

“西光所建所六十周年暨《光子学报》创刊五十周年”专辑

引用格式: LI Lin, ZHANG Duoteng, QU Yunwei. Structure and Biomedical Applications of Small Molecular Super-resolution Fluorescent Imaging Dyes (Invited)[J]. Acta Photonica Sinica, 2022, 51(8):0851509

李林,张铎腾,渠允薇.超分辨荧光显微成像染料结构与生物应用(特邀)[J].光子学报,2022,51(8):0851509

超分辨荧光显微成像染料结构与生物应用 (特邀)

李林,张铎腾,渠允薇

(厦门大学柔性电子(未来技术)研究院,福建 厦门 361005)

摘 要: 荧光显微成像技术的生物医学应用离不开荧光染料的设计与开发。有机小分子荧光染料因其易于修饰、生物相容性好、光物理性质优异等特点,在细胞生物成像领域受到了广泛关注。随着超分辨荧光显微镜的发展和技术的进步,使得荧光显微成像突破了光学衍射极限,可以获得更为精准的生物分子学信息,观察纳米尺度下亚细胞器之间的相互作用。根据不同的成像原理,科学家开发出了单分子定位成像技术、受激辐射损耗成像技术、结构光照明技术等超分辨荧光显微技术。这些技术在细胞荧光显微成像领域的应用与发展,同时对有机小分子荧光染料的设计与开发提出了新要求。本文介绍了主流超分辨荧光显微技术的原理,总结已发表的超分辨荧光显微成像荧光染料的结构和光物理性质特点,归纳了其设计要求,旨在为新型荧光染料的设计提供参考。

关键词: 超分辨荧光显微成像;有机小分子染料;光物理性质;构效关系;生物医学应用

中图分类号: TQ617.3

文献标识码: A

doi: 10.3788/gzxb20225108.0851509

0 引言

随着生物医学的发展,人们对病理学的研究更加精细。准确解析细胞/亚细胞器水平生理变化,对理解疾病的发生发展至关重要。因此,细胞中的特定位点的检测/监测对于生物医学的发展具有重要意义^[1]。

基于生物医学成像的要求,研究者开发出了多种成像技术,如正电子发射型断层扫描技术(Positron Emission Computed Tomography, PET)、磁共振成像技术(Magnetic Resonance Imaging, MRI)、透射电子显微技术(Transmission Electron Microscopy, TEM)、荧光显微成像技术(Fluorescence Microscopy, FM)等。其中荧光成像技术具有独特的优势:通过采集光信号获得图像,对细胞的毒性较小,可以实现活细胞的实时成像,通过不同荧光波段的染料染色,实现多色成像等^[2]。这些优势使得荧光显微镜在生物学的研究中有着举足轻重的地位^[3]。

自从 1853 年 STOKES G G 首次提出荧光的概念,荧光技术的发展突飞猛进(图 1)。1911 年,随着第一台荧光显微镜的问世,荧光染料与荧光显微镜开始相互配合,成为研究细胞、活体生理活动的强大工具。1981 年,CREMER C 和 CREMER T 开发出第一台实用的共聚焦荧光显微镜,大幅度提高了光学显微镜的分辨率^[4]。但是受到光学衍射极限的制约,其极限分辨率一直无法突破 200 nm^[5],无法精确观测更细微的生物学信息,使其应用受到了限制。为解决这一问题,HELL S W (STED)^[6]、GUSTAFSSON M G L (SIM)^[7]、BETZIG E 和 MOERNER W (PALM)^[8]、庄小威 (STORM)^[9] 等科学家采用不同的原理和方法,突破光学衍射极限,开发出了超分辨荧光显微镜(Super-resolution Fluorescence Microscopy, SRFM),极大的拓展了荧光显微镜在生物医学领域的应用。成像设备和技术的进步同时也对荧光染料的开发提出了新的要求,设计适用于超分辨荧光显微成像的荧光染料成为亟待解决的问题。本文在介绍主要的超分辨荧光显

基金项目:国家自然科学基金(No. 22077101)

第一作者(通讯作者):李林(1983—),男,教授,博士,主要研究方向为有机/生物医学光子学。Email: ifelli@xmu.edu.cn

收稿日期:2022-06-06;录用日期:2022-07-12

<http://www.photon.ac.cn>

微成像技术原理的基础上,针对不同技术对有机小分子染料的要求,归纳总结了目前报道的适用于不同超分辨荧光显微技术的有机小分子荧光染料结构和光物理性质特点,同时展望了该领域的未来发展,旨在为超分辨荧光染料的设计提供思路。

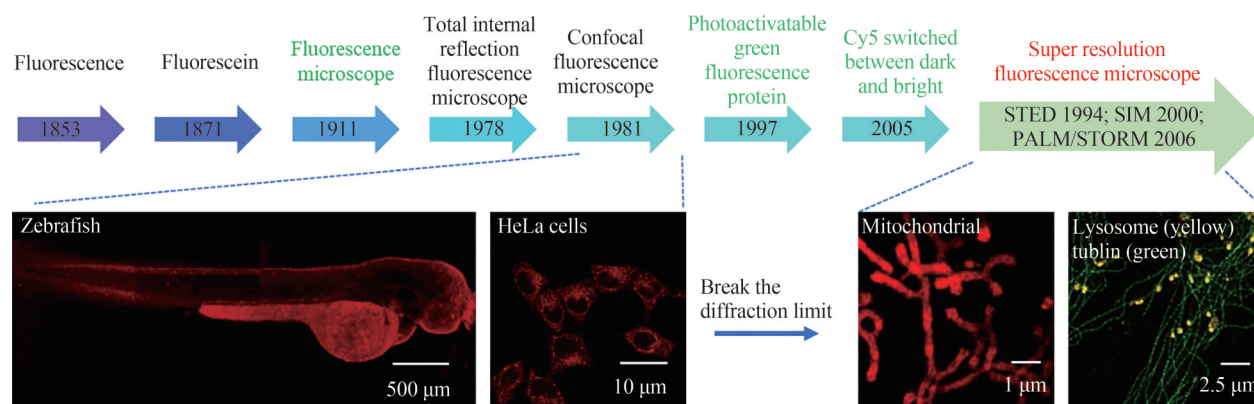


图1 荧光成像技术的发展

Fig. 1 Development of fluorescence imaging technology

1 超分辨荧光显微技术概述

一个理想的点光源经过物镜后,会被投影成具有一定大小的光斑,这就是点扩散函数(Point Spread Function, PSF)。因此物体上距离接近的两个点,在经过物镜后,其PSF会重叠,当其中一个点的波函数的一级极大值与接近点的一级极小值重叠时,将无法分辨出这两个点。传统的荧光显微镜受到衍射极限的约束,其极限分辨率大约在200 nm。而细胞中的亚细胞器如线粒体、溶酶体以及细胞骨架等的直径均小于这一数值^[10]。因此,传统的显微技术无法获得这些亚细胞单位的精确结构。

为了突破衍射极限,化学和物理学领域的科学家联合,基于不同的原理搭建了超分辨荧光显微镜,目前,应用最为广泛的主要有以下三类技术:1)基于激发态荧光受激损耗的受激辐射损耗荧光显微技术(Stimulated Emission Depletion Microscopy, STED);2)基于荧光分子开关效应的单分子定位成像技术(Single-molecule Localization Super-resolution Microscopy, SMLM),主要包括光活化定位显微技术(Photoactivated Localization Microscopy, PALM)和随机荧光重构显微技术(Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM);3)基于余弦结构光调制高频信号的结构光照明技术(Structure Illumination Microscopy, SIM)为与饱和结构光照明技术区分为“线性SIM”。

1.1 超分辨荧光成像技术原理简介

1994年,德国科学家HELL S W提出了在激发光斑的外围,引入一束中心光强为零的环形损耗光,该过程如图2(a)所示,通过相位调制作用,使损耗光在样品上所成的光斑为中空模式,该损耗光的中心与激发光斑中心重合。通过受激辐射的原理,使激发光斑外围的荧光基团发出与损耗光相干涉的荧光,通过二向色镜滤波,仅保留中心的短波长的荧光,从而达到缩小点扩散函数的目的,提高成像分辨率,这就是著名的STED技术^[6]。STED能够实现超分辨成像的关键在于损耗光激发下,受激发射和自发荧光之间相互竞争的非线性效应。损耗光激发荧光团后,不可避免的会产生自发辐射,随着损耗光功率的增强,自发辐射逐渐被受激辐射取代,当功率达到某一强度,绝大部分电子将以受激辐射的形式返回基态^[11]。因此,STED的分辨率与损耗光的光强相关,损耗光功率越高,分辨率越高。

1995年,BETZIG E提出了利用单分子定位的方式突破衍射极限的想法^[12]:通过降低荧光分子“开启”的比例,限制同一时间发射光子的荧光分子数量,计算对应荧光分子PSF的中心位置,通过大量的成像和计算,将所有荧光团的中心位置拟合在一张图上,最终获得超分辨的荧光成像(图2(b))。2006年,BETZIG E借助一种可激活的变种绿色荧光蛋白,实现了该设想并获得了20~30 nm分辨率的成像,即PALM技术^[8]。同年,庄小威课题组采用类似原理,利用光调控有机小分子荧光染料对(Cy3-Cy5),开发出了STORM技术^[9]。基于对PSF的定位精度,单分子定位成像往往需要数千帧的图像数据进行重构,以牺牲时间的方式来

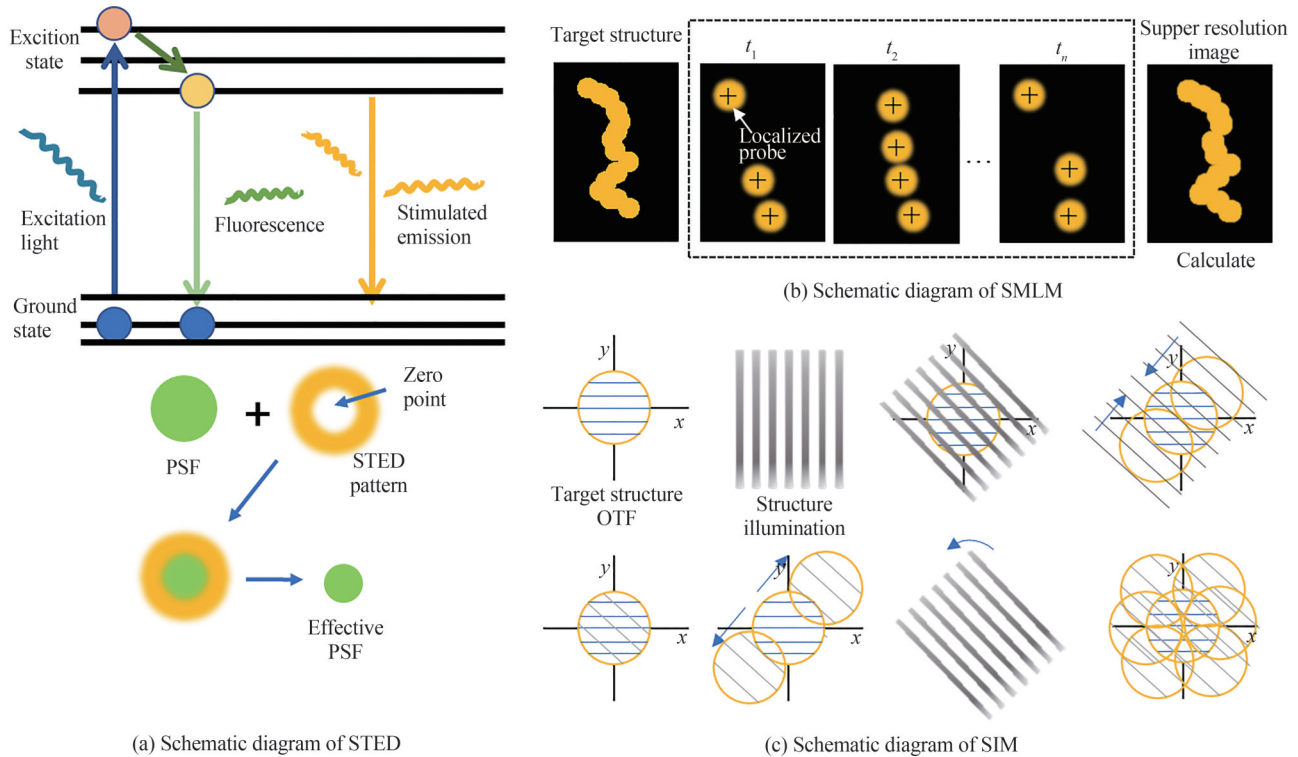


图 2 不同超分辨荧光成像技术的原理
Fig. 2 Principle of different super-resolution fluorescence imaging techniques

换取高空间分辨率,成像速度受到了一定的限制。因此,在对活细胞进行观测时,为了平衡成像时间和空间分辨率,需要增加激发光功率,提高采样频率,获得超分辨荧光图像^[13]。

在空间频域中,光学传递函数(Optical Transfer Function, OTF)是 PSF 的傅里叶变换结果。显微镜收集到的频谱,等于被观察物体的频谱与 OTF 的卷积。因此,提高 OTF,可以提升成像的分辨率。GUSTAFSSON M G L 在 2000 年发明的线性 SIM 技术通过在激发光前加入一个光栅,将匀场照明光替换为余弦结构光,通过余弦调制相位,将高频信号调制到低频信号中,通过旋转光栅,可以得到各个方向的高频频谱,最后,通过电脑解析,得到包含有高频信号的图像(图 2(c))。利用线性 SIM 技术,可以使物体的分辨率提高一倍,达到 100 nm 左右^[7]。2005 年 GUSTAFSSON M G L 在线性 SIM 的基础上,通过引入非线性光学,开发出具有更高分辨率的饱和结构光照明技术(Saturated Structured Illumination Microscopy, SSIM, 也称为非线性 SIM)^[14]。

1.2 超分辨荧光染料的设计要求

通过对有机小分子染料进行针对性的结构修饰,可以提高其性能,使有机小分子染料满足使用场景的需求。染料进入细胞的能力称为透膜能力,提高染料的透膜能力有助于改善染料的染色效果,降低染料的用量,减少非特异性标记,从而提高成像的信噪比。由超分辨荧光显微成像技术的原理可知,相较于传统的共聚焦荧光显微成像,超分辨荧光显微成像需要对成像样品进行更多次数的扫描以收集足够数量的光子,从而获得更高分辨率的成像^[15]。这一特点要求荧光染料具有更加优异的光稳定性和亮度^[16]。同时,超分辨荧光显微成像需要高功率的激发光源,这就需要降低染料的光毒性,避免对细胞的过度损伤。

针对不同的超分辨荧光显微成像技术,有机小分子染料结构特点有所不同。SMLM 技术需要限制同一时间荧光开启的分子数量,因此要求荧光分子具有闪烁能力(STORM)或光激活能力(PALM)。针对 STORM 成像,需要调控染料分子处于荧光态的比例,使每帧图像获得稀疏的荧光分子信号,并提升染料的抗光漂白能力,增加成像帧数,提升成像分辨率。而 PALM 成像中,需要使染料在成像前处于暗态,降低染料的自发激活荧光,使染料可控释放荧光,因此通常使用笼化策略来调控染料分子暗态与亮态的转换并获得适合的光活化量子效率。而用于 STED 成像的染料分子,由于损耗光功率极高,因此,STED 成像要求染料具有优异的抗光漂白能力,同时,需要避免损耗光对染料的二次激发,因此对染料光谱的调控十分重要。

线性SIM成像对于荧光染料没有特殊要求,是目前活细胞成像中应用最多的超分辨成像技术,而非线性SIM的设计是基于荧光分子激发态饱和效应,对分子设计有一定的要求,但目前应用尚未普及,因此本文中不再赘述。此外,超分辨荧光显微成像要求染料在成像时空窗口内尽量减少扩散,这需要将染料分子与靶向基团结合,从而对目标物进行荧光标记成像。

2 适用于STED的有机小分子染料

2.1 对染料光稳定性的调控

传统罗丹明染料,如罗丹明B、罗丹明6G等,具有优异的荧光量子产率($\Phi = 0.5 \sim 1$),在生物成像中可以获得较高的信噪比^[17]。然而,较差的水溶性、低透膜能力使其容易自聚集并产生非特异性结合。同时,由于STED成像要求极高的损耗光功率,传统罗丹明染料的光稳定性限制了其在超分辨荧光显微成像中的应用。HELL S W课题组在罗丹明染料的4,5号位修饰磺酸基团(图3,1-1,1-2,1-3),在改善罗丹明染料的水溶性和透膜能力的同时有效抑制了染料与蛋白质结合后的荧光淬灭^[18],显著提高高功率激光照射下染料的稳定性。在此基础上,通过氨基偶联反应,实现了细胞中微管的超分辨荧光成像。除此之外,还可以在罗丹明骨架上修饰羟基,以改善其水溶性和透膜能力,降低染料在细胞中的自聚集。然而,在烯丙基位置连接羟基的染料(R580),容易在高功率激光照射下发生光氧化,导致染料变质。因此,研究者非烯丙基和非苄基的位点引入羟基获得了2-1(530RH)和2-2(575RH)等一系列染料(图3),在提高了染料的水溶性和透膜能力的同时,有效提升了染料的稳定性^[19],使其适用于STED成像。

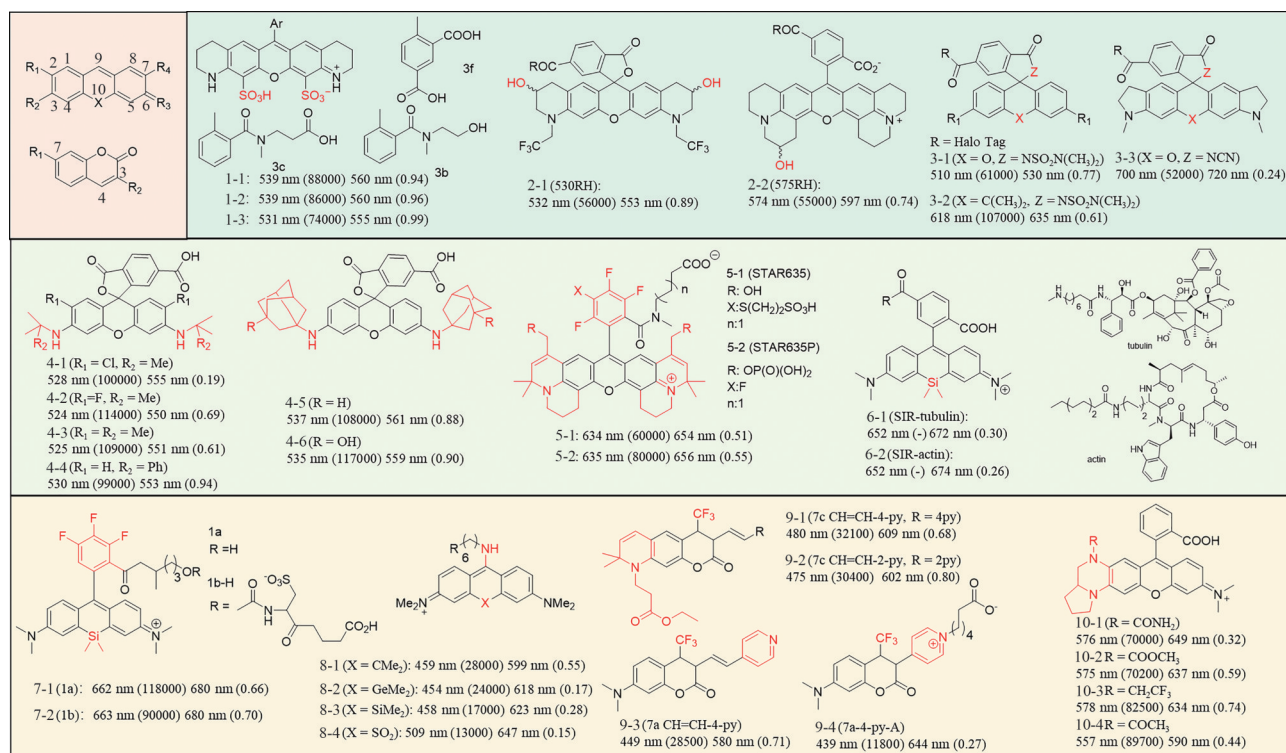


图3 适用于STED的有机小分子染料

Fig. 3 Small molecular organic dyes for STED

以开环内盐形式存在的罗丹明,其透膜能力低于闭环螺内酯结构的罗丹明。同时,由于正电荷的存在,染料容易富集到线粒体,影响对细胞其他特定位点的定位能力。在罗丹明染料的2,3号位引入吸电子基团,诱导染料向螺内酯结构的转化是优化染料透膜能力的一种有效方式。但是,这种方式常导致染料量子产率的降低。为了解决透膜能力和荧光量子产率之间的矛盾,JOHNSON K等报道了一种在改善染料透膜能力的同时保持高信噪比的策略(3系列,图3)^[20]:将罗丹明中的羧基转化为缺电子的酰胺,这一调整在不影响罗丹明的光谱特性和荧光量子产率的前提下,可调控罗丹明开环-闭环结构的动态平衡。在透膜时,染料以

闭环形式存在,当染料与目标蛋白结合后,会向开环形式转移,荧光增加1 000倍。此系列染料分子覆盖了500~700 nm的可见光区波段,可以用于多色超分辨荧光显微成像。

LAVIS L D课题组^[21]和肖义课题组^[22]分别报道了对四甲基罗丹明中的N, N-二甲基氨基位点的衍生化修饰,抑制扭转分子内电荷转移(Twisted Intramolecular Charge Transfer, TICT)效应来获得具有高亮度和稳定性的染料;河北大学高保祥教授等通过在苯环6号位引入甲氧基的策略提升硅基罗丹明的亮度,同时由于两个甲氧基的存在对罗丹明母体结构9号位具有空间位阻保护作用,提高了染料的稳定性^[23]。HELL S W等在2019年发现,在激光照射染料样品时,会发生光氧化导致罗丹明上的氮脱烷基化,进而导致染料光谱的蓝移。尤其在STED成像中,使用的激光器功率高,为了避免光氧化,HELL S W等设计开发了一系列三芳基甲烷取代的罗丹明4(图3),可以在光照下保持稳定,防止光谱蓝移,有效提高染料的光稳定性^[24]。此类设计具有普适性,可以拓展到罗丹明衍生物中以提升染料的光稳定性。

2.2 对荧光光谱的调控

对染料荧光光谱的调控是优化染料成像性能的重要策略。在STED成像中,损耗光功率过大引起的光毒性是活细胞成像中迫切需要解决的问题。近红外荧光染料在降低光损伤的同时,可以有效避免生物自发荧光的干扰,提高对生物样本的穿透能力,受到了研究人员的广泛关注。引入久洛尼定环(Julolidine rings)是一种促进罗丹明分子光谱红移的常用策略。在此基础上,HELL S W课题组在罗丹明C3苯环上修饰吸电子的F原子,进一步促进了罗丹明染料的光谱红移(5系列,图3)^[25]。其中,5-1(STAR635)通过引入烯丙基醇结构,在不增加额外电荷的前提下提高了染料的水溶性和透膜能力。同时,5-1通过增长染料与氨基反应基团之间碳链的长度,改善了其与目标蛋白质结合的反应效率,成功地应用于STED成像。

通过将IV族元素(C, Si, Ge等)引入到氧杂蒽结构中,可以调控罗丹明的激发和发射波长红移至600 nm以上,这是由于与IV族原子连接的甲基的s-p轨道和荧光团的p轨道之间的共轭稳定了最低未占分子轨道能级(Lowest Unoccupied Molecular Orbital, LUMO)。2008年,肖义教授课题组报道了首个硅基罗丹明染料^[26]。该染料在具有近红外激发和发射能力的同时,具有优异的光稳定性,适用于STED成像。然而,硅基罗丹明的开环比率较低,在常规的生理缓冲溶液中容易以闭环形式存在。因此,需要对其修饰以更好的适用于STED成像。JOHNSON K课题组发现,硅基罗丹明与极性蛋白质分子结合后主要以开环形式存在,据此将硅基罗丹明与多西紫杉醇(与微管蛋白特异性结合)和去溴去甲基-贾斯普拉基内酯(与肌动蛋白特异性结合)连接,获得了一系列性能优异的新型染料(图3)。当6-1(SiR-tubulin)在体外与微管蛋白结合时,其荧光强度增强了10倍以上;而6-2(SiR-actin)与肌动蛋白结合后则显示出100倍以上的荧光增强。利用6-1和6-2,成功实现了活细胞中微管与肌动蛋白的超分辨荧光成像^[27]。基于此原理,研究者使用SiR-Hoechst实现了对细胞核中DNA的染色并进行了超分辨荧光成像^[28]。

为了进一步得到长波长的超分辨荧光染料,HELL S W课题组在硅基罗丹明的基础上,连接了氟化苯环,在不影响荧光量子产率的前提下获得了发射波长在680 nm的染料7-1和7-2(图3)。通过连接蛋白质标签,可以实现对细胞骨架的精确定位,并且这两个染料可以选择800 nm的损耗光,有效减少了损耗光对细胞的损伤^[29]。

罗丹明染料(包括硅基罗丹明染料)的斯托克斯位移(Stocks shift)一般在20~40 nm范围内,容易被损耗光二次激发,导致信号干扰。KLAN P课题组以及WU L和BURGESS K课题组在前期的工作中提出:罗丹明的9号位引入9-氨基吡喃酮支架是促进罗丹明斯托克斯位移增加的有效方法^[30, 31]。基于此,HELL S W课题组设计了C、Si、Ge取代O原子的新型罗丹明染料(8系列,图3),并获得了超过100 nm的斯托克斯位移(图3),有效避免了损耗光对样品的二次激发^[32]。

除了罗丹明染料外,香豆素染料的分子结构小,亮度高等特点也受到了研究者的关注。HELL S W课题组设计了一系列大斯托克斯位移的香豆素类染料(9系列,图3)^[33]。其中9-4具有超过200 nm的斯托克斯位移,并具有优异的荧光量子产率。通过引入三氟甲基结构,进一步提高了染料的光稳定性,使其适用于STED成像。基于不同母体结构的超分辨荧光染料的开发,也为设计新型超分辨荧光探针(Fluorescent probe)提供了更多的染料选择。

2.3 协同策略调控荧光染料性能

染料多种性能的共同提升对于新型染料的设计开发具有重要意义。然而亮度、光谱、稳定性等性能的共同

提升对染料的结构设计以及合成提出了很高的要求,通常难以实现。近期,袁林教授和王璐课题组合作报告一种协同策略,同时改善常规荧光团的光稳定性、亮度以及斯托克斯位移。研究者将具有调控电子密度的四氢吡嗪基团引入到传统的罗丹明中,合成了具有振动结构的不对称罗丹明(9,图3)。该策略可以增加染料激发态的振动弛豫,并抑制了扭转分子内电荷转移的形成,提高了亮度和光稳定性,同时增加了斯托克斯位移^[34]。这种结合了抑制扭曲分子内电荷转移和不对称合成的协同策略为构建更优异的STED染料提供了新的思路。

3 适用于SMLM的有机小分子染料

目前,常用的SMLM主要包括PALM和STORM。PALM技术最初是通过光活化的荧光蛋白(Fluorescent protein)实现的,但依赖基因编码的技术缺陷限制了其应用场景,后来逐步发展到可以通过有机小分子染料完成成像;而STORM技术的实现,得益于庄小威以及SAEUR M, TINNIFIED P等在2005年报道的Cy5染料在暗态与亮态之间切换的光闪烁现象^[35, 36]。尽管使用Cy3-Cy5分子对可以对活细胞进行单分子定位成像^[37],但仍需要借助氧化还原缓冲溶液,这在某种程度上限制了STORM技术对活细胞中生理过程的监测。光活化/光闪烁的超分辨荧光染料的匮乏和缺陷,促使研究者们着力于开发新的结构体系的同时,不断优化其光物理性能。

3.1 光活化超分辨染料

罗丹明染料在开环-闭环状态下具有高信噪比,同时,其高量子产率的特性使得这类染料在受激后可以辐射较多光子,满足SMLM成像的要求。因此,在罗丹明结构上修饰适当的笼化基团,活化光调节罗丹明“off”到“on”的过程,可以实现PALM成像(图4)。早在1977年,KNAUER K H和GLEITER R就报道了罗丹明酰胺的光致变色反应^[38]。2007年,HELL S W等通过将4-氨基邻苯二甲酰亚胺作为芳基取代基对罗丹明B进行修饰,得到在紫外区有明显吸收的光活化罗丹明荧光染料11(图4)^[39]。该染料分子具有极低的自发激活荧光比例(小于0.01%),在 $50 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的紫外光(375 nm)光活化后,染料荧光增强,单个染料分子平均可以收集到900个光子。利用该分子成功对微管蛋白进行了超分辨荧光成像,同时,实现了U373MG细胞表面的3D成像。然而该染料通过紫外光光活化,同时染料分子的水溶性不理想,限制了其对活细胞的超分辨成像。因此,2014年,MOERNER J课题组基于染料11的思路,对罗丹明酰胺的取代基进行修饰,通过增加内酰胺上烷烃取代物的共轭结构和正电荷获得更大的吸收波长红移的染料,并获得了活化光波长大于400 nm的染料12-1和12-2(图4)^[40],

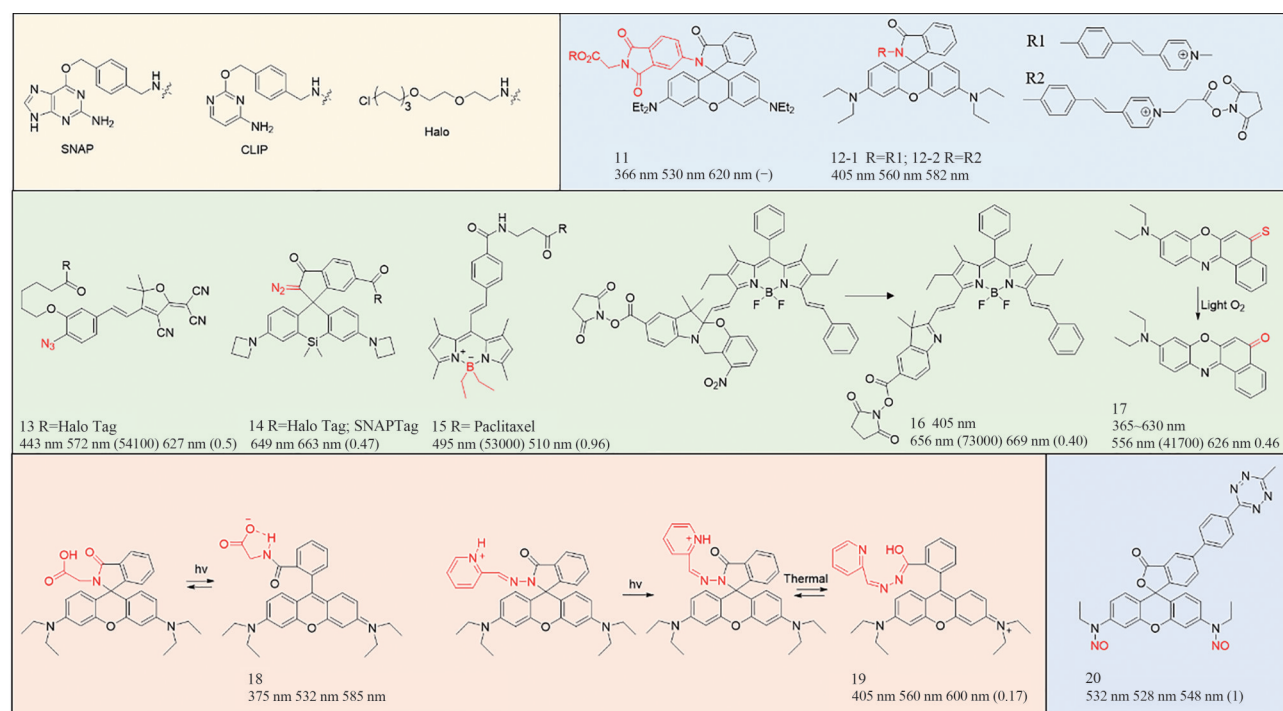


图4 适用于PALM的有机小分子染料
Fig. 4 Small molecular organic dyes for PALM

该染料具有0.89%的光活化量子产率,可以利用更低功率($18\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$)的活化光活化,有效减少了应用过程中紫外光对细胞的损伤。

基于光化学反应的基团也可以作为笼化基团。MOERNER W E课题组在2008年,开发出了叠氮基-二氰基亚甲基二咪唑^[41]。在443 nm的光照射下,不稳定的叠氮结构转化为氨基,光活化量子产率为0.59%,分子内的推拉电子结构促使染料的荧光增强。通过结合HaloTag蛋白标签,构建了染料13(图4),可以对活细胞中蛋白进行标记,实现PALM成像^[42]。LAVIS L D课题组在罗丹明螺内酯结构中引入重氮结构作为笼化单元,构建了无色罗丹明,设计了染料14(图4)^[43]。重氮结构作为笼化基团的引入缩小了笼化基团的分子大小,提高了罗丹明的透膜能力,同时使该染料具有了优异的荧光激活率(83.5 s)和极低的自发激活荧光比例(10^{-6})。光活化后,罗丹明结构由闭环向开环结构转化,释放荧光。然而,该笼化基团在光活化后会形成部分非荧光物质,丢失部分信号。

氟硼二吡咯(BODIPY)染料同样具有量子产率高,稳定性好,生物相容性优良的特点,因此,通过对BODIPY母体结构修饰笼化单元可以得到适用于PALM成像的染料。光活化硼烷基化的BODIPY染料15(图4)在光照下硼烷基裂解后可被溶剂加合物所取代,光活化量子产率为0.12%^[44]。该染料的光活化和激发过程均使用低功率激光($488\text{ nm}, 160\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$)为光源,对细胞的刺激较小。通过将紫杉醇与15共价偶联,SMITH E A等对活细胞中的微管结构进行了超分辨荧光成像,为开发光活化BODIPY超分辨荧光染料提供了新思路。RAYMO F M和其合作者将BODIPY与光敏感的恶嗪杂环化合物连接获得染料16(图4),从而调控其荧光强度与荧光光谱^[45]。不同于将荧光团通过笼化基团完全屏蔽的设计,该染料在光活化前仍具有荧光,恶嗪杂环在光活化后与BODIPY结构共轭,吸收与发射光谱红移,(激发波长从608 nm红移至656 nm,发射波长从623 nm红移至669 nm),通过收集活化后响应波段的荧光,从而获得超分辨成像。该染料的光活化量子数为1%,在405 nm的激发光下,单个分子平均可以收集到2 000个光子,可以对活细胞溶酶体进行超分辨荧光成像,并通过与溶酶体内蛋白质共价结合防止染料在细胞中扩散,优异的信噪比使其分辨率达到了15 nm。这一设计表明笼化单元不一定需要将荧光完全屏蔽,如果可以实现光谱的大斯托克斯位移调控,同样可以用于PALM成像。

通过简单的分子结构调整获得分子效能的提升是研究者追求的目标,莱斯大学的XIAO H课题组通过在传统的荧光团中进行硫-氧原子替换,开发了一种简便且通用的PALM成像荧光染料设计策略,在可见光谱范围内获得了一系列可光活化的小分子荧光染料^[46](染料17为例)。基于理论计算,荧光团内的硫代羰基取代通过光致电子转移可诱导荧光团荧光淬灭,而荧光团处于有氧环境能由可见光(365~630 nm)活化,光活化量子效率为2.6%。在这一过程中,硫笼荧光团可以有效地被氧化为其氧代衍生物,从而恢复荧光团的荧光,活化后荧光亮度提升260倍。这一设计策略在最小的结构改变下获得了优异的荧光性能的调整,为PALM超分辨染料的设计提供了新的思路。

传统罗丹明结构容易受到pH和极性变化的干扰,在缓冲溶液或细胞中荧光开关状态随机切换,干扰了光活化超分辨荧光成像的精度。肖义课题组通过在螺内酯结构中直接引入羧基,构建了甘氨酸罗丹明染料(18,图4)。在光激活开环释放荧光的同时,引入的羧基与氮负离子形成氢键,稳定了罗丹明染料的开环结构^[47]。通过与传统罗丹明对比,18具有更高的稳定性(荧光分子的开启时间延长到68.5 ms)和收集光子数(单个分子的平均收集光子数达到43 200),这些优点显著了提高染料的超分辨荧光显微成像性能。而FUENTES P R课题组则开发了一种结合光活化和流动性特点,且独立于分子介质特性来控制开环荧光分子数量的方法(19,图4)^[48]。19在光活化后,会存在一个闭环形式的反式结构,该结构与开环的荧光分子间存在着热平衡关系,因此发光的荧光分子比例有可调控性。 $85\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ 的光源光活化100 s后,体系中的开环顺式结构占比为0.64%,而荧光分子占比为0.25%。通过将染料分子嵌入PVA薄膜,测试得到分子开关次数达到221次,每次分子开关可以收集到640个光子。此外,即使光活化后的分子被光漂白,闭环形式的反式结构将向开环形式转化,从而保持开环荧光分子的数量。该策略能够以极小的光毒性进行长时间的荧光信号采集,利用19追踪细胞内的亚细胞结构,同时实现对神经元中突触小泡运输过程的三维延时成像。

肖义课题组通过亚硝基笼化策略构建新型罗丹明,能通过可见光激活(532 nm)荧光团^[49],促进N-NO键的断裂实现高亮度荧光发射,该染料的光活化量子产率为16%(离去一个一氧化氮)和2.7%(离去第二个

一氧化氮)。结合生物正交偶联定位技术,20(图4)可以实现活细胞中线粒体和微管的超分辨荧光成像。与传统的邻硝基苄基策略相比,研究者将笼化单元简化为一氧化氮,降低了笼化单元对罗丹明母体结构光学性能的干扰。同时,通过可见光对笼化基团进行光活化,减少了光源对细胞的光毒性。

3.2 光闪烁超分辨染料

不同于2006年庄小威课题组对Cy3和Cy5在DNA上进行修饰构成分子对的方法,MOERNER W E等在2008年通过共价修饰连接Cy3和Cy5,消除了Cy3和Cy5分子间距离的不确定性影响,实现了对新月形杆菌管状茎结构的超分辨荧光成像^[37]。2013年,庄小威课题组报道了通过优化缓冲溶液体系促进花菁染料应用于超分辨成像^[50],然而这些方法聚焦于改善缓冲溶液体系来促使染料从三线态回到基态,而非对染料结构的调控,本综述不作赘述。

罗丹明染料的开闭环结构可以实现荧光的开启或关闭。2013年JOHNSON K课题组设计了具有优异过膜能力和光谱特性的硅基罗丹明染料(21,图5)。当使用 $1\text{ kW}\cdot\text{cm}^{-2}$ 的激发光时,每帧图片可以收集到630个光子,因此适用于STORM成像^[51]。通过结合不同的蛋白标签“HaloTag, SNAPTag和CLIPTag”,实现了对不同蛋白的标记和活细胞中的超分辨荧光成像。但是,此染料无法实现*d* STORM,应用存在一定的限制。

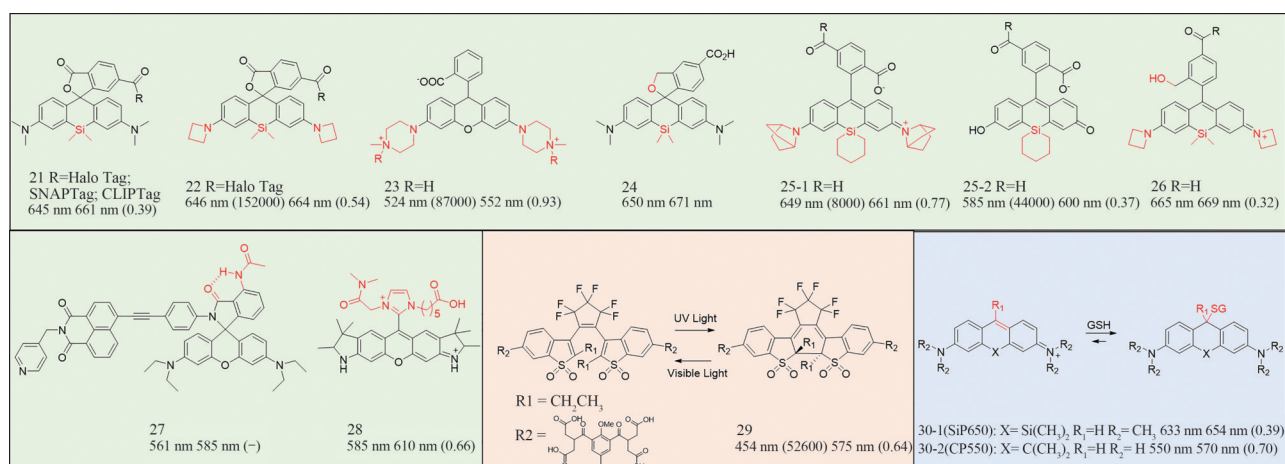


图5 适用于STORM的有机小分子染料
Fig. 5 Small molecular organic dyes for STORM

LAVIS L D课题组将N, N-二甲基结构替换为四元的氮杂环结构,通过抑制扭转分子内电荷转移效应极大的提升了硅基罗丹明的量子产率和亮度,同时不影响硅基罗丹明开闭环结构比例。在 $14\text{ kW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 637 nm的激发光激发下,10 000帧照片可以定位到283 501个分子。研究者将该染料与HaloTag蛋白标签结合,开发出了染料22(图5),实现了对活细胞的STORM成像^[21]。同样为了获得更高的荧光亮度,肖义课题组利用季铵基团的吸电子效应,抑制染料在激发态时电荷诱导效应,降低分子扭曲导致的非辐射能量损耗,从而增强荧光发射^[22]。这一策略提升了罗丹明染料的量子产率,并提升了荧光开启时的寿命,进而促进单分子成像时可收集的总光子数增加。在PBS缓冲溶液中单分子收集到的总光子数提升近四倍,达到40 600个,有助于提高单分子成像的精度。研究者利用染料23及其衍生物(图5),用 $2\text{ kW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 532 nm的激光激发染料实现了对细胞膜和活细胞中溶酶体的超分辨荧光成像。这两种策略虽然对染料的亮度进行了提升,然而由于没有对罗丹明染料的开闭环性能进行进一步调控,无法实现*d* STORM,同时,所需的激发光功率较高,特别是染料22,达到了 $14\text{ kW}\cdot\text{cm}^{-2}$,不利于对活细胞的成像。

正因如此,研究者希望通过调控处于亮态(开环状态)罗丹明的比例,获得适用于*d* STORM成像的染料。基于对罗丹明开闭环比例的调控,URANO Y等设计了一种新型罗丹明染料(24,图5)^[52],区别于传统罗丹明的螺内酯结构,在此分子中,通过引入分子内的亲核反应基团,调节亲核基团(羟基)的亲核性和亲电基团(罗丹明母体结构)的亲电性来调控分子的分子内螺环化平衡常数(pK_{cycl})。该染料的 pK_{cycl} 为5.8,开环形式的寿命约为100 ms,因此在pH 7.4的生理条件下,该染料的开环比例极低,可以直接应用于活细胞超分

辨荧光成像。

虽然硅基罗丹明在生理环境下以闭环形式为主,但存在不稳定性,易受到环境因素干扰,为了稳定硅基罗丹明的开环比例,IWANAGA S等提出通过对Si原子上的取代基进行修饰,引入硅烷结构,将有利于提高咕吨环上的电子密度,促进罗丹明染料的环化反应,进而降低罗丹明染料两性离子的占比。研究者设计了一系列分子验证了这一假设,并筛选出具有合适开关比例的染料25-1(4%)和25-2(3%)^[53]。在 $0.18\text{ kW}\cdot\text{cm}^{-2}$ 的激发光激发下,25-1单分子可收集到411个光子,25-2可收集到332个光子。通过染料25(图5),实现了对HeLa细胞微管的超分辨荧光成像。

罗丹明的螺环化反应平衡也可以通过对氧杂蒽上不同位点的修饰来进行优化,进而获得具有适宜开关比的染料用于STORM超分辨荧光成像。徐兆超和刘小刚发现罗丹明的开环比例与吉布斯自由能差值(ΔG)之间存在良好的线性关系,因此,可以通过 $\Delta G_{\text{c-o}}$ 来指导罗丹明染料的设计^[54]。基于 $\Delta G_{\text{c-o}}$ 这一思路,研究者设计并合成了 pK_{cycl} 为5.3的染料26(图5),其具有优异的亮度和光稳定性,在 1.92 kW cm^{-2} 的激发光下可以单分子可以收集到800个光子。通过对吉布斯自由能差值的计算,可以提前预测染料的 pK_{cycl} ,以获得适用于*d*STORM成像的染料。

罗丹明螺内酰胺因其闭环反应较慢,常作为光调控笼化基团用于PALM成像而非STORM成像。徐兆超课题组提出通过引入氢键来稳定螺内酰胺(27,图5)^[55],加速了其从荧光开环结构到非荧光螺内酰胺的闭环转化,使其具有了优异的光闪烁性能。通过在螺内酰胺上进一步取代6-苯基乙炔基萘酰亚胺,可以将活化光波长红移至405 nm,同时活化光功率降低至 $1.8\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$,降低光毒性对细胞的影响。该染料克服了传统罗丹明染料对酸性环境敏感易开环的特点,拓展了罗丹明染料在酸性环境下的超分辨成像,并成功应用于枯草芽孢杆菌细胞表面微结构的超分辨荧光成像。

XU K课题组报道了一种实现高性能STORM成像染料设计的新思路^[56]。利用1,3-双取代咪唑鎓替代罗丹明类染料中的苯环,得到的新型荧光染料分子(28,图5)。1,3-双取代咪唑鎓带有正电荷,可促进染料分子捕获电子而破坏母体的共轭结构,并在560 nm光源的照射下进而进入暗态。与传统罗丹明相比,该类染料更容易进入暗态,并且可以在405 nm的紫外照射下恢复到荧光态,在收集100 000帧照片后仍具有优异的光闪烁性能,平均单个分子在光漂白前可收集到4 500个光子。

二芳基乙烯(DAE)具有良好的稳定性和光致变色特性,但这类物质在生物成像中受到溶解度差的应用限制。HELL S W课题组通过水溶性基团修饰,改善了DAE结构的水溶性,获得了一系列新型染料(图5)^[57]。其中,染料29可通过375 nm的光源光活化(转化率0.15%)并在480 nm的激发下向开环形式转换(转化率0.018%),同时,单分子每次激发可释放2 500个光子使得高密度的目标物标记成为可能。该染料不需要额外的缓冲溶液辅助就可以实现光闪烁,避免了对活体样本的干扰。这类染料的开发拓展了超分辨荧光染料的种类,但为了改善水溶性而增加了染料的分子量,不利于进一步对分子的功能化修饰。

KAMIYA M和URANO Y等开发了一种在活细胞中自发闪烁的新方法^[58]:利用细胞内高含量的谷胱甘肽(GSH)对氧杂蒽荧光团的9号位进行亲核进攻,得到了可用于STORM成像的硅取代和碳取代两类荧光染料。研究者通过染料对GSH的解离常数($K_{\text{d,GSH}}$)来衡量该类染料的荧光开启率。其中30-1的 $K_{\text{d,GSH}}$ 为 $1\ \mu\text{M}$,30-2的 $K_{\text{d,GSH}}$ 为 $3.1\ \mu\text{M}$,两个染料均表现出在荧光和无荧光状态下GSH加合物之间的平衡性以及优异的自发闪烁能力,可结合STORM成像活细胞中的微管或线粒体。此外,通过使用自发闪烁的近红外染料30-1(SiP650,图5)和绿色荧光团30-2(CP550,图5),在不需要介质的条件下,实现了双色活细胞单分子成像。这种方式避免了光活化对细胞的副作用。

4 适用于SIM的有机小分子荧光染料

基于结构光成像的原理,线性SIM技术对荧光染料没有特殊要求,并且根据奈科斯特定律,其需要收集的光子数也仅为共聚焦成像的4~8倍,远低于STED成像和SMLM成像,因此绝大多数荧光染料都适用于线性SIM成像。对于非线性SIM技术,虽然对分子的饱和吸收有要求,但目前应用尚未普及,在本文中不再赘述。据此,本综述就不再对其结构进行分类评述,仅通过两个典型案例解析设计理念。与此同时,线性SIM也是最具潜力的用于长时间监测细胞生理活动的荧光成像技术。然而,即便在线性SIM成像中使用了

较低功率的激发光和更短的采样时间,光毒性依然会对细胞产生影响,特别是在观察一些对光毒性敏感的亚细胞器,如线粒体等。在长时间照射时,线粒体的形态会发生变化,功能也可能会收到影响,这会对监测与这些亚细胞器相关的生理和病理过程产生干扰,无法做到精准检测^[59]。因此,研究者开发了自修复染料用于降低光毒性的影响^[60, 61]。2014年BLANCHARD S C课题组报道了利用三线态淬灭剂中和光照产生的ROS的策略设计新型染料(31,图6)。这一策略可以极大的降低染料的光毒性并提高染料的稳定性^[62]。2020年,陈知行教授课题组基于这一策略,报道了新型线粒体示踪剂32^[63],这一示踪剂相较于传统的MitoTracker系列染料,具有更高的光稳定性,同时,通过结构光成像,研究者验证了这类新型染料不会对线粒体构成明显的光损伤,可实现无损监测线粒体动态变化过程。

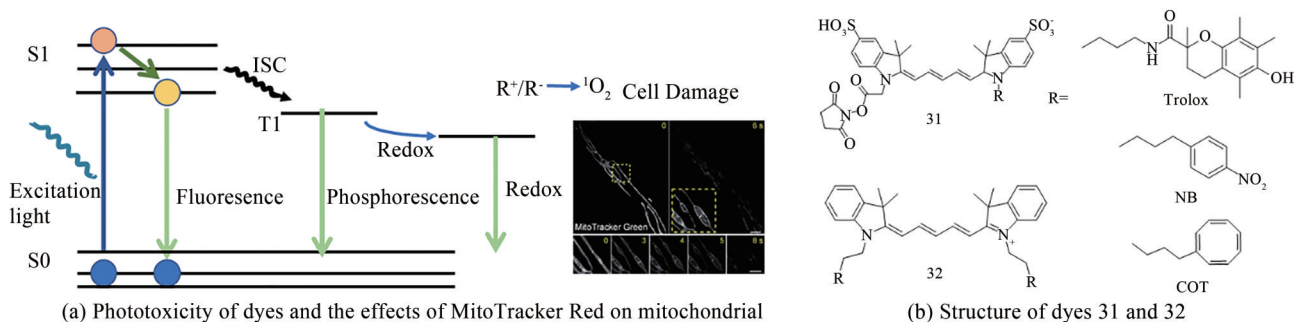


图6 染料光毒性示意图和自修复染料分子
Fig. 6 Schematic diagram of dye phototoxicity and self-healing dye molecules

5 总结与展望

综上,荧光染料的发展促进了成像技术的进步,而成像技术也进一步指导了染料结构的优化与完善。超分辨荧光显微成像技术采用创造性的策略突破衍射极限,使研究者可以对亚细胞器、生物大分子以及亚细胞结构之间相互作用进行研究,成为了研究生理学和病理学的有力工具。荧光显微镜的使用离不开荧光染料,相较于传统光学显微镜,超分辨荧光显微镜所采用的光源功率更高,需要收集信号的时间更长,对光谱的要求更为严苛,因而对染料的设计提出了更高的要求。其中,有机小分子荧光染料具有易于修饰以调控光物理性质,便于使用,操作简便等优点,受到了超分辨荧光显微技术研究者的广泛青睐。为了改善有机小分子染料的水溶性和过膜率,研究者在染料上修饰水溶性基团或改善荧光分子携带的电荷。除此之外,STED技术使用高功率的激光作为损耗光,对染料的光稳定性有严格要求,研究者通过对染料结构进行修饰,改善其光稳定性,降低染料的光漂白,从而获得稳定的荧光信号;通过抑制分子的扭转分子内电荷转移效应,优化电子排布来提高荧光量子产率进而收集更多的荧光信号;通过调控染料激发发射光谱红移,采用近红外的损耗光激发,降低对细胞的光损伤;同时,通过增大斯托克斯位移,避免损耗光的二次激发,以获得更高分辨率的成像。染料分子的光活化或闪烁能力在SMLM中至关重要。研究者设计不同的笼化基团和光敏基团调控PALM染料分子的稳定性,优化笼化基团,设计分子量小、荧光屏蔽效果好的笼化基团,改善染料分子的亮态与暗态对比度和光活化量子产率,获得高质量的PALM成像。对罗丹明分子结构的调控,优化其开闭环的比率,从而获得适合的开环荧光团的占比,同时通过染料分子稳定性和亮度的提升,降低激发波长功率,从而降低对活细胞的光损伤,以获得高质量的活细胞STORM成像。虽然线性SIM成像对染料的光物理性质并没有特殊的要求,但研究者也通过进一步减少分子受激发产生的超氧自由基对生物样本损伤等策略,降低成像过程中染料的光毒性,以提高成像效果。

这些策略的共同目的都是力求精准,减小染料分子对目标物的影响,客观地对目标物进行观测。目前,不同波段的高稳定性荧光染料不断涌现,丰富了超分辨荧光染料库,促进了多色超分辨荧光显微成像的发展。然而要实现长时间无损监测亚细胞器之间、生物大分子与亚细胞器、生物大分子之间的相互作用,以及复合时间尺度的“四维超分辨成像”,仍需进一步优化有机小分子荧光染料的结构和性能。如何在尽量不增加染料分子体积/分子量的前提下,实现染料分子的高透膜性、优异的精准定位能力、高光稳定性及低光毒性,是研究人员的不懈追求^[64]。而随着光物理性质优异的荧光团的不断开发,有机小分子荧光团/探针,也

将在精准检测领域发挥越来越大的作用,成为精准医学研究中的重要工具之一。

参考文献

- [1] LIU H W, CHEN L, XU C, et al. Recent progresses in small-molecule enzymatic fluorescent probes for cancer imaging [J]. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(18): 7140-7180.
- [2] WANG S, REN W X, HOU J T, et al. Fluorescence imaging of pathophysiological microenvironments [J]. *Chemical Society Reviews*, 2021, 50(16): 8887-8902.
- [3] SCHERMELLEH L, FERRAND A, HUSER T, et al. Super-resolution microscopy demystified [J]. *Nature Cell Biology*, 2019, 21(1): 72-84.
- [4] PAWLEY J B. Handbook of biological confocal microscopy[M]. City: Handbook of Biological Confocal Microscopy, 1995.
- [5] ABBE E K. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung [J]. *Archiv Für Mikroskopische Anatomie*, 1873: 913-468.
- [6] HELL S W, WICHMANN J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy [J]. *Optics Letters*, 1994, 19(11): 780-782.
- [7] GUSTAFSSON M G. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy [J]. *Journal of Microscopy*, 2000, 198(Pt 2): 82-87.
- [8] BETZIG E, PATTERSON G H, SOUGRAT R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [9] RUST M J, BATES M, ZHUANG X W. Sub-diffraction-limit imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) [J]. *Nature Methods*, 2006, 3(10): 793-795.
- [10] FERNÁNDEZ-SUÁREZ M, TING A Y. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, 9(12): 929.
- [11] KLAR T A, HELL S W. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy [J]. *Optics Letters*, 2007, 24(14): 954-956.
- [12] DICKSON R M, CUBITT A B, TSIEN A B, et al. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein [J]. *Nature*, 1997, 388(6640): 355-358.
- [13] SAMANTA S, GONG W, LI W, et al. Organic fluorescent probes for Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM): recent highlights and future possibilities [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2019, 380: 17-34.
- [14] GUSTAFSSON M G. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(37): 13081-13086.
- [15] LINDE S V D, SAUER M. How to switch a fluorophore: from undesired blinking to controlled photoswitching [J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 43(4): 1076-1087.
- [16] WU J, SHI Z, ZHU L, et al. The design and bioimaging applications of NIR fluorescent organic dyes with high brightness [J]. *Advanced Optical Materials*, 2022, 10(8): 2102514.
- [17] WANG L, DU W, HU Z, et al. Hybrid rhodamine fluorophores in the visible/NIR region for biological imaging [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(40): 14026-14043.
- [18] BOYARSKIY V P, BELOV V N, MEDDA R, et al. Photostable, amino reactive and water-soluble fluorescent labels based on sulfonated rhodamine with a rigidized xanthene fragment [J]. *Chemistry - A European Journal*, 2008, 14(6): 1784-1792.
- [19] BUTKEVICH A N, BELOV V N, KOLMAKOV K, et al. Hydroxylated fluorescent dyes for live-cell labeling: synthesis, spectra and super-resolution STED [J]. *Chemistry*, 2017, 23(50): 12114-12119.
- [20] WANG L, TRAN M, D'ESTE E, et al. A general strategy to develop cell permeable and fluorogenic probes for multicolour nanoscopy [J]. *Nature Chemistry*, 2019, 12(2): 165-172.
- [21] GRIMM J B, ENGLISH B P, CHEN J, et al. A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy [J]. *Nature Methods*, 2015, 12(3): 244-250.
- [22] YE Z, YANG W, WANG C, et al. Quaternary piperazine substituted rhodamines with enhanced brightness for super-resolution imaging [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(37): 14491-14495.
- [23] SONG Y, ZHANG X, SHEN Z, et al. Improving brightness and stability of Si-rhodamine for super-resolution imaging of mitochondria in living cells [J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(18): 12137-12144.
- [24] BUTKEVICH A N, BOSSI M L, LUKINAVIČIUS G, et al. Triarylmethane fluorophores resistant to oxidative photobleaching [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(2): 981-989.
- [25] WURM C A, KOLMAKOV K, GÖTTTFERTF, et al. Novel red fluorophores with superior performance in STED microscopy [J]. *Optical Nanoscopy*, 2012, 1(1): 7.
- [26] FU M, XIAO Y, QIAN X, et al. A design concept of long-wavelength fluorescent analogs of rhodamine dyes: replacement of oxygen with silicon atom [J]. *Chemical Communications*, 2008, (15): 1780-1782.

- [27] YU Y, WU S, NOWAK J, et al. Live-cell imaging of the cytoskeleton in elongating cotton fibres[J]. *Nature Plants*, 2019, 5(5): 498-504.
- [28] LUKINAVIČIUS G, BLAUKOPF C, PERSHAGEN E, et al. SiR-Hoechst is a far-red DNA stain for live-cell nanoscopy[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8497.
- [29] KOLMAKOV K, HEBISCH E, WOLFRAM T, et al. Far-red emitting fluorescent dyes for optical nanoscopy: fluorinated silicon-rhodamines (SiRF Dyes) and phosphorylated oxazines[J]. *Chemistry*, 2015, 21(38): 13344-13356.
- [30] HORVÁTH P, ŠEBEJ P, ŠOLOMEK T, et al. Small-molecule fluorophores with large Stokes shifts: 9-Iminopyronin analogues as clickable tags[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2014, 80(3): 1299-1311.
- [31] WU L, BURGESS K. Fluorescent amino- and thiopyronin dyes[J]. *Organic Letters*, 2008, 10(9): 1779-1782.
- [32] BUTKEVICH A N, LUKINAVIČIUS G, D'ESTE E, et al. Cell-permeant large Stokes shift dyes for transfection-free multicolor nanoscopy[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(36): 12378-12381.
- [33] SCHILL H, NIZAMOV S, BOTTANELLI F, et al. 4-Trifluoromethyl-substituted coumarins with large Stokes shifts: synthesis, bioconjugates, and their use in super-resolution fluorescence microscopy[J]. *Chemistry—A European Journal*, 2013, 19(49): 16556-16565.
- [34] JIANG G, REN T B, D'ESTE E, et al. A synergistic strategy to develop photostable and bright dyes with long Stokes shift for nanoscopy[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 2264.
- [35] BATES M, BLOSSER T R, ZHUANG X W. Short-range spectroscopic ruler based on a single-molecule optical switch[J]. *Physical Review Letters*, 2005, 94(10): 108101.
- [36] HEILEMANN M, MARGEAT E, KASPER R, et al. Carbocyanine dyes as efficient reversible single-molecule optical switch[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(11): 3801-3806.
- [37] CONLEY N R, BITEEN J S, MOERNER W E. Cy3-Cy5 covalent heterodimers for single-molecule photoswitching[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, 112(38): 11878-11880.
- [38] KNAUER K H, GLEITER R. Photochromie von rhodaminderivaten[J]. *Angewandte Chemie*, 1977, 89(2): 116-117.
- [39] FÖLLING J, BELOV V, KUNETSKY R, et al. Photochromic rhodamines provide nanoscopy with optical sectioning[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46(33): 6266-6270.
- [40] LEE M K, RAI P, WILLIAMS J, et al. Small-molecule labeling of live cell surfaces for three-dimensional super-resolution microscopy[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(40): 14003-14006.
- [41] LORD S J, CONLEY N R, LEE H L D, et al. A photoactivatable push-pull fluorophore for single-molecule imaging in live cells[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(29): 9204-9205.
- [42] LEE H L D, LORD S J, IWANAGA S, et al. Superresolution imaging of targeted proteins in fixed and living cells using photoactivatable organic fluorophores[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(43): 15099-15101.
- [43] GRIMM J B, ENGLISH B P, CHOI H, et al. Bright photoactivatable fluorophores for single-molecule imaging[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(12): 985-988.
- [44] LINCOLN R, GREENE L E, ZHANG W, et al. Mitochondria alkylation and cellular trafficking mapped with a lipophilic BODIPY-acrolein fluorogenic probe[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(45): 16273-16281.
- [45] ZHANG Y, SONG K H, TANG S, et al. Far-red photoactivatable BODIPYs for the super-resolution imaging of live cells[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(40): 12741-12745.
- [46] TANG J, ROBICHAUX M A, WU K L, et al. Single-atom fluorescence switch: a general approach towards visible light-activated dyes for biological imaging[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(37): 14699-14706.
- [47] YE Z, YU H, YANG W, et al. A strategy to lengthen the on-time of photochromic rhodamine spirolactam for super-resolution photoactivated localization microscopy[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(16): 6527-6536.
- [48] HALABI E A, PINOTSI D, FUENTES P R. Photoregulated fluxional fluorophores for live-cell super-resolution microscopy with no apparent photobleaching[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1232.
- [49] ZHENG Y, YE Z, LIU Z, et al. Nitroso-caged rhodamine: a superior green light-activatable fluorophore for single-molecule localization super-resolution imaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(22): 7833-7842.
- [50] VAUGHAN J C, DEMPSEY G T, SUN E, et al. Phosphine quenching of cyanine dyes as a versatile tool for fluorescence microscopy[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(4): 1197-1200.
- [51] LUKINAVIČIUS G, UMEZAWA K, OLIVIER N, et al. A near-infrared fluorophore for live-cell super-resolution microscopy of cellular proteins[J]. *Nature Chemistry*, 2013, 5(2): 132-139.
- [52] UNO S N, KAMIYA M, YOSHIHARA T, et al. A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging[J]. *Nature Chemistry*, 2014, 6(8): 681-689.
- [53] HARA D, UNO S N, MOTOKI T, et al. Silinanyl rhodamines and silinanyl fluoresceins for super-resolution microscopy[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2021, 125(31): 8703-8711.
- [54] CHI W, QIAO Q, WANG C, et al. Descriptor ΔG_{C-O} enables the quantitative design of spontaneously blinking

- rhodamines for live-cell super-resolution Imaging[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(45): 20215-20223.
- [55] QI Q, CHI W, LI Y, et al. A H-bond strategy to develop acid-resistant photoswitchable rhodamine spirolactams for super-resolution single-molecule localization microscopy[J]. *Chemical Science*, 2019, 10(18): 4914-4922.
- [56] WANG B, XIONG M, SUSANTO J, et al. Transforming rhodamine dyes for (*d*)STORM super-resolution microscopy via 1, 3-Disubstituted imidazolium substitution[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 61(9): e202113612.
- [57] ROUBINET B, WEBER M, SHOJAEI H, et al. Fluorescent photoswitchable diarylethenes for biolabeling and single-molecule localization microscopies with optical superresolution[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(19): 6611-6620.
- [58] MOROZUMI A, KAMIYA M, UNO S N, et al. Spontaneously blinking fluorophores based on nucleophilic addition/dissociation of intracellular glutathione for live-cell super-resolution imaging [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(21): 9625-9633.
- [59] WÄLDCHEN S, LEHMANN J, KLEIN T, et al. Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15348.
- [60] ZHENG Q, JUETTE M F, JOCKUSCH S, et al. Ultra-stable organic fluorophores for single-molecule research[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 43(4): 1044-1056.
- [61] TINNEFELD P, CORDES T. 'Self-healing' dyes: intramolecular stabilization of organic fluorophores [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(5): 426-427.
- [62] ZHENG Q, JOCKUSCH S, ZHOU Z, et al. The contribution of reactive oxygen species to the photobleaching of organic fluorophores[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2013, 90(2): 448-454.
- [63] YANG Z, LI L, LING J, et al. Cyclooctatetraene-conjugated cyanine mitochondrial probes minimize phototoxicity in fluorescence and nanoscopic imaging[J]. *Chemical Science*, 2020, 11(32): 8506-8516.
- [64] LI L, SUN H. Next generation of small-molecule fluorogenic probes for bioimaging[J]. *Biochemistry*, 2019, 59(3): 216-217.

Structure and Biomedical Applications of Small Molecular Super-resolution Fluorescent Imaging Dyes (Invited)

LI Lin, ZHANG Duoteng, QU Yunwei

(*The Institute of Flexible Electronics (IFE, Future Technologies)*, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: In order to conduct imaging studies, researchers have developed a variety of biological imaging techniques, such as positron emission computed tomography, magnetic resonance imaging, scanning electron microscopy, fluorescence microscopy, etc. Among them, fluorescence imaging technology has its unique advantages: the images are obtained by acquiring the signals of photons, which is less toxic to the living cells and can realize real-time imaging of living cells; multi-color imaging is realized by dye staining in different fluorescence wavelength, and molecules in cells can be observed between interactions in cells. These advantages make fluorescence microscopy irreplaceable in the study of cell biology and pathology research. However, constrained by the diffraction limit, the ultimate resolution of fluorescence microscopy cannot exceed 200 nm, which does not meet the requirements for accurate observation of fine structures such as subcellular organelles; important physiological changes such as protein-protein interactions and subcellular organelle interactions. Diffraction limits the application of conventional fluorescence microscopy such as confocal fluorescence microscopy. In order to solve this problem, scientists have used different principles and methods to break the diffraction limit. The development of super-resolution fluorescence microscopy has greatly expanded the application of fluorescence microscopy in biomedical fields.

At present, the most widely used super-resolution fluorescence microscopy mainly the following three categories: 1) Single molecule localization imaging based on fluorescent molecular switching effect, mainly including photoactivated localization microscopy and stochastic fluorescence reconstruction microscopy; 2) Stimulated emission depletion fluorescence microscopy based on excited state fluorescence excited loss; 3) Structured light illumination fluorescence microscopy based on cosine structured light modulated high

frequency signal. New imaging methods have put forward new requirements for the development of fluorescent dyes. And the design and development of dyes suitable for super-resolution fluorescence microscopy has become an important research direction. In this paper, we first briefly introduce the principles of single molecule localization imaging technique, stimulated emission depletion imaging technique, and structured light illumination technique, and summarize the common and special requirements of these techniques for small molecule dyes.

Compared with conventional optical microscopy, super-resolution fluorescence microscopy employs a higher power light source, requires a longer time to collect signals, and has more stringent spectral requirements, thus placing higher demands on the design of dyes. Researchers have improved the photostability and spectra of dyes by modifying their structures, using near-infrared excitation emission to reduce photodamage; by suppressing the TICT effect of molecules and optimizing the electron arrangement to increase the quantum yield to collect more signals; and by increasing the Stokes shift to avoid secondary excitation of lossy light to obtain higher resolution imaging.

The photoactivation and light scintillation ability of molecules are crucial in single-molecule localization imaging. The researchers have improved the contrast between the light and dark states of dye molecules through photo-caging strategies, photosensitive groups and modulation of molecular stability; and optimized the switching ratio of light scintillation molecules by modulating the ratio of open and closed rings of rhodamine molecules. Researchers have also developed several types of triple state quenching groups to further reduce the damage to biological macromolecules by superoxide radicals generated by the excitation of molecules and to reduce phototoxicity.

Finally, we look forward to the development direction of small molecule dyes and propose for novel super-resolution fluorescent dyes/probes to achieve high membrane permeability, excellent precision positioning ability, high brightness and stability, and low phototoxicity of dye molecules without increasing the size of dye molecules as much as possible. This paper summarized the structural design characteristics of organic small molecule dyes selected for different techniques with respect to the requirements of different super-resolution imaging techniques for dye performance. It provides ideas for the development of new dyes suitable for super-resolution imaging.

Key words: Super-resolution fluorescence imaging; Organic small molecular dyes; Photophysical properties; Structure-activity relationships; Biomedical applications

OCIS Codes: 000.1570; 160.2540; 180.2520