·技术进展·

单分子定位超分辨成像全链条解决方案

胡芬[1,2] 王波[1] 解钊[1] 黎继强[1] 陈明鑫[1] 刘帅[1] 杨建宇[1] 李任植[3] 潘雷霆[1,2,4*]

［1.弱光非线性光子学教育部重点实验室，南开大学物理科学学院，泰达应用物理研究院，天津 300071；
2.纳微成像（天津）生物科技有限公司，天津 300192；3.塔什干中亚大学医学院，塔什干 111221，乌兹别克斯坦；
4.极端光学协同创新中心，山西大学，太原 030006］

【摘要】 单分子定位超分辨成像（single molecular localization microscopy, SMLM）作为一项突破光学衍射极限的技术，实现了纳米级空间分辨率，为生命科学研究提供了颠覆性的成像手段。然而，SMLM在实际应用中仍面临诸多挑战，如硬件系统高度依赖进口、制样流程繁琐、双色成像探针缺乏、数据分析挖掘不足等。这些瓶颈限制了SMLM设备的利用率，阻碍了其广泛应用和产业化发展。本文提出一套SMLM“九要素”全链条解决方案，包括硬件系统、软件控制和图像重建3个“硬实力”要素和精准制样、闪烁探针、数据分析挖掘、特色试剂耗材、特异性抗体和实际应用6个“软实力”要素。其中，“硬实力”可通过采购与集成市场化成熟组件实现快速部署，“软实力”则需依赖长期技术沉淀与领域认知积累。该方案的提出可推动SMLM从“高端仪器”向“高效工具”转化，促进超分辨成像技术的普惠化应用，为高端显微成像设备的使用提供新思路。

【关键词】 超分辨成像；单分子定位；全链条解决方案；自动化制样

【中图分类号】 O436; TH74 **【文献标志码】** A **【DOI】** 10.11876/mimt202504005

Full–chain solution for single–molecule localization super–resolution microscopy

Hu Fen[1,2], *Wang Bo*[1], *Xie Zhao*[1], *Li Jiqiang*[1], *Chen Mingxin*[1], *Liu Shuai*[1], *Yang Jianyu*[1], *Lee Imshik*[3], *Pan Leiting*[1,2,4*]

(*1. Key Laboratory of Weak–Light Nonlinear Photonics*, *Ministry of Education*, *School of Physics*, *TEDA Institute of Applied Physics*, *Nankai University*, *Tianjin 300071*, *China*;
2. Tianjin Nano–Microimaging Biotechnology Co., *Ltd.*, *Tianjin 300192*, *China*;
3. Medical School, *Central Asian University*, *Tashkent 111221*, *Uzbekistan*;
4. Collaborative Innovation Center of Extreme Optics, *Shanxi University*, *Taiyuan 030006*, *China*)

【Abstract】 Single–molecule localization microscopy (SMLM), as a groundbreaking technology surpassing the optical diffraction limit, achieves nanoscale spatial resolution (~ 20 nm) and has revolutionized biological imaging. However, its widespread application faces critical challenges including reliance on imported hardware systems, complex sample preparation protocols, lack of dual–color imaging fluorescent probes, and insufficient data analysis and mining, leading to underutilization of existing equipment. This review proposes a comprehensive full–chain solution addressing nine critical elements of SMLM, which include three “hard skills” — hardware systems, software control, and image reconstruction; and six “soft skills” — precise sample preparation, blinking probes, data analysis and mining, specialized reagents and consumables, specific antibodies, and practical applications. The “hard skills” can be rapidly deployed through the procurement and integration of mature commercial components, whereas the “soft skills” rely on long–term technological accumulation and deep domain knowledge. This solution aims to promote

基金项目：国家重点研发计划（2022YFC3400600）；国家自然科学基金（32227802, 12174208）；天津市自然科学基金（23JCYBJC01250）
第一作者：胡芬，女，博士研究生，副教授，研究方向：生物医学光学
通信作者：潘雷霆，男，博士研究生，教授，研究方向：生物医学光学

the transformation of SMLM from a “high–end instrument” into an “efficient tool”, facilitating the broader application of super–resolution imaging technologies and offering new perspectives for the use of advanced microscopy systems.

【Key words】 Super–resolution microscopy; Single–molecule localization; Full–chain solution; Automated sample preparation

目前，超分辨荧光显微技术主要分为两大类：一是激发光场调控技术，如受激发射损耗显微镜[1]和结构光照明显微镜[2]；二是单分子定位成像技术（single molecular localization microscopy, SMLM），包括随机光学重建显微术（stochastic optical reconstruction microscopy, STORM）[3]、光激活定位显微镜（photoactivated localization microscopy, PALM）[4]等。其中，SMLM超分辨成像因其最高分辨率、强定量能力及多模式适配性，受到众多科研工作者的青睐[5-6]。该类技术基于全内反射照明光路，通过控制激活光和激发光，使成像区域内每次仅有少量、随机、离散的单个荧光分子闪烁发光，随后，利用高斯拟合等算法对每个单分子荧光信号的点扩散函数（point spread function, PSF）进行分析，获得其纳米级空间定位信息，最终将数万帧荧光定位数据叠加重建生成超分辨图像。该技术本质是采用 “时间换空间”的策略实现超分辨成像。STORM基于免疫荧光标记，利用商业化荧光探针进行多色超分辨成像，在标记灵活性与成像质量之间实现较好的平衡，是当前应用最广泛的SMLM方案。SMLM已广泛应用于细胞骨架、膜蛋白、神经元突触、细胞器互作等研究，成为揭示细胞结构与功能的重要工具[7]。

尽管SMLM以其卓越的空间分辨率和定量能力在生命科学研究中展现出巨大潜力，但分辨率的提升也对各相关技术提出了前所未有的高标准与严要求。SMLM的实现不仅依赖于硬件系统的构建，更需要软件控制、图像算法、样品制备、探针设计与数据分析等技术的协同支撑。目前，SMLM在实际应用和推广过程中面临一系列问题，如核心硬件系统高度依赖进口，样品制备流程繁琐，缺乏稳定闪烁的双色探针以及高效的数据分析挖掘工具等，导致国内很多高校和研究所进口SMLM设备的使用率低，多处于低效运行或闲置状态，严重阻碍了高质量研究成果的产出与科学价值的转化。

针对上述痛点，本文围绕SMLM技术在系统优化、样本制备、图像重建、数据分析及应用拓展等方面的优化开展深入探讨，提出一套SMLM “九要素”全链条解决方案，即硬件系统、软件控制和图像重建3个 “硬实力”要素，精准制样、闪烁探针、数据分析挖掘、特色试剂耗材、特异性抗体和实际应用6个 “软实力”要素。通过 “软硬实力”要素协同，旨在提升SMLM的可及性、易用性和普及性，为生命科学研究提供更高效、更精准的超分辨成像工具。

1 SMLM全链条解决方案之 “硬实力”三要素

1.1 硬件系统

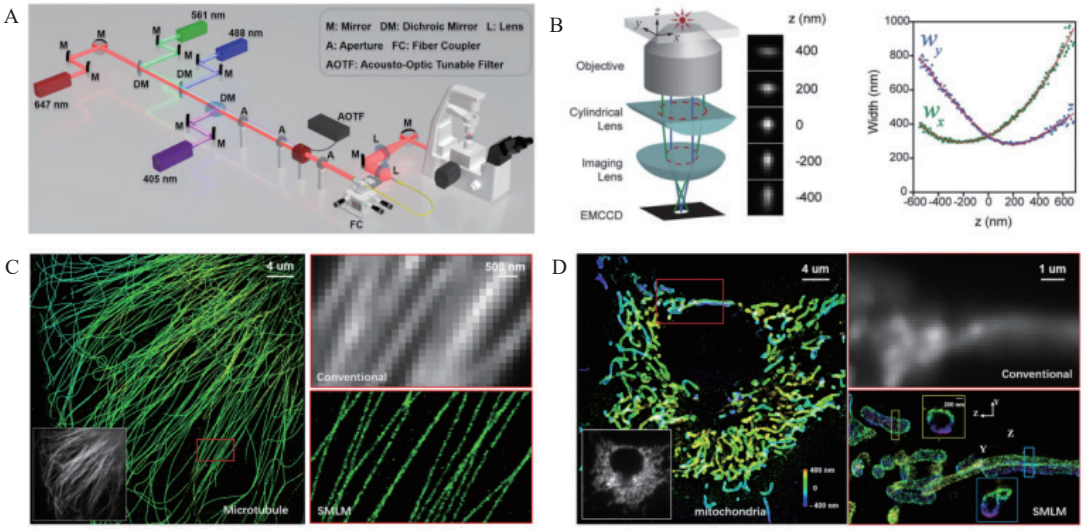
SMLM通常基于电动倒置荧光显微镜架构，一般采用模块化光路设计，主要包括多色激光器模块、全内反射荧光（total internal reflection fluorescence, TIRF）照明模块、显微镜和成像探测器等组件。不同波长激光通过反射镜和二向色镜进行空间合束，并统一耦合进单模光纤，出射后经由准直透镜调整为平行光束，再通过电动全内反射照明器将光束精准投射至物镜后焦面，从而实现对样品激发的有效控制（图1A）。该光路设计兼具灵活性与稳定性，便于系统模块的扩展与调整。单模光纤具备天然滤波功能，能够输出接近理想高斯分布的光斑。尽管光纤耦合存在一定的能量损耗，但其在光束质量、系统稳定性和模块兼容性上的综合优势更为突出。

由于单分子荧光信号强度较弱，且荧光闪烁速度较快，因而SMLM对探测器的灵敏度和成像速度提出较高要求。电子倍增电荷耦合器件（electron–multiplying charge coupled device, EMCCD）在传统CCD的基础上增加了电子增益寄存器，可将光生电信号成百上千倍地放大。科学级互补金属氧化物半导体探测器（scientific complementary metal–oxide–semiconductor, sCMOS）融合了CCD与CMOS技术的优点，具有高量子效率，在低光照条件下仍可提供良好图像质量。此外，sCMOS的数据读出速度高于

EMCCD，可支持每秒数百帧的高速成像。凭借优异的性能表现与相对较低的成本，sCMOS探测器近年来已逐步取代EMCCD，成为SMLM成像的主流选择。

在实现三维成像方面，庄小威课题组[8]2008年提出在显微镜与相机之间引入柱面透镜，导致出射荧光在图像平面中的PSF呈现椭圆形变化，其方向与形状随着焦深位置的改变而连续演变（图1B）。通过对这种PSF变化特征进行反演分析，得到 ~ 50 nm的Z轴分辨率，从而实现亚细胞结构的三维解析。图1C为细胞微管骨架三维SMLM图像，呈现出清晰、连续且精细的丝状结构，空间分辨力远超传统光学显微成像。图1D为细胞线粒体外膜蛋白TOMM20的三维SMLM图像，展示出线粒体典型的三维中空管状结构。

当前，SMLM市场主要由日本尼康（Nikon）、德国蔡司（Zeiss）等国际厂商垄断，价格昂贵，维护成本高昂。SMLM关键零部件如多色激光器系统、sCMOS相机、电动全内反射照明器等已逐步实现了国产化替代，物料成本极大降低。但显微镜机架、高数值孔径物镜等部件尚需进一步国产化突破。



注：SMLM为单分子定位成像技术。

图1 单分子定位超分辨成像系统架构及成像效果 A为SMLM系统光路图[6]；B为SMLM基于柱透镜的三维成像原理[8]；C为COS-7细胞微管骨架单分子定位超分辨图像；D为COS-7细胞线粒体外膜蛋白TOMM20单分子定位超分辨图像

1.2 软件控制

在实现高分辨率SMLM成像的过程中，软件系统不仅是硬件运行的中枢，更是保障成像质量、实现实验流程自动化以及提升数据采集效率的关键支撑。软件的性能、集成度与操作便捷性，直接决定了系统的易用性、稳定性及科研产出效率。目前国际主流SMLM系统已配备功能相对完善的控制软件，但普遍存在界面复杂、参数设置繁琐等问题，操作难度较高，对初学者或非专业技术人员而言存在较高的使用门槛。这在一定程度上限制了SMLM系统的普及与高效利用，降低了实验效率，也增加了科研人员的学习成本。因此，构建一套界面简洁、操作友好、贴合实际工作流程的软件控制平台，对提升系统整体性能与用户体验具有重要意义。

首先，需要集成自动化控制系统，实现对激光器系统、sCMOS相机、电动载物台和TIRF照明模组等关键硬件的协同控制，从激发光功率调节到图像序列采集全过程自动化。软件需支持多设备协同控制、状态监测与实时反馈，以提升系统响应速度与运行稳定性。其次，在用户界面设计上，应充分考虑科研需求与用户使用习惯，以SMLM成像流程为逻辑基础，进行简洁清晰的功能划分与模块布局，摒弃繁琐的层级结构与非必要参数暴露，降低操作复杂度。用户可通过图形化界面快速完成曝光时间设定、帧数选择、激光强度调节与成像模式切换等

关键操作，并实时监控各模块状态，实现“所见即所得”的直观操作体验。此外，可引入基于图像质量反馈的自适应调参模块，实现成像过程中的动态优化，例如根据荧光信号强度、闪烁频率自动调整激发光和激活光功率。未来，还可拓展人工智能辅助模块，例如引入机器学习算法用于识别异常成像、智能标注数据采集区域或预测最佳成像参数，进一步提升科研效率。

1.3 图像重建

SMLM图像重建过程包括单分子定位、漂移校正及图像质量评估等关键环节，涉及几千兆级别的数据处理，对重建算法与软硬件系统的性能提出了极高要求。图像重建的质量不仅决定了最终图像的空间分辨率与结构保真度，也深刻影响后续的生物信息提取与解读。

SMLM成像控制荧光分子的随机闪烁，逐帧记录荧光分子信号，并通过拟合计算确定纳米级坐标位置。成像过程通常需采集数万帧图像，庞大的数据处理任务对单分子定位分析程序提出了极高要求，其性能直接决定了最终图像的重建质量。为此，国内外科研人员陆续开发了多种单分子定位算法及相应的软件工具或ImageJ插件，以不断提升图像重建的效率与准确性。2010年，第1款ImageJ SMLM插件QuickPALM发布，支持基础的图像重建[9]。随后，2014年发布的ThunderSTORM进一步扩展了功能，不仅支持2D和3D成像，还内置多种定位拟合算法，如最小二乘法、加权最小二乘法及极大似然估计等，并提供图形化交互界面，能够调整参数并预览重建效果[10]。SMLocalizer于2018年推出，首次在ImageJ插件中引入图形处理器（graphics processing unit, GPU）加速，其数据处理速度是QuickPALM和ThunderSTORM的2 ~ 15倍[11]。SMLocalizer通过简化参数输入流程，降低了初学者的使用门槛，同时为高阶用户保留了自定义调整空间，兼顾了易用性与灵活性。2020年，RainbowSTORM发布，在继承ThunderSTORM定位功能的基础上，集成了光谱校准与识别功能，可对超分辨图像赋予伪彩色编码，为多色成像提供了便捷方案[12]。同年，SMAP以模块化架构推出，覆盖了单分子定位、漂移校正、后处理与可视化全流程，支持最新算法的快速迭代更新，进一步完善了SMLM数据处理生态[13]。

漂移校正是SMLM图像重建中不可或缺的一环。SMLM成像过程的持续时间通常达到数分钟，期间难以避免由于热效应、机械松弛和振动等因素造成漂移，从而影响成像精度与图像质量。一种常见的漂移校正方法是在样本中引入荧光微球等基准标记物，通过追踪其随时间的位移以建立漂移轨迹来进行校正。这种方法比较简单但存在较大局限性，若微球数量过少，可能在成像视野中没有微球进行定位；若微球数量过多，容易落在细胞结构上，因其高亮信号掩盖周围的低强度荧光点，造成“黑域”现象，影响结构还原的完整性。另一种则不借助额外标记物，通过将图像序列按帧数划分为若干时间段，对相邻段进行互相关分析，计算各段之间的漂移量，实现后处理校正[14]。然而，传统互相关方法处理速度较慢且在大规模数据处理时易受噪声干扰，且每个分段内部的固有漂移无法获取，导致漂移校正不够精准。潘雷霆课题组提出一种完全基于定位坐标信息的最近邻配对云图（nearest paired cloud, NP-Cloud）漂移校正算法，可实现秒级、纳米分辨率级、*XYZ*三维的漂移校正[15]。

此外，超分辨图像的质量评估也是图像重建中的重要环节。样本化学环境、光学设置条件等因素会在重构中对图像产生影响，造成噪声与失真，降低超分辨图像质量。因此，北京大学陈良怡课题组、哈尔滨工业大学李浩宇课题组及潘雷霆课题组[16]联合开发了一套超分辨尺度下显微图像重建质量评估方案，采用滚动傅里叶环相关计算（rolling Fourier ring correlation, rFRC）在超分辨尺度上进行量化计算，减小图像的像素级细小误差，同时引入改进的分辨率比例尺误差图促进超分辨率尺度下不同重建图像的有效融合，最大限度降低结构失真，实现以超分辨的精细尺度和像素级准确量化误差能力揭示图像空间信息的不确定性和分辨率分布的异质性，为基于超分辨图像的生物信息分析提供方法支撑。

近年来，深度学习技术在SMLM图像重建中的应用也取得了显著进展。Ouyang等[17]率先训练深

度神经网络以还原快速采集的单分子定位图像，实现了成像帧数显著减少，同时仍保持较高的定位精度。Ozcan团队[18]提出的Deep–Z方法实现了基于二维荧光图像的三维虚拟重建，为SMLM三维成像拓展了新路径。Hershko等[19]构建了神经网络，利用PSF的色度依赖性，实现了无需额外光学元件的多色图像分色。Shechtman团队[20]近期开发的DBlink方法结合卷积神经网络与双向长短期记忆网络，可从原始SMLM视频中直接生成超分辨时序图像，实现动态过程的高时空分辨成像。此外，Zhou等[21]提出了一种基于残差网络（residual networks, ResNet）的图像修复方法，通过增强局部特征提取能力减少图像伪影，从而加速图像重建过程。胡芬等[22]则设计了一套基于增强型深度超分辨率神经网络的重建流程，实现了从低分辨率微管图像到高质量超分辨图像的深度学习重建。

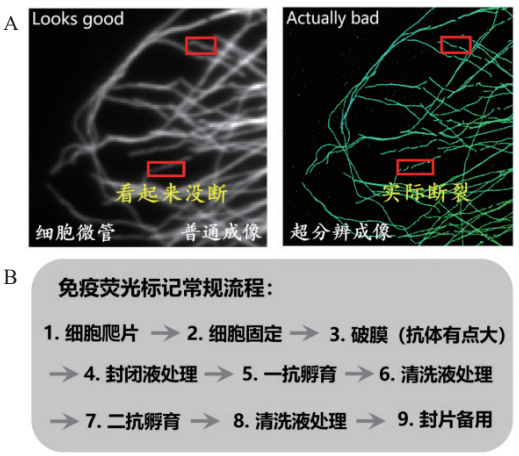
综上所述，高质量SMLM成像的实现，需依托以上3个关键的“硬实力”要素，即高性能的硬件系统、便捷易用的软件控制平台以及快速且高保真的图像重建算法体系。这些“硬实力”可通过采购并集成市场成熟化组件在短时间内实现快速部署。

2 SMLM全链条解决方案之“软实力”六要素

2.1 精准制样

超分辨成像的实现需要高质量样品适配。随着显微镜分辨率的提高，对样品的质量要求也在上升。任何制样过程带来的伪像、缺陷都会在超分辨成像下暴露无遗，所得结果谬之千里。SMLM作为分辨率最高的光学成像技术，对样品质量的要求也是最苛刻的[23–25]。如图2A所示，红色方框内微管普通成像看起来没有断裂，但由于制样不够精细，SMLM成像清晰揭示微管已经发生断裂。若研究某种药物是否破坏微管，基于超分辨成像结果容易得到假阳性结论。

超分辨成像都是基于荧光实现的。荧光标记主要依靠荧光蛋白转染和免疫荧光标记两种方法。前者多用于活细胞成像，后者则主要应用于固定细胞样本。SMLM由于单分子定位工作原理限制，一般用于固定细胞成像，即采用免疫荧光标记。免疫荧光标记步骤繁琐（图2B），耗费大量时间和人力（制备流程需要4 h或更长，需频繁操作），且人员学习上手慢，培养周期长（一般半年左右），不同人员制备质量参差不齐，显著影响成像的重复性和可靠性。因此，精准、标准化、可重复的样品制备不仅是高质量超分辨图像获取的关键，更是确保研究结论科学性和可验证性的基础。随着SMLM技术在生命科学领域的深入应用，发展自动化、低误差的样品制备方案已成为提升成像效率与研究可靠性的必然趋势。



注：SMLM为单分子定位成像技术。

图2 高质量样品制备对SMLM超分辨成像的重要性
A为单分子定位超分辨成像演示制样导致的微管断裂；B为免疫荧光制样流程

目前市面上已有一些自动化免疫染色制样设备，按其工作原理大致可分为两类：基于坐标移液系统和多通道灌流系统。前者通常采用步进电机配合*XYZ*轨道，实现精准的取液与换液操作，具备高通量处理能力，代表产品包括德国徕卡（Leica）的Bond系列、美国安捷伦（Agilent）的Dako Omnis、美国赛默飞世尔科技（Thermo Fisher Scientific）的Autostainer 360–2D、瑞士罗氏（Roche）的BenchMark系列等，单次可处理30个以上的样本。然而，该类设备普遍体积庞大、价格昂贵、耗材成本高，主要面向大型医院病理检验。美国ONI公司推出的Aplo Flow在一定程度上实现了设备的小型化，支持每批12个样本的自动化制备，但需配套专用样品容器，灵活性与成本控制仍存在不足。

相比之下，多通道灌流系统如法国Fluigent公司的Aria系统，通过空气压缩机结合多通道阀门和

液体流量计精确控制液体流动，具备更高的微量处理精度，但存在试剂交叉污染问题。另有文献提出一种由多个注射泵分别控制每种试剂的方案——NanoJ–Fluidics[26]，可进一步提高液体处理精度，但因多泵并联设计造成设备体积庞大，且试剂难以完全推出，存在严重死体积问题。总体而言，当前自动化制样设备在小型化、低成本、适配性与无污染等方面仍存在不足，难以满足科研实验室高质量成像的制样需求。

为突破现有制样设备局限，潘雷霆课题组自主研发出全自动免疫荧光制样机（图3）。机器零部件国产化率100%，工作原理首创[27]。该设备能够自动化完成细胞或切片样品的免疫荧光标记全过程，减少人工干预，提高制样的精准性，增强实验的重复性和可靠性，填补了超分辨成像领域自动化制样设备的空白。

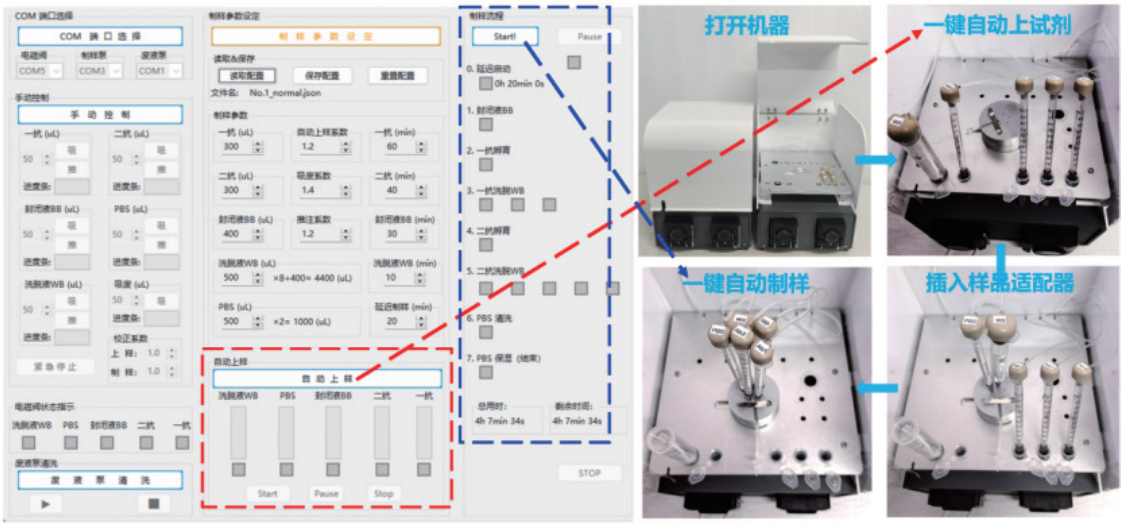


图3 潘雷霆课题组研发的全自动免疫荧光制样机操作流程及其控制软件界面

2.2 闪烁探针

SMLM基于“时间换空间”的成像策略，通过荧光探针在激发光照射下的可循环闪烁行为，在时序上实现原本空间上不可分辨分子的分离定位。因此，荧光探针是否具备优良的闪烁性能，成为高质量SMLM超分辨成像的核心前提。为了实现这一目标，需综合考虑探针种类、探针浓度、成像缓冲液配方以及激发光强等多种因素。

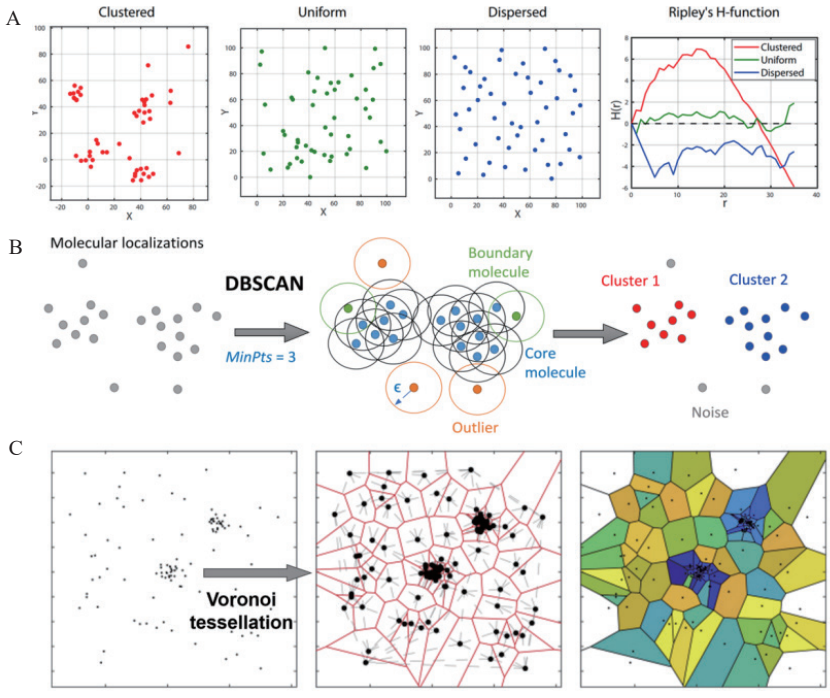
在研究复杂的生物结构及分子互作的过程中，多色成像因其信息维度的扩展而具有重要意义[28–29]。多色超分辨成像不仅能够提供目标分子的空间分布，还能揭示不同分子间的精细结构关系与功能协同，大大拓展了人们对细胞内生命现象的认知。目前商业有机荧光探针匹配的激发波段主要包括488 nm、561 nm、647 nm和750 nm，理论上可实现3～4色SMLM成像。然而，各激发波段所对应的荧光探针在闪烁性能上存在极大差异，已有的闪烁性能较好的荧光探针都集中在红外激发波段如Cy5、Alexa Fluor 647等，绿光和蓝光还没有对应的闪烁性较好的染料，限制了双色SMLM成像应用。

2.3 数据分析挖掘

从SMLM获得的数据通常呈现为庞大、复杂且高维的荧光定位点集合。这类“点云”数据不仅记录了生物分子在细胞内的空间分布，还蕴含着丰富的结构与功能信息。因此，亟需发展高效先进的图像处理算法和工具，推动SMLM数据的深入挖掘与解析。

目前，研究人员已发展了多种方法用于SMLM数据中的深层信息的提取与分析，特别是针对图像中普遍存在的簇状结构，聚类分析成为核心技术之一[30–31]。现有聚类方法主要分为两大类。一类基于统计空间分析，如Ripley’s K函数[32]、对关联函数（pair correlation function, PCF）[33]和贝叶斯聚类方法[34]，这些方法着重探讨分子间的空间相关性，适合评估聚集现象及其尺度依赖性。Ripley’s K函数基于点过程理论，通过统计不同尺度下某定位

点周围的邻近点数量，与随机分布模型进行比较，得到的函数曲线可用于定量描述聚集程度随尺度的变化（图 4A）。其在细胞膜蛋白聚集的研究中有很多应用，但该方法假设背景为均匀随机分布，难以处理存在背景噪声或边界效应的数据，且不直接输出聚类边界，需结合阈值设定或后续处理以获得具体簇信息。PCF作为 Ripley's K 函数的微分形式，对局部结构变化更为敏感，适合分析亚细胞尺度的微聚集行为，如细胞骨架蛋白的聚集尺度与分布模式。然而，其同样受边界效应和离群点的影响。贝叶斯聚类方法则在概率模型框架下对点集建模，以马尔可夫链蒙特卡洛等方法估算簇的数量及点的归属概率，可对聚类的不确定性进行量化分析，适用于分子复合体建模，但计算复杂度高，对大规模数据处理能力有限。另一类是基于密度或空间特征的聚类方法，常见的如基于密度的噪声应用空间聚类（density–based spatial clustering of applications with noise, DBSCAN）[35]、用于定位的快速优化聚类算法（fast optimized cluster algorithm for localizations, FOCAL）[36–37]、基于局部方向中心性的聚类算法（clustering algorithm using the local direction centrality, CDC）[38]、根据空间分布进行划分的泰森多边形（Voronoi tessellation）聚类算法[39–40]，以及根据样本点之间的距离进行划分的 K–means 算法[41]和层级聚类算法[42]等。DBSCAN通过设定半径参数 ε 与最小邻近点数 *Minpts*，将密度高于阈值的点归为一类，低密度点视为噪声，无需预设聚类数，能识别任意形状的结构，适合聚类数未知、结构多样的 SMLM图像分析，但对参数选择较敏感（图 4B），其作为经典密度聚类算法，已被广泛应用于 SMLM 数据提取[43–44]。FOCAL相较于 DBSCAN，可针对 SMLM特性优化密度估计与背景校正，显著提升处理效率，适合大规模、定位误差显著的数据处理。泰森多边形策略通过构建基于最近邻的空间划分图，从多边形面积判断局部密度变化，具备较强的自适应能力，尤其适用于非均匀背景的簇提取，但对噪声较敏感，计算复杂度较高（图 4C）。在已有算法基础上，潘雷霆课题组[45]开发了一种结合多次 DBSCAN和层次聚类的混合聚类方法，并成功应用于密度分布不均匀膜蛋白的 SMLM超分辨图像分割，以及具有独特的簇状分布结构特点核孔复合物的 SMLM数据的筛选和分析[46]。



注：DBSCAN为基于密度的噪声应用空间聚类。

图 4 代表性聚类方法原理[30] A 为 Ripley's K 函数聚类原理图；B 为 DBSCAN 聚类原理图；C 为泰森多边形聚类原理图

除了聚类分析，在SMLM成像数据中，共定位分析也是重要的挖掘方向，用于判断两种或多种分子在空间上的协同分布，揭示蛋白相互作用、蛋白复合体装配及功能区组织。由于SMLM图像稀疏、离散的点云特性，传统的共定位指标如Pearson或Manders相关系数并不适用，研究者开发了多种更符合点模式特征的分析方法。最基本的方法是最近邻分析（nearest neighbor analysis, NNA）[47–48]。该方法计算每个通道中一个分子与另一个通道中所有分子的最短欧式距离，统计其分布特征并与随机分布数据集进行比较，以判断是否存在显著性偏近，适用于评估分子间是否存在紧密缔合或相邻定位。NNA方法简单直观，不依赖于聚类结果，计算效率高，但在密度变化大或存在显著背景噪声时容易出现偏差。另一种被广泛采用的方法是互相关分析（cross–correlation analysis）[49–50]。其核心思想是基于点的空间自相关函数，计算两个通道在不同尺度下的点对协同概率，可量化不同尺度下的共聚集趋势，是研究大分子复合体结构或功能模块之间耦合关系的重要工具。

近年来，基于聚类的共定位分析方法日益受到关注[51]。这类方法首先对两个通道独立进行空间聚类分析，随后评估不同通道簇的重叠程度、几何关系或距离分布，如“簇—簇距离”或“簇间交集比例”等指标。这类方法能捕捉结构化共定位信息，特别适用于研究细胞膜蛋白复合物、信号斑块等高度组织化结构，但分析结果高度依赖于聚类参数设定，且难以评估共定位的统计学显著性。此外，基于泰森多边形的共定位分析也逐渐应用于SMLM数据[52–54]。该方法基于维诺图（Voronoi diagram）对SMLM数据进行分割，利用空间几何邻接关系构建共定位模型，适合处理信号强度不均或复杂背景样本。其优点在于无需预设聚类参数，能揭示结构复杂区域中的局部密度变化与空间关联，但其对定位误差敏感，结果解释高度依赖几何结构，不如直接的距离或概率模型直观，实际应用仍需结合随机检验和生物背景知识。

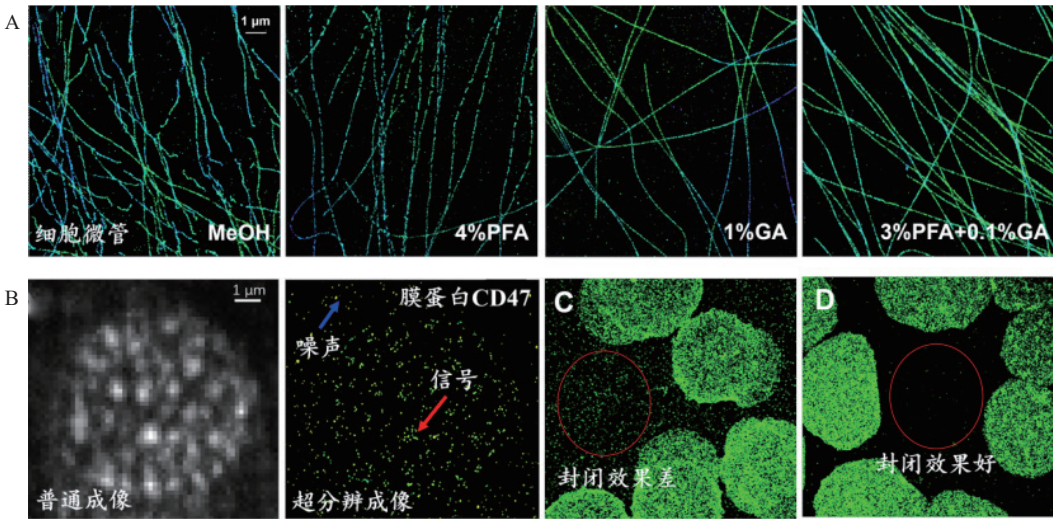
2.4 特色试剂耗材

SMLM成像对试剂与耗材的性能要求远高于传统荧光显微技术。由于成像过程高度依赖于荧光探针的单分子闪烁行为，任何影响探针光物理特性的环境因素，如氧含量、pH值、还原剂强度等，均可能直接干扰定位精度与图像重建效果。同时，若样品固定或封闭不充分，也会造成细胞结构破坏、背景信号升高等问题。因此，成像缓冲液、固定液和封闭液等关键试剂的性能优化，是保障成像质量与数据准确性的关键环节。

成像缓冲液是决定STORM成像质量的核心试剂之一。理想的缓冲体系需具备良好的还原环境与高效的氧清除能力，以维持荧光分子的可逆闪烁状态，从而产生稀疏且稳定的单分子信号。这类缓冲液通常含有单乙醇胺（monoethanolamine, MEA）、葡萄糖氧化酶/过氧化氢酶（glucose oxidase/ catalase, GOX/CAT）系统等成分。MEA作为还原剂，能够促使荧光分子从激发态迅速进入暗态并维持其稳定，从而减少激发态寿命，延长“熄灭”时间；而GOX/CAT系统则通过耗氧反应降低成像环境中的氧浓度，抑制荧光分子的光漂白。该组合能够有效控制荧光分子的闪烁频率，使得在任意时刻处于激发态的分子数量受控，有利于单分子逐一分辨与定位。

在样品固定方面，不同固定液对结构保存和抗原保留能力存在显著差异。多聚甲醛（paraformaldehyde, PFA）是目前应用最广泛的固定剂，能够较好地保存亚细胞结构，且不会明显影响抗原识别位点，但对膜蛋白的固定效果相对较差[55–56]。戊二醛（glutaraldehyde, GA）因含有多个醛基，固定强度更高，适合高保真度结构保存，但可能掩盖蛋白结构域，干扰抗体识别，且需配合硼氢化钠还原，以消除多余醛基带来的背景染色干扰。冰甲醇（methanol, MeOH）则通过快速沉淀蛋白实现固定，能较好保留抗原性，但会破坏细胞膜结构，影响真实形态的重建。因此，针对不同的成像靶标，需在结构完整性与抗原保留之间进行权衡，选择最优的固定方案[57–58]。SMLM成像结果显示，使用MeOH和4% PFA固定的COS–7细胞微管出现明显断裂，而1% GA固定的微管结构较完整但背景较高；相比之下，采用3% PFA与0.1% GA的混合固定液处理后，既保留了微管的连续性结构，又有效降低了背景噪声（图5A）。PFA与GA的混合配方在结构保真与抗原保留之间取得了良好平衡，但具体比例仍需根据靶标特性进一步优化。

此外，在免疫染色成像中，非特异性结合带来的背景噪声是影响超分辨成像定位精度的重要干扰源。传统封闭液在SMLM体系下常常难以充分去除背景信号，导致结果失真。例如，对于膜蛋白CD47这类点状成像目标，噪声也是点（图5B蓝色箭头处），信号也是点（图5B红色箭头处），若封闭效果不好，会引发非特异标记，则无法区分采集的数据哪些是信号点，哪些是噪声点。选用好的封闭试剂，背景噪声可大幅减少（见图5C、图5D红色圆圈处）。



注：SMLM为单分子定位成像技术；MeOH为冰甲醇；PFA为多聚甲醛；GA为戊二醛。

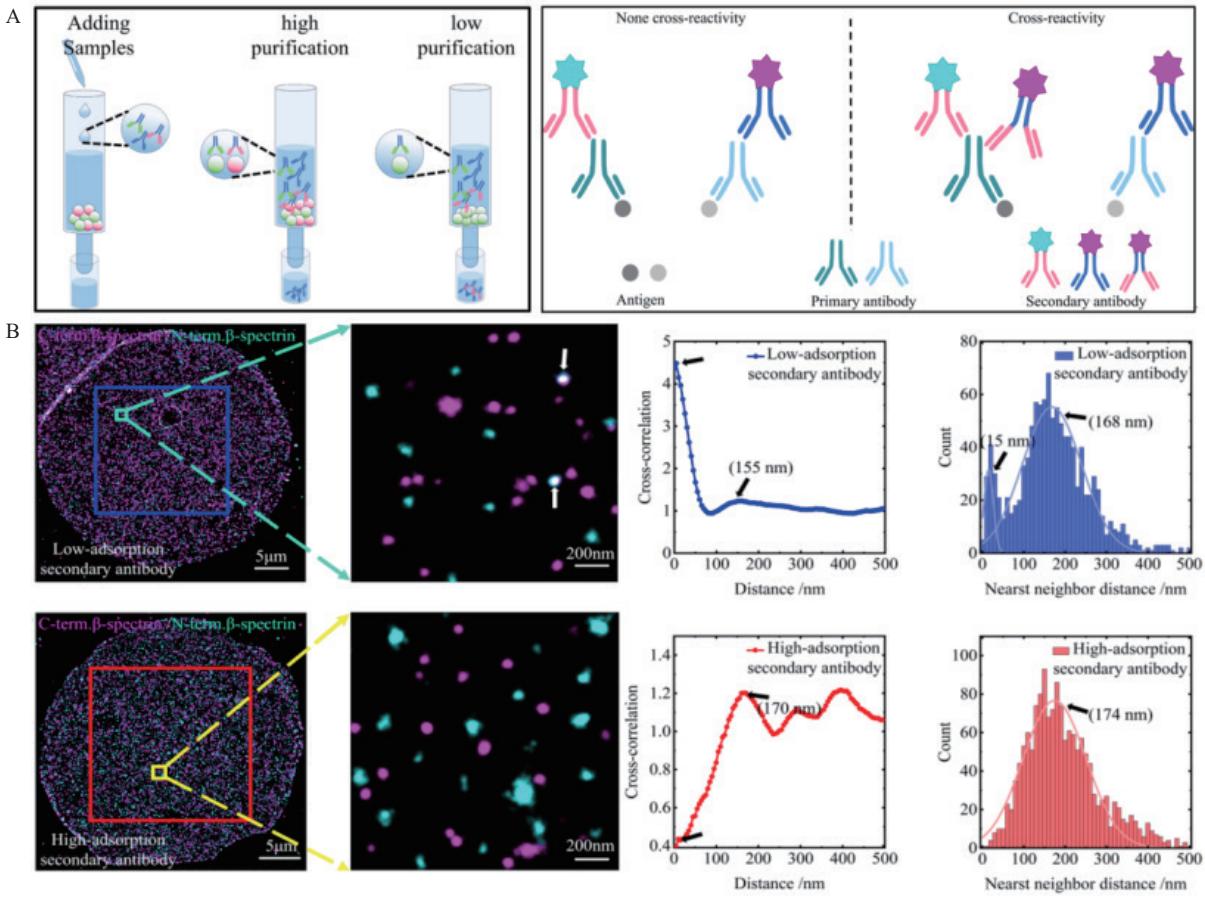
图5 固定剂和封闭液对SMLM成像的重要性 A为不同固定剂处理下COS-7细胞微管SMLM成像结果的差异；B为点簇状膜蛋白SMLM成像中的信号点与噪声点难以区分；C为封闭效果差导致背景噪声高；D为封闭效果好可有效降低背景噪声

2.5 特异性抗体

STORM成像基于免疫荧光标记，需使用带荧光探针的一抗或二抗标记目标蛋白分子，抗体的选择对成像质量具有决定性影响。由于该技术依赖于单分子层面的精准定位与稀疏激发，任何标记效率不足或非特异性结合现象，都会显著影响图像的真实性。因此，相较于常规荧光成像，其对抗体的结合位点选择与特异性都提出了更高的要求。

在一抗的筛选方面，应优先选择高亲和力、特异性强的单克隆抗体，避免多克隆抗体中潜在的非特异性识别风险。同时，还需确保其识别位点在固定后的样本中仍处于暴露状态，避免因构象遮挡而影响结合效率。对于膜蛋白或细胞器内在蛋白，若其抗原位点位于跨膜区或封闭结构内，常规染色难以充分标记。为提升靶标覆盖率，可采用识别不同表位的一抗组合策略，实现多位点共标记，以增强成像完整性和稳定性。

相比一抗，二抗虽然主要在放大信号方面发挥关键作用，但其非特异性结合问题往往更为突出。抗体分子呈典型“Y”型结构，“Y”臂末端Fab为抗原结合片段（fragment of antigen binding），柄部可结晶片段（fragment crystallizable, Fc）常是二抗识别的结合位点。二抗通常是多克隆抗体，可与一抗Fc段的多个位点结合，从而实现信号增强。然而，近期潘雷霆课题组实验发现这种多位点结合同时也带来了较大的非特异性风险，尤其在多靶标染色实验中，不同物种来源的一抗并存，若二抗物种专一性不足，极易造成信号串扰[59]。因此，选择具备高物种特异性的二抗显得尤为关键。一般二抗的生产过程中会进行预吸附处理，即将二抗与可能导致非特异性交叉反应的其他物种血清蛋白预先孵育，去除可能引发交叉结合的抗体成分，从而有效提高二抗的物种专一性（图6A）。选用经过充分预吸附处理的高特异性二抗，可显著降低背景噪声和伪信号，保障信号的真实性和来源的可靠性。为评估二抗的物种特异性，潘雷霆课题组基于红细胞骨架模型中β-血影蛋白（β-spectrin）N端与C端在空间分布上的互斥位置关系，设计了双色SMLM成像实验。结果表明，低吸附二抗会由于非特异结合产生信号串扰，造成β-spectrin N端和C端共定位假象（图6B）[59]。这一实验方案为通过超分辨成像评估二抗物种特异性提供了标准化的技术路径。



注：SMLM为单分子定位成像技术；β–spectrin为β–血影蛋白。

图6 二抗物种特异性对SMLM成像的重要性[59] A为二抗预吸附提高物种特异性原理示意图；B为低吸附和高吸附二抗标记的红细胞β–spectrin N端和C端的双色STORM成像及基于互相关和最邻近距离的共定位分析结果

2.6 实际应用

SMLM已在生物学诸多领域展现出广泛的应用前景。该技术不仅实现了线粒体、内质网、中心粒、核孔复合物、染色质、黏着斑及细胞骨架等亚细胞结构的高精度解析，也使得在纳米尺度下可视化基因组DNA、蛋白质等关键生物大分子的空间分布成为可能。例如，研究者利用SMLM成功解析了核孔复合物八重对称性结构的空间组织特征，并揭示了其精密构型与生物功能之间的关联[60]。在染色质研究中，SMLM被用于绘制基因组DNA在细胞核中的高分辨排布图谱，推动了三维基因组结构与功能调控机制的深入探索[61]。在免疫细胞中，SMLM揭示了T细胞受体（T cell receptor, TCR）在细胞膜上的纳米级聚簇排列，阐明聚簇状态与信号转导活性的关联[62]。SMLM也被用于构建复杂的分子互作网络图谱，如揭示大分子复合物中蛋白组分之间的耦合关系[63]，以及神经突触中突触前后分子精细对接模式[64]等。

围绕前沿生命科学问题，潘雷霆课题组开展了多项具有代表性的SMLM应用研究。在人红细胞膜骨架系统组织结构特性方面，创新性地引入最近距离分析、二维自/互相关分析数理方法，揭示人红细胞膜骨架核心组分spectrin生理状态长度约为80 nm，澄清了近40年的spectrin生理长度疑问[65]。开发膨胀单分子定位的超分辨成像技术（ultrastructure expansion single–molecule localization microscopy, U–ExSMLM），达6 nm分子分辨率水平，并揭示红细胞骨架分布存在不对称性，为理解红细胞双凹圆饼形态提供直观的成像支撑[66]。提出二抗交联单分子定位超分辨成像方法，为膜蛋白组织分布及与骨架关系研究提供新策略[67]。在真核细胞骨架组织调控特性方面，揭示了细胞中间纤维骨架纳米尺度新型、快速可逆的解聚特性，助力理解细胞对环境力响应的骨架调控机制[68]。发展信号叠

加再重构方法，发现伪足小体骨架复合物的三维形貌呈“雪人”形状而非传统认为的“圆屋顶”形状，更新了伪足小体骨架复合物纳米尺度结构信息[69-70]。

为进一步推动SMLM技术的发展，还需积极拓展其在基础科研、转化医学及药物研发等方向的应用，构建以问题为导向的超分辨成像解决方案，形成从基础研究到应用开发的闭环。如细胞外囊泡（extracellular vesicles, EVs）尤其是外泌体在细胞间通讯、疾病进展及液体活检等方面具有重要生物学意义，但其直径大小只有 30 ~ 200 nm，结构与功能研究受限于分辨率瓶颈。SMLM可对EVs表面蛋白质分布、微区聚集及分泌过程进行精准成像与量化分析，为其分型、功能机制研究与肿瘤早筛提供高分辨可视化手段[71]。再如传统药效评价方法多依赖平均信号分析，难以反映异质细胞群中微观变化。SMLM成像平台可进行高内涵小分子药物筛选与药效评价，在单分子水平观察药物与靶点蛋白的结合状态、作用位置，结合定量图像分析与高维数据挖掘算法，实现药效精准评价，构建纳米尺度精准药理学体系[72]。

综上所述，SMLM系统的构建不仅依赖于硬件系统、软件控制和图像重建3大“硬实力”要素，更离不开精准制样、闪烁探针、数据分析挖掘、特色试剂耗材、特异性抗体与实际应用6个“软实力”层面的技术沉淀与方法体系建设。这些“软实力”要素需要在长期实践研究中持续优化、积累与打磨，才能真正推动SMLM走向更广阔的科研应用场景。

“九要素”共同支撑SMLM稳定运行与高效应用的全链条技术生态。潘雷霆课题组开发的SMLM“九要素”全链条技术体系如图7所示。在硬件层面，筛选出激光器、高灵敏相机等国产部件，自主研发出SMLM超分辨显微镜STORM Ultra300，实现国产高端替代，打破国外垄断。同时自主研发全自动免疫荧光制样机Workflow Ultra300，填补超分辨制样设备国内空白，显著提升了样品制备的效率与稳定性。在软件与算法方面，开发了图像漂移校正与数据挖掘等关键环节算法，实现SMLM数据的高效解码与定量分析。同时，不断拓展应用领域，努力推动SMLM从成像工具走向揭示生命规律的核心手段。

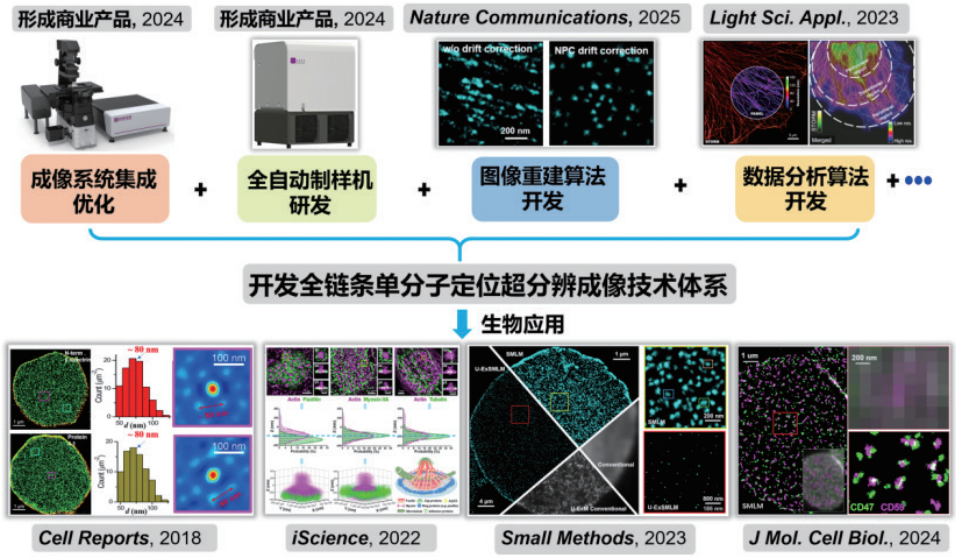


图7 潘雷霆课题组开发的单分子定位超分辨成像全链条解决方案

3 总结

SMLM凭借其卓越的空间分辨率和广泛的应用潜力，在生命科学研究领域占据了越来越重要的地位。本文在梳理相关研究成果的基础上，提出一套SMLM“九要素”全链条解决方案，围绕“硬实力”三要素——硬件系统、软件控制与图像重建，以及“软实力”六要素——精准制样、闪烁探针、数据分析挖掘、特色试剂耗材、特异性抗体与实际应用，构建起从成像设备到生物学应用的一体化技术体系。这九要素的协同支撑方案可推动SMLM从“高端仪器”到“高效工具”的跨越。软硬实力结合的技术体系大幅提升了SMLM的操作便捷性、成

像可靠性与数据可用性，为高端显微成像设备的普惠化应用和高质量发展奠定了坚实基础。未来，随着各要素的持续优化与融合创新，该全链条解决方案将在生命科学、基础医学、药物研发、材料科学等领域发挥更大作用，为科学探索提供更精细、更准确的支撑。

[参 考 文 献]

[1] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy [J]. Opt Lett, 1994, 19(11): 780-782.

[2] Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy [J]. J Microsc, 2000, 198(2): 82-87.

[3] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. Science, 2006, 313(5793): 1642-1645.

[4] Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. Nat Methods, 2006, 3: 793-796.

[5] Lelek M, Gyparaki M T, Beliu G, et al. Single-molecule localization microscopy [J]. Nat Rev Methods Primers, 2021, 1: 39.

[6] 杨建宇,董浩,邢福临,等.单分子定位超分辨成像技术进展及应用 [J].激光与光电子学进展, 2021, 58(12): 1-35.

[7] Liu S, Hoess P, Ries J. Super-resolution microscopy for structural cell biology [J]. Annu Rev Biophys, 2022, 51: 301-326.

[8] 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.

[9] Henriques R, Lelek M, Fornasiero E F, et al. QuickPALM: 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ [J]. Nat Methods, 2010, 7: 339-340.

[10] Ovesný M, Křížek P, Borkovec J, et al. ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging [J]. Bioinformatics, 2014, 30(16): 2389-2390.

[11] Bernhem K, Brismar H. SMLocalizer, a GPU accelerated ImageJ plugin for single molecule localization microscopy [J]. Bioinformatics, 2018, 34(1): 137-138.

[12] Davis J L, Soetikno B, Song K H, et al. RainbowSTORM: an open-source ImageJ plug-in for spectroscopic single-molecule localization microscopy (sSMLM) data analysis and image reconstruction [J]. Bioinformatics, 2020, 36(19): 4972-4974.

[13] Ries J. SMAP: a modular super-resolution microscopy analysis platform for SMLM data [J]. Nat Methods, 2020, 17: 870-872.

[14] Wang Y, Schnitzbauer J, Hu Z, et al. Localization events-based sample drift correction for localization microscopy with redundant cross-correlation algorithm [J]. Opt Express, 2014, 22 (13): 15982-15991.

[15] Hou M, Yang J, Yang M, et al. Fast and robust drift correction for single-molecule localization microscopy[J]. Nature Communications, 2025, 16: 9031.

[16] Zhao W, Huang X, Yang J, et al. Quantitatively mapping local quality of super-resolution microscopy by rolling Fourier ring correlation [J]. Light Sci Appl, 2023, 12: 298.

[17] Ouyang W, Aristov A, Lelek M, et al. Deep learning massively accelerates super-resolution localization microscopy [J]. Nat Biotechnol, 2018, 36: 460-468.

[18] Wu Y, Rivenson Y, Wang H, et al. Three-dimensional virtual refocusing of fluorescence microscopy images using deep learning [J]. Nat Methods, 2019, 16: 1323-1331.

[19] Hershko E, Weiss L E, Michaeli T, et al. Multicolor localization microscopy and point-spread-function engineering by deep learning [J]. Opt Express, 2019, 27(5): 6158-6183.

[20] Saguy A, Alalouf O, Opatovski N, et al. DBlink: dynamic localization microscopy in super spatiotemporal resolution via deep learning [J]. Nat Methods, 2023, 20: 1939-1948.

[21] Zhou Z, Kuang W, Wang Z, et al. ResNet-based image inpainting method for enhancing the imaging speed of single molecule localization microscopy [J]. Opt Express, 2022, 30(18): 31766-31784.

[22] 胡芬,林洋,侯梦迪,等.基于深度学习的细胞骨架图像超分辨重建 [J].光学学报, 2020, 40(24): 48-55.

[23] Jimenez A, Friedl K, Leterrier C. About samples, giving examples: optimized single molecule localization microscopy [J]. Methods, 2020, 174: 100-114.

[24] Whelan D R, Bell T D M. Image artifacts in single molecule localization microscopy: why optimization of sample preparation protocols matters [J]. Sci Rep, 2015, 5: 7924.

[25] Kaplan C, Ewers H. Optimized sample preparation for single-molecule localization-based superresolution microscopy in yeast [J]. Nat Protoc, 2015, 10: 1007-1021.

[26] Almada P, Pereira P M, Culley S, et al. Automating multimodal microscopy with NanoJ-Fluidics [J]. Nat Commun, 2019, 10: 1223.

[27] 潘雷霆,王波,胡芬.自动制样机的适配器及自动制样机的制作方法: ZL20242 0638317.7 [P]. 2025-03-28.

[28] 潘雷霆,胡芬,张心正,等.多色单分子定位超分辨显微成像术 [J].光学学报, 2017, 37(3): 86-93.

[29] Chen X, Wang X, Huang F, et al. Multicolor single-molecule localization microscopy: review and prospect [J]. PhotoniX, 2024, 5: 29.

[30] Khater I M, Nabi I R, Hamarneh G. A review of super-resolution single-molecule localization microscopy cluster analysis and quantification methods [J]. Patterns, 2020, 1(3): 100038.

[31] Nieves D J, Pike J A, Levet F, et al. A framework for evaluating the performance of SMLM cluster analysis algorithms [J]. Nat Methods, 2023, 20: 259-267.

[32] Kiskowski M A, Hancock J F, Kenworthy A K. On the use of Ripley's K-function and its derivatives to analyze domain size [J]. Biophys J, 2009, 97(4): 1095-1103.

[33] Sengupta P, Jovanovic-Talisman T, Lippincott-Schwartz J. Quantifying spatial organization in point-localization superresolution images using pair correlation analysis [J]. Nat Protoc, 2013, 8: 345-354.

[34] Rubin-Delanchy P, Burn G L, Griffié J, et al. Bayesian cluster identification in single-molecule localization microscopy data [J]. Nat Methods, 2015, 12: 1072-1076.

[35] Ester M, Kriegel H P, Sander J, et al. A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise [C] //Proceedings of the Second International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining, August 2, 1996, Virigina, USA. Virigina: AAAI Press, 1996: 226-231.

[36] Mazouchi A, Milstein J N. Fast optimized cluster algorithm for localizations (FOCAL): a spatial cluster analysis for super–resolved microscopy [J]. Bioinformatics, 2016, 32(5): 747–754.
[37] Nino D F, Djayakarsana D, Milstein J N. FOCAL3D: a 3–dimensional clustering package for single–molecule localization microscopy [J]. PLoS Comput Biol, 2020, 16(12): e1008479.
[38] Peng D, Gui Z, Wang D, et al. Clustering by measuring local direction centrality for data with heterogeneous density and weak connectivity [J]. Nat Commun, 2022, 13: 5455.
[39] Levet F, Hosy E, Kechkar A, et al. SR–Tesseler: a method to segment and quantify localization–based super–resolution microscopy data [J]. Nat Methods, 2015, 12: 1065–1071.
[40] 杨建宇,胡芬,侯梦迪,等.人红细胞膜骨架超分辨图像的Voronoï分析[J].中国激光, 2023, 50(15): 31–40.
[41] Mondal P P. Probabilistic optically–selective single–molecule imaging based localization encoded (POSSIBLE) microscopy for ultra–superresolution imaging [J]. PLoS One, 2020, 15(11): e0242452.
[42] Murtagh F, Contreras P. Algorithms for hierarchical clustering: an overview [J]. Wiley Interdiscip Rev Data Min Knowl Discov, 2012, 2(1): 86–97.
[43] Siddig S, Aufmkolk S, Doose S, et al. Super–resolution imaging reveals the nanoscale organization of metabotropic glutamate receptors at presynaptic active zones [J]. Sci Adv, 2020, 6(16): eaay7193.
[44] Meng J X, Zhang Y, Saman D, et al. Hyperphosphorylated tau self–assembles into amorphous aggregates eliciting TLR4–dependent responses [J]. Nat Commun, 2022, 13: 2692.
[45] 杨建宇,胡芬,邢福临,等.结合多次DBSCAN和层次聚类算法的膜蛋白单分子定位超分辨图像分割[J].中国激光, 2023, 50(3): 78–85.
[46] 侯梦迪,胡芬,杨建宇,等.核孔复合物单分子定位超分辨图像的筛选和重构[J].中国激光, 2024, 51(3): 67–75.
[47] Malkusch S, Endesfelder U, Mondry J, et al. Coordinate–based colocalization analysis of single–molecule localization microscopy data [J]. Histochem Cell Biol, 2012, 137(1): 1–10.
[48] Feher K, Graus M S, Coelho S, et al. K–neighbourhood analysis: a method for understanding SMLM images as compositions of local neighbourhoods [J]. Front Bioinform, 2021, 1: 724127.
[49] Patra P, Sanchez C P, Lanzer M, et al. Pair cross–correlation analysis for assessing protein co–localization [J/OL]. Biophys J, 2025 (2025–03–13) [2025–05–18]. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349525001389.
[50] McCall A D. Colocalization by cross–correlation, a new method of colocalization suited for super–resolution microscopy [J]. BMC Bioinformatics, 2024, 25: 55.
[51] Pageon S V, Nicovich P R, Mollazade M, et al. Clus–DoC: a combined cluster detection and colocalization analysis for single–molecule localization microscopy data [J]. Mol Biol Cell, 2016, 27(22): 3627–3636.
[52] Strack R. Analyzing colocalization in SMLM [J]. Nat Methods, 2019, 16: 680.
[53] Levet F, Julien G, Galland R, et al. A tessellation–based colocalization analysis approach for single–molecule localization microscopy [J]. Nat Commun, 2019, 10: 2379.
[54] Ejdrup A L, Lycas M D, Lorenzen N, et al. A density–based enrichment measure for assessing colocalization in single–molecule localization microscopy data [J]. Nat Commun, 2022, 13: 4388.
[55] Tanaka K A K, Suzuki K G N, Shirai Y M, et al. Membrane molecules mobile even after chemical fixation [J]. Nat Methods, 2010, 7: 865–866.
[56] Leyton–Puig D, Kedziora K M, Isogai T, et al. PFA fixation enables artifact–free super–resolution imaging of the actin cytoskeleton and associated proteins [J]. Biol Open, 2016, 5(7): 1001–1009.
[57] Paavilainen L, Edvinsson A, Asplund A, et al. The impact of tissue fixatives on morphology and antibody–based protein profiling in tissues and cells [J]. J Histochem Cytochem, 2010, 58(3): 237–246.
[58] Pilchová V, Richter A, Meurer M, et al. The effect of chemical fixation with paraformaldehyde, glutardialdehyde or methanol on immunofluorescence staining of neutrophils and neutrophil extracellular traps [J]. Innate Immun, 2025, 31: 17534259241307563.
[59] 邓师禹,胡芬,侯梦迪,等.二抗物种特异性对双色STORM成像的影响[J].激光与光电子学进展, 2024, 61(6): 145–152.
[60] Thevathasan J V, Kahnwald M, Cieśli ń ski K, et al. Nuclear pores as versatile reference standards for quantitative superresolution microscopy [J]. Nat Methods, 2019, 16: 1045–1053.
[61] Mateo L J, Murphy S E, Hafner A, et al. Visualizing DNA folding and RNA in embryos at single–cell resolution [J]. Nature, 2019, 568: 49–54.
[62] Rossboth B, Arnold A M, Ta H, et al. TCRs are randomly distributed on the plasma membrane of resting antigen–experienced T cells [J]. Nat Immunol, 2018, 19: 821–827.
[63] Sydor A M, Czymmek K J, Puchner E M, et al. Super–resolution microscopy: from single molecules to supramolecular assemblies [J]. Trends Cell Biol, 2015, 25(12): 730–748.
[64] Tang A H, Chen H, Li T P, et al. A trans–synaptic nanocolumn aligns neurotransmitter release to receptors [J]. Nature, 2016, 536: 210–214.
[65] Pan L, Yan R, Li W, et al. Super–resolution microscopy reveals the native ultrastructure of the erythrocyte cytoskeleton [J]. Cell Rep, 2018, 22(5): 1151–1158.
[66] Hou M, Xing F, Yang J, et al. Molecular resolution mapping of erythrocyte cytoskeleton by ultrastructure expansion single–molecule localization microscopy [J]. Small Methods, 2023, 7(2): 2201243.
[67] Yang J, Xing F, Hu F, et al. Super–resolution microscopy unveils the nanoscale organization and self–limiting clustering of CD47 in human erythrocytes [J]. J Mol Cell Biol, 2025, 16(9): mjae041.
[68] Pan L, Zhang P, Hu F, et al. Hypotonic stress induces fast, reversible degradation of the vimentin cytoskeleton via intracellular calcium release [J]. Adv Sci, 2019, 6(18): 1900865.
[69] Hu F, Zhu D, Dong H, et al. Super–resolution microscopy reveals nanoscale architecture and regulation of podosome clusters in primary macrophages [J]. iScience, 2022, 25(12): 105514.
[70] Xing F, Dong H, Yang J, et al. Mesenchymal migration on adhesive–nonadhesive alternate surfaces in macrophages [J]. Adv Sci, 2023, 10(23): 2301337.
[71] Ghanam J, Chetty V K, Zhu X, et al. Single molecule localization microscopy for studying small extracellular vesicles [J]. Small, 2023, 19(12): 2205030.
[72] Beghin A, Kechkar A, Butler C, et al. Localization–based super–resolution imaging meets high–content screening [J]. Nat Methods, 2017, 14: 1184–1190.