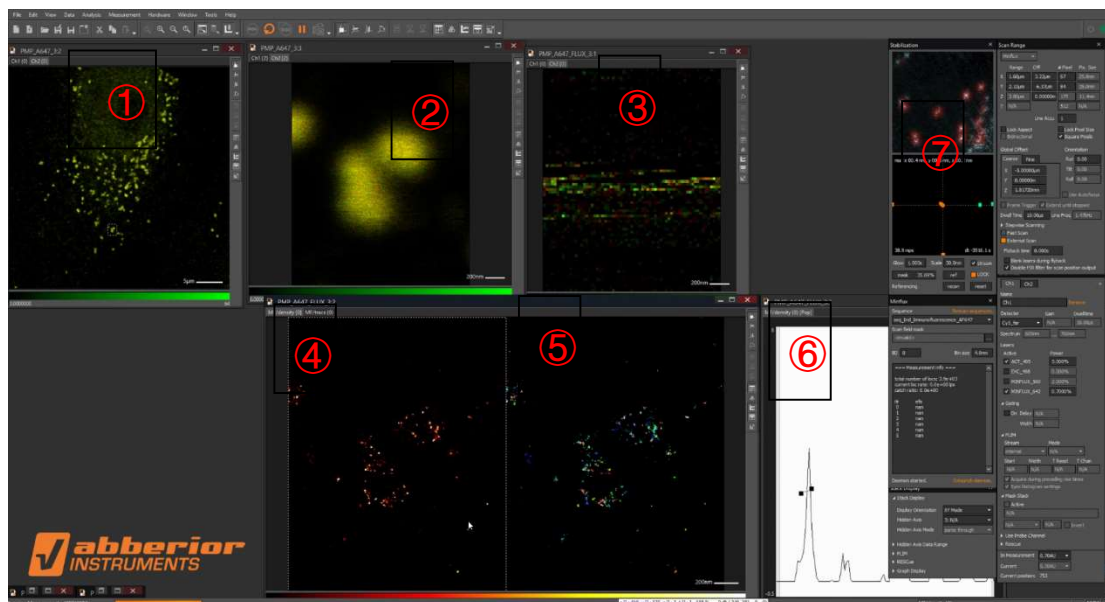


1 你们推荐的 fiducial marker 叫什么？

40 nm gold nanorod，几乎不漂白，不崩解，容易和玻璃黏附，稳定。

2 各个窗口的描述：



①是共聚焦的大视野的图，今天演示使视野的标尺是 5μm；

②是第一个局部位置的放大，可以在第一个窗口上随意选择 ROI，然后拖入此窗口；

③是事件时间流显示，用来监控闪点过程，强弱，密度；

④是拍照位置的定位成像实时累积结果；

⑤是窗口④同一图像的颜色展示，每增加一个数据点颜色就会用不同的颜色展示；

⑥是在④中选取一个结构做 line profile，看半高峰宽，推算出仪器实际分辨率(仪器分辨率* ~2.3 = FWHM)；

⑦载物台上 nanorod 的实时 xyz 位置变化，用来监控三轴漂移，一般为 1 纳米以内，系统自动实时将漂移计算入定位结果。

3 样品是过氧化物酶体看起来不连续，而是各种点状结构？展示的很多结果也是不连续的结果？

样品是一种细胞器，参与重要能量代谢。

定位超分辨率结果图就是给人这种感觉，大大不同于常规共聚焦。只有在定位点数目极大的情况下 zoom out 才能产生感官上连续分布，但这样做没有实际分辨率需求意义。

需要注意的是在标记样品时，染料需要覆盖整个表面，但又不能浓度过高，以减低相邻分子同闪现象。

4 台子自动修正，后期是否需要重新校准？

这个仪器的载物台是实时监视 fiducial marker 并反馈纠正的，通常三轴精度在 1 纳米以下。系统检测到这种漂移后可以实时的在点定位图像上补偿回来，因此后期不需要做类似常规单分子定位的漂移校准计算。

5 MINFLUX 在成像中可以不停的优化 L，在做图像扫描是每个点都要反复优化 L？还是统一优化好 L 后，扫描其他位置时也使用同样的 L？

在纳米定位成像时，对每一个点都做必要迭代，增大 donut 激光强度，缩小 L（就是您说的优化 L），直到精度不能再提高，每次迭代大约需时 100 微秒，一般 4, 5 次迭代就能达到最优精度。

在单分子追踪成像时，由于时间精度关系，不做迭代，以固定 L 追踪，每个数据点 100 微秒。

6 这样反复扫描成像过程中，光损伤大吗？

在传统单分子定位超分辨率技术中，这不是首要考虑问题，而是应该采集尽可能多的光子信号，以使用算法更精确的判定。

与此相比，MinFLUX 的原理决定它以比单分子定位显微镜（SMLM）低 20 倍的信号量就能产生比 SMLM 高 10 倍的分辨率，而且速度极快，每个数据点视野小，另外它不是在一个点上的反复扫描，而是跳跃采点，因而漂白和杀伤问题很小。

7 Autofocus 的 light 怎样去掉的？

MINFLUX 里面没有使用 autofocus，完全靠主动 3 轴反馈稳定系统，它是以 fiducial marker 成像为基本参照的。

7 采一张 minflux 图像，需要 405/488 反复照多少次？

我们只用 405 做活化。实际成像时可根据样品情况调 405 激光强度，其频率是由系统根据结果自动控制的。

8 如果对左上角的图全视野（约 40x40 微米）做个图需要多长时间？

我们可以简单计算一下，1600 平方微米，如果 10%区域有样品，取 1nm pixel size, 那就是 16×10^7 次方个点，每个点不做迭代需时 100 微秒，那总耗时 16000 秒，约 4.4 小时。MINFLUX 做固定样品超分辨重要目的是用来解析精细结构的，解析大视野图的时间代价比较高，也没有必要。MINFLUX 的分辨率下探到普通电镜水平，类似的，应用上也不会用电镜做大视野成像。

9 MINFLUX 拍超分辨图大约拍多久或多少次能得到理想的图像？

参考上述成像时间计算。其定位精度是根据 CRB 算法迭代控制的，可以通过前面讲过的 line profile 形式来估计出当前结构的分辨率。

10 一个分子成像一次后是否需要漂白掉后再成像？如果单个分子多次闪烁是否存在 overlapping？

不需要进行类似基于相机的单分子定位的漂白过程。MinFlux 单点定位速度很快，远小于闪烁本身的时间跨度，而且是单纳米精度数据直出，因此传统相机方法需要考虑的单点多次重叠带来的后续算法重构时精度下降问题，在 MinFlux 中不存在。

11 靠得非常近的两个点怎样区分？

在小视野单位时间（单次定位最快只需 100 μ s 左右）里同时闪烁概率很小，优化的样品 buffer 和系统控制进一步降低这种可能性。如果此时还有同时闪烁发生，那么理论上会造成迭代路径干扰，因而可以反馈得知，从而舍去此点。需要注意的是某些染料分子靠的非常近时单个分子会引起周边分子共闪，因此降低精度，此时需要选择合理染料浓度。

12 多纳圈的运动是固定顺序的吗？

对每一个点定位过程中的四个数据采集位置是固定的，只有迭代半径的区别。对各个成像点来说不是固定的扫描顺序，而是跳跃的。

13 软件界面中最下面两个图的意义？

左右图一样，右面是每出一个点用不同颜色表示；左面就是一个亮度图，下面的颜色标尺就是这张图的。

14 建议在实时结果图中加一个以时间先后为 scale 的 color bar。

好建议，已反馈研发。

15 Alexa-647 是否最适合做 MINFLUX?

目前测试下来单色应用 Alexa 647 通常合适, 多色应用 sulfo Cy5/CF660/CF680 组合适合, 这是对 640 激发来说。对 561 激发, 目前可用的为 Atto 565。应用团队在测试几乎所有染料, 然后会给用户出具一个 list。

16 半峰宽图片来自于哪里? 测量分辨率的公式? 对于测量真实分辨率是否有实际意义?

是选取感兴趣结构, 用软件自带的 line profile 功能得出的实际测量 FWHM 值。根据高斯分布的 FWHM 约等于 2.3 倍 Standard Deviation 这个公式, 进而得出仪器大约精度。

17 nanorod 推荐一下品牌、型号?

见问题 1

18 nanorod 如何反馈精度?

通过对其连续成像, 测定出其位置三轴漂移, 从而主动纠正。

19 可否提供 buffer 的大概信息?

我们的 buffer 类似常用的 dSTORM buffer, 最重要的步骤是在混合各组分之前通入氮气来去除氧, 并保持去氧状态, 这样可以维持闪烁几天, 测试中最多有过几次一周不用换 buffer。不这样做会造成 pH 慢慢变酸, 相关的酶成分和 MEA 不再有效。

20 核孔复合物双色三维结构解析, 需要多久?

3D MinFlux 实际情况需要等到年中正式商品化发布才知道。理论上三维定位是通过类似于我们 STED 的 spatial light modular 产生 3D donut, 并用缩小球半径来迭代定位。不同于 2D MinFLux 的四个位置, 3D 定位中使用 6 个位置, 4 个在赤道圈上, 南北极各 1 个, 因而采集计算位置增多, 推测速度略慢于 2D。

21 移动 3 次计算会不会产生 artifacts?

只会提高精度, 就像 GPS 卫星越多, 定位越精确

22 荧光的闪烁有一定的随机性, 一次扫描很大的概率会拍不到荧光, 怎么解决这个问题?

MinFlux 并不是以共聚焦/STED 那种线面扫描方式进行的，而是实时跳跃到邻近闪点发生处定位成像的。

23 我们现在看见的是单个分子吗，有多少分子呈现在一个亮的点上？背景上面的小点是信号吗？

通常来说单个点来源于不同的单个分子，但有可能完成一个闪点事件后 MinFlux 在搜寻时又找到这个点，因而不能肯定说每个点就代表一个不同的单独分子。由于尺度关系，非常靠近的分子会定位在同一点。

我们相信单独的小点是定位点，通常在后续处理时，我们会将颜色亮度尺调整为展现最亮信号点，而忽略在背景上的这些弥散的定位点。之所以能看到这些弥散定位点是由于现在设定的后续渲染 pixel size 为 1nm，通常我们渲染是光子数 binning 到 4nm pixel size，这样就看不到这些背景了。

24 Buffer 和 STORM buffer 有何不同？

见问题 19.

25 除了展示的核孔复合物、过氧化物酶体、细胞骨架外现在还有哪些应用？或者未来的应用？

现在展示的是我们内部的样品。当然我们尝试了很多用户样品，很少有特殊样品不能用于 MinFlux。我们昨天成功做了用户单个细菌相互作用的 MinFlux 成像。病毒学研究也会从中受益，我们尝试了病毒的样品，最主要挑战是对病毒样品的荧光标记。就像我们的 STED 能从组织到病毒成像一样，我们也尝试了 MinFlux 组织成像，因为它有 pinhole，可以得到比较好的 sectioning。组织成像时需要样品背景小，能被共聚焦或宽场看见。

我们也有一些意想不到的成功应用，譬如用 MinFlux 追踪晶体晶格内单个质子，在这个样品内，质子穿越晶格会引起亮度改变，因而可以间接追踪展示出质子的轨迹。

另外，由于会被 STED 激光激发，所以 Quantum dot 一般不应用在 STED 成像里。但是在 MinFlux 里 Q-dot 可能作为一个很好的实现细胞内追踪的染色工具。

所以我们设想是用共聚焦粗扫，用 STED 细扫，用 MinFlux 精扫。

26 分辨率提高一般需要标记方法的改进，宽场、confocal 可以使用二抗、一抗就能满足连续标记；超分辨需要使用 SNAP/HALO；染色方法上有没有对应 minflux 的染色方法？

我个人想发展如何将标准间接免疫荧光标记的样品应用于 MinFlux，这样来降低门槛，

使得很多普通用户可以尝试这个技术。要做到这一点需要注意别用太高的抗体浓度，当然我们需要标记完全覆盖样品结构，但是不能过度标记，否则单个位点几个荧光分子同时发光的概率大大增强，使得系统难以分辨单个点。

我们也在尝试发展只含有单个荧光基团的抗体，这不同于 STED 应用里为了抗漂白每个抗体有三四个荧光基团，这种单荧光基团抗体对于 MinFlux 足够了。

总的来说，目前间接免疫荧光标记还不能理想的应用于 MinFlux，还是需要一抗直连单荧光抗体，或者用 SNAP/HALO 等小 tag 来做荧光标记。Nanobody 是另一种方向，它可以通过生物工程改造，来控制标记覆盖率，或实现单荧光基团抗体，或多种不同荧光基团共存抗体。

在标记样品时，非常重要的一点是 blocking 的时间，需要 1 个小时以上，来降低背景。用高质量的 BSA fraction V 就可以，不一定要用很贵的 blocking 试剂，也可以加最低浓度的 Tween 20，但一定至少要 blocking 1 小时。

27 MINFLUX 可以做动态成像吗？比如看内部的细胞器移动？

就像 PPT 里看到的，我们已经可以做 single particle tracking，对活细胞内的细胞器追踪也是可能的。我们目前正在努力把 vesicle 内部随时间变化的结构信息成像和 single particle tracking 结合起来，这需要一定时间来实现。MinFlux 在单个 vesicle 大小视野下的成像速度很快，因此可以看到 vesicle 内部结构变化，同时 MinFlux 单分子追踪每个数据点只需 100 微秒，因此我们可以选择做 single particle 高速追踪，或是很多个 particle 以较慢的间隔同时追踪，这在别的追踪成像里由于漂白是不太可能长时间实现的。

28 MINFLUX 的分辨率概念和其他超分辨方法的分辨率概念有何不同？MINFLUX 分辨率的测量方法？

MINFLUX 是结合单分子定位来做超分辨率的，这个技术里分辨率就是定位精度，和 STORM/PALM 里面使用的定位精度类似。一般用 line profile 得出测量结构的 FWHM，其值约等于 2.3 倍的 Standard Deviation，进而得出仪器的精度。 $FWHM / \sim 2.3 = \text{分辨率}$

29 MINFLUX 的信号是否比普通单分子弱，怎么判断其是真实的信号，还是噪音？

MINFLUX 样品制备过程和 PALM/STORM 一样，所以样品本身不存在信号弱的问题。MINFLUX 的原理决定了只需，而且必须尽量少的信号光子数，才能达到单分子级分辨率。噪音来源于仪器和样品制备，仪器上我们选用单光子计数级 APD 作为探测器，其量子效率要比最好的共聚焦探测器还要高 30%；样品制备里最重要的降低背景的步骤

就是 1 小时以上的 blocking, 参见问题 26 最后一节。

30.最后重构超分辨图像时, 使用的单分子PSF多大? 怎么决定?

和 PALM/STORM 不同, MINFLUX 不用做 PSF 拟合, 而是直接实时定位。其分辨率只依赖于共圈直径的大小和信号光子数。

31.迭代扫描时, 是否会漂白部分单分子, 影响标记密度?

迭代是针对当下单分子点进行的, 每次 100 微秒, 共 5 次, 所以速度很快, 而且原理决定只需少量信号光子, 因此不存在明显漂白问题。

32.精扫和粗扫 都是同时用还是分开用什么顺序等?

针对每个分子的四个位置数据采集和迭代, 我们用 EOD (electro optic reflector)它是定位型的而不是扫描型的部件, 大概在 300 纳米见方的区域内精确定位光束。超过这个尺度, 或者在找寻处于 on state 的闪点时, 我们用基于 galvo 的 4 镜 Scanner 在更大的视野内扫描, 整个范围约 80 微米见方@100X 物镜。

33.2020文章的迭代和2017没有迭代的运算 具体的区别多大 可否再说一下?

时间上明显区别, 每一个过程包括多纳圈四个位置的移动, 稳定, 驻留, 每个位置信号光子采集, 实时 fitting 计算等耗时 100 微秒。

迭代就是缩小共圈直径, 重复上述步骤, 一般重复 4 次(共 5 次), 能达到设计分辨率, 这样耗时 500 微秒。时间上远小于一次单分子闪烁的时间跨度(根据不同情况常规为十几到几十毫秒)。

34. 李博士您好, 刚刚您说染料选择有一个总结表格, 请问这个表格是否公开, 能在哪里查到?

我们的应用团队测试过所有市场上的通用染料, 各种相关数据内置在系统里, 只要选择使用的染料, 系统会自动匹配参数。对于我们的用户, 我们会提供进一步咨询。有些测试结果具有新的科学意义, 我们也正在准备相关文章, 发表后我们会分享给大家。

35. 对标记探针的要求是什么? 尤其是荧光蛋白, 为什么荧光蛋白比染料用的少?

对探针标记要求非常类似 PALM/STORM, 总的来说就是亮, 稳定, 抗漂白淬灭, 友好的闪烁特性。

荧光蛋白总的来说可以用, 但是体积比染料分子大, 而且容易被漂白, 信号不及染料强,

信噪比不高，有些蛋白有背景激活。

反过来在 tracking 中寻找信号分子，光活化染料和蛋白应该比过分稀释染料来达到所需浓度来的方便。

36. 迭代是否会有发散的风险？如果发散后能否自动校正，再次迭代？

迭代就是不断提高多纳圈激光强度，缩小共圈直径，来提高精度，其本身没有发散风险。发散风险来源于系统不稳定，在 MINFLUX 上有 3 轴自稳定系统，主动稳定精度小于 1 纳米，而且实时计算入最终定位坐标，迭代过程极快，所以不会出现问题中的情形。

37. demo 机器的位置在哪里？地下？一层？

现在做 demo 的这台机器是放在二楼的，而且房间只有简易的移动空调，并且人员进出，哪怕这样，系统都不需特别预热和校正，几乎随用随开。它的稳定性除了常规的抗震台以外，最重要的就是 3 轴主动自稳定系统来保持的。

用户那边我们建议能放在地下室最好，最重要的是室温要稳定。放在稍高的楼层也不太受影响，但是最好不要放在高层，因为高层建筑物本身就有低频背景震动。

38. MINFLUX 如何监视 Z 漂移的？

我们使用 gold nanorod 作为 fiducial marker，通过干涉成像和算法锁定到 3 轴主动自稳定系统中。

39. 你们是否测试过光活化染料而不必使用 blinking 缓冲液？性能如何？（Have you tried the photoactivatable dyes, no need to use the blinking buffer, how is the performance?）

我们有开始进行这方面的尝试，还没有深入去做。

40. What is the criteria to stop an iteration and point the position?

为了达到单位数纳米分辨率，我们一般采取 5 次迭代。当然你可以继续下去，但是这个分辨率已经是单分子尺度了，没有更进一步的实际意义。

41. 会不会有新的 paper 发表 Chris 测试过的染料等信息等工作？

如果成为我们的用户，我们会有培训，告知相关信息。

同时我们也会有相关测试应用很快发表，譬如 MinFlux 在微生物学里的应用。这是一个

不断推进的过程，不断根据用户的要求和应用，我们会不断发表新文章。

42. 李博士提到过MINFLUX曾经应用到晶体实验，可否谈一些相关信息？（Just now, Dr. Lee said MINFLUX can be used to do experiment on crystal lattice, so what about this exp?）

这是用户的特殊样品，当质子穿越有缺陷的晶格时会引起亮度改变，我们用 MINFLUX 跟踪这些亮度变化，反推出单个质子的运动轨迹。

我们也做了新冠病毒 COVID-19 的成像，我们对单个病毒成像不是很感兴趣，而是看它如何在培养的细胞里复制的，特别是表面某些蛋白在不同时期的变化和作用，数据马上就要发表了。这里用的是免疫染色，将来要用 Nanobody 来染色新冠病毒。

我们也成功把 MinFLUX 应用在诸如脑组织，心肌组织等 tissue imaging 中，也会发表相应文章。

43 STED对周边点的bleach很大，MINFLUX怎么样？

两者原理完全不一样，MF 速度快，所需信号光子数极少，几乎没有漂白问题。在 demo 时使用的激光量通常只有百分之零点几。

44 tracking 只找到一个分子会很快，如果做多个分子会怎样？速度上怎么样？

这是我们下一步要做的工作，tracking 速度很快，这使得我们可以选择高时间分辨率追踪单分子，还是牺牲一小部分时间分辨率来同时追踪一批分子。更重要的是同时结合成像来看结构的动态变化。详细信息可以参考 Abberior 暑期系列报告的回放视频，Chris 在那里面做了 tracking 的演示：
<https://attendee.gotowebinar.com/recording/2026086977274183693>

45 文章上说即可以用donut的也可以用SIM的照明，现在商用化的可以使用SIM照明吗？

目前还不可以，商用机是去年底发布的，今年马上要发布 3D MINFLUX。其他更进一步的还在研发。另外生物物理所纪伟老师的 ROSE 技术有点儿类似 SIM+STORM 的方式，大家有兴趣可以看看相关文章或找机会和他询问一下。

46 647和680染料的emission之间也会有色差,怎么解决？

对我们影响大的色差主要来源于照明部分，不同波长激光产生的多纳圈会由于色差而处于不同位置，这对于我们所要达到的单分子尺度精度有很大影响，所以我们在做多色时推荐使用能被同一种激光激发的不同染料，它们的发射信号能被滤色片区分开。发射接收端的色差不是能引起科学性误差的主要问题。

47 after selecting a interested area from the confocal image, how does the MINFLUX scan the area? is it by pointing down the particular molecule or by scanning the whole area ?

No scanning point by point, the EOD is 'jumping' among the points

48 What is EOD by the way?

EOD is electro optic deflector, 类似于 AOTF/AOM 等, 是基于电/生光控制的无振镜、无惯性的扫描系统。速度快, 无惯性, 属于指哪打哪型光束偏转装置。

49 从共聚焦图像中选择区域做MINFLUX时是手动选择ROI是吗?

目前是的, 我们正在考虑开发将来可以使用机器学习自动选择。

50 如何做MINFLUX扫描Z? 从当前的界面中没有看到

请等商品化 3D MINFLUX 第四季度正式发布。

51 当前的2D MINFLUX在Z方向的分辨率有多少?

大约类似共聚焦约 500 纳米, 3D MINFLUX 发布后预计分辨率 xyz 在 3-5nm 左右

52 如果双色一个很亮、另一个很弱时怎么平衡?

对于同一个激发波长多纳圈来说, 如果两个荧光强度差的太多, 成像会很困难。制样时应该选择正确的荧光基团和正确的标记方法, 我们也在尝试用算法来区分这种情况。如果两个双色实在差别很大, 那就要考虑用不同的激发波长多纳圈来做了。

53 Abberior 暑期系列报告的回放地址:

第一讲回放: MINFLUX

<https://attendee.gotowebinar.com/recording/2026086977274183693>

第二讲回放: Adaptive Optics STED microscopy

<https://attendee.gotowebinar.com/recording/7768242473024070927>

第三讲回放: STED PAINT: STED microscopy with exchangeable fluorophores

<https://attendee.gotowebinar.com/recording/298769603510526732>

第四讲回放：STED 活细胞成像

<https://attendee.gotowebinar.com/recording/5788060514615923728>