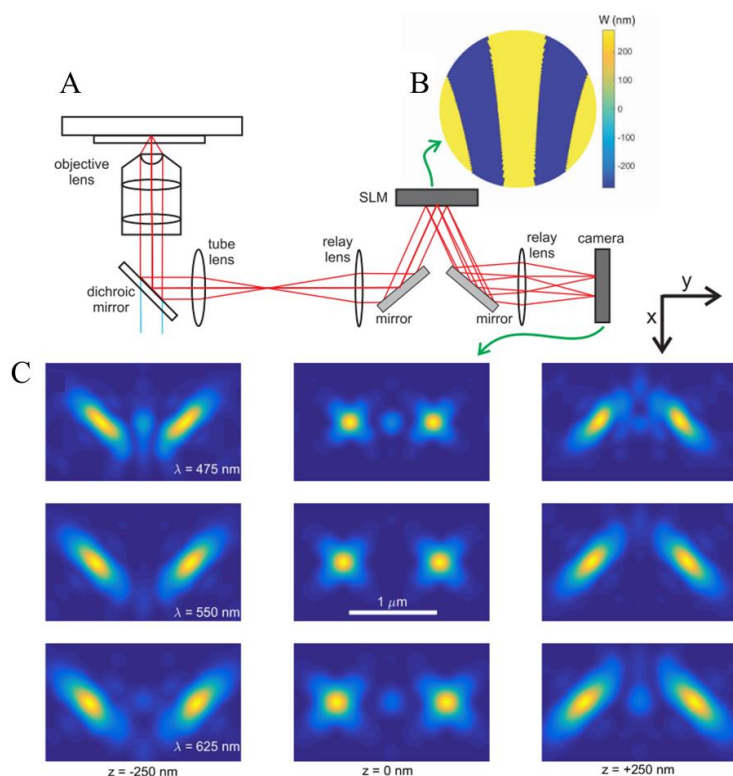


图 5 同时测量单分子的发射波长与三维位置<sup>[40]</sup>。(A)光路设计图，SLM 放置在后焦面上。(B)弯曲光栅的光瞳函数。(C)三种波长在不同位置下的 PSF 分布，波长越长两个旁瓣的距离越远。

Fig. 5 Simultaneous measurement of emission wavelength and 3D position of single molecules<sup>[40]</sup>. (A) Optical path design with an SLM placed on the back focal plane. (B) Pupil function of curved grating. (C) PSF of three different wavelengths. The longer the wavelength, the farther the distance between the two side lobes.

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, 随之而来其拟合精度就会下降, 并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 级极大值的间隔获取其波长大小。在 1000 光子数下其波长拟合精度达到 10nm, 实现了同时测量二维

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 等采用双通道分别插入柱面镜和分光棱镜的方法<sup>[41]</sup>, 实现三维位置和荧光光谱同时定位, 并用该方法进行相距 10nm 的 4 种染料无串扰三维成像。在 SLM 中, 即使施加电压相同, 不同波长的光经过后造成的相位改变也略有差别, 因此 Shechtman 等通过最小二乘法计算出一种波长适应的 SLM 电压<sup>[42]</sup>, 实现了在同一个 SLM 调制下, 红光和绿光产生了具有 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

位置和荧光波长<sup>[39]</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 5A-B, 开发出了能够同时拟合三维位置和波长的 PSF<sup>[40]</sup>, 该设计同样是依靠 1 级衍射距离判断波长, 同时在不同的深度会发生显著的变化(图 5C), 在 800 平均光子数条件下其拟合光谱精度达到 10~20nm, 轴向精度达到 25~50nm。

一组具有特定波长响应 SLM 电压<sup>[43]</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开来。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>[44]</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 6)。Kim 的报告进一步的证明了即使在标准 PSF 中, 也能解析出更多的信息, 展现了计算科学的发展也极大地推动着显微成像领域的进步。

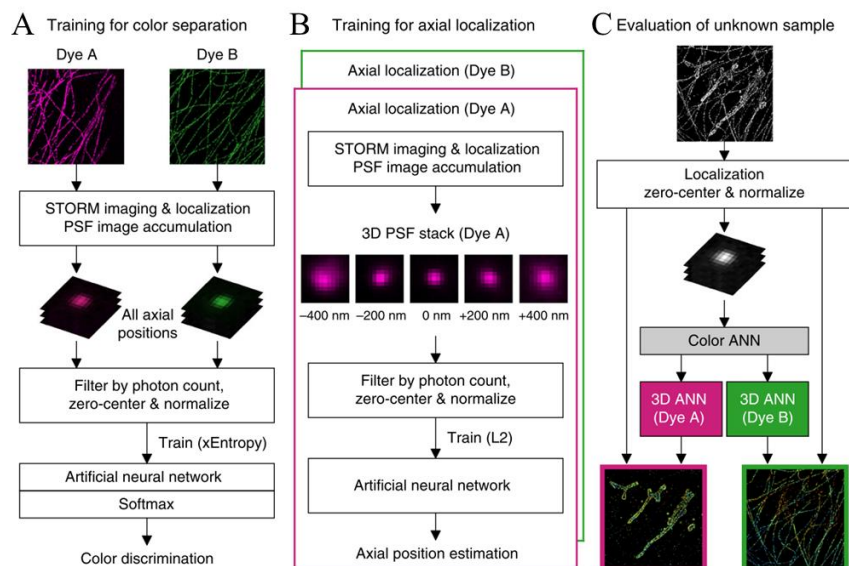


图 6 基于人工神经网络的信息提取方法<sup>[44]</sup>。(A)颜色分辨训练步骤。(B)轴向位置定位训练步骤。(C)对未知样品的颜色分辨、三维定位拟合流程。

Fig. 6 Information extraction method based on artificial neural network<sup>[44]</sup>. (A) Color separation training steps. (B) Training steps for axial localization. (C) Color discrimination and three-dimensional localizing process of unknown samples

## 2.4 基于单分子图像的偶极子朝向的参数提取

大部分的 PSF 建模步骤中, 我们通常假设单分子点发射光一般都是各向同性的。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, 由于每时每刻它的朝向都在改变, 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 的中心大约会发生 100nm 的偏差<sup>[45; 46]</sup>。在偶极子模型中如图 7E, 其在 xy 面的

偏转角称为方位角(azimuthal angle)  $\phi$ , 与光轴之间的夹角称为极角(polar angle)  $\theta$ , 同时由于偶极子可能并非完全固定, 自身也会发生旋转振动, 这角度称为转动角  $\alpha$ 。当转动角较小时偶极子光强分布更为不均, 反之则更偏向于各向同性如图 7A-C, 并且极角的大小也会影响 PSF 的偏移量大小(图 7D)。因此一方面来说获取偶极子朝向就能补偿 PSF 横向偏移提高定位精度, 另一方面来说偶极子朝向在研究膜蛋白相互作用以及排列方式上具有非常重要的指示作用<sup>[47-49]</sup>。

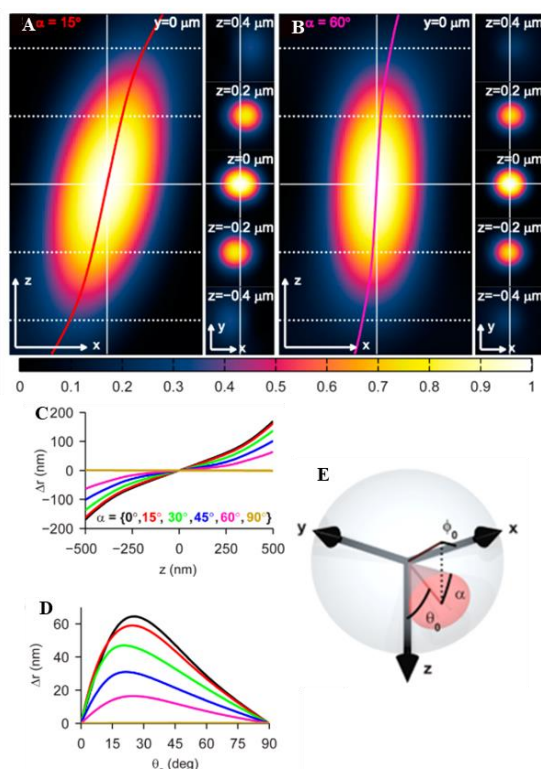


图 7 偶极子方向引起的定位偏差<sup>[46]</sup>。(A) 转动角、极角、方位角分别为  $15^\circ$ 、 $45^\circ$ 、 $0^\circ$  单分子点的 PSF  $xz$  切面，右图为  $xy$  切面，以及其定位偏差。(B) 极角、方位角与(A)相同的情况下转动角为  $60^\circ$  的 PSF。(C)和(D)分别为不同转动角，极角产生的横向偏移值。(E) 转动角、极角、方位角在偶极子中的物理意义。

Fig. 7 Localization deviation caused by dipole direction<sup>[46]</sup>. (A) PSF  $xz$  section of single molecule with rotation angle, polar angle and azimuth angle of  $15^\circ$ ,  $45^\circ$  and  $0^\circ$  respectively,  $xy$  section on the right, and its localization deviation. (B) PSF with the same polar angle and azimuth angle as (A) and rotation angle of  $60^\circ$ . (C) and (D) are lateral offset generated by different rotation angles and polar angles, respectively. (E) The physical meaning of rotation angle, polar angle and azimuth angle of the dipole.

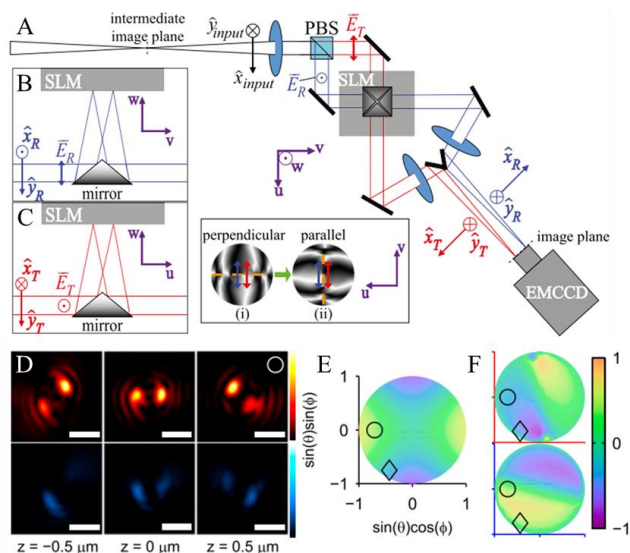


图 8 基于双螺旋 PSF 的偶极子方向定位方法<sup>[50]</sup>。(A)光路布局。(B)和(C)分别为两个偏振方向的成像通道，它们的光瞳函数分别为(i),(ii)。(D)上下图分别为水平和垂直通道的 PSF。(E),(F)分别为 LA,LD 指标，只考虑 LA 指标时会出现四种可能的朝向结果。红色和蓝色分别代表透射通道和反射通道的 LD 指标。

Fig. 8 Dipole orientation localization method based on double helix PSF<sup>[50]</sup>. (A) Optical path layout. (B) and (C) are imaging channels with 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.

2012 年 Mikael 等尝试通过双螺旋 PSF 来获得偶极子朝向<sup>[50]</sup>, 在这里他们运用偏振分束棱镜将两正交偏振的光分开实现双通道成像。虽然通过各通道的光子比例 LD (Linear Dichroism) 可以大致推断出方位角 $\phi$ 朝向, 但偶极子极角 $\theta$ 还未确定。因此他们根据双螺旋 PSF 特征引入了旁瓣不对称性 LA (Lobe Asymmetry) 来描述极角大小 (图 8E)。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 (图 8F)。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>[51]</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里叶面上<sup>[52]</sup>, 调制出 Vortex PSF, 如图 9A 所示。Vortex PSF 与标准 PSF 相比, 其提高了偶极子朝向拟合精度如图 9B-C, 并且由于 PSF 较为紧凑提高了单分子图像的信噪比。利用这种方法他们展示了 $\lambda$ -DNA 的偶极子朝向和三维位置的同时定位 (图 9D)。

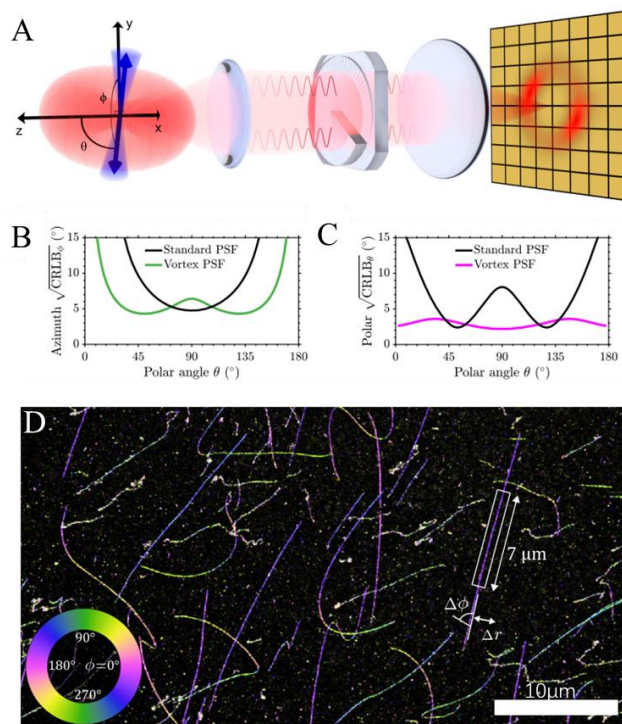


图 9 基于 Vortex PSF 的朝向与三维位置同时定位<sup>[52]</sup>。(A)Vortex PSF 光路。在 4000 光子 10 背景光子的单分子图像中, 方位角 $\phi$ (B)和极角 $\theta$ (C)的 CRLB。(D)  $\lambda$ -DNA 的二维位置及方位角, 伪色代表该点方位角, 大小如左下角。

Fig. 9 The single-molecule orientation and three-dimensional location are simultaneously localized based on vortex PSF<sup>[52]</sup>. (A)Vortex PSF optical path. CRLB of azimuth angle(B) and polar angle(C) in for single molecule imaging with 4,000 photons and 10 background photons. (D) The 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

上个世纪 90 年代, Hell 等提出了一种双物镜成像系统的架构<sup>[53]</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提高了数倍。单分子定位成像法与 4Pi 显微镜的结合使单分子定位方法的轴向分辨率达到纳米级别<sup>[54]</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干涉成像是 4Pi-SMLM 的光路设计特点<sup>[55; 56]</sup>。将上下通道分别延迟不同的相位并在多个通道成像, 通过对比各通道的相应单分子点的强度比还原单分子的轴向坐标。由于各通道的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六至十倍, 实现亚 10nm 精度的轴向定位<sup>[57]</sup>。

在 4Pi PSF 中存在四个相互独立的维度, 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 等在相同的光路中 (图 10A), 通过 IAB 模型将干涉相位项从轴向位置中解耦, 从实验采集 PSF 中建立更真实的 4Pi PSF 模型<sup>[58]</sup>如图 10C。IAB 模型可以将四通道的实验 PSF 分成三个与相位 $\phi$ 无关的矩阵 I、A、B, 只需要校准三个三维的矩阵就可以完整表达一个实验型的四维的 4Pi-PSF, 避免了直接校准一个四维的 4Pi-PSF。解决了由于温度变化对光程的改变而引起的定位偏移, 并证明了 IAB 模型能够达到理论定位精度如图 11B, 及克服了光度法 (photometry) 在高数值孔径物镜产生定位偏差。得益于 4Pi 实验装置是一个多通

道的光路,天然适合进行多色单分子成像。最近 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>[59]</sup>,并且相比传统的多色 4Pi 方法<sup>[60]</sup>提升了光子利用率。

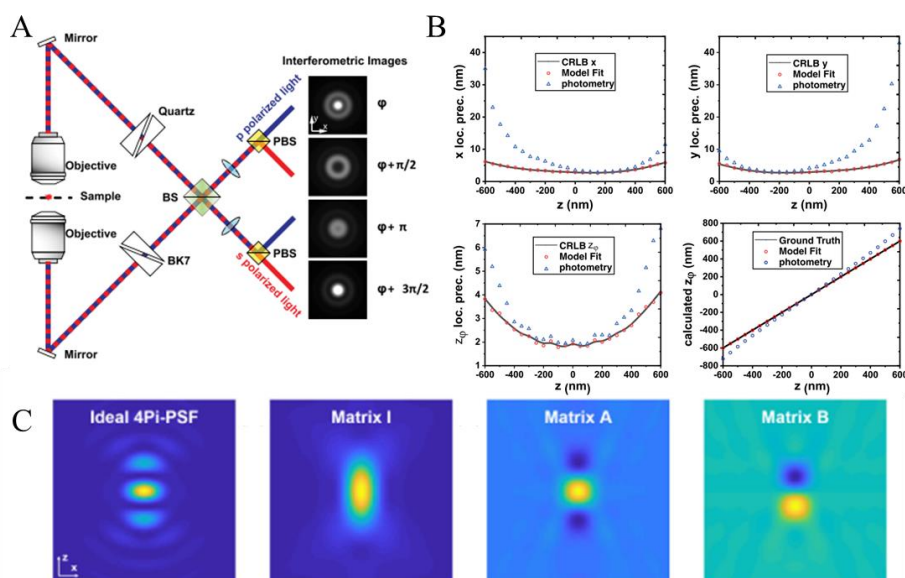


图 10 IAB 模型分解的 4Pi-PSF<sup>[58]</sup>。(A)四通道 4Pi-SMLM 光路结构以及各通道的 PSF。(B)每物镜接收 2000 光子以及 20 背景下,通过光度法和 IAB 模型拟合得到的各维度定位精度。(C)理想的 4Pi-PSF 与分解出来的 IAB 矩阵。

Fig. 10 4Pi-PSF decomposed by IAB model<sup>[58]</sup>. (A) The 4-channel 4Pi-SMLM optical path layout and the PSF of each channel. (B) The 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.

### 3 点扩散函数的模型和分析方法

#### 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>[61]</sup>。不过高斯拟合由于结构简单,在具有像差、特定偏振等导致的不对称的 PSF 并不适用。随着单分子点的远离焦点位置,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的 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,通常从光场分布建立 PSF 模型,对于大数值孔径物镜的成像系统,甚至还需要使用考虑电场偏振的矢量模型<sup>[62; 63]</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,通常需要进行进一步校准。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。

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<sup>[64]</sup>。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>[65]</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>[36]</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 等进一步地开发出能够进行三维定位的神经网络 DeepSTORM3D<sup>[37]</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,通过优化网络直到能够有效地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。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 三维定位。



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 DECODE<sup>[66]</sup>。与 Deep STORM3D 相比, 其在高密度 PSF 的定位中提高了十倍定位速度和两倍的准确率, 在达到理论定位精度的同时还对定位结果做出不确定程度预测。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的成本, 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 总结

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, 将 PSF 改造后虽然能够提高了对于某一维度的定位精度, 但是同时也常需要对另一方面做出取舍, 比如增大的 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合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, 比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, 比如解析荧光寿命分辨标记的染料类型<sup>[67]</sup>; 从需要探究的问题中寻找定位维度, 比如单分子追踪中的运动模型参数<sup>[68]</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>[69]</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广泛的应用前景。

## 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*, 2005, 102(37): 13081-13086.
- [3] BLOM H, WIDENGREN J. Stimulated Emission Depletion Microscopy[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(11): 7377-7427.
- [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*, 2000, 97(15): 8206-8210.
- [6] RUST M J, BATES M, ZHUANG X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nat Methods*, 2006, 3(10): 793-5.
- [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. 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): 4.21.1-4.21.28.
- [12] JIA H, YANG J, LI X. 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.
- [13] STALLINGA S, RIEGER B. Accuracy of the Gaussian Point Spread Function model in 2D localization microscopy[J]. *Optics Express*, 2010, 18(24): 24461-24476.
- [14] SMALL A, STAHLHEBER S. Fluorophore localization algorithms for super-resolution microscopy[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(3): 267-279.
- [15] PATTERSON G, DAVIDSON M, MANLEY S, et al. Superresolution imaging using single-molecule localization[J]. *Annu Rev Phys Chem*, 2010, 61: 345-67.
- [16] 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.

- [17] HUANG B, WANG W, BATES M, et al. Three-Dimensional Super-Resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy[J]. *Science*, 2008, 319(5864): 810-813.
- [18] HOLTZER L, MECKEL T, SCHMIDT T. Nanometric three-dimensional tracking of individual quantum dots in cells[J]. *Applied Physics Letters*, 2007, 90(5): 053902.
- [19] 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.
- [20] GREENGARD A, SCHECHNER Y Y, PIESTUN R. Depth from diffracted rotation[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(2): 181-183.
- [21] PAVANI S R P, PIESTUN R. High-efficiency rotating point spread functions[J]. *Optics Express*, 2008, 16(5): 3484-3489.
- [22] 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*, 2009, 106(9): 2995-2999.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] SIVILOGLOU G A, BROKY J, DOGARIU A, et al. Observation of Accelerating Airy Beams[J]. *Physical Review Letters*, 2007, 99(21): 213901.
- [26] SIVILOGLOU G A, CHRISTODOULIDES D N. Accelerating finite energy Airy beams[J]. *Optics Letters*, 2007, 32(8): 979-981.
- [27] JIA S, VAUGHAN J C, ZHUANG X. Isotropic three-dimensional super-resolution imaging with a self-bending point spread function[J]. *Nature Photonics*, 2014, 8(4): 302-306.
- [28] LIU S, 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.
- [29] ZELGER P, KASER K, ROSSBOTH B, et al. Three-dimensional localization microscopy using deep learning[J]. *Optics Express*, 2018, 26(25): 33166-33179.
- [30] 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.
- [31] 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 Lett*, 2015, 15(6): 4194-9.
- [32] 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.
- [33] ZHOU Y, CARLES G. Precise 3D particle localization over large axial ranges using secondary astigmatism[J]. *Opt Lett*, 2020, 45(8): 2466-2469.
- [34] 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.
- [35] JIN D, XI P, WANG B, et al. Nanoparticles for super-resolution microscopy and single-molecule tracking[J]. *Nat Methods*, 2018, 15(6): 415-423.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] 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]. *Biophys J*, 2010, 99(8): 2686-94.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] ZHANG Z, KENNY S J, HAUSER M, et al. Ultrahigh-throughput single-molecule spectroscopy and spectrally resolved super-resolution microscopy[J]. *Nat Methods*, 2015, 12(10): 935-8.
- [42] 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.
- [43] HERSHKO E, WEISS L E, MICHAEL T, et al. Multicolor localization microscopy and point-spread-function engineering by deep learning[J]. *Optics Express*, 2019, 27(5): 6158-6183.
- [44] KIM T, MOON S, XU K. Information-rich localization microscopy through machine learning[J]. *Nature Communications*, 2019, 10.
- [45] 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.
- [46] LEW M D, BACKLUND M P, MOERNER W E. Rotational mobility of single molecules affects localization

accuracy in super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Nano Lett*, 2013, 13(9): 3967-72.

[47] ZHANGHAO K, CHEN L, YANG X S, et al. Super-resolution dipole orientation mapping via polarization demodulation[J]. *Light Sci Appl*, 2016, 5(10): e16166.

[48] ZHANGHAO K, GAO J, JIN D, et al. Super-resolution fluorescence polarization microscopy[J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2017, 11(01).

[49] ZHANGHAO K, CHEN X, LIU W, et al. Super-resolution imaging of fluorescent dipoles via polarized structured illumination microscopy[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4694.

[50] 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*, 2012, 109(47): 19087-19092.

[51] 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.

[52] 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.

[53] 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.

[54] HAO X, LI Y, FU S, et al. Review of 4Pi Fluorescence Nanoscopy[J]. *Engineering*, 2020.

[55] AQUINO D, SCHONLE A, GEISLER C, et al. Two-color nanoscopy of three-dimensional volumes by 4Pi detection of stochastically switched fluorophores[J]. *Nat Methods*, 2011, 8(4): 353-9.

[56] HUANG F, SIRINAKIS G, ALLGEYER E S, et al. Ultra-High Resolution 3D Imaging of Whole Cells[J]. *Cell*, 2016, 166(4): 1028-1040.

[57] 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*, 2009, 106(9): 3125-3130.

[58] LI Y, BUGLAKOVA E, ZHANG Y, et al. Accurate 4Pi single-molecule localization using an experimental PSF model[J]. *Opt Lett*, 2020, 45(13): 3765-3768.

[59] CHEN J W, YAO B X, YANG Z C, et al. Ratiometric 4Pi single-molecule localization with optimal resolution and color assignment[J]. *Optics Letters*, 2022, 47(2): 325-328.

[60] ZHANG Y, SCHROEDER L K, LESSARD M D, et al. Nanoscale subcellular architecture revealed by multicolor three-dimensional salvaged fluorescence imaging[J]. *Nat Methods*, 2020, 17(2): 225-231.

[61] STETSON P B. DAOPHOT - A computer program for crowded-field stellar photometry[J]. *Publications of the Astronomical Society of the Pacific*, 1987, 99: 191.

[62] LEUTENEGGER M, RAO R, LEITGEB R A, et al. Fast focus field calculations[J]. *Optics Express*, 2006, 14(23): 11277-11291.

[63] 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.

[64] BABCOCK H P, ZHUANG X. Analyzing Single Molecule Localization Microscopy Data Using Cubic Splines[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 552.

[65] 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-+.

[66] 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.

[67] THIELE J C, HELMERICH D A, OLEKSIJEVETS N, et al. Confocal Fluorescence-Lifetime Single-Molecule Localization Microscopy[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(10): 14190-14200.

[68] 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).

[69] 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.

**作者简介:**李依明(1988-), 男, 博士, 南方科技大学生物医学工程系副教授, 先后在上海交通大学、海德堡大学、卡尔斯鲁厄理工学院、欧洲分子生物实验室总部和耶鲁大学等多个国际一流机构学习和工作, 长期致力于三维超高分辨显微成像技术及其生物应用, 在光学仪器研发, 光学理论和成像算法等方面积累了坚实的理论基础以及实验经验。E-mail: liym2019@sustech.edu.cn