

단일분자 위치측정을 이용한 초해상도 형광 현미경법

Super-resolution Fluorescence Microscopy Based on Single-molecule Localization

심상희 | Sang-Hee Shim

Department of Chemistry, Korea University, 145 Anam-ro, Seongbuk-gu, Seoul 02841, Korea
E-mail: sangheeshim@korea.ac.kr

1. 서론

광학현미경은 생체의 미시세계를 직접 관찰할 수 있게 해주어 현대 생물학을 발전시키는 원동력이 되어왔다. 이 중 형광 현미경은 복잡한 구성의 생체 내에서 특정 물질을 선택적으로 가시화할 수 있어 현대 생물학의 필수 도구가 되었다. 형광물질은 흡수광과 다른 파장의 빛을 방출하기 때문에, 방출빛만을 선택적으로 검출함으로써, 높은 감도로 특정 분자만을 선택적으로 볼 수 있게 해준다. 밝은 형광물질과 초고감도 카메라를 사용하면 단일 분자까지 관찰이 가능하다.

단일 분자는 가시광의 회절 무늬보다 훨씬 작기 때문에, 단일 분자의 이미지는 광학적 회절현상으로 결정되어 수백 나노미터의 회절 무늬를 가지게 된다. 이러한 광학적 해상도 한계는 19세기 물리학자 아베에 의해 정립된 이래, 깨어질 수 없는 절대적 법칙으로 믿어져 왔으나, 2000년대 초반부터 형광 분자 고유의 화학적 성질을 이용하여 다양한 방법으로 극복되어 왔으며, 이러한 방법들을 통틀어 초해상도 형광현미경법(super-resolution fluorescence microscopy)라 부른다. 여러 초해상도 형광현미경법 중에 한 주류는 형광 분자들을 임의로 끄고 켜는 방법을 활용하여 분자들을 시간 축상에서 분리함으로써, 분해능 한계를 극복한다. 이러한 방법은 2006년에 STORM(stochastic reconstruction microscopy)² 또는 (F)PALM((fluorescence) photoactivation light microscopy)^{3,4}의 이름으로 동시에 소개되었다.

단일분자 분광학(single molecule spectroscopy)에서 사용되는 다양한 기술을 접목할 수 있고, 비교적 단순한 광학 설비로 높은 해상도(10-20 nm)를 얻을 수 있는 장점 때문에, 신속히 상용화되고 장비가 보급되어 새로운 생물학적 발견들을 낳아내고 있다. 이번 총설을 통하여 단일 분자를 바탕으로 하는 초고해상도 현미경의 원리와 다양한 기능 및 가능성을 소개하고자 한다.

2. 본론

2.1 단일 분자의 초정밀 위치 측정

모든 생물학적 구조는 이를 이루는 각각의 분자들의 위치로 결정된다. 따라서 형광물질로 표시된 구조는 각

Author



심상희

1999 서울대학교 화학과 (학사)
2001 서울대학교 화학과 (석사)
2008 University of Wisconsin-Madison (박사)
2008-2013 Harvard University (박사후 연구원)
2013-2016 울산과학기술원 생명과학부 생명공학과 조교수
2016-현재 고려대학교 화학과 조교수

형광분자의 위치로 결정할 수 있다. 그러므로 형광분자들의 위치를 모두 정확하게 알 수 있다면, 높은 해상도의 이미지를 얻을 수 있을 것이다. 그렇다면 각각의 형광 분자들의 위치를 어떻게 측정할 수 있을까?

한 개의 형광분자에서 방출된 광자들은 사방으로 퍼져나간다. 대물렌즈에 도달한 광자들은 튜브 렌즈에 의해 모인다. 렌즈의 초점면에서 광자들은 무한히 작은 점으로 모이지 않고 빛의 회절 현상 때문에 유한한 크기의 원형의 회절무늬를 형성한다. 회절무늬의 크기는 빛의 파장에 비례하고 대물렌즈의 조리개수에 반비례한다. 가시광선의 파장은 400-700 nm이므로 높은 조리개수의 대물렌즈를 사용할 때, 회절무늬의 측면(대물렌즈의 수직면)의 폭은 ~200 nm, 대물렌즈의 축방향 폭은 ~500 nm에 달한다. 이러한 회절무늬의 크기는 광학현미경의 분해능을 수백 나노미터로 결정하는 주요원인이다.

그런데 이를 뒤집어 생각해 보면 한 현미경에서 얻은 모든 형광분자의 이미지는 모두 같은 모양, 같은 폭을 가지게 된다. 따라서 단일 분자들의 이미지에 알려진 회절무늬의 모양을 맞추어 보면 분자의 중심 위치를 정확하게 측정할 수 있다. N개의 광자의 이미지는 분자의 중심 위치를 N번 측정하는 셈이며, 한 개의 광자로 측정할 때마다 회절무늬 폭만큼의 부정확도가 있다고 생각할 수 있다. 따라서 위치 측정의 정확도는 $\sigma/\sqrt{N}$ (σ : 회절무늬의 폭)으로 대략 나타낼 수 있다.⁵ 따라서 많은 수의 광자를 방출하는 분자의 중심 위치는 회절 한계보다 훨씬 높은 정확도로 알아낼 수 있다.

이러한 원리는 다양한 생물리 실험에 적용되며, 밝은 형광 입자의 경우 ~1 Å까지 정확도를 얻을 수 있다.⁶ 또한, 상온의 수용액 상에서 단일 형광 분자의 위치를 나노미터의 정확도로 측정할 수 있다.⁷ 그러나 여러 개의 분자가 가까이 위치하여 그 이미지가 겹치기 시작하면 위치 측정이 부정확해진다. 적은 수의 분자의 이미지가 겹칠 경우, 분자들의 흡수/방출 스펙트럼을 이용하여 분리하거나^{8,9} photobleaching/photoblinking

을 이용하여 시간 영역으로 분리할 수 있다.^{10,11} 그러나 가까이 자리한 분자의 수가 너무 많아지게 되면 이마저도 불가능해지게 된다.

2.2 확률적 스위칭을 통하여 회절 한계를 극복하다

대부분의 생체 샘플에는 수천 수만 개의 형광분자들이 높은 밀도로 모여있기 때문에 앞서 소개한 단일분자 위치 측정법만으로는 분석할 수 없다. 그러나 만일 이 수많은 분자들의 형광을 대부분 끈 후, 이미지들이 겹치지 않을 정도의 소수의 분자들만 형광을 켜 수 있다면, 이들의 위치를 정확하게 알 수 있을 것이다. 위치를 측정한 분자들의 형광을 끄고, 새로운 분자들을 비슷한 양만큼 켜서 위치를 측정하면 새로운 위치값들을 추가로 얻을 수 있다. 분자들을 끄고 켜면서 정확하게 그 위치를 측정하는 과정을 계속 반복하여 모든 분자들의 위치를 알아내면, 전체 구조를 높은 정확도로 재현할 수 있다 (그림 1A). 이처럼 많은 수의 형광분자들을 공간이 아니라 시간으로 분리한 후 그 위치를 정확하게 측정하여 구조를 재현하는 방법은 동시에 3개의 연구실에서 소개되어 STORM,² PALM³ 또는 FPALM⁴이라 명명되었다. 이들은 빛에 의하여 켜고 켜 수 있는 유기 염료나 형광 단백질을 사용하여 초고 해상도 형광 현미경법을 구현하였다. 이러한 광스위칭이 가능한 형광물질들은 형광을 일으키는 빛의 세기가 강하면 이에 의하여 꺼지며, 이 빛과 다른 파장의 빛에 의하여 꺼진 상태에서부터 형광상태로 활성화 된다. 형광이 꺼지는 확률은 형광을 일으키는 들뜸(excitation) 빛의 세기에 비례하고, 형광이 활성화되는 확률은 활성화(activation) 빛의 세기에 비례하며, 스위칭의 모든 과정은 확률에 비례하여 임의로 일어난다. 임의적 확률적 과정에 의하여 시간상으로 분리된 분자들의 위치를 종합하여 구조를 재현하기 때문에 이 글에서는 이러한 방법들을 통틀어 STORM(stochastic reconstruction microscopy)이라고 부르겠다.

STORM 이미지의 해상도는 광스위칭을 일으키는 형광물질의 밝기에 의하여 결정된다. 앞서 단일분자 위치측정에서 언급했듯이, 형광물질이 켜진 후 꺼질 때까지 탐지한 광자의 숫자가 위치 측정의 정확도를 결정하기 때문이다. 여러 광스위칭을 일으키는 형광물질 중 Cy5나 Alexa647과 같은 밝은 유기 염료는 수천 개의 광자를 방출하며, 형광단백질들은 대개 수백 개의 광자를 방출한다. 이러한 광자수는 이론적으로 회절 한계보다 해상도를 수십~수백 배 향상시킬 수 있으며, 실험적으로는 Alexa647를 통해 ~20 nm의 해상도가 실현되었다.²

2.3 형광 탐침

STORM 이미지에 사용될 수 있는 형광탐침은 아래와 같은 조건들을 충족하여야 한다. 첫째, STORM 탐침은 특정 파장대의 형광빛을 방출하지 않는 꺼진 상태를 가져야 한다. 이

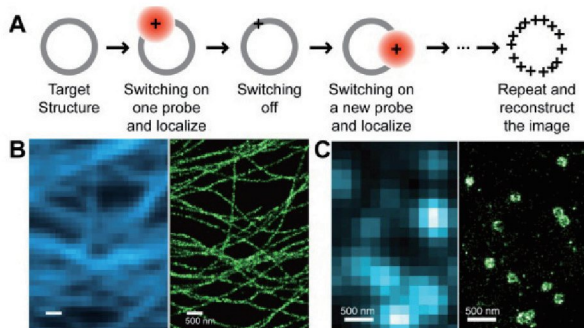


그림 1. STORM의 기본원리: (A) STORM 기본원리의 모식도, (B) 세포내 미세관의 STORM 이미지(우측)와 같은 대상의 일반적인 형광 이미지, (좌측),¹⁰ (C) 세포내 클라트린 피막 홀(clathrin-coated pits)의 STORM 이미지(우측)와 같은 대상의 일반적인 형광 이미지.¹⁸

꺼진 상태는 보통 화학구조가 변하거나 일시적으로 전자 상태가 변화된 상태이다. 둘째, 높은 해상도를 얻기 위해서는 앞서 언급했듯 켜진 후 꺼질 때까지 많은 수의 광자를 방출하여야 한다. 셋째, 정확한 위치 측정을 위해서 회절 한계 면적 내에 단 한 개의 분자만 켜져 있어야 하므로 대다수의 분자들은 꺼진 상태에 있어야 한다. 특히, 광스위칭이 가능한 대다수의 형광물질들은 열에너지나 들뜸 빛에 의하여 자발적인 활성화를 일으켜 형광이 켜진 상태로 되돌아갈 수 있기 때문에, 활성화빛이 없는 상태에서 일정량의 분자들이 켜져 있게 된다. 이러한 자발적 활성화의 확률이 작을수록 좋은 STORM 탐침이 된다. 이러한 필수조건들과 더불어, 동영상 만들 경우에는 스위칭이 일어나는 횟수도 중요하다. 한 개의 탐침이 많은 횟수의 스위칭 과정을 거칠 수 있으면, 그만큼 동영상을 이루는 이미지의 갯수도 늘어나기 때문이다.

이러한 조건들을 충족시키는 탐침들이 유기 염료부터 형광 단백질까지 다양하게 개발되어 있다.¹ 형광 단백질들은 생체 내의 단백질을 유전적으로 표지하여 살아 있는 세포에서 발현할 수 있다는 장점이 있다. 그러나, 형광 단백질들은 방출 광자수가 적기 때문에 해상도가 낮은 편이다. 유기 형광 물질은 대개 밝고 안정하며, 단백질 외에도 핵산, 당류, 지질, 약물 등의 작은 분자들을 표지할 수 있다. 항체를 사용하면 유기염료로 생체 내 단백질을 표지할 수 있다. 그러나, 항체의 크기가 10-15 nm에 달하기 때문에 STORM 이미지 속 구

조의 크기가 인공적으로 늘어날 수 있고 살아 있는 세포를 표지하기 어렵다는 단점이 있다. SNAP, trimethoprin 등의 유전적으로 발현할 수 있는 꼬리표(tag) 단백질을 이용하면 살아있는 세포에 존재하는 특정 단백질을 유기염료로 표지하여 STORM 이미지를 얻을 수 있다.^{12,13}

2.4 다색 이미징

STORM 탐침들은 다양한 스펙트럼에 걸쳐 개발되어 있으므로(그림 2A), 이들을 조합하여 다색 이미지를 얻을 수 있다. 스펙트럼이 겹치지 않는 형광물질들을 조합하면 색간의 혼선이 거의 없는 다색 이미지를 4가지 색까지 얻을 수 있다(그림 2B).¹⁴ 또한, 스펙트럼이 겹치는 탐침들을 섞어 놓아도 단일 분자의 스펙트럼은 구별할 수 있으므로 그 신원을 알 수 있다.¹² 이러한 방법을 통하면 색간의 혼선이 있을 수 있지만, 하나의 광원을 사용하여 고정된 셀에서는 4가지 색,¹² 살아 있는 세포에서는 3가지 색¹⁵까지 구분할 수 있다. 또는, 스펙트럼이 겹치는 형광물질들도 프리즘을 분광계로 활용하여 단일 분자의 스펙트럼을 측정함으로써, 단일 광원을 사용하고 스펙트럼 간격이 10 nm 밖에 되지 않는 형광체를 구분하여 4색 이미지를 얻을 수 있다(그림 2B).¹⁷

한 가지 탐침으로 모든 색의 이미지를 얻되, 이 탐침을 여러 색의 활성화 분자와 함께 표지한 후, 활성화 분자에 최적화된 활성화 빛을 사용하여 색을 구분하는 방법도 있다.¹⁶

2.5 3차원 이미징

3차원 STORM 이미지는 각 분자의 위치를 3차원으로 측정함으로써 얻을 수 있다. 지금까지 카메라 상의 2차원 중심 위치를 측정하여 2차원 이미지를 얻었으므로, 대물렌즈의 축 방향의 위치를 알아낼 수 있는 방법을 고안하면 3차원 이미지를 얻을 수 있다.

최초의 3차원 STORM 기술은 카메라 앞에 원통형 렌즈를 끼워넣어 비점수차(astigmatism)를 이용하는 방법을 사용하였다(그림 3A).¹⁸ 이러한 방법을 사용하면 단분자의 축상 위치에 따라 가로 또는 세로로 긴 타원형으로 그 이미지의 모양이 변한다. 따라서, 이 타원형 이미지의 모양으로부터 축 방향 위치를 얻어 3차원 위치를 결정할 수 있다. 이 방법으로 측면으로는 20 nm, 축상으로는 50 nm 정도의 해상도를 얻을 수 있다(그림 3B). 비점수차 방법에 두 개의 대물렌즈를 결합하여 광자의 숫자를 두 배로 늘리면 해상도를 측면 9 nm, 축방향 18 nm까지 향상시킬 수 있다.¹⁹ 단분자의 이미지 모양을 변화시켜 축상 위치를 결정하는 다른 방법들로는 두 개의 초점면을 사용하거나,²⁰ 나선형으로 이미지를 변형시키거나,²¹ 거울로 축방향 이미지를 측면으로 반사시키는 방법²² 등이 있다.

3차원 이미지를 얻는 가장 해상도가 높은 방법은 두 개의

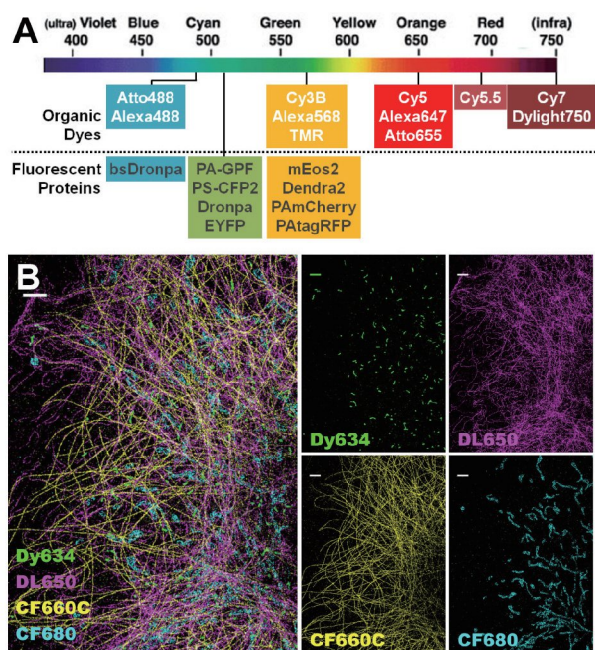


그림 2. STORM에 사용되는 광스위칭 형광물질: (A) 가시광선 전 영역대의 파장별 유기 형광 물질과 형광 단백질, (B) 4가지 스펙트럼이 겹치는 유기 형광물질을 이용한 4색 이미지.¹⁷ 과산화소체는 Dy634(녹색), 비멘틴은 DL650(자주색), 미세관은 CF660C(황색), 미토콘드리아는 CF680(청록색)으로 표지하였다. 좌면 우면의 이미지 모두 동일 세포의 동일 영역의 이미지이다.

정반대 방향으로 놓인 대물렌즈에서 얻은 이미지들의 간섭(interferometry) 현상을 이용하는 것이다.²² 각 분자의 위치에 따라 두 대물렌즈를 통과한 경로의 길이가 달라지므로 그 간섭된 빛의 세기가 달라지는 것을 관찰하여 축방향 위치를 결정한다. 이러한 방법을 사용하면 광자수가 적은 형광단백질에서도 10 nm의 축상해상도를 얻을 수 있다.

STORM은 높은 조리개수의 대물렌즈를 사용하여 한 초점면의 두께가 600 nm 정도이다. 수 마이크론의 세포 전체를 아우르려면 대물렌즈를 여러 축방향 위치에 놓고 각 초점면에서 얻은 이미지를 쌓아 세포 전체의 이미지를 얻을 수 있다.²⁴ 이보다 두꺼운 샘플은 빛의 산란, 구면수차, 샘플의 자가 형광 때문에 위치측정의 정확도가 떨어진다. 이를 극복하기 위해서 이광자흡수 활성화를 이용하거나, 얇은 편상으로 모양을 만든 들뜸 빛을 형광의 탐지각과 수직 입사시키면 수-수십 마이크론 이상 두께의 샘플에서 3D STORM 이미지를 얻을 수 있다.^{25,26}

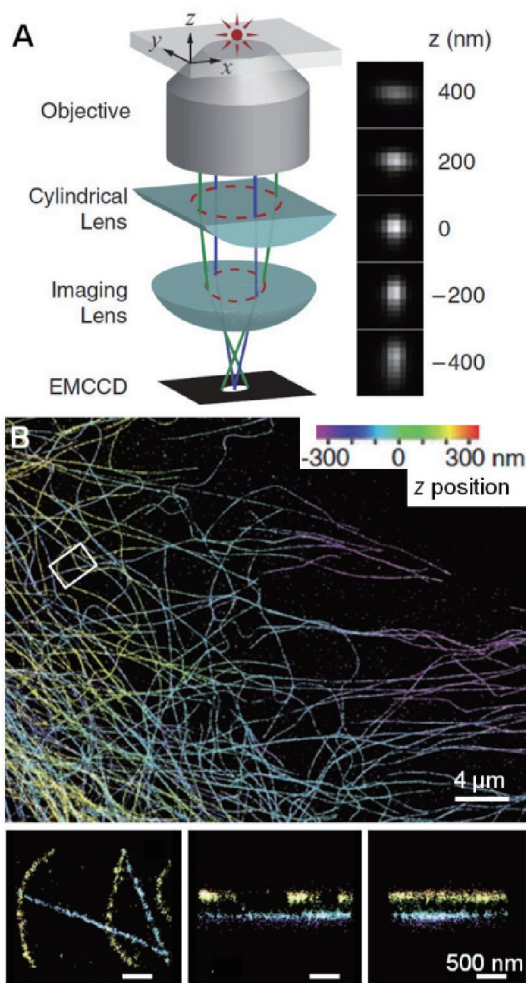


그림 3. 3차원 STORM: (A) 난시를 이용한 3차원 현미경의 개요(좌)와 다양한 z축 위치에 따른 단분자 이미지의 변화(우), (B) 세포내 미세관의 3차원 이미지.¹⁸

2.6 살아있는 세포의 이미징

초고해상도 형광현미경법의 차별화된 장점은 살아있는 세포에서도 특정 분자의 초고해상도 이미지를 얻을 수 있다는 것이다. 그런데 STORM에서는 분자들을 시간상으로 분리하여 이미지를 축적하기 때문에 이미징 속도가 느려진다. 정밀한 구조 재현을 위해 충분히 많은 숫자의 위치점을 장기간 동안 축적해야 하므로, 시간과 공간 해상도가 상충된다. 이 때문에 살아있는 포유동물세포 및 박테리아에서 형광단백질을 이용하여 처음 STORM을 구현하였을 때에는 ~60 nm의 공간해상도를 30-60초 내에 얻게 되었다.^{27,28} 이를 향상시키기 위하여 형광단백질 대신에 빠르게 스위칭하는 유기 물질인 Alexa 647을 이용하여 20 nm의 2차원 공간해상도를 0.5초 내에 얻었다.²⁹

시간 해상도를 높일 수 있는 또다른 방법은 단일분자의 이미지가 다소 겹쳐지더라도 수치적으로 분리할 수 있는 분석법을 개발하는 것이다. 이러한 분석법이 있다면, 카메라 프레임 당 보다 많은 숫자의 분자들을 활성화시킬 수 있으므로 보다 짧은 시간 안에 충분한 수의 위치점을 얻을 수 있게 된다. 이러한 분석법으로는 같은 이미지에서 위치측정과 이미지 감산을 반복하거나,^{30,31} 이미지들의 순차적인 정보를 이용하여 앞뒤의 이미지를 빼거나,^{33,32} 전체적으로 분자들의 위치의 확률을 추론하는 방법³⁴이 있다.

다른 초고해상도 현미경법과 차별되는 STORM의 장점 중 하나는 단일 분자가 분리되어 단일자 추적이 용이하다는 점이다. 기존의 추적 실험에서는 분자들의 이미지를 분리하기 위하여 아주 낮은 밀도로 형광표지한다. 그런데 광스위칭이 가능한 탐침을 사용하면, 시간상 분리가 가능하여 형광표지의 밀도한계가 사라진다. 따라서 매우 높은 밀도로 확산 계수의 지도를 얻을 수 있게 된다.³⁵ 이를 이용하여 세포 표면의 지질이나 막단백질의 확산계수의 분포를 시공간으로 분리하여 알아낼 수 있다.

2.7 응용

STORM은 개발된 지 수 년밖에 지나지 않았지만, 다양한 생물학적 시스템에 적용되어 새로운 발견들을 쏟아내고 있다. STORM은 세포생물학 뿐 아니라 면역학, 미생물학, 신경생물학에 걸친 생물학 전반에 다양하게 적용되고 있다.

진핵생물의 단백질 복합체들은 STORM의 기술 개발 단계부터 연구되어 왔다. 일례로 세포가 외부환경에 부착하게 해주는 초점 접착 복합체(focal adhesion complex)가 있다. 복합체의 단백질 구성원들의 위치를 10 nm의 해상도로 측정함으로써(그림 4A), 외부부착-신호전달-힘전달-액틴조절의 여러 기능의 다층 구조로 이루어짐을 분자 수준으로 밝히기도 하였다(그림 4B).³⁶

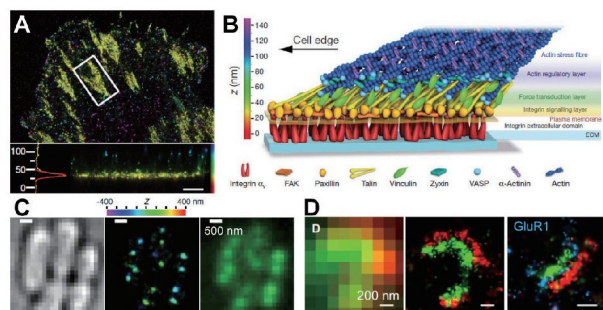


그림 4. STORM 이미징의 응용: (A-B) 세포 바닥의 인테그린 단백질 기반의 초점 점착 복합체의 구조, (C) 대장균(좌) 내 뉴클리오이드 관련 단백질인 H-NS의 초고해상도 이미지(중)와 일반 형광이미지(우), (D) 뇌조직의 시냅스 구조. 시냅스 전/후를 조직하는 Bassoon(적색)과 Homer1(녹색) 단백질의 3차원 구조(중). (우) 시냅스의 GluR1 리셉터 단백질(청색)과 시냅스 조직 단백질의 3색 이미지.

미생물의 크기는 1 마이크로 정도로 광학현미경의 분해능으로는 내부 구조를 보기 어렵다. STORM은 살아있는 미생물 내부의 구조를 초고해상도로 볼 수 있는 도구를 제공함으로써 기존에 볼 수 없었던 구조들을 밝혀내고 있다. 일례로, 대장균의 유전자 조절 단백질의 공간 구조를 연구하여 유전자 발현을 조절하는 기작을 발견하였다(그림 4C).³⁷

뉴런 세포들은 다른 뉴런들과 소통하기 위하여 시냅스를 형성하고 다양한 신경전달물질을 주고 받는 수용체들을 포진시킨다. 일례로, 광유전학(optogenetics)와 3D STORM을 결합하여 외부 자극에 의하여 시냅스의 구조와 수용체의 구성/구조가 어떻게 변화하는지를 단일 시냅스 상에서 관찰하였다(그림 4D).³⁸

생체 시료 뿐 아니라, 생체 물질을 이용한 나노 재료의 구조를 알아내는데 STORM을 활용할 수 있다. 짧은 DNA 가닥의 일시적인 상보결합을 이용하여 형광을 스위칭하는 STORM 이미징법을 DNA-PAINT라 부르며, 이를 이용하면 DNA 오리가미와 같은 나노구조체의 다색, 3차원 이미지를 얻을 수 있다.³⁹

A, T, G, C의 염기서열로 이루어진 DNA 상보결합은 다양한 조합을 만들어낼 수 있기 때문에, 수십 수백가지 염기서열을 구분할 수 있다. 이를 이용하여 100-1,000가지 RNA 서열을 각 세포에서 정량할 수 있다.⁴⁰ 이를 응용하면 이미징과 결합된 대용량 염기서열 분석이 가능해질 것이다.

3. 결론

광스위칭 형광물질을 이용하여 분자들의 이미지를 시간상으로 분리하고 단일분자들의 위치를 정확하게 측정하여 STORM 이미지를 얻을 수 있다. 기존 단분자 검출 현미경에 형광물질과 분석법을 바꾸는 것만으로도 10배 이상 개선된 초고해상도를 구현할 수 있다. Stimulated emission depletion (STED) 등 다른 초고해상도 형광현미경법에 비하여 비교적

간단한 기기장치를 사용하면서도 더 향상된 해상도(10-20 nm)를 제공한다. 또한, 단일분자 분석법에서 사용되던 다양한 기술과 접목되어 다색, 삼차원 이미징을 구현이 용이하고, 확산 계수 등의 물리화학적 성질들을 고밀도로 측정할 수 있다.

STORM 기술에는 아직 발전의 여지가 남아있다. STORM의 해상도는 이론적으로는 무한히 개선될 수 있기 때문이다. 즉, 보다 많은 광자를 얻을 수 있는 광스위칭 형광물질을 개발하면 그에 비례하여 해상도를 개선시킬 수 있다. 또, 다양한 표지 방법의 개발을 통해 시공간 해상도를 개선시키고 단백질 외의 생체 물질도 초고해상도로 분석할 수 있을 것이다. 뿐만 아니라, 단일 분자를 쉽게 분리할 수 있는 점을 활용하여 확산 계수 이외의 여러 다른 생체 시스템의 물리 화학적 성질들을 세포에서 단일 분자 수준으로 알아낼 수 있을 것이다.

기존의 장점들에 힘입어 STORM은 널리 보급되어 다양한 생물, 비생물적 시스템에 적용될 수 있을 것이다. 생체 내 미세 구조를 단일 분자 레벨에서 볼 수 있는 STORM은 기존의 분자생물학, 생화학, 세포생물학 기술을 보완하여 생체내 분자들의 동적 상호 작용에 관한 우리의 이해를 크게 넓히는 데 기여할 것으로 기대된다.

참고문헌

1. B. Huang, H. Babcock, and X. Zhuang, *Cell*, **143**, 1047 (2010).
2. M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang, *Nat. Methods*, **3**, 793 (2006).
3. E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess, *Science*, **313**, 1642 (2006).
4. S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, and M. D. Mason, *Biophys. J.*, **91**, 4258 (2006).
5. R. E. Thompson, D. R. Larson, and W. W. Webb, *Biophys. J.*, **82**, 2775 (2002).
6. A. Yildiz and P. R. Selvin, *Acco. Chem. Res.*, **38**, 574 (2005).
7. A. Pertsinidis, Y. X. Zhang, and S. Chu, *Nature*, **466**, 647 (2010).
8. T. D. Lacoste, X. Michalet, F. Pinaud, D. S. Chemla, A. P. Alivisatos, and S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **97**, 9461 (2000).
9. L. S. Churchman, Z. Okten, R. S. Rock, J. F. Dawson, and J. A. Spudich, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **102**, 1419 (2005).
10. M. P. Gordon, T. Ha, and P. R. Selvin, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **101**, 6462 (2004).
11. X. H. Qu, D. Wu, L. Mets, and N. F. Scherer, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **101**, 11298 (2004).
12. I. Testa, C. A. Wurm, R. Medda, E. Rothermel, C. von Middendorf, J. Fölling, S. Jakobs, A. Schönle, S. W. Hell, and C. Eggeling, *Biophys. J.*, **99**, 2686 (2010).

13. R. Wombacher, M. Heidbreder, S. van de Linde, M. P. Sheetz, M. Heilemann, V. W. Cornish, and M. Sauer, *Nat. Methods*, **7**, 717 (2010).
14. G. T. Dempsey, J. C. Vaughan, K. H. Chen, M. Bates, and X. Zhuang, *Nat. Methods*, **8**, 1027 (2011).
15. M. Schwering, A. Kiel, A. Kurz, K. Lymperopoulos, A. Sprödefeld, R. Krämer, and D.-P. Herten, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **50**, 2940 (2011).
16. M. Bates, B. Huang, G. T. Dempsey, and X. Zhuang, *Science*, **317**, 1749 (2007).
17. Z. Zhang, S. J. Kenny, M. Hauser, W. Li, and K. Xu, *Nat. Methods*, **12**, 935 (2015).
18. B. Huang, W. Q. Wang, M. Bates, and X. Zhuang, *Science*, **319**, 810 (2008).
19. K. Xu, H. P. Babcock, and X. Zhuang, *Nat. Methods*, **9**, 185 (2012).
20. M. F. Juetz, T. J. Gould, M. D. Lessard, M. J. Mlodzianoski, B. S. Nagpure, B. T. Bennett, S. T. Hess, and J. Bewersdorf, *Nat. Methods*, **5**, 527 (2008).
21. S. R. P. Pavani, M. A. Thompson, J. S. Biteen, S. J. Lord, N. Liu, R. J. Twieg, R. Piestun, and W. E. Moerner, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **106**, 2995 (2009).
22. J. Y. Tang, J. Akerboom, A. Vaziri, L. L. Looger, and C. V. Shank, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **107**, 10068 (2010).
23. G. Shtengel, J. A. Galbraith, C. G. Galbraith, J. Lippincott-Schwartz, J. M. Gillette, S. Manley, R. Sougrat, C. M. Waterman, P. Kanchanawong, M. W. Davidson, R. D. Fetter, and H. F. Hess, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **106**, 3125 (2009).
24. B. Huang, S. A. Jones, B. Brandenburg, and X. Zhuang, *Nat. Methods*, **5**, 1047 (2008).
25. A. G. York, A. Ghitani, A. Vaziri, M. W. Davidson, and H. Shroff, *Nat. Methods*, **8**, 327 (2011).
26. F. C. Zanacchi, Z. Lavagnino, M. P. Donnorso, A. Del Bue, L. Furia, M. Faretta, and A. Diaspro, *Nat. Methods*, **8**, 1047 (2011).
27. H. Shroff, C. G. Galbraith, J. A. Galbraith, and E. Betzig, *Nat. Methods*, **5**, 417 (2008).
28. J. S. Biteen, M. A. Thompson, N. K. Tselentis, G. R. Bowman, L. Shapiro, and W. E. Moerner, *Nat. Methods*, **5**, 947 (2008).
29. S. A. Jones, S. H. Shim, J. He, and X. Zhuang, *Nat. Methods*, **8**, 499 (2011).
30. S. J. Holden, S. Uphoff, and A. N. Kapanidis, *Nat. Methods*, **8**, 279 (2011).
31. F. Huang, S. L. Schwartz, J. M. Byars, and K. A. Lidke, *Biomed. Opt. Express*, **2**, 1377 (2011).
32. D. T. Burnette, P. Sengupta, Y. H. Dai, J. Lippincott-Schwartz, and B. Kachar, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **108**, 21081 (2011).
33. P. D. Simonson, E. Rothenberg, and P. R. Selvin, *Nano Lett.*, **11**, 5090 (2011).
34. S. Cox, E. Rosten, J. Monypenny, T. Jovanovic-Talisman, D. T. Burnette, J. Lippincott-Schwartz, G. E. Jones, R. Heintzmann, *Nat. Methods*, **9**, 195 (2012).
35. S. Manley, J. M. Gillette, G. H. Patterson, H. Shroff, H. F. Hess, E. Betzig, and J. Lippincott-Schwartz, *Nat. Methods*, **5**, 155 (2008).
36. P. Kanchanawong, G. Shtengel, A. M. Pasapera, E. B. Ranko, N. W. Davidson, H. F. Hess, and C. M. Waterman, *Nature*, **468**, 580 (2010).
37. W. Q. Wang, G. W. Li, C. Y. Chen, X. S. Xie, and X. Zhuang, *Science*, **333**, 1445 (2011).
38. J. Schnitzbauer, T. S. Maximilian, T. Schlichthaerle, F. Schueder, and R. Jungmann, *Nat. Protocols*, **12**, 1198 (2017).
39. K. H. Chen, A. N. Boettiger, J. R. Moffitt, S. Wang, and X. Zhuang, *Science*, **348**, aaa6090 (2015).