

· 技术与方法 ·

# 基于超分辨率径向波动的活细胞线粒体纳米尺度 成像: 关键参数影响与优化策略

方三华\* 刘丽 杨丹 刘双双 尹伟 赵倩冰 黄琼 陈静瑶

(浙江大学医学院公共技术平台, 杭州 310058)

**摘要** 超分辨率径向波动(SRRF)作为一种无需特殊硬件的计算成像方法, 为活细胞超分辨率成像提供了有力工具, 然而该技术的成像效果高度依赖参数设置。为建立针对活细胞线粒体的SRRF成像优化方案, 该研究以HeLa细胞为模型, 利用Abberior Live Orange Mito染料标记线粒体, 通过转盘共聚焦显微镜获取时间序列图像, 并使用NanoJ-SRRF系统评估了环半径、径向放大倍数、时序分析模式等关键参数对成像质量的影响。重建图像的分辨率与质量分别采用半全宽和NanoJ-SQUIRREL的分辨率尺度皮尔逊相关系数与分辨率尺度误差进行定量评估。结果表明, 环半径是最关键参数, 较小取值(0.1~1.0)可实现超越衍射极限的分辨率; 径向放大倍数与环内轴数对结构质量影响较小; 在时序分析模式中, 时序径向性平均法能提供最稳定且无伪影的重建结果; 而梯度加权会引入明显伪影并显著降低图像质量。该研究针对转盘共聚焦成像、Abberior Live Orange Mito标记、108 nm像素尺寸、20 Hz采集、100帧时间序列的实验条件, 提供了经量化评估的NanoJ-SRRF参数优化方案, 为该条件下的活细胞线粒体纳米级成像提供了经量化评估的参数优化起点。

**关键词** 活细胞成像; 线粒体; 超分辨率径向波动(SRRF); 参数优化; 图像质量评估

## SRRF (Super-Resolution Radial Fluctuation)-Based Nanoscale Imaging of Living Mitochondria: Key Parameters and Optimization Strategies

FANG Sanhua\*, LIU Li, YANG Dan, LIU Shuangshuang, YIN Wei, ZHAO Qianbing,

HUANG Qiong, CHEN Jingyao

(Core Facilities, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

**Abstract** As a computational imaging method requiring no specialized hardware, SRRF (super-resolution radial fluctuation) provides a powerful tool for live-cell super-resolution imaging, yet its performance is highly dependent on parameter settings. To establish an optimized SRRF imaging protocol for live-cell mitochondria, this study utilized HeLa cells as a model, labeled mitochondria with Abberior Live Orange Mito dye, acquired time-series images via a spinning disk confocal microscope, and evaluated the effects of key parameters such as ring radius, radial magnification, and temporal analysis modes using the NanoJ-SRRF system. The resolution and quality

收稿日期: 2025-11-17

接受日期: 2026-01-08

浙江大学仪器研制培育项目(批准号: YQZX-C202412)和浙江省基础公益研究计划(批准号: LGC19H090001)资助的课题

\*通信作者。Tel: 0571-88206765, E-mail: fshfbzxhq@zju.edu.cn

Received: November 17, 2025

Accepted: January 8, 2026

This work was supported by the Zhejiang University Instrument Development and Cultivation Program (Grant No.YQZX-C202412), and the Zhejiang Province Basic Public Welfare Program (Grant No.LGC19H090001)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-88206765, E-mail: fshfbzxhq@zju.edu.cn

of reconstructed images were quantitatively assessed using Full Width at Half Maximum and the resolution-scale Pearson correlation coefficient along with resolution-scale error from NanoJ-SQUIRREL. Results indicate that ring radius is the most critical parameter, with smaller values (0.1–1.0) achieving resolution beyond the diffraction limit; radial magnification and axes per ring have minor impacts on structural quality. Among temporal analysis modes, temporal radiality averaging provides the most stable and artifact-free reconstruction, whereas gradient weighting introduces significant artifacts and markedly reduces image quality. This study provides a quantitatively evaluated NanoJ-SRRF parameter optimization scheme under the experimental conditions of spinning disk confocal imaging, Abberior Live Orange Mito labeling, 108 nm pixel size, 20 Hz acquisition, and a 100-frame time series. It offers a reliable parameter starting point for nanoscale live-cell mitochondrial imaging under these specific conditions.

**Keywords** live-cell imaging; mitochondria; SRRF (super-resolution radial fluctuation); parameter optimization; image quality assessment

超分辨率显微技术通过突破光学衍射极限(约200 nm)实现纳米尺度亚细胞结构的可视化,极大地推动了细胞生物学研究进展<sup>[1]</sup>。尽管受激发射损耗(stimulated emission depletion, STED)显微镜<sup>[2-3]</sup>、单分子定位显微镜(single-molecule localization microscopy, SMLM)<sup>[4-6]</sup>以及结构光照明显微镜(structured illumination microscopy, SIM)<sup>[7]</sup>等超分辨率显微镜提供了前所未有的空间分辨率,但它们在活细胞成像中存在光毒性强、硬件配置复杂以及标记条件严苛等问题。在此背景下,计算超分辨率方法作为一种有效的替代策略被提出,该方法基于算法处理,能够从常规荧光显微镜图像中提取亚衍射极限信息,最大程度降低光损伤的同时,保持良好的动态生物系统兼容性<sup>[8-10]</sup>。

在众多计算超分辨成像技术中,超分辨率径向波动(super-resolution radial fluctuation, SRRF)因其无需专用硬件或稀疏标记即可实现约150 nm分辨率而受到广泛关注<sup>[10-12]</sup>。该技术通过分析荧光信号在时间序列上的径向对称性波动,能够从宽场显微、转盘共聚焦或全内反射荧光(total internal reflection fluorescence, TIRF)等常规成像模式中重建高分辨率图像<sup>[13-14]</sup>,因而在活细胞成像中显示出良好的适用性。自2016年首次被报道以来,SRRF技术在活细胞及亚细胞结构成像领域取得了一系列重要研究进展:在成像模式适配方面,SRRF已成功应用于宽场、共聚焦、TIRF等多种常规显微镜,实现了从低光照活细胞GFP标记成像到高分辨率固定样本成像的多场景覆盖,甚至可结合结构化照明显微镜(SIM)和调制Airyscan技术进一步提升性能,为不同实验需求提供灵活选择<sup>[10,14]</sup>;在亚细胞结构可视化方面,除早期应用于细胞骨架(微管、肌动蛋白)成像外,应

用已拓展至线粒体、内质网、细胞膜等多种亚细胞结构,例如通过SRRF可清晰捕捉线粒体网络的动态重构、肌动蛋白皮层的逆行流动以及细胞膜受体的纳米尺度分布特征<sup>[10-11,14-15]</sup>;在技术优化与拓展方面,研究者通过算法改进(如GPU加速、Python语言重构)将计算速度提升数十倍,实现实时成像分析,同时开发的增强型SRRF(eSRRF)通过自动化参数优化和3D成像拓展,进一步提升了图像保真度和应用范围,可实现每秒1个体积的活细胞volumetric超分辨率成像<sup>[16]</sup>;在标记策略适配方面,SRRF不仅兼容传统荧光蛋白(如GFP)和有机染料,还可与荧光素结合标签等新型遗传编码探针联用,实现低光毒性长时程成像,且通过荧光素浓度优化可进一步提升成像性能稳定性<sup>[11]</sup>。此外,SRRF与膨胀显微镜(ExM)的结合(如Ex-FEAST)可将分辨率提升至约26 nm,为亚细胞结构的超高分辨率观测提供了新途径<sup>[17]</sup>。

线粒体是调控细胞能量代谢、凋亡过程及信号转导的关键动态细胞器,其融合、分裂以及网络重构等复杂形态变化通常发生在亚秒级时间尺度与亚衍射空间尺度<sup>[18-20]</sup>。因此,对线粒体进行成像需采用一种能够在高空间分辨率、高时间精度与低光毒性之间取得良好平衡的技术。SRRF已成功应用于固定及活细胞中细胞骨架等结构的可视化研究<sup>[10,12]</sup>,其参数优化研究也逐步形成体系化进展:在核心参数校准方面,早期研究通过NanoJ-SQUIRREL质量评估工具验证,环半径、径向放大倍数及环内轴数的合理组合是平衡分辨率与伪影的关键,针对微管、线粒体等不同亚细胞结构,环半径0.5、径向放大倍数5、环内轴数6的参数组合被证实具有普适性<sup>[21-22]</sup>;在多模态联用场景中,SRRF与Airyscan、膨胀显微镜

(ExM)的结合研究明确了联合体系下的参数适配原则, 如与ExM联用时需下调环半径至0.3以匹配样品膨胀后的结构尺度<sup>[17]</sup>。不过, SRRF在线粒体成像中受参数影响的具体表现尚未得到系统评估。NanoJ-SRRF作为ImageJ开源图像处理平台的插件, 其超分辨重建结果受到环半径、径向放大倍数、时序分析模式及加权方案等多个关键参数的显著影响, 这些参数共同决定了最终图像的分辨率与伪影水平<sup>[10,12]</sup>。尽管半高全宽(full width at half maximum, FWHM)分析及ImageJ插件NanoJ-SQUIRREL(super-resolution quantitative image rating and reporting of error locations)可为图像质量提供量化评估手段<sup>[22-23]</sup>, 但目前仍缺乏针对线粒体SRRF成像的参数系统优化方案。

为此, 本研究系统评估了NanoJ-SRRF各项参数在活细胞线粒体超分辨成像中的影响。通过联合应用FWHM与NanoJ-SQUIRREL分析策略, 我们明确了在保证高分辨率与低伪影水平的前提下的最优参数组合。本研究在特定成像条件下, 为基于SRRF的线粒体成像提供了一套经系统评估的参数优化建议, 为该类实验条件下的线粒体动态纳米级可视化提供了方法学参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

HeLa细胞购自中国科学院细胞库(中国上海), 常规培养于含10%胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司)及1%青霉素-链霉素双抗(北京索莱宝科技有限公司)的DMEM培养基(Sigma公司)中。每2~3天更换一次培养液。待细胞融合度达到70%~80%时, 使用胰酶-EDTA(Sigma-Aldrich)进行消化传代。

### 1.2 线粒体标记

采用Abberior Live Orange Mito荧光染料(Abberior Instruments)标记线粒体。将HeLa细胞以 $1.5 \times 10^5$ /皿的密度接种于经0.01%多聚赖氨酸[生工生物工程(上海)股份有限公司]包被的35 mm共聚焦培养皿(ibidi)中。培养24 h后, 使用无酚红且无血清的DMEM(Gibco)清洗细胞2次, 随后加入0.5  $\mu\text{mol/L}$ 染料, 于37 °C培养箱中孵育30 min。孵育结束后, 以相同培养基清洗3次, 去除未结合染料, 随后立即进行成像。

### 1.3 转盘共聚焦显微镜成像

使用奥林巴斯Spin10系统(IX83显微镜; Yokoga-

wa CSU-X1转盘)采集共聚焦时间序列图像。该系统配备60倍/1.5 NA油镜及ORCA-Fusion BT sCMOS相机(Hamamatsu)。所有活细胞成像均在37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下(Thermoplate III)进行。成像参数设置如下: 561 nm激光器输出功率为50 mW, 曝光时间为50 ms, 总帧数100帧, 像素尺寸为108 nm。

### 1.4 超分辨率径向波动分析

SRRF是一种基于径向对称性获取超分辨率荧光图像的方法<sup>[11]</sup>。本研究采用ImageJ(v1.54f)中NanoJ-SRRF(v1.14 Stable1)插件进行超分辨图像重建。该插件包括多项参数及参数集: 关键参数包括环半径、径向放大倍数与环内轴数; 参数集涵盖时序分析、径向性、加权及校正模块。为评估上述参数对线粒体SRRF图像分辨率与质量的影响, 本研究分别设定环半径(0.1、0.5、1、1.5、2、3)、径向放大倍数(1、5、10)及环内轴数(2、6、8)进行测试。时序分析采用三种模式: 时序径向平均(temporal radiality average, TRA)、时序径向成对乘积均值(temporal radiality pairwise product mean, TRPPM)和时序径向自相关(temporal radiality auto-correlation, TRAC)。径向性模块中分别启用移除正约束、重归一化及梯度平滑功能; 加权模块选用强度加权或梯度加权; 校正模块则选用最小化SRRF模式或快速线性化SRRF功能。NanoJ-SRRF操作流程参照先前报道的方法进行<sup>[13]</sup>。

### 1.5 超分辨率定量图像评分与误差定位分析

NanoJ-SQUIRREL(v1.1-alpha)是一种无需预设参数的图像质量评估工具, 以ImageJ插件形式运行, 可对超分辨率图像质量及伪影进行定性分析与定量分析<sup>[22]</sup>。将SRRF处理所得超分辨率图像与对应原始图像堆栈的平均图进行比对, 利用SQUIRREL算法生成误差图。图中紫色区域表示低误差, 黄色区域表示高误差。分辨率尺度皮尔逊相关系数(resolution-scaled Pearson correlation coefficient, RSP)用于量化原始数据与配准数据之间的相似性, 其标准化取值范围为-1至1, 数值为1表示完全一致。分辨率尺度误差(resolution scaling error, RSE)是基于图像强度的均方根误差指标, 数值越低表示原始图像与超分辨率图像之间的一致性越高。具体操作步骤详见我们之前的研究<sup>[21]</sup>。

### 1.6 半高全宽(FWHM)分析

FWHM用于图像分辨率的定量评估<sup>[23]</sup>。利用

ImageJ软件的Plot Profile工具,在图像相邻特征位置绘制线段进行分析:可分辨结构呈现独立峰,而未分辨结构则融合为单一宽峰。FWHM通过拟合孤立点光源的强度分布进行测量:对强度分布进行高斯拟合后,按公式 $FWHM=2.354\sigma$ ( $\sigma$ 为标准差)计算50%峰高处对应的宽度,最终得到分辨率数值(如“FWHM=90 nm”)。本研究所有FWHM测量均采用ImageJ软件的Plot Profile工具完成。

### 1.7 统计分析

采用GraphPad Prism 10软件进行统计分析。数据以平均值±标准差表示(每组 $n=5$ 个生物学重复)。组间均值差异的统计学显著性通过单因素方差分析(ANOVA)结合Tukey多重比较检验进行评估,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 实验结果

为评估不同NanoJ-SRRF参数对HeLa细胞线粒体超分辨率图像分辨率与质量的影响,本研究采用半高全宽(FWHM)作为分辨率的评价指标,并利用SQUIRREL方法衍生的RSP和RSE对图像质量进行量化分析。系统考察了环半径、径向放大倍数、环内轴数、时序分析方法、径向性设置、加权方案及校正方法等关键参数的影响。在SRRF成像前,我们检测了共聚焦原图信噪比(SNR)、总光子数和线粒体标记密度。信噪比通过信号区域平均强度与背景区域灰度值的标准差之比估算,值约为11.7~14.1,平均每帧总光子数约为 $10.9\times 10^7$ ,线粒体标记密度为5~9/100  $\mu\text{m}^2$ 。

### 2.1 环半径对SRRF图像分辨率与质量的影响

使用Abberior Live Orange Mito染料标记HeLa细胞线粒体,通过转盘共聚焦显微镜获取时间序列原始图像。分别选取0.1、0.5、1.0、1.5、2.0和3.0等环半径值(其余参数设为默认)进行SRRF图像重建。结果显示,所有重建图像的分辨率均较原始图像显著提高[FWHM=(482±32) nm;  $P<0.05$ ,图1]。随着环半径从0.1增大至3.0,FWHM从(82±21) nm线性上升至(398±10) nm( $P<0.05$ ,方差分析),对应分辨率下降约385%;环半径在0.1~1.0范围内可获得优于光学衍射极限的分辨率。NanoJ-SQUIRREL误差图的定性评估(图2A~图2F)显示,环半径在2.0~3.0时黄色高误差区域明显扩大。定量分析(图2G和图2H)表明,当环半径大于1.5时,RSP呈下降趋势(从0.947±0.009

降至0.928±0.05),RSE则呈上升趋势(从339±62增至395±71),但上述变化均无统计学显著性。

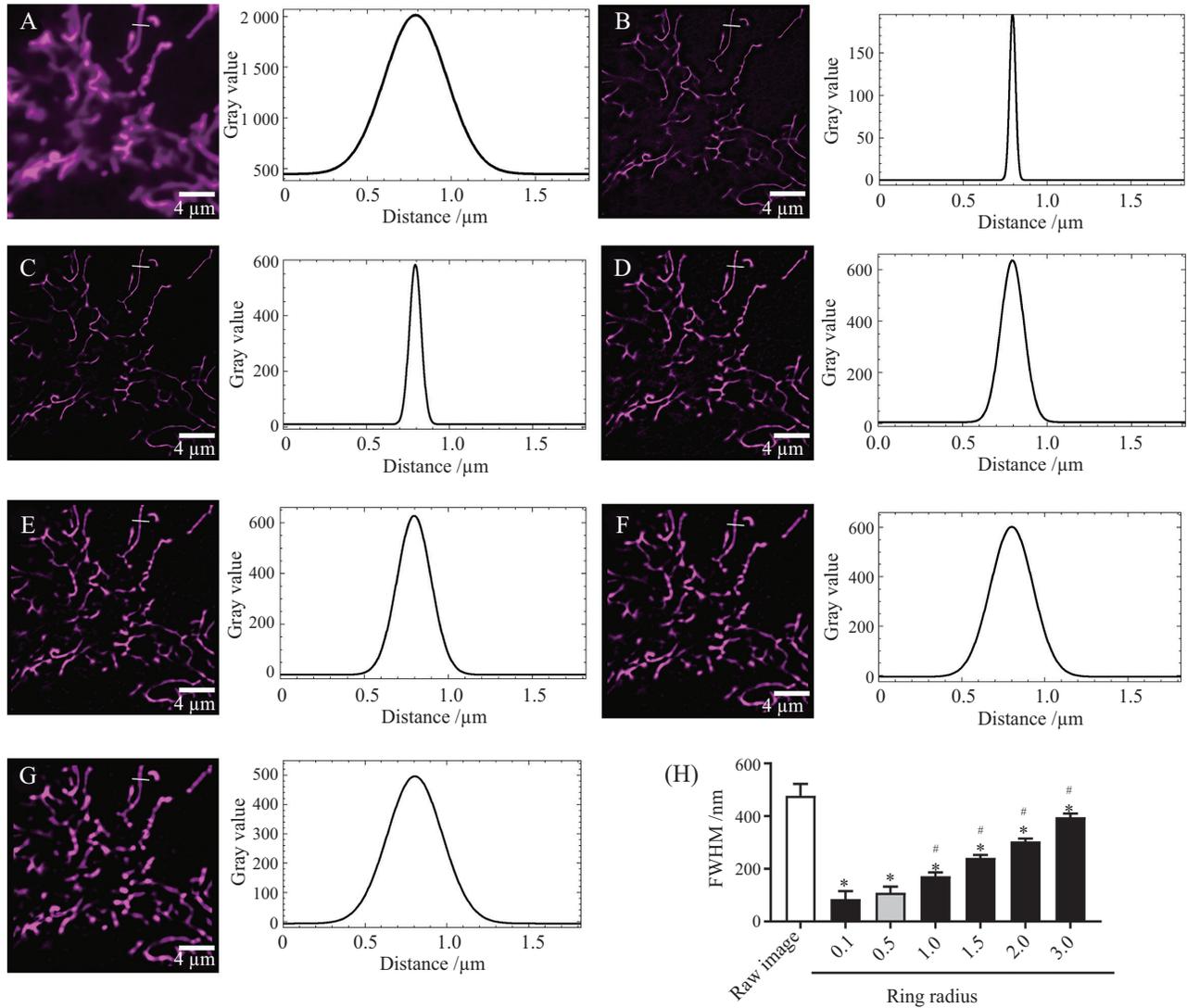
### 2.2 径向放大倍数与环内轴数对SRRF性能的影响

进一步评估径向放大倍数(1、5、10)与环内轴数(2、6、8)对SRRF重建质量的联合影响。结果显示,六种参数组合所重构的图像空间分辨率均较原始图像显著提升( $P<0.05$ ,图3A~图3G)。然而,放大倍数为1且环内轴数为6的组合所获图像的分辨率低于其他参数组合(方差分析 $P<0.05$ )。NanoJ-SQUIRREL分析显示,各组间RSP与RSE均无显著差异(图4A~图4H),说明这些参数对线粒体图像重建质量影响有限。

### 2.3 时序分析、径向性、加权及校正方法对SRRF结果的影响

我们还评估了时序分析方法(TRA、TRPPM、TRAC)、径向性选项(移除正约束、重归一化、梯度平滑)以及加权与校正模式(梯度加权、快速线性化SRRF)对SRRF重建质量的影响。在时序分析方法中,TRA与TRPPM呈现单峰分布,而TRAC呈现双峰分布,因此仅对TRA和TRPPM模式的FWHM进行量化分析。与TRA模式相比,TRPPM模式分辨率有降低趋势[FWHM: (75±13) nm vs (106±18) nm],但差异不显著(图5A~图5C和图5I)。TRPPM与TRAC模式均引入更多高误差区域,并伴随RSP降低(分别为0.876±0.016和0.762±0.032,TRA为0.945±0.014)及RSE升高,但TRPPM与TRA之间的RSE差异不显著(图6A~图6C、图6I~图6J)。

启用“移除正约束”选项导致背景噪声增加,RSP显著降低至0.871±0.012( $P<0.05$ ),但对分辨率无显著影响(图5D、图5I、图6D、图6I~图6J)。“重归一化”选项显著降低图像分辨率[(434±35) nm vs (106±18) nm,  $P<0.05$ ],但未显著改变RSP或RSE(图5E、图5I、图6E、图6I~图6J)。而“梯度平滑”选项对分辨率及图像质量指标均无显著影响(图5F、图5I、图6F、图6I~图6J)。与“强度加权”相比,“梯度加权”引入异常背景伪影(图5G),对分辨率没有影响[(95±20) nm vs (106±18) nm,  $P>0.05$ ],但导致RSP显著下降(0.525±0.029,  $P<0.001$ )和RSE显著升高(901±175,  $P<0.001$ ),并伴随高误差区域扩大(图5G、图5I、图6G、图6I~图6J)。最后,“快速线性化SRRF”与默认“最小化SRRF模式”在分辨率[(122±19) nm vs (106±18) nm]与图像质量指标(RSP: 0.935±0.019 vs



线粒体采用Abberior Live Orange Mito染料标记, 时序原始图像采集自Olympus SpinSR10转盘共聚焦显微镜。超分辨率图像通过ImageJ插件NanoJ-SRRF生成, 图像分辨率以半高全宽(FWHM)进行评估, 该数值由ImageJ计算得出。A: 原始图像及其分辨率; B-G: 分别为环半径0.1、0.5、1.0、1.5、2.0和3.0(默认参数为0.5)条件下生成的SRRF图像及对应分辨率; H: 原始图像与SRRF图像分辨率的统计分析。数据以平均值 $\pm$ 标准差表示( $n=5$ )。\* $P<0.05$ , 与原始图像相比; # $P<0.05$ , 与环半径0.5的SRRF图像相比。

Mitochondria were labeled with Abberior Live Orange Mito dye. Time-series raw images were taken by Olympus SpinSR10 Spinning Disk Confocal. Super-resolution images were produced using ImageJ plugin NanoJ-SRRF. Image resolution was assessed by FWHM, which was calculated by ImageJ. A: raw image and its resolution; B-G: super-resolution images produced by NanoJ-SRRF using different ring radius (0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 3.0, 0.5 is default parameter) and their respective resolutions; H: statistical analysis of the resolution of raw image and SRRF images. Data are expressed as the  $\bar{x} \pm s$  ( $n=5$ ). \* $P<0.05$  compared with the raw image. # $P<0.05$  compared with the SRRF image using ring radius 0.5.

图1 不同环半径参数下NanoJ-SRRF重建HeLa细胞线粒体图像分辨率的比较

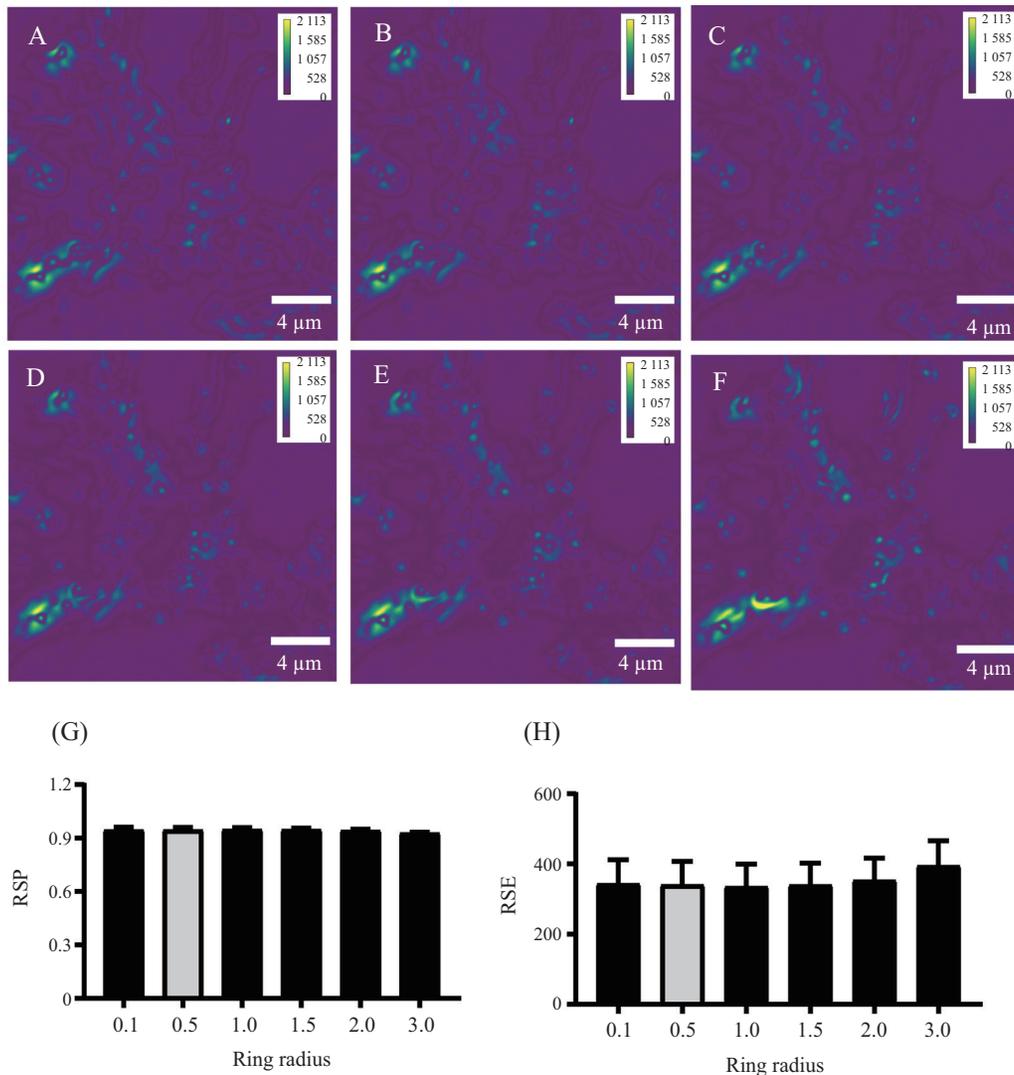
Fig.1 Comparison of the resolution of mitochondria images reconstructed by NanoJ-SRRF using different ring radius in HeLa cells

0.946 $\pm$ 0.016; RSE: 352 $\pm$ 59 vs 325 $\pm$ 65)方面均无显著差异( $P>0.05$ )。误差图分析显示两种校正方法在高误差区域分布上特征相似(图5A、图5H、图5I、图6H~图6J)。

### 3 讨论

本研究系统评估了NanoJ-SRRF各项参数对活

细胞线粒体超分辨率图像分辨率及质量的影响。结果表明, 环半径是其中最关键的参数: 较小的取值(0.1~1.0)有助于实现超越衍射极限的分辨率; 而径向放大倍数与环内轴数对线粒体图像质量影响较小。在时序分析模式中, 时序径向平均(TRA)能够提供最稳定且无伪影的重建结果; 梯度加权则会明显引入伪影并降低图像保真度; 此外, “快速线性化



误差图由NanoJ-SQUIRREL生成,反映超分辨率图像与参考图像(原始图像)之间的局部差异。图中紫色表示低误差,黄色表示高误差。分辨率缩放皮尔逊相关系数(RSP)和分辨率缩放误差(RSE)为图像质量评价指标。A~F: 环半径0.1、0.5、1.0、1.5、2.0和3.0条件下生成的SRRF图像对应的SQUIRREL重建误差图; G、H: RSP和RSE的统计分析结果。数据以平均值±标准差表示( $n=5$ )。

The error maps were produced by NanoJ-SQUIRREL. The SQUIRREL error map represents the local discrepancies between the super-resolution image and reference image (raw image). Purple regions have low error and yellow regions have high error. RSP (resolution scaled Pearson-correlation) and RSE (resolution scaled error) are quality metrics for the super-resolution images. A-F: the reconstructed SQUIRREL error maps from SRRF images in different ring radius (0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 3.0) in NanoJ-SRRF; G,H: statistical analysis of RSP and RSE. Data are expressed as the  $\bar{x} \pm s$  ( $n=5$ ).

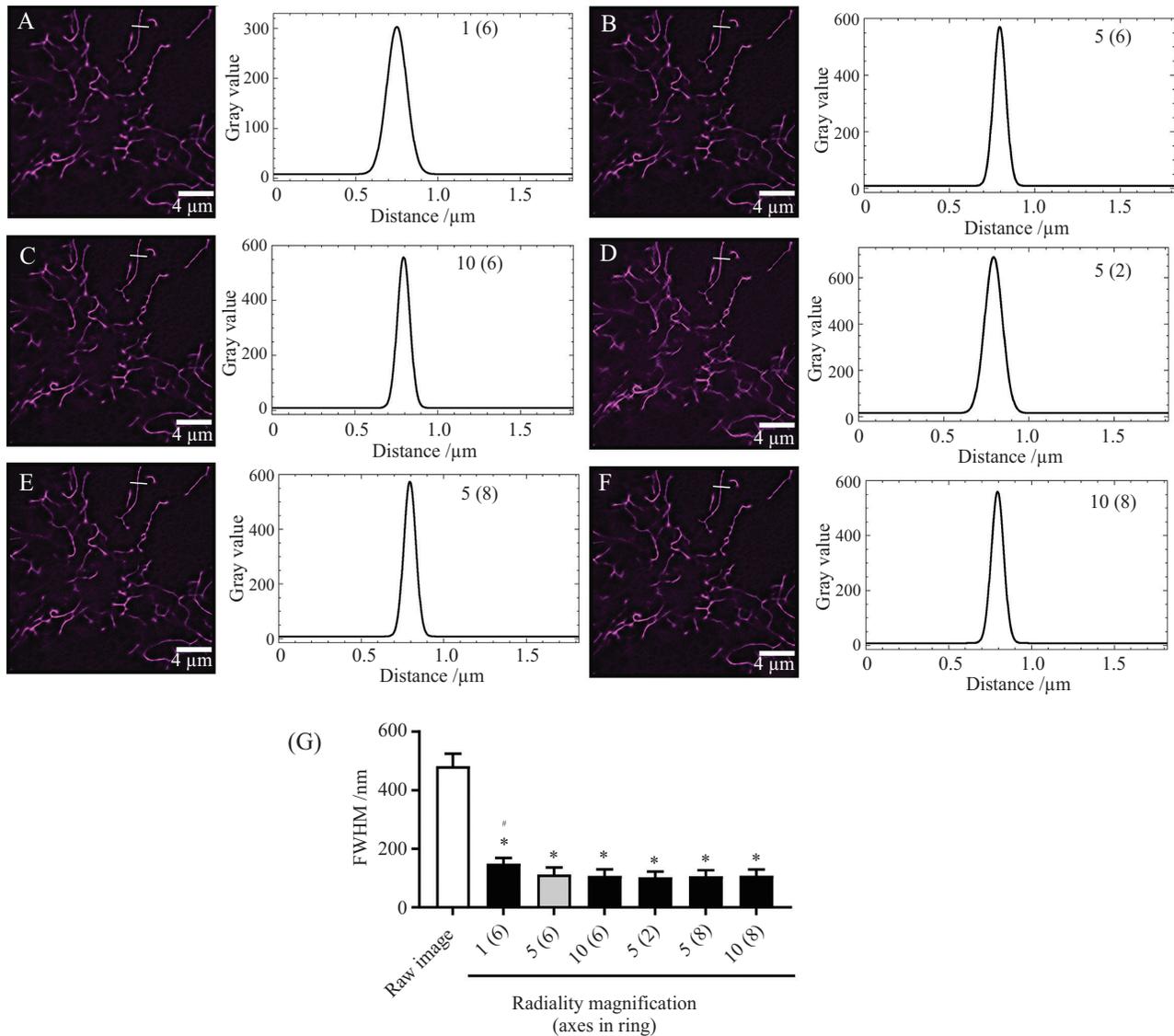
图2 不同环半径参数下NanoJ-SRRF生成线粒体SRRF图像的误差图比较

Fig.2 Comparison of the error maps of mitochondria SRRF images in different ring radius in NanoJ-SRRF

SRRF”校正与默认方法效果相当。上述发现为优化SRRF参数提供了循证依据,有助于在活细胞中实现伪影最小化的可靠线粒体动力学纳米级观察。

具体而言,较小的环半径(0.1~1.0)是实现高分辨率(FWHM<200 nm)和最少伪影的关键,该结论通过SQUIRREL指标(RSP>0.92, RSE<380)得到量化验证。这一结果与多项前期关于线粒体SRRF的研究相符——这些研究同样采用小环半径(通常为0.5)以解析亚衍射结构。例如, VENKATACHALAPATHY等<sup>[11]</sup>

采用0.5环半径,在Mito-FAST标记的活Neuro-2a细胞中实现了约130 nm的分辨率; QIN等<sup>[24]</sup>应用类似半径的TRAC模式,结合MitoTracker Deep Red标记,以约80 nm分辨率捕捉了线粒体动态。然而,这些研究多依赖默认或经验性参数调整,缺乏系统性优化<sup>[14,25-26]</sup>。本研究提供的定量证据表明,环半径超过1.5会显著降低分辨率并增加误差,进一步强调了参数精确控制的必要性。此外,我们发现TRA模式在最小化线粒体网络伪影方面优于TRAC模式,这与部分文献中TRAC用于



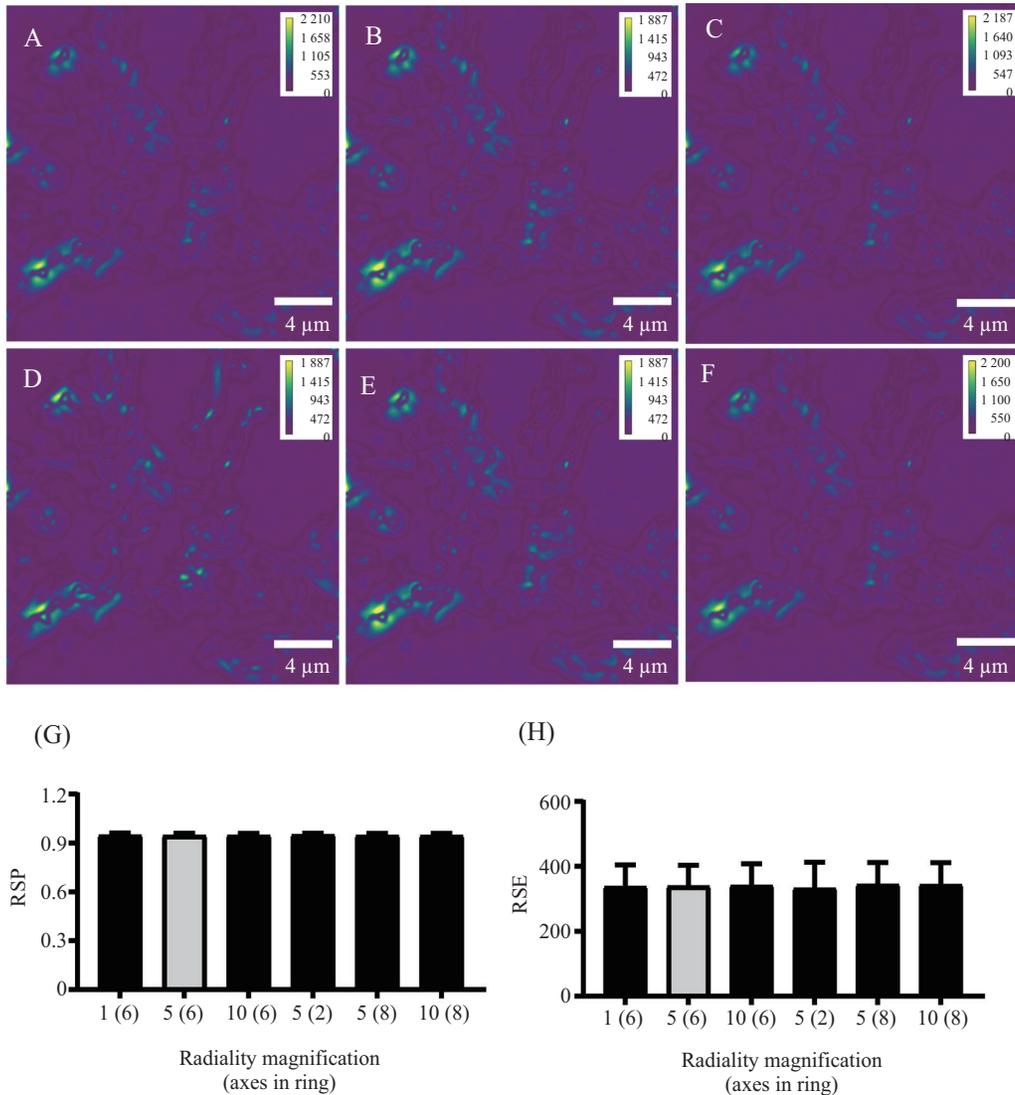
线粒体标记及图像采集条件同图1, 分辨率评估方式亦同。A~F: 不同径向放大倍数(1、5、10)与环内轴数(2、6、8)组合下生成的SRRF图像及其分辨率; G: SRRF图像分辨率的统计分析。数据以平均值 $\pm$ 标准差表示( $n=5$ )。\* $P<0.05$ , 与原始图像组相比; # $P<0.05$ , 与其他参数组合相比。Mitochondrial labeling and image acquisition conditions were maintained as described in Fig.1, with an identical approach applied for resolution assessment. A-F: super-resolution images produced by NanoJ-SRRF using different radially magnification (1, 5 and 10) and axes in ring (2, 6 and 8), and their respective resolutions; G: statistical analysis of the resolution of SRRF images. Data are expressed as the  $\bar{x}\pm s$  ( $n=5$ ). \* $P<0.05$  compared with the raw image group; # $P<0.05$  compared to other parameter combinations.

图3 不同径向放大倍数与环内轴数条件下NanoJ-SRRF重建HeLa细胞线粒体图像分辨率的比较  
Fig.3 Comparison of the resolution of mitochondria images reconstructed by NanoJ-SRRF using different radially magnification and axes in ring in HeLa cells

高时间分辨率动态成像的报道有所不同<sup>[27]</sup>。这种差异可能源于线粒体标记密度、动力学特性或具体成像条件的不同。

与SRRF在微管蛋白成像中的应用<sup>[21]</sup>相比, 本研究针对线粒体所推荐的参数既存在共性, 也具有差异。两者均适用于小环半径( $\leq 1.0$ )和TRA模式, 但线粒体对环半径增大表现出更高的敏感性, 这可能与其更为动态的结构特性有关。梯度加权在两种体

系成像中均会严重降低图像保真度, 因此应避免使用。“移除正约束”与“重归一化”等参数在两类样本中同样导致分辨率下降, 进一步证实它们在活细胞SRRF成像中普遍不适用。这些跨结构的一致性结果验证了基于双指标(FWHM+SQUIRREL)优化框架的稳健性, 也表明了核心参数(如小环半径、TRA模式、避免梯度加权)在细胞骨架与细胞器成像中具有较广泛的适用性。



误差图由NanoJ-SQUIRREL生成,其表示方法与图2相同。A~F:不同径向放大倍数(1、5、10)与环内轴数(2、6、8)组合下生成的超分辨率图像所对应的SQUIRREL重建误差图;G、H:RSP与RSE的统计分析。数据以平均值 $\pm$ 标准差表示( $n=5$ )。

The error map was generated by NanoJ-SQUIRREL, using the same representation method as in Fig.2. A-F: the reconstructed SQUIRREL error maps from super-resolution images using different radiality magnification (1, 5 and 10) and axes in ring (2, 6 and 8) in NanoJ-SRRF; G,H: statistical analysis of RSP and RSE. Data are expressed as the  $\bar{x} \pm s$  ( $n=5$ ).

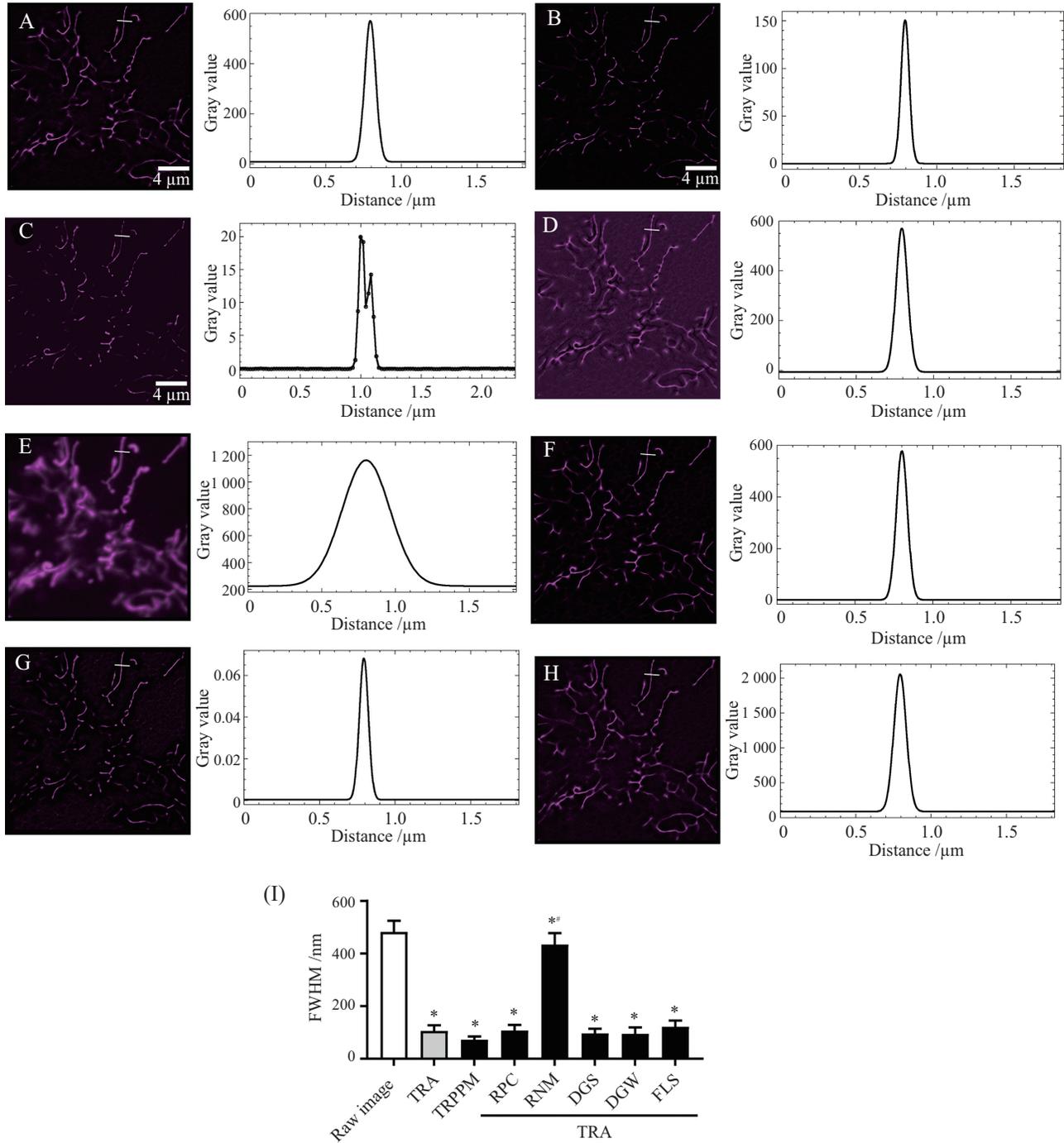
图4 不同径向放大倍数与环内轴数条件下线粒体SRRF图像误差图的比较

Fig.4 Comparison of the error maps of mitochondria SRRF images reconstructed by NanoJ-SRRF using different radiality magnification and axes in ring

相比之下,肌动蛋白SRRF成像因其更高的标记密度与更强的动态特性,通常需要更严格的参数设置。例如,在LifeAct-GFP标记的活细胞研究中常采用更小的环半径( $\leq 0.5$ ),以防止相邻细丝融合。在捕捉快速的肌动蛋白聚合动力学( $>1 \mu\text{m}/\text{min}$ )时,多优选TRAC模式<sup>[13,27-28]</sup>。本研究优化的线粒体成像参数(适用于中等动态性与标记密度)更接近微管蛋白而非肌动蛋白的成像条件,尤其在TRA模式的选择与对半径 $\leq 1.0$ 的耐受性方面。参数选择需依具体结构而定:线粒体成像需权衡低光毒性与分辨率-保真

度之间的平衡;肌动蛋白成像则需要更高的时间分辨率与更精细的空间采样;微管蛋白成像则适用于中等参数设置。这进一步凸显了在定量指标指导下开展结构特异性参数优化的重要性。

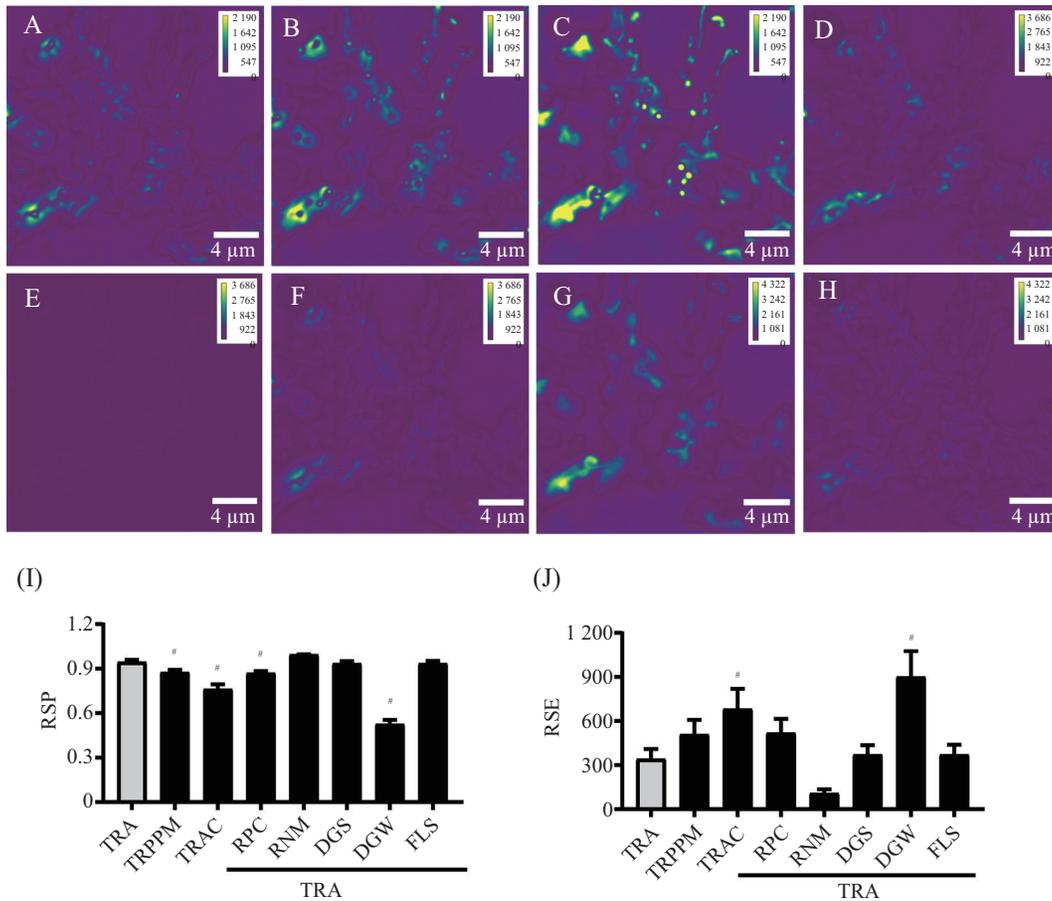
本研究结果与NanoJ User Manual v1.1R0中的参数推荐既有一致之处,也存在差异(图7)。手册中默认环半径为0.5,本研究发现0.1~1.0范围内均可实现超衍射极限分辨率,与手册建议一致,说明小环半径在多种结构中具有普适性。在时序分析模式上,手册默认推荐TRPPM,但本研究发现TRA在线粒体



线粒体标记及图像采集条件同图1, 分辨率评估方式亦同。A: 时序径向性平均法(TRA); B: 时序径向性成对乘积均值法(TRPPM); C: 时序径向性自校正法(TRA); D: 移除正性约束; E: 重归一化; F: 梯度平滑; G: 梯度加权; H: 快速线性化SRRF; I: 各方法生成SRRF图像分辨率的统计分析。数据以平均值±标准差表示( $n=5$ )。\* $P<0.05$ , 与原始图像组相比, # $P<0.05$ , 与环半径0.5的SRRF图像组相比。

Mitochondrial labeling and image acquisition conditions were maintained as described in Fig. 1, with an identical approach applied for resolution assessment. A: SRRF image using TRA (temporal radiality average) and its resolution; B: SRRF image using TRPPM (temporal radiality pairwise product mean) and its resolution; C: SRRF image using TRAC (temporal radiality auto-correction) and its resolution; D: SRRF image using 'remove positivity constraint' and its resolution; E: SRRF image using 'renormalize' and its resolution; F: SRRF image using 'do gradient smoothing' and its resolution; G: SRRF image using 'do gradient weighting' and its resolution; H: SRRF image using fast linearise SRRF and its resolution; I: statistical analysis of the resolution of SRRF images. Data are expressed as the  $\bar{x} \pm s$  ( $n=5$ ). \* $P<0.05$  compared with the raw image. # $P<0.05$  compared with the SRRF image using ring radius 0.5.

图5 不同时序分析、径向性计算、加权方式及校正方法对NanoJ-SRRF重建HeLa细胞线粒体图像分辨率的影响  
 Fig.5 Comparison of the resolution of mitochondria images reconstructed by NanoJ-SRRF using different temporal analysis, radially, weighting and corrections in HeLa cells



误差图由NanoJ-SQUIRREL生成, 其表示方法与图2相同。A: TRA法; B: TRPPM法; C: 时序径向性自校正法(TRAC); D: 移除正性约束; E: 重归一化; F: 梯度平滑; G: 梯度加权; H: 快速线性化SRRF; I: SRRF图像分辨率统计; J: RSP统计; K: RSE统计。数据以平均值±标准差表示( $n=5$ )。\* $P<0.05$ 表示与采用TRA方法生成的SRRF图像相比。

The error map was generated by NanoJ-SQUIRREL, using the same representation method as in Fig.2. A: SRRF image using TRA (temporal radiality average) and its resolution; B: SRRF image using TRPPM (temporal radiality pairwise product mean) and its resolution; C: SRRF image using TRAS (temporal radiality auto-corrections) and its resolution; D: SRRF image using remove positivity constraint and its resolution; E: SRRF image using re-normalize and its resolution; F: SRRF image using do gradient smoothing and its resolution; G: SRRF image using do gradient weighting and its resolution; H: SRRF image using fast linearise SRRF and its resolution; I: statistical analysis of RSP; J: statistical analysis of RSE. Data are expressed as the  $\bar{x} \pm s$  ( $n=5$ ). \* $P<0.05$  compared with the SRRF image using TPA.

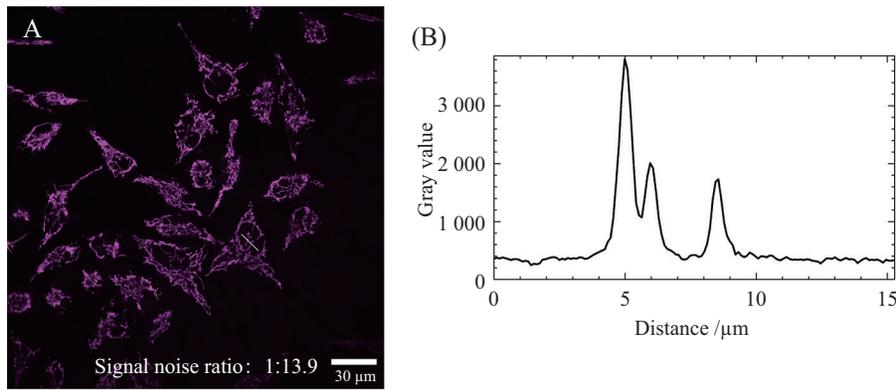
图6 不同时序分析、径向性、加权及校正方法生成线粒体SRRF图像的误差图比较

Fig.6 Comparison of the error maps of mitochondria SRRF images reconstructed by NanoJ-SRRF using different temporal analysis, radially, weighting and corrections

成像中表现更稳定、伪影更少。这一差异可能源于线粒体结构的动态性与标记密度介于“宽场数据”与“中密度闪烁数据”之间, 更适合采用平均类算法以平衡分辨率与保真度。此外, 手册建议在低信噪比条件下启用梯度加权, 但本研究显示梯度加权会显著引入伪影, 这可能与本研究使用的Abberior Live Orange Mito染料标记信噪比较高、结构较粗有关。本研究结果在多数核心参数上验证了手册的适用性, 但在时序分析模式与梯度加权的使用上提出了针对线粒体成像的优化调整。

基于本研究结果, 我们建议在活细胞线粒体

SRRF成像中遵循以下优先级进行参数调整与优化。(1) 首先应优化环半径, 因其是对分辨率与伪影影响最显著的关键参数, 推荐从默认值0.5出发, 在0.1~1.0内进行微调, 以在提升分辨率的同时通过SQUIRREL评估维持结构的保真度。(2) 根据样本的动态特性选择时序分析模式: 对于多数线粒体的缓慢形态变化, 推荐采用时序径向性平均模式(TRA)以获取稳定且伪影较少的重建结果; 如需捕捉快速分裂或融合等高速动态过程, 可尝试使用时序径向性自相关模式(TRAC), 但需注意其可能引入的伪影风险。(3) 避免使用高风险的加权与处理选



线粒体采用Abberior Live Orange Mito染料标记, 原始图像使用奥林巴斯SpinSR10转盘共聚焦显微镜拍摄。A: 原始单帧图像及信噪比。使用ImageJ的Adjust-Threshold功能区分信号和背景, 并用ImageJ的Analyze-Measure功能计算信号和背景的平均灰度; B: 灰度剖面图。在图A线粒体部位画一条线段, 使用ImageJ的Analyze-Plot profile绘制指定线段(剖面线)的灰度值分布。

Mitochondria were labeled with the Abberior Live Orange Mito dye, and the original images were acquired using an Olympus SpinSR10 spinning disk confocal microscope. A: original single-frame image and signal-to-noise assessment. The signal and background were differentiated using the 'Adjust-Threshold' function in ImageJ, and the average grayscale intensities of the signal and background regions were calculated using the 'Analyze-Measure' function in ImageJ; B: grayscale profile plot. A line segment was drawn across a mitochondrial region in image A. The grayscale intensity distribution along this specified line (profile line) was plotted using the 'Analyze-Plot Profile' function in ImageJ.

图7 HeLa细胞线粒体单帧图像信噪比及灰度剖面图

Fig.7 Signal-to-noise assessment of single-frame mitochondria image in HeLa cell and grayscale profile plot

项, 如梯度加权会显著降低图像保真度导致RSP骤降, 而“移除正约束”和“重归一化”通常会引起分辨率下降或背景增强, 非特殊情况不建议启用。(4) 对于影响相对较小的参数, 如径向放大倍数和环内轴数, 可保持默认设置(例如放大倍数5、轴数6); 校正方法中, “快速线性化SRRF”与默认方法效果相近, 可按计算效率需求选择。(5) 参数调整后务必结合定量验证, 使用NanoJ-SQUIRREL计算分辨率尺度皮尔逊相关系数(RSP)与分辨率尺度误差(RSE), 并审视图谱误差, 推荐以RSP>0.90及较低RSE值为标准, 确保重建结果的可靠性。

需要指出的是, 本研究的参数优化结论建立在特定的实验体系内, 包括: HeLa细胞、Abberior Live Orange Mito标记、转盘共聚焦成像、108 nm像素尺寸、20 Hz采集速率与100帧时间序列。尚未验证以下常见但可能影响SRRF性能的场景: 更高数值孔径(NA>1.5)或更低信噪比(SNR)的成像条件; 亚秒级(<1 s)或更长时程(>5 min)的动态成像; 其他线粒体荧光探针(如Mito-Tracker、GFP标记蛋白)或细胞类型; 与膨胀显微镜(ExM)、TIRF或宽场成像模式的结合使用。未来可在上述拓展条件下进一步验证与调整参数, 以建立更具普适性的SRRF成像指南。

此外, 本研究采用的FWHM与NanoJ-SQUIRREL(RSP/RSE)主要评估图像的分辨率提升

及其与原始宽场图像的一致性, 并不能完全验证SRRF重建中线粒体亚结构的“真实性”。线粒体直径约为200~300 nm, 恰处于衍射极限与SRRF分辨能力的交界区域, 算法在该尺度下易因过拟合产生虚假结构(如断裂或假峭)。因此, 本研究所提供的参数优化方案, 主要是在分辨率-保真度权衡框架下, 基于现有评估体系得出的相对最优解。未来仍需借助具备更高空间分辨率和结构验证能力的成像技术(如STED、SIM/iSIM), 在同一细胞、同一时间点进行正对照成像, 并通过结构相似度或Jaccard指数等指标进一步确认SRRF重建结果的结构真实性。

SRRF的性能高度依赖于原始图像的信噪比(SNR)与标记密度。根据NanoJ-SRRF手册, 在低SNR条件下, 环半径过小可能导致噪声被误识别为径向信号, 从而引入伪影; 而在高标记密度下, 过小的环半径可能造成相邻结构的信号重叠, 降低分辨率。此外, 时序分析模式(如TRA与TRAC)对信号稳定性和波动频率的敏感度不同, TRAC更适合高动态样本, 但在SNR较低时易出现双峰伪影。因此, 在实际应用中, 若SNR低于本研究条件(如<10), 建议适当增大环半径(如0.8~1.2)并优先使用TRA模式。未来可在更宽范围的SNR与标记密度条件下系统性验证参数鲁棒性, 以拓展本优化方案的适用边界。此外, 虽然本研究采用5 s/帧(20 Hz)的采集速

率以平衡信噪比与分辨率,但在对时间分辨率要求更高的动态过程中(如线粒体快速分裂),可尝试将采集速率提升至0.5 s/帧(2 Hz),但可能伴随信噪比下降。

## 4 结论

本研究在转盘共聚焦成像、Abberior Live Orange Mito标记、108 nm像素尺寸、20 Hz采集100帧时间序列的成像体系下,提出了系统、定量的NanoJ-SRRF参数优化建议。研究确认小环半径(0.1~1.0)是突破衍射极限的关键因素,而TRA模式可确保重建结果无显著伪影。径向放大倍数与环内轴数等参数影响较小,梯度加权则会显著降低图像质量。这些发现不仅有助于实现线粒体动力学的可靠纳米级可视化,也体现了我们所建立的双指标优化框架在多种细胞结构成像中的广泛适用价值。通过推动基于实证数据的参数选择策略,本研究有望促进SRRF技术在活细胞超分辨率成像中的更广泛应用,并确保最大限度地减少伪影干扰。

## 参考文献 (References)

- [1] VALLI J, SANDERSON J. Super-resolution fluorescence microscopy methods for assessing mouse biology [J]. *Curr Protoc*, 2021, 1: e224.
- [2] KLAR T A, HELL S W. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy [J]. *Opt Lett*, 1999, 24: 954-6.
- [3] HEIN B, WILLIG K I, HELL S W. Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2008, 105: 14271-6.
- [4] RUST M J, BATES M, ZHUANG X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. *Nat Methods*, 2006, 3: 793-5.
- [5] HESS S T, GIRIRAJAN T P K, MASON M D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy [J]. *Biophys J*, 2006, 91: 4258-72.
- [6] PATTERSON G, DAVIDSON M, MANLEY S, et al. Superresolution imaging using single-molecule localization [J]. *Annu Rev Phys Chem*, 2010, 61: 345-67.
- [7] GUSTAFSSON M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy: short communication [J]. *J Microsc*, 2006, 198: 82-7.
- [8] DERTINGER T, COLYER R, IYER G, et al. Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 22287-92.
- [9] COX S, ROSTEN E, MONYPENNY J, et al. Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics [J]. *Nat Methods*, 2012, 9: 195-200.
- [10] GUSTAFSSON N, CULLEY S, ASHDOWN G, et al. Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12471.
- [11] VENKATACHALAPATHY M, BELAPURKAR V, JOSE M, et al. Live cell super resolution imaging by radial fluctuations using fluorogen binding tags [J]. *Nanoscale*, 2019, 11: 3626-32.
- [12] FANG S, LIU L, YANG D, et al. Super-resolution radial fluctuations (SRRF): a versatile and accessible tool for live-cell nanoscopy [J]. *Histochem Cell Biol*, 2025, 163: 67.
- [13] CULLEY S, TOSHEVA K L, MATOS PEREIRA P, et al. SRRF: universal live-cell super-resolution microscopy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 101: 74-9.
- [14] HAN Y, LU X, ZHANG Z, et al. Ultra-fast, universal super-resolution radial fluctuations (SRRF) algorithm for live-cell super-resolution microscopy [J]. *Opt Express*, 2019, 27: 38337.
- [15] GARG R, ANJUM F, SALAM A, et al. Tracking the super resolved structure of mitochondria using red emissive carbon nanodots as a fluorescent biomarker [J]. *Chem Commun*, 2023, 59: 13454-7.
- [16] LAINE R F, HEIL H S, COELHO S, et al. High-fidelity 3D live-cell nanoscopy through data-driven enhanced super-resolution radial fluctuation [J]. *Nat Methods*, 2023, 20: 1949-56.
- [17] WANG B, YAO L, JING Y, et al. Multicomposite super-resolution microscopy: enhanced airyscan resolution with radial fluctuation and sample expansions [J]. *J Biophotonics*, 2020, 13: e201960211.
- [18] JAKOBS S, WURM C A. Super-resolution microscopy of mitochondria [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2014, 20: 9-15.
- [19] JAKOBS S, STEPHAN T, ILGEN P, et al. Light microscopy of mitochondria at the nanoscale [J]. *Annu Rev Biophys*, 2020, 49: 289-308.
- [20] LANDONI J C, KLEELE T, WINTER J, et al. Mitochondrial structure, dynamics, and physiology: light microscopy to disentangle the network [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2024, 40: 219-40.
- [21] FANG S, LIU L, YANG D, et al. Parameter optimization of NanoJ-SRRF for live-cell microtubule imaging [J]. *BioTechniques*, 2025, doi: 10.1080/07366205.2025.2534301.
- [22] CULLEY S, ALBRECHT D, JACOBS C, et al. Quantitative mapping and minimization of super-resolution optical imaging artifacts [J]. *Nat Methods*, 2018, 15(4): 263-6.
- [23] LI M, HUANG Z L. Rethinking resolution estimation in fluorescence microscopy: from theoretical resolution criteria to super-resolution microscopy [J]. *Sci China Life Sci*, 2020, 63: 1776-85.
- [24] QIN G, GUAN X, MAO J, et al. Nanosilver-enhanced far-field fluorescence fluctuations for super-resolution microscopy [J]. *Nano Lett*, 2024, 24: 15186-94.
- [25] CHEN R, TANG X, ZHAO Y, et al. Single-frame deep-learning super-resolution microscopy for intracellular dynamics imaging [J]. *Nat Commun*, 2023, 14: 2854.
- [26] GARG R, ANJUM F, SALAM A, et al. Tracking the super resolved structure of mitochondria using red emissive carbon nanodots as a fluorescent biomarker [J]. *Chem Commun*, 2023, 59: 13454-7.
- [27] SALSMAN J, DELLAIRE G. Super-resolution radial fluctuations (SRRF) microscopy [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2440: 225-51.
- [28] CHEN J, FANG Q, HUANG L, et al. Deep-learning accelerated super-resolution radial fluctuations (SRRF) enables real-time live cell imaging [J]. *Opt Lasers Eng*, 2024, 172: 107840.