中国科学: 化学 2019 年 第 49 卷 第 5 期: 787 ~ 800
SCIENTIA SINICA Chimica chemcn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

评 述 庆祝南开大学成立100周年专刊

单分子/单颗粒光学显微成像研究

叶中菊, 刘华, 肖乐辉*

南开大学化学学院, 药物化学生物学国家重点实验室, 天津生物传感与分子识别重点实验室, 天津 300071
*通讯作者, E-mail: lehuixiao@nankai.edu.cn

收稿日期: 2018-08-27; 接受日期: 2018-09-13; 网络版发表日期: 2018-10-30
国家自然科学基金(编号: 21522502)资助项目

摘要 作为一种新型的光学显微成像手段, 单分子、单颗粒光学显微成像技术具有高分辨率、高通量、高灵敏度、非接触、无损伤等优点, 在各个学科领域得到了广泛应用. 结合本课题组的研究方向, 本文综述了单分子、单颗粒光学显微成像研究中的单分子检测, 单颗粒光学显微成像追踪, 超分辨成像以及单颗粒催化四个方面的重要研究进展, 并展望了该成像技术在生物医学应用中的发展前景与挑战.

关键词 单分子检测, 单颗粒追踪, 超分辨成像, 单颗粒催化, 光学显微成像

1 引言

近年来, 随着研究技术的进步, 对各种疾病的诊断、检测以及机理研究不断深入, 在单个分子、颗粒以及细胞层面统计分析目标物的物理、化学特性及生物学效应已成为趋势[1~8]. 然而, 许多关键问题依然存在. 例如, 传统的分析方法主要考察的是宏观层面对复杂体系中大量分子的整体或平均行为, 忽略了掩盖在整体平均下的局部差异以及个体行为. 这些个体行为间的差异性, 在许多生理过程和化学反应过程中发挥着至关重要的作用, 如生命体内各种蛋白、基因对生命体的调控, 某些化学反应中间态的变化等. 与此同时, 某些疾病的出现需要研究者将目光转移到单个细胞、亚细胞层甚至分子层面, 如基因突变和蛋白质的错误折叠等. 因此, 实现对个体差异性的分析, 在单分子、单颗粒层面研究分子、颗粒的动力学特征, 对诸多生物、物理学过程的揭示和疾病的高灵敏检测具有重要的指导意义.

光学显微成像技术以光学显微镜为成像平台, 对微观物体结构进行放大成像, 以供人们提取细微结构信息, 进而为重要生命过程的揭示以及疾病的诊断和治疗提供新的思维和新的方法. 根据显微镜的成像原理主要分为以下4种显微技术: 暗场显微镜(dark-field microscopy, DF)、荧光显微镜(fluorescence microscope, FM)、共聚焦显微镜(confocal microscopy, CM)以及微分干涉显微镜(differential interference contrast microscope, DIC). DF主要利用颗粒的散色光成像, 一般适用于溶液体系中贵金属纳米颗粒及微生物的动态追踪[9,10]; FM一般以近单色、光强较强、波长较短的紫外光作为激发光源, 是生物、医学以及材料科学研究中一种重要的成像手段[11]; CM具有控制景深的能力、消除和减少焦平面外的背景干扰、逐点成像、分

引用格式: Ye Z, Liu H, Xiao L. Recent advances of single molecule/particle imaging with optical microscopic methods. *Sci Sin Chim*, 2019, 49: 787–800, doi: 10.1360/N032018-00199

© 2018 《中国科学》杂志社

辨率较高等特点, 在细胞、组织及亚细胞层成像方面有着广泛应用[12~14]; DIC成像具有较强的立体感, 主要被用于细胞器成像、单颗粒追踪等生物医学研究[15~17].

与一般的分析检测手段相比, 光学显微成像技术具有高灵敏度、高通量、高时空分辨率、非接触、无损伤等优点. 光学显微镜的发展, 催生了一系列的成像方法, 为原子、分子水平化学反应的监测, 活细胞内颗粒、蛋白的追踪以及单细胞尺度形态结构的分析开辟了道路. 其中, 单分子、单颗粒显微成像技术在物理、化学、生物、医学等研究领域都得到了广泛的应用. 结合本课题组的研究方向, 本文主要从单分子检测、单颗粒追踪、超分辨成像及单颗粒纳米催化四个方面对单分子、单颗粒光学显微成像的最新研究进展进行了综述, 最后展望了该技术在复杂生物体系中的应用前景和挑战.

2 单分子、单颗粒光学显微成像技术

单分子、单颗粒光学显微成像技术是基于普通光学显微成像手段, 在单个分子、颗粒或单个细胞层面研究纳米材料与生物分子的相互作用、反应机制、运动规律, 或者利用分子及纳米颗粒作为探针在活细胞水平上探索复杂生物学过程的机理, 从而为高效治疗手段的开发以及微观生命过程的揭示提供有力证据, 是从宏观到微观、从整体到个体探索研究的强有力工具, 主要具有以下3个优点: (1) 高时空分辨率, 能够实现对单个分子、颗粒以及单个细胞水平的实时、原位监测, 在获得大量分子或颗粒的测量数据后, 可针对个别感兴趣或反常的分子或颗粒进行单独的信息分析; (2) 研究的是复杂体系中的个体行为或者整体中的局部差异, 可以进一步揭示掩藏在宏观测量下的微观动力学; (3) 在测量的时间变量中, 不要求大量分子或颗粒的行为保持同步一致, 允许不同分子、颗粒的反应路径或状态演变的差异. 单分子、单颗粒光学显微成像技术可以通过实时原位监测来获得个体行为信息, 捕捉到被宏观测量所掩没的极少数的中间体或过渡状态, 在生物医学应用以及生物化学反应中存在较大的潜在价值[6,18~22].

借助于单分子、单颗粒光学显微成像技术, 研究者在生物检测、遗传信息传递、药物传输等领域均取得了重要进展[23]. 例如, 利用单分子、单颗粒光学显微成像技术, 通过单颗粒计数, 研究者实现了对重金属离子以及生物大分子超高灵敏检测[24~30]; 通过单颗粒追踪技术, 进一步揭示了功能化的纳米颗粒与细胞膜的相互作用行为以及在细胞内的代谢过程[18,19,31,32]; 利用单分子、单颗粒的光学特性进行超分辨成像研究, 细胞结构得到了进一步揭示[33]; 单颗粒催化研究揭示了隐藏在整体宏观层面下单个颗粒的异质性等[21,24]. 这些研究结果都有利于生物医学中疾病的诊断与治疗、化学反应中反应机理以及物理学中分子的运动机制的揭示.

3 单分子、单颗粒显微成像技术的主要应用

3.1 单分子检测

疾病的早期诊断为各种重大疾病的治疗提供了可能, 近年来得到了人们越来越多的关注. 开发快速、高通量、超灵敏疾病标志物的检测方法一直是分析化学领域的热点. 传统的信号放大技术可以实现疾病标志物的高灵敏检测, 但是扩增技术通常会使背景值增高, 影响检测结果的重现性. 与此同时, 其反应时间长并可能出现假阳性输出, 这阻碍了扩增技术在实际样品测定中的进一步应用. 随着高性能检测器的普及以及各种光学测量方法的涌现, 单分子光谱技术由于其无需信号放大就可以实现单分子水平上的超灵敏分析, 被广泛应用于生物医学以及分析化学等领域. 单分子、单颗粒的检测方法主要可以分为两大类: 基于散射模式的检测方法和基于荧光模式的检测方法.

3.1.1 基于散射模式的检测方法

基于散射模式的检测方法主要是通过改变贵金属纳米粒子的材料组成和局部环境的介电常数, 引起贵金属纳米粒子局域表面等离子体共振(LSPR)的变化, 从而达到检测目标物质的目的. 利用贵金属纳米粒子较好的散射性能, 结合单颗粒检测的方法, 研究者在生物医学以及分析化学等领域取得了一系列研究成果[34~37]. 其中, 龙亿涛教授课题组利用贵金属纳米颗粒的散射成像取得了一系列的研究成果, 例如, Shi等[38]利用14 nm金纳米颗粒(GNPs)和60 nm GNPs耦合导致GNPs的LSPR的变化, 实现了暗场模式下在单颗

粒水平上对点击反应的实时监测. Zhang等[39]基于Cu壳对GNPs局部环境的介电常数的调控, 实现了细胞内烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)代谢相关生物过程的单颗粒监测. Jing等[40]基于金棒(GNRs)周围介电常数和电子密度的变化, 实现了单颗粒电催化反应的成像监测. 此外, Ma等[41]利用金、银纳米颗粒的散色特性, 实现了两种癌症标志物的同时检测; Li等[42]使用单颗粒计数的方法, 基于GNPs的光学特性, 检测了与阿尔茨海默症相关的核酸序列, 检测下限达到3 fM. 近年来, 本课题组[43~45]在基于单颗粒的分析检测领域也取得了一些研究成果. 基于金、银纳米粒子耦合效应, Poon等[44]实现了对血清中癌症标志物的定量测定. 如图1(A)所示, 在目标抗原存在下, 由一抗修饰的GNPs和由二抗修饰的银纳米粒子可以发生耦合, 形成的夹心免疫复合物的LSPR散射信号较单个探针有显著增强. 通过暗场显微镜测量探针颗粒的散射强度, 目标蛋白的含量可以被准确量化. 为了验证这种方法的可靠性, 癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原(PSA)和甲胎蛋白(AFP)的测量结果与通过常规酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒获得的结果进行了比较, 测量结果显示这两个数据集的一致性很好. 这3种抗原的检测限分别为1.7、3.3和5.9 pM, 线性动态范围为0~300 pM. 由于该方法简单且准确, 它可以适用于未来临床试验中的疾病筛查.

Qi等[45]基于Cu^{2+}诱导的GNPs表面介电常数的变化设计了一种方便、灵敏、彩色编码的单颗粒焦磷酸盐(PPi)检测方法. 实验设计如图1(B)所示, 在NADH的存在下, GNPs可以将Cu^{2+}催化沉积在GNPs的表面, 引起GNPs周围介电常数的变化, 从而使其LSPR光谱红移. GNPs的暗场成像也由绿色变成黄色. 而当焦磷酸盐存在于体系中时, 焦磷酸盐可以与Cu^{2+}络合形成复合物, 阻止催化沉积的发生, 从而GNPs的LSPR光谱不会发生改变. 通过测量溶液在暗场成像下的黄色颗粒占全部颗粒的比重, 即可实现溶液中焦磷酸盐的定量测量.

3.1.2　基于荧光模式的检测方法

荧光探针一般具有激发波长可调、尺寸可调、表面功能基团多等优点, 基于此, 许多荧光探针被成功应用于各种生物分子以及金属离子的检测. 其中, 张春阳课题组[46]利用荧光探针的光学性质在单分子检测研究领域取得了一系列的研究成果. 该课题组在早期利用单颗粒计数法测定了量子点(Qdots)的浓度[47]. 随后, 该课题组利用Qdots的荧光特性检测了肾素和蛋白激酶等生物分子[48,49]. 作为本课题组的重要研究方向之一, 为了实现生物分子的超灵敏检测, 本课题组一直致力于新颖纳米探针的开发以及超灵敏检测方法的优化. Li等[50]合成了尺寸均一、分散性良好的上转换纳米颗粒(UCNPs). 该上转换纳米颗粒具有较好的光学稳定性、抗漂白性、低毒性以及较高的量子产率等优点. 此外, 近红外光激发还可以有效屏蔽复杂生物环境下生物样本的背景荧光, 从而提高成像的信噪比, 进而增强检测的灵敏度. 如图1(C)所示, 在该工作中, 修饰有捕捉抗体的GNPs (GNPs-Ab2)与修饰有检测抗体的上转换纳米颗粒(UCNPs-Ab1)因为待检测物PSA抗原与抗体间的特异性结合作用而相互靠近. 根据抗原含量水平的高低, 两颗粒之间的作用力随之变化, 当作用力达到一定水平, 两颗粒之间的距离足够近时, 基于能量共振转移原理, 上转换纳米颗粒的荧光发生猝灭, 从而达到对PSA高灵敏检测的目的.

利用团聚作用引起信号变化的策略已经成功实现了多种生物传感器的开发. 然而, 这些方法是在系综层面上, 很容易掩盖细微的信号变化, 不利于提高方法的检测限. 如何设计生物传感策略进一步挖掘细微信号变化所对应检测目标物的量, 是研究者提高检测灵敏度所努力的方向. Shi等[51]巧妙设计“裂开型”核酸适配体, 结构如图1(D)所示, 利用单分子漂白技术, 在单分子水平上考察荧光团聚体的团聚程度, 根据荧光团聚程度与目标检测分子的相关性, 计算目标分子的浓度, 并以腺苷为检测对象, 成功实现了皮摩尔级的高灵敏检测(44.5 pM). Su等[52]开发了一种新型的非扩增单分子成像方法, 用于体外端粒酶活性检测(端粒酶在多数肿瘤细胞内的高表达, 可以作为一种新的治疗诊断靶点). 如图1(E)所示, 该方法基于核酸短暂杂交的单分子检测策略, 利用短链荧光DNA探针与真正靶标的动态随机结合产生与背景噪音不同的动力学特征信号. 通过提取单分子动态结合动力学曲线定量测定端粒酶的反应产物(TRP), 实现低至0.5 fM的检测限和0.5~500 fM的动态范围. 用这种方法, 从癌细胞中提取的端粒酶的灵敏度低至10个细胞. 此外, TRPs的长度分布也通过多重核酸杂交被确定, 这对深入研究端粒酶的催化机理有重要意义.

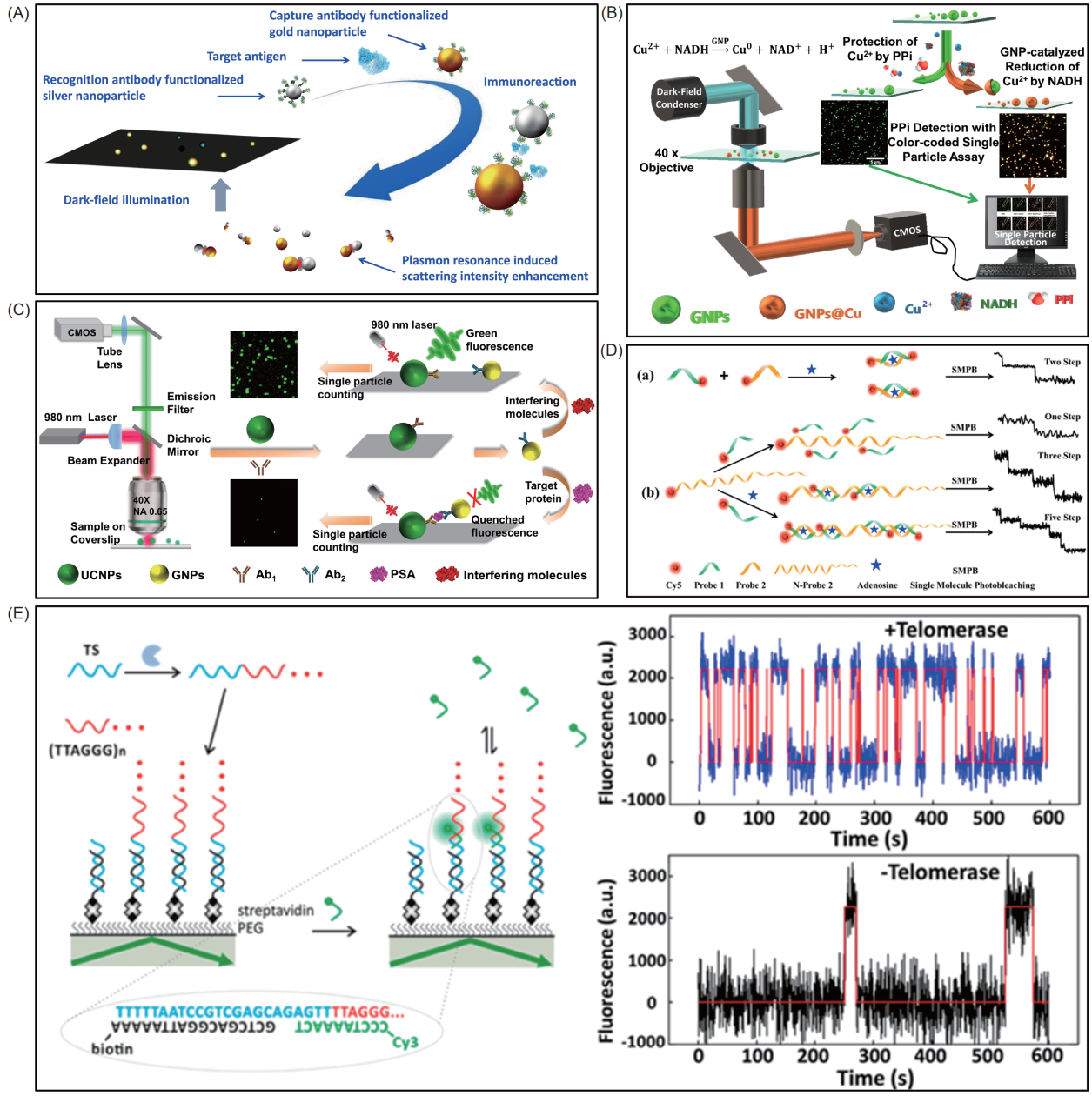


图 1 单分子检测机理图. (A) 基于金、银纳米粒子耦合效应检测多种癌症标志物的机理图[44]; (B) 基于Cu^{2+}在GNPs表面的催化沉积检测焦磷酸盐[45]; (C) 基于单颗粒计数法检测PSA的机理图[50]; (D) 基于单分子荧光漂白技术超灵敏检测腺苷[51]; (E) 基于核酸短暂杂交检测端粒酶的示意图、在端粒酶存在和不存在时的单分子荧光随时间变化曲线[52] (网络版彩图)

Figure 1 Schematic diagram of single-molecule detection. (A) Schematic illustration of biomarker detection using scattering-based single particle intensity measurement with a dark-field microscope [44]. (B) Schematic diagram of the light path for the optical microscopic imaging of single nanoparticle and the principle of the color-coded SPD for PPi assay [45]. (C) Schematic diagram of the light path for the optical microscopic imaging of UCNPs and the principle of digital immunosorbent assay by single-particle enumeration [50]. (D) Detection of adenosine molecules based on the single molecule photobleaching measurement [51]. (E) Telomerase detection by single molecule stochastic binding of the telomeric repeats, single-molecule fluorescent trajectories in the presence and absence of telomerase [52] (color online).

与传统的宏观检测相比，单分子、单颗粒检测法具有灵敏度好、分辨率高等优点. 迄今为止，基于该方法，许多生物(纳米纤维和蛋白纳米颗粒)以及非生物纳米颗粒(量子点以及其它荧光纳米颗粒)已经被成

功用于生物分子如癌症标志物以及重金属离子的检测[53~56]. 另外, 值得注意的是, 高灵敏检测方法的开发, 除了检测技术上的选择还要考虑所使用材料的光学特性, 如好的抗漂白性、化学稳定性以及较高的量子产率等. 这些优良的光学特性可以有效规避生物样本的自荧光, 进而提高分析检测的灵敏度, 降低样本的检测下限. 因此, 具有较好光学性质的纳米探针是单分子、单颗粒检测的关键.

3.2　单颗粒追踪

单颗粒追踪技术(single-particle tracking, SPT)是一种非侵入式、具有超高灵敏度以及高时空分辨率的显微成像手段, 能对细胞膜、细胞内的一些动力学过程进行长时间的成像追踪. 结合物理学中的动力学分析模型, 活细胞内单个分子、颗粒的动态变化行为可以从一般的可视化转变为可量化, 在空间和时间两个维度度量单个颗粒的动态行为, 被广泛应用于生命体内的许多生理过程, 如细胞内分子信号的传递, 细胞内外分子或颗粒的黏附、迁移等. 目标探针的光物理学特性决定了分子或颗粒在SPT成像中的成像品质, 进而决定了揭示的动力学规律的准确性. 大量研究成果显示, 贵金属纳米颗粒和具有较好光学稳定性的荧光分子或颗粒是SPT中应用较广的探针材料. 通过对探针材料位移轨迹和强度轨迹的提取和分析来揭示细胞膜和细胞内的一些重要生理代谢过程. 近年来, SPT主要被应用于以下两个方面.

3.2.1　利用SPT研究细胞膜上的动态行为

利用单颗粒追踪技术研究功能化的纳米载体入侵细胞时与细胞膜的相互作用, 有利于纳米载体的开发和功能化基团的合理设计, 为药物传输和基因转染等生物医学研究提供帮助. 颗粒在细胞膜上的扩散行为主要与细胞膜本身的结构组成有关. 如图2(A)所示, 细胞膜上的多糖、蛋白分子以及空间拥堵状况对颗粒、分子在细胞膜上的迁移、扩散均有较大的影响, 一般被划分为3种扩散方式: 随机扩散、受限扩散和超级扩散[57].

GNPs由于其独特的光物理特性, 较大的负载量, 较好的生物相容性等特点被广泛地应用于药物、基因的传输[17,58~60], 然而人们对其在细胞膜上的扩散行为还不甚了解, Wei等[32,61]利用暗场显微成像技术, 研究了不同浓度穿膜肽修饰的GNPs在磷脂膜上的迁移行为(图2(B)). 研究发现, 不同浓度穿膜肽(TAT)修饰的GNPs与磷脂膜相互作用的强弱不同. 在一定条件下可将纳米颗粒限制于二维平面, 但纳米颗粒仍然可以发生平动迁移. 不同于传统的随机扩散和完全受限行为, 其在界面处呈现跳跃式迁移行为, 该跳跃式的迁移行为有助于纳米颗粒在磷脂膜上以高效的方式寻找合适的强作用位点. 具有较好生物相容性的DNA纳米结构也是常用的纳米载体之一, Liang等[62]利用SPT研究了四面体结构的DNA在哺乳细胞中的内化机制以及在进入细胞前的动态迁移过程. 研究发现, 穿膜过程中Cy3标记的DNA纳米结构主要经历了两种运动状态: 在最开始的45 s内, 颗粒基本保持静止并拥有较强的荧光强度; 随后的15 s, DNA纳米结构迅速迁移并伴随荧光强度的急剧降低. 均方位移分析进一步揭示了这一运动过程: 在前45 s, DNA纳米结构与细胞膜存在较强的相互作用, 导致颗粒的运动受限, 因此均方位移随时间的变化较小; 随后的15 s, 由于DNA纳米结构的内化作用, 脱离了细胞膜的束缚, 颗粒迅速扩散到细胞质中, 因此均方位移随时间变化迅速增大. 许多类似的工作通过SPT均得到了一定的揭示. 例如, 荧光染料和荧光量子点标记的配体分子与细胞膜上受体分子间相互作用的研究, 研究发现根据受体与配体分子间作用力的不同, 受体分子在细胞膜上表现出不规则的扩散行为[63~66], 这些研究结果对了解纳米载体在细胞内代谢过程中的横向扩散具有一定的指导意义.

许多重要的生物、物理学过程除了与目标物的横向扩散密切相关, 其运动过程中的空间转动信息也同样重要. Fang课题组[17,67]利用DIC显微成像, 追踪了金纳米棒在磷脂膜和细胞膜上的转动行为. 近期, 该课题组发展了一种自动化的单颗粒追踪技术用来追踪各向异性的金纳米棒在活细胞膜上的五维(5D) (x、y、z坐标, 方位角, 仰角)信息[68]. 研究发现在细胞膜上, 颗粒表现出典型的转动扩散行为, 当颗粒与细胞膜上的网格蛋白发生作用时, 颗粒运动受限, 保持一段静默状态, 随后恢复扩散能力并逃脱原始的作用位点. 该研究利用单颗粒追踪技术获得的三维轨迹信息和二维转动扩散信息更详细地揭示了活细胞膜上的传输过程, 为纳米载体的合理设计提供了一定的指导. 本课题组也一直致力于SPT的研究并取得了一定的研究成果. Xiao等[69]以双波长的暗场显微镜为实验平台, 如图2

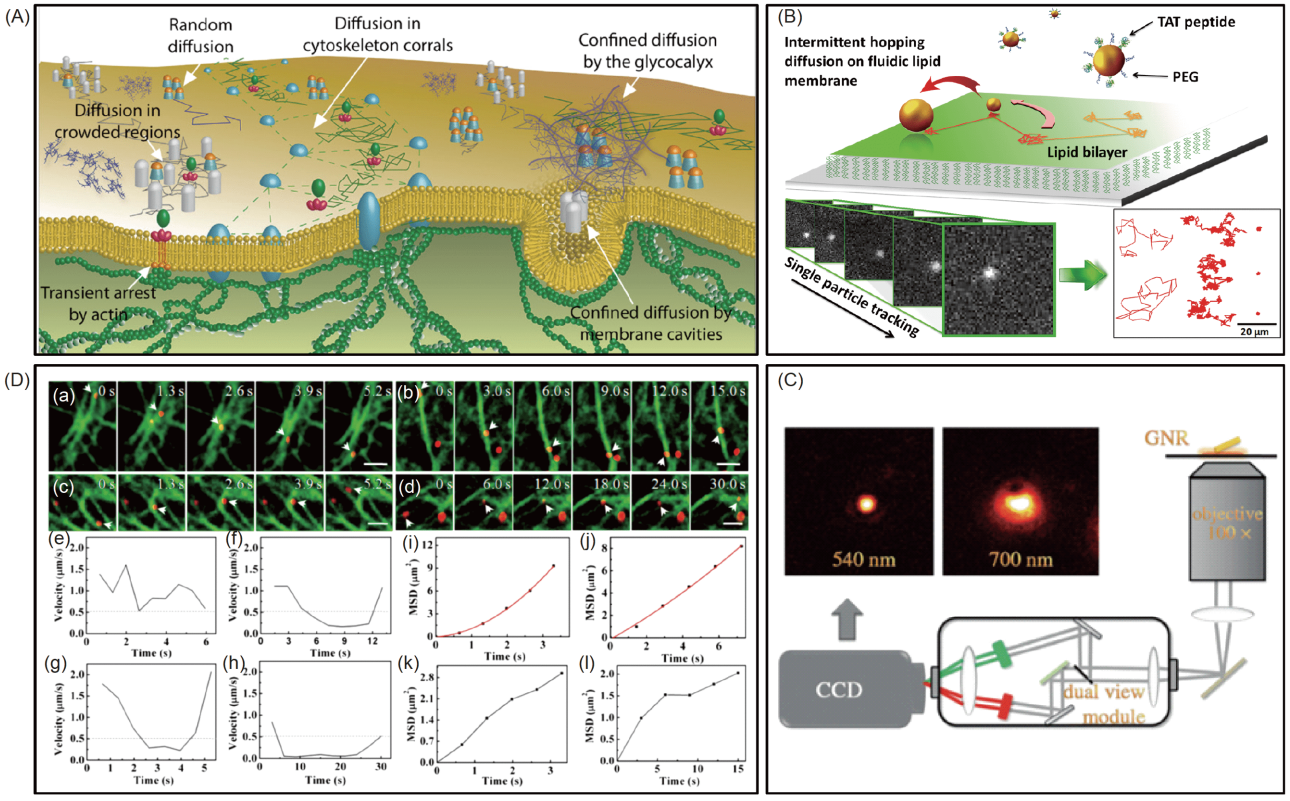


图 2　单颗粒追踪. (A) 细胞膜表面分子横向扩散的代表性机理图[57]; (B) 多肽修饰的GNPs在磷脂膜上的跳跃式迁移机理图[61]; (C) 单个金纳米棒平动和转动扩散追踪的双波长光学显微成像原理图[69]; (D) A~D流感病毒颗粒在不同结构的微管上的动态追踪[71] (网络版彩图)

Figure 2　Single-particle tracking. (A) Schematic representation of the diverse lateral diffusion of molecular components on the cell surface [57]. (B) Schematic diagram of TAT-modified GNPs diffusion on lipid membrane [61]. (C) Dual-view optics for single particle translational and rotational tracking [69]. (D) Influenza viruses moving along different configurations of microtubules [71] (color online).

(C)所示, 利用SPT研究了转铁蛋白修饰的金纳米棒在活细胞膜上的平动与转动扩散. 研究发现颗粒的平动扩散主要与细胞膜表面的结合位点有关, 而转动扩散则主要与内吞途径中配体与受体的聚集有关, 这两种扩散在时间和空间上是相互独立的, 转动扩散的揭示有利于对扩散迁移中方位角和极角变化的掌握. 此外, 我们还将SPT拓展于微生物体系, 以大肠杆菌为载体, 研究了其在界面处以及基因转染后与细胞膜的相互作用过程, 这一研究有助于进一步了解活性颗粒与刚性纳米颗粒运动行为的差异性.

3.2.2　利用SPT研究活细胞内的动态过程

细胞内的动态过程主要包括颗粒、分子的内化作用, 信号分子的传递与转导, 基因调控等, 这些动态过程利用SPT均得到了一定的揭示. 例如, 病毒入侵细胞主要包括3个过程: 病毒与受体细胞膜表面发生相互作用; 病毒通过细胞内吞作用进入细胞并迁移到一定的细胞器进行基因的释放; 基因在细胞液和细胞核的合适位置进行复制和表达. 对病毒入侵细胞这一过程的动力学研究有助于病毒感染性疾病的预防和治疗[70]. Liu等[71]利用SPT检测和分析了量子点标记的流感病毒颗粒在活细胞内依赖于细胞微管的迁移机制. 如图2(D)所示, 研究发现病毒在单个微管上发生迅速迁移, 而且沿着细胞外围单向迁移到微管中心, 在网格状微管处, 病毒的迁移发生改变并伴随长时间的停滞. Li等[72]使用SPT研究了量子点封装的HIV-1颗粒感染人类巨噬细胞的过程, 研究发现在感染过程中, 病毒颗粒主要依赖于网格蛋白介导的内吞途径进入细胞, 随后通过肌动蛋白的协同作用进入核内体并与其发生融合, 最后在胞液中进行基因的释放和复制. 基于SPT,

研究者还对病毒侵染细胞的路径进行了考察和分析. 例如, 量子点标记的疱疹病毒主要通过非小窝蛋白和非网格蛋白介导的路径侵染细胞, 量子点标记的逆转录病毒则依靠网格蛋白介导的内吞进入细胞, 研究表明病毒侵染细胞的途径不仅依赖于病毒表面的膜蛋白[73]. 因此, 可以通过相应的抑制剂来阻碍病毒对细胞的入侵, 如网格蛋白、小窝蛋白、肌动蛋白以及膜融合抑制剂等.

探针材料在细胞内化后的代谢过程的研究也依赖于单颗粒追踪技术. Liu等[74]使用DNA修饰的GNPs作为一种双波长发射和等离子体探针, 研究了其在细胞内的迁移行为以及聚集状态. 研究表明, 在内吞作用前期, 颗粒主要以单颗粒状态存在, 在随后的囊泡运输过程中发生聚集, 颗粒迁移的速率主要与颗粒的聚集大小有关而与细胞内细胞器的种类(如核内体、溶酶体)无关. 此外, 许多被荧光分子标记的蛋白、基因以及细胞内的分子动力学也得到了广泛的研究[75], 如分子马达在细胞内的传输和分配.

SPT开拓了人们对于细胞内外各种生理过程中动态调控机制的认识, 在单分子、单颗粒水平上揭示了分子或颗粒的扩散迁移行为, 得到了分子生物学家、生物化学家以及物理学家的广泛关注, 但对于细胞内外各种分子间相互作用下的动态行为以及代谢过程的归纳总结仍需要更多动态行为机制研究的进一步深入.

3.3 超分辨成像研究

传统的光学显微成像技术虽然在许多学科领域得到了广泛的应用, 但因光学分辨率极限(~200 nm)的掣肘, 使用范围也受到了一定的限制. 例如, 复杂环境下细胞内精细结构以及动态变化的研究, 许多医学难题的攻克都需要借助更高分辨率的成像手段. 基于此, 超分辨成像打破了光学显微镜的衍射极限, 为生命科学研究提供了前所未有的工具, 在生物医学领域得到了高度的认可和广泛的应用.

超分辨成像技术主要包括单分子定位显微镜技术(single-molecule localization microscopy, SLM)、光激活定位显微镜技术(photoactivated localization microscopy, PALM)、随机光学重建显微镜(stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)和直接光学重建显微镜技术(direct stochastic optical reconstruction microscopy, dSTORM)等[76~79]. 超分辨成像技术的关键在于荧光探针“on”和“off”即有荧光和无荧光之间的调制. 在成像捕捉的某一时刻, 小部分荧光探针处于“on”的状态, 而在下一时刻, 这些荧光探针的荧光熄灭或被漂白, 而处于黑暗状态下的其他部分荧光探针被点亮, 两种状态在长时间的成像过程中反复交替存在, 再通过相应的二维高斯拟合获得时间分辨率下荧光探针的精准位置, 最后通过多张成像结果重构即可获得密集样本内的精密结构和动态变化.

荧光探针“on”和“off”的交替切换, 主要通过以下几种途径实现: 荧光探针本身的闪烁特性、光漂白、吸附和解吸附、化学反应和光激发等. 例如, 有氧条件下, 罗丹明、噁嗪染料自身具有一定的荧光闪烁特性; 无氧的条件下, 通过加入硫醇可调制Alexa647、Cy5的荧光闪烁性; 基于光活化和光转换可以实现蛋白分子如mEos 3.1和mEos 3.2的荧光切换; 利用化学反应如分子内的螺化反应控制分子荧光等[80~84]. 基于这些荧光探针的开发和使用, 超分辨成像在生物成像中取得了一系列的研究成果. 2005年, 量子点(Qdots)因其自身的光学闪烁性第一次被成功应用于超分辨成像[85]. 利用类似的原理, He等[86]合成了具有光学闪烁性的碳点(Cdots)并用其对管状多肽的自组装和细胞微管进行了超分辨重构, 定位精度可以达到25 nm. 细胞内、外的结构组成以及一些生物分子的自组装过程通过超分辨成像技术也取得了一定成果, 如Kaminski Schierle等[82]利用超分辨荧光成像研究了细胞内外多肽的自组装行为, 分辨率可以达到20 nm左右. 通过超分辨重构可以区分不同的形态包括多肽单体的聚集和成熟的纤维状多肽, 还可以区分溶液体系和细胞内多肽, 这一研究有利于蛋白聚集引起的疾病分子机制的研究(图3(A)); 该课题组还通过双色单分子定位显微镜监控纤维的生长机制, 研究发现单个纤维生长速率的异质性[87]; Letschert等[88]利用正交化学反应有效标记了细胞膜上的多糖复合物, 通过超分辨成像技术研究了细胞膜上多糖的分布(图3(B)). 此外, 超分辨成像技术还被应用于微生物的重构, Jiang等[89]用聚合物PFBT和富勒烯衍生物PCBM合成了一种半导体纳米颗粒, 通过光驱使纳米颗粒表面电子的电离和自发重建来实现颗粒荧光的切换, 该课题组使用该材料对大肠杆菌进行了超分辨成像重构, 定位精度可达到5 nm, 如图3(C)所示. 近年来, 本课题组在超分辨成像研究中也取得了一定的进展. Wei等[90]利用罗丹明B在银纳米

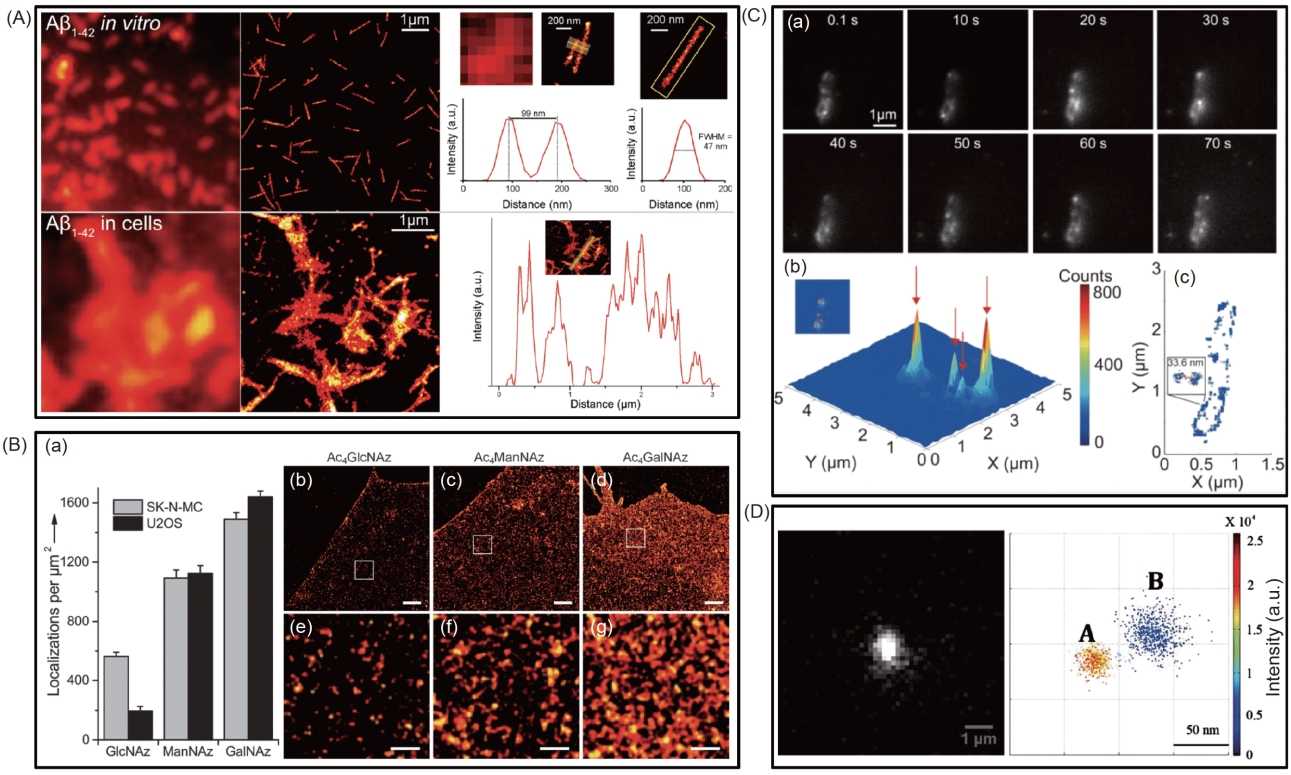


图 3 (A) 溶液中及细胞内纤维的原位超分辨成像[82]; (B) 细胞膜上多糖的超分辨成像及分布[88]; (C) 用PCBM封装的BFBT纳米颗粒标记的大肠杆菌的超分辨成像[89]; (D) 单分子在热点区域的超分辨成像[90] (网络版彩图)

Figure 3 (A) Super-resolution imaging permits the nature and morphology of intracellular $A\beta_{1-42}$ aggregates to be probed *in situ* [82]. (B) Super-resolution imaging and analysis of cell-surface glycoproteins [88]. (C) A sequence of fluorescence microscopy images showing the blinking behavior of an *E. coli* labeled with 20% PCBM-doped PFBT CPNs [89]. (D) Super-resolution imaging of single molecules in a conjugated hotspot region [90] (color online).

线上不断地吸附和脱附转换实现了超分辨重构, 进而研究了在这一过程中单个荧光分子的斯托克斯位移. 研究发现纳米颗粒对荧光热点的荧光光谱的调制效应是一个非匀致的过程, 该方法可以用来研究单个纳米谐振器的光学特性(图3(D)). 近期, 本课题组[91]借助于超分辨成像所具有的超高定位精度对纳米对(GNPs和金纳米棒)之间的间距进行了定位研究, 通过高精准定位可以准确测定纳米颗粒为的间距进而研究其等离子体耦合效应.

超分辨显微成像实现了密集样本下对生物结构、组成和一些动态生物过程的超高精度揭示, 超越了普通光学显微技术的分辨率, 为生物医学难题的攻克提供了强有力的帮助.

3.4 单颗粒纳米催化研究

多相催化在化学反应中扮演着重要的角色, 包括有机合成、能源反应以及污染物的清除等[92~94], 因此, 在近几十年, 得到了研究者的广泛关注. 金属纳米颗粒具有较小的尺寸和较高的化学势, 在催化反应中表现出优异的催化性能, 是一种重要的多相催化剂, 被广泛地应用于各种催化反应中[24,95~97]. 传统的催化反应研究主要聚焦于对催化反应整体平均的测量, 假设多相催化剂和催化反应在时间和空间上是异质性的. 然而, 对于任意催化反应中单个催化剂催化活性异质性的实际分析与表征仍然是个巨大的挑战: 首先, 颗粒之间普遍存在的异质性, 颗粒的尺寸、形状以及表面催化位点的类型和数量都会存在差异性; 其次, 即使是针对单个颗粒而言, 颗粒表面位点也存在差异性, 如角、边、面等; 最后, 当催化剂纳米颗粒足够小时, 它们的结构动力学(包括形态变化以及表面重构)会随时间的变化而变化、随颗粒的不同而不同[98,99]. 因此, 实现对催化反应单颗粒水平的实时原位表征, 对揭示

单个纳米颗粒在催化反应中的异质性和动力学行为有着重要意义.

3.4.1 基于单分子荧光显微成像技术的单个纳米颗粒催化动力学研究

单分子荧光显微成像技术具有高灵敏度、高时空分辨率等优点, 被广泛地应用于单分子、单颗粒水平的催化反应研究. 单分子荧光显微成像技术首先被应用于单个酶分子的催化动力学研究[100], 随后被应用于半导体金属氧化物以及现在的金属纳米颗粒的催化反应. Chen和Xu课题组[97,101,102]利用单分子荧光显微镜在单颗粒催化研究中取得了一系列的研究成果. 2008年, 两课题组首先研究了GNPs在单分子水平的催化活性[102]. GNPs作为催化剂, 可以使没有荧光的树脂天青迅速的被羟胺还原并生成有荧光的试卤灵分子, 根据对试卤灵荧光分子的实时追踪, 可以分析单个GNPs的催化反应活性. 图4(A)中强度随时间的变化轨迹图中, τ_{off}表示每个产物分子(试卤灵)形成的时间, τ_{on}表示产物形成后从GNPs上脱附需要的时间. 轨迹中每一次强度的骤然增强和消失代表一个催化反应周期. 单个的τ_{off}和τ_{on}值是随机的, 但它们的统计结果(如平均值、分布)具有一定的规律性. 如图所示, 随着反应物浓度的增加, 产物形成速率τ_{off}^{-1}和τ_{on}^{-1}逐渐增加, 随后保持不变, 存在一定的浓度依赖性. 之后, 该课题组又先后研究了尺寸大小对于纳米颗粒在催化反应中的影响, 如尺寸大小对球形GNPs以及Pd纳米立方体的催化活性影响等[96,103]. 研究表明, 不同的颗粒拥有不同的表面重建时间; 纳米颗粒的尺寸越小, 表面能越高, 催化反应活性越高, 动力学表面重建越容易(图4(B)). 除了尺寸效应以外, Xu等[95]还考察了形状对Pd纳米颗粒催化效率的影响, 研究表明Pd八面体催化活性比Pd立方体更高. 单颗粒催化反应还被用于研究二氧化钛纳米棒的光学氧化催化反应以及光催化产生活性氧的反应系统中[104,105].

基于单分子水平的纳米催化研究, 许多催化剂的异质性在单颗粒水平得到了一定的揭示, 有助于提高人们对单颗粒多相催化的认识和了解.

3.4.2 单颗粒纳米催化的超分辨成像研究

对于尺寸在100 nm以上或者微米级的催化剂颗粒, 它们的表面结构和活性位点一般可以通过电子显微镜获得, 但对于光学显微镜而言, 由于其光学衍射极限的限制, 我们很难获得这些信息. 利用超分辨成像技术, 对催化反应中产生的荧光热点进行二维高斯拟合, 得到相应的单分子荧光点扩散函数(point spread function, PSF)可以使单个纳米颗粒在催化反应中的单个产物成像达到10 nm左右的分辨率, 由此可以进一步得到单个颗粒表面的催化活性分布.

Chen课题组[106]先后使用超分辨成像的方法研究了一维(1D)的金纳米棒和二维(2D)的金纳米片的催化活性. 在一维金纳米棒的催化性能研究中, 通过对产物荧光分子的重构结果分析, 研究表明, 金纳米棒的晶面不同, 催化活性不同; 催化活性从棒的中间向两端呈现线性增强, 两端的催化活性最强; 相同晶面, 不同颗粒间的催化活性不同(图4C)). 在二维金纳米片的催化活性研究中, 研究表明, 角区域的催化活性大于边缘区域, 边缘区域大于平面(图4D))[107]. 此外, Xu等[108]利用超分辨成像的方法研究了单个Sb包裹的二氧化钛纳米棒和金三角片随时间变化的空间催化活性分布. 研究发现, 与表面较光滑的纳米颗粒相比, 表面粗糙的纳米颗粒具有更强的催化活性; 在同一个纳米颗粒上, 角的催化活性要高于面, 但活性高的区域稳定性也越差. 因此, 对长时间分析而言, 催化活性较稳定的区域在整个催化反应中占主导地位. Fang等[109]基于单颗粒催化超分辨的传统研究, 开拓性地将三维(3D)超分辨成像技术应用到单颗粒催化研究中, 揭示了SiO_2@Pt@mSiO_2纳米颗粒的催化活性以及催化活性位点的分布. 超分辨成像技术还被广泛地应用于沸石晶体的单颗粒催化反应中, 如ZSM-22沸石颗粒、ZSM-5晶体、H- ZSM-5晶体[110,111].

超分辨成像技术在单颗粒催化反应中的使用, 可以更有效、更直观地揭示单个颗粒表面不同位点催化活性的差异性, 使单颗粒催化异质性的研究得到进一步深化.

4 总结与展望

随着单分子、单颗粒光学显微成像研究的深入发展, 单分子、单颗粒光学显微成像技术被成功应用于物理、化学以及生物医学领域, 并取得了一系列的研究进展, 但其自身也存在一定局限性. 如在普通光学

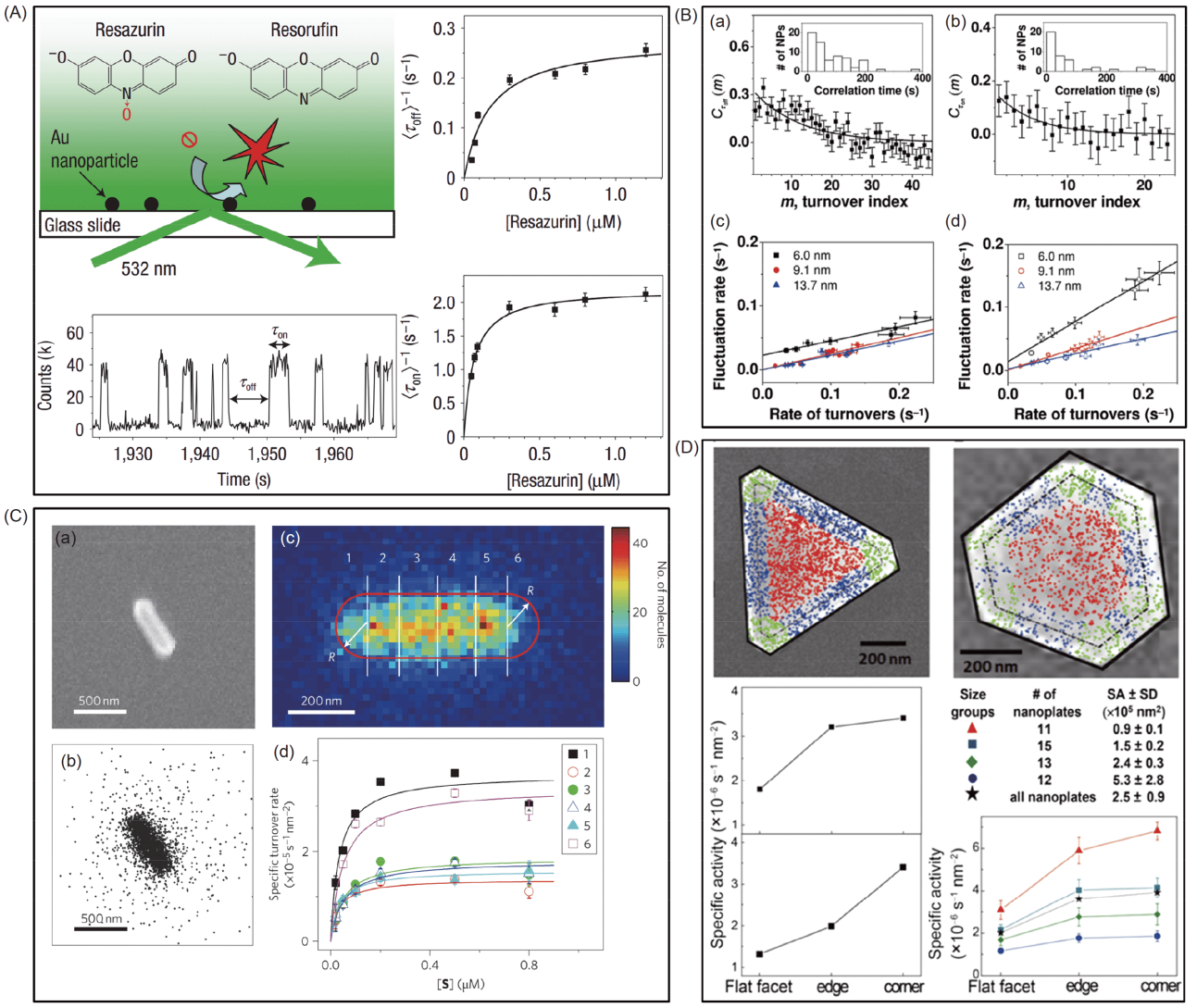


图 4 单颗粒催化及超分辨成像. (A) 单个GNPs的催化原理图和催化动力学机制[102]. (B) (a, b)单个GNPs (9.1 nm) τ_{on}和τ_{off}的自相关函数，插图为相关时间分布; (c, d) 金颗粒的活性波动速率与催化周转速率的关系图[96]. (C) 单个Au@mSiO$_2$纳米棒的空间催化活性定量分析[106]. (D) 单个Au@mSiO$_2$纳米片的催化活性定量分析[107] (网络版彩图)

Figure 4 Single-particle catalysis and super-resolution imaging. (A) Single-turnover detection of single-Au-nanoparticle catalysis [102]. (B) Autocorrelation functions of the τ_{off} (a) and τ_{on} (b) from the turnover trajectory of a single 9.1 nm Au-nanoparticle; dependence of the activity fluctuation rate of the τ_{off} reaction (c) and the τ_{on} reaction (d) [96]. (C) Quantitative reaction kinetics of a single Au@mSiO$_2$ nanorod at subparticle resolution [106]. (D) Spatially resolved activity quantitation on single Au@mSiO$_2$ nanoplates [107] (color online).

成像模式下，对于复杂生物体系内的单颗粒追踪和精确定位需要颗粒本身具有优越的光学特性来规避样本中的自背景和其他干扰等. 未来可能需要从以下几个方面来进一步深化单分子、单颗粒光学显微成像研究: 开发多模态光学显微成像系统, 将具有不同功能的成像技术融合成多模态一体化成像, 实现功能互补; 基于单分子、单颗粒成像技术，发展具有高通量和高灵敏度的分析检测技术提高成像的分辨率; 合成适用于单分子、单细胞成像的具有优良光学物理特性的探针材料, 提高探针材料的生物相容性. 单分子、单颗粒光学显微成像因其自身的优点适用于多个交叉学科的使用, 具有较大的发展潜力.

参考文献

1 Li H, Guo Y, Xiao L, Chen B. *Analyst*, 2014, 139: 285–289
2 Li J, Mo L, Lu CH, Fu T, Yang HH, Tan W. *Chem Soc Rev*, 2016, 45: 1410–1431
3 Zhang D, Wei L, Zhong M, Xiao L, Li HW, Wang J. *Chem Sci*, 2018, 9: 5260–5269
4 Li T, Wu X, Liu F, Li N. *Analyst*, 2017, 142: 248–256
5 Zhu L, Li G, Sun S, Tan H, He Y. *RSC Adv*, 2017, 7: 27595–27602
6 Xu JJ, Zhao WW, Song S, Fan C, Chen HY. *Chem Soc Rev*, 2014, 43: 1601–1611
7 Zhang Z, Zhang C. *Anal Chem*, 2012, 84: 1623–1629
8 Zhou J, Yang Y, Zhang C. *Chem Rev*, 2015, 115: 11669–11717
9 Sönnichsen C, Alivisatos AP. *Nano Lett*, 2005, 5: 301–304
10 Inoué S, Shimomura O, Goda M, Shribak M, Tran PT. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 4272–4277
11 Hu K, Zarrine-Afsar A, Ahmadzadeh H, Krylov SN. *Instrum Sci Tech*, 2004, 32: 31–41
12 Molnár E, Kuntam S, Cingaram PKR, Peksel B, Suresh B, Fábián G, Fehér LZ, Bokros A, Medgyesi A, Ayaydin F, Puskás LG. *Molecules*, 2013, 18: 9999–10013
13 Mooney MA, Zehri AH, Georges J, Nakaji P. *Neurosurg Focus,* 2014**,** 1: 36
14 Teske CA, Schroeder M, Simon R, Hubbuch J. *J Phys Chem B*, 2005, 109: 13811–13817
15 Wang G, Sun W, Luo Y, Fang N. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 16417–16422
16 Wang G, Stender AS, Sun W, Fang N. *Analyst*, 2010, 135: 215–221
17 Gu Y, Sun W, Wang G, Fang N. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 5720–5723
18 Saxton MJ, Jacobson K. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1997, 26: 373–399
19 Ruthardt N, Lamb DC, Bräuchle C. *Mol Ther*, 2011, 19: 1199–1211
20 Chen T, Dong B, Chen K, Zhao F, Cheng X, Ma C, Lee S, Zhang P, Kang SH, Ha JW, Xu W, Fang N. *Chem Rev*, 2017, 117: 7510–7537
21 Chen P, Zhou X, Andoy NM, Han KS, Choudhary E, Zou N, Chen G, Shen H. *Chem Soc Rev*, 2014, 43: 1107–1117
22 von Diezmann A, Shechtman Y, Moerner WE. *Chem Rev*, 2017, 117: 7244–7275
23 Xiao L, Yeung ES. *Annu Rev Anal Chem*, 2014, 7: 89–111
24 Chen P, Zhou X, Shen H, Andoy NM, Choudhary E, Han KS, Liu G, Meng W. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 4560–4570
25 Zhang CY, Yeh HC, Kuroki MT, Wang TH. *Nat Mater*, 2005, 4: 826–831
26 Li H, Guo Y, Xiao L, Chen B. *Biosens Bioelectron*, 2014, 59: 289–292
27 Li Y, Hu X, Ding D, Zou Y, Xu Y, Wang X, Zhang Y, Chen L, Chen Z, Tan W. *Nat Commun*, 2017, 8: 15653
28 Ma Y, Zhang Z, Xu Y, Ma M, Chen B, Wei L, Xiao L. *Talanta*, 2016, 161: 476–481
29 Xu X, Wang L, Li K, Huang Q, Jiang W. *Anal Chem*, 2018, 90: 3521–3530
30 Wang S, Zhang L, Wan S, Cansiz S, Cui C, Liu Y, Cai R, Hong C, Teng IT, Shi M, Wu Y, Dong Y, Tan W. *ACS Nano*, 2017, 11: 3943–3949
31 Ye Z, Wei L, Zeng X, Weng R, Shi X, Wang N, Chen L, Xiao L. *Anal Chem*, 2018, 90: 1177–1185
32 Wei L, Ye Z, Xu Y, Chen B, Yeung ES, Xiao L. *Anal Chem*, 2016, 88: 11973–11977
33 Fernández-Suárez M, Ting AY. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9: 929–943
34 Yuan L, Wang X, Fang Y, Liu C, Jiang D, Wo X, Wang W, Chen HY. *Anal Chem*, 2016, 88: 2321–2326
35 Chen C, Zhu S, Wang S, Zhang W, Cheng Y, Yan X. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 13913–13919
36 Ma F, Ren M, Zhang C. *Sci China Chem*, 2017, 60: 1285–1292
37 Ma F, Li Y, Tang B, Zhang CY. *Acc Chem Res*, 2016, 49: 1722–1730
38 Shi L, Jing C, Ma W, Li DW, Halls JE, Marken F, Long YT. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 6011–6014
39 Zhang L, Li Y, Li DW, Jing C, Chen X, Lv M, Huang Q, Long YT, Willner I. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 6789–6792
40 Jing C, Gu Z, Long YT. *Faraday Discuss*, 2016, 193: 371–385
41 Ma J, Zhan L, Li RS, Gao PF, Huang CZ. *Anal Chem*, 2017, 89: 8484–8489

42 Li T, Xu X, Zhang G, Lin R, Chen Y, Li C, Liu F, Li N. *Anal Chem*, 2016, 88: 4188–4191
43 Xiao L, Wei L, He Y, Yeung ES. *Anal Chem*, 2010, 82: 6308–6314
44 Poon CY, Wei L, Xu Y, Chen B, Xiao L, Li HW. *Anal Chem*, 2016, 88: 8849–8856
45 Qi F, Han Y, Ye Z, Liu H, Wei L, Xiao L. *Anal Chem,* 2018
46 Hu J, Wang ZY, Li CC, Zhang CY. *Chem Commun*, 2017, 53: 13284–13295
47 Zhang C, Johnson LW. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 3750–3751
48 Long Y, Zhang L, Zhang Y, Zhang C. *Anal Chem*, 2012, 84: 8846–8852
49 Wang LJ, Yang Y, Zhang CY. *Anal Chem*, 2015, 87: 4696–4703
50 Li X, Wei L, Pan L, Yi Z, Wang X, Ye Z, Xiao L, Li HW, Wang J. *Anal Chem*, 2018, 90: 4807–4814
51 Shi X, He Y, Gao W, Liu X, Ye Z, Liu H, Xiao L. *Anal Chem*, 2018, 90: 3661–3665
52 Su X, Li Z, Yan X, Wang L, Zhou X, Wei L, Xiao L, Yu C. *Anal Chem*, 2017, 89: 3576–3582
53 Pan P, Wang Y, Zhu Y, Gao X, Ju Z, Qiu P, Wang L, Mao C. *Nano Res*, 2015, 8: 3562–3570
54 Sunderland KS, Yang M, Mao C. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 1964–1992
55 Zhao X, Tapec-Dytioco R, Tan W. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 11474–11475
56 Zhou J, Wang Q, Zhang C. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 2056–2059
57 Manzo C, Garcia-Parajo MF. *Rep Prog Phys*, 2015, 78: 124601
58 He H, Xie C, Ren J. *Anal Chem*, 2008, 80: 5951–5957
59 Nan X, Sims PA, Xie XS. *ChemPhysChem*, 2008, 9: 707–712
60 Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. *Adv Drug Deliver Rev*, 2008, 60: 1307–1315
61 Wei L, Zhao X, Chen B, Li H, Xiao L, Yeung ES. *Anal Chem*, 2013, 85: 5169–5175
62 Liang L, Li J, Li Q, Huang Q, Shi J, Yan H, Fan C. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 7745–7750
63 Sun Y, Li N, Zhang M, Zhou W, Yuan J, Zhao R, Wu J, Li Z, Zhang Y, Fang X. *Chem Commun*, 2016, 52: 7086–7089
64 Li N, Yang Y, He K, Zhang F, Zhao L, Zhou W, Yuan J, Liang W, Fang X. *Sci Rep*, 2016, 6: 33469
65 Cheng M, Zhang W, Yuan J, Luo W, Li N, Lin S, Yang Y, Fang X, Chen PR. *Chem Commun*, 2014, 50: 14724–14727
66 Marchuk K, Guo Y, Sun W, Vela J, Fang N. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 6108–6111
67 Sun W, Wang G, Fang N, Yeung ES. *Anal Chem*, 2009, 81: 9203–9208
68 Chen K, Gu Y, Sun W, Bin Dong W, Wang G, Fan X, Xia T, Fang N. *Nat Commun*, 2017, 8: 887
69 Xiao L, Wei L, Liu C, He Y, Yeung ES. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 4181–4184
70 Liu SL, Wang ZG, Zhang ZL, Pang DW. *Chem Soc Rev*, 2016, 45: 1211–1224
71 Liu SL, Zhang LJ, Wang ZG, Zhang ZL, Wu QM, Sun EZ, Shi YB, Pang DW. *Anal Chem*, 2014, 86: 3902–3908
72 Li Q, Li W, Yin W, Guo J, Zhang ZP, Zeng D, Zhang X, Wu Y, Zhang XE, Cui Z. *ACS Nano*, 2017, 11: 3890–3903
73 Joo KI, Lei Y, Lee CL, Lo J, Xie J, Hamm-Alvarez SF, Wang P. *ACS Nano*, 2008, 2: 1553–1562
74 Liu M, Li Q, Liang L, Li J, Wang K, Li J, Lv M, Chen N, Song H, Lee J, Shi J, Wang L, Lal R, Fan C. *Nat Commun*, 2017, 8: 15646
75 Levsky JM, Shenoy SM, Pezo RC, Singer RH. *Science*, 2002, 297: 836–840
76 Rust MJ, Bates M, Zhuang X. *Nat Meth*, 2006, 3: 793–796
77 Huang B, Babcock H, Zhuang X. *Cell*, 2010, 143: 1047–1058
78 Henriques R, Lelek M, Fornasiero EF, Valtorta F, Zimmer C, Mhlanga MM. *Nat Methods*, 2010, 7: 339–340
79 Burnette DT, Sengupta P, Dai Y, Lippincott-Schwartz J, Kachar B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 21081–21086
80 Zhang M, Chang H, Zhang Y, Yu J, Wu L, Ji W, Chen J, Liu B, Lu J, Liu Y, Zhang J, Xu P, Xu T. *Nat Methods*, 2012, 9: 727–729
81 Wombacher R, Heidbreder M, van de Linde S, Sheetz MP, Heilemann M, Cornish VW, Sauer M. *Nat Methods*, 2010, 7: 717–719
82 Kaminski Schierle GS, van de Linde S, Erdelyi M, Esbjorner EK, Klein T, Rees E, Bertoncini CW, Dobson CM, Sauer M, Kaminski CF. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 12902–12905
83 Lukinavičius G, Umezawa K, Olivier N, Honigmann A, Yang G, Plass T, Mueller V, Reymond L, Corrêa Jr IR, Luo ZG, Schultz C, Lemke EA, Heppenstall P, Eggeling C, Manley S, Johnsson K. *Nat Chem*, 2013, 5: 132–139
84 Uno SN, Kamiya M, Yoshihara T, Sugawara K, Okabe K, Tarhan MC, Fujita H, Funatsu T, Okada Y, Tobita S, Urano Y. *Nat Chem*, 2014, 6: 681–689

85 Lidke KA, Rieger B, Jovin TM, Heintzmann R. *Opt Express*, 2005, 13: 7052–7062
86 He H, Liu X, Li S, Wang X, Wang Q, Li J, Wang J, Ren H, Ge B, Wang S, Zhang X, Huang F. *Anal Chem*, 2017, 89: 11831–11838
87 Pinotsi D, Buell AK, Galvagnion C, Dobson CM, Kaminski Schierle GS, Kaminski CF. *Nano Lett*, 2014, 14: 339–345
88 Letschert S, Göhler A, Franke C, Bertleff-Zieschang N, Memmel E, Doose S, Seibel J, Sauer M. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 10921–10924
89 Jiang Y, Novoa M, Nongnual T, Powell R, Bruce T, McNeill J. *Nano Lett*, 2017, 17: 3896–3901
90 Wei L, Liu C, Chen B, Zhou P, Li H, Xiao L, Yeung ES. *Anal Chem*, 2013, 85: 3789–3793
91 Wei L, Ma Y, Zhu X, Xu J, Wang Y, Duan H, Xiao L. *Nanoscale*, 2017, 9: 8747–8755
92 Bell AT. *Science*, 2003, 299: 1688–1691
93 Weckhuysen BM. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 4910–4943
94 Weckhuysen BM. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 4557–4559
95 Chen T, Chen S, Song P, Zhang Y, Su H, Xu W, Zeng J. *ACS Catal*, 2017, 7: 2967–2972
96 Chen T, Chen S, Zhang Y, Qi Y, Zhao Y, Xu W, Zeng J. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 1839–1843
97 Sambur JB, Chen P. *Annu Rev Phys Chem*, 2014, 65: 395–422
98 Zambelli T, Wintterlin J, Trost J, Ertl G. *Science*, 1996, 273: 1688–1690
99 Jaramillo TF, Jørgensen KP, Bonde J, Nielsen JH, Horch S, Chorkendorff I. *Science*, 2007, 317: 100–102
100 Xu W, Kong JS, Chen P. *J Phys Chem C*, 2009, 113: 2393–2404
101 Xu W, Shen H, Liu G, Chen P. *Nano Res*, 2009, 2: 911–922
102 Xu W, Kong JS, Yeh YTE, Chen P. *Nat Mater*, 2008, 7: 992–996
103 Zhou X, Xu W, Liu G, Panda D, Chen P. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 138–146
104 Moon J, Takagi H, Fujishiro Y, Awano M. *J Mater Sci*, 2001, 36: 949–955
105 Wang N, Tachikawa T, Majima T. *Chem Sci*, 2011, 2: 891–900
106 Zhou X, Andoy NM, Liu G, Choudhary E, Han KS, Shen H, Chen P. *Nat Nanotech*, 2012, 7: 237–241
107 Andoy NM, Zhou X, Choudhary E, Shen H, Liu G, Chen P. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 1845–1852
108 Zhang Y, Lucas JM, Song P, Beberwyck B, Fu Q, Xu W, Alivisatos AP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 8959–8964
109 Han R, Ha JW, Xiao C, Pei Y, Qi Z, Dong B, Bormann NL, Huang W, Fang N. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 12865–12869
110 Ristanović Z, Hofmann JP, De Cremer G, Kubarev AV, Rohnke M, Meirer F, Hofkens J, Roeffaers MBJ, Weckhuysen BM. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 6559–6568
111 Roeffaers MBJ, De Cremer G, Libeert J, Ameloot R, Dedecker P, Bons A, Bückins M, Martens JA, Sels BF, De Vos DE, Hofkens J. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 9285–9289

Recent advances of single molecule/particle imaging with optical microscopic methods

Zhongju Ye, Hua Liu, Lehui Xiao*

State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, College of Chemistry, Tianjin Key Laboratory of Biosensing and Molecular Recognition, Nankai University, Tianjin 300071, China
**Corresponding author (email: lehuixiao@nankai.edu.cn)*

Abstract: Single-molecule and -particle imaging with optical microscopic methods have been widely used in various fields with the advantages of high resolution, high throughput and excellent sensitivity. This review summarized recent progresses of optical microscopic imaging of single-molecule and -particle in the areas of molecular detection, super-resolution imaging and single-particle catalysis. At last, we outlined the challenges and prospect of optical microscopic imaging techniques for single-molecule and -particle assay in biomedical applications.

Keywords: single-molecule detection, single-particle tracking, super-resolution imaging, single-particle catalysis, optical microscopic imaging

doi: 10.1360/N032018-00199