

博士 学位 论 文

单分子定位超分辨成像专用罗丹明染料优化设计

**Optimized Design of Rhodamine Fluorophores for Single-Molecule
Localization Super-Resolution Imaging**

作者 姓 名: 叶智伟

学 号: 11307102

指 导 教 师: 肖义 教授

学 科、 专 业: 应用化学

答 辩 日 期: 2020 年 1 月 10 日

大连理工大学

Dalian University of Technology

大连理工大学学位论文独创性声明

作者郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下进行研究工作所取得的成果。尽我所知，除文中已经注明引用内容和致谢的地方外，本论文不包含其他个人或集体已经发表的研究成果，也不包含其他已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的贡献均已在论文中做了明确的说明并表示了谢意。

若有不实之处，本人愿意承担相关法律责任。

学位论文题目：单分子定位超分辨成像专用罗丹明染料优化设计

作者签名：叶智伟 日期：2020年1月10日

大连理工大学学位论文版权使用授权书

本人完全了解学校有关学位论文知识产权的规定，在校攻读学位期间论文工作的知识产权属于大连理工大学，允许论文被查阅和借阅。学校有权保留论文并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印、或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

学位论文题目：单分子定位超分辨成像专用罗丹明染料优化设计

作者签名：叶智伟 日期：2020年1月10日

导师签名：苏波 日期：2020年1月10日

答辩委员会主席：吕宗文 日期：2020年1月10日

摘要

近年来,超分辨荧光成像技术的快速发展革新了生物学研究方法,因为它通过突破传统荧光显微镜的光学衍射极限,实现了超高的分辨率。超分辨成像技术的建立依赖于高性能的荧光染料,而其中的定位型超分辨成像对染料要求更高,染料分子需具备在时空中稀疏的光转换能力。作为适用于定位型超分辨成像的核心染料,罗丹明染料被广泛应用于超分辨成像研究,然而该染料的关键性质仍然表现不理想。为此,有必要通过理性的分子设计为完成高质量超分辨成像开发基于罗丹明的荧光染料。

荧光染料在定位型超分辨成像中的适用性可以通过分析其单分子光物理性质来加以预测和评价,为此本论文首先解决单分子分析算法开发的关键问题,建立了一种单分子分析算法。该算法由三部分构成: (1) 单分子的识别,通过超分辨定位和分子聚类的方法排除在空间上重叠的单分子信号; (2) 状态轨迹的拟合,采用隐匿 Markov 模型分析亮暗态; (3) 单分子光物理性质的测量,给出每种单分子性质的物理定义。基于 Matlab 将上述算法转换为具有图形化界面的软件,自动化分析的单分子光物理性质特征,为准确评价单分子光物理性质提供重要工具。

罗丹明螺内酰亚胺具备可逆光激活特征,可以实现稀疏发光的控制,适用于光激活定位显微成像。然而,其关键的亮态时间性质目前仍有待于优化。本论文提出通过构建分子内酸性环境来延长该类染料亮态时长的策略,通过将羧基引入邻近螺环位置构建了新型罗丹明螺内酰亚胺 Rh-Gly。光激活、 pK_a 证实了新策略对罗丹明螺内酰亚胺亮态的稳定性; 对基于该策略染料及其类似物应用上述单分子分析算法和软件实现了单分子光物理性质计算和测量,分析结果显示邻接羧基将螺内酰亚胺的亮态时间从~30 ms 延长至~60 ms, 并预期该策略染料具备良好的超分辨成像性能。通过基于该策略的 Rh-Gly 染料及其标记功能性探针,实现了 10 s 时间分辨率和~50 nm 空间分辨率的活细胞线粒体超分辨成像,以及对活细胞细胞核 H2B 蛋白和固定细胞微管超分辨成像。

其次,为了改善传统四甲基罗丹明 (TMR) 在水溶液中不理想的发光效率,本论文开发了一种季铵化哌嗪策略来抑制 TICT 态的形成,提升罗丹明染料的亮度,提高其超分辨成像能力。光谱实验结果表明季铵化哌嗪取代的罗丹明 MPR ($\Phi = 0.93$; $\epsilon = 8.7 \times 10^4$ $L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$) 相比于 TMR ($\Phi = 0.47$; $\epsilon = 7.8 \times 10^4$ $L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$) 显示出大于两倍的亮度提升。通过建立的单分子分析方法对 MPR 和 TMR 的单分子光物理性质统计,其结果显示 MPR 具有更好的单分子亮度且预测其定位型超分辨成像能力更优。通过对基于该策略标记衍生物的开发,实现了对固定细胞的微管以及活细胞的细胞膜和溶酶体的超分辨成像。

本论文发展的两种罗丹明染料分子优化策略为开发适用于超分辨成像的染料提供了平台分子，促进未来超分辨成像技术的发展和进化。

关键词：超分辨成像；单分子定位；单分子算法；罗丹明；罗丹明螺内酰亚胺

ABSTRACT

The rapid evolvement of super-resolution imaging techniques has revolutionized the biological studies in recent years. Super-resolution imaging provides unprecedented resolutions by breaking the diffraction limit of conventional fluorescent microscopies. The establishment of this technique relies on superior fluorophores, especially for localization-based super-resolution imaging which further requires sparse photoswitching behaviors of fluorophores in terms of both space and time. As core fluorophores for localization super-resolution imaging, rhodamines have been widely deployed for super-resolution imaging. However, these fluorophores exhibit suboptimal properties for these advanced imaging techniques. Therefore, it is necessity to update rhodamine fluorophores to facilitate high-quality super-resolution imaging through rationalized strategy of molecular design.

Since the single-molecule characteristics predetermine the localization-based super-resolution imaging capabilities of a fluorophore, the establishment of standardized algorithm and the development of applicable software for analyzing single-molecule data emerge as a critical problem. In this dissertation, a single-molecule algorithm has been established, which is constituted by three components: 1) the identification of single-molecule signals, which utilizes the super-resolution localization and molecular cluster methods for excluding spatially overlapped signals; 2) the transition-state fitting of fluorescent trajectories, which adopts the hidden Markov model to analyze bright and dark states; 3) the measurement of single-molecule photophysical properties, which defines the physical meanings of single-molecule characteristics. Following the established algorithm, a MATLAB based software with GUI interface has been developed for automatically analyzing single-molecule characteristics. The development of algorithm and software for single-molecule analysis would set a stage for evaluating single-molecule photophysics in the future.

Ring-closed forms of rhodamine spiroamides are photoactivated to highly fluorescent ring-opened forms, providing sparse dark to bright transforms in a controllable fashion, suitable for photoactivated localization imaging. However, one of its key properties, the duration of on-states, i.e. on time, has never been optimized previously. In this dissertation, a molecular design strategy is developed to lengthen the on time of photoactivated zwitterionic state through an intramolecular acid microenvironment, and a new rhodamine spiroamide, Rh-Gly, is obtained by introducing a carboxylic acid group in proximate to the lactam location. Photoactivation and pK_a studies substantiate the the stabilization effect of adjacent acid group. The established single-molecule algorithm and software enable the measurement of single-molecule photophysics of fluorophores developed through the acidic strategy. Single-molecule results demonstrate that acid strategy lengthens the on time from ~ 30 ms to ~ 60 ms, and predict that

these fluorophores permit high-quality super-resolution imaging. Furthermore, through Rh-Gly and its probes derived following acid strategy, high-quality super-resolution imaging of mitochondria in living cells is obtained at ~ 50 nm spatial resolution in 10 s, and super-resolution imaging of nucleus H2B proteins in living cell and microtubule filaments in fixed cells are realized. The development of this strategy would benefit the future development of high-performance rhodamine spirolactams for photoactivation localization microscopies as well as inspire the improvement of other fluorophores.

Conventional rhodamines, like tetramethylrhodamine (TMR), show suboptimal fluorescence in aqueous solution. The nonradiative process of these fluorophores probably correlates to the formation of twisted intramolecular charge transform (TICT) state. In this dissertation, a quaternary piperazine strategy is developed to surpass the TICT formation and improve the brightness of rhodamine fluorophores. The quaternary piperazine substituted rhodamine, MPR ($\Phi = 0.93$; $\epsilon = 8.7 \times 10^4 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), exhibits over two-fold brightness enhancement compared to its analog TMR ($\Phi = 0.47$; $\epsilon = 7.8 \times 10^4 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) in ensemble spectrum studies. Single-molecule photophysics properties of MPR and TMR are measured through the priorly established single-molecule algorithm and software. The results demonstrate that MPR shows increased single-molecule brightness and holds an enhanced capability of super-resolution imaging. Moreover, through biological functional derivatives of MPR, these quaternary piperazine substituted rhodamines enable super-resolution imaging of microtubules in fixed cells and plasma membrane or lysosomes in living cells.

Rhodamine fluorophores, developed from the two new molecular designs in this dissertation, would serve as scaffolds for the development of super-resolution imaging probes, promoting the future involvement of super-resolution techniques.

Key Words: Super-resolution imaging; Single-molecule localization; Single-molecule algorithm; Rhodamine; Rhodamine spirolactam.

目 录

摘要	I
ABSTRACT	III
TABLE OF CONTENTS	IX
图目录	XIII
表目录	XVI
主要符号表	XVII
英文缩写表	XVIII
1 绪论	1
1.1 研究背景与意义	1
1.2 影响单分子定位超分辨成像的荧光染料性质	5
1.2.1 荧光染料的亮度	5
1.2.2 荧光染料的闪烁特征	6
1.2.3 荧光染料的稳定性	8
1.2.4 荧光染料的标记能力	10
1.2.5 其它影响超分辨成像的染料性质	11
1.2.6 总结	11
1.3 定位型超分辨成像的荧光染料研究进展	11
1.3.1 单分子亮度的提升	13
1.3.2 荧光染料闪烁特性的增强	16
1.3.3 荧光染料稳定性的增强	28
1.3.4 染料标记能力的优化	31
1.3.5 研究进展总结	41
1.4 本文主要研究思路	41
1.4.1 染料母体选择	41
1.4.2 研究策略	41
2 单分子分析算法的建立和软件的开发	43
2.1 引言	43
2.2 单分子分析算法的设计	43
2.3 单分子数据结构	44
2.4 单分子信号的识别	44
2.4.1 背景噪音过滤及单分子候选信号初选	44

2.4.2 重叠单分子信号的排除	47
2.4.3 单分子信号采样像素的确定	50
2.5 单分子荧光强度轨迹的拟合	51
2.6 单分子光物理性质的测量	54
2.6.1 单分子亮度的测量	54
2.6.2 单分子闪烁特征的测量	55
2.6.3 单分子光稳定性的测量	56
2.6.4 单分子信号的其它特征	56
2.6.5 单分子光物理性质的统计学特征	57
2.7 单分子分析软件的开发	58
2.8 本章小结	62
3 超长亮态时长罗丹明螺内酰亚胺的设计、合成和超分辨成像性能	64
3.1 引言	64
3.2 超长罗丹明螺内酰亚胺亮态时长的分子设计策略	65
3.3 超长罗丹明螺内酰亚胺亮态时长的分子合成方法	65
3.3.1 超长罗丹明螺内酰亚胺亮态时长的分子合成路线	67
3.3.2 Rh-Gly、Rh-Asp、Rh-Ser 及其甲酯对比物的合成	69
3.3.3 Rh-Gly-Halo 的合成步骤	71
3.3.4 Rh-Gly-NCS 的合成步骤	73
3.4 实验方法	76
3.4.1 Rh-Gly 和 Rh-MGly 的光谱测量	76
3.4.2 定位型显微镜的配置	76
3.4.3 Rh-Gly 的光激活实验	77
3.4.4 聚合物薄膜中的单分子成像	77
3.4.5 细胞培养与 Rh-Gly 及其生物功能衍生物的染色方法	78
3.4.6 Rh-Gly 与 Mitochondrial deep red 的双色共聚焦荧光成像	79
3.4.7 Rh-Gly 和其生物功能衍生物的光激活定位超分辨成像	79
3.4.8 Rh-Gly 和其生物功能衍生物的定位型超分辨成像数据处理	79
3.5 结果与讨论	80
3.5.1 Rh-Gly 和 Rh-MGly 的光激活性质测量	80
3.5.2 Rh-Gly 和 Rh-MGly 的 pK_a 测量	83

3.5.3 Rh-Gly 单分子亮态时间测量和超分辨成像能力评价	84
3.5.4 Rh-Gly 染色的活细胞线粒体光激活定位超分辨成像	90
3.5.5 Rh-Gly 标记 HaloTag 的活细胞融合蛋白超分辨成像	95
3.5.6 Rh-Gly 标记抗体的微管超分辨成像	96
3.6 本章小结	98
4 超亮季铵化哌嗪罗丹明的设计、合成及超分辨成像性能	100
4.1 引言	100
4.2 季铵化哌嗪罗丹明分子设计策略	100
4.3 季铵化哌嗪罗丹明的合成方法	101
4.3.1 季铵化哌嗪罗丹明的合成路线	101
4.3.2 Lyso-R、MPR 和 MEM-R 的合成步骤	104
4.3.3 4-MPR-COOH 的合成步骤	105
4.3.4 Mem-TMR 的合成步骤	107
4.3.5 季铵化哌嗪取代萘酰亚胺及其二甲氨基对比物的合成步骤	108
4.3.6 季铵化哌嗪取代硝基苯并二噁唑及其二甲氨基对比物的合成步骤	110
4.4 实验方法	112
4.4.1 季铵化哌嗪染料及其二甲氨类似物的光谱研究	112
4.4.2 成像显微镜的类型	113
4.4.3 MPR 和 TMR 的抗体标记方法	113
4.4.4 MPR-IgG 和 TMR-IgG 的单分子实验	113
4.4.5 HeLa 细胞培养及 LAMP1-mGFP 质粒转染	114
4.4.6 溶酶体共定位分析及细胞膜共聚焦成像的染色方法	114
4.4.7 季铵化哌嗪染料及其对比标识物超分辨成像的染色方法	114
4.4.8 溶酶体共定位分析及细胞膜共聚焦荧光成像	115
4.4.9 季铵化哌嗪染料及其对比标识物的超分辨成像	115
4.4.10 季铵化哌嗪染料及其对比标识物超分辨成像的数据分析	116
4.5 结果与讨论	117
4.5.1 哌嗪取代染料的 pK_a 测量	117
4.5.2 季铵化哌嗪取代染料与二甲氨类似物的光谱测量及亮度比较	119
4.5.3 季铵化哌嗪策略提升亮度的机制探究	124
4.5.4 MPR 和 TMR 的单分子测量	127

4.5.5 MPR 标记抗体的微管超分辨成像及其与 TMR 的成像结果对比	134
4.5.6 Mem-R 的活细胞细胞膜超分辨成像及其与 Mem-TMR 的成像结果对比	139
4.5.7 Lyso-RH 的活细胞溶酶体超分辨成像	143
4.5.8 Mem-R 和 Lyso-RH 在活细胞内的闪烁行为探究	147
4.6 本章小结	147
5 结论与展望	148
5.1 结论	148
5.2 创新点	149
5.3 展望	149
参考文献	150
附录 A 化合物表征数据	163
附录 B 激活荧光染料闪烁模型	188
附录 C 补充甘氨酸罗丹明成像结果	190
攻读博士学位期间科研项目及科研成果	197
致谢	199
作者简介	200

TABLE OF CONTENTS

ABSTRACT	I
Contents of figure	XIII
Contents of table	XVI
Legend	XVII
List of abbreviations	XVIII
1 Introduction	1
1.1 Background and significance	1
1.2 Fluorophore properties correlating to the single-molecule localization super-resolution imaging	5
1.2.1 Brightness of fluorophores	5
1.2.2 Blinking characteristics of fluorophores	6
1.2.3 Photostability of fluorophores	8
1.2.4 Labeling capability of fluorophores	10
1.2.5 Other properties correlating to the super-resolution imaging	11
1.2.6 Conclusion	11
1.3 Research progress of fluorophores for localization-based super-resolution imaging	11
1.3.1 Improvement of single-molecule brightness	13
1.3.2 Enhancement of blinking characteristics of fluorophores	16
1.3.3 Improvement of photostability of fluorophores	28
1.3.4 Optimization of labeling capability of fluorophores	31
1.3.5 Conclusion of research progress	41
1.4 Research ideas in this study	41
1.4.1 Selection of fluorophore scaffold	41
1.4.2 Research strategy	41
2 Establishment of algorithm and development of software for single-molecule analysis	43
2.1 Introduction	43
2.2 Design of single-molecule analysis algorithm	43
2.3 Structure of single-molecule data	44
2.4 Registration of single-molecule signals	44
2.4.1 Filter of background noise and primary identification of single-molecule candidates	44
2.4.2 Remove overlapping single-molecule signals	47

2.4.3 Define sampling pixels for single-molecule signals	50
2.5 Fitting of single-molecule fluorescent trajectories.....	51
2.6 Measurement of single-molecule photophysical properties.....	54
2.6.1 Measurement of single-molecule brightness.....	54
2.6.2 Measurement of single-molecule blinking statistics	55
2.6.3 Measurement of single-molecule photostability	56
2.6.4 Measurement of other properties of single-molecule signals.....	56
2.6.5 Statistic characteristics of single-molecule photophysical properties..	57
2.7 Development of single-molecule analyzing software	58
2.8 Conclusion.....	62
3 Design, synthesize and super-resolution imaging performance of rhodamine spiroamides with lengthened on time.....	64
3.1 Introduction	64
3.2 Molecular design strategy to lengthen the on time of rhodamine spiroamides	65
3.3 Synthetic method of rhodamine spiroamides with lengthened on time	65
3.3.1 Synthetic route of rhodamine spiroamides with lengthened on time ...	67
3.3.2 Synthesis of Rh-Gly, Rh-Asp, Rh-Ser and their methyl ester analogues	69
3.3.3 Synthesis steps of Rh-Gly-Halo	71
3.3.4 Synthesis steps of Rh-Gly-NCS	73
3.4 Experimental section	76
3.4.1 Spectral measurement of Rh-Gly and Rh-MGly.....	76
3.4.2 Components of localization microscopy	76
3.4.3 Photoactivation experiment of Rh-Gly	77
3.4.4 Single-molecule imaging in thin polymer film	77
3.4.5 Cell culture & staining procedure of Rh-Gly and its biologically functional derivatives	78
3.4.6 Two-color confocal fluorescent imaging of Rh-Gly and Mitochondrial deep red	79
3.4.7 Photoactivation localization super-resolution imaging through Rh-Gly and its biologically functional derivatives	79
3.4.8 Post-analyze of localization super-resolution imaging data from Rh-Gly and its biologically functional derivatives	79
3.5 Results and discussion.....	80

3.5.1	Photoactivation properties of Rh-Gly and Rh-MGly	80
3.5.2	pK _a studies of Rh-Gly and Rh-MGly	83
3.5.3	Single-molecule fluorescence on-time measurements and evaluation of super-resolution imaging capabilities of Rh-Gly	84
3.5.4	Rh-Gly for PALM imaging of mitochondria in live cells.....	90
3.5.5	Rh-Gly-labeled HaloTag for PALM imaging of fusion proteins in live cells.....	95
3.5.6	Rh-Gly-labeled antibody for PALM imaging of microtubules	96
3.6	Conclusion.....	98
4	Design, synthesis and super-resolution imaging performance of quaternary piperazine substituted rhodamine with superior brightness.....	100
4.1	Introductinon	100
4.2	Molecular design strategy of quaternary piperazine substituted rhodamines	100
4.3	Synthetic method of quaternary piperazine substituted rhodamines.....	101
4.3.1	Synthetic route of quaternary piperazine substituted rhodamines	101
4.3.2	Synthetic steps of Lyso-R, MPR and Mem-R.....	104
4.3.3	Synthetic steps of 4-MPR-COOH	105
4.3.4	Synthetic steps of Mem-TMR	107
4.3.5	Synthetic steps of quaternary piperazine substituted naphthalimides and their dimethyl amino substituted analogues	108
4.3.6	Synthetic steps of quaternary piperazine substituted NBD and their dimethyl amino substituted analogues	110
4.4	Experimental section	112
4.4.1	Spectroscopical studies of quaternary piperazine substituted fluorophores and their dimethyl amino analogues	112
4.4.2	Types of imaging microscopies.....	113
4.4.3	Antibody labeling method of MPR and TMR.....	113
4.4.4	Single-molecule experiment of MPR-IgG and TMR-IgG	113
4.4.5	Transfection of LAMP1-mGFP plasmid and cell culture of HeLa cells	114
4.4.6	Staining procedure of lysosomal colocalization analysis and confocal imaging of plasma membrane	114
4.4.7	Staining procedure of quaternary piperazine substituted fluorophores and their comparing markers.....	114
4.4.8	Lysosomal colocalization analysis and confocal fluorescent imaging of plasma membrane.....	115

4.4.9	Super-resolution imaging of quaternary piperazine substituted fluorophores and their comparing markers	115
4.4.10	Post-analysis of super-resolution imaging data of quaternary piperazine substituted fluorophores and their comparing markers	116
4.5	Results and discussion.....	117
4.5.1	pK_a measurements of piperazine substituted fluorophores	117
4.5.2	Spectroscopical measurement and brightness compare of of quaternary piperazine substituted fluorophores	119
4.5.3	Study of brightening mechanism of quaternary piperazine substituted strategy	124
4.5.4	Single-molecule measurement of MPR and TMR	127
4.5.5	Super-resolution imaging of microtubules with MPR labelled antibodies and its comparison with the imaging results from TMR.....	134
4.5.6	Super-resolution imaging of plasma membrane in living cells with Mem-R and its comparison with imaging results of Mem-TMR.....	139
4.5.7	Super-resolution imaging of lysosomes in living cells with Lyso-R ..	143
4.5.8	Discussion on the blinking mechanism of Mem-R and Lyso-RH in living cells.....	147
4.6	Conclusion.....	147
5	Conclusion and outlook.....	148
5.1	Conclusion.....	148
5.2	Innovative points	149
5.3	Outlook.....	149
	References	150
	Appendix A Characterization data of compounds	163
	Appendix B Blinking model of photoactivated fluorophores	188
	Appendix C Supplemental imaging results of Rh-Gly.....	190
	Research project and research achievements as a Ph.D candidate.....	197
	Acknowledge.....	199
	About the author.....	200

图目录

图 1.1 衍射极限限制远场光学显微镜的分辨率	1
图 1.2 多维度超分辨光学成像	2
图 1.3 单分子定位超分辨成像的原理	3
图 1.4 单分子光转换模型、单分子荧光轨迹图及实验中单个分子的闪烁	4
图 1.5 单分子亮度影响定位的精确度和准确性	6
图 1.6 染料闪烁特征影响超分辨重构结果	7
图 1.7 光漂白速率影响超分辨成像的重构质量	9
图 1.8 氮杂四元环类罗丹明染料 (Jenelia Fluor)	14
图 1.9 氮杂三元环萘酰亚胺通过上-上构型压制分子内扭曲电荷转移态	14
图 1.10 通过位阻抑制罗丹明的非辐射跃迁	15
图 1.11 取代基供电子能力减弱的罗丹明染料	15
图 1.12 双键构型固定的菁染料	16
图 1.13 染料激活的模式	17
图 1.14 叠氮基笼化的 DCDHF 染料	18
图 1.15 重氮笼化罗丹明的策略	18
图 1.16 改良的笼化罗丹明染料	19
图 1.17 亚硝基笼化的罗丹明	20
图 1.18 其它笼化策略	20
图 1.19 可光转换的罗丹明螺内酰亚胺	21
图 1.20 改进的罗丹明螺内酰亚胺衍生物	22
图 1.21 二芳烯染料的结构及其光致开关变化机理	23
图 1.22 水溶性二芳烯衍生物 1-28 以及其超分辨成像结果	23
图 1.23 螺吡喃和螺噁嗪染料	25
图 1.24 自闪烁的硅基罗丹明	26
图 1.25 点累积纳米形貌成像的机理	27
图 1.26 点累积纳米形貌成像方法的改良及应用	28
图 1.27 结构修饰改进染料的光稳定性	29
图 1.28 自修复染料	31
图 1.29 绿色荧光蛋白结构及荧光蛋白的 PALM 成像	32
图 1.30 自标记蛋白标签技术及特定位点非天然氨基酸修饰技术的原理	33

图 1.31 自标记标签蛋白反应配体结构	34
图 1.32 自标记蛋白标签技术的合成荧光染料结构及其超分辨成像结果	35
图 1.33 适用于自标记蛋白标签技术及生物正交反应的硅基罗丹明	35
图 1.34 特定位点非天然氨基酸修饰技术中的生物正交反应	37
图 1.35 细胞亚细胞结构的靶向配体	38
图 1.36 小分子荧光标识物用于超分辨成像	39
图 2.1 提取单分子信号过程的数学模型包含的数据结构	44
图 2.2 单分子成像结果的聚类分析	50
图 2.3 单分子光物理性质的测量示意图	54
图 2.4 采样方式对单分子性质统计结果的影响	58
图 2.5 单分子分析软件流程图	59
图 2.6 单分子分析软件界面	60
图 2.7 单分子分析软件输出结果	61
图 2.8 单分子统计分析软件界面及其典型分析结果	62
图 3.1 稳定激活后罗丹明螺内酰亚胺双离子结构的机理	66
图 3.2 本章中研究化合物的合成路线	68
图 3.3 Rh-Gly 在薄膜和溶液中的吸收光谱	80
图 3.4 甘氨酸罗丹明及其甲酯类似物的光激活前后光谱研究	81
图 3.5 Rh-Gly 的光激活实验	82
图 3.6 质子加成的 Rh-Gly 与 Rh-MGly 的螺环开关环平衡	83
图 3.7 基于罗丹明螺内酰亚胺单分子性质完成的拟合和预测	86
图 3.8 本研究中提出的解释罗丹明螺内酰亚胺闪烁的机制	87
图 3.9 Rh-Gly 在 HeLa 和 MCF-7 细胞系的双色共定位分析	91
图 3.10 Rh-Gly 染色的活 HeLa 细胞和 MCF-7 细胞的线粒体聚集区域超分辨成像	92
图 3.11 对图 3.10a 和图 3.10b 的定位的傅立叶环相关曲线分析 ^[165]	94
图 3.12 对活 HeLa 细胞细胞核的组蛋白超分辨成像	96
图 3.13 固定 HeLa 细胞中微管的超分辨成像	97
图 3.14 图 3.13 重构图的单分子亮度直方图	98
图 4.1 季铵化哌嗪罗丹明分子设计策略	101
图 4.2 季铵化哌嗪罗丹明的合成路线	102
图 4.3 季铵化哌嗪染料及其二甲氨对比染料的合成路线	103

图 4.4 味嗪罗丹明在 PBS 中的质子化过程的 $pK_{1/2}$ 测量	118
图 4.5 HP-Naph 和 HP-NBD 在 PBS 中的质子化 pK_a 测量	119
图 4.6 基于季铵化味嗪策略的荧光团的紫外可见吸收及荧光光谱	122
图 4.7 罗丹明染料在水中和缓冲液 (PBS) 中的吸收和荧光光谱	123
图 4.8 溶剂分子和质子化氨基的氢键作用	125
图 4.9 Lyso-RH 和 TMR 的溶剂变色效应	127
图 4.10 MPR-IgG 和 TMR-IgG 的单分子荧光信号	127
图 4.11 MPR-IgG 和 TMR-IgG 在 PBS 缓冲体系下不同激光照明强度的单分子特征	130
图 4.12 MPR-IgG 和 TMR-IgG 在成像增强液 (200 mM 疏基乙胺) 体系下不同激光照明强度的单分子特征	131
图 4.13 在不同标记密度下对 MPR 和 TMR 能够获得的重构成像图的模拟	133
图 4.14 固定 HeLa 细胞中微管的超分辨成像	135
图 4.15 MPR 和 TMR 的超分辨成像结果比较	136
图 4.16 定量化以固定 HeLa 细胞免疫标记微管方法比较 MPR 和 TMR 的超分辨成像能力	137
图 4.17 对比通过 MPR 和 TMR 单标记二抗完成的微管超分辨成像	138
图 4.18 在活 HeLa 细胞中 Mem-R 与 Mem-TMR 的共聚焦荧光成像	140
图 4.19 Mem-R 的细胞膜超分辨成像	141
图 4.20 通过 Mem-TMR 和 Mem-R 染色活细胞的细胞膜超分辨成像比较	142
图 4.21 Mem-TMR 和 Mem-R 重构成像结果的定位密度比较	142
图 4.22 Lyso-R 酸性亚细胞器选择性标记的机理示意图	143
图 4.23 Lyso-R 与溶酶体相关膜蛋白 (Lamp-1) 的共定位分析	144
图 4.24 Lyso-Rh 的活细胞溶酶体超分辨成像	145
图 4.25 Lyso-RH 和 LysoTracker Red (商品化溶酶体探针) 在活 HeLa 细胞中超分辨成像溶酶体的单分子亮度对比	146

表目录

表 3.1 七种罗丹明螺内酰亚胺的单分子表征实验	88
表 3.2 罗丹明螺内酰亚胺的单分子单帧收集光子数、闪烁次数、定位精度的比较	89
表 3.3 活细胞线粒体单分子定位超分辨成像比较	95
表 4.1 季铵化哌嗪取代染料在水中的光谱性质	120
表 4.2 其它季铵化哌嗪罗丹明和 Mem-TMR 的光物理性质。	120
表 4.3 Lyso-RH 和 TMR 在不同溶剂中的光谱性质	124
表 4.4 Lyso-RH 和 TMR 在水和甘油混合溶剂中的光谱性质	126
表 4.5 MPR-IgG 和 TMR-IgG 的单分子性质	129
表 4.6 活细胞溶酶体的定位型超分辨成像比较	146

主要符号表

符 号	代表意义	单 位
σ	定位不确定度、定位精度	nm
N	光子数	光子
a	像素点尺寸	nm
k_r	分子暗态到亮态转换速率	s ⁻¹
k_d	分子由亮态转换到暗态转换速率	s ⁻¹
k_b, k_{bleach}	分子漂白速率	s ⁻¹
τ_{on}	平均亮态持续时间	s
τ_{dark}	平均暗态持续时间	s
$f(t_i)$	单分子亮度、单分子单帧光子数	光子
t_{on}	亮态持续时间	s
t_{dark}	暗态持续时间	s
$r(t_i)$	单分子荧光发出速率	光子/s
SNR	信噪比	
λ_{Ab}	荧光团最大吸收波长	nm
λ_{Em}	荧光团最大发射波长	nm
Φ	荧光量子产率	
ε	摩尔消光系数	mol/(L ⁻¹ ×cm ⁻¹)
Δf	Onsager 极性	
α	Kamlet-Taft 模型的模型的氢键供体能力	
β	Kamlet-Taft 模型的溶剂氢键受体能力	
π	Kamlet-Taft 模型的溶剂极性	
η	粘度	cP
Z	溶剂的 Kosower's 性质	
$pK_{1/2}$	半质子化的 pH 值	
pK_a	酸解离常数	
$R_{Nyquist}$	基于 Nyquist-Shannon 标准计算的空间分辨率	nm

英文缩写表

英文缩写	英文全称
¹³ C NMR	Carbon-13 (C13) nuclear magnetic resonance
¹ H NMR	Proton nuclear magnetic resonance
AOTF	Acousto-optic tunable filter
BIC	Bayesian information criterion
BINAP	(±)-2,20-Bis(diphenylphosphino)-1,10-binaphthalene
BRB80	Brinkley renaturing buffer 80
Cep-41	Centrosomal protein 41
CLIP-tag	Mutant of AGT that reacts specifically with O ² -benzylcytosine derivatives
cMOS	Complementary metal–oxide–semiconductor
COT	1,3,5,7-Cyclooctatetraene
Cox-8A	Cytochrome c oxidase subunit 8A
CRISP	Continuous reflective Interface Sample Placement
DCDHF	2-dicya-nomethylene-3-cyano-2,5-dihydrofuran
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	N,N-Dimethylformamide
dSTORM	direct STORM
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDCI	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride
EMCCD	Electron-multiplying charge-coupled device (CCD)
FBS	Fetal bovine serum
FPALM	Fluorescence photoactivation localization microscopy
FRC	Fourier ring correlation
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GDSIM	Ground state depletion microscopy followed by individual molecule return
GFP	Green fluorescent protein
GluK2	Kainate receptor
H2B	Histone protein H2B
Halo-tag	Modified haloalkane dehalogenase that covalently bind to synthetic ligands (Halo-Tag ligands)

英文缩写表 续表

HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate
HeLa	HeLa cell
HPLC	High-performance liquid chromatography
HRMS	High-resolution mass spectrum
LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein 1
MCF-7	Human breast cancer
MEA	Cysteamine
MSD	Mean square displacement
NBD	Nitrobenzoxadiazole
NGS	Normal goat serum
NPA	<i>p</i> -nitrobenzyl alcohol
PAINT	Point accumulation of imaging nanoscale-topography
PALM	Stochastic optical reconstruction microscopy
PBS	Phosphate buffer saline
PBST	PBS buffer contained 0.1% tween-20
PSF	Point spread function
PVA	Polyvinyl alcohol
RESOLFT	Reversible saturable optical fluorescence transitions
SIM	Structured-illumination microscopy
SMLM	Single-molecule localization microscopy
SNAP-tag	Mutant of the human DNA repair protein O ⁶ -alkylguanine- DNA alkyltransferase (AGT) that reacts specifically with benzylguanine (BG) or benzylchloropyrimidine (CP) derivatives
SNR	Signal-to-noise ratio
SOFI	Super-resolution optical fluctuation imaging
STED	Stimulated emission depletion
STORM	Stochastic optical reconstruction microscopy
TCSPC	Time correlated single photon count
TICT	Twisted intramolecular charge transfer
TIRF	Total internal reflection fluorescence microscopy
TLC	Thin-layer chromatography
TMP-tag	eDHFR protein that selectively labels trimethoprim
TNER1	Tumor necrosis factor receptor 1
TSQ	Triplet state quencher

1 绪论

1.1 研究背景与意义

荧光显微镜是人们理解和认识微观世界的重要工具，然而由于光学衍射极限 (Abbe diffraction limit) 的限制，传统的远场显微镜不能分辨尺寸小于 200 nm 的结构。如图 1.1 所示，将点光源置于二维空间中心位置，由于衍射以及光的统计特征，其发射的光子并不能精确在远端相机上提供准确的位置信息；在收集几百甚至几千个发射光子后，将获得点光源的光斑，其中心结构艾里斑的直径大约与发射波长相等；而当两个点光源空间距离过近（小于艾里斑的半径时， $< 200 \text{ nm}$ ），显微镜相机上只能显现出一个光斑，无法分辨两个发射源的存在。

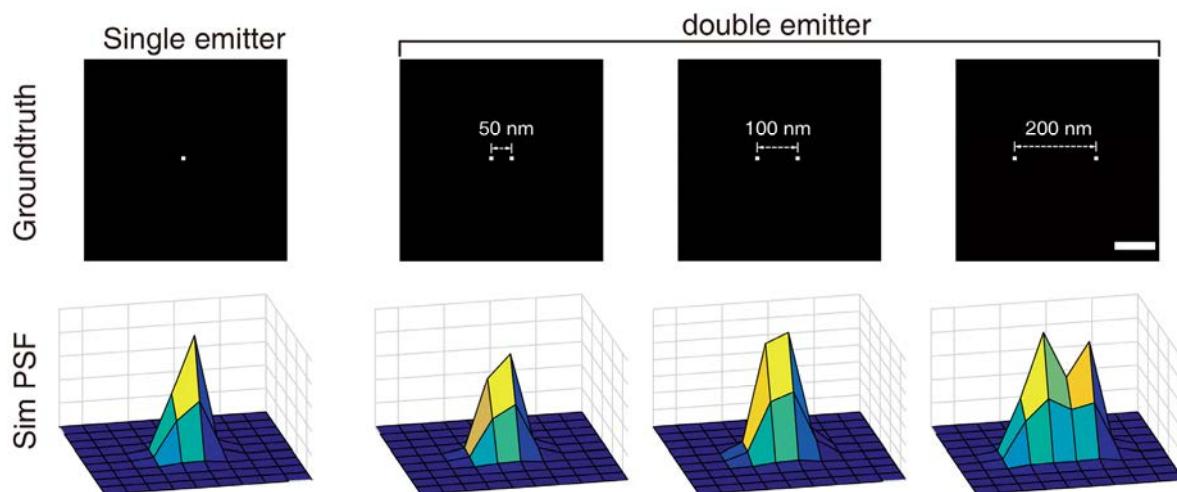


图 1.1 衍射极限限制远场光学显微镜的分辨率，标尺：100 nm

Figure 1.1 Diffraction limit restricts the resolvability of far-field optical microscopy. Scale bar: 100 nm.

为了改善显微镜的分辨率，科学家开发了去卷积 (deconvolution)、共聚焦成像 (confocal imaging) 等成像技术，但这些成像方法所能够取得的分辨率 (xy, 150-200 nm; z, 500-800 nm) 仍然十分有限。另一方面，为了更精确的获得高分辨率的信息，研究者使用波长更短的电子显微镜和 X-射线显微镜，但这些技术通常要求对样本进行特殊的固定，不能够实现活体实时观察。不仅如此，这些技术通常缺乏有效的标记手段，难以多维度选择性的获取样品信息。因此，研究者致力于发展突破光学显微极限的先进光学成像技术。

超分辨显微成像（Super-resolution imaging）的发展极大的突破了传统的衍射极限，提供了分子水平的细节信息，改革了生命科学乃至材料科学的研究方法，极大促进了这些领域内科学的研究的进步。这些先进光学显微镜的平面（xy）分辨率达到了 10-100 nm，轴向（z）分辨率也达到了 20-150 nm，结合荧光染料的高特异性靶向标记功能以及发射光谱的多色可选择特征，可以从多维度对目标结构进行超高分辨率的成像测量（图 1.2）。因此，2014 年诺贝尔化学奖授予了超分辨成像领域的三位重要科学家 Eric Betzig, Stephen Hell 和 William Moerner，以表彰他们为超分辨显微镜的开发做出的杰出贡献。

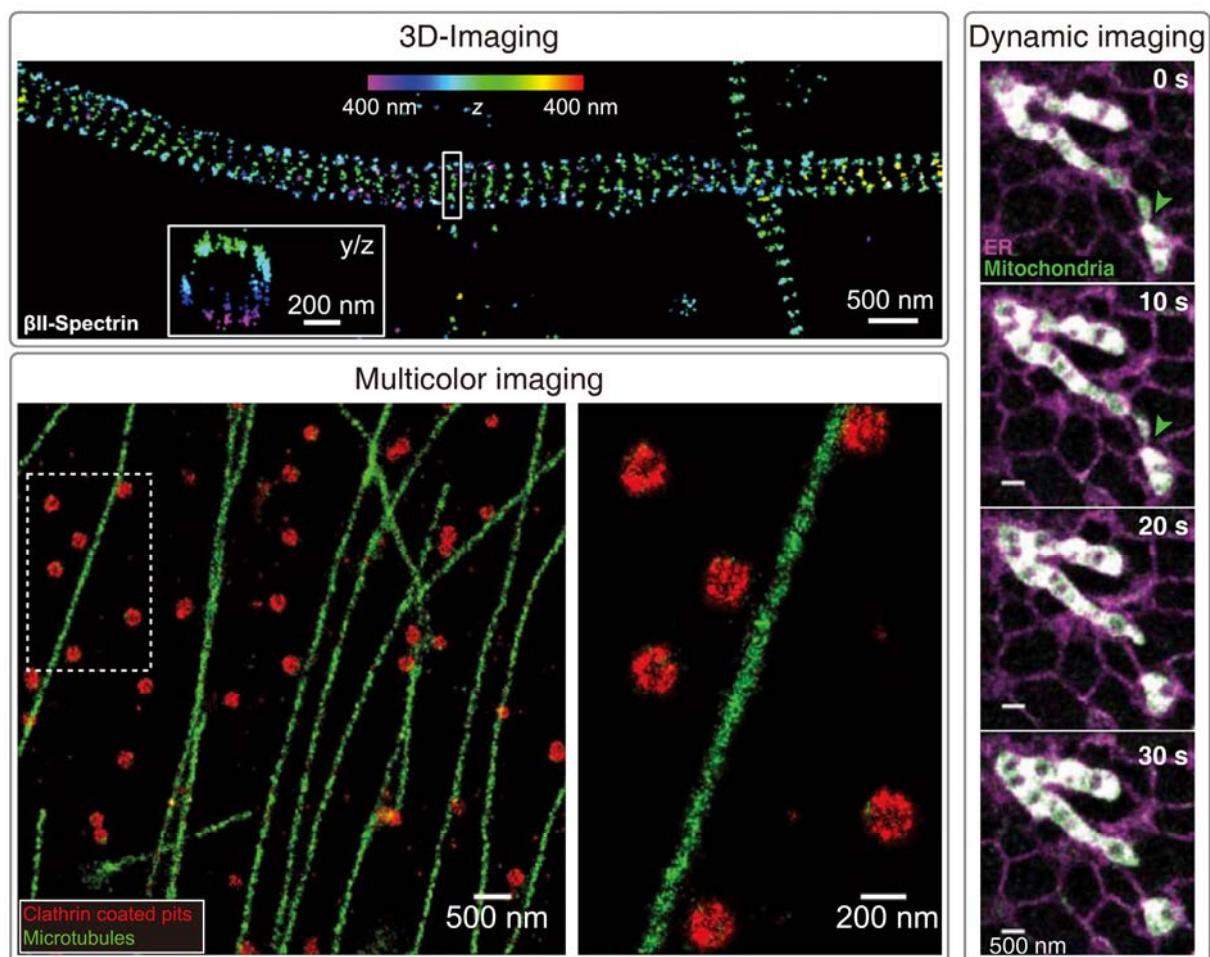


图 1.2 多维度超分辨光学成像，图来源于文献^{[1]-[3]}

Figure 1.2 Multidimensional super-resolution imaging. Images reproduced from references^{[1]-[3]}.

超分辨成像技术包括受激发射损耗(Stimulated emission depletion, STED)显微镜^[4]、光激活定位显微镜(Photoactivated localization microscopy, PALM)^[5]、随机光学重建显微镜(Stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)^[6]以及结构照明显微镜(structured-illumination microscopy, SIM)^[7]等。从超分辨的原理出发,上述显微镜可划分为三类: 1) 通过引入中心强度为零的环状(doughnut-shape)饱和光,将除中心之外的染料分子限制在基态,因而建立超越衍射极限的极小的激发空间限域,通过对整个样品进行扫描最终完成超分辨成像,这种模式可称之为 STED; 2) 在频率域(frequency space)改造激发光,形成与莫尔条纹(Moiré patterns)类似的干涉条纹,收集经过上述激发光频率调制后的样品荧光信号,重构出超越衍射极限的结构特征,这类的技术可统称为 SIM; 3) 控制染料在时空中稀疏的发光(图 1.3),对每一个单分子信号进行点扩散函数(PSF)的统计学近似拟合,获取其在空间中的准确位置,最终通过积累足够的定位信息描绘出结构的微观细节,这一类技术包括 PALM 和 STORM 等,可归纳为单分子定位超分辨显微镜(SMLM)或简称为定位型超分辨显微镜。

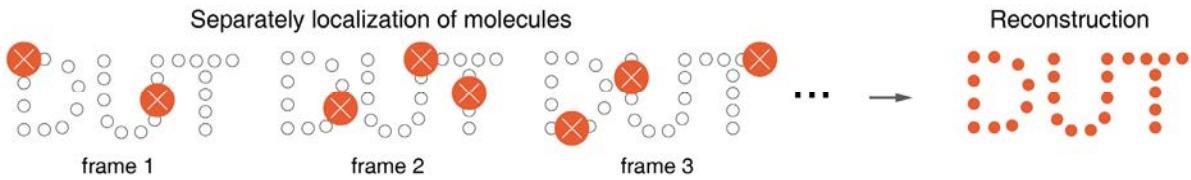


图 1.3 单分子定位超分辨成像的原理

Figure 1.3 Schematic illustration of the principle of single-molecule localization super-resolution imaging.

相较于超分辨技术 STED 和 SIM, 定位型超分辨成像具有成像分辨率高和设备要求低的优势。定位型超分辨成像基于对单分子的信号统计学分析, 从原理上已经达到逐个对分子的定位水平, 因此是分辨率最高的超分辨成像技术之一。同时从单分子直接读取数据, 可以挖掘整体平均成像研究丢失的单分子亚簇群信息。另外, 由于不依赖复杂的激发光改造, 定位型超分辨成像在普通的宽场荧光显微镜上即可完成, 对设备的要求较低。

定位型超分辨成像对荧光染料提出了极高的要求。该技术建立在染料的稀疏发光上,需要具有光转化(photoswitching)能力的染料^{[8],[9]}。如图 1.4a 所示, 染料必须能够在被漂白前完成至少一次从暗态到亮态的转换,且不同染料形成的亮态需在时空中孤立,避免产生重叠。图 1.4b 展示了一个发生多次闪烁的染料分子的荧光强度轨迹图。这个分子

在记录初始阶段处于暗态（或未被激活），随着记录时间的延长，分子从暗态转换到亮态（或激活到亮态），其后发生多次亮暗态间的转化，并且每次亮态和暗态的过程具有不同的时间，从而形成了闪烁的特征（图 1.4c）。

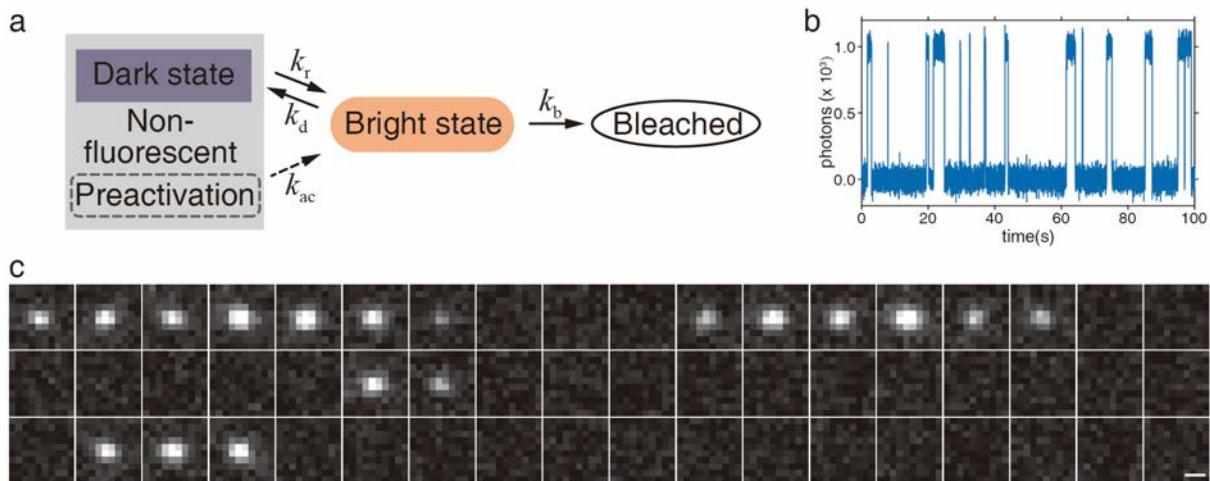


图 1.4 单分子光转换模型 (a)、单分子荧光轨迹图 (b) 及实验中单个分子的闪烁 (c)，标尺: 500 nm。

Figure 1.4 Photoswitching model of single molecule (a), single-molecule fluorescence trajectory (b) and experimental blinks of a single molecule (c). Scale bar: 500 nm.

为实现染料有效的光转化，研究者提出了不同的控制方法，其中包括 STORM^[6]、PLAM^[5]、FPALM^[10]、GDSIM^[11]、dSTORM^[12]等。上述方法按照染料进入转化的方式大致分成两类：其一，染料在初始时候处于亮态，通过高功率激光的“漂白”以及相应的成像环境控制将染料分子压制到稀疏的随机发光，这一类可归纳为压制型，包括 STORM、GDSIM 和 dSTORM；其二，染料初始处于暗态，在成像中随机的转化到亮态继而实现染料整体的持续稀疏发光，这一类可归纳为激活型，包括 PALM 和 FPALM。然而，在压制型成像中，成像增强剂具有细胞毒性且通常需要使用除氧体系，因此该技术通常不适用于活细胞成像；第二种方式虽可免于有毒害的成像液体系，但是在该技术广泛应用的荧光蛋白相比于有机小分子染料的亮度和稳定性弱^[13]，而有机小分子染料的分子设计策略仍然十分有限，需要改善染料较弱的生物相容性。

超分辨技术也对染料的标记性能和稳定性提出了很高的要求。为了在活细胞标记成像中应用，染料需要具有良好细胞膜通透性和亚细胞器结构（以及蛋白、生物活性分子）的准确靶向以及选择性标记能力。同时，染料也应具有良好的稳定性，可以在目标结构

上形成稳定闪烁的单分子信号，通过这些信号的收集定位反应结构的细节特征。相较于普通光学成像，超分辨成像总是需要更多的荧光信号来重构解析出更高分辨率的微观信息。

总之，超分辨成像，尤其是单分子定位超分辨成像，显现出对高性能的荧光染料显著的依赖性。下文将对影响定位型超分辨成像的染料性质进行详细讨论。

1.2 影响单分子定位超分辨成像的荧光染料性质

1.2.1 荧光染料的亮度

荧光染料的亮度影响定位型超分辨成像的定位准确度^[14]。在定位型超分辨成像中，单分子的定位是通过分析其光斑的点扩散函数（Point spread function, PSF）获得。由于光具有统计特征，因此增加单分子发射光子数量，能够减少光子随机分布对光斑 PSF 的干扰，从而更准确的给出单分子的定位。图 1.5a 和 d 展示了两个光子收集总数分别为 100 和 1000 的单分子信号，图 1.5b 和 e 给出了这两种单分子信号 1000 次单分子定位模拟的结果，而在图 1.5c 和 f 中给出了定位结果中心区域的放大图。模拟的结果显示：当单分子信号的收集光子数增加时，单分子拟合算法的准确性和精确性将会极大提升。因此，单个分子的收集光子数，即单分子亮度或者荧光染料的亮度，决定了最终成像的定位精确度和准确性。

基于上述事实，Thompson 等^[15]推导出单分子定位的不确定程度 (σ) 近似与单分子收集光子的个数的平方根 (\sqrt{N}) 成反比，见公式 1.1：

$$\sigma^2 = \frac{s^2 + a^2/12}{N} + \frac{4\sqrt{\pi}s^3b^2}{aN^2} \quad (1.1)$$

其中， s 为 PSF 的标准方差（Standard deviation）， a 为图像上每个像素点的实际尺寸， b 为背景噪音信号。

总之，单分子的亮度，即荧光染料的亮度是提升定位型超分辨成像的关键。在光谱研究中，染料的亮度定义为量子产率和摩尔消光系数的乘积。因此，提高染料的摩尔消光系数或量子效率，或者同时提高两个参数，将提高单分子的亮度，提升染料超分辨成像应用的潜力。

另一方面，单分子的亮度也受到染料荧光发射的持续性影响。单分子亮度的提升来源于收集荧光光子绝对数量的增加，因此荧光染料多次充分的激发将扩大其发射的光子数从而提高单分子亮度。然而因为受到定位型超分辨成像原理的限制，荧光染料的亮态延长需要与其闪烁稀疏度综合考量。在能够保证单分子信号稀疏度的前提下，延长荧光染料的亮态时长，也可以提高荧光染料单分子亮度。

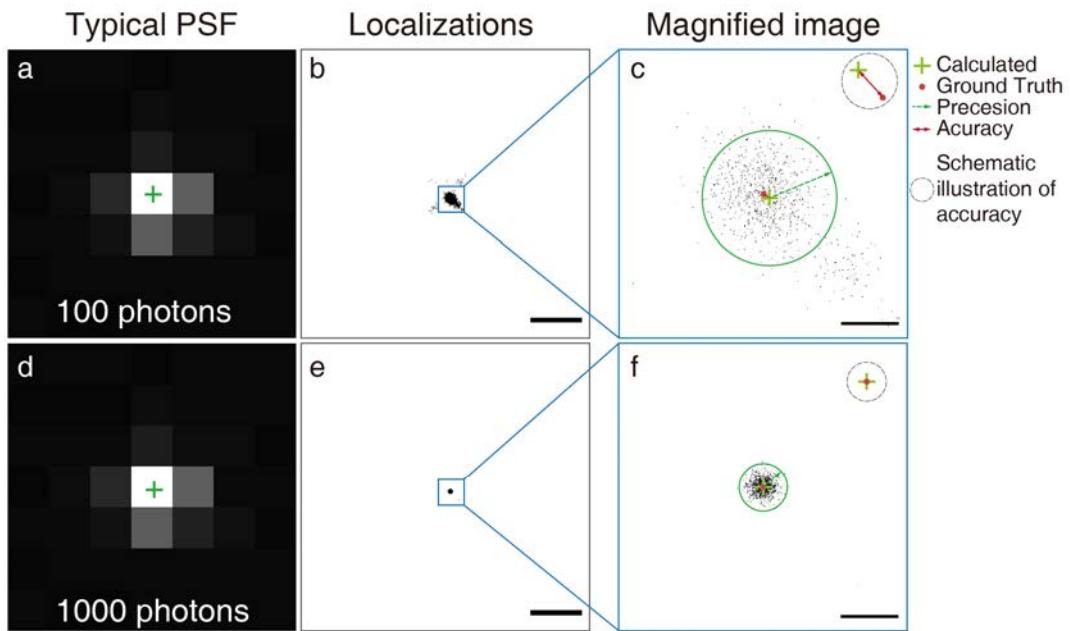


图 1.5 单分子亮度影响定位的精确度和准确性, 标尺: 200 nm (b 和 e)、20 nm (c 和 f)

Figure 1.5 The effect of single-molecule brightness towards the precision and accuracy of localizations. Scale bar: 200 nm (b and e); 20 nm (c and f).

1.2.2 荧光染料的闪烁特征

定位型超分辨成像的实现依赖于在时空上分隔的染料单分子信号。虽然近年来改进的超分辨算法能够从高密度甚至重叠的单分子数据中挖掘分子定位信息^{[16]-[18]}, 但是这些算法的定位准确度受到贝叶斯信息准则的限制, 因而它们对高密度单分子数据定位准确度始终低于低密度稀疏数据的定位准确度。因此想要提升定位型超分辨成像质量, 染料必须具备形成稀疏孤立单分子信号的能力。

影响单分子信号稀疏程度的决定性因素就是染料的闪烁特征。按照与文献相似的光转换模型^[8] (图 1.4a), 染料的闪烁特征可用两个关键的速率来反映: 1)染料从亮态到暗态的转换速率 $k_d = 1/\tau_{on}$ (τ_{on} 是染料在亮态持续的平均时间); 2)染料从暗态到亮态的转换速率 $k_r = 1/\tau_{dark}$ (τ_{dark} 是染料在暗态持续的平均时间)。两个速率之比 (k_d/k_r) 决定了在达到平衡态时, 染料的单分子信号密度; 而两个速率的绝对值则决定了达到平衡态所需要花费的时间。

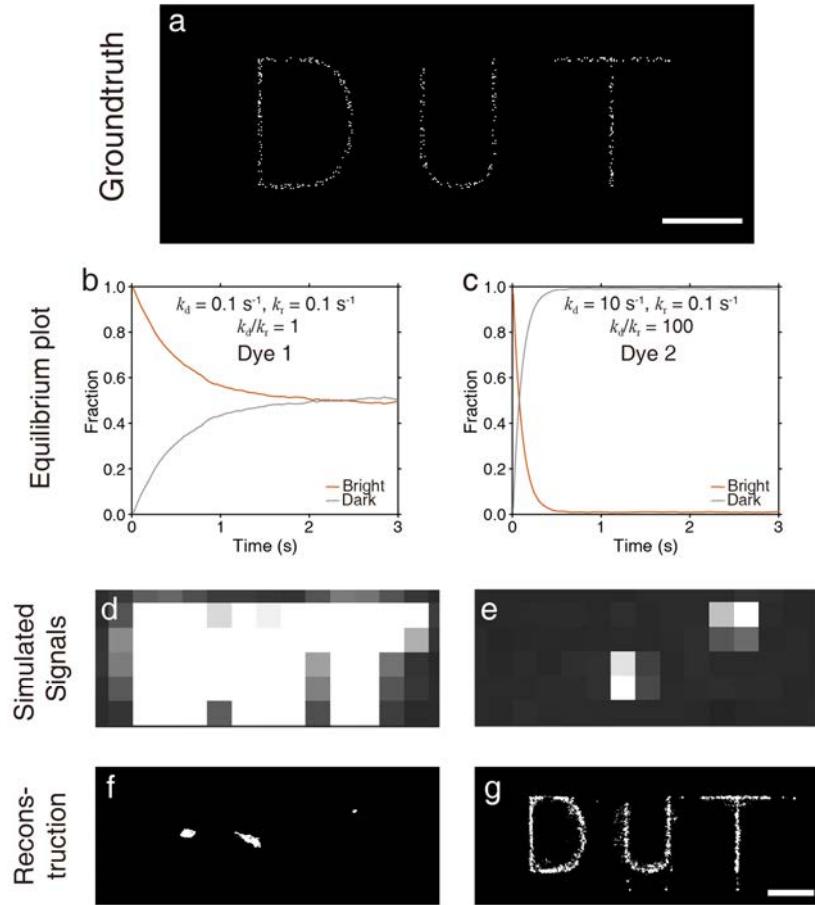


图 1.6 染料闪烁特征影响超分辨重构结果, 标尺: 300 nm

Figure 1.6 The impact of blinking characteristics towards super-resolution reconstruction.
Scale bar: 500 nm.

图 1.6 展示具有不同闪烁特征 (染料 1 vs 染料 2) 的两种染料的模拟结果。模拟的染料分布见图 1.6a, 假定所有染料遵循压制型染料的成像特征, 在开始阶段处于亮态, 且假定在成像中荧光染料不发生光漂白。在达到稀疏单分子发光前, 染料需要通过随机光转换达到亮暗态平衡, 图 1.6b 和 c 给出了达到平衡态过程中亮态和暗态分子比例的变化。两种染料的闪烁特征 ($k_d/k_r = 1$ vs $k_d/k_r = 100$) 不同, 具有较大的 k_d/k_r 比例值的染料 2 在达到平衡时, 处于亮态的分子比例更低, 更符合定位型超分辨成像在时空中稀疏和孤立单分子的要求。图 1.6d 和 e 给出了在达到平衡态时染料分子的模拟信号。由于染料 1 在平衡态的亮态比例过高, 其在成像中不能够产生稀疏的单分子信号, 模拟结果显示染料 1 的平衡态的分子信号叠加, 对染料 1 的模拟信号定位重构不能解析染料标记的结

构特征（图 1.6f）。而染料 2 的单分子信号在时空中稀疏分布（图 1.6e），其超分辨定位重构的结果与染料分布真实情况相符（图 1.6g）。

此外，虽然染料 1 不适用于定位型超分辨成像，但是其平衡态特征可能适用于其它超分辨成像（如 RESOLFT^[19]、SOFI^[20]等）。

另外，在压制型成像过程中，染料进入平衡态消耗的时间也是影响超分辨成像质量的重要因素。染料在进入平衡态前，往往不能够形成稀疏的单分子信号，在此阶段染料被激发产生的荧光信号通常不能够用于定位分析而直接损耗。因此缩短达到平衡时间，将提高荧光染料的光子利用率。对比两种模拟染料，由于染料 1 的转换速率较慢（ $k_d = 0.1 \text{ s}^{-1}$ ），染料 1 达到平衡态的时间消耗（2 s）要长于染料 2（ $k_d = 10 \text{ s}^{-1}$; < 1 s），因此在定位型超分辨成像中染料 1 的适用性更弱。

1.2.3 荧光染料的稳定性

超分辨成像需要比普通荧光成像更多的光子信息来获得微观的细节信息，因此染料的稳定性是影响超分辨成像质量的另一个关键因素。在定位型超分辨成像中染料的稳定性可以用三个关键参数来反映：1) 染料在猝灭前可收集到的总光子数；2) 染料的光漂白速率；3) 染料的闪烁次数（ N_{blinks} ，亮暗态转换次数）。

在不考虑成像系统收集效率的前提下，染料可收集的总光子数等价于其荧光量子产率与被激发到激发态的次数的乘积。因此，在染料的荧光量子产率确定的情况下，总光子数与染料在成像中发生漂白前，可被激发的次数成正相关，反映了染料的总体稳定性。

染料的光漂白速率（ k_b ）反映了染料在成像中不可逆漂白过程发生的快慢。染料在亮态和暗态均有可能发生漂白过程，因此该速率对应的绝对光漂白过程包括从两种状态发生的漂白。然而，暗态不能被直接测量（只能通过测量亮态来间接反映），因此通常情况下测量报告的速率表征了染料最后一次从亮态转换到暗态过程的发生快慢。

光漂白过程也影响染料的闪烁持续性，并对定位型超分辨成像重构的质量有较大的影响。图 1.7a 展示了不同漂白速率的染料（1、2 和 3）逐步达到闪烁平衡状态的时候，亮态、暗态和光漂白态所占比例的变化。三种染料的预设 k_d 与 k_r 完全相同，并且采用与图 1.6 中染料 2 相同的值以便分析漂白过程对超分辨成像结果的影响。从图 1.7a 中可以观察到，当染料的光漂白速率（ k_b ）逐渐增加时，染料在进入平衡闪烁状态前发生完全光漂白的比例也在增加。当 k_b （ 50 s^{-1} ，染料 3）是 k_d 5 倍的时候，达到平衡时只有< 20% 的染料没有发生光漂白。在这种情况下，这些处于暗态的染料在转换到亮态发光时，很快将发生漂白而失去被多次定位的可能性。因而，对于具有较高漂白速率的染料，其超分辨成像的重构质量将下降，并且很有可能不能够获得完整的标记结构信息（图 1.7b）。

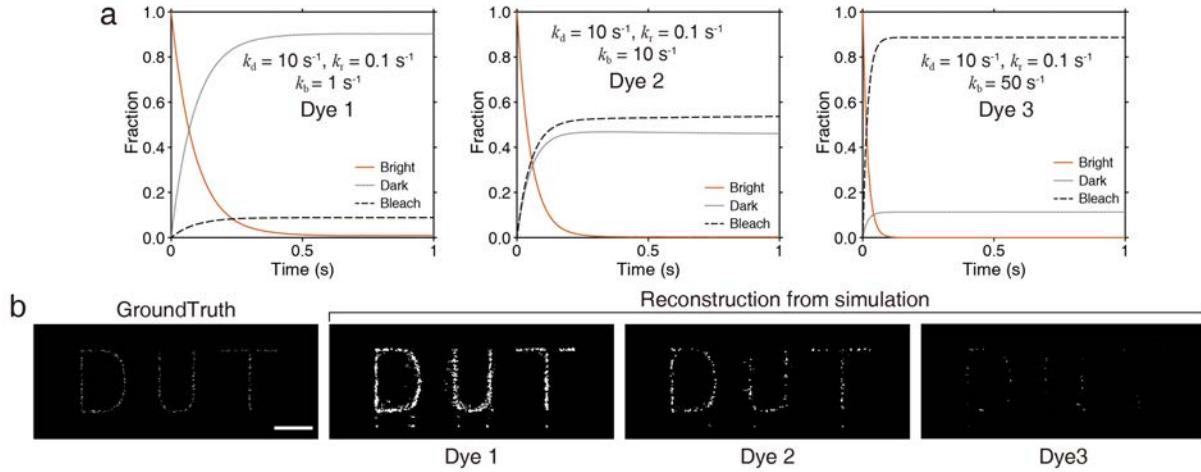


图 1.7 光漂白速率影响超分辨成像的重构质量, 标尺: 300 nm

Figure 1.7 Photobleaching rate correlates to the reconstruction quality of the super-resolution imaging. Scale bar: 300 nm.

染料的光漂白过程也影响与染料的亮暗态转换次数(闪烁次数), 因此染料的闪烁次数也反映了其稳定性。在定位型超分辨成像中, 单个分子多次有效的亮态可以增加定位次数, 提升超分辨重构分析结果的连续性和完整性。这一点对于压制型闪烁策略的染料来说尤为重要, 因为这些染料进入稀疏闪烁的平衡态前, 需要在压制过程消耗掉染料不少的闪烁循环, 因此遵循该策略的成像对染料的闪烁次数提出了更高的要求。然而闪烁次数不能直接用作染料稳定性的指标, 必须与染料闪烁特征一起考虑。例如, 在比较两个染料的稳定性时, 当其中染料 1 的转换速率(k_r 和 k_d) 显著的快于染料 2 时, 即使染料 1 的漂白过程发生比染料 2 更快, 但由于染料 1 的 k_r 和 k_d 过大, 其亮暗态转换发生过于迅速, 染料 1 可能拥有更多的闪烁次数。

如果假设光漂白过程仅发生在亮态, 根据近似的单分子闪烁数学模型, 染料的平均闪烁次数可以通过亮态到暗态的转换速率(k_d) 和漂白速率(k_b) 计算获得:

$$\langle N_{\text{blinks}} \rangle = \frac{k_d}{k_b} \quad (1.2)$$

方程 1.2 也同样验证了上面关于染料闪烁次数不能独立表征染料稳定性的情况。

总之, 染料可收集的总光子数越高, 光漂白速率越慢, 闪烁次数越多, 对于其定位型超分辨成像越有利。

1.2.4 荧光染料的标记能力

染料的标记能力决定了其超分辨成像定位结果的价值。相较于其它超分辨成像，定位型超分辨成像最具优势的特征是从单分子的水平上给出其定位信息，这种分子水平的分辨率对染料标记的选择性和准确性提出了极高的要求。非特异性的染料标记所产生的定位信息只能给成像带来干扰，只有准确靶向目标结构的染料分子的定位才能准确重构出未知的微观结构信息。因此，适用于定位型超分辨成像的染料必须具备有优越的标记的选择性与准确性。

标记选择性可用染料在靶标结构上的荧光信号与基底背景噪音信号之比来反映。对细胞进行标记的过程中，几乎所有的染料都会形成非特异的背景吸附：脂溶性较好的染料吸附于细胞的各种膜结构，带正电荷的染料倾向分布于线粒体与溶酶体，而染料在成像介质玻璃表面会有不同程度的吸附。在普通荧光成像中，由于采用的激发光源能量较低，这些背景干扰往往不明显；而在超分辨成像中，因为高能量光源的放大效应，这些背景噪声信号很可能对结果产生非常严重的干扰（尤其在非靶标结构上的单分子信号更亮且数量更多的情况下）。因此，超分辨成像要求染料具有非常高的靶向特异性，并且需要染料即使在高能量的激发光源照射条件下，也尽量避免在非标记结构上形成干扰的单分子信号。

标记准确性则决定了定位信息反映微观结构的准确性^[14]。标记准确性可以用两个参数来衡量：1)染料在目标结构的标记密度；2)标记后染料距离目标结构的距离。首先，准确的标记需要使用匹配结构细节复杂度的标记密度。越复杂的结构越需要更高的标记密度，通过更密集的分子标记对结构进行采样，最终这些定位密集标记的分子反映微观复杂的结构特征。其次，染料与标记结构之间的距离影响了定位分析的精确程度。由于定位型超分辨成像可以达到 $< 10 \text{ nm}$ 的分辨率，因此染料与标记结构的距离也会对定位重构的结果产生显著影响。例如，在免疫荧光染色中通常使用的两级抗体标记技术，因为抗体较大的实际尺寸，会造成染料与结构 $20\text{-}30 \text{ nm}$ 的空间位移偏差。这种偏差最终导致在使用两级甚至单级免疫标记微管时，通过定位型超分辨成像估计的微管直径尺寸（ $\sim 50 \text{ nm}$ ）比微管的真实尺寸要大 $\sim 30 \text{ nm}$ 。

另外，在活细胞成像中，染料的透膜性对定位超分辨成像质量产生较大的影响。在细胞膜和细胞膜表面的成像研究中，染料最好不具备膜通透性，以减少细胞内非特异性着色的干扰；对细胞内各种组分以及亚细胞器结构研究，则需要染料具备良好的膜通透性，以利于在活细胞的动态生理变化过程中对各种组分特异性染色成像。因此，染料在

设计时，需要考虑其标记对象的生物学特征，按照不同的设计完成染料的开发，以最大化程度优化标记成像结果。

1.2.5 其它影响超分辨成像的染料性质

由于闪烁机制的多样、单分子物理性质的差异和标记对象成像要求的差别，染料的超分辨成像质量也与其它上面未讨论的染料性质有关联。例如，对于激活型染料，其光激活效率、光激活波长都会影响单分子的闪烁模式。通常在活细胞成像中，倾向于使用可见光激活且激活效率较高的染料，因为紫外照射或者强光照射会对细胞的生理过程产生干扰。又比如，在多色超分辨成像实验中，多种染料的闪烁同步性，影响成像的信号收集效率；同步化闪烁的染料可以更有效率完成多色超分辨成像。再比如，未共价键连目标结构的染料的扩散运动也会对定位型超分辨成像产生较大的影响。在小分子染色成像实验中，单分子信号收集的时间不能太长，否则由于分子的快速扩散过程，单分子信号会产生动态模糊（Motion blur），干扰成像定位^{[3],[21]}。

1.2.6 总结

定位型超分辨成像对荧光染料的光物理性质提出了很高的要求。由于定位机理的要求，染料需要能够形成高亮度的单分子信号，同时在成像中完成尽可能多的有效闪烁；而由于标记准确性的要求，染料需要避免形成背景单分子信号，同时需要按照与目标结构细节匹配的密度近距离标记。然而到目前为止，真正能够完全满足上述要求的染料仍然十分缺乏，限制了定位型超分辨成像的拓展应用和深入开发。

此外，对于绝大部分超分辨染料，实际成像往往需要较高毒性的成像增强剂以及除氧体系来实现染料稳定的闪烁，因此，这些染料在活细胞成像中的应用十分有限。为此，开发不依赖于成像液体的超分辨染料具有十分重要的实际应用价值，将推动定位型超分辨成像技术在活细胞成像中的应用。

1.3 定位型超分辨成像的荧光染料研究进展

定位型超分辨成像技术的诞生与荧光染料闪烁现象的发现密切相关。早在上世纪 90 年代初，在低温单分子荧光的研究中，科学家已经发现单分子荧光发射强度的波动现象^{[22],[23]}。在 1995 和 1997 年，Trautman 和 Macklin^[24]、Lu 和 Xie^[25]在室温下观察到荧光染料的单分子荧光强度波动；1997 年，Moerner 等人^[26]也发现绿色荧光蛋白（GFP）在单分子发光时会出现闪烁和亮暗态转换的现象。虽然这些早期的研究已经揭示了荧光染料的单个分子可以发生的亮暗态的光转换，但是未找到有效的手段对这些转换进行控制。2002 年，Lippincott-Schwartz 等^[27]发展了可光激活的荧光蛋白；2005 年，Zhuang 等^[28]

和 Saeur、Tinnefield 等^[29]第一次实现了荧光染料单分子可控亮暗态光转换。这些可控荧光染料闪烁的实现，才真正建立了定位型超分辨成像的基础。基于以上发现，翌年（2006 年），三个研究团队（Betzig^[5]、Hess^[10]和 Zhuang^[6]）分别独立的开发了单分子定位型超分辨显微镜。由于采用了不同的激活技术，他们开发的显微镜被称为 PALM、FPALM 和 STORM，其中的 PALM 和 FPALM 均采用了可激活的荧光蛋白（PA-FP）作为检测底物，而 STORM 采用了有机小分子（Cy3 和 Cy5）配对体系。虽然底物不同，但这些方法均通过控制荧光染料的亮暗态光转换过程，形成时空中稀疏的单分子信号，通过 PSF 的数学模型对每个分子信号定位，最终通过收集所有分子的定位获得高分辨率图像。

定位型超分辨依赖于荧光染料的亮暗态光转换过程，然而当时使用的荧光染料非常局限，仅有 Cy3 和 Cy5 配对染料体系和一种 PA-FP 光激活荧光蛋白，不能够满足不同样品的成像需求。为此，研究者迫切地寻找具有亮暗态光转换功能的小分子荧光染料。在 2007 年，Bossi、Hell 等^[30]利用罗丹明螺内酰亚胺的光激活特性实现了稀疏化的闪烁信号，第一次成功的将罗丹明染料应用到定位型超分辨成像中。在 2008 年，Heilemann、Sauer 等^[12]通过成像液成功控制单一 Cy5 染料进行闪烁，第一次提出了 dSTORM 的技术理念；同年，Tinnefield 等^[31]通过对成像环境中氧化还原体系的改造，进一步揭示了成像液对染料亮暗态光转换调控的能力。这些结果进一步激励研究者对其它有机荧光染料进行定位型超分辨成像的尝试，在 2009 年，Heilemann、Sauer 等^[32]对一系列商品化的基于罗丹明荧光团的荧光染料进行了定位型超分辨成像尝试；同年，Zhuang 等^[33]尝试对 Cy5 染料的亮暗态转换机理进行了研究，揭示了还原性巯基对染料双键加成可获得稳定的暗态。在 2010 年，Sauer 等^[34]基于融合蛋白标签技术，在活细胞中利用小分子染料实现了细胞核定位型超分辨成像。在 2011 年，Zhuang 等^[35]对商品化小分子荧光染料完成了系统性的定位型超分辨成像能力评估，筛选出部分适合完成多色超分辨成像的小分子荧光染料。至此，通过对传统荧光染料的系统性挖掘，定位型超分辨成像应用广度也得到进一步的提高。

上述研究仅仅完成了小分子荧光染料在超分辨成像的初步应用尝试，定位型超分辨成像研究的深度、可适用性范围的拓展、应用潜力的开发仍需要比传统染料更高效的小分子荧光染料。因此，染料开发工作者进一步尝试从分子设计角度出发对染料进行分子加工，提升染料的定位型超分辨成像性能。2010 年，Hell 等^[36]设计了重氮盐式的新型笼化（Caged）罗丹明，具备定位型超分辨成像的潜力。2012 年，Zhuang 等^[37]使用硼氢化钠对已标记的染料分子进行还原，从而避免了压制型成像达到闪烁平衡前的消耗，提升了超分辨成像质量。2013 年，Johnsson 等^[38]首次将长波长的硅基罗丹明（肖义等^[39]首次

开发了该染料)标记到细胞内蛋白结构,完成了定位型超分辨成像。2014年, Urano 等^[40]通过改造硅基罗丹明的螺环取代基的亲核能力,构造了不依赖于激光和成像液体体系,通过自身开关环动态平衡实现稀疏单分子信号的自闪烁长波长荧光染料。他们通过这些染料的标记,在活细胞内实现了微管的动态超分辨成像。2015年, Lavis 等^[41]使用氮杂环丁烷取代传统罗丹明的二甲氨供体,提升了罗丹明染料的亮度。2017年, Belov、Irie、Hell 等^[42]通过对二芳烯的结构修饰与优化获得了不依赖于成像液体体系闪烁的定位型超分辨成像染料。2018年, Winter、Smith 等^[43]将开发了一种可光激活的 BODIPY, 并成功将该染料应用到定位型超分辨成像中。近年来,有机荧光染料分子结构的优化工作受到广泛关注,新型染料的开发将进一步推动定位型超分辨成像的进化和应用。

高性能的荧光染料是完成高质量超分辨成像的前提。然而,目前染料研究领域仍然缺乏荧光染料超分辨成像相关光物理性质(例如,闪烁特征)的研究,应当深入挖掘染料分子结构与这些性质的关联,优化提升荧光染料的超分辨成像能力,从理论上和应用上同时推进荧光染料在定位型超分辨成像中的开发应用。下文将按照染料的光物理性质分述领域内的重要贡献。

1.3.1 单分子亮度的提升

如 1.2.1 节所述,单分子信号的亮度决定了超分辨成像定位的精确性和准确性。荧光染料发射的光子越多,其定位分析的结果越准确。而染料的单分子亮度与其荧光量子产率成正相关。因此,许多研究者致力于优化染料分子结构提高其荧光量子产率,改善其单分子亮度,提升染料的超分辨成像质量。

其中最具代表性的研究当属 Lavis 等^{[41],[44],[45]}使用氮杂环丁烷替换传统二甲氨供体的分子设计策略。传统提高罗丹明荧光量子产率的策略需要对供体胺取代基进行扩环固定,导致染料的水溶性和生物相容性变差,不利于在生物相容的水环境下进行染料的标记和成像。2015年, Lavis 等^[41]对一系列氮杂多元环(三元环—七元环)取代的罗丹明进行了光谱研究,最终发现氮杂环丁烷取代的罗丹明(图 1.8, **1-2**)展现出两倍于四甲基罗丹明(**1-1**, TMR)的荧光量子产率,并且其单分子亮度也远高于传统的罗丹明。通过开发染料 **1-2** 的融合标签蛋白配体衍生物,他们证明了上述的取代策略可以应用于活细胞蛋白标记超分辨成像,并且该染料完成标记的信噪比优于传统染料标记结果。在这篇开创性工作中,他们还证明了这种氮杂环丁烷取代策略在不同种类荧光染料上的通用性。2016年,他们^[44]将上述强化亮度的策略迁移到重氮盐笼化的罗丹明上,获得了具有光激活特性的 PA-JF₅₄₉(**1-3**),进一步拓展了氮杂四元环策略在活细胞蛋白标签超分辨成像中的应用。2017年,他们^[45]继续通过控制氮杂环丁烷取代基的电子效应,获得了多种颜色

的罗丹明染料(**1-4**)。这些染料在透膜性、吸光性或者亮度上显现出相比于传统染料的优势，并且可以覆盖商品化激光的波长范围。

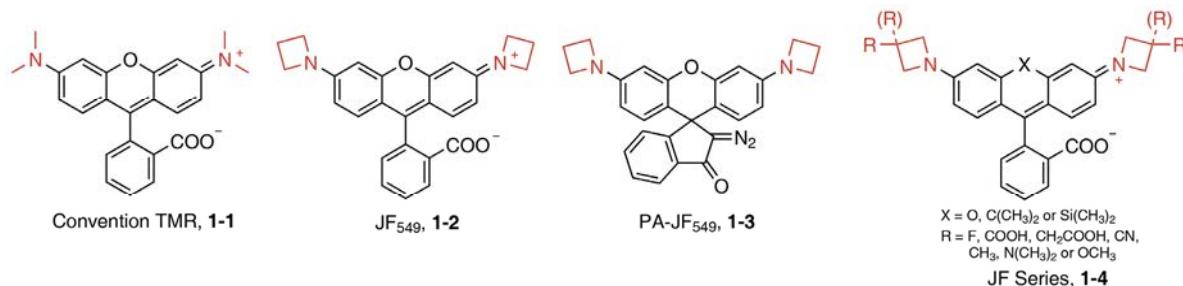


图 1.8 氮杂四元环类罗丹明染料 (Jenelia Fluor)

Figure 1.8 Azetidine substituted rhodamines (Jenelia Fluor)

Liu、Xu 等^[46]对吖丙啶取代的荧光染料也进行了细致的光物理研究工作。他们通过计算发现吖丙啶取代的萘酰亚胺 (图 1.9a, **1-5**) 在基态时处于上-上构型 (图 1.9b-c, up-up)，抑制了在激发态供体氨基的扭转 (图 1.9d) 与分子内扭曲电荷转移态 (TICT) 态的形成，使萘酰亚胺在水中的荧光量子产率有显著的提高。这一策略也成功拓展到香豆素 (coumarin)、邻苯二酰亚胺 (phthalimide)、不对称罗丹明、硝基苯并二噁唑 (nitrobenzoxadiazole, NBD) 染料上。不过由于这些荧光染料的摩尔消光系数相对较小，它们在定位型超分辨成像中的表现，仍需后续应用实验进一步的验证。

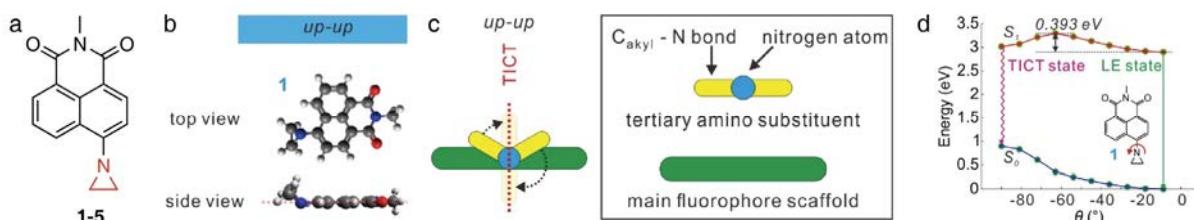


图 1.9 氮杂三元环萘酰亚胺通过上-上构型压制分子内扭曲电荷转移态，(b-d) 引自文献^[46]

Figure 1.9 Aziridinyl naphthalimide suppresses the formation of TICT state through an up-up conformation. (b-d) reproduced from reference^[46].

此外，Foley 等^[47]报道 7-氮杂双环[2.2.1]庚烷取代的罗丹明 (图 1.10, 1.9, **1-6**) 也具有接近于 1 的荧光量子产率，并且具有极佳的光稳定性。罗丹明 101 (**1-7**)，由于将可转动的氨基取代基固定成环，也具有~1 的荧光量子产率。上述所有策略均通过环张力

或者空间位阻抑制可能与 TICT 态相关的非辐射跃迁，实现了荧光染料的荧光量子产率的大幅提升。

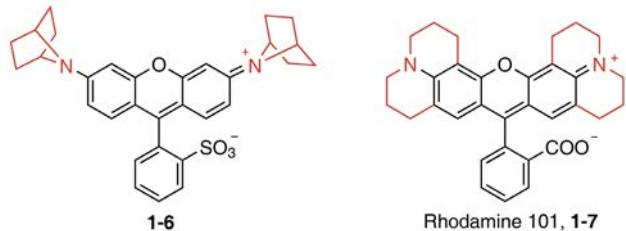


图 1.10 通过位阻抑制罗丹明的非辐射跃迁

Figure 1.10 Inhibition of non-radiative decay of rhodamine fluorophore through steric effect.

除此之外，取代基诱导效应的改变，也可以提升荧光染料的荧光量子产率。典型的例子是罗丹明 6G（图 1.11，**1-8**）以及罗丹明 110（**1-9**）：相比于四甲基罗丹明，由于烷基取代基的减少，氨基的供电子能力降低，罗丹明染料的非辐射跃迁得到抑制，获得接近于 1 的荧光量子产率。

Belov、Eggeling、Hell 等^[48]也应用类似的策略，将具有强吸电子诱导效应的氟原子及三氟甲基修饰到罗丹明的结构上，获得了与罗丹明 110 近似光谱特征的高荧光量子产率的罗丹明系列衍生物（**1-10**）。这系列染料同时还具有很高的光稳定性，并被进一步修饰和应用于 STED 超分辨成像技术。这些染料的高亮度也适合于定位型超分辨成像，Belov、Bossi、Hell 等^[49]在 2014 年对这种染料进行了叠氮笼化，并成功进行了 PALM 超分辨成像。

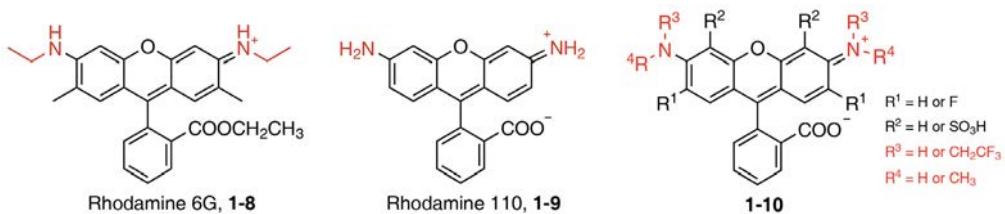


图 1.11 取代基供电子能力减弱的罗丹明染料

Figure 1.11 Rhodamine fluorophores with weakened electron-donating groups.

另外，通过位阻和诱导效应的组合设计，Joo、Rhee、Kim、Jung、Ahn 等^[50]开发了 N-（6-羟基环己基）氨基取代基，可以同时提高 1-（6-二甲氨基萘-2-基）乙酮（acedan）在水中的荧光量子产率和摩尔消光系数。这种取代基也可以拓展应用到萘酰亚胺和 NBD

染料中。然而这类荧光染料母体结构的摩尔消光系数较低，且该策略并不能抑制所有重要的非辐射跃迁过程，只能将染料在水中荧光量子产率提升到 0.4 左右，因而其在定位型超分辨成像中应用仍需要进一步的探索和研究。

抑制染料的双键顺反异构化的过程也可以提高染料的亮度。研究者很早就已经对菁染料的双键构型变化过程进行了抑制尝试^{[51]-[53]}，通过三个并联的六元碳骨架抑制了 Cy3 染料的双键的旋转，获得了在水中也具有较高的荧光量子产率和较长荧光寿命的 Cy3B 染料（图 1.12a, **1-11**）。然而并环的结构合成开发难度很高，对于 Cy5 的改造直到 2017 年，才由 Schnermann 等^[54]开发实现。在他们的研究中开发的染料 **1-12** 结构见图 1.12b，在水中具有比 Cy5 更高的荧光量子产率和荧光寿命。通过这个染料，他们成功的进行了细胞骨架蛋白的三维超分辨成像（图 1.12c）。

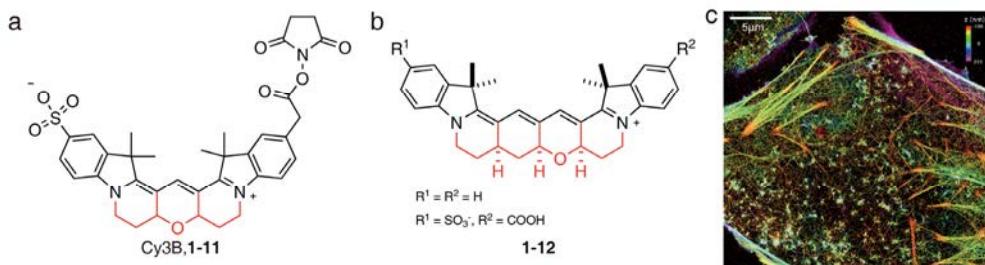


图 1.12 双键构型固定的菁染料，(c) 来源于文献^[54]

Figure 1.12 Conformational restrained cyanine. (c) reproduced from reference^[54].

综上所述，研究者从分子设计策略角度开发了一些提升荧光染料亮度的策略，但许多策略还缺乏单分子分析以及成像标记的检验，因此其超分辨成像适用性暂未能确定。同时，许多目前的策略仍然存在生物相容性较弱，合成较为复杂的特点，研究者仍需要在平衡染料生物相容性及控制合成复杂度的情况下，开发提升亮度的分子设计策略。

1.3.2 荧光染料闪烁特性的增强

定位型超分辨成像的实现需要荧光染料具有稀疏闪烁的特征。虽然染料研究者已经开发了相当数量的荧光染料，但是其中绝大多数荧光染料缺乏对其闪烁性质的研究；同时，对部分已知荧光染料的研究结果显示，绝大多数的染料需要成像液的配合才能完成高质量的成像。为了摆脱成像液的限制，研究者在近年来也在发展具备良好闪烁特性的荧光染料。这些尝试主要从两个方面进行：(1) 探索具备亮暗态光转换能力的新荧光染料；(2) 对传统荧光染料分子结构修饰提升其闪烁性质。

目前染料研究领域内为提升闪烁特性开发的绝大多数染料类型为激活型。如 1.1 节所述, 按照染料进入转化的方式可将应用于定位型超分辨成像的荧光染料分为两类, 第一类是压制型, 而第二类是激活型。由于压制型染料在成像前处于亮态, 因此需要使用高功率激光进行压制, 促使染料大量转换到暗态达到稀疏闪烁的平衡。然而在达到平衡前的染料的分子荧光信号相互重叠, 很难用于定位分析, 因而这部分光子信息被耗损了。为此, 研究者在改良荧光染料的闪烁特征时, 倾向于开发激活型的染料, 避免染料光子在压制过程的消耗。

激活型染料 (图 1.13) 按照其可逆性可划分为两类: 1) 不可逆激活荧光染料; 2) 可逆亮暗态光转化的染料。下文将按照该分类顺序对研究领域内的重要进展进行综述。

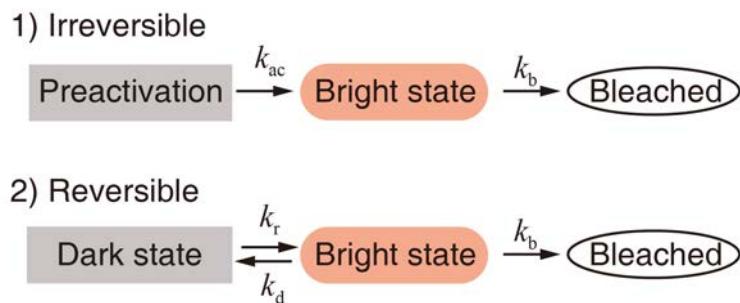


图 1.13 染料激活的模式

Figure 1.13 Photoactivation pattern of fluorophores

(1) 不可逆激活荧光染料

为了提高普通荧光染料的光子收集效率, 一种有效的设计策略是对荧光团进行笼化 (caged)。通过笼化, 限制荧光染料在成像初始阶段处于不发光的暗态, 因而实现稀疏化激活, 最大化的利用染料发出的光子。2008 年, Moerner 等^[55]开发了一种叠氮笼化策略, 对 2-二氰基乙烯基-3-氰基-2,5-二氢呋喃 (DCDHF) 的氨基进行改造 (图 1.14, 1-13)。叠氮基具有弱的吸电子诱导效应, 在取代发色团的供体后, DCPHF 失去了供电-共轭-吸电 (D-π-A) 的推拉电子体系, 因而吸收由 570 nm 缩短到 424 nm。在 407 nm 的可见光激活后, 叠氮基发生光催化分解, 绝大多数分子的叠氮基转化为氨基, 从而恢复较长波长的吸收和荧光发射。2010 年, Moerner 等^[56]将叠氮笼化策略应用到其它推拉体系荧光团 (NBD、DCDHF 类似物等) 上, 验证了该策略的拓展性。

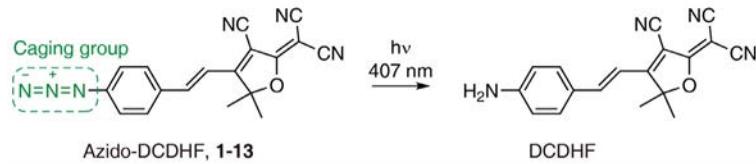


图 1.14 叠氮基笼化的 DCDHF 染料

Figure 1.14 Azido-caged DCDHF fluorophore.

罗丹明的传统笼化策略通过紫外光敏感的邻硝基苄基取代罗丹明的供体氨基（图 1.15a, **1-14**）^{[57],[58]}，但是该取代基的体积较大，合成较为复杂，且在激活后产生有毒性的副产物。2010 年，Belov、Wurm、Hell 等^[36]开发了一种重氮化的笼化策略，对罗丹明的羧基进行修饰（图 1.15b, **1-15**）。该策略衍生的笼化基团体积小，不会对染料的膜通透性、水溶性产生较大影响；激活后产生的氮气副产物不会对活细胞产生毒害效应，在活体生物成像中具有较好的应用潜力。该研究中完成多色荧光成像证明了染料 **1-15** 的成像应用价值（图 1.15c）。在 2014 年，Belov、Hell 等^[49]为不同颜色的罗丹明按照上述策略开发了可光激活的探针，并用于对细胞骨架的定位型超分辨成像。

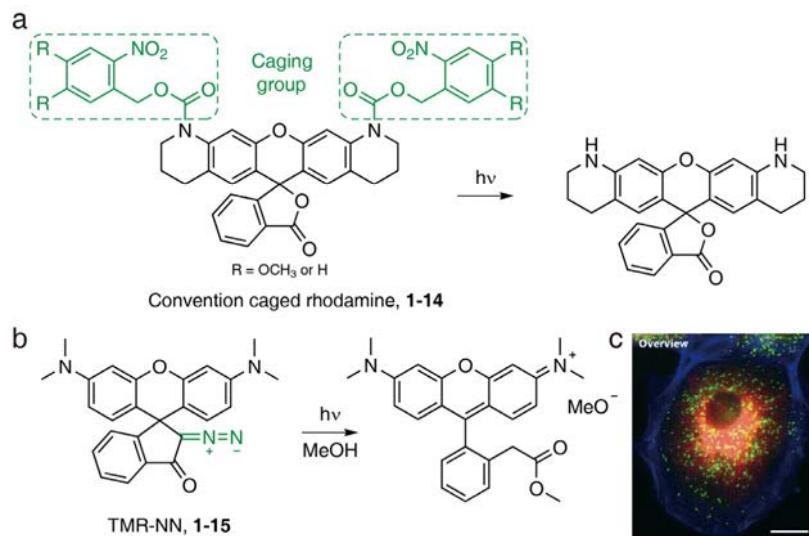


图 1.15 重氮笼化罗丹明的策略, (c) 来源于文献^[36]

Figure 1.15 diazo-caging strategy of rhodamine. (c) reproduced from reference^[36].

此外, 研究者也开展了针对传统的邻硝基苄基笼化策略的优化。2011 年, Lavis 等^[59]发展了通过还原进行邻硝基苄基衍生的合成策略, 提高了传统的合成策略的收率。该研究中还将通过新合成方法获得的笼化罗丹明应用于细胞核 DNA 的 PALM 超分辨成

像。2012 年, Johnsson 等^[60]使用单边笼化策略 (更早该策略的应用可参见文献^[61]), 保留了罗丹明 110 另一侧的芳香胺, 并通过这个伯胺衍生了标签蛋白的配位底物, 开发了可用于蛋白特异性标记的光激活罗丹明染料 (图 1.16a, **1-16**)。单边笼化, 可以避免传统笼化罗丹明的两次脱笼 (uncage) 过程, 提升染料在 PALM 激活中的效率; 另一侧的衍生为染料提供了选择性标记融合标签蛋白的功能。通过该染料, 研究者实现了对固定细胞线粒体的融合 SNAP 蛋白标签的特征蛋白的标记 (Mito-SNAP)。2016 年, Lavis 等^[62]将传统的笼化策略应用到硅基罗丹明, 开发了长波长的光激活硅基罗丹明 (图 1.16b, **1-17**)。他们将这个染料与鬼笔环肽 (phalloidin) 连接, 完成了对细胞的肌动蛋白 (F-Actin) 的超分辨成像 (图 1.16c)。

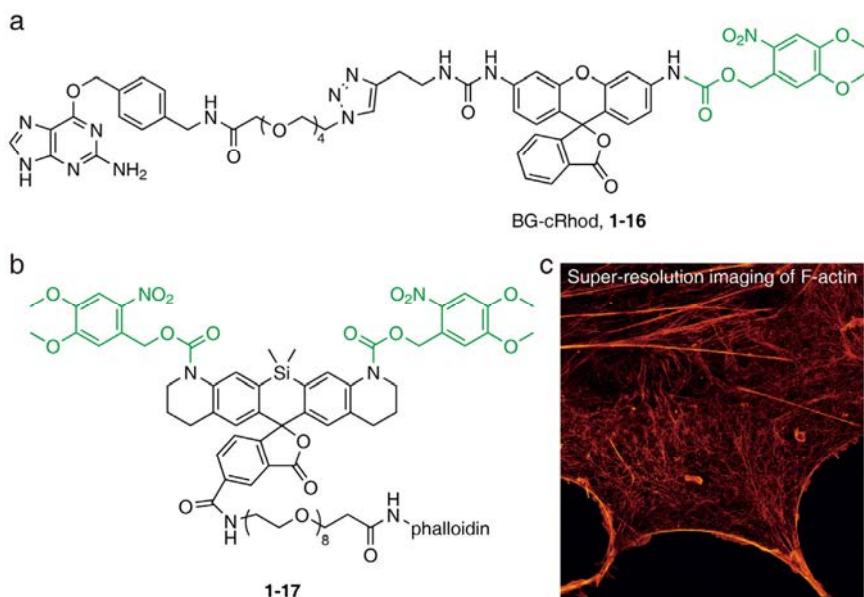


图 1.16 改良的笼化罗丹明染料, (c) 来源于文献^[62]

Figure 1.16 Optimized caged rhodamines. (c) reproduced from reference^[62].

2018 年, 肖义、杨有军等^{[63],[64]}为罗丹明引入了一种新型的亚硝基笼化策略, 并成功开发了两种探针 (图 1.17a, c, **1-18** 和 **1-19**)。这种新型的策略的笼化基团体积很小, 其激活后释放的一氧化氮具有生物学活性, 可以用来进一步观察一氧化氮对细胞生理过程的影响。通过探针 **1-18** 和 **1-19**, 研究者完成了对线粒体 (图 1.17b) 和溶酶体的超分辨成像 (图 1.17d)。

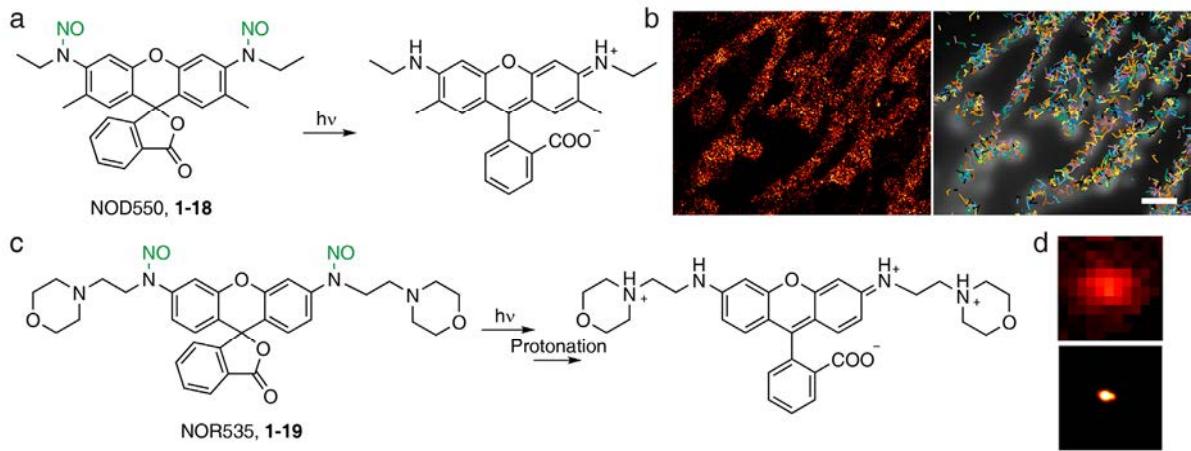
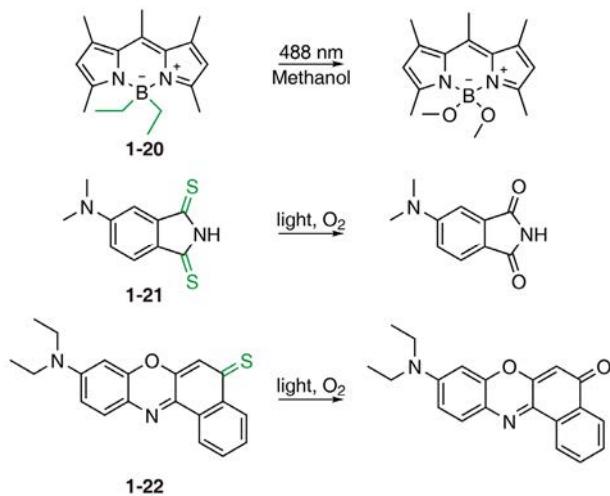
图 1.17 亚硝基笼化的罗丹明, (b,d) 来源于文献^{[63],[64]}Figure 1.17 Nitroso-caged rhodamines. (b,d) reproduced from reference^{[63],[64]}.

图 1.18 其它笼化策略

Figure 1.18 Other caging strategy

不仅针对罗丹明, 研究者同时也在尝试为其他染料母体开发新笼化策略, 并尝试将笼化染料用于定位型超分辨成像中。2018 年, Winter、Smith 等^[43]通过对氟硼吡咯 (BODIPY) 的硼取代基烷基化, 实现了一种新型的基于 BODIPY 的笼化染料 (图 1.18, 1-20)。这种染料用 488 nm 的可见光即可激活, 激活前后有 3 倍的荧光差异。在研究中, 他们通过染料的 meso-位置衍生紫杉醇 (Paclitaxel) 结构, 实现了在活细胞中对微管的超分辨成像。2019 年, Wensel、Xiao 等^[65]对一系列羰基参与共轭的染料开发了硫取代型笼化策略 (图 1.18, 1-21 和 1-22)。这些染料可以被与母核染料吸收接近 (或波

长更长一些)的光激活,并且其中的一些染料具有较好的生物相容性。在研究中,他们使用硫取代的尼罗红(Nile red, **1-22**)成功对脂滴进行了定位型超分辨成像;通过硫取代的4-(二甲基氨基)邻苯二甲酰亚胺(**1-21**)的蛋白标签底物衍生标记物,他们完成了对细胞核组蛋白H2B的超分辨成像。

(2) 可逆激活的染料

相比于不可逆激活的染料,可逆激活的染料在成像中可以给出更多的定位信息,更有利于定位型超分辨成像,而更为受到研究者的关注。一种可逆亮暗态转换的染料母体是罗丹明螺内酰亚胺^{[66],[67]}。如图1.19a所示,罗丹明螺内酰亚胺的闭环结构不具备罗丹明的共振平面结构,不具有可见光区的吸收和发射。紫外光激活后,这类染料会发生从关环到开环的转变,从完全无荧光闭环形式转变为荧光发射的开环形式。而这种结构转换是可逆的,开环形式可通过热振动弛豫回到关环形式。这种可逆的光激活平衡具有亮暗态光转换特征,可以应用于定位型超分辨成像。2007年,Bossi、Hell等^[30]第一次将这种类型罗丹明应用于定位型超分辨成像,并为此开发了修饰有可标记基团的染料**1-23**(图1.19b)。如图1.19c所示,他们将这种染料应用于微管的超分辨成像,并进一步使用双光子激活光完成了微球表面结构的三维超分辨成像。

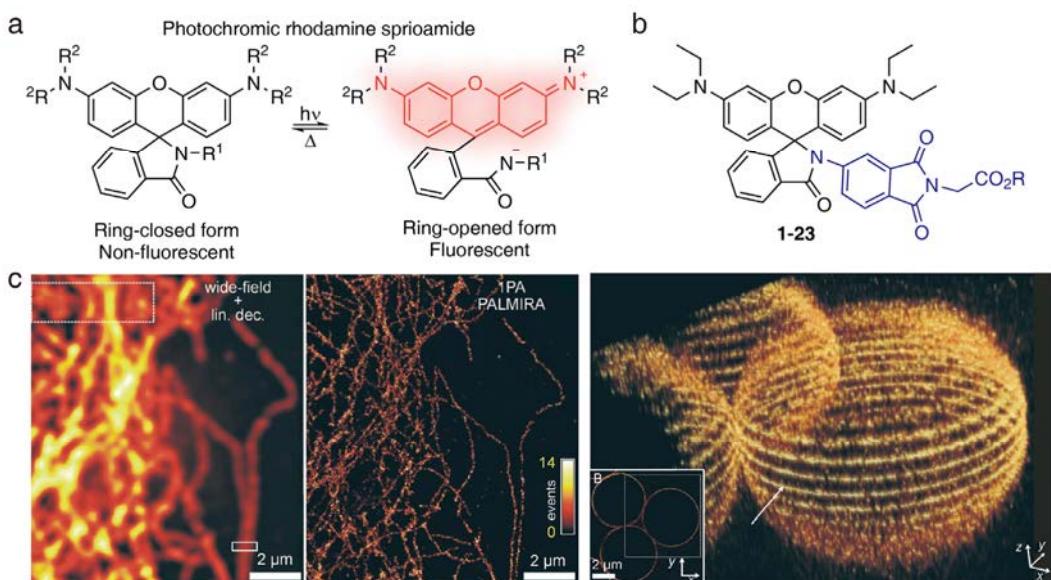


图1.19 可光转换的罗丹明螺内酰亚胺, (c) 图来源于文献^[30]

Figure 1.19 Photochromic rhodamine spiroamides. (c) reproduced from reference^[30].

由于传统的罗丹明螺内酰亚胺的激活需要使用对活细胞产生较大毒性的紫外光,因而并不适用于活细胞超分辨成像。2014年,Moerner等^[68]通过螺环衍生结构优化,开发

了新型罗丹明螺内酰亚胺的衍生物（图 1.20a, **1-24**）。新螺内酰亚胺的光激活波长提升至可见光区（ > 400 nm），极大的提升了这系列染料的生物相容性。通过该染料，研究者成功对活细菌细胞膜的三维结构进行了超分辨成像重构（图 1.20b）。罗丹明螺内酰亚胺的另一个劣势是其较弱的水溶性，因此不利于生物标记应用。为此，2018 年，Belov、Bossi 等^[69]改良了他们开发的染料 **1-23**，为其衍生了水溶性非天然氨基酸，获得了具有较好水溶性的染料 **1-25**（图 1.20c）。通过该染料的标记染色，他们成功提高了微管超分辨成像质量（图 1.20d），并且利用染料 **1-23** 的 Halo 融合蛋白配体衍生物完成了活细胞内质网结构的超分辨成像。同年，Tetin 等^[70]也对罗丹明螺内酰亚胺进行了水溶性修饰的衍生，不过在研究中他们认为拥有恰当 pK_a 的这类染料可以通过在中性环境开关环的动态平衡形成自闪烁模式的亮暗态变化（关于自闪烁的详细讨论见本节后文），不需要紫外激活光的参与。

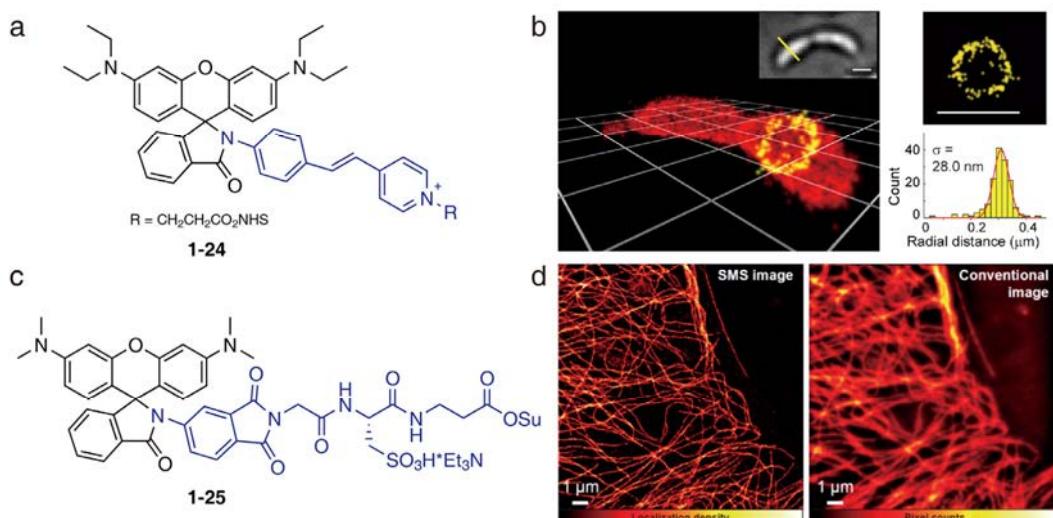


图 1.20 改进的罗丹明螺内酰亚胺衍生物，图 (b、c) 来源于文献^{[68],[69]}
 Figure 1.20 Optimized derivatives of rhodamine spiroamides. (b,c) reproduced from references^{[68],[69]}.

第二类具有超分辨成像应用潜力的光转换染料是二芳烯（ diarylethene，图 1.21, **1-26**）。早在 2002 年，Irie 等^[71]发现这类染料的衍生物在室温可记录到单分子闪烁现象。在 2005 年和 2007 年，他们^{[72],[73]}继续开发了新型二芳烯类染料，分别展示了二芳烯类染料的双光子激活特性以及聚合物环境对其光致开关过程的影响。然而，由于二芳烯染料并不具有很好的亮度，因此，在这些研究中，二芳烯染料需要共价连接高亮度的报告

荧光团（或直接接入荧光团共轭体系），通过能量转移过程（或者荧光团的荧光变化）来检测二芳烯染料的开关环过程。这种双染料体系，由于具有多芳香结构，很难保证分子整体的水溶性，并且其复杂的合成也为生物学应用带来了巨大的挑战。

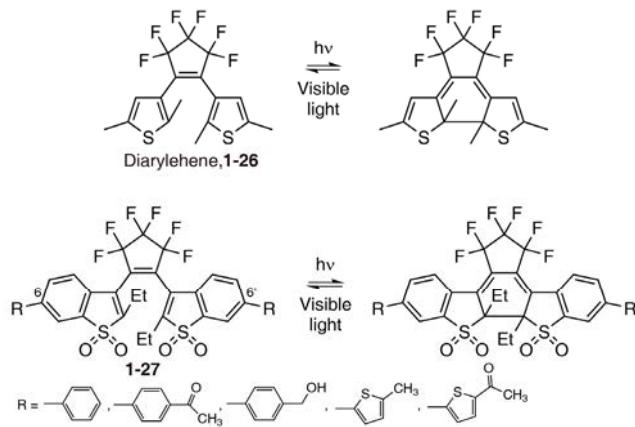


图 1.21 二芳烯染料的结构及其光致开关变化机理

Figure 1.21 Molecular structures of diarylethene fluorophores and schematic illustration of their photoswitching mechanism.

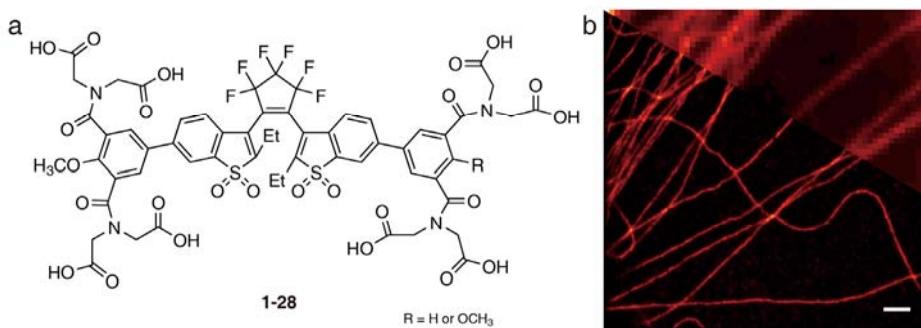


图 1.22 水溶性二芳烯衍生物 1-28 (a) 以及其超分辨成像结果 (b)，(b) 来源于文献^[42]

Figure 1.22 Water-soluble diarylethene derivative 1-28 (a) and its super-resolution imaging results (b). (b) reproduced from reference^[42].

2011 年，Irie 等^[74]开发了具有高亮度的新型二芳烯染料（1-27）。这种染料将传统二芳烯噻吩环替换为噻吩砜，并且在二芳烯苯并噻吩砜的 6,6' 位置进行了芳香基取代。这些染料在二氯六环溶液中具有高的荧光量子产率（0.61-0.88）。2016 年，Wöll 等^[75]使用上述染料作为母核在 6,6' 位置修饰了萘基，第一次成功应用单一二芳烯染料完成定位型超分辨成像。2017 年，Belov、Irie、Hell 等^[42]进一步对这种新型二芳烯的水溶性以及

闭环到开环转换速率进行了优化。如图 1.22a 染料 **1-28** 的分子结构所示，他们在苯并噻吩的 6,6'-苯基取代基的对位引入了供电子的甲氧基，并且进一步对染料修饰了 8 个羧基。这样获得染料的单分子亮度更高，并且具有较好的水溶性。最终利用开发的染料 **1-28**，他们对微管（图 1.22b）以及其他结构蛋白进行了成功的免疫标记和定位型超分辨成像。

同时，研究者也尝试将传统二芳烯染料应用于超分辨成像，按照传统策略为二芳烯连接上高亮度的荧光团，通过荧光团与二芳烯闭环结构之间的能量转移猝灭效应，形成有效的亮暗态光转换过程。2013 年，Huang、Zhu 等^[76]将四苯基乙烯与二芳烯连接，并应用该染料进行了定位型超分辨成像尝试。2014 年，Zhu 等^[77]将三个二芳烯荧光团连接在苝酰亚胺上，通过多个二芳烯分子更好的猝灭苝酰亚胺的荧光，通过该策略开发的染料具有更好的亮暗态对比度，有利于定位型超分辨成像应用。同年，Huang、Li、Zhu 等^[78]将哌嗪萘酰亚胺与二芳烯连接在水溶性高分子聚合物上，并对溶酶体进行了超分辨成像。2017 年，Zhu 等^[79]再次将两个二芳烯与苝酰亚胺连接，并为染料衍生了功能性聚乙二醇链，利用新染料完成了脂质体的超分辨成像。虽然报道指出传统的二芳烯染料开发的探针具备超分辨成像的能力，但是通过上述策略开发的染料分子体积庞大，生物相容性较弱，且合成较为复杂，因此，研究者仍需要对这些染料进一步改良，以增强其生物标记能力与定位型超分辨成像能力。

其它十分有潜力的光致变色型染料包括螺吡喃（spiroprylane，图 1.23，**1-29**）和螺噁嗪（spirooxane）。虽然这些染料本身的荧光量子效率较低，但是基于与传统二芳烯类似的策略，为这些染料连接高亮度荧光团，可以获得具有亮暗态光转换能力的荧光染料。2010 年，Sauer 等^[80]将罗丹明（Atto590 和 Atto594）与螺吡喃连接（**1-30**），并对在聚合物薄膜中分散的染料进行了单分子定位成像的尝试。2012 年，Bossi、Sortino、Raymo 等^[81]设计并合成了一系列染料-螺噁嗪共轭结构的双染料（**1-31**），并尝试应用染料进行了单分子定位成像。2016 年，Raymo、Bossi 等^[82]为该染料衍生了可生物共价标记的功能性羧基，并利用免疫标记方法成功对细胞的微管进行了标记和超分辨成像。

此外，研究者也在寻找和开发基于其他荧光团母体的具备亮暗态光转换的荧光染料，例如，Tang 等^[83]开发的可用于活细胞超分辨成像的四苯乙烯（tetraphenylethylene）衍生物。

虽然在超分辨成像领域研究者已经报道了一些可逆光转换的染料，但是仅有极少数染料真正展现了生物标记与高质量超分辨成像功能；此外，绝大多数的染料水溶性较弱，

光激活效率较低并且亮暗态对比度（或者亮态的单分子信号强度）有限，这些性质的提升仍有待于未来研究者对这些荧光染料进一步的优化开发。

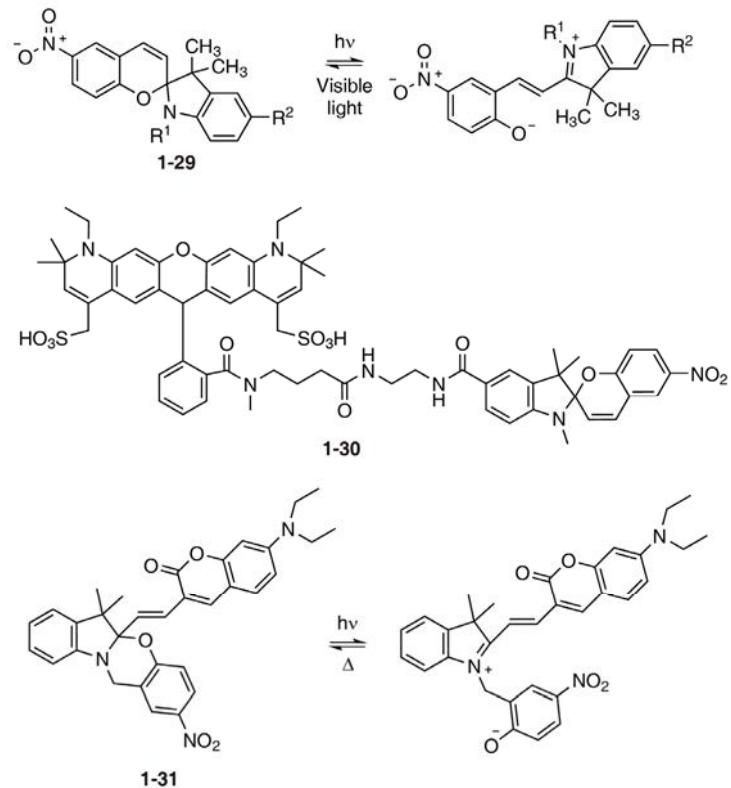


图 1.23 螺吡喃和螺噁嗪染料
Figure 1.23 Spiropyran and spirooxane fluorophores.

为了解决大部分可逆光转换染料对活细胞样本进行超分辨成像的困难，2014 年，Kamiya、Urano 等^[40]开发了自闪烁的硅基罗丹明染料（图 1.24，1-32）。事实上，罗丹明染料的开关环平衡是动态过程，其开关环转换在平衡控制下在染料不同分子中随机发生，因此作者认为如果能够开发在成像中性条件下，稀疏处于亮态的罗丹明，便可以利用上述特征完成不依赖光激活的亮暗态转换，实现染料的自闪烁。为此，作者首先开发一系列 pK_a 为 5-6 的罗丹明染料，这些染料在中性成像环境中大部分处于没有可见发射的闭环（暗态）而少部分随机的转换到亮态，满足定位型超分辨成像的稀疏性要求。然而定位型超分辨成像不止对染料的亮态稀疏度提出要求，还需要染料能够稳定在亮态并发出足够的光子形成单分子信号。因此，作者进一步研究了这些染料的开环亮态时间，他们发现仅有染料 1-32 具备较长的亮态时间，能够为成像提供单分子信号。为了验证该染料的标记和成像能力，研究者开发了染料 1-32 的 Halo 蛋白底物衍生物，并通过该探

针成功完成了对活细胞微管的动态超分辨成像。2018年, Kamiya、Urano 等^[84]开发出发射波长在可见光区的自发闪烁的罗丹明染料, 并成功对固定细胞的微管进行了定位型超分辨成像。

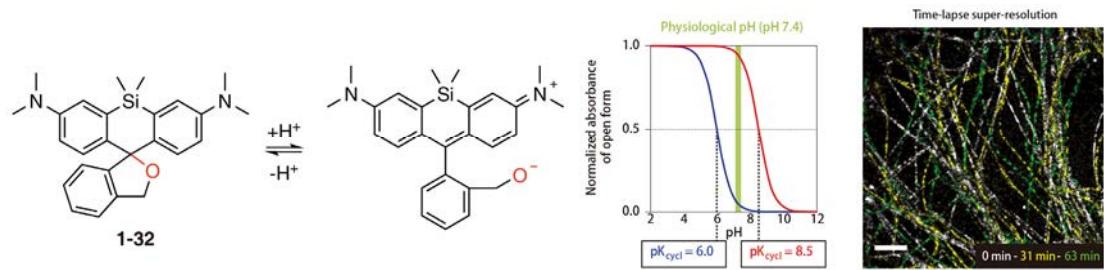


图 1.24 自闪烁的硅基罗丹明, 图来源于文献^[40]

Figure 1.24 Spontaneously blinking silicon-rhodamine. Reproduced from reference^[40].

荧光染料在靶标结构上的动态结合过程也可以形成定位型成像的稀疏单分子信号。2006年, Hochstrasser 等^[85]开创性的提出了利用染料与靶标结构的动态可逆结合来实现定位型超分辨成像, 他们将之命名为点累积纳米形貌成像 (Point accumulation of imaging nanoscale-topography, PAINT)。其机理如图 1.25a 所示, 染料对目标结构进行可逆动态标记, 在目标结构上的短暂驻留的染料被激发后获得其单分子信号, 而随着染料的动态解离, 信号消失, 完成单分子亮暗态转换; 目标结构周围的所有染料在时空中都可以对结构进行标记, 因此该成像不易被染料的光稳定性影响; 当积累足够数量的单分子信号后, 可以通过这些信号的定位重构出微观结构。如图 1.25b 所示为 PAINT 成像中闪烁的荧光信号轨迹图, 它展示了环境敏感的尼罗红 (Nile red) 染料对膜结构的随机动态标记过程。

由于单分子信号来源于染料在目标结构上的瞬态标记, 因此染料在结构上的驻留时间需要匹配成像的收集时间, 而单分子信号的稀疏度由溶液中染料的浓度控制。因为该方法不需要染料提前共价限域标记在结构上, 可以利用环境中的染料分子, 因此最终可获得的定位密度不受限于染料本身的亮暗态转换次数。但在该技术中染料并没有通过牢固的共价键连于目标结构, 染料在结构上的扩散过程会模糊单分子信号, 并影响定位型成像的精度。

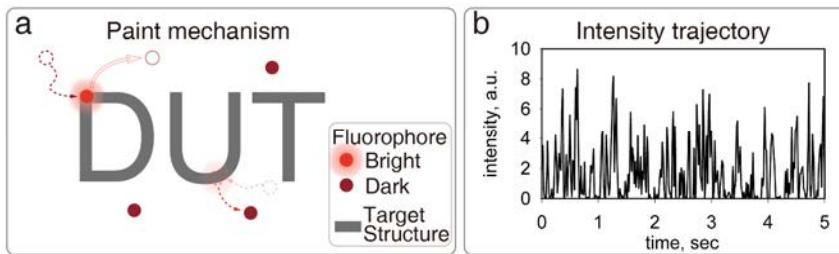
图 1.25 点累积纳米形貌成像的机理, (b) 来源于文献^[85]

Figure 1.25 Schematical illustration of PAINT mechanism. (b) reproduced from reference^[85].

PAINT 技术的关键问题是实现动态可逆的结构标记, 然而有限的实现策略限制了早期该技术的发展。为了获得解决标记过程的可逆性并保证标记的短暂稳定性, 研究者最初利用了脱氧核糖核酸 (DNA) 短序列的碱基对配对技术^{[86],[87]} (图 1.26a)。直到 2015 年, 才由 Kiuchi、Watanebe 等^[88]发展了新的小分子探针 PAINT 成像, 他们利用商品化的细胞骨架标记短肽链 (LifeAct) 连接的有机小分子染料对固定细胞的肌动蛋白进行了定位型超分辨成像 (图 1.26b)。在成像中使用了高度倾斜的照明模式, 将激发光限制在有限的成像空间内, 减少来自非焦面的自由小分子探针的背景干扰; 同时, 在溶液中的小分子探针染料以较快的速度随机扩散, 很快的在照明区域和非照明区域之间动态迁移, 不能够在单一位置累积发射足够的光子而形成单分子信号; 相反地, 探针可逆的结合到肌动蛋白上, 激发这些在结构上短暂驻留的分子可以获得有效的单分子信号。基于上述原理, 作者完成了肌动蛋白的超分辨成像, 因该成像不需要染料拥有受环境影响的亮暗态转换过程, 研究者将该成像技术命名为 IRIS。但本论文认为其可逆交换成像的原理与 2006 年报道的 PAINT 成像一致, 因此也将其归属于 PAINT 成像。2016 年, Betzig 等^[89]结合小分子荧光染料与片层光 (lattice sheet illumination) 技术, 在大的三维空间尺度上对活细胞的膜结构进行了 PAINT 成像。2017 年, Schepartz、Toomre 等^[90]进一步挖掘了 Urano 等在 2014 年开发的自闪烁的罗丹明染料 1-32 开关环状态的环境敏感性。如图 1.26c 所示, 利用在脂溶性的膜结构中染料倾向于闭环的暗态以及染料分子在膜结构与水环境的扩散交换平衡, 实现了长程的各种亚细胞结构的定位型超分辨成像。2019 年, Xu、Klymchenko 等^[91]为了改善尼罗红对细胞膜的 PAINT 超分辨成像, 开发了一系列衍生有不同链长的磺酸盐尼罗红衍生物。他们发现短链的尼罗红具有对细胞膜可逆标记的特征, 更有利于实现细胞膜的 PAINT 超分辨成像。

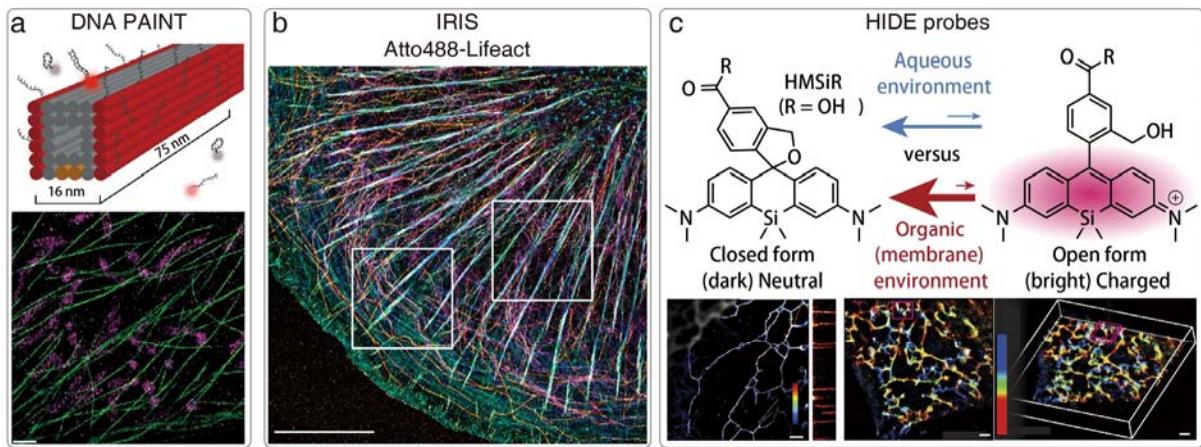


图 1.26 点累积纳米形貌成像方法的改良及应用, 图来源于文献^{[87],[88],[90]}

Figure 1.26 Optimization and applications of PAINT strategy. Reproduced from reference^{[87],[88],[90]}.

综上所述,研究者为提升染料的亮暗态闪烁特征做出了许多努力,其相关的策略包括对染料的笼化结构设计,光致变色染料与高亮度报告荧光团结合的双染料的开发,自闪烁及环境敏感染料的开发,发展染料的可逆标记等。在未来,研究者应当继续发展新光转换机制,优化这些染料结构,开发更好的超分辨成像染料,并利用这些染料探针拓展定位型成像的应用。

1.3.3 荧光染料稳定性的增强

荧光染料的稳定性也对定位型超分辨成像的质量有较大的影响,具有更高光稳定的染料可以延长定位型超分辨成像的时间窗口,并且这些染料可激发次数增加,其发射的荧光光子总数更多,为成像提供充足的光子统计信息。而相较于传统的荧光显微成像,超分辨成像需求更大规模的光子统计信息来实现超越光学衍射极限的成像。因此,超分辨显微镜对染料的稳定性提出了很高的要求。

荧光染料的稳定性受到其光漂白过程的限制,染料的漂白过程主要是其三重态与环境中氧化还原物质的不可逆光化学反应过程。当荧光染料被激发到激发态时,可以经过系间穿越进入三重态。这些三重态的寿命比激发态的寿命要长几个数量级,因而易与环境中的氧气以及其它可能的氧化还原物质进行反应,从而导致荧光染料的荧光猝灭。

一种稳定荧光染料设计模式是通过对染料结构分子改造,限制氧化还原物质与荧光染料的反应,提升荧光染料的光稳定性。如图 1.27a 所示,氟代荧光素 (Fluorinated fluorescein, 1-33)^[92],通过氟原子的引入,抑制染料与氧气等其他活性物质的反应,提

高染料的光稳定性；1.3.1 节所展示的四元环^[41]、三元环^[46]以及双环氨基^[47]作为供电子基的染料，具有更高的荧光量子产率，同时也具有更高的光稳定性；另外对菁染料的双键异构过程进行抑制^{[51]–[53]}，也可以获得光稳定性更好，荧光亮度更高的染料。

荧光染料漂白过程的中间体可能会干扰多色成像光谱拆分的准确性。例如，罗丹明染料的光漂白过程包括多步光化学反应。这些反应产生的中间体具有相对其母体结构蓝移的荧光信号，使得标记染料的光谱信息出现位移偏差，导致多色成像的光谱拆分准确性下降。为了抑制罗丹明染料光谱位移的发生，2019 年，Butkevich、Hell 等^[93]开发了新氨基取代基的罗丹明染料，并将这些新染料与已知罗丹明进行了光谱位移的比较研究。结果显示叔丁基（图 1.27b, **1-34**）及金刚烷（**1-35**）罗丹明、7-氮杂双环[2.2.1]庚烷罗丹明（图 1.10, **1-6**）、罗丹明 110（图 1.11, **1-9**）、三氟乙基氨基罗丹明（图 1.11, **1-10**）表现出抗光漂白诱导位移的特征，而最近报道的明星染料四元环罗丹明并不能完全抑制光漂白的发生。研究者也验证了新开发的罗丹明染料 **1-34** 的细胞成像潜力，通过这些染料成功地对活细胞的波形蛋白（vimentin）进行了 STED 超分辨成像。

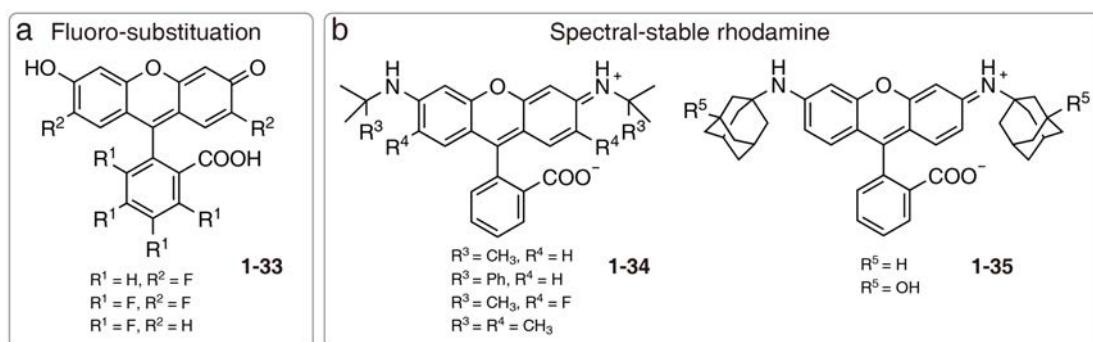


图 1.27 结构修饰改进染料的光稳定性，图来源于文献^{[88]–[90]}

Figure 1.27 Structural modifications enhanced photostability of fluorophores. Reproduced from reference^{[88]–[90]}.

除了对荧光团结构修饰的策略外，将荧光稳定剂在分子内直接与染料近距离连接也可以提高染料的光稳定性^{[94]–[95]}。早期的单分子研究揭示了染料的光稳定性受三重态猝灭剂（triplet state quencher, TSQ）的影响，按照其猝灭机制可将这些猝灭剂分为三种：1) 通过三重态-三重态湮灭消耗染料三重态的氧气（图 1.28a）；2) 通过三重态能量转移机制的环辛四稀（COT，图 1.28b）；3) 通过光诱导电子转移猝灭的维生素 C (ascorbic acid)、甲基紫晶（methylviologen）、对硝基苯甲醇（NPA）、水溶性维生素 E (Trolox) 等（图 1.28c）。如图 1.28d 左图所示，研究者推测这些猝灭剂分子以一种碰撞的方式与染料的三重态发生能量转移或者是光电子转移，调控染料的发光稳定性。虽然在溶液中

使用稳定剂能够提升染料的单分子发光光稳定性^{[28],[96],[97]}，但是绝大部分这些稳定剂在其工作浓度下 ($> 1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 具有较高的毒性，会对活细胞样品造成损害；另一方面，这些稳定剂在细胞内分布的不均匀，很难为不同目标结构上的标记染料提供可靠稳定剂浓度来保证染料的单分子发光稳定性。为了解决上述问题，2012 年，Blanchard 等^[98]开发了一种新的提升染料光稳定的策略，通过分子内的三重态猝灭剂稳定染料的单分子荧光发射（图 1.28d 右图），他们将采用这种策略的染料称为自修复（Self-healing）染料。按照该策略，他们开发了通过短链直接连接 TSQ 的新型 Cy5 染料 **1-36**，其结构如图 1.28e 所示。进一步通过比较不同的三重态猝灭剂在分子内工作的效率，他们发现 COT 相连的染料的单分子亮态时间最长，进入暗态的可能性最低，可进行长时间的单分子追踪（图 1.28e 右图）。同年另外一篇报道中，他们^[99]通过激光闪光光解技术对上述染料的三重态寿命进行了研究。基于连接有 COT 的 Cy5 染料三重态寿命显著降低的实验结果，他们认为 COT 可以作为 Cy5 染料的三重态能量受体，从而快速消耗了染料的三重态，使染料迅速回到基态，稳定 Cy5 染料的单分子发光。2013 年，Cordes 等^[100]也对 Trolox 对 Cy5 的稳定机制进行了研究，他们针对分子内自修复和分子间诱导自修复进行了对比研究，他们认为 Trolox 也会对 Cy5 的三重态暗态过程进行抑制，从而提升染料的单分子发光光稳定性。为了克服自修复染料合成的复杂和难度，2016 年，Cordes 等^[101]开发了一种非天然氨基酸（图 1.28f, **1-37**）作为稳定基团和荧光团的连接基团。2017 年，Blanchard 等^[102]进一步优化了 COT 与 Cy5 染料之间的连接链长，提高了自修复染料在有氧气存在的活细胞环境的单分子发光光稳定性。2019 年，Cordes 等^[103]进一步对分子内和分子间的自修复的竞争机制进行了研究。他们发现分子内的自修复过程起主导作用，并且在适当优化成像液添加剂浓度（三羧基乙基膦，TCEP）的条件下，自修复染料具有进行定位型超分辨成像的潜力。

其它的研究者也在尝试开发新型的荧光染料光稳定剂。2015 年，Cosa 等^[104]发现 Ni^{2+} 也可以提高染料的单分子发光光稳定性，随后在 2018 年，他们^[105]利用 NTA 耦合 Ni^{2+} ，实现了分子内的自修复策略，提升了 Cy5 染料的单分子发光寿命。

综上所述，研究者在尝试提升染料的光稳定性上作了许多的努力，并提出了一些分子设计思路，但绝大多数的设计策略在定位型超分辨成像的适用性仍有待研究。如 1.2.2 节所述，定位型超分辨成像要求染料能够有效的在亮态和暗态之间转换，因此该成像要求的染料稳定性不仅是对染料亮态的稳定，染料的暗态（与染料的三重态相关）也要有效的保留，且尽可能减少亮暗态转换过程中漂白的发生。然而染料的暗态不具备荧光发射，且其过程与三重态的形成正相关，与提升稳定性的抑制三重态的染料设计策略相反。

基于以上事实,为定位型超分辨成像开发光稳定性提升的染料是十分具有挑战的,研究也是十分匮乏的。

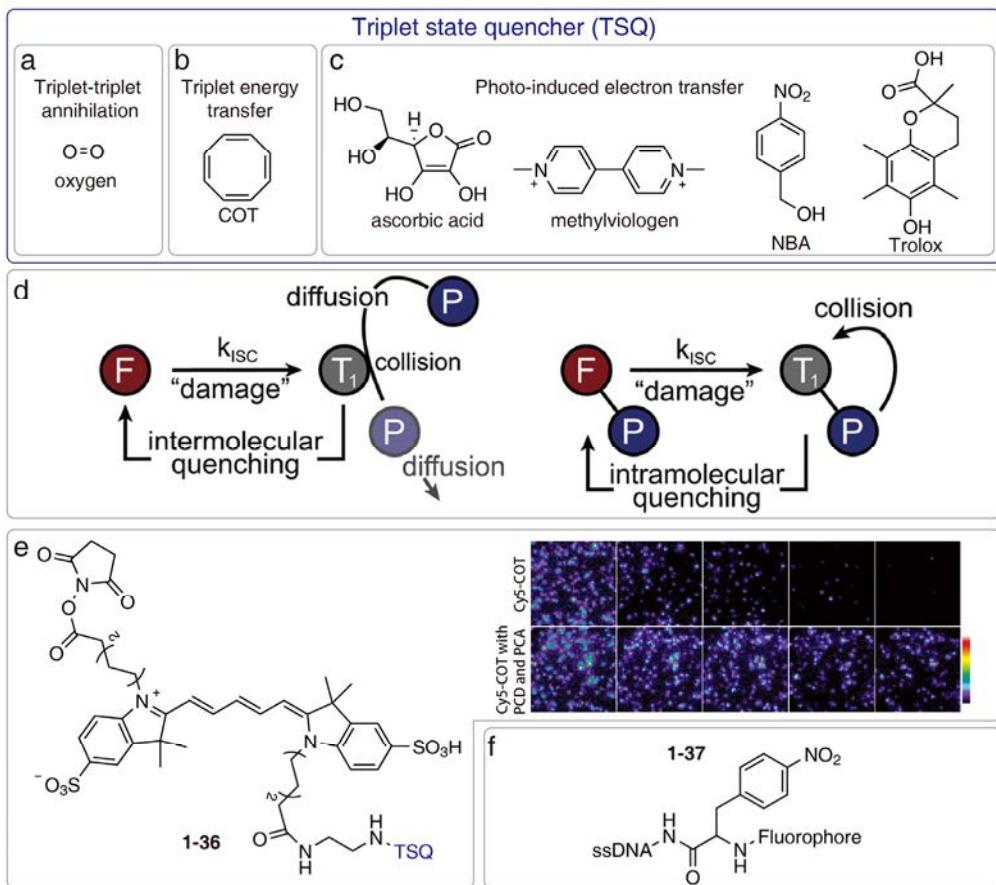


图 1.28 自修复染料, (d, e) 图来源于文献^{[98],[103]}

Figure 1.28 Self-healing fluorophores. (d, e) reproduced from reference^{[98],[103]}.

1.3.4 染料标记能力的优化

荧光染料的标记能力也制约了染料的定位型超分辨成像潜力。染料的标记能力包括两个方面:首先是对靶标结构准确而特异的标记,这样染料分子能够在定位型超分辨成像中提供准确的结构位置信息,最终实现精确的微观结构重构;第二,对于活细胞的成像,染料应当具备细胞膜甚至核膜通透性。因此,自从定位型超分辨成像的概念提出,研究者便在不断尝试寻找和发展适合于高分辨率成像的活细胞染料标记方法。

定位型超分辨成像的一种经典的标记方法是免疫荧光标记方法。基于抗体和抗原特异性结合的机制,免疫荧光标记的特异性和灵敏度很高,不易形成背景噪音信号干扰,

满足高分辨率成像的标记需求。此外，免疫标记方法中对细胞固定的过程使得结构保持稳定，而抗体和抗原的解离常数很小，其标记也具备良好的稳定性，这样超分辨成像过程不会受到结构变化和标记解离的干扰。然而，由于抗体分子较大，不具备膜通透性，免疫标记方法在活细胞成像的应用潜力较弱，少数报道的活细胞免疫标记需要在染色过程中改变细胞膜的通透性，干扰活细胞的正常生理活动。另外一方面，虽然免疫标记的特异性和灵敏度非常适合于高分辨率成像，但这种标记方法需要用到物理尺寸相对较大的抗体蛋白（5-10 nm），其二级的标记方法使得染料标记的实际位置距离结构有大约10-15 nm的距离，扩大了超分辨成像技术解析结构的尺寸误差。而这些误差与定位分析方法的准确性误差卷积后，将最终降低定位型超分辨成像的精确度。例如，对微管进行二级免疫标记，通过超分辨成像重构分析的微管直径比真实尺寸扩大20-30 nm。

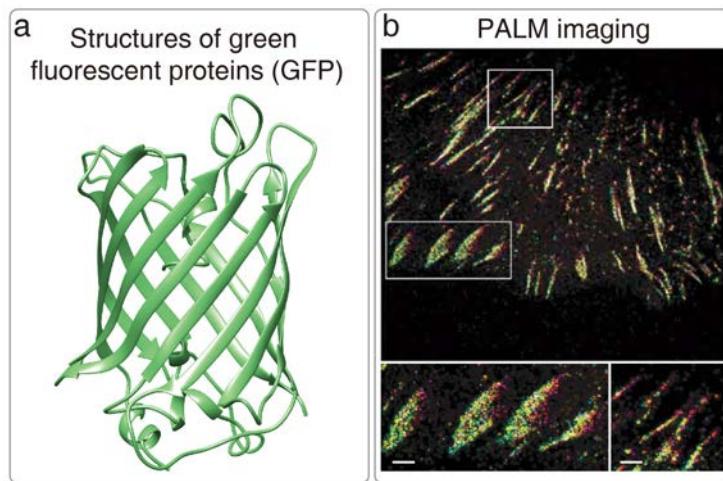


图 1.29 绿色荧光蛋白结构 (a) 及荧光蛋白的 PALM 成像 (b)，蛋白晶体数据来源于文献^[106]，数据处理软件是 Chimera^[107]；(b) 图来源于文献^[21]

Figure 1.29 Structure of a green fluorescent protein (a) and PALM imaging from fluorescent proteins (b). Crystal data of GFP was from reference^[106] and reproduced with Chimera^[107]. (b) reproduced from reference^[21].

基因修饰的标记方法因其良好的特异性也被广泛应用于超分辨成像技术中。这种技术将靶标蛋白与荧光蛋白基因以适当的方式剪切连接，通过外源基因转染技术使得活细胞内源性的表达融合有荧光蛋白（典型绿色荧光蛋白结构见图 1.29a）的靶标蛋白，获得了准确标识靶标蛋白的荧光信号。由于该技术极高的标记准确性，定位型超分辨成像的三篇开创研究论文中有两篇^{[5],[10]}采用了基因修饰的技术，利用可光转换的荧光蛋白实现

了高分辨率成像。如图 1.29b 所示, 2008 年, Betzig 等^[21]再一次运用 EcosFP 动态的追踪了活细胞的粘连复合物 (adhension complexes)。然而, 具有光转换能力的荧光蛋白仍旧十分稀少, 因此研究者最近十年仍在尝试不断开发新型光激活^[108]、发射光谱更长^[109]、亮度更高^{[110],[111]}、转换次数更多^{[112],[113]}的荧光蛋白。虽然新型荧光蛋白已经改善了其在波长区间及光转换次数方面的劣势, 但是荧光蛋白的单分子荧光亮度及其光稳定性仍然低于有机染料^{[13],[44]}, 其结构可修饰性也较弱, 限制了其在定位型超分辨成像尤其是在活细胞定位型超分辨成像上的应用。

另外一方面, 有机荧光染料由于其较高的亮度以及广泛的可修饰性, 具有良好的定位型超分辨成像潜力。但是有机荧光染料缺乏选择性标记能力, 并不能够提供有价值的地位信息。一种解决的策略是将荧光染料共价连接到免疫荧光标记的抗体上, 为染料提供标记特异性, 然而如前所述, 这种方法并不适用于活细胞成像。为了解决合成小分子荧光染料的标记选择性, 研究者开发了自标记蛋白标签技术 (TMP-tag^{[114]–[116]}, SNAP-tag^[117], Halo-tag^[118]等) 及特定位点非天然氨基酸修饰技术^[119]。这两种技术均通过基因编辑方式, 准确的对靶向蛋白的标记位点进行修饰, 因而具有极高的标记选择性。如图 1.30 所示, 蛋白标签技术中, 靶标蛋白在修饰位点融合标签蛋白, 而标签蛋白可以选择性与弱亲核底物结合, 将合成荧光染料标记到靶标蛋白上; 非天然氨基酸编辑技术中, 靶标蛋白在修饰位点处连接具有生物正交标签的非天然氨基酸, 利用生物正交标记的方法将合成荧光染料连接到靶标蛋白。因此, 这些共价蛋白标记技术兼具小分子荧光染料的可灵活化学修饰且光物理性质良好的特性与内源性表达融合蛋白的专一性特征, 适用于定位型超分辨成像。

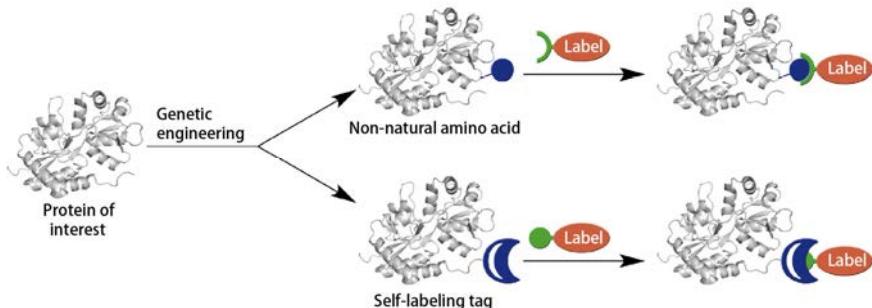


图 1.30 自标记蛋白标签技术及特定位点非天然氨基酸修饰技术的原理, 图来源于文献 [120]

Figure 1.30 Schematic illustration of self-labeling protein tags and site specific incorporation of non-natural amino acids techniques. Image was reproduced from reference^[120].

自标记蛋白标签包括 Halo-tag、TMP-tag、SNAP-tag 和 CLIP-tag 等，其对应的反应配体或底物如图 1.31 所示。其中，Halo-tag、SNAP-tag 和 CLIP-tag 通过自催化反应，不可逆的将染料连接到自身蛋白结构上，从而实现对其融合蛋白的标记；TMP-tag 则通过对配体的选择性识别连接有配体的染料，染料与蛋白之间的连接非共价键连而是通过分子间作用力连接。在过去这些标签蛋白的配体通常都是利用酰胺键实现与染料的连接，2015 年，肖义等发展通过“Click”点击化学策略连接的新方式，成功将 SNAP 配体与合成荧光染料连接（图 1.31c，Linkers），并通过新的染料成功对细胞线粒体 Cox-8A 蛋白和细胞核 H2B 蛋白进行了标记成像。

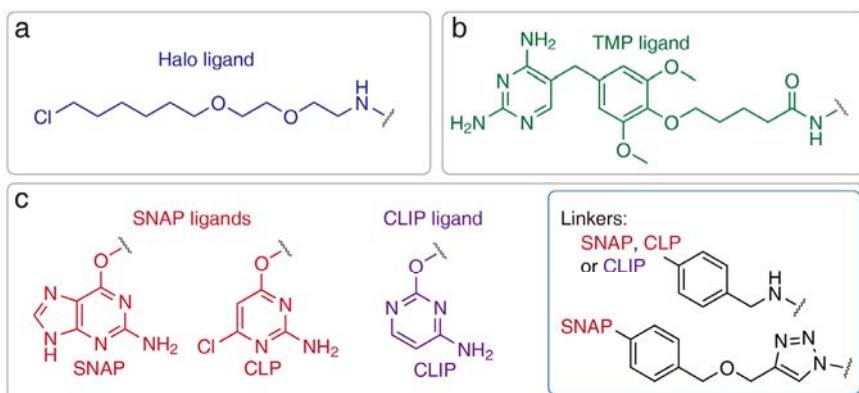


图 1.31 自标记标签蛋白反应配体结构

Figure 1.31 Structures of ligands of self-labeling protein tags.

自标记蛋白标签技术在近年来逐渐应用到先进光学成像中。2010 年，Moerner 等^[121]将他们开发的 DCDHF 类染料连接上 Halo 标签蛋白底物，获得了染料 **1-38**（图 1.32a），对表达有标签蛋白的细菌进行了超分辨成像。同年，Heilemann、Cornish、Sauer 等^[34]通过 TMP-Atto655（染料 **1-39**，图 1.32b）以及 TMP 标签蛋白技术成功在高分辨率尺度下展示了活细胞的细胞核组蛋白 H2B 的分布。如图 1.32c 所示，2011 年，Sauer 等^[122]通过商品化的 SNAP-Cell TMR-Star（染料 **1-40**）与 SNAP-tag 蛋白标签技术再一次对 H2B 蛋白成功进行了定位型超分辨成像。

2013 年，Johnsson 等^[38]将硅基罗丹明连接 SNAP、CLIP、Halo 蛋白标签底物（染料 **1-41**、**1-42**、**1-43**，图 1.33），实现了对细胞核组蛋白 H2B 的定位型超分辨成像，以及中心体 Cep41 蛋白的 STED 超分辨成像；他们还将硅基罗丹明连接了四嗪基团，开发了染料 **1-44** 适用于生物正交标记成像。另外，许多具备良好成像潜力的染料也利用自标记蛋白标签技术实现了活细胞的选择性标记成像。如 1.3.1 节中的染料 **1-2**、**1-3**、1.3.2

节中染料 **1-16**、**1-23** 和 **1-32** 也通过衍生蛋白标签底物，利用蛋白标签技术成功对细胞进行了选择性的标记染色及超分辨成像。

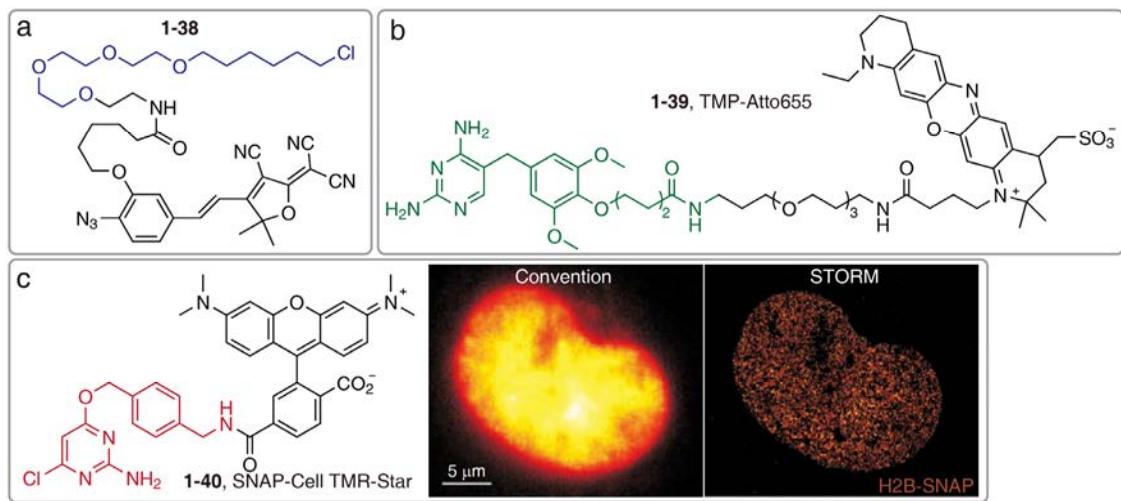


图 1.32 自标记蛋白标签技术的合成荧光染料结构及其超分辨成像结果，(c) 图来源于文献^[122]

Figure 1.32 Structures of synthetic fluorophore dyes deployed for self-labeling protein tags and their super-resolution imaging results.

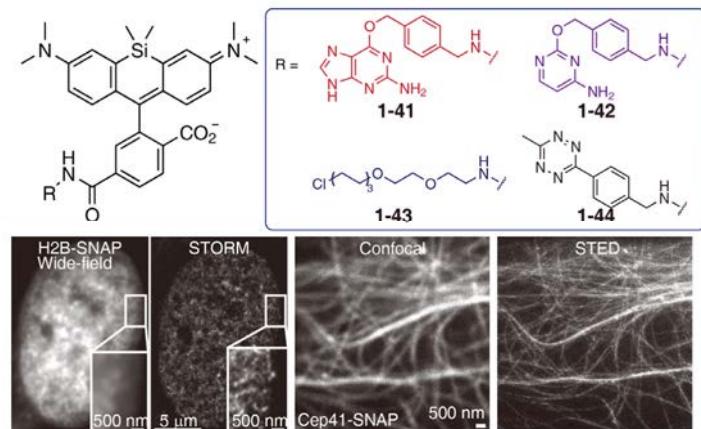


图 1.33 适用于自标记蛋白标签技术及生物正交反应的硅基罗丹明，图来源于文献^[38]

Figure 1.33 Silicon-rhodamine derivatives for self-labeling protein tags and bioorthogonal reaction. Images were reproduced from reference^[38].

非天然氨基酸修饰技术也逐步被应用到超分辨成像研究中。对于有机合成染料与非天然氨基酸之间标记反应，传统的策略是通过铜 (I) 催化的叠氮与乙炔基的“点击”

(Click) 反应 (图 1.34a)。但这种反应的反应速率较慢, 且高浓度的铜离子会对细胞造成毒害作用, 因此研究者在近年来逐渐发展了四嗪-环辛烯/环辛炔的标记方法^{[123]–[125]}。如图 1.34b 所示, 该方法基于四嗪与环辛烯或者环辛炔之间 Diels-Alder 环加成反应的良好选择性和极高的反应速率, 实现对靶标结构的共价特异标记。由于正交标记体系的模块化特征, 基于该策略的荧光染料分子只需为其衍生四嗪或者环辛烯/炔, 可以实现对不同结构的标记, 其标记的选择性由衍生有配对底物的非天然氨基酸 (通常是环辛烯/环辛炔) 建立。在四嗪-环辛烯/环辛炔正交标记体系中, 四嗪还可以通过能量转移或者电子转移的方式猝灭染料的荧光, 而正交反应后, 由于四嗪结构被破坏, 染料被猝灭的荧光得以恢复, 因而可以实现高成像对比度。如前所述, Johnsson 等^[38]开发了与四嗪相连的染料 **1-44** (图 1.33), 通过非天然氨基酸修饰技术, 成功对大肠杆菌 (*E. coli*) 表达的 GFP 蛋白进行了标记成像。2014 年, Lemke 等^[126]开发了一系列连接有环辛烯或环辛炔的非天然氨基酸 (图 1.34c, **1-45**、**1-46**、**1-47**、**1-48** 和 **1-49**), 并且尝试比较了这些生物正交标记底物在还原环境中的稳定性以及与四嗪的反应速率。根据上述研究结果, 他们实现了对胰岛素受体蛋白 (insulin receptors, 图 1.34c) 和病毒类似颗粒 (virus-like particles) 的超分辨成像。2015 年, Barry、Chin 等^[127]优化了非天然氨基酸在波形蛋白和肌动蛋白的修饰位点, 第一次成功在这两种微管相关蛋白上修饰衍生有环辛炔的非天然氨基酸, 成功实现了这两种蛋白的定位型超分辨成像。2017 年, Kele 等^[128]衍生了一系列四嗪硅基罗丹明染料 (图 1.34d, **1-50**、**1-51** 和 **1-52**), 并成功运用这些染料对波形蛋白进行了超分辨成像。2018 年, Doose 等^[129]也利用四嗪-环辛烯体系与非天然氨基酸技术, 成功对 NMDA 受体蛋白进行了准确的标记和定位型超分辨成像。2019 年, Sauer 等^[130]对跨越全可见光区光谱的 22 种四嗪染料 (染料与四嗪的连接方式见图 1.34e, **1-53**、**1-54**) 的生物正交反应进行了研究, 发现光诱导电荷转移是四嗪对吸收红光的噁嗪及罗丹明染料猝灭的主要机制, 使用这些染料对肌动蛋白 (图 1.34e)、细胞膜的 GluK2 以及 TNER1 受体蛋白、微管蛋白进行了标记及超分辨成像。以上论述的生物正交标记以及非天然氨基酸标记技术的内容进展仅覆盖该领域内与超分辨成像相关的内容, 更详细的内容讨论可参见领域内的重要综述^{[131]、[132]}。

直接使用具有靶向能力的有机小分子荧光探针进行标记, 也是实现亚细胞结构超分辨成像的有效标记策略。为了实现对特定结构的标记选择性, 小分子荧光染料需要衍生靶向配体 (例如, 紫杉醇、三苯基膦、Hoechst 等), 而衍生位点的选择 (同时包括对靶向配体及荧光团的修饰位点选择) 会影响最终探针的靶向能力以及荧光团的光物理性质。如图 1.35 所示为常见的靶向配体结构, 及其典型的连接位点: 靶向肌动蛋白的鬼笔环肽

(phalloidin)、jasplakinolide; 靶向线粒体的三苯基膦、罗丹明; 靶向微管的紫杉醇及其衍生物; 靶向溶酶体的天冬氨酸蛋白酶抑制剂 (pepstatin A)、吗啉; 靶向细胞核 DNA 的 Hoechst 等。目前探针研究领域内的靶向配体种类仍然有限, 并且其连接修饰位点和连接方式缺乏对超分辨成像应用的优化, 这些问题仍有待研究者解决。

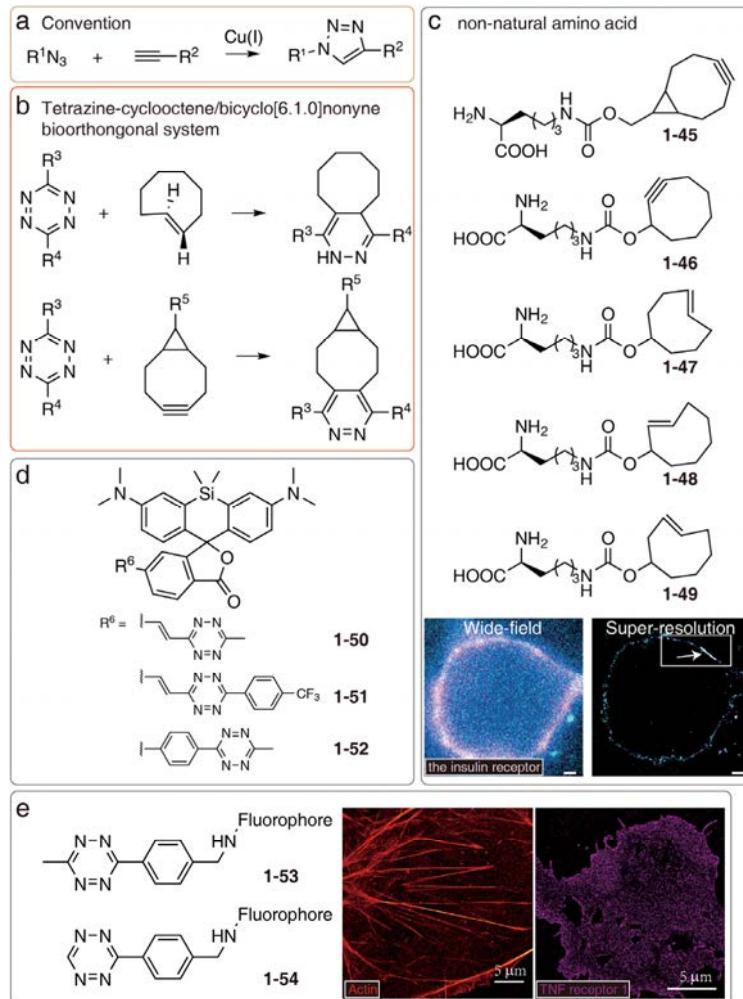


图 1.34 特定位点非天然氨基酸修饰技术中的生物正交反应, (c,e) 成像结果来源于文献^{[126],[130]}

Figure 1.34 Bioorthogonal reactions in the technique of site-specific incorporation of non-natural amino acids. (c,e) Imaging results were reproduced from reference^{[126],[130]}.

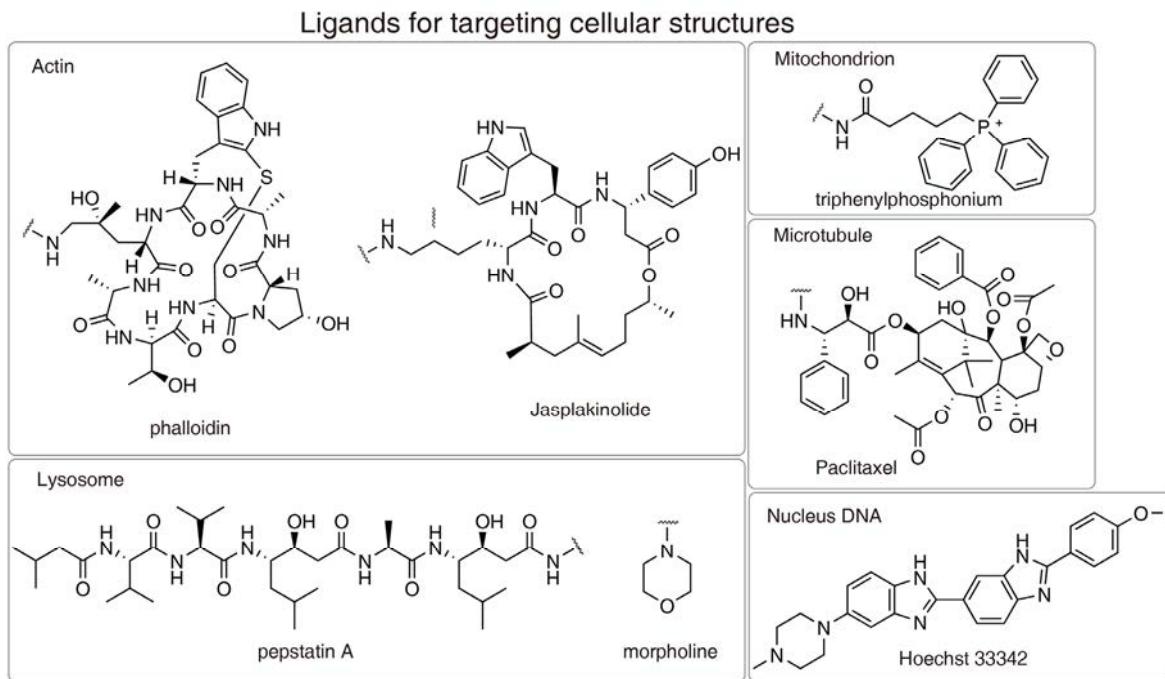


图 1.35 细胞亚细胞结构的靶向配体
Figure 1.35 Targeting ligands of subcellular structures.

绝大多数商品化的亚细胞器探针就是有机小分子荧光染料，并具备较好光谱性质与选择性标记能力。2012 年，Zhuang 等^[3]成功应用商品化的亚细胞器探针（图 1.36a，MitoTracker Red，1-55；Lysotracker Red，1-56；DiI，1-57；ER-Tracker Red，1-58）对活细胞的线粒体、溶酶体、细胞膜和内质网进行了定位型超分辨成像（图 1.36a），为了促进这些染料的单分子闪烁，研究者在成像体系中添加了成像液。2013 年，Manley 等^[133]尝试利用其它的商品化小分子探针实现活细胞定位型超分辨成像，并且进一步探究了成像液对这些染料的超分辨重构解析结果的影响。结果显示绝大部分商品化的亚细胞器探针需要额外使用成像液系统，才能实现较为准确而完整的靶标结构的超分辨成像。2015 年，Gerlich、Johnsson 等^[134]开发了具有细胞核 DNA 靶向能力的硅基罗丹明（图 1.36b，1-59），这种染料通过衍生 Hoechst 靶向基团而获得了细胞核的选择性标记。通过这种染料，研究者实现了细胞核的 STED 超分辨成像（图 1.36b）。2016 年，Lukinavičius、Reymond、Johnsson 等^[135]在硅基罗丹明共轭结构外的苯环 5 位羧基衍生了不同的靶标基团，成功开发了一系列具备亚细胞器靶向功能的荧光探针（图 1.36c，1-60），并利用这些探针实现了相应亚细胞的选择性 STED 超分辨成像（图 1.36c）。2018 年，Lukinavičius

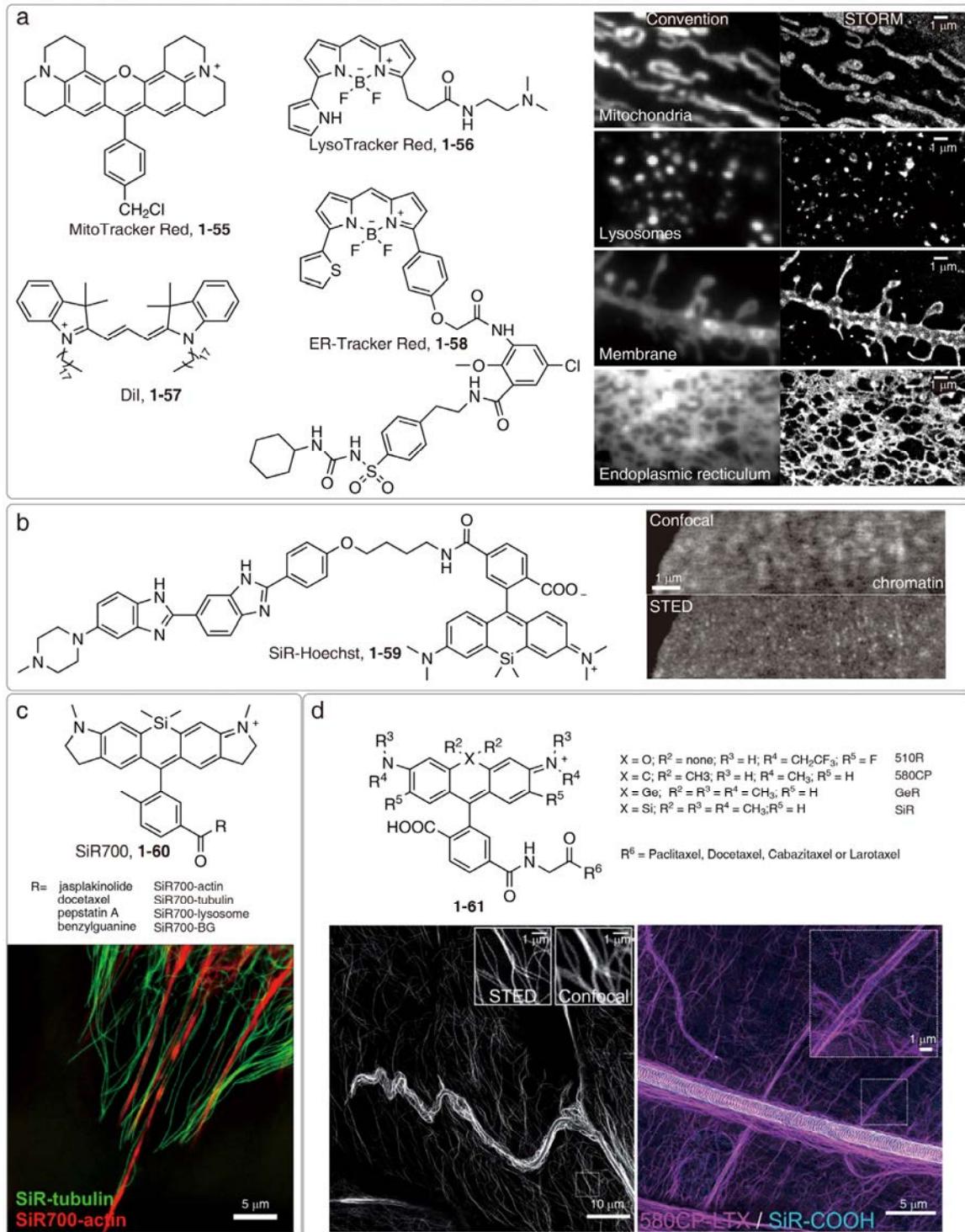


图 1.36 小分子荧光标识物用于超分辨成像

Figure 1.36 Small-molecule fluorescent markers for super-resolution imaging.

等^[136]为多种罗丹明(普通、碳基、锗基和硅基罗丹明)开发了靶向微管的探针(图 1.36d, **1-61**)，其标记能力通过为染料连接紫杉醇及其衍生物获得。他们从毒性、膜通透性和标记动力学对这些探针进行了评估，并通过这些新探针，实现了对黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)幼虫活体组织微管结构的 STED 超分辨成像(图 1.36d)。

小分子荧光探针的染色策略与 PAINT 成像技术具有共同的标记方式。如 1.3.2 节中关于 PAINT 成像技术所述，PAINT 技术要求染料非稳态结合到靶标结构或者生物大分子上，而小分子荧光探针依靠色散力等分子间亲和力，通过非共价的方式实现对靶标结构的标记，且具备标记可逆性。当标记结构的周围发生微环境变化时(如 pH、电位等)，标记的小分子可以可逆离开标记位置。因此，小分子荧光染色方法天然就具备有 PAINT 型超分辨成像的特征。基于该特征，PAINT 型超分辨成像中绝大多数研究报道应用的染料是小分子荧光探针，如 Nile red^[85]，Atto488-LifeAct^[88]等。然而，并非所有小分子荧光探针都可以有效的实现 PAINT 型成像，因为后者还要求荧光染料具有与单分子信号收集时间相匹配的标记驻留时间^[91]，并且在成像中实现多次可逆的标记过程。这些特征的开发仍有待研究者对小分子探针的分子结构设计优化，以增强有机荧光染料在定位型超分辨成像的应用潜力。

近年来，为了优化小分子探针的开发策略，研究者在也将前文所述的四嗪-环辛烯/环辛炔的生物正交的标记方法用于这类探针的开发。该方法通过模块化分子设计策略，避免了因为染料母体结构特征不同，单一靶向配体需要为不同染料设计独立连接策略的难题。基于四嗪-环辛烯体系，荧光染料分子只需要共价衍生四嗪(绝大部分情况下)或者环辛烯，而探针的标记选择性则通过为靶向配体衍生配对的正交底物实现。因此，该策略降低了小分子荧光染料探针的设计难度及合成复杂度。2018 年，Kele 等^[137]优化了 Cy5 染料衍生四嗪的方式，获得的四嗪 Cy5 染料在正交标记前后展现出更大的荧光亮度差异。通过新的 Cy5 染料以及连接有鬼笔环肽(phalloidin, 图 1.35)的环辛炔的靶向配体，他们成功以免洗方式对肌动蛋白进行了 STED 超分辨成像。前文所述的染料 **1-53** 和染料 **1-54** 也通过连接有鬼笔环肽的环辛烯靶向到肌动蛋白进行了超分辨成像。

改善染料的生物相容性，即提升染料的膜通透性以及水溶性，也是荧光染料设计和开发的重点。这些性质的改良有利于提升染料在活细胞成像的应用潜力。比如，2014 年，Zhang 等^[138]通过引入穿膜肽链，将光激活的罗丹明螺内酰亚胺染料以及传统“Caged-Rh110”导入活细胞的亚细胞器结构上，并实现了活细胞的超分辨成像。在 1.3.2 节介绍的染料 **1-25** 和 **1-28** 也衍生有磺酸基和羧基，这些衍生基团改善了染料的水溶性以及生物相容性。

1.3.5 研究进展总结

自定位型超分辨荧光显微成像技术开发以来，研究者逐步地扩大了可适用的染料库中染料的种类。超分辨成像荧光染料已经从最初的有限单一荧光染料配对体系以及极个别光转换荧光蛋白发展成多样化的具有不同吸收发射波段、具备不同母体结构的以及使用不同标记方法的染料库。在此过程中，也迸发出包括硅基罗丹明在内的多种明星染料，研究者对它们进行了从发光、光激活转化策略、标记策略等广泛的优化尝试，并且取得了丰富的对细胞内结构超分辨成像结果。与此同时，这些荧光染料的发展同时也促进定位型超分辨成像的进化，超分辨成像的维度逐步从二维静态逐步扩展到三维动态，极大的提升了人们对于生命微观结构以及生命过程的认知。

然而，虽然超分辨荧光染料已经取得了相当的进展，但是真正能够实现活细胞超分辨成像的荧光染料仍然有限，并且荧光染料研究领域内缺乏设计超分辨荧光染料的方法，绝大多数的超分辨荧光染料仍然有相当的生物学应用局限性。

1.4 本文主要研究思路

1.4.1 染料母体选择

作为传统激光染料之一，罗丹明染料具备有较为优秀的荧光亮度以及较好的光稳定性。因此，罗丹明染料被广泛应用于定位型超分辨成像（见 1.3 节），是适用于该成像的核心染料之一。例如，罗丹明染料中的罗丹明螺内酰亚胺具备可逆激活的特性，可以稀疏转换到两性离子的亮态，适用于定位型超分辨成像。但是这些染料的性质（如亮态时间和亮度）仍然不够理想，在活细胞超分辨成像中的适用性能较弱，仍需要研究者优化罗丹明的分子设计来解决该染料的性能缺陷。因此，本论文选择的染料研究母体为罗丹明。

1.4.2 研究策略

影响荧光染料的定位型超分辨成像性能的三个关键性能，即亮度、闪烁特征和稳定性，均可以通过单分子光物理性质测量获得，而荧光染料的标记功能可以通过对高性能荧光染料进行生物标记功能衍生开发而获得。因此，本论文从罗丹明平台出发，尝试对该染料分子结构进行优化设计，提升其定位型超分辨成像性能；对优化后的染料进行单分子分析，预测评估其定位型超分辨成像能力；最后通过对染料生物功能衍生化，实现活细胞不同靶标结构的定位型超分辨成像。

然而，目前染料研究领域内无标准一致的单分子分析算法，且绝大多数算法存在准确性低以及统计通量小的问题。为此，本论文首先尝试提出和建立完整的单分子分析算

法，并为此开发相关的自动化、易用型软件。通过算法和软件的开发，确定荧光染料的评价方法，对本论文开发的荧光染料进行单分子分析研究和超分辨成像能力预测。

罗丹明染料中的螺内酰亚胺类型罗丹明具备适应于定位型超分辨成像的可逆光激活特征。然而其关键性能，光激活后亮态持续时间到目前为止未有优化策略。而在探针研究领域中，研究者的广泛共识是酸性环境质子及金属离子可以稳定罗丹明螺内酰亚胺的两性离子态亮态，并基于该机理开发了大量的荧光探针。受此启发，本论文尝试为罗丹明螺内酰亚胺在分子内引入内酸性环境，通过在螺环处邻接羧基策略延长这类染料的亮态时间；通过单分子光物理性质研究验证这些设计策略的有效性；最后通过开发相关的具有生物标记功能的染料衍生物，完成对活细胞亚细胞器结构的超分辨成像。

传统罗丹明染料受分子内扭曲电荷转移态(TICT)影响，在水中的发光亮度不理想，不利于定位型超分辨成像。本论文尝试从电子诱导效应出发，通过吸电子诱导效应的季铵化哌嗪基团取代传统二甲氨基供体取代基，降低供体的电子诱导效应，从而抑制 TICT 的发生。对基于该策略开发染料进行光谱学研究、单分子研究，确定策略提升亮度的有效性，并预测评估这些染料的超分辨成像应用潜力。最后，通过开发具有生物标记功能的染料衍生物，尝试对活细胞亚细胞器结构进行超分辨成像，确定该策略于超分辨成像的价值。

2 单分子分析算法的建立和软件的开发

2.1 引言

单分子定位超分辨成像技术源于单分子荧光研究。在这些研究针对的信号是单个分子的时间合并光子统计信息（time binned photon collection），同时这些信号也是超分辨成像定位对象，单分子分析具备有与定位型超分辨成像相同的基础分析对象。连续收集的时间合并光子统计信息构成了单分子分析中的单分子荧光轨迹。这些轨迹反映了单个染料分子在成像过程的亮暗态（或其它更复杂的状态）变化过程，揭示了染料在定位型超分辨成像应用的闪烁特征。因此，针对荧光轨迹分析的单分子分析可以实现对染料定位型超分辨成像能力的评估和预测。

实现对荧光染料的单分子分析，需要合适的数学模型算法以及相应的分析软件。然而，在荧光染料研究领域内缺乏完善解决上述问题的软件和方法。在以往的研究中，研究者采用的简单域值过滤分析方法缺乏确定的标准，不同研究报告的数据缺乏可对比性，且统计通量较小，分析的准确性较低，误差较大。这些方法缺乏准确分析染料单分子光物理性质及评估预测其超分辨成像应用潜力的能力。因此，在开发有效的超分辨成像荧光染料前，亟待针对上述的问题进行相关的数学模型优化以及处理软件的开发。

2.2 单分子分析算法的设计

单分子分析由单分子识别、状态轨迹拟合和单分子光物理性质分析三部分构成。

首先，需要识别单分子测量数据中的单分子信号。由于单分子与天文学无限远星体的近似点光源发光特征，可以通过天文图像处理的小波变换^[139]或者高斯滤波之差^[140]（定位型超分辨成像的候选信号识别算法）实现对单分子候选信号的识别。为了去除单分子信号重叠（空间距离过于接近）的候选单分子，可以通过定位型超分辨成像算法确定单分子信号位置，继而采用聚类算法归属分子的定位信息，实现距离过近分子的筛选。

单分子分析的第二步，需要实现对荧光轨迹的状态拟合。近年来，研究者广泛发展了荧光共振能量转移（FRET）荧光轨迹的拟合方法^{[141],[142]}，而 FRET 荧光轨迹由两个染料的荧光轨迹构成，因而这些拟合方法可以迁移到后者的拟合分析上。假定单分子荧光轨迹对应的染料亮暗态为隐匿态，基于贝叶斯信息准则确定染料转换状态个数，通过向前向后（Forward backward algorithm）算法和 Baum-Welch 算法拟合出状态转换隐匿 Markov 模型的参数，通过 Viterbi 算法实现荧光轨迹可能状态轨迹的分析。

最后, 从单分子荧光轨迹和拟合的亮暗态序列提取单分子光物理性质, 并实现对单分子光物理性质的后处理挖掘分析。这一步需要建立统一的标准, 从而实现不同染料的单分子光物理性质乃至超分辨成像潜力对比。

2.3 单分子数据结构

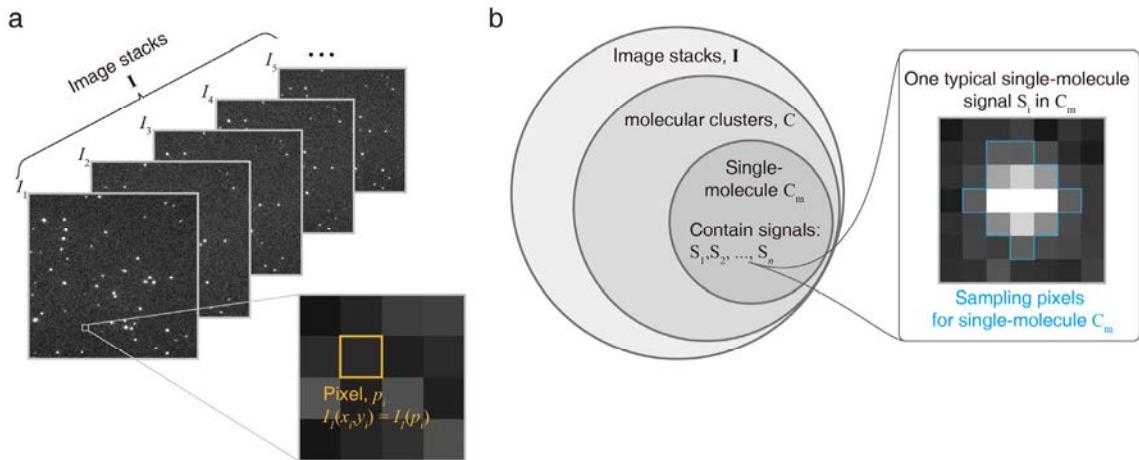


图 2.1 提取单分子信号过程的数学模型包含的数据结构

Figure 2.1 Data sets in mathematical model for extraction of single-molecule signals.

单分子实验测量获得的是堆栈的图序列 ($\mathbf{I} = \{I_1, I_2, \dots, I_{Fn}\}, n \in \mathbb{Z}^+$, 图 2.1a), Fn 是测量的图像总帧数, 每帧成像图均由像素点 $p(x,y)$ 构成, 并且在每帧图上散布着单分子的 PSF($\{S_1, S_2, \dots\}$, 图 2.1b)。对单分子信号进行分析, 首先要将这些单分子 PSF 在图像所在的位置识别出来, 接着将空间距离过近的单分子信号选出并排除在候选分析信号之外, 最后确定每个候选信号的采样像素并提取出其荧光轨迹信息。

2.4 单分子信号的识别

准确的单分子识别需要有效的提取单分子信号特征, 避免收集的单分子成像图中的背景噪音的干扰。

2.4.1 背景噪音过滤及单分子候选信号初选

(1) 阈值过滤的方法

最常见的识别方法是对一帧图像 I_k 上的所有像素点进行阈值过滤，将强度高于背景噪音信号（通常由研究者自行设定和优化）几倍的极值选定为候选单分子信号。这一过程可用方程 2.1 描述：

$$I_k(p_i) > n \times b \quad (2.1)$$

其中 b 为图像的背景噪音信号强度， n 为设定的倍数（通常取值 2–4）。

然而，这种方法要求准确的测量图像的背景噪音信号，阈值的高低选择也会影响不同样品获取的单分子信号候选的准确度。过高的阈值将丢失强度较弱一些的单分子信号，而较低的阈值则会极大的增加候选信号中的噪音干扰。另一方面，非均匀的噪音会严重影响获取单分子候选信号的准确度。

（2）高斯滤波

高斯滤波的算法平滑了背景噪音，减少了背景噪音对候选单分子信号的干扰。该方法首先对图像进行如方程 2.2 的高斯卷积运算：

$$I_G(x, y) = \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} I(x - k, y - l) \mathbf{K}_G(k, l) \quad (2.2)$$

其中 $\mathbf{K}_G(k, l)$ 为高斯滤波核函数：

$$\mathbf{K}_G(k, l) = e^{-\frac{k^2+l^2}{2\sigma^2}} \quad (2.3)$$

σ 为高斯滤波函数的方差，这个方差的预设值应当接近样品的单分子信号半径。在实际工程分析中，会对高斯滤波进行离散化近似，采用 7×7 或者 9×9 大小的一个小矩阵存放高斯滤波核函数，而 k 和 l 的取值也整数化。通过这种算法可以减轻背景噪音对单分子信号的干扰。

（3）高斯滤波之差

虽然高斯滤波已经去除了随机噪音的干扰，但并不能完全摆脱成像视野噪音不均匀分布造成的干扰。为了进一步降低这部分背景噪音的干扰，还可以进一步对图像信号的高斯卷积结果求差来更准确的获得单分子候选信号：

$$I_{DOG}(x, y) = I_{G1}(x, y) - I_{G2}(x, y) \quad (2.4)$$

这两个高斯滤波的核函数预设了不同的半径 (σ)，分别设定了分析特征尺寸的上界和下界，而滤波结果的差值则给出尺寸处于上下限之间的信号特征。不仅如此，差值的计算可以有效的减少样品本身的非均匀性的背景噪音干扰。

（4）小波变换

小波变换也可以从频率域提供单分子特征信息，这种方法已经被广泛用于分析天文学中的星体光谱信息^[139]。基于单分子信号与无限远星体发光特征的相似性（都在物理模型中近似为点光源），研究者近年来逐步将稳态小波变换（a trous wavelet transform or ‘a trous wavelet transform）的算法用于定位型超分辨成像识别单分子信号以及对定位中心的分析。

本论文中采用的小波尺度函数（scale function）是 B-Spline 函数，其一维一级（ $k=1$ ）形式为：

$$B_1(t) = \begin{cases} 1 & 0 \leq t < 1 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (2.5)$$

高级形式为：

$$B_{k+1}(t) = \frac{t}{k} B_k(t) + \frac{k+1-t}{k} B_k(t-1) \quad (2.6)$$

每级的 B-Spline 函数同时满足下面的双尺度（two-scale relation）关系：

$$B_k(t) = \sum_{i=0}^k 2^{-k+1} \binom{k}{i} B_k(2t-i) \quad (2.7)$$

基于上述 B-Spline 函数本身满足的双尺度关系（方程 2.7），以及小波变换的尺度函数满足双尺度关系方程 2.8，可以获得小波变换的尺度函数的 $\{h(l)\}$ 系数。在本论文中，采用其四级形式（cubic B-spline）作为小波分析的尺度函数，而一维四级 B-Spline 函数作为尺度函数的小波变换的系数 $\{h(l)\}$ 为 $(\frac{1}{16}, \frac{1}{4}, \frac{3}{8}, \frac{1}{4}, \frac{1}{16})$ （ l 分别取 0, 1, 2, 3, 4），用矩阵形式表述为 $\mathbf{h} = [\frac{1}{16}, \frac{1}{4}, \frac{3}{8}, \frac{1}{4}, \frac{1}{16}]$ 。

$$\frac{1}{2} \phi\left(\frac{t}{2}\right) = \sum_l h(l) \phi(t-l) \quad (2.8)$$

对于二维的数据，这个系数可以拓展为：

$$\mathbf{h}\mathbf{h}^T \quad (2.9)$$

而这个系数可以从原始信号 $(c_0(x, y) = I(x, y))$ 卷积逐步计算出各级小波变换的尺度函数系数：

$$c_{j+1}(x, y) = \sum_k \sum_l h(k) h(l) c_j(x + 2^j k, y + 2^j l) \quad (2.10)$$

通过这个尺度函数系数就可以求解出每一级小波变换系数：

$$w_{j+1}(x, y) = c_j(x, y) - c_{j+1}(x, y) \quad (2.11)$$

通常第一级 ($j=1$) 的小波变换系数中包含图像中的高频率分量, 这些高频分量主要来源于样品测量的噪音, 因此可以求出其统计意义上的平均值或者方差作为识别单分子信号的阈值。而在相应的识别研究中, 一般用对第二级 ($j=2$) 的数据进行分析, 因为这一级包含有接近于单分子信号特征频率。

相对于阈值分析和单一高斯滤波方法, 高斯滤波之差以及小波变换对背景噪音具有更好的容忍度, 因而后两者在本文中被采用作为单分子信号的识别方法。而后的区别是, 高斯滤镜之差的方法对单分子信号的尺寸均一性要求更高, 焦面接近成像焦面的单分子信号才能够被识别; 小波变换对不同焦面的单分子信号均有较好的识别作用, 但这种增强的识别效应会导致一些背景的单分子信号 (例如, 来源于玻璃表面的非特异性结合的染料噪音信号)。但单分子研究的样本具有非常高的均一性 (单分子接近分布于同一焦面), 因此这两种方法在识别单分子研究的单分子信号时候, 区别较小。

2.4.2 重叠单分子信号的排除

准确的单分子分析要求单分子荧光轨迹来源于单个分子, 而空间距离过近的单分子信号会互相干扰各自的荧光轨迹, 因此需要在下一步处理前进行排除。由于单分子染料并非在成像时处于亮态, 即便是压制型染料, 也有可能有极少一部分染料分子处于暗态, 因此最佳的单分子分析应当包括对收集成像图的所有帧的单分子信号进行分析。这一过程可以通过定位型超分辨成像的分析方法, 首先获得在成像过程中收集到所有单分子定位的信息, 然后利用聚类分析的方法, 对这些单分子信号进行分子归属。最后按照聚类的质心位置进行距离 (本论文中采用欧式距离) 分析, 将过于靠近的两个分子候选信号排除。

单分子的发光形成的 PSF, 可以利用二维高斯分布进行近似的拟合, 而从拟合的高斯函数的参数可以获得单分子定位以及亮度信息。二维高斯函数的形式如下:

$$G(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{(x-x_0)^2+(y-y_0)^2}{2\sigma^2}} \quad (2.12)$$

由于相机的像素化效应, 直接用高斯函数对单分子离散的像素强度值进行拟合的数学模型的偏差较大。按照之前文献的方法^[143], 采用积分型二维高斯函数作为 PSF 的近似数学模型:

$$iG(x, y|\theta) = \theta_N E_x E_y + \theta_b \quad (2.13)$$

$$E_x = \frac{1}{2} \operatorname{erf}\left(\frac{x-\theta_x+1/2}{\sqrt{2}\theta_\sigma}\right) - \frac{1}{2} \operatorname{erf}\left(\frac{x-\theta_x-1/2}{\sqrt{2}\theta_\sigma}\right) \quad (2.14)$$

$$E_y = \frac{1}{2} \operatorname{erf}\left(\frac{y-\theta_y+1/2}{\sqrt{2}\theta_\sigma}\right) - \frac{1}{2} \operatorname{erf}\left(\frac{y-\theta_y-1/2}{\sqrt{2}\theta_\sigma}\right) \quad (2.15)$$

其中 Θ 是所有拟合参数的列矩阵: θ_N 是信号的亮度 (即单个 PSF 的发出光子数) , θ_b 是背景的噪音强度, θ_x 、 θ_y 是二维高斯函数的中心坐标 (即单分子的定位位置坐标) , θ_σ 是二维高斯函数的方差 (反映单分子 PSF 的尺寸) , 这些参数同时给出了拟合单分子信号对象的特征信息。

本论文中采用非线性最小二乘法来对原始信号与积分型二维高斯函数进行拟合分析:

$$\text{Find } \Theta \text{ minimize } (iG(x, y|\Theta) - I(x, y))^2 \quad (2.16)$$

使用 Levenberg–Marquardt 算法, 通过方程 2.17 获得每一迭代的参数优化变量列矩阵 δ 。当算法计算的优化变量或者拟合与真实图像的差距小于一个设定的极小值时, 则认为找到拟合的参数完成迭代。

$$(\mathbf{J}^T \mathbf{J} + \lambda \mathbf{I}) \delta = \mathbf{J}^T [I(x, y) - iG(x, y|\Theta)] \quad (2.17)$$

$$\mathbf{J} = \begin{bmatrix} \frac{\partial iG(x_1, y_1|\Theta)}{\partial \theta_1} & \dots & \frac{\partial iG(x_1, y_1|\Theta)}{\partial \theta_n} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial iG(x_m, y_m|\Theta)}{\partial \theta_1} & \dots & \frac{\partial iG(x_m, y_m|\Theta)}{\partial \theta_n} \end{bmatrix} \quad (2.18)$$

迭代计算中需要积分型二维高斯函数的偏导数, 在本论文中采用的偏导数如下:

$$\frac{\partial iG(x, y|\Theta)}{\partial \theta_x} = \frac{\theta_N}{\sqrt{2\pi}\theta_\sigma} \mathbf{E}_y (e^{-\frac{(x-\theta_x-1/2)^2}{2\theta_\sigma^2}} - e^{-\frac{(x-\theta_x+1/2)^2}{2\theta_\sigma^2}}) \quad (2.19)$$

$$\frac{\partial iG(x, y|\Theta)}{\partial \theta_y} = \frac{\theta_N}{\sqrt{2\pi}\theta_\sigma} \mathbf{E}_x (e^{-\frac{(y-\theta_y-1/2)^2}{2\theta_\sigma^2}} - e^{-\frac{(y-\theta_y+1/2)^2}{2\theta_\sigma^2}}) \quad (2.20)$$

$$\frac{\partial iG(x, y|\Theta)}{\partial \theta_\sigma} = \frac{\theta_N}{\sqrt{2\pi}\theta_\sigma^2} (\mathbf{E}'_x \mathbf{E}_y + \mathbf{E}_x \mathbf{E}'_y) \quad (2.21)$$

$$\frac{\partial iG(x, y|\Theta)}{\partial \theta_N} = \mathbf{E}_x \mathbf{E}_y \quad (2.22)$$

$$\frac{\partial iG(x, y|\Theta)}{\partial \theta_b} = 1 \quad (2.23)$$

其中 \mathbf{E}'_x 与 \mathbf{E}'_y 为:

$$\mathbf{E}'_x = (x - \theta_x - 1/2) e^{-\frac{(x-\theta_x-1/2)^2}{2\theta_\sigma^2}} - (x - \theta_x + 1/2) e^{-\frac{(x-\theta_x+1/2)^2}{2\theta_\sigma^2}} \quad (2.24)$$

$$\mathbf{E}'_y = (y - \theta_y - 1/2) e^{-\frac{(y-\theta_y-1/2)^2}{2\theta_\sigma^2}} - (y - \theta_y + 1/2) e^{-\frac{(y-\theta_y+1/2)^2}{2\theta_\sigma^2}} \quad (2.25)$$

逐帧进行上述超分辨定位分析，可以获得所有单分子信号的精确坐标，在此将 L 定义为所有单分子信号定位坐标的集合。由于单个分子的亮态能够持续在多帧 ($\{1, 2, \dots, n\}, n \leq Fn$) 的成像图中形成多个单分子信号 ($S_k, S_{k+1}, \dots, S_l, k, l \in \mathbb{Z}^+$)，并且荧光分子也可能会出现多次亮暗态的转换形成多个单分子信号，因此收集的单分子精确定位信息需要进行分子归属。

本论文中采用 dbScan 聚类算法，基于定位的二维坐标的欧式距离进行聚类分析，其扫描半径 ($\text{eps} = 0.4 \text{ pixel}, 64 \text{ nm}$) 与定位精度接近，而每一个类的最少个数 minPts 是 2 个。在聚类分析后，所有不能够归属的单次出现的信号被归属于背景噪音类 C_b ，从而被排除出后续的分析算法。经过聚类分析后， L 中剩余的定位数据被归属于 $m (m \in \mathbb{Z}^+)$ 个分子类 C 中：

$$L = \begin{cases} C_b & \text{Background} \\ C = \{C_1, C_2, \dots, C_m\} & \text{Molecular cluster} \end{cases} \quad (2.26)$$

每个分子类中也包含有若干个分子信号：

$$C_i = \{S_{C_i,1}, S_{C_i,2}, \dots, S_{C_i,j}\} \quad C_i \in C \cap j \in \mathbb{Z}^+ \cap j \geq 2 \quad (2.27)$$

这些信号处于不同帧的成像图上。

最后计算各分子类之间的欧式距离，将距离过近 ($<4.5 \text{ pixel}$ ，大约 2-3 倍单分子的半峰宽) 重叠分子类排除出后续的分析。最终剩余的分子类 $C = \{C_1, C_2, \dots, C_k\} (k \in \mathbb{Z}^+)$ 就作为候选的单分子信号进行后续的荧光轨迹信息挖掘和后处理分析。图 2.2 展示了对序列单分子成像结果的聚类分析结果。左图是单分子成像第一帧采集到的信号，而中间图则展示了整个成像周期获得的图栈叠加计算的整体信号图，右图展示了对成像图栈的定位和聚类分析结果。第一帧与叠加图的对比显示有部分分子信号很快的发生了漂白的过程，因而在整体叠加图上并未能显现其单分子信号特征。所有信号的定位信息均在聚类分析图上显现，并且归属到对应的分子类中。在图中显示了两个分子类之间的空间距离过近，他们的单分子信号将会产生相互干扰，因而在后续的单分子分析中被排除。另外，图中还显示了几个在成像过程中仅有一次的定位信息，其定位没有与其它的定位在空间或者时间上产生相关性，因此在本研究中倾向于将其归属与随机出现的背景噪音信号，因而没有归属到任何一个分子类中，也被排除在后续分析之外。

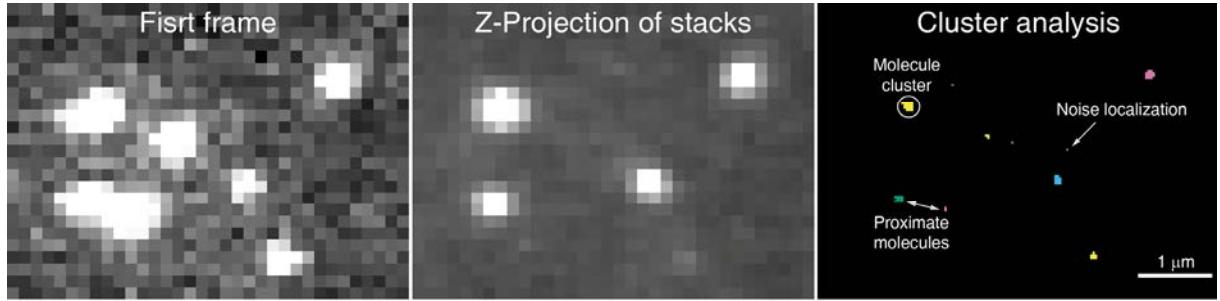


图 2.2 单分子成像结果的聚类分析

Figure 2.2 Cluster analysis of single-molecule imaging results.

2.4.3 单分子信号采样像素的确定

在提取单分子荧光轨迹信息前, 需要确定单分子信号集合 $\mathcal{S} (\mathcal{S} \subset \mathcal{C})$ 每个信号 ($\mathcal{S} = \{S_1, S_2, \dots, S_l\}, l \in \mathbb{Z}^+$) 主要分布的像素单元集合 \mathbf{P} :

$$\mathbf{P}_i = \{p_{i,1}, p_{i,2}, \dots, p_{i,n_i}\} \quad n_i \in \mathbb{Z}^+, \mathbf{P}_i \in S_i \quad (2.28)$$

为此, 对一帧图像 I_j 去除单分子信号周围 3 格像素 (7×7) 后剩下的背景噪音信息求中位值:

$$\begin{aligned} b_j &= \text{median}(\{I_j(\mathbf{P}')\}) \\ (\mathbf{P}' &= \{p_1, p_2, \dots, p_n\}) \notin \mathcal{C} \cap \mathbf{P}' \subset I_j, n \in \mathbb{Z}^+ \end{aligned} \quad (2.29)$$

计算结果 b_j 定义为每帧图像的背景噪音信号。

然后, 以 1.5 倍的上述噪音信号作为阈值, 对每帧的单分子信号及其周围的像素单元的荧光信号强度进行筛选, 将高于阈值的像素单元选出作为每帧单分子信号的候选像素单元。

$$I_j(\mathbf{P}_i) > 1.5 \times b_j \quad \mathbf{P}_i \in S_i, j = \text{frame}(S_i) \quad (2.30)$$

frame 函数可以给出给定单分子信号所在帧的帧序号。通过上述筛选, 对于所有的单分子信号 \mathcal{S} 均获得了其主要分布的像素集合 $\tilde{\mathbf{P}}_i = \{\mathbf{P}_1, \mathbf{P}_2, \dots, \mathbf{P}_i\}$ ($\tilde{\mathbf{P}}_i \in S_i$)。

接着, 根据 2.4.2 节已经给出单分子信号归属信息, 将归属于同一分子类 $\mathcal{C}_m (m \in \mathbb{Z}^+)$ 的 n 个单分子信号的像素集合 ($\{\tilde{\mathbf{P}}_{m,1}, \tilde{\mathbf{P}}_{m,2}, \dots, \tilde{\mathbf{P}}_{m,n}\}, n \in \mathbb{Z}^+ \cap n \geq 2$) 合并成具有 k 个像素点的像素集合:

$$\begin{aligned} \mathbf{P}_{\mathcal{C}_m} &= \bigcup_{i=1}^n \tilde{\mathbf{P}}_{m,i} \\ &= \{p_1, p_2, \dots, p_k\}, k \in \mathbb{Z}^+ \end{aligned} \quad (2.31)$$

计算 \mathbf{P}_{C_m} 每一个像素点在该分子类中所有单分子信号中给出的荧光强度的中位值：

$$\tilde{I}(p_i) = \text{median}(\{I_j(p_i)\}) \quad p_i \in \mathbf{P}_{C_m} \cap j = \text{frame}(\{C_m\}) \quad (2.32)$$

再计算该分子类的信号所处帧的噪音中位值：

$$b_{C_m} = \text{median}(\{b_n\}), n = \text{frame}(\{C_m\}) \quad (2.33)$$

以方程 2.33 计算的噪音值的 1.5 倍作为阈值，与方程 2.32 计算的像素点荧光强度中位值进行比较：

$$\tilde{I}(p_i) > 1.5 \times b_{C_m}, p_i \in \mathbf{P}_{C_m} \quad (2.34)$$

筛选出荧光信号较强的像素点集合 $\mathbf{P}_{C_m}^{final}$ 作为最终提取该分子 (C_m) 的采样像素。对所有 2.4.2 节的分子总类 C 中每个分子按照方程 2.31-2.34 进行计算，提取出每个候选分子的采样像素，然后从成像的所有帧图中提取其荧光强度轨迹。方程 2.35 展示了对分子 C_m 提取荧光轨迹的计算方法：

$$f_{C_m} = \left[\sum_{\mathbf{P}_{C_m}^{final}} I_1(p_i), \sum_{\mathbf{P}_{C_m}^{final}} I_2(p_i), \dots, \sum_{\mathbf{P}_{C_m}^{final}} I_{Fn}(p_i) \right] \quad (2.35)$$

2.5 单分子荧光强度轨迹的拟合

在发生光漂白前，荧光染料分子持续在亮暗态之间发生随机的转换。在亮态时，荧光染料分子发出光子，形成单分子信号，而暗态时荧光染料分子通常不发出或者给出极少的光子信息。因而通过对单分子信号的持续测量获得的荧光强度轨迹反映了单个荧光染料分子在漂白前的亮暗态转换光物理特征。然而，荧光染料的荧光发射过程具有自然的涨落；分子由于距离绝对焦面的距离以及分子偶极方向不同，其单分子信号的形态也具有差异；所有的荧光轨迹测量都卷积了测量系统的误差，对其亮暗态转换的对比度产生了影响。因而，简单通过“人眼”判断设定阈值的方法并不能够完全反映出测量单分子样品的亮暗态转换特征。

在荧光共振能量转移单分子研究中，研究者提出利用隐匿马尔可夫模型可以更为有效地分析隐藏在荧光轨迹背后的分子发光强度转换过程^{[141],[142]}。基于以上研究结果，本论文中也采用隐匿马尔可夫模型 (hidden markov model) 对单分子荧光强度轨迹进行拟合，分析单分子发光的亮暗态转换过程。

首先假定整个荧光轨迹的测量时长 (帧数) 为 $\mathbf{T} = \{1, 2, \dots, T\} (n \in \mathbb{Z}_n)$ 。按照隐匿马尔可夫模型，单个分子荧光轨迹为模型中的对隐匿状态的观察测量序列，可以用方程 2.36 描述：

$$F(t) = f_t, t \in \mathbf{T} \quad (2.36)$$

而单分子发光的亮暗态则对应于模型中的隐匿状态 s ，有 k 个隐匿状态 $S = \{1, 2, \dots, k\} (k \in \mathbb{Z}^+)$ 。而隐匿状态的各种不同荧光发射的可能性则用观察函数来描述，在本论文中荧光随机涨落的观察概率采用高斯分布函数描述：

$$\begin{aligned} O(f, i) &= \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_i} e^{-\frac{(f-\mu_i)^2}{2\sigma_i^2}} \\ &= o_{f,i}, f \in F, i \in S \end{aligned} \quad (2.37)$$

按照隐匿马尔可夫模型，各个时刻发生的状态变化的概率不与前一时刻的状态变化过程相关，是时间独立的。因此，各个隐匿状态之间相互转换的概率（以及隐匿状态保持的概率）用一个转换矩阵 ($A = \{a_{i,j}\}, i, j \in S$) 来描述，即从 i 状态转换到 j 状态的可能性是 $a_{i,j}$ 。而初始的荧光染料状态分布的概率可以用 π 来描述。按照上述模型，在时刻 t 的处于 j 状态的可能性为：

$$\begin{aligned} \alpha_{1,i} &= \pi_i o_{f_1,i} \\ \alpha_{t,j} &= \sum_{j \in S} a_{i,j} \alpha_{t-1,j} o_{f_t,j}, i, j \in S, t \in \mathbf{T} \end{aligned} \quad (2.38)$$

整个模型与荧光轨迹的相似匹配程度可用方程 2.39 衡量：

$$P(S, F) = \sum_{j \in S} a_{i,j} \alpha_{t,T} o_{f_T,j}, i \in S \quad (2.39)$$

按照上述的数学模型，确定荧光轨迹中荧光分子亮暗态变化的过程变为寻找隐匿马尔可夫模型中对应的隐匿状态序列的过程。要获取隐匿状态序列，首先要对马尔可夫模型的转换矩阵和观察函数进行求解。本论文中采用 Baum-Welch 算法，通过预设接近最优解的初始值，迭代进入模型估算出新的相关参数，再根据新的参数进一步迭代，直到整个体系的相似匹配程度不再变化，即可完成对模型参数最优解的求解过程。迭代计算中需要用到向前-向后 (forward-backward) 算法，其中向前计算的计算由方程 2.38 完成，而向后计算，则假定最终 (时刻 T) 的概率为 1 向前逆推计算各个状态的概率：

$$\begin{aligned} \beta_{T,i} &= 1 \\ \beta_{t,i} &= \sum_{j \in S} a_{i,j} o_{f_{t+1},j} \beta_{t+1,j}, t \in \mathbf{T} \cap t \neq T \end{aligned} \quad (2.40)$$

由此，可以推算出基于整个模型和荧光轨迹测量结果，在 t 时刻观察到状态 i 的概率为：

$$\gamma_{t,i} = \frac{\alpha_{t,i} \beta_{t,i}}{\sum_{j \in S} \alpha_{t,j} \beta_{t,j}} \quad (2.41)$$

而在 t 时刻发生状态 i 转换为状态 j 的概率为：

$$\xi_{t,i,j} = \frac{\alpha_{t,i} a_{i,j} \beta_{t+1,j} o_{f_{t+1,j}}}{\sum_{i \in S} \sum_{j \in S} \alpha_{t,i} a_{i,j} \beta_{t+1,j} o_{f_{t+1,j}}} \quad (2.42)$$

进一步可以估算出新的模型参数：

$$\tilde{\pi}_i = \gamma_{1,i}, i \in S \quad (2.43)$$

$$\tilde{a}_{i,j} = \frac{\sum_{t=1}^T \xi_{t,i,j}}{\sum_{t=1}^T \gamma_{t,i}} \quad (2.44)$$

$$\tilde{\mu}_i = \frac{\sum_{t=1}^T f_t \gamma_{t,i}}{\sum_{t=1}^T \gamma_{t,i}} \quad (2.45)$$

$$\tilde{\sigma}_i = \sqrt{\frac{\sum_{t=1}^T \gamma_{t,i} (f_t - \mu_i)^2}{\sum_{t=1}^T \gamma_{t,i}}} \quad (2.46)$$

再用新参数带入模型，根据方程 2.38-2.39 求出新的模型匹配相似度。当匹配相似度不再增加（前后两次相似度之差小于一个极小值时），参数的优化迭代过程完成。基于上述参数优化后的模型以及荧光轨迹数据，采用 Viterbi 算法就可以计算出可能性最大的荧光染料分子的状态变化轨迹。

然而上述的分析方法并没有真正确定单个分子轨迹究竟包含有多少状态转换。因此，需要再引入贝叶斯信息准则（Bayesian information criterion, BIC），对整个体系的最终包含的状态个数进行约束，避免过度拟合同时预测出体系中隐藏的状态总数。

$$BIC = -2 \log(P(S, F)) + 2(\text{numParam}) \quad (2.47)$$

在计算中，从假定单一状态迭代递增加状态的个数，每增加一种状态，进行隐匿马尔可夫模型分析，并计算出该条件下的 BIC 值，并与前一次较少状态条件下的值进行比较，如果新 BIC 值没有出现降低，则选用前一次分析采用的状态个数以及相应的模型分析的结果作为最终结果；如果 BIC 值降低，则存储该此迭代的 BIC 值，并增加状态数量，进行下一轮的迭代运算。最终，通过这些算法，本论文给出荧光轨迹隐藏的荧光染料分子的状态转换轨迹：

$$S(t) = s_{i,t}, i \in S, t \in T \quad (2.48)$$

为了进一步降低由多个分子发光形成的荧光轨迹对单分子光物理性质统计带来的误差，本研究中仅对状态个数 $k=2$ ($S = \{S_{\text{on}}, S_{\text{dark}}\}$ ，即只有亮态 on 和暗态 dark) 的荧光强度轨迹进行下面的数据挖掘分析。

2.6 单分子光物理性质的测量

如序章 1.2.1-1.2.3 节所述, 荧光染料单分子的光物理性质极大程度上决定了其在定位型超分辨成像中的应用潜力。图 2.3 展示了从单分子荧光轨迹曲线以及拟合的状态转换序列 (State fit) 中测量单分子光物理性质的方法。这些性质包括单分子亮度 (光子收集速率、单次亮态过程的光子数), 单分子闪烁特征 (亮暗态转换速率、亮态持续时间、暗态持续时间、占空比), 单分子光稳定性 (总收集光子数、总闪烁次数)。

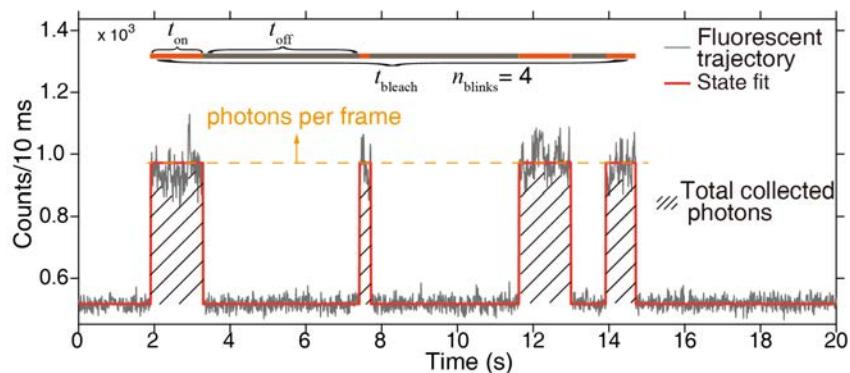


图 2.3 单分子光物理性质的测量示意图

Figure 2.3 Schematical illustration of measurement of single-molecule photophysical properties.

2.6.1 单分子亮度的测量

单分子亮度可以用两个测量量来反映, 其一是单分子处于亮态时的发出光子速率 (对应于测量时的对单个信号的光子收集速率); 其二是单次亮态过程的光子数, 即单次亮态的分子转换到暗态前总收集到的光子数。前者反映了荧光染料分子在一定光强条件下的光子发出快慢。具有较高发出光子速率的荧光染料分子在相同光强条件下可以在更短的时间内给出更多的光子统计数据, 十分有利于提高整个成像过程的光子收集效率, 以至于可能提高时间分辨率。而后者单次亮态过程的光子数, 则反映了荧光染料分子的单个信号能够收集到的最大可能的光子数。因此, 具有较高此参数的荧光染料分子具备形成高亮度的单分子信号的能力。然而, 单次亮态过程的光子数并没有反映出荧光染料分子的光子发射速率。如果荧光染料分子仅仅具有较高的单次亮态光子数, 而其荧光光子发射速率较慢的时候, 超分辨成像时需要增加光强以及延长曝光时间才能够获得该分

子的高亮度单分子信号，但是增加光强可能会对活细胞产生更大的光毒性，同时延长单个分子信号的成像曝光时间也会牺牲整体的时间分辨率。

对于提取出的单分子荧光轨迹，结合 2.5 节拟合获得的整个成像过程的亮暗态序列，可以获得该分子处于亮态时在轨迹上单帧的收集光子数量 $f(t_i)$ ($t_i \in \text{frame}(S_{\text{on}})$)，其单位是 photons/frame。这个参数同时也被称为光子收集速率 (photon count rate)、单分子光子发射速率 (photon emissive rate，在忽略收集的损失情况下) 或者单分子每帧光子数 (Photons per single-molecule per frame)。在确定实验中每帧的时间 t_{frame} 后，可以很容易转换为绝对光子的收集速率：

$$r(t_i) = \frac{f(t_i)}{t_{\text{frame}}}, t_i \in \text{frame}(S_{\text{on}}) \quad (2.49)$$

而单次亮态的光子数，则可以通过累加处于连续亮态（在转换到暗态前）的收集光子数量获得：

$$\text{Photons per switching cycle} = \sum f(i_{\text{on}}), i_{\text{on}} \in \text{frame}(\text{Successive bright states}) \quad (2.50)$$

2.6.2 单分子闪烁特征的测量

如 1.2.2 节所述，单分子的闪烁特征可以通过单分子亮暗态的转换速率来描述。然而，这些转换速率并不能够直接测量，需要先完成对单分子亮态时间、暗态时间的测量，然后通过一定的亮暗态转换的动力学模型计算出这些速率。

单分子亮态时间可定义为单个分子在亮态持续的时长 t_{on} ，从暗态转换到亮态到下一次亮态转换到暗态的时间。而暗态时间则定义为单个分子在暗态持续的时长 t_{dark} ，即从亮态转换到暗态到下一次从暗态转换到亮态的时间。当简单假定单分子亮暗态转换过程满足自然指数分布，在 t 时刻发生亮态到暗态转换的概率 $P_{\text{on}}(t)$ 或者发生从暗态到亮态的概率 $P_{\text{dark}}(t)$ 为：

$$P_{\text{on}}(t) = \bar{t}_{\text{on}} e^{-\frac{t}{\bar{t}_{\text{on}}}} \quad (2.51)$$

$$P_{\text{dark}}(t) = \bar{t}_{\text{dark}} e^{-\frac{t}{\bar{t}_{\text{dark}}}} \quad (2.52)$$

该过程的转换速率可以用其亮态时间期望值获得：

$$\begin{aligned} k_{\text{on}} &= \frac{1}{E(P_{\text{on}}(t))} \\ &= \frac{1}{\bar{t}_{\text{on}}} \\ &= k_d + k_b \end{aligned} \quad (2.53)$$

$$k_r = \frac{1}{E(P_{\text{dark}}(t))} = \frac{1}{\bar{t}_{\text{dark}}} \quad (2.54)$$

另外一个单分子闪烁的物理性质是占空比，其定义为单分子在其生命周期（或者成像周期内）处于亮态的时间占比：

$$\text{Duty cycle} = \frac{\sum_{S_{\text{on}}} t_{\text{on}}}{T_{\text{total}}} \quad (2.55)$$

2.6.3 单分子光稳定性的测量

单分子光稳定性相关的单分子光物理性质有总收集光子数，亮暗态转换次数（总闪烁次数），光漂白发生时间以及光漂白速率等。总收集光子数在本论文中定义为单分子荧光轨迹所有亮态帧的总收集光子数：

$$\text{Total collected photons} = \sum_{i_{\text{on}} \in \text{frame}(S_{\text{on}})} f(i_{\text{on}}) \quad (2.56)$$

亮暗态转换次数 n_{blinks} ，则定义为在单分子状态轨迹中，亮态转换到暗态以及暗态转换到亮态的次数总和。

光漂白的过程可能发生于亮态或者暗态，然而荧光轨迹只能收集到亮态发出的光子信号，暗态不能直接测量，因此绝对的光漂白时间无法获得。在本论文中定义的光漂白时间 t_{bleach} 为从染料激活或者第一次处于亮态作为起始时间到最后一次亮态到暗态的转换的时间间隔。

再一次使用自然指数衰减模型，假定荧光染料分子的光漂白在 t 时刻发生的概率：

$$P_{\text{bleach}}(t) = \bar{t}_{\text{bleach}} e^{-\frac{t}{\bar{t}_{\text{bleach}}}} \quad (2.57)$$

则光漂白速率可以估算为：

$$k_{\text{bleach}} = \frac{1}{E(P_{\text{bleach}}(t))} = \frac{1}{\bar{t}_{\text{bleach}}} \quad (2.58)$$

2.6.4 单分子信号的其它特征

除前文所述的单分子光物理性质外，单分子信号仍有其它的特征参数，包括定位精度和信噪比。在本论文中，定位精度的计算采用 Thompson 公式 1.1，分析的数据来源于 2.4.2 节的超分辨定位数据 L 。

因为在相机上的光子收集过程满足泊松分布的随机特征，因而信噪比则定义为单分子信号的采样像素的最高信号强度，在减去背景噪音信号后与其平方根之比^{[144],[145]}：

$$\text{SNR} = \frac{f(t_i, p_{\text{max}}) - b}{\sqrt{f(t_i, p_{\text{max}})}}, t_i \in \text{frame}(S_{\text{on}}) \quad (2.59)$$

2.6.5 单分子光物理性质的统计学特征

2.6.1-2.6.3 节定义在本论文中单分子光物理性质的参数含义，然而上述所有的测量仅实现了孤立荧光轨迹的性质测量。因此，上述的测量结果会极大地受到不同单分子信号自然涨落的影响，而更具有现实意义的是对亚群（subset）单分子信号特征的统计分析。通过统计亚群的一系列单分子轨迹的测量结果，反映出荧光染料的单分子光物理性质。

以荧光轨迹为统计单元，估计每个轨迹的光物理性质，即总收集光子数、闪烁次数、光漂白时间、光漂白速率，通过统计亚群中所有轨迹的相关性质，给出荧光染料的光物理性质。由于该统计模式的最小采样单元为单个分子，将该统计方法称为分子采样（Molecule sampling）。

在分子采样方式下，对于基于单次状态的性质，即亮态时间、暗态时间、亮暗态转换速率、单次亮态光子数，和基于单帧的性质，即光子收集速率，需要对每个荧光轨迹求出该特征的平均值（或其它统计特征值），然后再对亚群中所有的荧光轨迹进行计算获得染料分子的光物理性质。

例如，对单个荧光轨迹的所有亮态帧的光子收集速率取平均值，即可获得该分子处于亮态时的平均光子收集速率：

$$\bar{f} = \frac{\sum_{e \in S_{em}} f(t_{em})}{n_{em}}, n_{em} = Count(S_{em}) \quad (2.60)$$

Count 函数计算给定集合中元素的总个数，在此即为在单分子荧光轨迹中亮态出现的次数。

将单分子成像中所有提取的荧光轨迹的光子收集速率去平均值，则可以给出荧光染料的期望光子收集速率：

$$\bar{\bar{f}} = \frac{\sum_{i \in C_m} \bar{f}(i)}{n_{C_m}}, n_{C_m} = Count(C_m) \quad (2.61)$$

在这种统计方式下，由于单分子实验中单分子总数的局限性，仅对单次测量进行统计，其结果存在较大的误差。为了更精确地给出荧光染料的光物理性质，在测试时对样品不同区域进行单分子荧光成像和分析，获得多组成像的统计结果，再进一步对这些统计结果进行统计分析，可以获得更准确的荧光染料的光物理性质特征。例如对多组成像结果的光子收集速率进行分析，可以获得对荧光染料更准确的单分子亮度评价 \tilde{f} ：

$$\tilde{f} = \frac{\sum_j \bar{\bar{f}}(j)}{n_j}, j \in \{Imaging\ times\} \quad (2.62)$$

另一方面，对于这些基于单次状态或者单帧计量的光物理性质，忽略不同荧光轨迹的区别，直接统计亚群分子中所有状态或者帧的测量值，直接给出荧光染料的光物理性质。这种统计方式忽略了不同分子之间的个体差异，直接将所有的测量结果作为统计对象，将该统计方法称之为最大化采样（Maximized sampling）。

例如，对所有荧光轨迹中的亮态帧的光子收集速率取平均值，也可以得到荧光染料的期望光子收集速率：

$$\bar{f}' = \frac{\sum_{c_m \in C} \sum_{em \in S_{c_m,em}} f(t_{c_m,em})}{\sum_{c_m \in C} n_{c_m,em}}, n_{c_m,em} = \text{Count}(S_{c_m,em}) \quad (2.63)$$

上述两种统计方法的不同之处在于采样的对象不同，前一种将每条荧光轨迹及其对应的单个分子作为光物理性质测量的最小的统计对象，而后者的方式的采样统计的最小对象是每帧或者每次状态转换的过程。相对来说，前一种方式考虑同一荧光染料分子的分子间差异性，而后者的方式从整体角度上将同一荧光染料的所有分子视为完全相同的对象，从而以更小的单元进行统计采样。图 2.4 所示为按照不同的采样标准对不同照射光强下某种荧光染料的单分子亮度以及亮态时间的统计结果。两种采样方式给出的结果并不完全一致，通过分子采样统计方式获得的数据相对于最大化采样数据偏高。因此，研究者在比较不同染料的单分子数据时，应当注意其统计方式，避免比较来源不同统计方式的结果。同时，研究者在报告其单分子统计结果时，应当准确的描述其统计方式，为后续研究提供参考。同时，图 2.4 可以观察到两种不同统计方式下的数据趋势近乎一致，说明两种方式都可以准确的反应单分子光物理性质的内在特征。

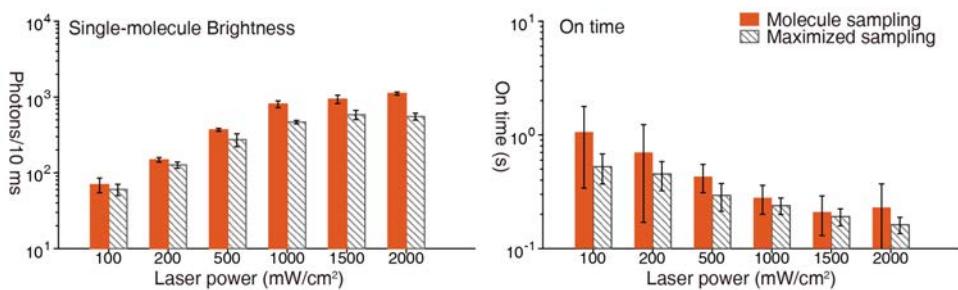


图 2.4 采样方式对单分子性质统计结果的影响

Figure 2.4 Impact of sampling approaches to single-molecule statistical results.

2.7 单分子分析软件的开发

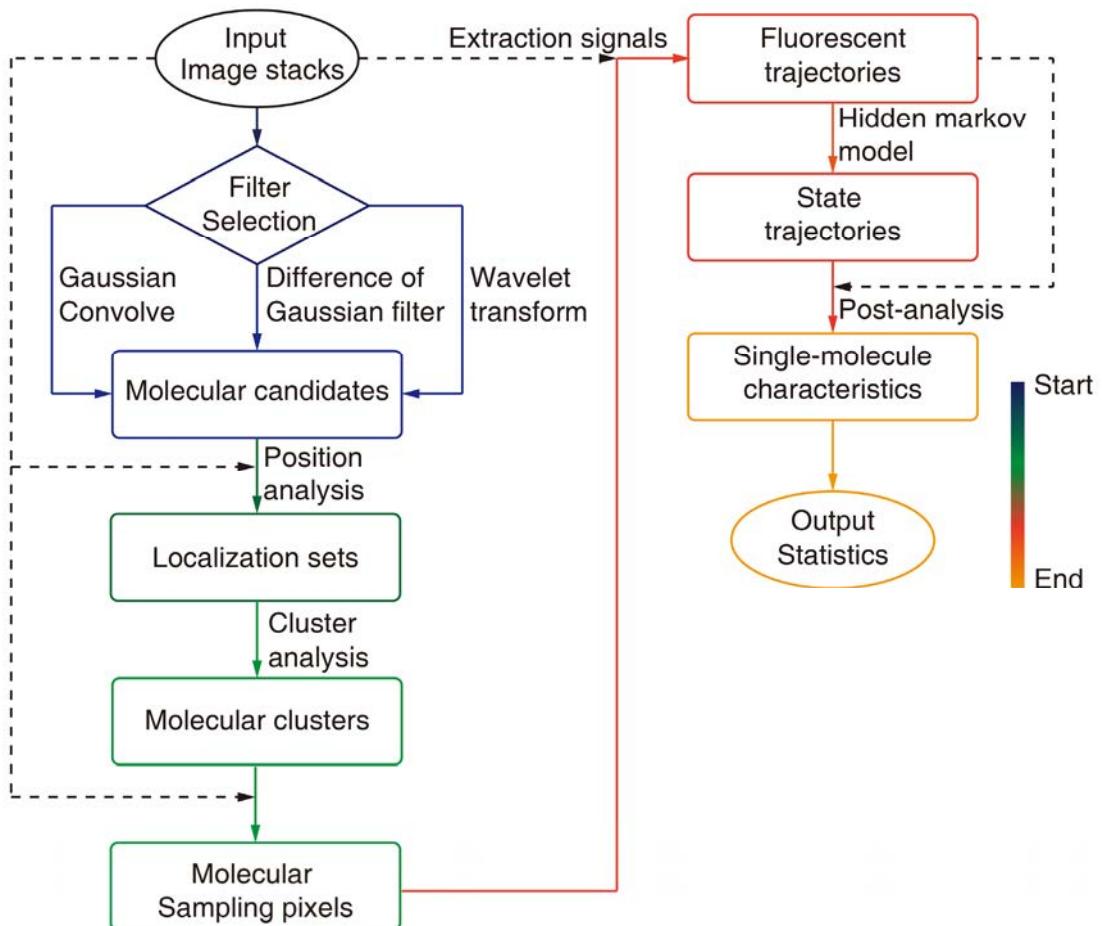


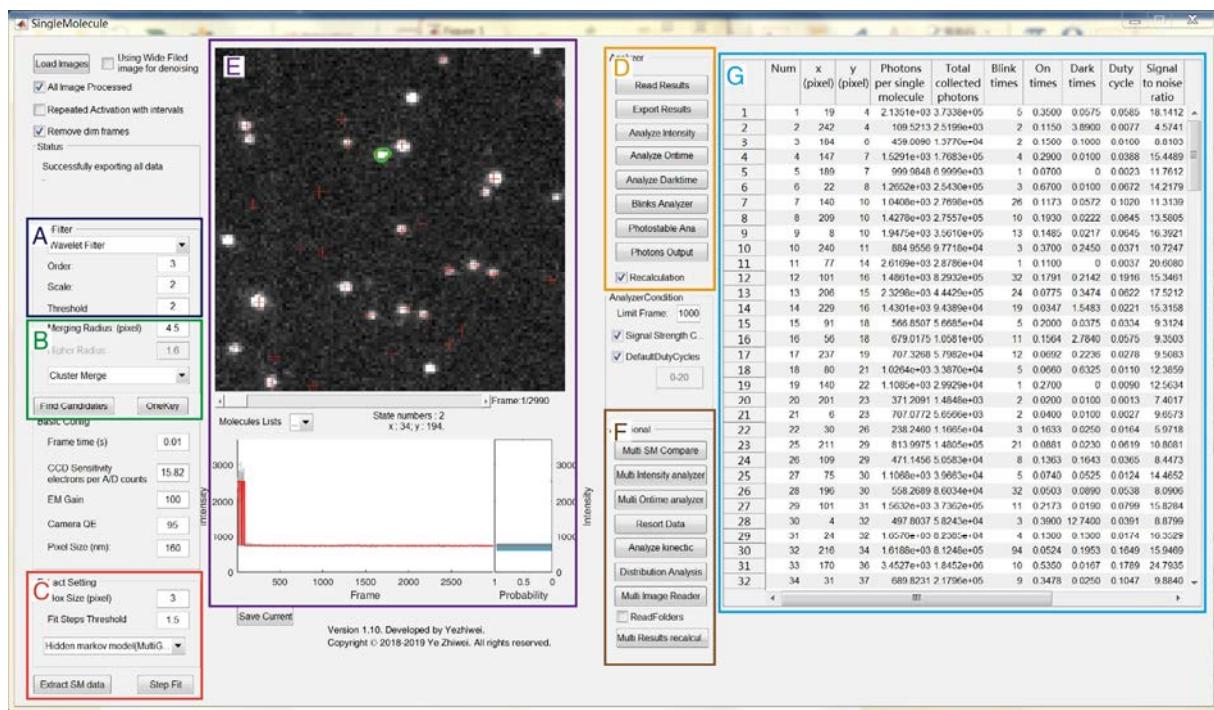
图 2.5 单分子分析软件流程图

Figure 2.5 Flow chart of the single-molecule analysis software.

基于建立的单分子分析算法以及统一定义的单分子光物理性质定义及统计方法，实现了具有图形化界面的自动单分子分析软件的开发。图 2.5 展示了为本研究设计的单分子分析软件的流程图，展示了软件从输入到输出完成的每一步计算和操作。图中椭圆框为输入与输出，菱形框为选择节点，圆角矩形框是每步分析获得的数据，实线箭头指示了软件内部运行的流程（从开始的冷深色到最后的暖亮色），虚线指示了该步操作同时需要提供的额外的数据。

单分子分析实验的原始数据是成像图栈，而时空中随机分布的各个分子的单分子数据散布其中。这些成像图堆栈是单分子分析软件的输入端，接着由用户决定使用恰当的预处理滤镜（方法包括 2.4 节中的高斯卷积、高斯滤镜之差以及小波变换），对图像进行去噪音处理寻找局部极值获得候选分子（Molecular candidates）。结合这些分子位置以及原始的图栈，利用超分辨定位分析的方法给出所有单分子信号的准确位置

(Localization sets)，然后再通过聚类分析的方法将这些单分子信号进行分子类归属，获得整个成像的所有分子类 (Molecular clusters)。再利用这些分子类以及原始图栈，按照 2.4.3 节论述的算法获得每个分子的实际采样像素坐标 (Molecular sampling pixels)。利用这些坐标在原始图栈上提取出每个分子的荧光轨迹 (Fluorescent trajectories)，利用隐匿马尔可夫模型拟合出轨迹中暗藏的状态轨迹 (State trajectories)。最后，结合分子的荧光轨迹和状态轨迹按照 2.6 节给出单分子的光物理性，输出为单分子光物理性质数据。



- A Prefilter module. Selection of method & Parameter configuration.
- B Localization, Cluster & Molecular sampling.
- C Extraction of fluorescent trajectories & States fitting module.
- D Basic Post-analysis module.
- E Frame window & axes for fluorescent trajectories.
- F Advanced analysis module. For further analysis of photohysical statisitcs of single molecules.
- G Table of molecule-based sampling statistics.

图 2.6 单分子分析软件界面

Figure 2.6 Interface of single-molecule analysis software.

图 2.6 显示了为本研究开发的单分子分析软件的界面。软件基于 Matlab(MathWorks) 平台开发，大体上可以分为 A-G 六个模块。其中 A、B 模块对应于流程图中的前处理卷积、寻找分子类以及确定分子采样像素的流程，在软件界面上将这两部分合并为一个模

块界面（PreFilter, Find Candidates）。C 模块包含提取荧光轨迹的操作按钮，以及相应的对荧光轨迹进行拟合的操作按钮。D 模块包括一系列的单分子光物理性质测量按钮。E 模块是实时的数据展示界面，包括每一帧单分子实验数据的展示窗口、展示荧光轨迹信号的坐标图。F 模块包含针对单分子光物理性质统计信息复杂的分析处理工具。G 模块展示了通过分子采样统计口径获得的分子光物理性质统计结果。

图 2.7 显示了单分子分析软件的输出结果，软件将所有的处理结果整理在一个独立的尾缀为“SingleMoleculeResults”的文件夹内。按照最大化采样的统计口径，对于每一个测量的单分子光物理性质，软件将其性质数值与对应的分子坐标同时输出为 txt 的单独文件，例如，“bleachtime.txt”存储了单分子的漂白时间 t_{bleach} 。而按照分子采样投机口径获得的单分子光物理性质数据则统一在单独的“moleculecharacteristics.csv”文件中给出。“ClusterGroupedResult.bmp”文件是单分子聚类分析结果的图像，“smda.mat”文件存储了后处理过程中所有的数据，包括每一条荧光轨迹数据以及其状态轨迹数据。软件的大部分输出结果可以直接被 Origin、Excel 等数学分析软件读取，并进行进一步的后处理分析。

File structure of output results:

SingleMoleculeResults	
bleachtime.txt	t_{bleach}
blinks.txt	n_{blinks}
ClusterGroupedResult.bmp	Molecular cluster image
darktime.txt	t_{off}
Dutycycles.txt	Duty cycle
DutycyclesTime.txt	T_{total}
EventsPhotonsperSwitchingCycles.txt	Photons per switching cycle
EventsUncertainties.txt	Localization uncertainties
moleculecharacteristics.csv	Molecular sampling statistics
ontime.txt	t_{on}
Parameter.txt	Analysis configurations
photonsoutput.txt	Total collected photons
photostability.txt	On-state durations of initial bright molecules.
smda.mat	Processing data.
SNR.txt	Signal-to-noise ratio
Step_Fit_Intensity.txt	Photons per single-molecule per frame/photon count

图 2.7 单分子分析软件输出结果

Figure 2.7 Output results of single-molecule analysis software.

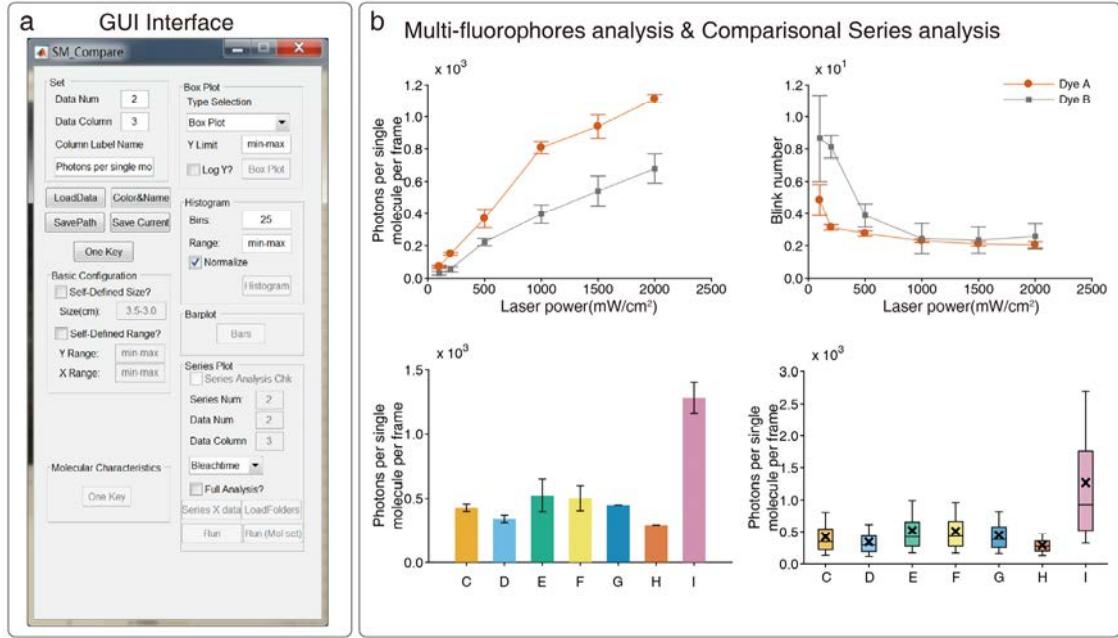


图 2.8 单分子统计分析软件界面 (a) 及其典型分析结果 (b)

Figure 2.8 Interface (a) of a statistical software for single-molecule and its typical analytical results (b).

为了进一步有效比较不同荧光染料之间的光物理性质,或者在不同实验条件(如照射强度)下多种荧光染料的光物理性质的统计学比较,本研究还开发了如图 2.8a 所示的单分子比较分析软件。该软件可以在设定好读取目录(文件地址)时,自动化分析不同染料在不同条件下的单分子光物理性质统计性息。图 2.8b 展示了通过该软件的自动化分析处理得到的多种染料的统计学比较结果以及多种荧光染料比较结果的不同统计学展示方式(柱状图、箱图)。

2.8 本章小结

为了准确评估荧光染料的单分子光物理性质,以及进一步评价其定位型超分辨成像潜力,本论文完整的建立了单分子光物理性质分析算法并给出在本论文中各项单分子光物理性质的定义。基于该分析算法,实现了具有图形化界面的单分子分析软件的开发。

完善的单分子分析算法的建立以及软件的开发,提升了单分子光物理性质分析的准确度,减少了人为因素导致的误差。该方法的建立为本论文中后续发展的罗丹明染料优化设计策略提供了定位型超分辨成像潜力评估和预测工具。同时,该方法的建立和开发为在同一标准下对所有荧光染料的单分子光物理性质评估提供了可能性,为探究分子结

构与单分子光物理性质规律以及发展和寻找适合于定位型超分辨成像的荧光染料提供了有价值的测量及评估平台。

3 超长亮态时长罗丹明螺内酰亚胺的设计、合成和超分辨成像性能

3.1 引言

定位型超分辨成像需要高性能的荧光染料。定位型超分辨显微镜中的光激活定位显微镜（PALM）的必备要素就是具备激活特征的荧光染料。为了进一步提升光激活定位显微镜的成像能力和生物使用范围，开发新型的激活型荧光染料并且为染料开发标记功能变得日趋重要。

罗丹明衍生物在近年来被广泛用于光激活定位显微成像。其中，罗丹明螺内酰亚胺就是第一种被应用于光激活定位显微镜的小分子激活型荧光染料^[30]。罗丹明螺内酰亚胺具有适用于活细胞超分辨成像的潜质：1) 罗丹明螺内酰亚胺在激活后发生从关环到开环的结构变化，并不会产生毒性产物；2) 因为罗丹明关环结构不具有可见光吸收和荧光发射，因此这种开关环的过程具有极佳的亮暗对比；3) 同时这种激活过程是可逆的，可以在成像中被多次定位，从而提升最终成像的定位密度和定位精度。

基于以上的优秀性质，研究者针对罗丹明螺内酰亚胺进行了一系列的优化^{[68],[69],[138],[146]}。然而，定位型超分辨成像，包括光激活定位显微成像，始终存在时间和空间分辨率的平衡。早期的定位型超分辨成像需要分钟，甚至小时的时间来累积充分的单分子信号，实现高分辨率的定位成像。这种时间分辨率不适用于动态的较快的活细胞成像，因而研究者尝试改善显微镜的硬件（如采用速率更快的 cMOS 相机^[147]），发展高密度单分子信号的分析算法（贝叶斯分析等^[147]），以提升成像的时间分辨率来实现对活细胞的快速超高分辨率的成像。为了改善定位型超分辨成像的时间分辨率，化学领域的研究者也通过改善荧光染料的发光效率来扩大成像中收集的光子信号统计数量^{[41],[46]}。但是荧光染料的单分子亮度不仅仅取决于其荧光量子效率，同时也与其发光稳定性密切相关。每个单分子信号是多次（百次-万次）的光子分布的统计结果，收集这些光子信息的速率则极大的受到荧光染料的亮态发光持续性的影响，而荧光染料的亮态发光持续性则由其亮态时长反应。因此提升荧光染料亮度的另一个非常重要，但是往往被忽视的策略是提升其亮态时长。亮态时长的提升可以改善单分子信号的信噪比，在成像周期内为每个分子信号积累更充分的光子统计数据。从而，在相对缩短的时间内，完成等质量的超分辨成像。

对于罗丹明螺内酰亚胺的亮态时间延长的设计策略未出现在之前的相关研究中。根据上述的结果，本章尝试发展一种罗丹明螺内酰亚胺的分子设计策略，用以改善该荧光染料的亮态的稳定性，并尝试将该策略的荧光染料用于选择性标记的活细胞光激活定位超分辨成像。

3.2 超长罗丹明螺内酰亚胺亮态时长的分子设计策略

图 3.1a 所示，罗丹明螺内酰亚胺的隐色体闭环结构在光激活后会形成开环的两性离子亮态，该结构具有可见光区的吸收和荧光发射。但是这种亮态持续时间较短，通常很快通过热弛豫方式回到关环的状态。因此，提升罗丹明螺内酰亚胺亮态稳定性的关键就需要改善瞬态开环结构的稳定性。事实上，罗丹明螺内酰亚胺类染料已经在化学传感领域被广泛研究，在该领域内一个广泛的共识是酸性环境或者是过渡金属离子可以稳定开环结构（图 3.1b）。基于上述机制，研究者已经开发了庞大数量的罗丹明螺内酰亚胺荧光探针^{[148]-[155]}。同理，如果能够将酸性环境或者过度金属离子引入罗丹明螺内酰亚胺的结构，就可以延长激活后两性离子亮态的持续时间。但是在活细胞成像中，不可能安全、准确和选择地在罗丹明螺内酰亚胺所处位置降低 pH 或者引入上述重金属离子。

如果能直接将羧基直接连接到罗丹明螺内酰亚胺的螺环结构处，这样激活后亮态不稳定的氮负离子被邻近的分子内质子中和（图 3.1c），形成的氧负离子具有比氮负离子更弱的亲核能力，从而提升两性离子结构的稳定性并延长亮态寿命。因此，这种直接在螺环位置引入甘氨酸从而获得的甘氨酸罗丹明（Rh-Gly），可能拥有更长的亮态，更好的潜力来实现活细胞光激活定位成像。

3.3 超长罗丹明螺内酰亚胺亮态时长的分子合成方法

所有化学中间体及溶剂均直接采购自化学品供应商，如不作说明则未经过预处理直接使用。柱层析色谱的固定相为 200-300 目硅胶。反相高效液相色谱（HPLC）分析使用 Venus C18 5 μm 色谱柱（ Φ 4.6 mm, 150 mm），流动相通过 Elite P230 高压恒流泵输送，装配的进样环的型号是 Rheodyne models 7725i。产物通过 Elite UV230-II 检测器检测，设定的检测波长为 254 nm。在不额外说明的情况下，通常的分析流速为 0.8 mL/min，使用的流动相为甲醇和水（包含 0.6% 乙酸）。制备级高效液相色谱（prep-HPLC）分析使用 Sinochrom ODS-BP 10 μm 色谱柱（ Φ 30 mm, 250 mm），流动相通过 Elite P270 高压恒流泵输送，装配的进样环的型号是 Rheodyne models 3325i。产物也通过 Elite UV230-II 检测器检测，设定的检测波长为 254 nm。制备级色谱分析的流速是 40 mL/min，流动相为水和甲醇（0.6% 乙酸）。

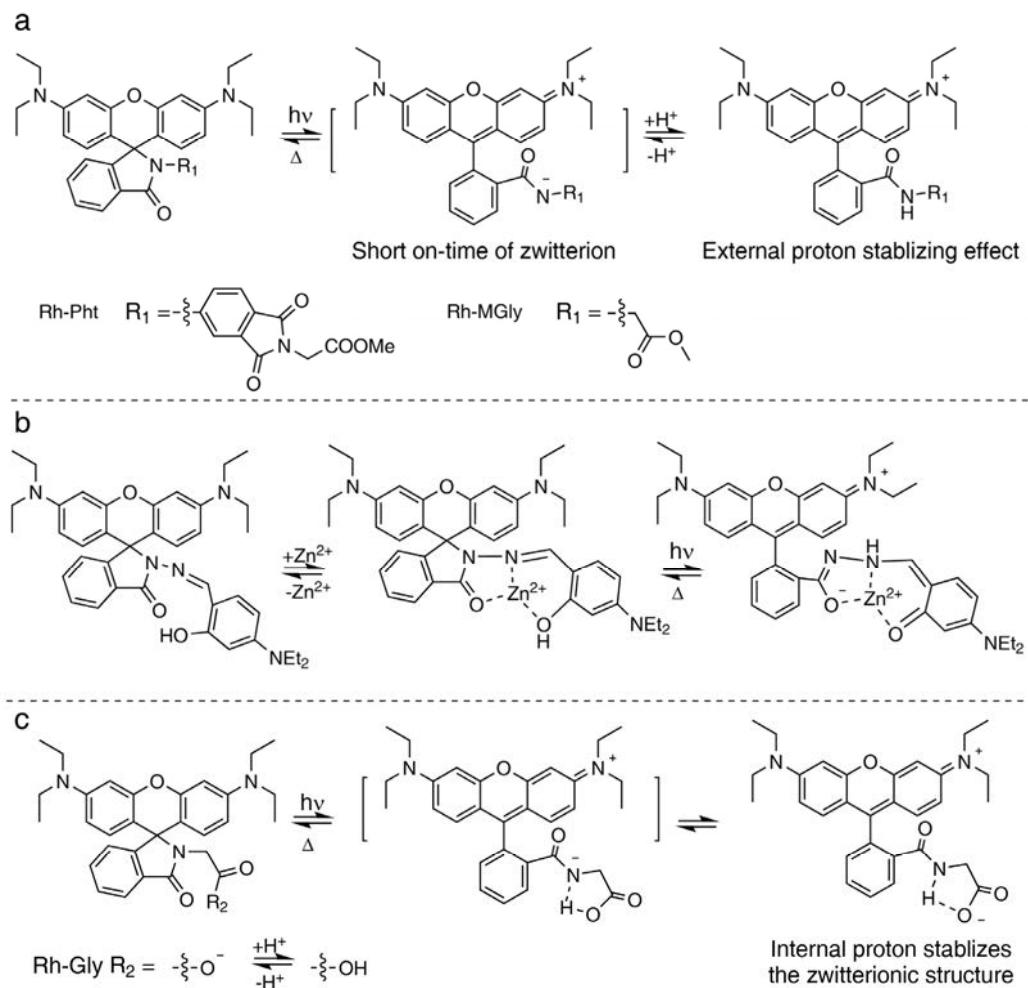


图 3.1 稳定激活后罗丹明螺内酰亚胺双离子结构的机理。 (a) 常见罗丹明螺内酰亚胺的光致变色机制。 (b) 一个通过锌离子稳定的罗丹明螺内酰亚胺的光致变色机制。 (c) 本论文提出的 Rh-Gly 光致变色过程可能机制, Rh-Gly 在光激活条件下转换到荧光发色状态 (两性离子态), 同时可以通过热弛豫振动回到非激活的状态 (螺环态)。

Figure 3.1 Mechanism of stabilizing the photoactivated zwitterionic form of rhodaminespirolactam. (a) Photochromic mechanism of common rhodamine spirolactam, *e.g.*, Rh-Pht and Rh-MGly. (b) Photochromic mechanism of a rhodamine spirolactam stabilized by zinc ion.^[154] (c) Proposed hypothesis on photochromic reaction of Rh-Gly with light-induced activation ($h\nu$) of fluorescence (zwitterion) and thermal relaxation (Δ) to the deactivated state (spirolactam).

¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱图测量设备是 Bruker Avance II 400, Bruker Avance III 500 和 Varian Mercury 400 核磁共振波谱仪。耦合常数 (J) 的单位是 Hz。质谱测量设备是 HP 1100 LC-MSD, Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL, Waters Synapt G2-Si HDMS and the UPLC/Q-TOF 质谱仪。

所有反应通过薄层色谱层析 (TLC) 监测。HATU 是 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯的缩写; DMF 是 N,N-二甲基甲酰胺的缩写。

3.3.1 超长罗丹明螺内酰亚胺亮态时长的分子合成路线

图 3.2 展示了在本章中研究的化合物的合成路线。

路线图首先展示了分子内酸性策略的模型化合物甘氨酸罗丹明 (Rh-Gly, (3-3)), 天冬氨酸罗丹明 (Rh-Asp, (3-5)) 和丝氨酸罗丹明 (Rh-Ser, (3-7)) 的合成方法。它们的起始原料是商品化的罗丹明 B, 通过三氯氧磷与羧酸的反应, 获得了高反应活性的罗丹明酰氯衍生物 3-1, 然后与甲酯保护的天然氨基酸 (甘氨酸、天冬氨酸、丝氨酸) 的氨基发生取代反应, 获得对比化合物甘氨酸罗丹明甲酯 (Rh-MGly, 3-2), 天冬氨酸罗丹明二甲酯 (Rh-dMAsp, 3-4) 和丝氨酸罗丹明甲酯 (Rh-MSer, 3-6)。最后通过水解甲酯保护基, 获得了最终的模型化合物 Rh-Gly (3-3), Rh-Asp (3-5) 和 Rh-Ser (3-7)。

路线图展示了对甘氨酸罗丹明 Rh-Gly 进行生物标记功能化修饰的方法。染料 3-11 即为衍生 Halo 蛋白标签配体的甘氨酸罗丹明 Rh-Gly-Halo, 可以通过它选择性的对细胞内表达的 Halo 融合蛋白的进行标记。Rh-Gly-Halo 的合成需要首先按照文献的方法, 合成 4,5-溴取代的罗丹明 B, 3-8。然后通过活性酯活化 3-8 的羧基, 与甘氨酸乙酯缩合获得中间体 3-9。通过 Sonogashira 偶联反应, 将 Halo 蛋白配体衍生到罗丹明上, 获得中间体 3-10。最后通过水解乙酯保护基, 获得 Halo 融合蛋白标签染料, Rh-Gly-Halo(3-11)。

为了将 Rh-Gly 标记到具有活性氨基的生物大分子上, 可以对母体染料 Rh-Gly 衍生具有标记活性的异硫氰酸结构: 化合物 3-16 为具有生物标记功能的异硫氰酸甘氨酸罗丹明 Rh-Gly-NCS。首先合成 4,5-硝基取代的罗丹明 B, 3-12。然后, 通过活性酯活化的方法, 合成连接有甘氨酸乙酯的中间体 3-13。然后通过水解乙酯保护基获得中间体 3-14, 再还原硝基获得氨基衍生中间体 3-15。最后将中间体 3-15 与硫光气反应, 将氨基转换为异硫氰酸酯, 获得最终可生物标记的染料 Rh-Gly-NCS(3-16)。

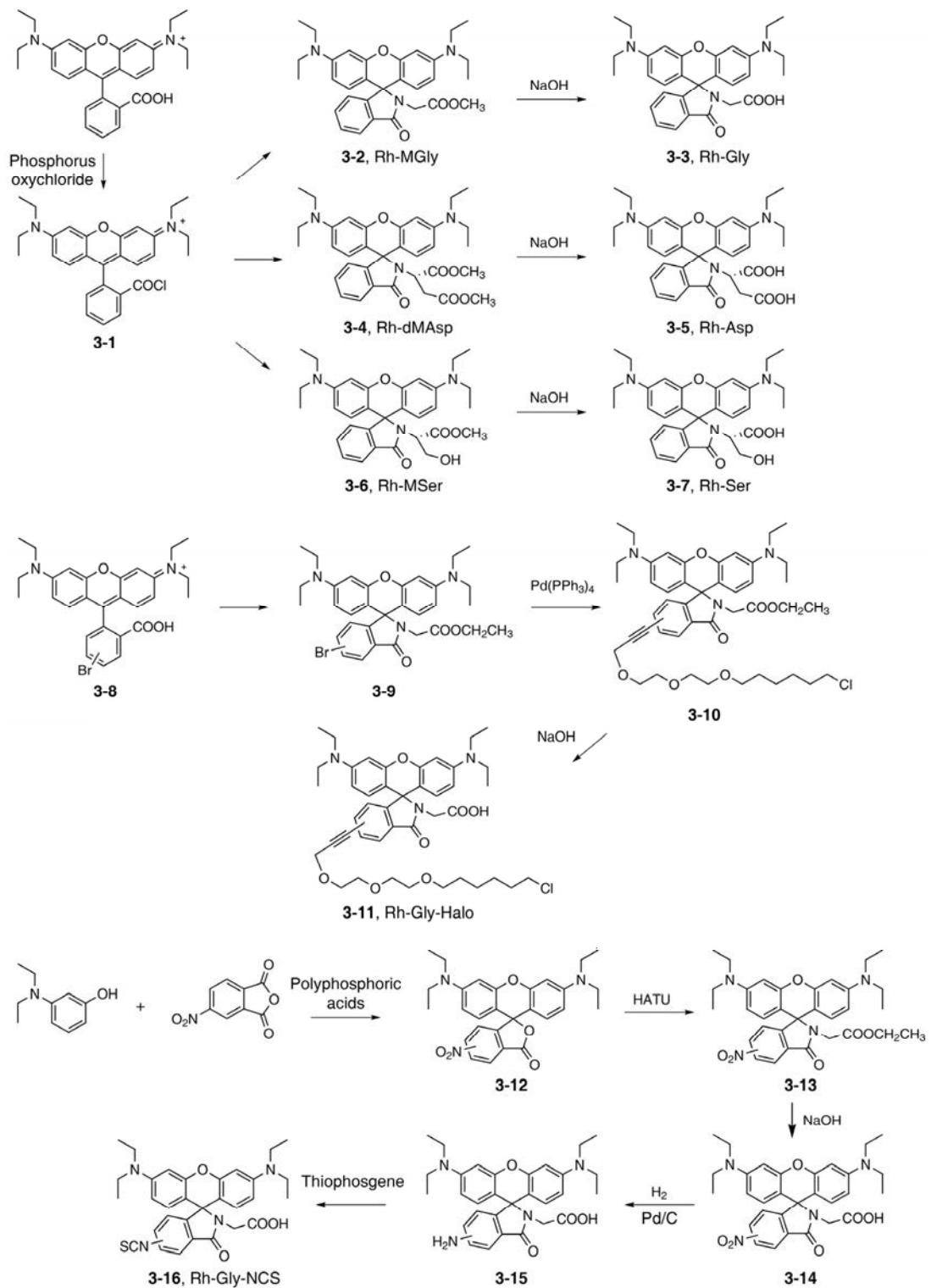
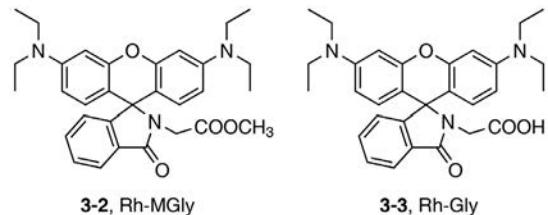


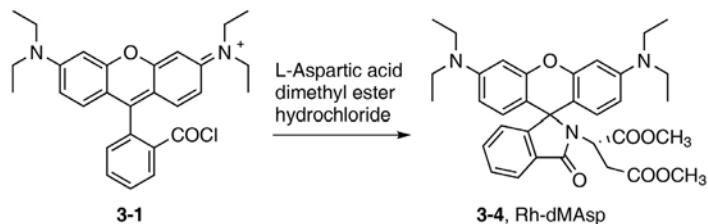
图 3.2 本章中研究化合物的合成路线

Figure 3.2 Synthetic route of studied compounds in this chapter.

3.3.2 Rh-Gly、Rh-Asp、Rh-Ser 及其甲酯对比物的合成

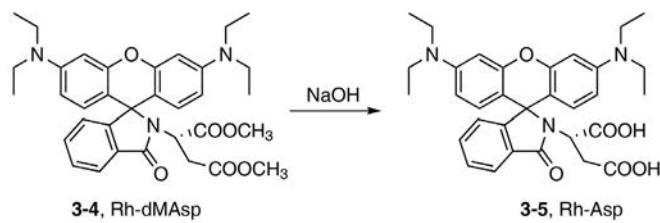


甘氨酸甲酯罗丹明 B (Rh-MGly, 3-2) 以及甘氨酸罗丹明 (Rh-Gly, 3-3) 由合作
者辽宁大学于海波教授提供。

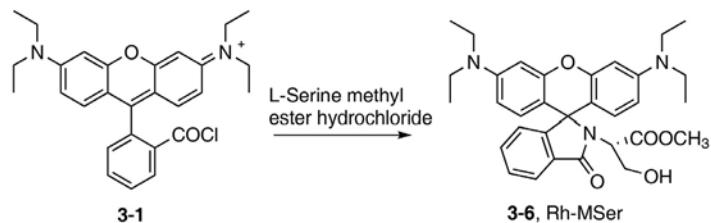


天冬氨酸二甲酯罗丹明 B (Rh-dMAsp, 3-4) 以及天冬氨酸罗丹明 (Rh-Asp, 3-5) 的合成及表征由合作者边辉师弟完成, 其具体合成方法见下文。

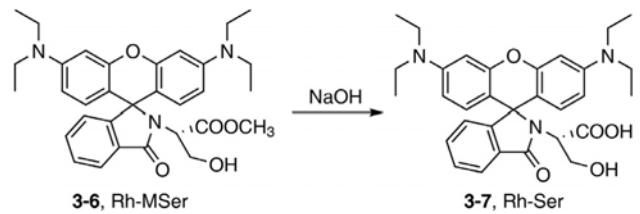
天冬氨酸二甲酯罗丹明 B (Rh-dMAsp, 3-4) : 罗丹明酰氯 (3-1) 通过与文献^[156]相同的方法合成。将 3-1 (从 1 g, 2.08 mmol 罗丹明 B 获得) 配成 50 mL 乙腈溶液。同时, 将天冬氨酸二甲酯盐酸盐 (618 mg, 3.13 mmol) 溶解在 100 mL 乙腈与 10 mL 三乙胺混合溶剂中。待上述氨基酸溶液变澄清后, 将紫色酰氯溶液逐滴加入其中。整个反应混合溶液在室温下搅拌 10 h。在反应结束后, 减压除去乙腈溶剂。最后用硅胶柱层析色谱纯化粗产品, 流动相采用乙酸乙酯与石油醚的混合体系 (v/v, 1:10)。最终产物为白色固体 (1.02g, 产率 81%)。HRMS (ESI, TOF) m/z calcd for $C_{34}H_{40}N_3O_6 [M+H]^+$: 586.2917; found: 586.2917 ($z = 1$)。 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.89 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.51 – 7.40 (m, 2H), 7.08 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.61 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 6.38 (d, $J = 8.8$ Hz, 3H), 6.27 (dd, $J = 26.5, 8.9$ Hz, 2H), 4.34 (dd, $J = 9.7, 3.8$ Hz, 1H), 3.54 (s, 3H), 3.51 (s, 3H), 3.34 (dq, $J = 14.0, 7.0$ Hz, 8H), 3.23 (dd, $J = 16.5, 9.8$ Hz, 1H), 2.06 (dd, $J = 16.6, 3.6$ Hz, 1H), 1.16 (dt, $J = 14.3, 7.0$ Hz, 12H)。 ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 171.27, 170.33, 167.32, 153.77, 153.74, 153.45, 149.00, 148.83, 132.77, 130.66, 130.63, 129.02, 128.09, 124.02, 122.90, 108.07, 107.49, 104.78, 103.95, 98.07, 97.62, 65.56, 52.26, 51.62, 50.52, 44.37, 44.34, 34.77, 12.63, 12.58。



天冬氨酸罗丹明 (Rh-Asp, (3-5))：将 3-4 (1g) 溶解在 20 mL 甲醇和 10 mL 氢氧化钠 (70% 水溶液) 的混合溶剂中。然后将反应混合物加热至沸腾直至 TLC 监测显示反应已进行完毕。待反应混合物降至室温，减压除去甲醇并将剩余混合物溶于水中。向混合溶液中加入浓盐酸，将析出的白色固体过滤收集并晾干。获得的产物是白色或粉红色固体 (0.80 g, 产率 84%)。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{32}H_{35}N_3O_6[M-H]^-$: 556.2453; found: 556.2455 ($z = 1$)。HPLC (甲醇/水 = 90/10, 含有 0.6% 乙酸), $t_R = 5.13$ min; 峰面积 > 93% (254 nm)。

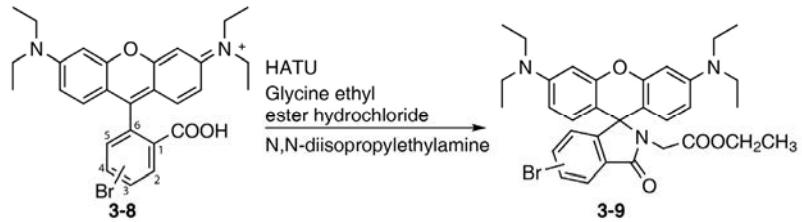


丝氨酸罗丹明甲酯(Rh-MSer, **3-6**): 按照相同文献从罗丹明 B(250 mg, 0.52 mmol) 合成了罗丹明酰氯 **3-1**。将 **3-1** 配成乙腈溶液, 同时将丝氨酸甲酯盐酸盐 (81 mg, 0.52 mmol) 溶解在 2 mL 三乙胺和 10 mL 乙腈的混合溶液中。将氨基酸溶液滴加到酰氯的乙腈溶液中, 并搅拌过夜。粗产品通过硅胶柱层析色谱分离, 流动相为二氯甲烷和甲醇(v/v, 100:1)。产物为无色透明粉末 (113 mg, 产率 40%)。HRMS (ESI, TOF) *m/z* calcd for C₃₂H₃₈N₃O₅ [M+H]⁺: 544.2806; found: 544.2816 (*z* = 1). ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 7.79 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 7.57 – 7.48 (m, 2H), 7.00 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.34 (d, *J* = 4.8 Hz, 6H), 4.89 (s, 1H), 3.82 (dd, *J* = 6.9, 4.8 Hz, 1H), 3.78 – 3.67 (m, 1H), 3.32 (q, *J* = 6.7 Hz, 9H), 3.27 (s, 3H), 1.08 (t, *J* = 6.8 Hz, 12H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 169.00, 166.79, 153.25, 152.75, 152.73, 148.45, 148.41, 133.06, 130.00, 129.77, 128.89, 128.36, 123.75, 122.39, 108.02, 107.50, 104.11, 103.56, 97.01, 96.94, 65.13, 60.11, 56.86, 51.36, 43.65, 43.62, 12.39, 12.35.



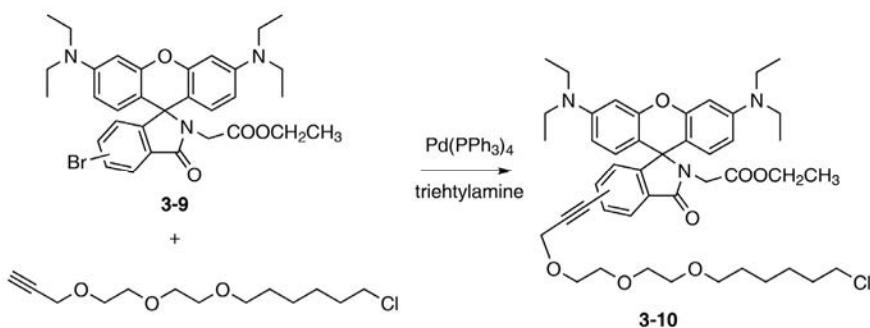
丝氨酸罗丹明 B (Rh-Ser, (3-7))：将 **3-6** (200 mg, 0.37 mmol) 与氢氧化钠 (148 mg, 3.7 mmol) 溶解于甲醇和水的混合溶剂 (10 mL/10 mL) 中，并置于回流条件下反应 7 h。当通过 TLC 监测到反应终点时，停止反应并通过减压除去甲醇。获得的粗产品进一步通过硅胶柱层析色谱分离，流动相为二氯甲烷和甲醇 (v/v, 25:1)。获得产物再进一步通过制备反相高效液相色谱纯化，流动相为 83% (v/v) 甲醇和 17% (v/v) 水 (包含 0.6% 乙酸)。最终收集产物部分，减压除去溶剂，获得纯化产物为粉色粉末 (0.22 mg, 产率 0.1%)。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{31}H_{36}N_3O_5 [M+H]^+$: 530.2649; found: 530.2646 ($z = 1$)。HPLC (甲醇/水 = 83/17, 含有 0.6% 乙酸), $t_R = 15.0$ min; 峰面积 = 90% (254 nm)。

3.3.3 Rh-Gly-Halo 的合成步骤

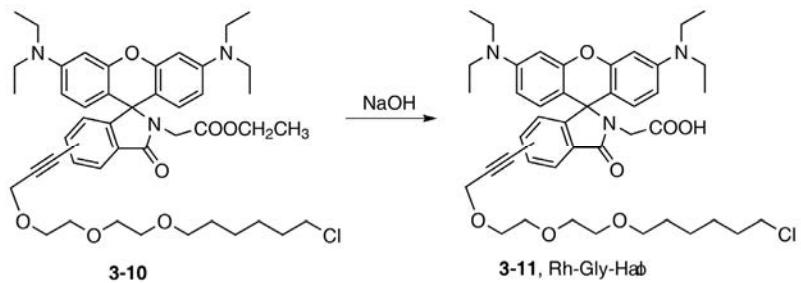


4'5'-溴甘氨酸乙酯罗丹明 B(3-9): 按照文献^[157]的方法合成 4'5'-溴代罗丹明 B(3-8)。将 3-8 (异构体混合物, 230 mg, 0.44 mmol), 甘氨酸乙酯盐酸盐 (61 mg, 0.44 mmol) 与 HATU (168 mg, 0.44 mmol) 溶解在干燥的 5 mL 二氯甲烷与 0.1 mL 二异丙基乙胺混合溶液中。将反应混合物置于室温下搅拌反应 12 h。反应完成后, 反应混合物经过盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并蒸干溶剂。对粗产品进一步通过硅胶柱层析色谱纯化, 流动相是乙酸乙酯和石油醚 (v/v, 1:5)。最终获得的产物 (180 mg, 产率 67%) 是 4'5'-溴取代异构体混合物, 其两种异构体的比例为 1:1。HRMS (ESI, TOF) m/z calcd for $C_{32}H_{36}N_3O_4NaBr [M+Na]^+$: 628.1787; found: 628.1794 ($z = 1$)。($4'$ -异构体在 1H NMR 中特征峰尾注*) 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.06* (s, 0.5H), 7.79 (d, $J = 8.1$ Hz, 0.5H), 7.60 – 7.49 (m, 1H), 7.22 (s, 0.5H), 6.97* (d, $J = 8.1$ Hz, 0.5H), 6.53 (t, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.35 (s, 2H), 6.28 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H), 3.89 (p, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.33 (p, $J = 11.2, 6.7$ Hz, 8H), 1.16

(q, $J = 6.7$ Hz, 12H), 1.08 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 167.07, 167.04, 165.96, 165.32, 154.30, 152.36, 152.31, 151.23, 147.92, 147.89, 134.52, 131.54, 130.55, 128.36, 128.28, 128.25, 126.22, 126.14, 125.16, 124.56, 123.58, 121.07, 106.95, 106.93, 102.80, 102.73, 96.60, 64.07, 63.88, 59.91, 43.34, 40.71, 40.67, 13.10, 12.94, 11.58, 11.56.

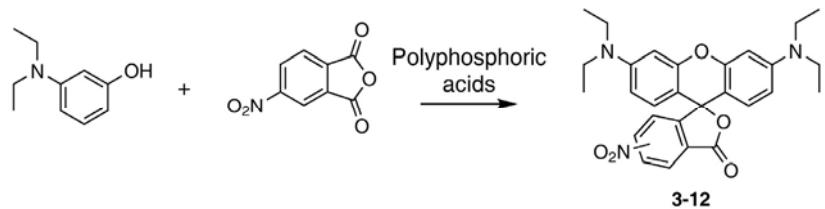


Halo 配体衍生的甘氨酸乙酯罗丹明 B (3-10) : 将 **3-9** (异构体混合物, 150 mg, 0.28 mmol) 与四 (三苯基膦) 钯 (60 mg, 52 μmol) 加入 Schlenk 瓶中, 然后将瓶内抽真空置换氩气三次。在完成惰性氛围置换后, 5 mL DMF 与三乙胺的混合溶液(v/v, 3:1), 再置换氩气三次。最后将 Halo 配体 (120 μL) 加入反应混合溶液中。反应在惰性环境搅拌反应 4 h, 控制反应温度为 80°C。待反应完成后, 将反应体系降至室温, 减压除去溶剂。粗产品使用硅胶柱层析纯化, 流动相为乙酸乙酯和石油醚 (v/v, 1:1)。最终获得的产物 (100 mg, 产率 67%) 为 4'/5' 的异构体, 其比例为 1:1。HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{59}\text{ClN}_3\text{O}_7[\text{M}+\text{H}]^+$: 788.4036; found: 788.4039 ($z = 1$)。4'-异构体在 ^1H NMR 中特征峰尾注*) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.98* (s, 0.5H), 7.86 (d, $J = 7.8$ Hz, 0.5H), 7.53 – 7.45 (m, 1H), 7.15 (s, 0.5H), 7.03* (d, $J = 7.9$ Hz, 0.5H), 6.51 (dd, $J = 8.9, 6.2$ Hz, 2H), 6.34 (t, $J = 2.3$ Hz, 2H), 6.26 (dt, $J = 8.3, 2.5$ Hz, 2H), 4.44* (s, 1H), 4.33 (s, 1H), 3.88 (qd, $J = 7.2, 2.9$ Hz, 2H), 3.81 (d, $J = 2.8$ Hz, 2H), 3.77 (dd, $J = 6.1, 3.5$ Hz, 1H), 3.72 (dd, $J = 6.0, 3.5$ Hz, 1H), 3.70 – 3.63 (m, 3H), 3.65 – 3.56 (m, 2H), 3.55 (dd, $J = 5.8, 3.6$ Hz, 1H), 3.50 (td, $J = 6.7, 4.7$ Hz, 2H), 3.44 (dt, $J = 13.7, 6.7$ Hz, 2H), 3.32 (q, $J = 6.5$ Hz, 8H), 1.75 (h, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.57 (dp, $J = 18.1, 6.7$ Hz, 2H), 1.50 – 1.31 (m, 4H), 1.15 (td, $J = 7.0, 2.6$ Hz, 12H), 1.08 (td, $J = 7.1, 1.5$ Hz, 3H)。 ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 167.16, 167.15, 166.15, 165.95, 152.63, 152.36, 152.35, 152.32, 147.88, 147.86, 134.90, 130.56, 129.79, 129.21, 128.33, 126.28, 125.83, 125.39, 122.90, 122.02, 121.71, 106.94, 106.92, 103.09, 96.62, 86.46, 84.95, 84.78, 84.58, 70.22, 70.18, 69.67, 69.64, 69.49, 69.43, 69.10, 69.06, 68.21, 68.17, 64.11, 63.98, 59.88, 58.11, 57.96, 44.03, 44.00, 43.34, 40.72, 40.68, 31.54, 31.52, 28.46, 28.43, 25.69, 25.66, 24.42, 24.40, 12.95, 11.59, 11.58.



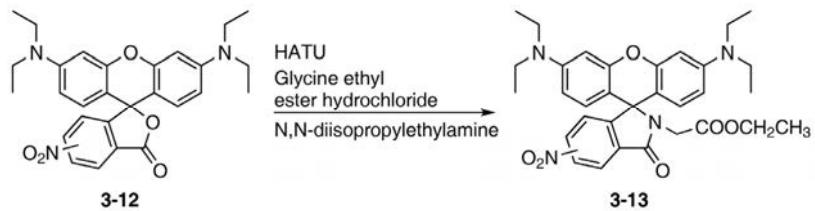
Halo 配体衍生甘氨酸罗丹明 (Rh-Gly-Halo, 3-11)：将 3-10 (异构体混合物, 50 mg, 63 μ mol) 溶解在 4 mL 甲醇中, 并向其中加入 5 mol/L 氢氧化钠水溶液。反应温度控制在 30℃, 保持搅拌 2 h。在反应结束后, 通过减压除去多余的溶剂, 获得的粗产品用硅胶柱层析色谱纯化, 其流动相为二氯甲烷和甲醇 (v/v, 20:1)。最终获得的产品 (40 mg, 产率 83%) 为 4'/5' 异构体混合物, 其比例大约为 1:1, 并直接用于后续的标记成像实验。HRMS (ESI) m/z calcd for C₄₃H₅₅ClN₃O₇ [M+H]⁺: 760.3723; found: 760.3726 ($z = 1$)。 (4'-异构体在 ¹H NMR 中特征峰尾注*) ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 7.81 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.57 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.04 (t, $J = 3.9$ Hz, 1H), 6.55 – 6.30 (m, 6H), 4.43* (s, 1H), 4.33 (s, 1H), 3.66 (dd, $J = 11.1, 6.5$ Hz, 2H), 3.62 – 3.53 (m, 4H), 3.56 – 3.47 (m, 2H), 3.47 (q, $J = 5.3$ Hz, 2H), 3.43 – 3.38 (m, 2H), 3.40 – 3.35 (m, 2H), 3.35 – 3.29 (m, 8H), 1.67 (dp, $J = 13.8, 6.9$ Hz, 2H), 1.52 – 1.40 (m, 2H), 1.40 – 1.23 (m, 4H), 1.08 (td, $J = 7.0, 2.4$ Hz, 12H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 168.59, 165.87, 165.75, 153.62, 152.63, 152.60, 135.96, 131.55, 131.53, 130.23, 129.68, 128.94, 126.43, 126.18, 125.08, 124.17, 122.97, 122.11, 88.89, 87.14, 84.66, 70.13, 70.06, 69.76, 69.70, 69.58, 69.52, 69.44, 69.40, 68.67, 68.65, 64.31, 64.13, 58.04, 57.90, 45.29, 45.26, 41.15, 31.97, 31.95, 29.01, 28.97, 26.06, 26.03, 24.88, 24.85, 12.24.

3.3.4 Rh-Gly-NCS 的合成步骤

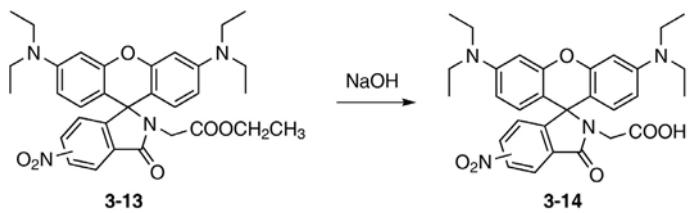


4'5'-硝基罗丹明 B (3-12)：将间 (N,N-二甲氨基) 苯酚 (2 g, 12.10 mmol), 4-硝基萘酐 (1.17 g, 6.05 mmol) 以及多聚磷酸 (几滴) 共同溶解在 15 mL DMF 中。反应在 120°C 进行 8 h。在将反应液的温度降至室温后，将其倒入冰水中，产生紫色固体沉

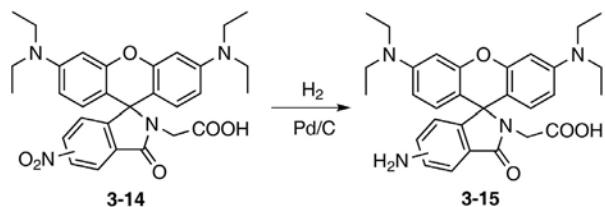
淀。这些固体通过硅胶柱层析色谱纯化，流动相为二氯甲烷和甲醇 (v/v, 20:1)。最终获得的产品 (1.3 g, 产率 49%) 为 4'/5' 异构体混合物，其比例大约在 10:9。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{28}H_{30}N_3O_5 [M+H]^+$: 488.2180; found: 488.2197 ($z = 1$)。($4'$ -异构体在 1H NMR 中特征峰尾注*) 1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.65* (s, 0.53H), 8.53* (d, $J = 8.4$ Hz, 0.53H), 8.47 (d, $J = 8.3$ Hz, 0.47H), 8.24 (d, $J = 8.4$ Hz, 0.47H), 8.04 (s, 0.47H), 7.55* (d, $J = 8.4$ Hz, 0.53H), 6.66 – 6.42 (m, 6H), 3.38 (q, $J = 6.4$ Hz, 8H), 1.10 (t, $J = 6.8$ Hz, 12H)。 ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 166.82, 166.60, 153.07, 152.89, 151.78, 149.85, 148.83, 133.05, 129.51, 129.43, 129.03, 127.03, 126.33, 125.20, 120.49, 119.72, 108.81, 104.76, 104.55, 96.79, 43.91, 12.31, 12.29。



4'/5'-硝基甘氨酸甲酯罗丹明 B(3-13): 将 **3-12**(异构体混合物, 200 mg, 0.41 mmol), 甘氨酸乙酯盐酸盐 (42 mg, 0.41 mmol) 与 HATU (156 mg, 0.41 mmol) 溶解在干燥的二氯甲烷 (4 mL) 和二异丙基乙基胺 (100 μ L) 混合溶剂中。反应混合物在室温下搅拌反应 12 h。反应完成后, 使用盐水洗涤反应混合物, 无水硫酸钠干燥。获得的粗产品使用硅胶柱层析色谱纯化, 流动相为乙酸乙酯和石油醚 (v/v, 1:5)。最终获得的产品 (150 mg, 产率 64%) 是 4'/5'异构体混合物, 其比例大约为 1:1。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{32}H_{37}N_4O_6 [M+H]^+$: 573.2708; found: 573.2708 ($z = 1$)。($4'$ -异构体在 1H NMR 中特征峰尾注*) 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.77* (s, 0.5H), 8.30 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J = 8.2$ Hz, 0.5H), 7.91 (s, 0.5H), 7.24* (d, $J = 8.5$ Hz, 0.5H), 6.51 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.42 – 6.33 (m, 2H), 6.28 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.92 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.86 (s, 2H), 3.34 (q, $J = 6.5, 5.8$ Hz, 8H), 1.16 (t, $J = 6.0$ Hz, 12H), 1.10 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)。 ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 166.72, 166.65, 164.66, 164.59, 157.97, 153.84, 152.39, 152.29, 150.02, 148.15, 148.13, 147.22, 134.49, 130.78, 128.04, 127.95, 126.61, 124.07, 123.28, 122.69, 118.55, 118.01, 107.07, 107.03, 101.67, 101.52, 96.82, 96.73, 64.61, 64.48, 60.07, 43.37, 40.90, 40.84, 12.95, 11.56, 11.54。



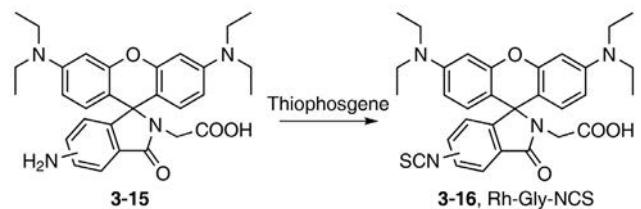
4'/5'-硝基甘氨酸罗丹明 (3-14)：合成方法与中间体 (3-5) 的合成方法一致。从 100 mg, **3-13** (异构体混合物, 0.17 mmol) 获得 79 mg, 14 (产率 83%)。产品也是 4'/5' 异构体混合物, 其比例大约为 1:1。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{30}H_{33}N_4O_6[M+H]^+$: 545.2395; found: 545.2391 ($z = 1$)。($4'$ -异构体在 1H NMR 中特征峰尾注*) 1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.46* (d, $J = 1.9$ Hz, 0.5H), 8.32 (dt, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 1H), 8.06 (d, $J = 8.3$ Hz, 0.5H), 7.70 – 7.62 (m, 0.5H), 7.27* (d, $J = 8.4$ Hz, 0.5H), 6.52 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.42 – 6.25 (m, 4H), 3.56 (d, $J = 3.9$ Hz, 2H), 3.31 (q, $J = 7.0$ Hz, 8H), 1.11 – 1.06 (m, 12H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 164.72, 164.68, 158.88, 154.52, 152.70, 152.59, 150.57, 148.56, 148.54, 147.81, 135.14, 131.11, 128.93, 128.87, 127.88, 125.20, 124.24, 124.08, 118.28, 117.73, 107.84, 102.80, 97.08, 64.78, 45.16, 43.60, 12.39, 12.37.



4'/5'-氨基甘氨酸罗丹明 (3-15) : 将 **3-14** (异构体混合物, 50 mg, 0.092 mmol) 的 3mL 甲醇溶液与 Pd/C (10%, 1 wt%) 混匀, 并加入高压反应釜中。再置换完反应釜中空气后, 充入 3 Mpa 氢气。反应在 30°C 搅拌条件下进行 8 h。待反应完全后, 将反应液过滤除去 Pd/C, 并减压除去溶剂, 即可获得产物 **3-15** (39 mg, 产率 84%)。HRMS (ESI) m/z calcd for C₃₀H₃₅N₄O₄ [M+H]⁺: 515.2653; found: 515.2651 (z = 1)。

4'-3-15: ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 6.89 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.68 (dd, J = 8.1, 2.1 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.46 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.31 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 5.42 (s, 2H), 3.47 (s, 2H), 3.38 – 3.13 (m, 8H), 1.08 (t, J = 6.9 Hz, 12H).

5'-3-15: ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.40 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.70 – 6.48 (m, 3H), 6.36 (d, J = 11.9 Hz, 4H), 6.04 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 3.52 (s, 2H), 3.32 (q, J = 7.0 Hz, 8H), 1.08 (t, J = 6.9 Hz, 12H).



异硫氰酸甘氨酸罗丹明 (Rh-Gly-NCS, **3-16**)：将硫光气 (15 μ L, 0.20 mmol) 溶解于干燥的丙酮中，并预冷至 0°C。将 **3-15** (异构体混合物, 20 mg, 0.040 mmol) 溶解于三乙胺 (27 μ L) 与干燥丙酮的混合溶液中，并加入到上述的预冷溶液中。反应混合物在室温条件下搅拌反应 12 h。粗产品为反应混合物中析出的固体，通过过滤收集。滤饼进一步通过乙醚洗涤三次，干燥后获得紫色固体，即为 **3-16**。上述产物直接用于标记，并不再进行进一步的纯化。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{31}H_{33}N_4O_4S$ [M+H]⁺: 557.2217; found: 557.2200 (z = 1)。

3.4 实验方法

3.4.1 Rh-Gly 和 Rh-MGly 的光谱测量

紫外吸收光谱的测量设备是 Agilent 8453 紫外可见分光光度计，荧光光谱的测量设备是 Agilent Cary Eclipse 荧光分光光度计。吸收测量的容器是 10 mm 光程的二通石英比色皿，荧光测量的容器是 10 mm 光程的四通石英比色皿。

固体薄膜的光谱分析方法: 将染料以 200 μM 浓度溶解于 1% (wt %) 聚乙烯醇 (PVA) 水溶液中, 混匀后覆盖到盖玻片的表面。将盖玻片置于 37°C 的恒温箱干燥 12 h, 即可制备获得分析所需的固体薄膜样品。样品的荧光光谱测量设备是 Olympus FV-1000 共聚焦显微镜, 测量的激发波长是 488 nm, 测量的范围是 510-640 nm (带宽: 10 nm), 步长 5 nm。对于样品在相同的实验条件下测定其激活前后的荧光光谱, 激活光是持续时长为 5 s 的 375 nm 激光。

3.4.2 定位型显微镜的配置

单分子成像及超分辨成像采用冷泉公司 (ColdSpring Science Co., Ltd.) 基于 Olympus IX71 搭建的显微成像系统。系统配备有 405 nm (Coherent OBIS 405, 100 mW) , 488 nm (Coherent Sapphire 488, 200 mW) , 532 nm (Coherent Sapphire 532, 200 mW) , 588 nm (Coherent Sapphire 588, 100 mW) 和 640 nm (Coherent OBIS 640, 150 mW) 激光光源。从光源产生的激光由声光可调滤光器 (an acousto-optic tunable filter, AOTF)

控制功率，通过光纤导入显微镜系统。激光通过带通滤光片（FF01-390/482/532/640, Semrock）过滤，并聚焦于 $\times 100$ 物镜（UAPON 100XOTIRF，数值孔径 NA: 1.49）的背焦面。光的入射角度由机械化的全内反射显微镜照明器（motorized-TIRFM illuminator, Olympus, IX2-RFAEVA2）控制。375 nm 激光（长春新产业，50 mW，MLL-III-375L）则通过机械快门（mechanical shutter, Uniblitz）控制，并在进入显微镜前进行了信号扩大。样品发出的荧光信号通过二色分光镜（Di01-R405/488/532/635, Semrock）与激光信号分离，再进一步通过带通滤镜（FF01-446/510/581/703, Semrock）清洁，最终信号通过 EMCCD 相机（iXon DU-897U）收集。在成像中发生的 Z 轴漂移由 CRISP 自动准焦系统（ASI）校正。成像的方法倍数由显微镜内建放大镜（1.6/1.0 \times ）控制，成像的像素尺寸对应于 1.6 和 1.0 倍放大系统分别为 104 nm 和 160 nm。

3.4.3 Rh-Gly 的光激活实验

将盖玻片依次置于乙醇、1 M KOH 和 MilliQ 超纯水（Millipore）中超声清洁，氮气吹干。配置 2 μ M Rh-Gly 的聚合物水溶液（含有 0.1% PVA），以 3000 rpm/min 速度旋涂到盖玻片（Fisherbrand, 12-545-102）表面，完成样品的制备。激活成像是在 3.4.2 节描述的显微镜系统中完成，激活光为~3 s 持续时间的脉冲紫外激活光（375 nm, ~ 80 W/cm 2 ），脉冲周期大约为 0.1 Hz，荧光激发光为持续照明的 532 nm 激光（ ~ 2 kW/cm 2 ）。成像激发光及激活光的照明模式为宽场成像模式（Conventional mode or wide-field imaging mode），相机单帧图像收集频率为 50 Hz。获得的图像栈数据通过 ImageJ 软件^[158]的 ThunderStorm 插件^[140]进行定位信号分析。每个定位数据直接统计为激活事件。

3.4.4 聚合物薄膜中的单分子成像

每种荧光染料均通过聚合物溶液（0.1% PVA 水溶液）稀释，保证最终在样品薄膜上形成近似密度的稀疏的单分子信号（为了避免相邻分子信号出现交盖，邻近单分子信号之间距离大于 670 nm，显著大于单个分子信号的峰宽 330 nm）。将上述溶液以 3000 rpm/min 速率旋涂在预先清洁过的盖玻片（清洁方法与 3.4.3 节方法相同）表面，即获得分散在高分子聚合物薄膜里的单分子分散样品。

单分子成像在 3.4.2 节描述的显微镜上进行，成像的照明模式为宽场成像模式。成像时保持~1 kW/cm 2 532 nm 激光和~30 W/cm 2 375 nm 激光持续照射样品，相机的像素尺寸为 160 nm，单帧收集频率为 100 Hz，一次单分子成像收集 2000 帧数据。对于每个样品，收集 5 个视野场的数据，每个视野场大小为 $40.96 \times 40 \mu\text{m}^2$ 。为了进一步验证实验的可重复性，对于每种荧光染料按照完全一致的方法制备 5 个样品，并且每个样品重复按照上述相同的成像策略完成单分子成像。

获得的单分子成像数据采用第 2 章开发的软件进行后处理分析，最终的统计数据采用 Bustamante 等^[159]报道的数学模型进行动力学拟合分析（模型见附录 B）。

3.4.5 细胞培养与 Rh-Gly 及其生物功能衍生物的染色方法

HeLa (helacyton gartleri) 细胞和 MCF-7 (human breast cancer) 细胞来源于中国科学院细胞库，按照文献的方法^[63]对细胞进行培养。细胞培养的培养基为包含 10% 胎牛血清 (FBS, Hyclone) 的 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco)，细胞在细胞培养箱 (CO₂ incubator, Thermo Scientific) 加湿的气氛中培养，培养采用的气体体系是 5% CO₂/95% 空气。

在本章的共聚焦成像实验中，HeLa 或者 MCF-7 细胞预先转移到玻璃底细胞培养皿 (Cellvis, D29-20-1.5-N) 培养 1-2 天，染色前细胞的汇合度达到 70-90%。使用含有 10 μM Rh-Gly 的培养基对细胞进行染色，染色时间为 5 min；在染色过程中，同时加入 Mitotracker Deep Red (染色浓度为 0.1 μM)，染色时间为 2 min。在完成染色后，使用 PBS 洗涤细胞三次，成像培养基为新鲜的 DMEM (10% FBS)。

在本章的超分辨成像实验中，HeLa 或者 MCF-7 细胞预先转移到预清洁的盖玻片上培养 1-2 天，在染色前细胞的汇合度达到 70-90%。

在线粒体超分辨成像实验中，使用含有 10 μM Rh-Gly 的培养基对细胞 (HeLa 或者 MCF-7) 进行染色，并且不经过洗涤直接进行定位型超分辨成像。染色和成像使用的培养基是含有 10% 胎牛血清的无酚红 DMEM (Macgene)。

在细胞核组蛋白超分辨成像实验中，HeLa 细胞提前利用脂质体转染试剂 (LipofectamineTM 3000) 转染 H2B-Halo 质粒。在转染 24 h 后，这些细胞转移到盖玻片上。继续培养 12 h，待细胞完全贴壁后，使用 10 μM Rh-Gly-Halo 培养基进行细胞染色，染色时长 2 h。染色结束后，使用 PBS 洗涤三次，除去大部分未标记的游离染料；并替换新鲜的 DMEM 培养基培养 30 min，重复替换培养两次，尽可能的除去游离的染料。成像前，替换含有 10% 胎牛血清的无酚红 DMEM 培养基。

在细胞微管成像实验中，HeLa 细胞按照文献描述的方法^[160]进行固定和抗体标记染色。在预处理、固定和还原除背景后，使用 1:100 稀释的兔源抗 α-tubulin 一抗 (Beyotime, AF0001) 在 4°C 下标记细胞 12 h。标记完成后，使用 PBST (PBS 含有 0.1% 吐温-20) 洗涤细胞三次，除去游离的抗体蛋白。使用山羊源抗兔二抗 (Bioss, bs-0295G；提前标记有 Rh-Gly-NCS) 在 4°C 下标记细胞 1.5 h，未标记的二抗也通过 PBST 洗涤三次除去。成像介质是 PBS，未加入任何额外的成像增强剂。

3.4.6 Rh-Gly 与 Mitochondrial deep red 的双色共聚焦荧光成像

共聚焦荧光成像的设备是 Olympus FV-1000 共聚焦显微镜。使用过滤后 330-385nm 波段的汞灯光作为 Rh-Gly 的激活光 (2.4 mW, 持续 5 s)。共定位成像中, 两束激光 (559 nm, Rh-Gly; 635 nm, Mitochondrial deep red) 以序列模式照射样品, 避免两种染料之间的串色效应。样品的信号通过二向分色镜 DM 405/488/559/635 分除激发光, 并进一步通过二向分色镜 SDM 640 拆分其短波长和长波长组分。检测器收集荧光信号波长最后通过电流控制衍射光栅控制, 设定波长稍短的 Rh-Gly 荧光信号接受波长为 575-620 nm; 而波长较长的 Mitochondrial deep red 荧光信号的接受波长为 655-755 nm。获得的共定位成像数据在制造商提供的软件上完成分析。

3.4.7 Rh-Gly 和其生物功能衍生物的光激活定位超分辨成像

光激活定位超分辨成像是在 3.4.2 节描述的全内反射荧光显微镜上进行, 照明模式为倾斜照明模式 (inclined illumination) [161],[162]。在超分辨成像前, 先在若激光照射强度下记录一张普通宽场荧光成像图。

在活细胞线粒体成像中, 通过持续的 375 nm 激光 ($\sim 2 \text{ W/cm}^2$) 与 32 nm 激光 ($\sim 2 \text{ kW/cm}^2$) 照射获得 Rh-Gly 的光致亮暗态转换, 在 10 s 内记录大约 ~ 2000 帧图像数据。记录数据中每个像素的尺寸为 104 nm。

在活细胞细胞核组蛋白 H2B 成像中, 先通过 532 nm 激光漂白部分已经处于开环两性离子的 Rh-Gly。超分辨成像数据的记录是在持续的 375 nm 激光 ($\sim 2 \text{ W/cm}^2$) 和 532 nm 激光 ($\sim 2 \text{ kW/cm}^2$) 照射下完成的, 记录速率为 33 Hz, 最终记录有 ~ 5000 帧。记录数据中每个像素的尺寸为 160 nm。

在固定细胞微管成像中, 532 nm 激光 ($\sim 2 \text{ kW/cm}^2$) 保持持续的对样品的照明。在成像的起始阶段, 375 nm 激活光 ($\sim 110 \text{ W/cm}^2$) 通过人为的控制脉冲地激活样品信号, 保证单分子信号稀疏分布。在成像的后期, 调整 375 nm 激活光到持续照明的模式以最大化的激活 Rh-Gly, 获得单分子信号。以 20 ms 的曝光时间收集大约 ~ 15000 帧图像。记录数据中每个像素的尺寸为 160 nm。

3.4.8 Rh-Gly 和其生物功能衍生物的定位型超分辨成像数据处理

超分辨成像数据分析通过 ImageJ 软件^[158]的 ThunderStorm 插件^[140]完成。通过对成像图像进行小波变换分析 (级别: 3, 尺度: 2), 完成样品的单分子信号的候选分析。针对每个单分子信号的 PSF, 以二维高斯函数的积分形式作为数学模型, 通过权重最小二乘法^{[143],[163]}拟合获得定位数据。对于微管成像, 定位数据中连续重复出现的定位信息进一步合并处理。所有获得的定位数据通过一个合适的定位密度滤镜过滤^[164], 除去背

景噪音干扰。使用 Average shifted histograms 方法（水平位移: 2）将所有的定位数据绘制到新图上，对于线粒体成像，超分辨重构图相较于原始数据的放大倍数为 $10.4\times$ ，单个像素尺寸为 10 nm；而对于其他的成像，重构图的放大倍数为 $8\times$ ，单个像素尺寸为 20 nm。定位数据中估算定位精度通过 Thompson 方程 1.1 完成。对于每组线粒体超分辨成像数据，Nyquist 分辨率是从 > 16 区域的平均值计算获得，按照 1 s 的时间尺度计算定位数据随成像时间增加累积的获得分辨率。不同区域分辨率的统计方差以橙红色的条带展示在绘制的分辨率随时间变化的图（图 3.10 和 52）中。傅立叶环相关分析（Fourier ring correlation (FRC) analysis）是通过文献^[165]提供的 Matlab 代码完成的。

3.5 结果与讨论

3.5.1 Rh-Gly 和 Rh-MGly 的光激活性质测量

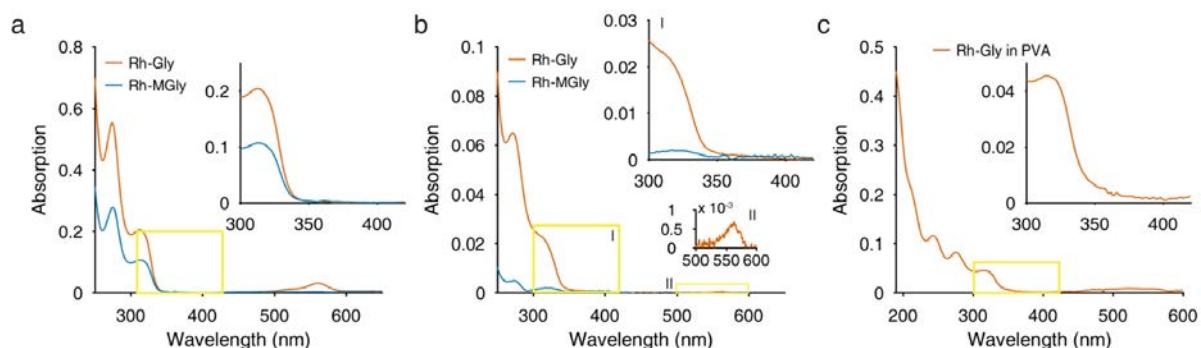


图 3.3 Rh-Gly 在薄膜和溶液中的吸收光谱。 (a) Rh-Gly 和 Rh-MGly 在甘油（含有 30% 甲醇，浓度为 $20 \mu\text{M}$ ）中的吸收光谱，插图为 300-425 nm 波段的放大光谱。 (b) Rh-Gly 和 Rh-MGly 在 PBS 溶液（浓度为 $3 \mu\text{M}$ ），插图显示了 300-425 nm (I) 以及 500-600 nm (II) 波段的放大光谱。 (c) Rh-Gly 在固相 PVA 聚合物薄膜中的吸收光谱，插图显示了 300-425 nm 波段的放大光谱。

Figure 3.3 Absorption spectra of Rh-Gly in solution and solid film. (a) The absorption spectra of Rh-Gly and Rh-MGly in glycerol solution (contained 30% methanol, dye concentration: $20 \mu\text{M}$). Inset shows the magnified spectra from 300 to 425 nm. (b) The absorption spectra of Rh-Gly and Rh-MGly in PBS solution (dye concentration: $3 \mu\text{M}$). Inset shows the magnified spectra from 300 to 425 nm (I) and 500 to 600 nm (II), respectively. (c) The absorption spectrum of Rh-Gly in solid PVA film. Inset shows the magnified spectrum from 300 to 425 nm.

图 3.3 展示了 Rh-Gly 和 Rh-MGly 的吸收光谱。Rh-Gly 和 Rh-MGly 的吸收光谱具有超越 350 nm 的尾吸收，可以满足 PALM 成像实验的稀疏激活特征^[146]。

Rh-Gly 在溶液和薄膜中均展示了良好的光激活特征（图 3.4）。在溶液中的激活荧光发射光谱测量由合作者于海波教授课题组完成。大部分的 Rh-Gly 分子在甘油（含有 30% 甲醇）处于无荧光发射的状态；然而，在紫外光照射过后，溶液的颜色加深为橙红色（图 3.4a 插图），同时伴随着显著增强的 585 nm 的罗丹明特征荧光发射光谱（图 3.4a）。该结果显示出罗丹明螺内酰亚胺结构在光激活过程中转换到开环的两性离子发色团结构。Rh-Gly 的光激活前后展示了 6.1 倍的荧光增强，而 Rh-MGly 在相同条件下没有展现出荧光发射的增强。此外，两种染料在固相 PVA 高聚物薄膜中的光激活光谱展现出相似的差异性。如图 3.4b 所示，在 375 nm 照射后，Rh-Gly 在 PVA 膜 ($\lambda_{fl}=570$ nm) 上展现出 7 倍的荧光增强；而同等条件下，Rh-MGly 的增强比例只有 3.5 倍。上述结果表明 Rh-Gly 具有比 Rh-MGly 更好的光激活能力。

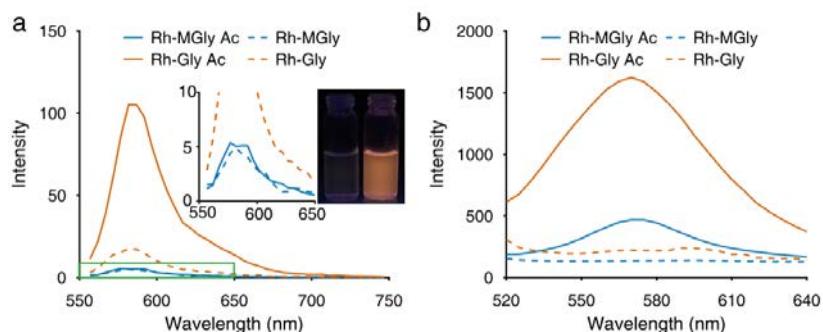


图 3.4 甘氨酸罗丹明及其甲酯类似物的光激活前后光谱研究。（a）Rh-Gly 和 Rh-MGly (5×10^{-7} M) 的甘油（预先混合 30% 甲醇）溶液在紫外光（Ac 代表激活后, $\lambda_{uv}=365$ nm）前后的发射光谱变化。插图：（左侧）（a）中框出区域的放大光谱图；（右侧） 5×10^{-4} M Rh-Gly 的甘油（预先混合 30% 甲醇）溶液在紫外光照前后的照片。（b）Rh-Gly 和 Rh-MGly 分布的 PVA 聚合物薄膜在紫外光照前后的发射光谱变化。

Figure 3.4 Spectral study of Rh-Gly and Rh-MGly before and after photoactivation. (a) Emission spectral changes of Rh-Gly and Rh-MGly (5×10^{-7} M) in glycerol (containing 30% CH_3OH , mixed well) before and after UV irradiation (Ac stands for after activation, $\lambda_{uv}=365$ nm). Inset: (left) magnified spectrum of the boxed region in (a) and (right) photographs of Rh-Gly solutions (5×10^{-4} M) in glycerol (containing 30% CH_3OH , mixed well) before and after UV irradiation. (b) Emission spectral changes of Rh-Gly and Rh-MGly in thin PVA film before and after UV irradiation.

为了验证 Rh-Gly 的重复激活性质，将 Rh-Gly 分散于固相 PVA 薄膜中进行了光激活实验研究。在实验中，Rh-Gly 持续性的被较强的 532 nm 激光 ($\sim 2 \text{ kW/cm}^2$) 激发，同时周期性的被 375 nm 的紫外激活光激活。如图 3.5a 所示，第一次被紫外光激活后，新形成的两性离子分子将总体被检测到的激活事件数量提升至 6.0×10^2 ；在大部分分子漂白前，Rh-Gly 的激活循环重复了 46 次，持续超过 10 min。图 3.5b 展示了在不同时刻激活前后的荧光成像图。在激活前观察到部分荧光信号是由于质子控制的开环平衡（图 3.6a）。综上所述，Rh-Gly 展现了重复可激活的特征，这种由光控制 Rh-Gly 的亮暗态转换特性满足光激活定位成像的光致变色特征。

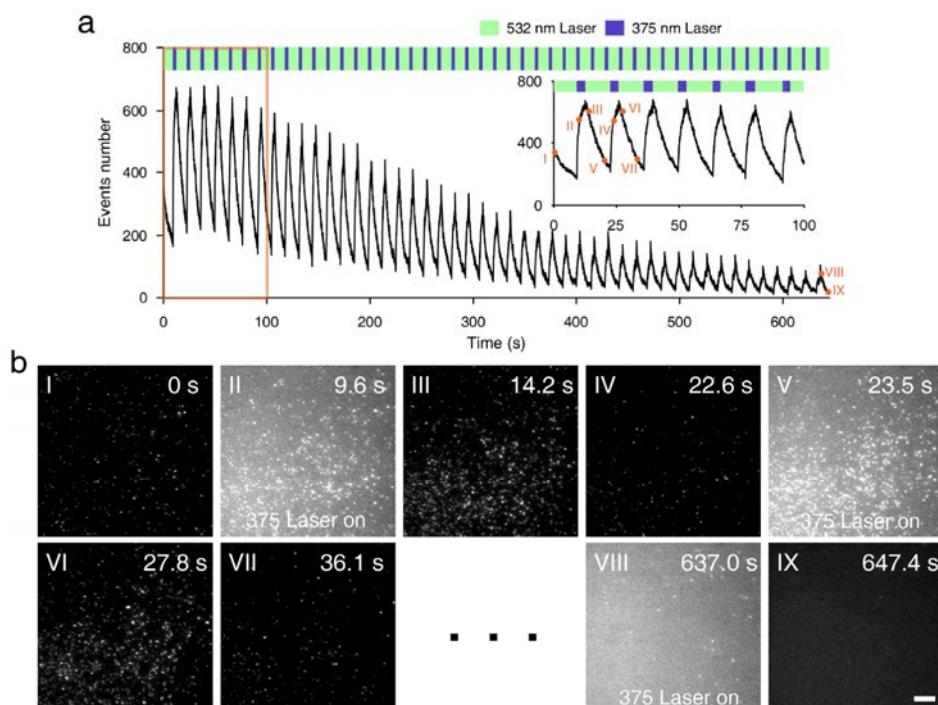


图 3.5 Rh-Gly 的光激活实验。 (a) 在周期循环控制的 375 nm 激光和持续照明的 532 nm 激光条件下，Rh-Gly 的激活事件随时间的变化。插图显示了 0-100 s 的放大曲线。

(b) 对应于 (a) 图中罗马数字标注时刻的时序的荧光成像图。标尺: 5 μm 。

Figure 3.5 Photoactivation experiment of Rh-Gly. (a) Time trace of numbers of activation events of Rh-Gly upon periodically controlled 375 nm laser and continuous irradiation of 532 nm laser. Inset demonstrates the magnified plot from 0 to 100 s. (b) Time course fluorescence images corresponding to the moments indicated by Roman numerals in (a). Scale bar: 5 μm .

3.5.2 Rh-Gly 和 Rh-MGly 的 pK_a 测量

不仅罗丹明螺内酰亚胺染料的可逆光激活过程可以在定位型超分辨成像中提供单分子亮态信号，其螺环质子随机开关换平衡过程也可能为成像提供稀疏的亮态分子^{[40],[70],[84],[166]}。图 3.6a 展示了罗丹明螺内酰亚胺的质子关联螺环开关环平衡过程的结构变化。该过程具有动态的特征，每个罗丹明螺环分子在时间轴上动态处于开关环的平衡过程。同时，该过程具有平衡的特征，在稳态环境下对于分子整体来说，相对固定比例的分子处于开环的亮态，而剩余的分子处于暗态。因此，将罗丹明螺内酰亚胺的 pK_a 控制在 6 以下，降低在中性环境下该分子质子化开环的比例，实现该条件下稀疏的罗丹明开环亮态，从而为定位型超分辨成像提供稀疏的单分子亮态信号。

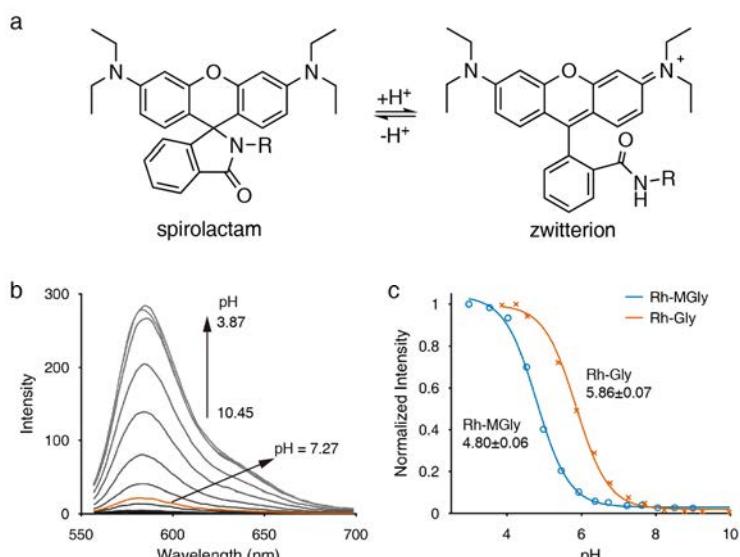


图 3.6 质子加成的 Rh-Gly 与 Rh-MGly 的螺环开关环平衡。 (a) 罗丹明螺内酰亚胺的随机自开环平衡。 (b) Rh-Gly 在甲醇/水 (v:v=3:7) 体系中随 pH 变化的发射光谱。 (c) Rh-MGly 和 Rh-Gly 在甲醇/水 (v:v=3:7) 体系中随 pH 变换发射强度积分的变化。

Figure 3.6 Protonation-induced spirocyclization equilibrium of Rh-Gly and Rh-MGly. (a) Spontaneous spirocyclization equilibrium of rhodamine spirolactam. (b) Emission spectral changes of Rh-Gly vs pH in C_2H_5OH/H_2O (v:v=3:7). (c) Integrated emission intensity vs pH of both Rh-MGly and Rh-Gly in C_2H_5OH/H_2O (v:v=3:7).

图 3.6b 展示了在质子滴定过程中，Rh-Gly 的荧光发射光谱变化。当环境 pH 从 10.45 逐渐降低到 3.87 时，染料展现了显著提升的荧光发射 (186 倍)。在中性环境中 (图 3.6b 中标注的曲线)，染料仍然具有较弱的荧光发射，显示出在此条件下，有少部分染料分

子处于两性离子状态。这一点也可以被从图 3.3b 中 Rh-Gly 在 PBS 溶液中观察到的弱可见光区吸收证实。因为罗丹明螺内酰亚胺在中性环境中持续性的随机开环^[70], Rh-Gly 略偏酸性的 pK_a 保证了绝大部分荧光团分子处于无荧光发射的螺环状态, 减少在光激活型超分辨成像中单分子信号重叠的可能性。

另一方面, pK_a 特征也侧面反映了分子内酸性对罗丹明螺内酰亚胺的开环两性离子结构的影响。如图 3.6c 所示, Rh-Gly 的 pK_a 是 5.86, 大约比 Rh-MGly 高一个 pH 单位。这个结果说明 Rh-Gly 转换到两性离子状态需要的酸性比 Rh-MGly 更弱, 同时这种减弱的酸性需求证实 Rh-Gly 转换产生的两性离子能够通过“自稳定”的结构(图 3.1c) 稳定, 而 Rh-MGly 则没有上述的稳定作用。这种稳定作用延长两性离子的寿命, 并可用来解释在图 3.4 中 Rh-Gly 更强的光激活效率。

3.5.3 Rh-Gly 单分子亮态时间测量和超分辨成像能力评价

本论文在单分子水平上研究了 Rh-Gly、Rh-Pht (结构见图 3.1a) 和 Rh-MGly 的光致转换行为。在单分子研究中, 所有染料均稀疏的分散在 PVA 薄膜中, 避免单分子信号发生重叠, 同时在研究中, 紫外光持续照射样品保持对罗丹明螺环分子的激活。这些罗丹明螺内酰亚胺的光致转换行为可以用 Bustamante 提出的数学模型^[159]来描述, 模型细节详见附录 B。荧光团可以被激活, 从暗态转换到亮态; 而在持续激发光的照射下, 激活态会转变为暗态或者发生漂白。基于上述的模型, 光致转换的速率可以通过对四个单分子光物理特征密度分布数据的拟合获得, 这四个特征参数是亮态的时间 (t_{on}), 无荧光发射暗态的时间 (t_{dark}), 染料激活后的闪烁次数 (n_{blinks}) 和光漂白时间 (t_{bleach})。对于罗丹明螺内酰亚胺染料, 其暗态到亮态转换不能使用单自然指数的模型 ($k_r e^{-k_r t}$), 需采用双自然指数拟合 ($\alpha k_{r1} e^{-k_{r1} t} + (1 - \alpha) k_{r2} e^{-k_{r2} t}$)。虽然单指数模型更为简单、参数更少, 但对罗丹明螺内酰亚胺染料单分子数据使用该模型拟合后, 不能准确给出这些染料的漂白时间分布 ($R^2 < 0.70$, Rh-Gly 和 Rh-MGly; $R^2 = 0.81$, Rh-Pht)。而基于双自然指数的拟合结果可以准确给出漂白分布的预期 ($R^2 > 0.90$), 因此对于所有的罗丹明螺内酰亚胺从暗态到亮态转换使用了双自然指数的模型。

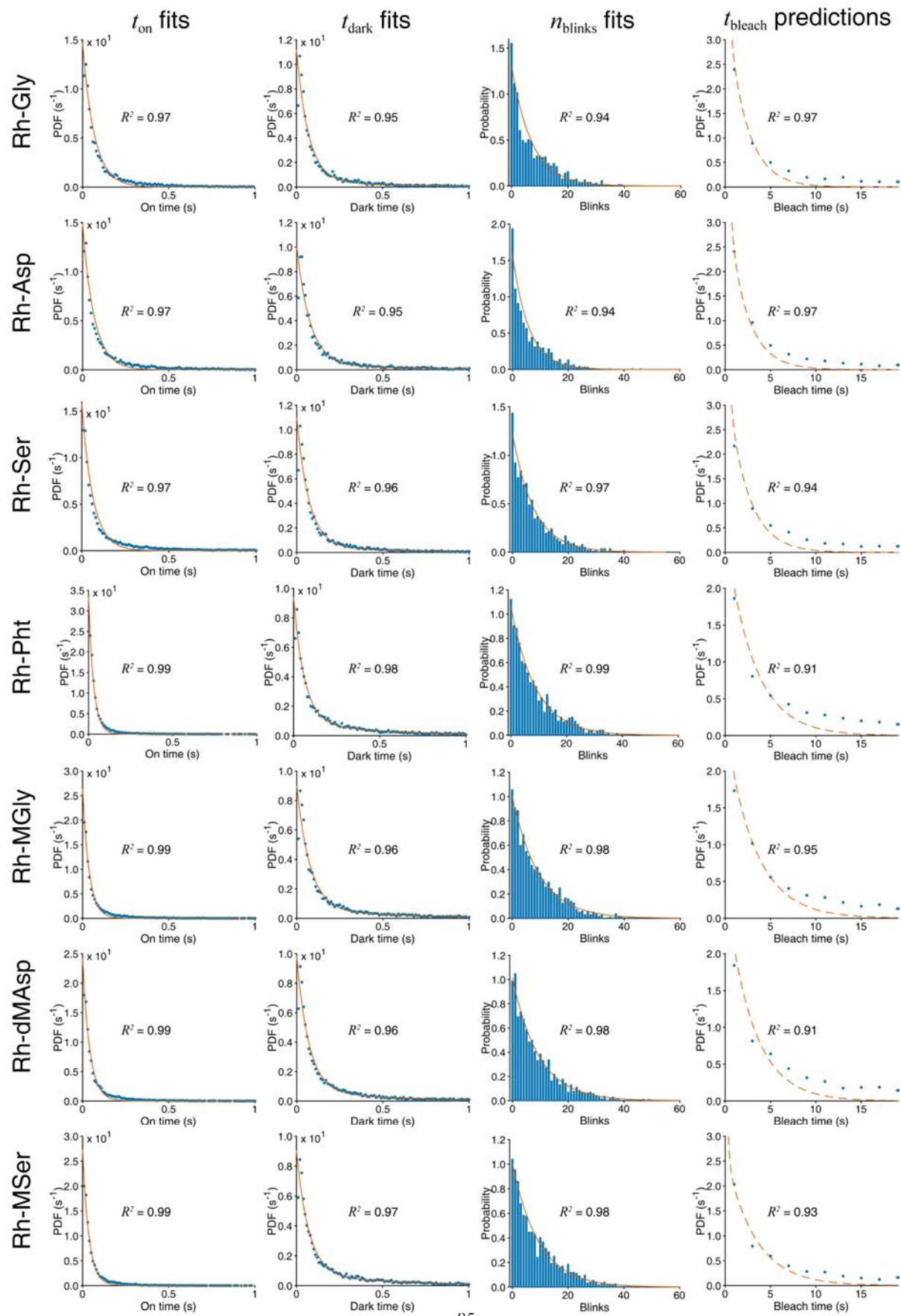


图 3.7 基于罗丹明螺内酰亚胺单分子性质完成的拟合和预测。从左到右：单自然指数函数良好的匹配亮态时间 (t_{on}) 分布；双自然指数函数良好的匹配了暗态时间 (t_{dark}) 分布；几何分布良好的拟合了闪烁次数 (n_{blink} , c)；按照模型获得动力学参数预测的漂白时间 (t_{bleach}) 分布匹配实验的真实数据（统计宽度：2 s）

Figure 3.7 Fittings and predictions for four single-molecule parameters in characterization experiments of seven comparing rhodamine spirolactams. From left to right column: on time (t_{on}) distributions fit well to a single-exponential function; dark time (t_{dark}) distributions match a double-exponential fitting; the numbers of blinks (n_{blink}) are in good accordance with a geometric distribution; the theoretically estimated bleach time (t_{bleach}) distributions; the dashed red line) from the model are in well agreement with the experimental data (bin width: 2 s).

如图 3.7 所示，理论模型良好的匹配了实验数据 ($R^2 > 0.90$)。这些获得的实验结果允许本论文提出结构变换的模型去解释罗丹明螺内酰亚胺的光致转换行为。如图 3.8 所示，罗丹明螺内酰亚胺的激活过程包括两条从暗态到亮态的转换 (k_{r1} 和 k_{r2}) 途径。较慢速率的转换 (k_{r1}) 对应于通过紫外光激活获得的未质子化的两性离子结构 (A1)，其中包括一个不稳定的酰胺负离子；而较快速率的转换 (k_{r2}) 则对应于通过紫外光激活或者随机开环转换获得质子化的两性离子结构 (A2)。然而，一旦荧光团进入激活态 (亮态)，这两种状态 (A1 和 A2) 就无法区分了，因为它们代表了相同的开环两性离子结构亮态。在经过一小段亮态的停留时间，这些两性离子或者以速率 k_{d} 转换到关环的暗态或者以速率 k_{b} 发射漂白。为了准确的比较实验中不同的罗丹明螺内酰亚胺的光致转换性质，本研究对每种染料独立重复进行了 5 次单分子实验，其结果总结在表 3.1 中；因为结果展现出一致的趋势，下面的分析将以表格中灰色底色标记的一组接近中间值的结果为基准进行。

为了减少高值数据带来的偏差，平均亮态时长 (\bar{t}_{on}) 通过拟合亮态时长概率分布 (图 3.7 最左侧一列图) 及方程 2.53 计算获得。Rh-Gly 展现延长的亮态持续时间 $\bar{t}_{\text{on}} = 68.5$ ms，显著长于另外两种类似物 (Rh-MGly, 37.7 ms; Rh-Pht, 29.9 ms)。Rh-Gly 延长的亮态持续时间证实了其处于两性离子态的稳定效应，与 3.5.1 节的整体光谱分析结果一致。因为平均亮态持续时间是通过速率之和 ($k_{\text{d}} + k_{\text{b}}$) 的倒数求得，亮态持续时间的增加可以进一步从三种罗丹明螺内酰亚胺的光转换速率上分析解释。对于 Rh-Gly，激活态短寿命的负氮离子可以被紧接着的分子内质子转移过程稳定，因此其亮态到暗态转换速率 $k_{\text{d}} = 12.7 \text{ s}^{-1}$ ，相对较慢；而对于 Rh-MGly 和 Rh-Pht，激活态的氮负离子的稳

定依赖于可能性较低的分子周围 PVA 分子上的羟基氢质子分子间质子转移，因而其亮态到暗态转换速率相对更快 (Rh-MGly, $k_d = 23.8 \text{ s}^{-1}$; Rh-Pht, $k_d = 29.9 \text{ s}^{-1}$)。Rh-Gly 的关环过程因为分子内质子转移而变慢。此外，Rh-Gly 展现出较慢的漂白速率 ($k_b = 1.9 \text{ s}^{-1}$)，支持其通过分子内方式强化的稳定效应。相比较于它们的漂白速率 k_b ($< 4 \text{ s}^{-1}$)，比较的类似物展现出更快的亮态转换到暗态的速率 k_d ($> 12 \text{ s}^{-1}$)，因此从亮态到暗态螺环的转换相对于光漂白过程对亮态时间的影响更大。总之，分子内质子转移稳定了亮态的两性离子结构，并且延长了 Rh-Gly 的亮态持续时间。

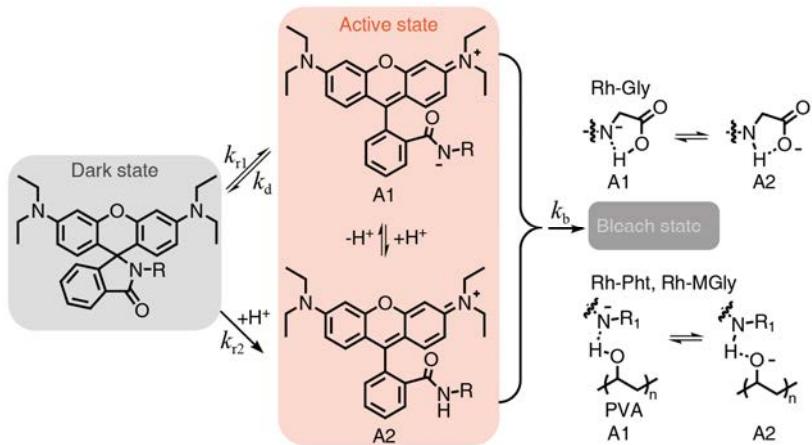


图 3.8 本研究中提出的解释罗丹明螺内酰亚胺闪烁的机制

Figure 3.8 Proposed mechanism explains the blink behavior of rhodamine spirolactam.

单分子荧光信号伴随着亮态时间延长也出现了增强效应。如表 3.1 所示，Rh-Gly 展示了良好的单分子亮度 (光子发射速率: 3.57×10^4 光子/s)，比两种对比类似物显著增强 (Rh-Pht, 2.44×10^4 光子/s; Rh-MGly, 2.85×10^4 photons/s)。Rh-Gly 的单分子亮度显示出与亮态时间延长正相关的增强特征，源于分子内氢键对两性离子的稳定作用。随单分子亮度的增强和亮态时间的延长，Rh-Gly 的单分子信号也展现出最高的信噪比 (5.48)。另外一方面，延长的亮态持续时间和增强的光子发射速率增加了染料在单次亮态过程中被激发的次数。这些激发次数的累加也扩大了染料在单次亮态过程被漂白的可能性，因此与其类似物展现的亮暗态转换次数 (闪烁次数，Rh-Pht, 9.3; Rh-MGly, 9.8) 相比，Rh-Gly 显示出减少的亮暗态转换次数 (7.7, 表 3.2)。尽管如此，这些闪烁次数的数值仍然可与报道结果相比较，因为过去的结果是在成像增强剂的存在条件下完成的^{[35],[167]}。虽然 Rh-Gly 展现出较少的闪烁次数，它的整体光稳定性仍然是提高的，与

它的类似物（总收集光子数 Rh-Pht, 1.47×10^4 ; Rh-MGly, 2.57×10^4 ）相比，Rh-Gly 的总收集光子数有显著的提升（ 4.32×10^4 ）。这种增强与亮态时间延长的原因一致，来源

表 3.1 七种罗丹明螺内酰亚胺的单分子表征实验

Table 3.1 Single-molecule characterization experiment of seven rhodamine spirolactams.

染料	\bar{t}_{on} (ms)	k_d (s^{-1})	k_b (s^{-1})	k_{r1} (s^{-1})	k_{r2} (s^{-1})	α	\bar{t}_{dark} (s)	$\bar{t}_{\text{dark}}/\bar{t}_{\text{on}}$	亮度 ($\times 10^4$ 光子/s)	SNR	总收集光 子数(\times 10^4)
Rh-Gly	69.4	12.5	1.9	1.5	14.1	0.21	0.49	7.1	3.70	5.64	4.48
	68.5	12.7	1.9	1.7	14.3	0.27	0.40	5.9	3.57	5.48	4.32
	53.5	16.3	2.4	1.6	15.5	0.31	0.37	6.9	3.57	5.51	3.85
	73.0	12.0	1.7	1.8	15.0	0.22	0.41	5.6	3.84	5.78	5.06
	62.1	14.1	2.0	1.6	14.5	0.24	0.44	7.0	3.70	5.65	4.79
Rh-Asp	67.1	12.5	2.4	1.3	12.9	0.26	0.51	7.6	3.34	5.14	3.77
	65.8	13.2	2.0	1.5	14.4	0.28	0.43	6.5	3.36	5.41	4.16
	66.7	13.0	2.0	1.7	14.3	0.32	0.36	5.3	3.81	5.70	4.41
	59.2	14.7	2.2	1.5	13.2	0.30	0.43	7.3	3.24	5.10	3.75
	80.6	10.7	1.7	2.1	15.4	0.24	0.35	4.3	3.82	5.68	5.27
Rh-Ser	57.8	15.4	1.9	1.4	12.6	0.27	0.48	8.3	3.50	5.39	4.38
	63.3	13.9	1.9	1.6	13.9	0.26	0.43	6.8	3.55	5.41	5.12
	49.0	18.2	2.2	1.4	12.3	0.34	0.38	7.8	3.21	5.04	3.63
	69.9	12.5	1.8	1.5	14.1	0.24	0.47	6.7	3.48	5.35	5.00
	55.2	16.2	1.9	1.4	13.2	0.31	0.45	8.1	3.35	5.18	4.21
Rh-Pht	32.8	26.3	4.2	1.4	13.0	0.39	0.32	9.8	2.43	4.15	1.42
	30.2	29.8	3.3	1.8	16.3	0.46	0.13	4.4	2.56	4.28	1.64
	29.9	29.9	3.6	1.7	15.6	0.47	0.12	4.1	2.44	4.30	1.47
	29.5	30.0	3.9	1.6	16.1	0.48	0.11	3.8	2.57	4.30	1.55
	33.1	27.4	2.8	1.6	15.1	0.45	0.17	5.0	2.49	4.17	1.74
Rh-MGly	38.0	24.3	2.0	1.4	12.4	0.39	0.30	7.9	2.74	4.47	2.53
	45.5	19.7	2.3	1.4	13.2	0.37	0.34	7.4	2.78	4.48	2.57
	37.2	24.3	2.6	1.5	13.4	0.40	0.28	7.6	2.97	4.74	2.45
	37.7	23.8	2.7	1.4	12.9	0.36	0.36	9.5	2.85	4.59	2.57
	36.2	25.0	2.6	1.6	14.4	0.38	0.29	8.0	3.30	5.09	2.66
Rh-dMAsp	46.1	19.5	2.2	1.3	11.6	0.36	0.38	8.3	2.56	4.20	2.85
	41.3	21.7	2.5	1.6	14.1	0.37	0.29	7.1	2.82	4.51	2.57
	37.9	24.5	1.9	1.5	13.2	0.41	0.26	7.0	2.84	4.57	2.88
	40.0	23.0	2.0	1.4	12.4	0.37	0.34	8.6	2.80	4.57	2.82
	34.5	26.3	2.7	1.6	13.9	0.43	0.21	6.2	2.62	4.37	2.11
Rh-MSer	36.4	24.5	3.0	1.4	12.6	0.39	0.30	8.3	2.59	4.35	1.84
	36.1	24.8	2.9	1.5	12.8	0.38	0.31	8.5	2.50	4.22	1.83
	36.5	24.6	2.8	1.6	13.8	0.42	0.23	6.3	2.62	4.35	1.90
	34.1	26.6	2.7	1.6	13.4	0.44	0.21	6.0	2.45	4.14	1.74
	34.7	26.3	2.5	1.6	14.0	0.42	0.23	6.6	2.33	4.06	1.75

于分子内氢键对两性离子状态的稳定作用。更重要的是，增强的单分子信号进一步提升了定位的精确度。在单分子研究中，Rh-Gly 的定位精度为 22.1（表 3.2），比它的类似物（Rh-Pht, 26.1; Rh-Pht, 24.6）定位结果更为精确。综上所述，由于拥有邻近螺环的羧基，Rh-Gly 的单分子荧光发射被分子内质子转移与分子内氢键协同强化，使得这种染料具有定位型超分辨成像的潜力。

表 3.2 罗丹明螺内酰亚胺的单分子单帧收集光子数、闪烁次数、定位精度的比较
Table 3.2 Comparison of photons per single molecule per frame, numbers of switching cycles and localization uncertainties of investigated rhodamine spirolactams.

染料	单分子单帧 收集光子数	闪烁次数 \bar{n}_{blinks}	定位精度(nm)
Rh-Gly	357	7.7	22.1
Rh-Asp	334	6.2	22.6
Rh-Ser	355	8.3	22.0
Rh-Pht	244	9.3	26.1
Rh-MGly	285	9.8	24.6
Rh-dMAsp	282	9.7	26.2
Rh-MSer	262	9.8	26.2

为了进一步分析酸性取代基和亮态时间延长之间的关系，本研究在同样的成像条件下增加比较了四种罗丹明螺内酰亚胺类似物 Rh-Asp、Rh-Ser、Rh-dMAsp 和 Rh-MSer。根据它们取代基的种类，四种染料分为两组：一组是具有酸性基团的罗丹明螺内酰亚胺，另一组是甲酯化的类似物。如表 3.1 所列，相比较于甲酯类似物（Rh-dMAsp, $\bar{t}_{on} = 41.3$ ms；Rh-MSer, $\bar{t}_{on} = 36.5$ ms），酸性螺内酰亚胺的亮态持续时间显著延长（Rh-Asp, $\bar{t}_{on} = 67.1$ ms；Rh-Ser, $\bar{t}_{on} = 63.3$ ms）。这些数据证实了分子内质子转移对于罗丹明螺内酰亚胺的两性离子结构的稳定作用。另外，Rh-Asp 和 Rh-Ser 与 Rh-Gly 的亮态时间接近，这说明额外的亲水性基团并没有延长两性离子亮态持续时间。另外一方面，如表 3.1 所列，这些酸性螺内酰亚胺也展现出显著增强的单分子亮度（Rh-Asp, 3.34×10^4 光子/s；Rh-Ser, 3.55×10^4 光子/s），而他们的酯化类似物的单分子亮度则相对更弱（Rh-dMAsp, 2.82×10^4 光子/s；Rh-MSer, 2.62×10^4 光子/s）。这些统计数据进一步的证实了分子内氢键的稳定效应。不仅如此，这种稳定效应也改善了酸性罗丹明螺内酰亚胺其它单分子光物理性质，包括提高的单分子信号信噪比（Rh-Asp, 5.14；Rh-Ser, 5.41 vs Rh-dMAsp, 4.51；Rh-MSer, 4.35）、增加的光漂白前总收集光子数（Rh-Asp, 3.77×10^4 ；Rh-Ser, 5.12×10^4 vs Rh-dMAsp, 2.57×10^4 ；Rh-MSer, 1.90×10^4 ）和强化的定位精度（Rh-Asp, 22.6；Rh-Ser, 22.0 vs Rh-dMAsp, 26.2；Rh-MSer, 26.2）。综上所述，由

于邻近螺环的羧基对两性离子态的加固稳定效应，酸性罗丹明螺内酰亚胺显著地展现出延长的亮态持续时间以及增强的单分子荧光信号。

邻近螺环的羧基同时也对暗态到亮态的恢复过程产生了影响。如表 3.1 所列，虽然所有研究的罗丹明螺内酰亚胺展现出近似的恢复速率 ($k_{r1} = 1.3 - 2.1 \text{ s}^{-1}$ 和 $k_{r2} = 11.6 - 16.1 \text{ s}^{-1}$)，但是它们暗态到亮态的两条转换途径的占比 (α 是速率 k_{r1} 的占比； $1 - \alpha$ 是速率 k_{r2} 的占比) 显示出较大的区别。酸性螺内酰亚胺显示出更高比例的质子化转换 (D 到 A₂，图 3.8；Rh-Gly、Rh-Asp、Rh-Ser， $1 - \alpha \geq 0.68$)，而类似物的相关比例更低 (Rh-Pht、Rh-MGly、Rh-dMAsp、Rh-MSer： $1 - \alpha \leq 0.64$)。这种增强的质子转移过程可以归结于分子方式对于质子转移的增强效应，因为对于没有分子内羧基的其它螺内酰亚胺结构，质子转移的过程依赖于不稳定的环境质子供体，例如 PVA 分子上的羟基。在所有染料中，Rh-Pht 显示出较低的质子化转换比率 ($1 - \alpha \leq 0.61$)，因为邻苯二甲酸酰亚胺的空间位阻效应抑制了分子间的质子转移过程。

酸性罗丹明螺内酰亚胺的延长亮态时间并没有降低这些染料的闪烁性质。在假定其它单分子光物理性质不改变的前提下，延长染料的亮态时长，可能会降低染料的平衡闪烁单分子稀疏度，即降低闪烁特征 $((k_d + k_b)/\bar{k}_r = \bar{t}_{\text{dark}}/\bar{t}_{\text{on}})$ 。但是如表 3.1 所列，Rh-Gly、Rh-Asp 和 Rh-Ser 的闪烁特征与其它罗丹明螺内酰亚胺类似物的结果接近，重复测量的结果显示这些染料的闪烁特征 $\bar{t}_{\text{dark}}/\bar{t}_{\text{on}}$ 处于 4-9 之间。酸性罗丹明螺内酰亚胺延长的亮态时长并没有影响它们的单分子信号稀疏度，因为它们展现出比对比物更长的暗态持续时间 (表 3.1， \bar{t}_{dark} 列)。因此，分子内酸性策略没有降低这些染料的闪烁性质，并且延长亮态持续时间将提高单个分子定位次数，提高成像的定位密度，利于光激活定位超分辨成像。

综上所述，酸性罗丹明螺内酰亚胺具备优秀的单分子光物理性质，这些染料具有比对比物更长的亮态持续时间以及更优秀的单分子亮度、总收集光子数和稳定性，且具备更优秀的光激活定位超分辨成像潜力。

3.5.4 Rh-Gly 染色的活细胞线粒体光激活定位超分辨成像

在应用 Rh-Gly 于活细胞超分辨成像前，对该染料在不同细胞系中的分布进行了研究。紫外光激活后，在 HeLa 和 MCF-7 细胞中，Rh-Gly 的荧光信号展示了线粒体的网状结构特征。如图 3.9a 和 b 的叠加图所示，在两种细胞中，Rh-Gly 的荧光信号与 Mitotracker Deep Red (商品化线粒体标识物) 展现了良好的重合性。图 3.9a 和 b 的强度剖面分析也显出两种染料的同步化的强度信号分布特征，这证明了两种染料的荧光信号的同现性。此外，在附图 50 (附录 C) 中进一步展示了来自共定位分析实验更多的视野

场数据。染色相关性的定量计算结果显示，两种染料染色具有较高的 Pearson 相关系数 (Pearson's coefficients)：0.86±0.07 (MCF-7 细胞, $n=52$) 和 0.83±0.06 (HeLa 细胞, $n=67$)。上述结果说明 Rh-Gly 具有对活细胞线粒体较好的选择性染色能力，同时其非特异性的荧光信号较少。

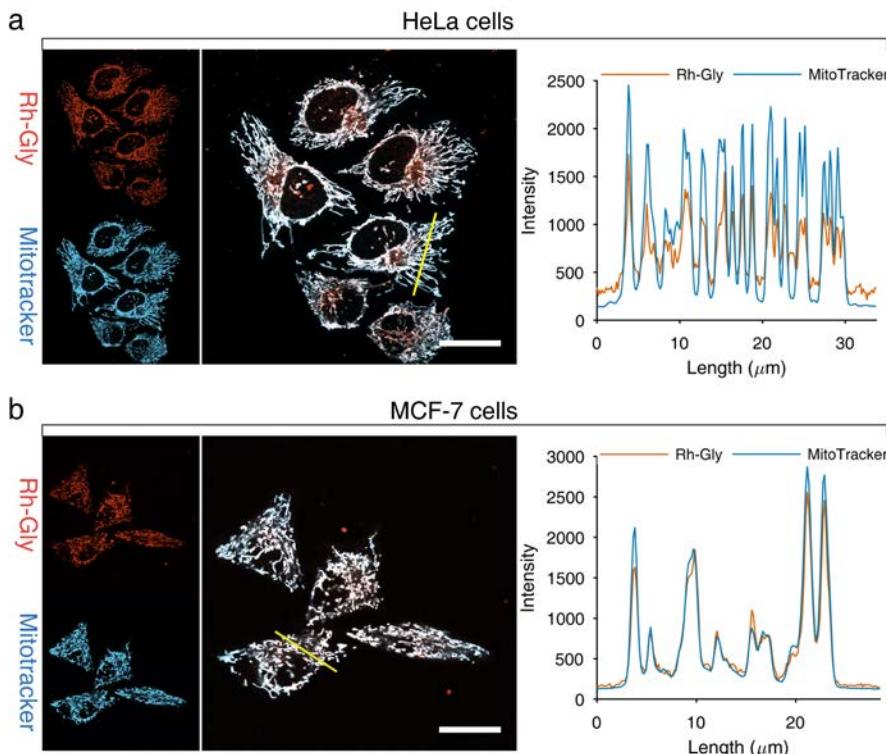


图 3.9 Rh-Gly 在 HeLa 和 MCF-7 细胞系的双色共定位分析。在每组分析中，从左往右：紫外光激活后 Rh-Gly 的共聚焦荧光成像图，着色为红色；Mitotracker Deep Red (Mitotracker) 的共聚焦荧光成像图，着色为蓝色；两张荧光成像图的叠加图；沿着叠加图中黄色线标注区域的两个荧光图的荧光强度刨线。标尺：25 μm 。

Figure 3.9 Two-color colocalization analysis of Rh-Gly in HeLa (panel a) and MCF-7 (panel b) cell lines. In each panel, from left to right: confocal fluorescence image of Rh-Gly after UV irradiation, colored in red; confocal fluorescence image of Mitotracker Deep Red (Mitotracker), colored in blue; merged image of two fluorescent images; intensity profiles from two fluorophores along the yellow line marked in the merged image. Scale bar: 25 μm .

Rh-Gly 在线粒体中的聚集可能与罗丹明螺内酰亚胺结构的质子平衡（开关换平衡，图 3.6a）相关。在中性的细胞基质环境中 ($\text{pH}=7.2$) ^[168]，Rh-Gly 分子部分质子化处于带有正电荷的两性离子状态；这部分正电荷分子被线粒体内膜的负电荷^[169]所吸引，从

而转移到线粒体中。一旦它们进入线粒体，线粒体内的亲脂微环境将转换它们回到无色无电荷且亲脂的螺环形式，这样这些分子就将持续的在线粒体中停留。因此，Rh-Gly 在线粒体中以关环形式聚集，能够被紫外光激活到两性离子的亮态。

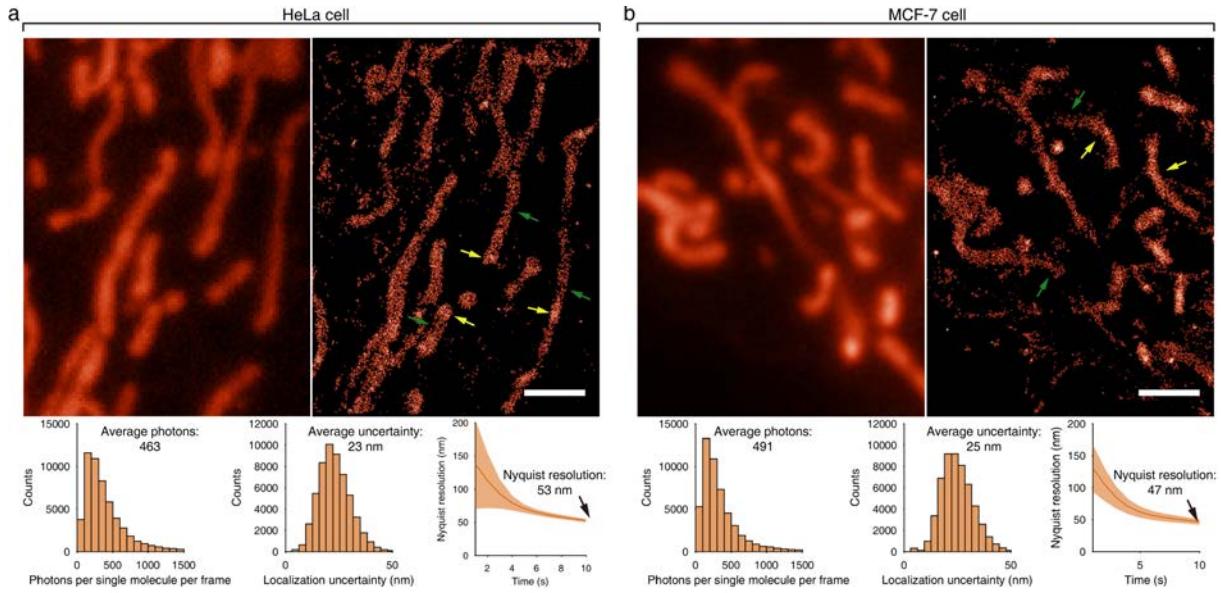


图 3.10 Rh-Gly 染色的活 HeLa 细胞（组 a）和 MCF-7 细胞（组 b）的线粒体聚集区域超分辨成像。在每组分析中，顶端左边的图是感兴趣区域的宽场荧光成像图；顶端右边的图是在倾斜照明条件下^{[161],[162]}从~2000 连续帧（10 s 采集时间）图像重构获得的相同区域光激活定位成像图，黄色箭头标注了具有高定位密度的区域，而绿色箭头指示了低定位密度的区域。每组分析的底端行，从左往右：单分子亮度的直方图；定位精度的直方图；Nyquist 分辨率的时间跟踪分析（橙色条带展示了在光激活定位型成像中>16 个区域的分辨率标准方差）。标尺：2 μm 。

Figure 3.10 Super-resolution imaging of mitochondria-enriched regions in live HeLa (panel a) and MCF-7 (panel b) cells stained with Rh-Gly. Inside each panel, the top left image is a wide-field fluorescence image of the region of interest and the right image is a PALM image of the same region reconstructed from ~2000 consecutive frames (10 s total duration) under inclined illumination^{[161],[162]}; yellow arrows mark the regions with high localization density, whereas green arrows indicate domains with low localization density; bottom row, from left to right: histogram of single molecule brightness, histogram of localization precisions and time trace analysis of Nyquist resolutions (orange color band shows the standard deviations of the resolutions estimated from >16 domains during the PALM imaging). Scale bars: 2 μm .

图 3.10 展示了 Rh-Gly 染色的活细胞线粒体超分辨成像。在 532 nm 激光和 375 nm 紫外激活光的持续照射条件下，荧光团在靶标区域展现了良好的闪烁特征。尤其值得注意的是，这些闪烁是在正常细胞培养基中完成的，不依赖于额外的除氧体系和有毒的还原剂^{[12],[32],[35]}，后者很可能会抑制细胞内 ATP 的合成过程^[170]。虽然光激活定位成像需要紫外激活光，但在实验中采用的激光光强较弱（~2 W/cm²），并且在短的成像时间内并没有带来严重的细胞损伤。与模糊的线粒体宽场荧光图对比，光激活定位成像显示了线粒体形态的细节特征（图 3.10a 和 b）。此外，超分辨成像结果也显示了线粒体的活性。因为罗丹明螺内酰亚胺的酸诱导开环趋势和 Rh-Gly 在质子化后的延长的亮态，在质子泵活性较高的区域，其荧光团亮态的定位数量也将增加。因此，成像图中的定位密度也反映了线粒体的活性。在图 3.10a 和 b 中，黄色箭头标注的高密度区域具有较为强烈的线粒体呼吸作用，而绿色箭头标注的低密度区域的线粒体活性较低。为了更进一步的展示 Rh-Gly 的线粒体超分辨成像能力，每一种细胞系额外进行了六次超分辨成像，其结果可见附图 51（附录 C），对应的超分辨成像定量分析结果可见附图 52。综上所述，Rh-Gly 展示了极佳的超分辨成像活细胞线粒体潜力。

两个定量化衡量光激活定位成像的性质是定位精度和重构图中靶标结构的定位密度（ ρ ）。定位精度描述了每个定位的精确程度^{[15],[163]}。如图 3.10（底端行第二张图）和附图 52 所示，Rh-Gly 在线粒体成像中的平均定位精度为 25 nm，对应的平均单分子亮度为 400-800 光子/（分子×帧）。另一方面，定位密度决定了重构成像图的采样间隔。根据 Nyquist-Shannon 标准^{[21],[171]}，对于靶标结构的离散型采样间隔（定位间隔）必须小于成像所需分辨率的一半。因此，二维成像基于 Nyquist 标准的分辨率（Nyquist 分辨率）可以按照方程 3.1 计算：

$$R_{Nyquist} = 2/\sqrt{\rho} \quad (3.1)$$

而计算出的 Nyquist 分辨率反映了超分辨成像的整体空间分辨率。通过方程 3.1，以秒为时间间隔单位，为超分辨成像计算了成像周期内累积的 Nyquist 分辨率（图 3.10 底端右侧图和附图 52）。随着成像时间的增加，定位数量逐渐积累，直至在 10 s 时 Nyquist 分辨率提升至大约 50 nm。对于在 10 s 获得重构成像进行的傅立叶环相关分析（Fourier ring correlation analysis, FRC analysis）^{[165],[172]}也显出相当高的空间分辨率，如图 3.11 所示，HeLa 细胞成像（图 3.10a）的 FRC 分辨率为 128 nm，而 MCF-7 细胞成像（图 3.10b）的 FRC 分辨率为 122 nm。综上所述，通过 Rh-Gly 的染色，在 10 s 内，对活细胞线粒体的超分辨成像获得了平衡的 25 nm 定位精度和~50 nm Nyquist 分辨率。

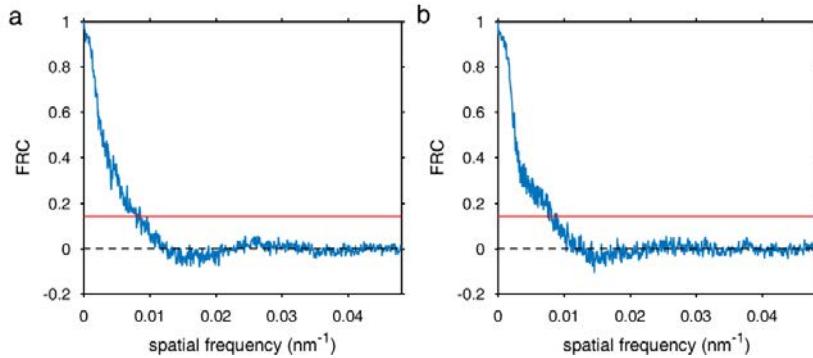


图 3.11 对图 3.10a (a) 和图 3.10b (b) 的定位的傅立叶环相关曲线分析^[165]。蓝色的线展示了随着空间频率提高而出现的相关性衰减。红色的线展示了按照文献^[165]设置的截止域值 0.143。

Figure 3.11 Fourier ring correlation curve analysis^[165] of localizations in Figure 3.10a (a) and Figure 3.10b (b). The blue line shows the decay of the correlation with spatial frequency. The red line represents the cut-off threshold of 0.143, following the reference^[165].

虽然超分辨成像存在空间和时间分辨率的取舍^[21]，通过 Rh-Gly 染色的光激活定位成像并没有牺牲成像速度来获得高质量的成像。如表 3.3 所列，本论文汇总线粒体的超分辨成像时间分辨率缩短到 10 s，可以与前人最好的成像结果相比较^{[3],[21],[133],[147],[164],[166],[173]}。虽然之前的线粒体超分辨成像可以实现 2 s 的时间分辨率，但该成像需要毒性的闪烁增强添加剂或者高强度的激光。表 3.3 序号为 5 和 6 号的成像使用了有毒的成像增强剂，而 4、6 和 7 号成像使用了高强度的激光。虽然 3 和 4 号成像结果给出了 2 s 的时间分辨率，但在这些研究中并没有报道相应的空间分辨率，这可能是由于在有限的时间内获得的空间分辨率较低。2 号结果使用了一种一氧化氮笼化的罗丹明，这种罗丹明在成像时会不断释放具有潜在生物活性的一氧化氮，可能会干扰成像的结果。因为 Rh-Gly 染色的成像不依赖于过高的激光光强且不需要任何额外的成像添加剂，所以该染料具备较好的活细胞超分辨成像能力。

活细胞线粒体超分辨成像的高时间分辨率是 Rh-Gly 的亮态时间延长的结果。亮态时间的延长以及 Rh-Gly 两性离子态的稳定效应增加了光子发射速率，强化了单分子亮度（表 3.2）。亮度的提升提高了单次定位的质量，同时亮态时间的延长可以在连续成像帧提供对结构的多次定位，最终扩大了成像中定位数量，导致在缩短的时间内获得较高的空间分辨率。因此，Rh-Gly 的亮态时间延长的内在特性使得该染料成为光激活定位成像活细胞线粒体的良好标识物。该染料在保持定位精度及提升光激活定位成像的时间分

辨率方面展现了平衡的折衷。此外，延长的亮态持续时间也为获取活细胞单分子追踪轨迹提供了可能性。

表 3.3 活细胞线粒体单分子定位超分辨成像比较

Table 3.3 Comparison of single-molecule localization super-resolution imaging of mitochondria in living cells.

序号	参考文献	染色方法	时间分辨率 (s)	空间分辨率 (nm) ¹	采集频率 (Hz)	照明强度 (kW/cm ²) ²	是否添加成像增强剂
1	本论文	小分子标识物	10	~50	200	532: 2 375: 0.002	-
2	(He et al. Anal. Chem. 2018) ^[63]	小分子标识物	10	未报道	150	532: 2 375: 0.0007	-
3	(Takakura et al. Nat. Biotechnol. 2017) ^[90]	小分子标识物	2	未报道	400	642: 4.4	-
4	(Gu et al. Adv. Mater. 2016) ^[83]	小分子标识物	2.5	未报道	未报道	561: 10 405: 0.11	-
5	(Carlini and Manley ACS Chem. Biol. 2013) ^[133]	小分子标识物	6-17	20-50	500	561: 1-5	+
6	(Shim et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2012) ^[3]	小分子标识物	2	30	503; 909	561: 10 405: 0.003	+
7	(Appelhans et al. Nano Lett. 2012) ^[174]	TOMM20-HaloTag	6-16	未报道	33	561: 25	-

¹ 通过 Nyquist-Shannon 标准估算的空间分辨率。

² 375、405、532、561 和 642 分别对应于 375 nm 激光、405 nm 激光、532 nm 激光、561 nm 激光和 642 nm 激光。

3.5.5 Rh-Gly 标记 HaloTag 的活细胞融合蛋白超分辨成像

通过 HaloTag 标签蛋白技术^[118]实现了 HeLa 活细胞细胞核组蛋白的超分辨成像。标记靶标蛋白（HaloTag 蛋白）需要在 Rh-Gly 分子上衍生蛋白的氯烷烃配体，为此本论文合成了 Rh-Gly-Halo（图 3.12a）。该探针具有膜通透性，可以共价标记到活细胞 H2B-Halo 融合蛋白上（图 3.12b 插图）。与宽场荧光图像相比，组蛋白 H2B 超分辨重构图（图 3.12b）展现出显著提升的分辨率，其定位信号的单分子亮度为 1040 光子/（分子×帧）（图 3.12c），定位精度为 21 nm（图 3.12d）。此外，更多的 H2B 蛋白超分辨成像展示在附图 53（附录 C），其定位精度及单分子亮度统计数据在附图 54（附录 C）中给出。所有成像与宽场荧光成像相比展现出显著清晰度提升，这些超分辨成像具有高的定位精度及单分子亮度，这些结果证实了 Rh-Gly-Halo 具备实现有效 H2B 蛋白超分辨成像

的能力。综上所述, Halo 配体连接的 Rh-Gly 衍生物展示了标记除线粒体外其它亚细胞结构的功能性, 并且保持了在活细胞进行光激活定位成像的能力。

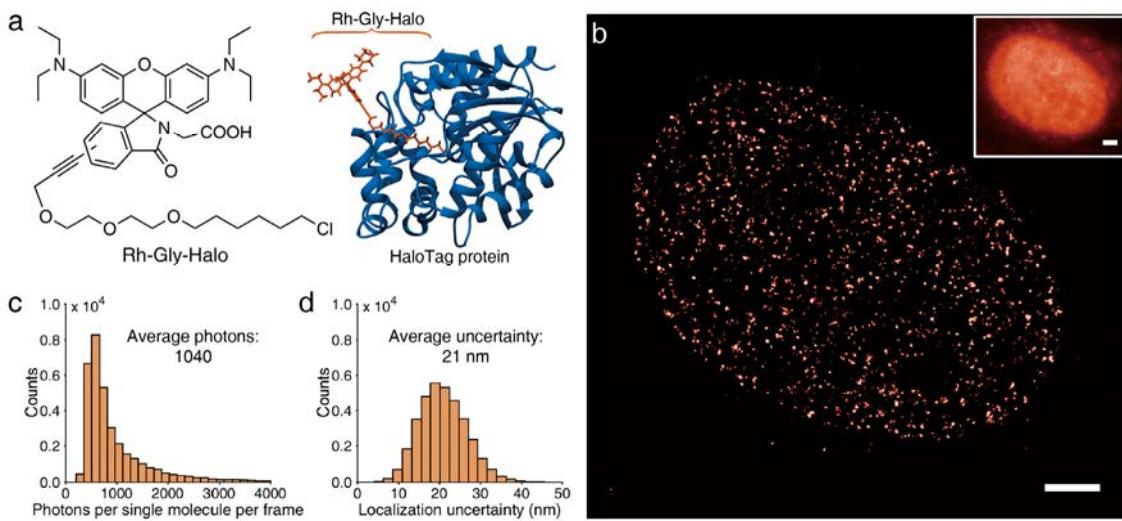


图 3.12 对活 HeLa 细胞细胞核的组蛋白超分辨成像。 (a) 左: Rh-Gly-Halo 的分子结构; 右: HaloTag 蛋白共价连接 Rh-Gly-Halo 的模型。Rh-Gly-Halo 标记卤代烷脱卤酶 (1BN6)^[175]的图像是通过 chimera 软件^[107]设计的。 (b) 在倾斜照明模式下活细胞中 Rh-Gly-Halo 标记的 H2B-Halo 融合蛋白的光激活定位超分辨成像。插图显示了标记有 Rh-Gly-Halo 的相同 H2B-Halo 融合蛋白的宽场荧光成像图。 (c) 单分子亮度直方图。

(d) 定位精度直方图。标尺: 3 μ m。

Figure 3.12 Super-resolution imaging of histones in nucleus of live HeLa cell. (a) Left: molecular structure of Rh-Gly-Halo; Right: model of HaloTag protein covalently bounded to Rh-Gly-Halo. Image of Rh-Gly-Halo coupled haloalkane dehalogenase (1BN6)^[175] is designed with chimera.^[107] (b) PALM image of H2B-Halo fusion proteins labeled with Rh-Gly-Halo in live HeLa cell under inclined illumination. Inset shows the wide-field image of the same H2B-Halo fusion proteins labeled with Rh-Gly-Halo. (c) Histogram of single molecule brightness. (d) Histogram of localization uncertainties. Scale bars: 3 μ m.

3.5.6 Rh-Gly 标记抗体的微管超分辨成像

为了更进一步拓展 Rh-Gly 的功能, 开发了该染料的异硫氰酸衍生物, Rh-Gly-NCS (图 3.13a), 并将其用于微管的超分辨成像。将抗原为 α -tubulin 的一抗和标记有 Rh-Gly-NCS 的二抗通过免疫荧光标记到固定细胞微管结构上, 成功实现了对微管的超分辨成像 (图 3.13b)。由于 Rh-Gly 的良好的光激活定位成像能力, 成像中使用的成像液为

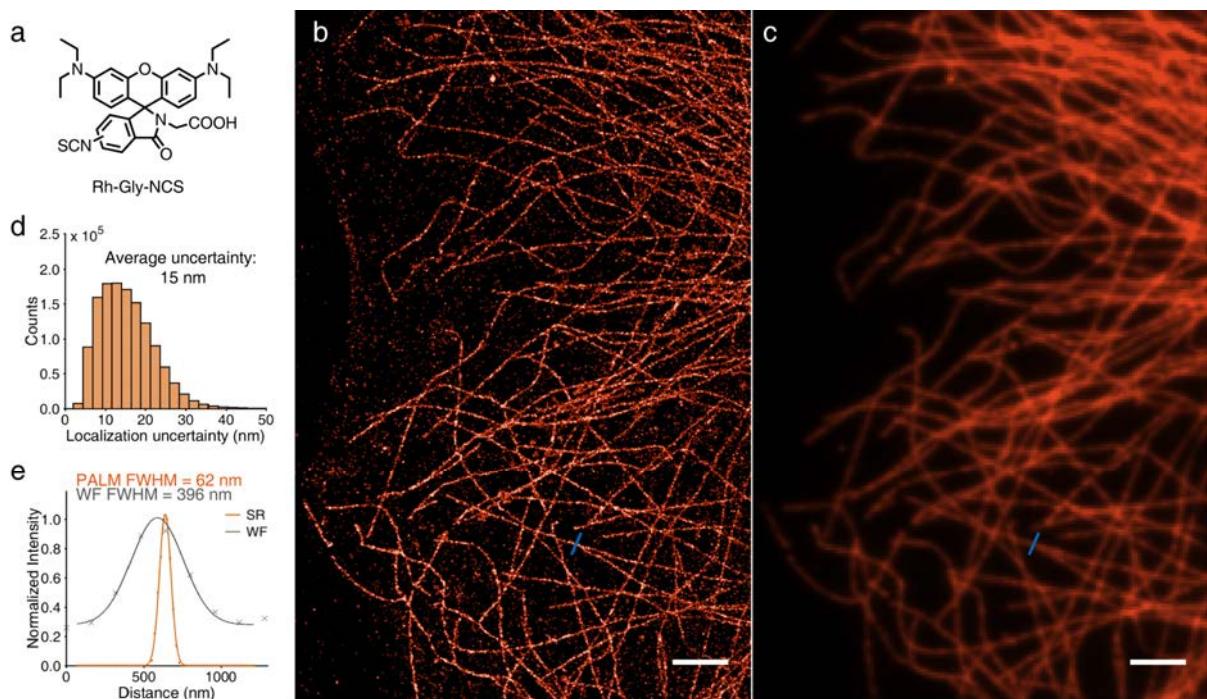


图 3.13 固定 HeLa 细胞中微管的超分辨成像。（a）Rh-Gly-NCS 分子结构。在倾斜照明模式下对免疫荧光标记的微管的超分辨成像（b）和对应的宽场荧光成像图（c）。免疫标记的一抗抗原为 α -tubulin 而二抗则标记有 Rh-Gly-NCS。超分辨成像是对~15000 帧原始数据重构获得，成像液是磷酸缓冲液（PBS）。（d）定位精度直方图。（e）在超分辨图（b）和宽场图（c）上蓝线标注区域的强度剖线分析，用单高斯函数拟合相关的数据，并给出了微管半峰宽的为 62 nm（超分辨图）和 396 nm（宽场成像图）。

标尺：3 μm 。

Figure 3.13 Super-resolution imaging of microtubules in fixed HeLa cell. (a) Molecular structure of Rh-Gly-NCS. Super-resolution image (b) and corresponding wide-field image (c) of microtubules immunolabeled with primary antibody against α -tubulin and secondary antibody labeled with Rh-Gly-NCS under inclined illumination. Super-resolution image was reconstructed from ~15000 frames. The imaging media is phosphate buffer saline (PBS). (d) Histogram of the localization precisions. (e) The intensity profiles of microtubule filament in super-resolution image (b) and wide-field image (c) indicated with blue lines. A single gaussian function was fitted to the data, estimating that the full width at half maximum (FWHM) of microtubule filament was 62 nm in the super-resolution image and 396 nm in the wide-field image. Scale bar: 3 μm .

普通 PBS 缓冲液，不添加任何额外成像添加剂。与模糊的宽场成像图（图 3.13c）相比，超分辨重构图显现出引人注目的清晰度提升。定量统计分析显示 Rh-Gly-NCS 的单分子

亮度为 981 光子/(分子×帧) (图 3.14)，而成像的平均定位精度为 15 nm (图 3.13d)。, 通过 Rh-Gly-NCS 标记抗体实现的微管超分辨成像展示出极大的分辨率提升，该结果的测量显示抗体标记的微管纤维尺寸为 62 nm，与前人报道匹配^[1]，而同一区域的宽场成像仅能粗略给出的 396 nm 的尺寸估计值 (图 3.13e)。更多细胞微管的超分辨成像结果可见附图 55 (成像重构定量分析见附图 56)，这些结果验证了 Rh-Gly-NCS 微管超分辨成像的可重复性。简而言之，通过对 Rh-Gly 的标记功能衍生实现了固定细胞微管超分辨成像。

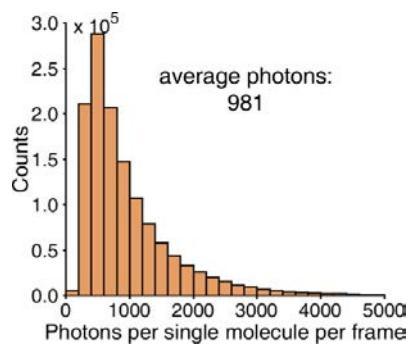


图 3.14 图 3.13 重构图的单分子亮度直方图

Figure 3.14 Histogram of single-molecule brightness of reconstruction image in Figure 3.13.

3.6 本章小结

本章提出将羧基引入罗丹明螺环的策略，构建分子内酸性环境，实现罗丹明螺内酰亚胺亮态持续时间的延长。基于该策略发展的甘氨酸罗丹明 Rh-Gly 展现了比甲酯类似物 (Rh-MGly) 更好的光激活能力以及紫外光控制的重复光激活特征。单分子分析结果显示包括 Rh-Gly 在内的具有分子内酸性罗丹明螺内酰亚胺在单分子水平展现出延长的亮态寿命，羧基对两性离子态的稳定效应将亮态持续时间从 30-40 ms 延长至 60-70 ms；分子内酸性染料同时展现了增强的单分子亮度、扩大的总收集光子数以及更好的超分辨成像潜力。细胞染色的共聚焦荧光成像结果显示 Rh-Gly 具备在不同细胞系中对线粒体的选择性染色功能，并且由于该染料延长的亮态持续时间以及良好的单分子光物理统计特征，通过 Rh-Gly 染色实现的活细胞线粒体超分辨成像具有平衡的时空分辨率（时间分辨率为 10 s，空间分辨率为~50 nm）。通过为 Rh-Gly 衍生 Halo 蛋白配体及异硫氰酸酯，拓展了该染料标记亚细胞器的功能性；通过自标记蛋白标签技术和免疫荧光染色技术，实现了对 HeLa 细胞细胞核组蛋白和微管的选择性标记和超分辨成像。综上所述，

本章的分子内酸性设计策略为未来开发适用于光激活定位成像的罗丹明螺内酰亚胺开辟了一条新的延长染料亮态持续时长的道路。

4 超亮季铵化哌嗪罗丹明的设计、合成及超分辨成像性能

4.1 引言

近年来，高级荧光显微技术迅速发展^{[5],[6],[10]}，尤其是其中的单分子定位显微镜，提供了超越 Abbe 衍生极限的超高分辨率。然而，与显微技术的快速进化相反，高亮度和光稳定性的染料的开发仍然缓慢，严重限制了活细胞动态成像的研究^{[176],[177]}。因此，研究者迫切需要基于理性的分子设计策略开发具备高亮度和高稳定性的染料。

罗丹明染料已经被广泛用于超分辨成像研究^{[40],[41],[90],[93],[133],[138],[178]–[180],[44],[62]–[64],[70],[84],[88],[89]}。由于这些广泛的应用，研究者对改善罗丹明染料的性质倾注了大量努力^[181]。虽然罗丹明的非辐射跃迁过程不能排除氢键作用等其它的机制，但过去的实验研究已经表明一些罗丹明染料的非辐射跃迁有可能与分子内扭曲电荷转移状态 (twisted intramolecular charge transfer, TICT) 的形成模型相匹配^{[182]–[185]}。因此，一个提高新罗丹明亮度的重要策略便是压制其 TICT 态的形成^[186]。在 TICT 状态，染料的供体基团经历相对于荧光团核心~90 度的扭转（图 4.1），因此不具备荧光发射且具有较高活性。为了抑制 TICT，化学研究者曾经通过环固定的方式限制氨基供体的旋转，然而这种方法经常导致较大的分子结构且生物相容性较弱。在几篇里程碑的文章中，Lavis 等^{[41],[44],[45]}替换了二四甲基罗丹明 (TMR) 的二甲氨基取代基为氮杂环丁烷。通过抑制 TICT，这种简单的修饰显著的提升了染料的亮度和光稳定性。之后，徐兆超和刘晓刚等^[46]进一步展示氮杂环丙烷也可以有效的抑制 TICT 形成。因为防止 TICT 的形成对发展高亮度和高稳定性染料具有重要意义，寻找新的抑制 TICT 并利于超分辨成像策略具有重要意义。

4.2 季铵化哌嗪罗丹明分子设计策略

染料的 TICT 形成受两个因素控制：空间位阻和电子效应。减少氨基的供电子性将降低 TICT 状态的稳定性，提升进入 TICT 态的能量，从而抑制 TICT 态形成。因此，具有吸电子诱导效应的季铵化哌嗪基是合适的抑制可能 TICT 态形成的供体取代基。如图 4.1 所示，正电荷的季铵盐增强了吸电子诱导效应并且降低邻近氨基的供电子能力，因此将二甲氨基替换为季铵化哌嗪基将降低 TICT 态的可能性。

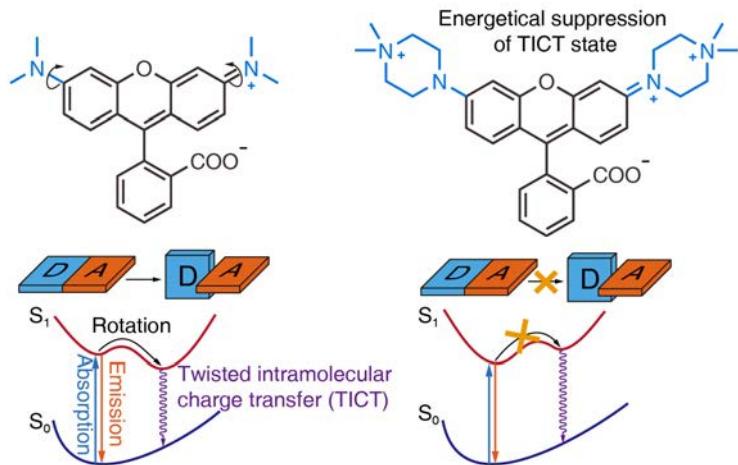


图 4.1 季铵化哌嗪罗丹明分子设计策略

Figure 4.1 Molecular design strategy of quaternary piperazine substituted rhodamines.

4.3 季铵化哌嗪罗丹明的合成方法

化学品的购买和处理方式, 反应的纯化方式、产物的表征方法可参见 3.3 节。本章合成应用了 3.3 节描述的高效液相色谱系统, 包括系统 A: Agilent 1100 高效液相分析系统, 检测波长设定为 290 nm; 系统 B: Elite 高效液相色谱分析系统(配备 P230 柱塞泵), 使用 Venus C18 5 μm 色谱柱 ($\Phi 4.6 \text{ mm}, 150 \text{ mm}$), 检测波长设定为 254 nm, 典型的流速为 0.8/1 mL/min; Elite 制备级别高效液相色谱系统(配备 P270 柱塞泵), 使用 Sinochrom ODS-BP 10 μm 色谱柱 ($\Phi 30 \text{ mm}, 250 \text{ mm}$), 检测波长为 254 nm, 典型流速为 30/40 mL/min。

BINAP 是 (\pm) -2,2'-双(二苯基膦)-1,1'-联萘的缩写。EDCI 是 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的缩写。

4.3.1 季铵化哌嗪罗丹明的合成路线

图 4.2 和图 4.3 展示了在本章研究的所有分子的合成路线。

图 4.2a 展示了季铵化哌嗪取代的罗丹明及其衍生物的合成路线, 通过商品化的间溴苯酚与邻苯二甲酸酐在甲基磺酸催化下反应获得溴取代的罗丹明类似物 (**4-1**)。该中间体可通过 Pd 催化的碳氮偶联反应获得哌嗪罗丹明 (Lyso-R, **4-2**), 再通过卤代烷烃的季铵化反应获得季铵化哌嗪 (MPR, **4-3**) 以及细胞膜探针 Mem-R(**4-4**)。

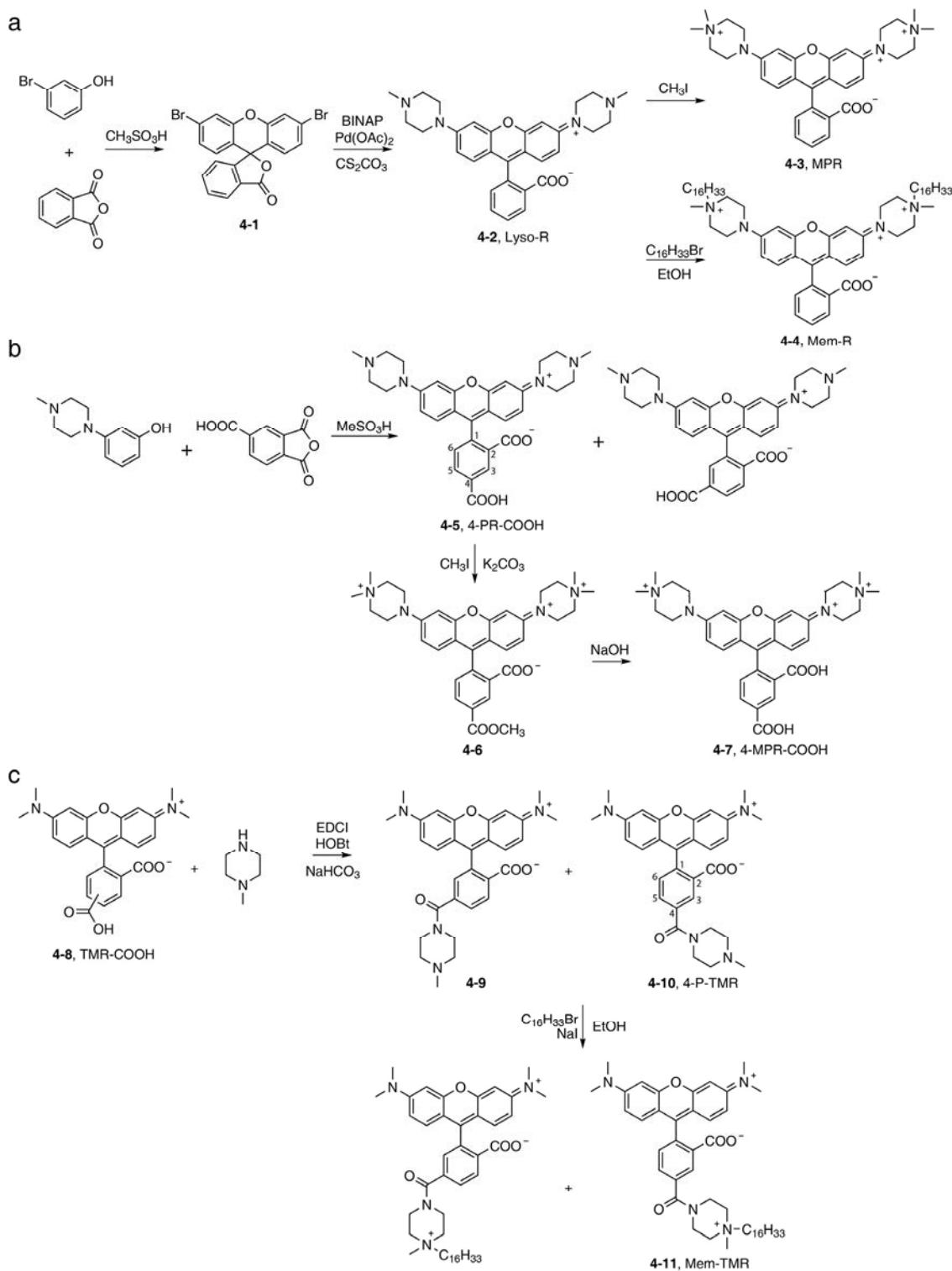


图 4.2 季铵化哌嗪罗丹明的合成路线

Figure 4.2 Synthetic route of quaternary piperazine-substituted rhodamine.

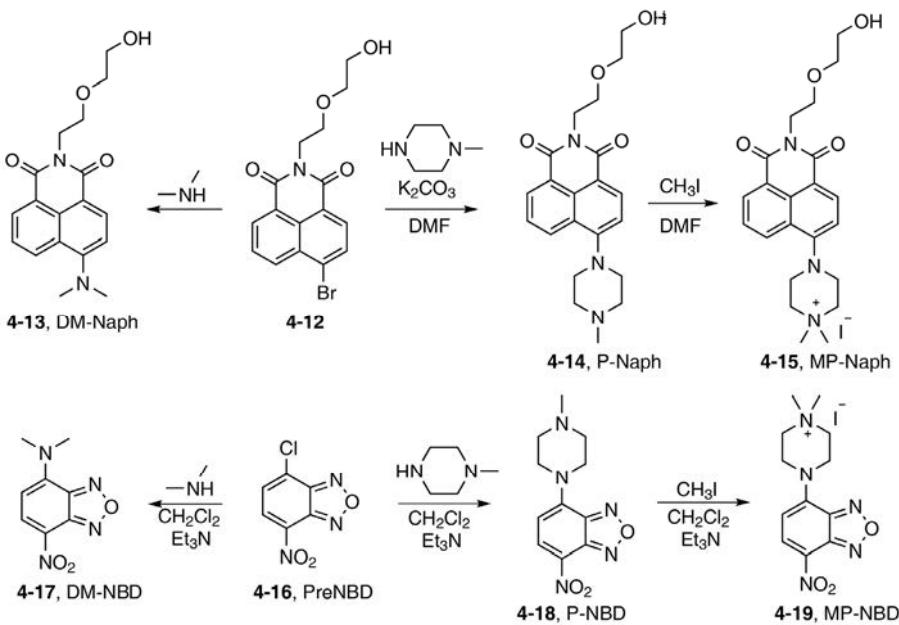


图 4.3 季铵化哌嗪染料及其二甲氨对比染料的合成路线

Figure 4.3 Synthetic route of quaternary piperazine-substituted fluorophores and dimethyl amino-substituted compared fluorophores.

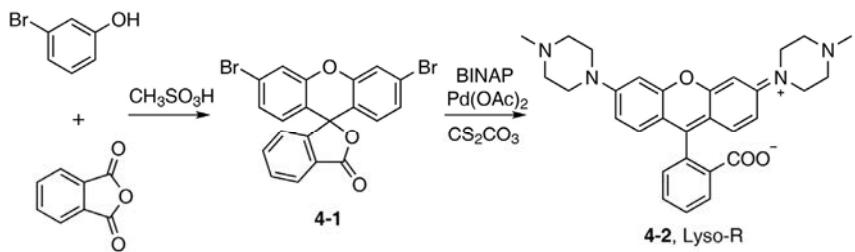
图 4.2b 展示了可生物标记的季铵化哌嗪取代罗丹明的合成路线。通过商品化的间甲基哌嗪苯酚与间羧基邻苯二甲酸酐在甲基磺酸催化下反应获得羧基衍生哌嗪罗丹明异构体，通过液相分离的方法获得其中 4-位置取代的单一异构体 (4-PR-COOH, **4-5**)。碘甲烷对中间体 4-PR-COOH 季铵化，获得羧基酯化的季铵化哌嗪罗丹明(**4-6**)，再水解酯基即可获得具有生物分子标记功能的羧基衍生季铵化哌嗪罗丹明 (4-MPR-COOH, **4-7**)。

图 4.2c 展示了对比化合物：具有细胞膜标记功能的四甲基罗丹明的合成方法。从羧基衍生的四甲基罗丹明异构体 (TMR-COOH, **4-8**) 出发，与甲基哌嗪进行反应获得哌嗪衍生的四甲基罗丹明异构体 (**4-P-TMR**, **4-9** 和 **4-10**)。对 **4-P-TMR** 进行季铵化，获得一对衍生季铵化哌嗪基团的四甲基罗丹明异构体，最后通过液相纯化获得 4 位置单一异构体，**Mem-TMR(4-11)**。

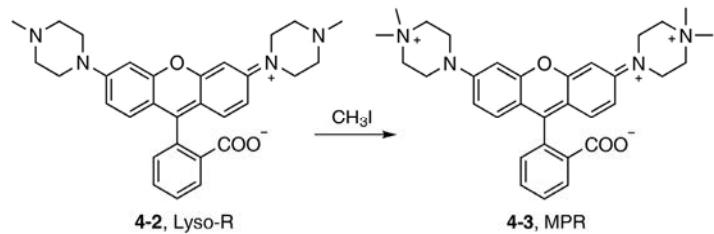
图 4.3 给出了季铵化哌嗪取代的萘酰亚胺和苯并噁二唑 (NBD) 染料及二甲氨取代的对比物合成方法。从萘酰亚胺或者 NBD 合成中间体(**4-12** 和 **4-16**)出发，与二甲氨发生取代反应可以获得二甲氨对比物 (DM-Naph, **4-13**; DM-NBD, **4-17**)，而与甲基哌嗪发生取代反应获得哌嗪萘酰亚胺 (P-Naph, **4-14**) 或者哌嗪 NBD (P-NBD, **4-18**)。

最后对荧光团的哌嗪基非芳香氨基季铵化，获得季铵化哌嗪萘酰亚胺（MP-Naph, **4-15**）与季铵化哌嗪 NBD（MP-NBD, **4-19**）。

4.3.2 Lyso-R、MPR 和 MEM-R 的合成步骤

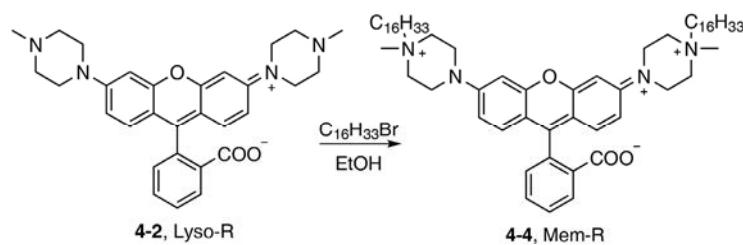


哌嗪罗丹明（Lyso-R, **4-2**）：中间体（**4-1** 按照文献的方法合成^[187]。将中间体（**4-1**（300 mg, 0.65 mmol），醋酸钯（29 mg, 0.13 mmol），BINAP（125 mg, 0.20 mmol）和碳酸铯（847 mg, 2.6 mmol）加入到 50 mL Schlenk 瓶中，真空置换氩气三次。再将甲苯（20 mL）和 N-甲基哌嗪（0.5 mL, 3.81 mmol）加入体系，并混合均匀。反应混合物在惰性气体氛围中 110℃ 搅拌反应 24 h。在 TLC 确定反应抵达终点后，将反应液降至室温，并用饱和碳酸钠水溶液洗涤三次，无水硫酸镁干燥有机层，并减压除去溶剂。剩余固体通过硅胶柱层析分离色谱纯化，流动相为二氯甲烷、甲醇和三乙胺的混合溶液（v/v/v=40:1:1），获得最终产物 Lyso-R（136 mg, 42%）。HRMS (ESI, TOF) m/z calcd for $C_{30}H_{33}N_4O_3 [M+H]^+$: 497.2553; found: 497.2549 ($z = 1$)。 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.01 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.79 – 7.61 (m, 2H), 7.17 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 6.76 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H), 6.74 – 6.59 (m, 4H), 3.31 (s, 8H), 2.58 (s, 8H), 2.34 (s, 6H)。 ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 171.0, 153.8, 135.5, 130.6, 129.6, 126.0, 125.2, 113.0, 110.7, 102.6, 96.9, 55.2, 48.2, 45.9。



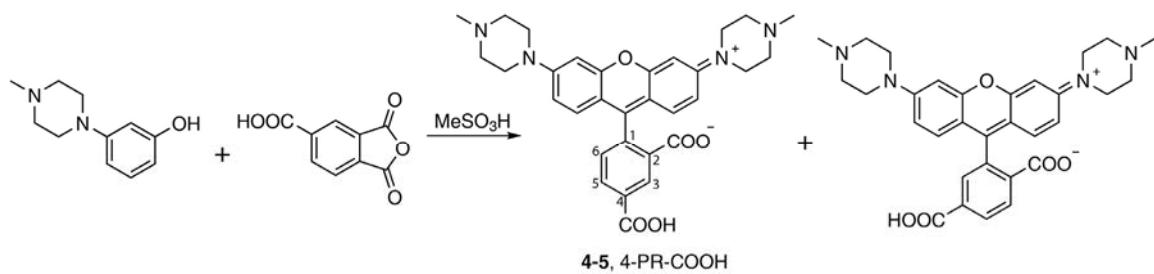
季铵化哌嗪罗丹明（MPR, **4-3**）：将 Lyso-R（6.3 mg, 0.013 mmol）溶解于 2.5 mL 乙腈，加入 4 mL 离心管中，然后逐滴加入碘甲烷（37.5 μ L, 0.17 mmol）。将离心管至于摇床上室温反应 2 d。在反应结束后，将 5 mL 乙醚加入反应液中，析出的白色固体通

过离心收集，离心转速为 3000 rpm/min，持续时间为 10 min。收集的粗产物通过甲醇和乙醚 (v/v = 1:2) 混合液体洗涤三次，并真空干燥获得 MPR (浅粉色粉末，6.1 mg，产率 61.6%)。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{32}H_{38}N_4O_3$ [M^{2+}]: 263.1467; found: 263.1462 ($z = 2$)。 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.00 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.79 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.72 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.87 (s, 2H), 6.80 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.62 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 3.61 (s, 8H), 3.53 (s, 8H), 3.18 (s, 12H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 168.69, 152.39, 151.78, 151.14, 151.11, 135.62, 130.16, 128.66, 126.09, 124.73, 123.77, 111.87, 109.40, 101.65, 82.70, 59.79, 50.28, 41.24。

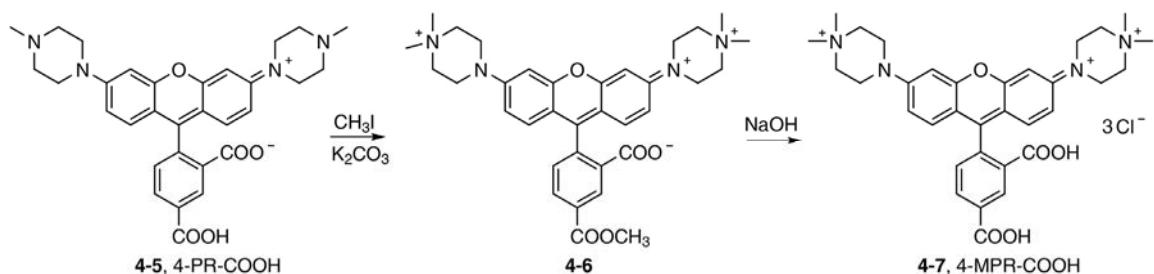


季铵化哌嗪罗丹明细胞膜探针 (Mem-R, **4-4**)：将 Lyso-R (82.3 mg, 0.17 mmol) 溶解于 9.7 mL 乙醇，加入碳酸氢钠 (174 mg, 2.1 mmol) 和 1-溴代十六烷 (1.52 mL, 5.0 mmol)。混合物搅拌回流反应 36 h。通过 TLC 监测反应进行完毕后，真空除去溶剂。粗产品使用硅胶柱层析色谱分离，流动相为二氯甲烷、甲醇、正己烷和乙酸 (v/v/v/v, 30:1:5:1)。获得的产物再进一步用制备级高效液相色谱 (设备 C) 纯化，流动相为甲醇、水和三氟乙酸的混合溶剂，梯度淋洗条件：0-4 min, 90:10:0.1 (v/v/v)；4-∞ min, 94:6:0.1 (v/v/v)。收集的产物溶液在真空中干燥后，获得 Mem-R (粉红色粉末，15 mg，产率 7.7%)。高效液相色谱分析显示产物纯度为 91.3%，采用设备 A 梯度淋洗，溶剂为甲醇和水 (包含 0.1% 乙酸和 0.1% 三乙胺) 混合体系，比例从 9:1 到 10:0 (v/v)，1 mL/min, $t_R = 8.28$ min。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{62}H_{98}N_4O_3^{2+}$ [M^{2+}]: 473.3814; found 473.3813 ($z = 2$)。 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.02 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.85 – 7.70 (m, 2H), 7.21 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 6.83 (dd, $J = 9.0, 2.2$ Hz, 2H), 6.65 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 3.76 (s, 8H), 3.56 (s, 8H), 3.48 – 3.40 (m, 4H), 3.13 (s, 6H), 1.72 (s, 4H), 1.24 (s, 52H), 0.87 – 0.82 (m, 6H)。 ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 168.65, 151.87, 151.22, 135.54, 130.12, 128.60, 126.15, 124.76, 123.82, 118.01, 115.64, 111.85, 109.49, 101.60, 62.74, 58.44, 45.72, 41.05, 31.25, 29.01, 28.98, 28.96, 28.90, 28.78, 28.66, 28.47, 25.76, 22.04, 20.89, 13.86。

4.3.3 4-MPR-COOH 的合成步骤



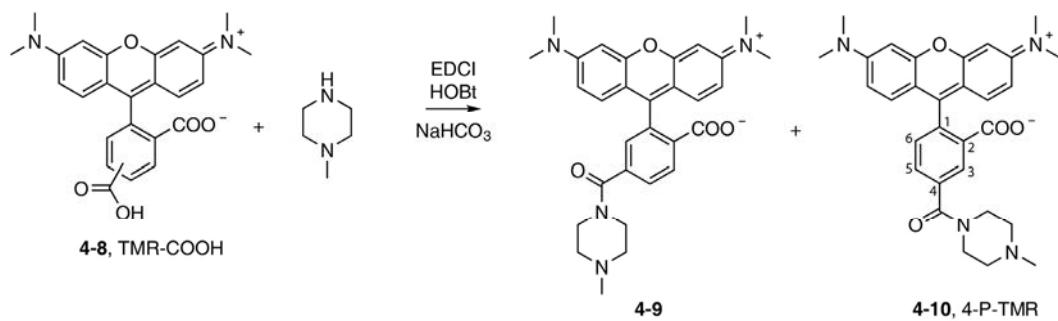
羧基衍生哌嗪罗丹明 (**4-5**, 4-PR-COOH)：将间 (N-甲基哌嗪) 苯酚 (500 mg, 2.60 mmol) 与间羧基邻苯二甲酸酐 (250 mg, 1.30 mmol) 溶解于甲基磺酸中 (2 mL)。反应混合物在 150°C 搅拌反应 12 h。反应完毕后，降至室温，将反应混合物倒入乙醚，并分离生成的紫色沉淀。粗产品使用硅胶柱层析色谱纯化，流动相为二氯甲烷、甲醇和三乙胺的混合溶液 (20:1:0.1, v/v/v)。获得的产品 (400 mg, 产率 56%) 是 4'/5' 位置异构体混合物，比例约为 3:1。单一异构体 4-PR-COOH 通过制备级高效液相色谱 (设备 C) 纯化，流动相为甲醇和水 (含有 0.1% 三氟乙酸) 混合溶液。4-PR-COOH: HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{31}H_{33}N_4O_5^+ [M^+]$: 541.2445; found 541.2428 ($z = 1$)。 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.38 (s, 1H), 8.27 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.30 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.73 (d, $J = 12.3$ Hz, 4H), 6.57 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.23 (s, 8H), 2.47 (s, 8H), 2.24 (s, 6H)。 ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 168.67, 166.92, 155.80, 153.08, 152.38, 136.50, 128.97, 127.11, 125.67, 124.59, 112.11, 108.27, 101.38, 84.05, 54.64, 47.46, 45.98。



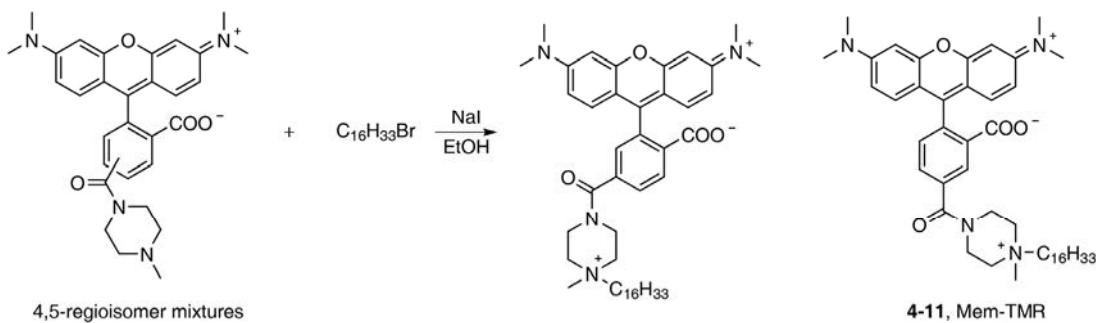
羧基衍生季铵化哌嗪罗丹明 (**4-7**, 4-MPR-COOH)：将 4-PR-COOH (100 mg, 0.18 mmol) 和碳酸钾 (512 mg, 3.70 mmol) 溶于 20 mL DMF 中，向混合溶液中滴加碘甲烷 (460 μ L, 7.40 mmol)。反应混合物在室温搅拌下反应，并使用 TLC 监测反应进程。当反应结束后，将 40 mL 乙醚加入反应混合液中，收集析出的粉色固体。粗产品用 30 mL 甲醇和 60 mL 乙醚的混合溶液清洗三次，获得产物 4-6 溶解于 4 mL 甲醇溶液，加入 5 mol/L NaOH 水解。混合物于 30°C 搅拌反应 4 h。接着，真空除去反应混合物中的溶剂，

通过制备级高效液相色谱（设备 C）纯化，流动相为 35% (v/v) 甲醇和 65% (v/v) 水（含有 0.1% 三氟乙酸）。产物的阴离子通过离子交换树脂（Sangon, A501840）置换为氯离子。纯化干燥完毕的产物 4-MPR-COOH 为粉红色粉末 (20 mg, 产率 15%)。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{33}H_{38}N_4O_5^{2+} [M^{2+}]$: 285.1416; found 285.1411 ($z = 2$)。 1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.41 (s, 1H), 8.30 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.89 (s, 2H), 6.82 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.69 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 3.63 (s, 8H), 3.54 (s, 8H), 3.20 (s, 12H)。 ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 168.27, 166.42, 151.72, 151.18, 136.16, 128.81, 126.32, 125.26, 123.64, 118.56, 116.16, 111.87, 109.03, 101.62, 82.79, 59.79, 50.25, 41.21。

4.3.4 Mem-TMR 的合成步骤

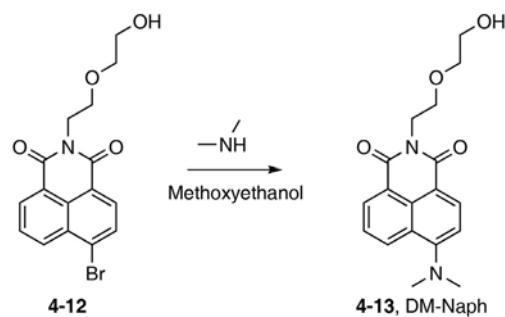


哌嗪衍生四甲基罗丹明 (**4-9**; **4-10**, 4-P-TMR)：四甲基罗丹明羧基衍生物 TMR-COOH (**4-8**) 按照文献^[36]的方法合成。将 TMR-COOH (异构体混合物, 200 mg, 0.46 mmol), 碳酸氢钠 (196 mg, 2.32 mmol), HOBT (76 mg, 0.56 mmol) 和 EDCI (107 mg, 0.56 mmol) 溶解于干燥的二氯甲烷 (4 mL) 中, 再加入 N-甲基哌嗪 (93 μ L, 83 mmol)。将反应混合物于室温条件下搅拌反应 12 h。待反应结束后, 使用饱和食盐水洗涤反应混合液, 无水硫酸钠干燥, 真空除去溶剂。获得的粗产品使用硅胶柱层析色谱纯化, 流动相为二氯甲烷、甲醇和三乙胺 (100/1/1, v/v/v)。获得的产品为 4'/5'-位置异构体混合物(**4-9** 和 **4-10**)。单一异构体 **4-P-TMR** 可通过制备级高效液相色谱 (设备 C) 纯化, 流动相为水 (0.1% 三氟乙酸) 和甲醇 (41:59, v/v) 的混合溶剂。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{30}H_{33}N_4O_4^+ [M^+]$: 513.2496; found 513.2500 ($z = 1$)。 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.70 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.92 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.18 – 7.05 (m, 4H), 6.99 – 6.95 (m, 2H), 4.60 (s, 1H), 3.43 (s, 20H), 2.80 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 167.70, 165.67, 156.83, 156.71, 136.70, 131.41, 130.83, 130.78, 130.52, 129.39, 114.54, 112.86, 96.20, 51.79, 41.97, 40.51。



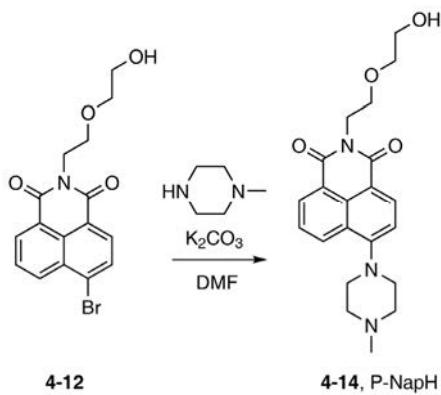
四甲基罗丹明膜探针（**4-11**, Mem-TMR）：取上一步获得的异构体混合物（**4-9** 和 **4-10**, 30 mg, 0.06 mmol) , NaI (26 mg, 0.17 mmol) 溶解于干燥的乙醇 (3.45 mL) 中。当异构体完全溶解后, 向混合液中加入溴代十六烷 (45 μ L, 0.15 mmol)。将反应混合物加热至回流, 搅拌反应 36 h。通过 TLC 确定反应终点后, 减压除去溶剂。粗产品使用硅胶柱层析色谱纯化, 流动相为二氯甲烷、甲醇和冰乙酸 (60/1/3, v/v/v) 的混合溶剂。异构体混合物通过制备级高效液相色谱 (设备 C) 分离, 流动相为甲醇、水和三氟乙酸 (85:15:0.1, v/v/v) 的混合溶剂。产品 Mem-TMR 是深红色油状液体 (~5 mg, 产率 ~9%)。HPLC(设备 B) 鉴定纯度大于 99%, 鉴定流动相为甲醇、水和三氟乙酸 (83:17:0.1, v/v/v) 的混合溶剂, 0.8 mL/min, t_R = 10.9 min。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{46}H_{65}N_4O_4^+$ [M^+]: 737.5006; found 737.4999 ($z = 1$)。 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.20 (s, 1H), 7.91 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.20 – 7.04 (m, 4H), 7.00 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H), 3.88 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.34 (s, 8H), 3.28 (s, 12H), 2.77 (s, 3H), 1.29 – 0.82 (m, 31H)。

4.3.5 季铵化哌嗪取代萘酰亚胺及其二甲氨基对比物的合成步骤

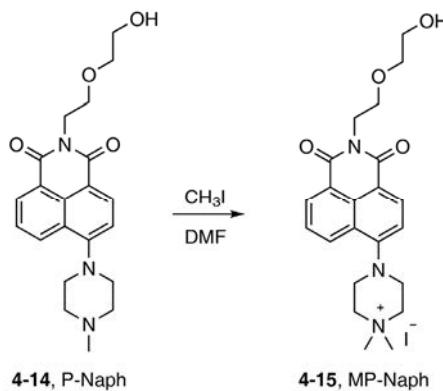


二甲氨基萘酰亚胺（**4-13**, DM-Naph）：中间体 **4-12** 按照文献^[188]的方法合成。将中间体 **4-12** (200 mg, 0.55 mmol) 溶解于 6.5 mL 的乙二醇甲醚中, 并加入 33%二甲胺溶

液 (3.75 g, 27.46 mmol)。将反应混合物置于 40℃下搅拌反应 1 h, 然后升温至 90℃继续反应。当 TLC 监测反应到终点后, 减压除去溶剂, 获得深红色油状产品。粗产品使用硅胶柱层析色谱纯化, 流动相为二氯甲烷。产物 DM-Naph 为亮黄色固体 (88 mg, 产率 48.8%)。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{18}H_{21}N_2O_4^+ [M+H]^+$: 329.1496; found: 329.1489 ($z = 1$)。 1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.50 – 8.45 (m, 1H), 8.43 (dd, $J = 7.3, 0.9$ Hz, 1H), 8.30 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.73 (dd, $J = 8.4, 7.4$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.59 – 4.52 (m, 1H), 4.21 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.63 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.46 (d, $J = 2.7$ Hz, 4H), 3.08 (s, 6H)。 ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 163.61, 162.92, 156.54, 132.27, 131.53, 130.55, 129.58, 124.92, 124.12, 122.16, 113.10, 112.90, 72.06, 66.96, 60.15, 44.33, 38.47。

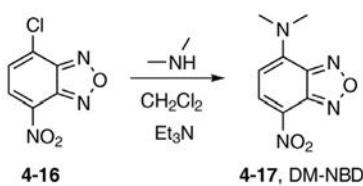


哌嗪萘酰亚胺 (4-14, P-Naph) : 在惰性气体氛围下, 将中间体 4-12 (500 mg, 1.37 mmol) 于干燥的碳酸钾 (296 mg, 2.14 mmol) 共同加入到 schlenk 反应瓶中, 加入干燥的 DMF 作为溶剂。待中间体溶解后, 在惰性气体氛围下加入 N-甲基哌嗪 (1.58 mL, 13.73 mmol)。将反应混合物加热至 60°C, 搅拌反应 1 h, 接着再加热至 80°C, 再搅拌反应 1 h。利用二氯甲烷萃取混合物中的产物, 收集有机相, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸镁干燥, 减压除去溶剂。粗产品使用硅胶柱层析色谱纯化, 采用梯度流动相: 二氯甲烷, 二氯甲烷和甲醇 (30:1, v/v) 混合溶剂。产品 P-Naph 为黄色固体 (156 mg, 产率 29.6%)。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{21}H_{26}N_3O_4^+ [M+H]^+$: 384.1918; found: 384.1913 ($z = 1$)。 1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.45 (dd, $J = 7.2, 0.8$ Hz, 1H), 8.43 – 8.39 (m, 1H), 8.37 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.79 (dd, $J = 8.3, 7.4$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 4.55 (s, 1H), 4.22 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.64 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.46 (d, $J = 2.4$ Hz, 4H), 3.23 (s, 4H), 2.64 (s, 4H), 2.31 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 163.54, 162.99, 155.66, 132.20, 130.64, 130.52, 129.10, 125.95, 125.23, 122.44, 115.33, 115.01, 72.06, 66.93, 60.14, 54.58, 52.46, 45.68, 38.55。



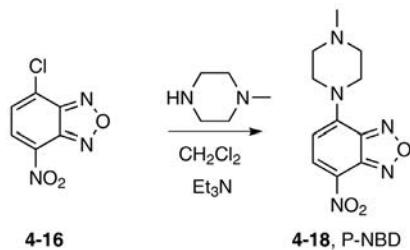
季铵化哌嗪酰亚胺 (4-15, MP-Naph) : 将 P-Naph (30 mg, 0.078 mmol) 溶解于 1.45 mL DMF 中, 加入碘甲烷 (98 μ L, 1.78 mmol)。将反应混合物加入至 30°C, 搅拌反应 6 h。待反应完毕后, 离心收集生成的固体析出物, 离心转速为 6000 rpm/min, 时间为 5 min。用二氯甲烷洗涤析出沉淀三次, 粗产品通过丙酮 (含有 10% 水) 重结晶, 产品 MP-Naph 为黄色固体 (11.8 mg, 产率 28.7%)。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{22}H_{28}N_3O_4^+$ [M] $^+$: 398.2074; found: 398.2075 ($z = 1$)。 1 H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.51 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 8.48 – 8.44 (m, 1H), 7.86 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.56 (s, 1H), 4.22 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.78 (s, 4H), 3.65 – 3.57 (m, 6H), 3.46 (s, 4H), 3.34 (s, 6H); 13 C NMR (126 MHz, DMSO) δ 163.48, 162.97, 153.69, 131.92, 130.85, 130.38, 128.95, 126.51, 125.37, 122.57, 116.83, 116.35, 72.06, 66.91, 60.79, 60.14, 46.04, 38.66.

4.3.6 季铵化哌嗪取代硝基苯并二噁唑及其二甲氨基对比物的合成步骤

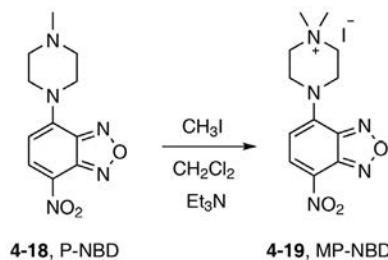


二甲氨基 NBD (4-17, DM-NBD)：将商品化中间体 4-16 (200 mg, 1.00 mmol) 溶解于 9.6 mL 二氯甲烷中，依次加入三乙胺 (208 μ L, 1.50 mmol) 和 33% 二甲胺水溶液 (205 mg, 1.5 mmol)。反应混合物于室温搅拌反应 1.5 h。在反应完成后，加入正己烷，离心收集析出的沉淀，离心转速为 4000 rpm/min，离心时间为 5 min。粗产品通过硅胶柱层析色谱纯化，流动相为二氯甲烷。真空除去溶剂并干燥后获得产品，产品为橙色固体 (110 mg, 产率 52.7%)。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_8H_9N_4O_3^+ [M+H]^+$: 209.0669; found:

209.0666 ($z = 1$). ^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.46 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 6.36 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 3.60 (s, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 146.58, 144.83, 144.75, 136.14, 119.69, 102.14, 54.87.



哌嗪 NBD (4-18, P-NBD) : 将中间体 4-16 (500 mg, 2.51 mmol) 溶解于 24 mL 二氯甲烷中, 依次加入三乙胺(522 μ L, 3.76 mmol)和 N-甲基哌嗪(420 μ L, 3.76 mmol)。反应混合物于室温搅拌反应 1.5 h。在反应完成后, 加入正己烷, 离心收集析出的沉淀, 离心转速为 4000 rpm/min, 离心时间为 20 min。粗产品通过硅胶柱层析色谱纯化, 流动相为二氯甲烷和甲醇 (30:1, v/v) 混合溶液。真空除去溶剂并干燥后获得产品, 产品为深红色固体 (190 mg, 产率 28.8%)。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{11}H_{14}N_5O_3^+ [M+H]^+$: 264.1091; found: 264.1085 ($z = 1$)。 1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.45 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 6.66 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 4.12 (s, 4H), 2.58 – 2.54 (m, 4H), 2.25 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 145.28, 144.79, 144.73, 136.22, 121.09, 103.55, 54.15, 49.20, 45.20。



季铵化哌嗪 NBD (4-19, MP-NBD) : 将 P-NBD (50 mg, 0.19 mmol) 溶解于 1.18 mL DMF 中, 加入碘甲烷 (236 μ L, 3.80 mmol)。反应混合物于 30°C 搅拌反应 2 h。在反应结束后, 加入乙醚, 3000 rpm/min 离心收集析出沉淀。粗产品用乙醚洗涤一次, 二氯甲烷洗涤三次, 真空干燥。最终产品 MP-NBD 为红褐色固体 (58 mg, 产率 75.4%)。HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{12}H_{16}N_5O_3^+$ [M]⁺: 278.1248; found: 278.1240 ($z = 1$)。¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.61 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 4.51 – 4.41 (m, 4H),

3.76 – 3.68 (m, 4H), 3.29 (s, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 144.76, 144.61, 144.52, 136.14, 123.27, 105.10, 59.69, 50.92, 43.14.

4.4 实验方法

4.4.1 季铵化哌嗪染料及其二甲氨类似物的光谱研究

染料通常预先配制成 1 mM 的 DMSO 溶液，而光谱测试的样品通过在预设的溶剂内稀释上述溶液获得。对于绝大多数本章的光谱研究，样品的浓度为 0.5 μM ，减少重吸收等荧光分子之间的互相干扰过程的影响。所有的测量都在 1 cm 光程的比色皿中完成。紫外可见吸收光谱和荧光光谱的测试仪器与 3.4.1 节描述的仪器相同(精确度为 $\pm 1 \text{ nm}$)。荧光寿命的测量设备是 DeltaFlex 时间分辨单分子计数系统 (time correlated single photon count system, TCSPC system)，装配有脉冲 NanoLED-455 光源。

MPR 和 MP-NBD 在超纯水 (MilliQ water) 以及 HP-Naph 在 $\text{pH}=4.0$ 水溶液中的荧光量子产率的测量设备是绝对荧光量子产率仪 (Hamamatsu C11347)。其余染料的荧光量子产率测量结果为相对值，其参比为上述已获得绝对荧光量子产率的三种染料及在乙醇中的罗丹明 B(酸性形式，0.49)^[189]。通过文献^[190]推倒的相对荧光量子产率计算方程如下：

$$\Phi_s = \Phi_{st} \times \frac{A_{st}}{A_s} \times \frac{I_s}{I_{st}} \times \frac{n_s^2}{n_{st}^2} \quad (4.1)$$

Φ_s 和 Φ_{st} 分别为样品和参比的荧光量子产率。 A_{st} 和 A_s 为在激发波长处参比及样品的吸收值。 I_s 和 I_{st} 为样品及参比在被激发后的荧光光谱积分面积。 n_s 和 n_{st} 为样品和参比溶剂的折光率。

在光谱实验中，PBS 是磷酸缓冲液 (10 mM, $\text{pH} 7.4$)，水为超纯水 ($\text{pH} \approx 7$)。通过盐酸和氢氧化钠水溶液调节相关溶液的 pH 到 4.0 或者 12.0。

非辐射跃迁速率通过下面的方程组计算：

$$k_r = \frac{\Phi}{\tau} \quad (4.2)$$

$$k_{nr} = \frac{1}{\tau} - k_r \quad (4.3)$$

其中， k_r 是染料的辐射跃迁速率； Φ 是染料的荧光量子产率； τ 是染料的荧光量子产率； k_{nr} 是染料的非辐射跃迁速率。

4.4.2 成像显微镜的类型

单分子与超分辨成像均通过 3.4.2 节描述的全内反射倒置荧光显微镜完成。共聚焦成像及共定位分析的显微镜为 Olympus FV1000 共聚焦显微镜（3.4.6 节描述显微镜）或者 Olympus FV1000MPE 共聚焦显微镜（工作于单光子模式）。当使用 FV1000MPE 显微镜时，工作的物镜为 UPLASAPO 60x 油镜。

4.4.3 MPR 和 TMR 的抗体标记方法

4-MPR-COOH 通过两步反应标记到抗体蛋白分子上：1) 通过 N-羟基琥珀酰亚胺活化羧基；2) 连接抗体蛋白的 α -氨基。下文介绍一例典型的标记实验流程。

将 4-MPR-COOH 的 DMSO 溶液（2.5 μ L, 20 mg/mL）与 NHS（1.2 e.q.）及二异丙基乙基胺（1.2 e.q.）混合，加入 EDCI（1.2 e.q.）。将装有反应混合物的离心管置于摇床（ZHY-100H, ZHICHENG）摇晃反应 1 h。同时，将 0.1 mg 山羊源抗兔抗体（Solarbio or Bioss）溶解于 40 μ L PBS 中，加入 5 μ L 0.9 M 碳酸氢钠水溶液，将其 pH 值调节至 8.0-8.5。按照设定的蛋白和染料的反应比例，计算好需要转移的染料反应液的体积。在酯缩合反应完毕后，按照预先算好的比例将活性酯反应液加入到蛋白溶液中。蛋白标记也是在相同的摇床上进行，室温反应 1 h。不稳定的标记通过 1.5 M 盐酸羟胺水溶液（pH = 8.0, 10 μ L）猝灭，猝灭反应在室温下进行 0.5 h。多余为标记的染料通过装有 Sephadex G25 树脂的离心式蛋白纯化柱纯化，纯化进行多次直至样品测量的染料蛋白比不再变化。

单分子分析实验和超分辨成像实验需要使用不同标记比例的抗体^{[35],[40]}。单分子实验需要标记比例较低的抗体，减少不同分子信号重叠的可能；超分辨成像实验需要高标记密度的抗体，提升最终重构的完整性。

在单分子分析实验中（图 4.10、4.11 和 4.12 及表 4.5）使用的 MPR-IgG 的染料蛋白比为 0.33，图 4.17 的微管免疫标记也使用了该标记比的抗体；剩余所有的超分辨成像实验（图 4.14、4.15 和 4.16）使用的 MPR-IgG 的染料蛋白比为 2.1。

对比四甲基罗丹明标记的二抗的标记使用了商品化的 5-羧基四甲基罗丹明 N--羟基琥珀酰亚胺酯（s42973, yuanye），按照标准的标记方法标记。在单分子分析实验中（图 4.10、4.11 和 4.12 及表 4.5）使用的 TMR-IgG 的染料蛋白比为 0.31，图 4.17 的微管免疫标记也使用了该标记比的抗体；剩余所有的超分辨成像实验（图 4.14、4.15 和 4.16）使用的 MPR-IgG 的染料蛋白比为 3.0。

4.4.4 MPR-IgG 和 TMR-IgG 的单分子实验

标记有荧光团的抗体分子在 PBS 中稀释，并吸附到预先清洁（按照 3.4.3 节描述方法清洁）过的盖玻片（Fisherbrand, 12-545-102）上。未吸附的抗体分子通过三次 PBS 洗

涤除去。成像时的单分子信号密度为 $0.03\text{-}0.11\text{ }\mu\text{m}^{-2}$ ，避免了不同单分子信号之间的重叠。单分子成像时使用了两种成像缓冲液体系：(A) 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH=7.4)，不含有其它成像增强剂；(B) 成像液体系，TN 缓冲液 (50 mM 三羟甲基氨基甲烷 (tris), pH 8.0; 10 mM NaCl) 含有 200 mM 疏基乙胺 (MEA)。单分子成像采用 3.4.2 节描述的全内反射倒置荧光显微镜。单分子成像帧收集频率为 100 Hz，在每种缓冲液体系中，每个样品在每种 532 nm 激光照明条件 (100, 200, 500, 1000 和 2000 W/cm²) 下成像三次。

获得的单分子成像数据采用第 2 章开发的软件进行后处理分析；统计按照第 2 章的分子采样方式完成。

4.4.5 HeLa 细胞培养及 LAMP1-mGFP 质粒转染

HeLa 细胞按照 3.4.5 节描述的方法培养。LAMP1-mGFP 质粒由 Esteban Dell'Angelica^[191]贡献 (Addgene plasmid 34831)。溶酶体共定位实验中 (图 4.23)，HeLa 细胞按照标准方法通过 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 脂质体瞬时转染 LAMP1-mGFP 质粒。

4.4.6 溶酶体共定位分析及细胞膜共聚焦成像的染色方法

HeLa 细胞预先转移到玻璃底细胞培养皿 (Cellvis, D29-20-1.5-N) 培养 1-2 天，染色前细胞的汇合度达到 70-90%。成像前使用含有 0.2 μM Lyso-R、5 μM Mem-R (0.5% DMSO) 或者 10 μM Mem-TMR (0.5% DMSO) 的培养基对 HeLa 细胞染色 5 min。对于细胞膜成像，多余的未标记染料通过 PBS 洗涤三次除去。成像采用的培养基为含有 10% 胎牛血清的 DMEM。

4.4.7 季铵化哌嗪染料及其对比标识物超分辨成像的染色方法

在超分辨成像实验中，HeLa 或者 MCF-7 细胞预先转移到预清洁的盖玻片上培养 1-2 天，在染色前细胞的汇合度达到 70-90%。

(1) 微管免疫荧光标记

HeLa 细胞按照文献给出的方法进行固定及免疫标记^{[160],[192]}。具体方法如下：

固定：首先使用补充有 4 mM EGTA 的 BRB 缓冲液 (0.25% Triton X-100, 80 mM PIPES, pH = 6.8, 1 mM MgCl₂ and 1 mM EGTA) 处理 HeLa 细胞 10 s，螯合清除细胞内的钙离子。待处理完毕后，迅速加入含有 0.5% 的戊二醛 BRB 缓冲液在室温下固定细胞 10 min。固定过程产生的背景噪音荧光信号通过新鲜配置的 0.1% 硼氢化钠 (PBS) 猥灭，处理时间为 7 min。在进行免疫标记前，剩余的固定液通过一次 PBS 洗涤除去。

免疫染色: 将一抗 (rabbit polyclonal antibody against α -tubulin, Beyotime, AF001) 在 30% NGS 中以 1:100 (v/v) 体积比稀释后对 HeLa 细胞微管进行标记, 在 4℃下标记 12 h。未标记的一抗蛋白通过三次 PBST (含有 0.1% Tween-20 的 PBS 缓冲液) 洗涤除去。采用 4.4.3 节中荧光染料标记的抗体作为二抗, 对一抗饱和标记, 标记浓度为~20 mg/L, 在 4℃下标记 2 h。未标记的二抗通过三次 PBST 洗涤除去。成像液为含有 200 mM 疏基乙胺的 TN 缓冲液 (50 mM Tris, pH 8.0, 10 mM NaCl)。

(2) 活细胞细胞膜和溶酶体标记

细胞膜: 成像前使用含有 20 μ M Mem-R 的培养基 (含有 5% DMSO) 对 HeLa 细胞染色 5 min。未标记上的游离染料通过三次 PBS 洗涤除去。成像液是普通的细胞培养基, 并且不包含任何成像添加剂, 例如, 不含有酚红的 RPMI 1640 (10%FBS)。

溶酶体: 成像前使用含有 0.5 μ M Lyso-R 的培养基 (含有 0.05% DMSO) 对 HeLa 细胞染色 5 min。染色完毕后, 直接替换普通细胞培养基进行成像观察, 不额外添加任何成像添加剂。

亚细胞器成像比较实验: 对于图 4.20 的实验, 成像前使用含有 1 μ M Mem-R (0.5% DMSO) 或者 1 μ M Mem-TMR (0.5% DMSO) 的培养基对 HeLa 细胞染色 5 min。在染色完毕后, 将多余染料通过 PBS 洗涤三次除去。在成像前, 细胞培养基替换为新鲜配置的含有 10% FBS 的普通细胞培养基, 不添加任何成像添加剂。

对于图 4.25 的比较实验, 成像前使用含有 0.5 μ M Lyso-RH (0.05% DMSO)、0.5 μ M LysoTracker Red (0.05% DMSO) 的培养基对 HeLa 细胞染色 5 min。成像时, 替换新鲜不含有酚红的 RPMI 1640 (10%FBS) 培养基, 不添加任何成像添加剂。

4.4.8 溶酶体共定位分析及细胞膜共聚焦荧光成像

在细胞膜成像实验中, 分别使用 515 nm 和 559 nm 激光激发 Mem-R 和 Mem-TMR。在溶酶体共定位成像实验中, 使用 488 nm 和 559 nm 激光激发 mGFP 和 Lyso-RH, 两束激光在序列模式下工作, 减少两种荧光染料光谱重叠对共定位带来的干扰。在共定位实验中, 收集到的荧光信号通过 SDM 560 二向色镜拆分成双通道长短波长的荧光信号。检测器收集荧光信号波长最后通过电流控制衍射光栅控制, 设定 mGFP 接收波长范围为 500-530 nm, Mem-R 接收波长范围为 530-590 nm, Lyso-RH 接收波长范围为 570-600 nm, Mem-TMR 接收波长范围为 565-640 nm。共定位实验的相关分析通过 Olympus 显微镜供应商提供的软件完成。

4.4.9 季铵化呲嗪染料及其对比标识物的超分辨成像

(1) 微管超分辨成像

在成像前，在弱的 532 nm 激光照明条件 ($< 1 \text{ W/cm}^2$) 下拍摄传统宽场荧光成像图。超分辨成像使用 2 kW/cm^2 532 nm 激光照明，激光的模式为倾斜照明模式^{[161],[162]}。将绝大多数荧光团分子转换到暗态后，于 50 Hz 频率记录样品的单分子闪烁信号，总计收集 15000 帧 (图 4.14) 或 20000 帧 (图 4.15、4.16 和 4.17) 数据。对比实验 (图 4.16) 中，每种染料的成像在五个不同的细胞上进行，减少细胞之间的差异性给染料对比带来的干扰。

(2) 活细胞细胞膜和溶酶体成像

细胞膜：在全内反射照明模式下，以弱 532 nm 激光 ($< 1 \text{ W/cm}^2$) 激发收集传统荧光成像图。收集完毕后，将激光器激发功率提升至 $\sim 2 \text{ kW/cm}^2$ ，并以 50 Hz 频率收集 ~ 15000 帧图像数据。

溶酶体：在倾斜照明模式下，以弱 532 nm 激光 ($< 1 \text{ W/cm}^2$) 激发获得传统荧光成像图。将激发光功率提升至 $\sim 2 \text{ kW/cm}^2$ ，并在短时间内 ($< 10 \text{ s}$) 大部分荧光团转换至暗态后，以 100 Hz 频率收集 10000 帧图像数据。将前 1000 帧数据用来重构 (图 4.24b) 的溶酶体结构信息。

亚细胞器成像比较实验：在 532 nm 激光 ($\sim 2 \text{ kW/cm}^2$) 照明激发条件下，以 100 Hz 频率收集 10000 帧图像数据。对于细胞膜比较实验，激光工作于全内反射照明模式；对于溶酶体比较实验，激光工作于倾斜照明模式。对于 Mem-R 与 Mem-TMR 及 Lysotracker Red 比较实验，每种染料收集 10 组成像数据。

4.4.10 季铵化哌嗪染料及其对比标识物超分辨成像的数据分析

超分辨成像数据分析通过 ImageJ 软件^[158]的 ThunderStorm 插件^[140]或者自编写的 Matlab 代码完成 (按照 ThunderStorm 的方法开发)。通过对成像图像进行高斯滤镜差值或者小波变换分析 (级别: 3, 尺度: 2)，完成样品的单分子信号的候选分析。针对每个单分子信号的 PSF，以二维高斯函数的积分形式作为数学模型，通过最小二乘法、权重最小二乘法^{[143],[163]}或者最大似然方法拟合获得定位数据。对于微管成像，定位数据中连续重复出现的定位信息进一步合并处理。在部分成像中，获得的定位数据通过一个合适的定位密度滤镜 (2-5 定位/50 nm) 过滤^[164]，除去背景噪音干扰。定位数据中估算定位精度通过 Thompson 方程 1.1 完成。定位数据中将不在焦面的数据过滤，将宽度过大 ($> 1.3 \times \text{median}(\sigma)$) 以及过小 ($< 0.7 \times \text{median}(\sigma)$) 的数据排除。傅立叶环相关分析 (Fourier ring correlation (FRC) analysis) 是通过文献^[165]提供的 Matlab 代码完成的。

为了分析图 4.24k 成像过程中荧光团分子存活率，该成像定位数据被分割成 10 组横跨 10 s 时间的定位数据。统计每组定位数据的个数，以第一组数据的统计值作为基准

归一化。图 4.24k 展示了获得数据的趋势线，表明了超分辨成像过程中存活单分子信号的衰减过程。

图 4.15、4.17 和 4.20 中的定位密度地图的分析软件是自编写的 Matlab 软件。密度地图中每个位置的定位密度是以 100 nm 尺寸的圆统计定位方式计算获得。对于每个超分辨成像结果，其结构上的定位密度定义为微管区域或者细胞膜边缘区域（从对应的宽场荧光成像定义）定位密度平均值。在图 4.17a 和 4.21 的箱图展示了每种染料来源于 $n \geq 5$ 成像结果的结构定位密度的统计分布。

在图 4.25 和 4.16 中报道的单分子亮度和定位精度统计数据来源于 $n \geq 5$ 成像结果，以减少不同细胞间差异带来的干扰。例如，图 4.25 的每组成像结果中，Lyso-RH 一致性发出比 LysoTracker Red 更多的光子；为了减少干扰，将每个染料的所有结果一起统计分析给出图 4.25 的结果，即 Lyso-RH 的平均单分子亮度为 650 个光子而 LysoTracker Red 的值为 449 个光子。作为对照，图 4.24h 的数据是由相对应的单次成像结果统计获得。

单分子追踪分析通过 U-Tracker^[193]软件完成。对于单个分子追踪的上限距离为 3 个像素点，对应于 480 nm。后续的数据处理以及图像给出分析是在自编写 Matlab 软件上完成的。为了计算扩散系数，对所有持续时间超过 10 帧的单分子轨迹计算每个时刻的均方位移（square displacement），按照单分子追踪实验的传统标准^{[3],[194],[195]}，对前四个时间间隔的数据进行线性拟合（MSD ($0 < \Delta\tau < 80 \text{ ms}$)）。为了简化最终的结果，持续时间为 10-20 帧的单分子轨迹展示在图 4.19f 中。

4.5 结果与讨论

4.5.1 呲嗪取代染料的 pK_a 测量

图 4.4 展示了对季铵化哌嗪罗丹明的质子化平衡过程的研究结果。因为罗丹明两边取代的哌嗪基团是对称的，因此它们的质子化过程并不能够被区分^{[196],[197]}，在滴定过程中仅对应于一个转换过程。因为有两个可质子化的位点参与质子化过程，这个转换过程使用 Hill 方程完成拟合^{[198],[199]}。Lyso-R 和 4-PR-COOH 展示了相近的质子化平衡过程，它们的 $pK_{1/2}$ 分别为 6.56 和 6.59。同时，Lyso-R 和 4-PR-COOH 的可见光吸收峰在滴定过程中出现了蓝移，证实了季铵化的哌嗪的供电子性将会下降。

图 4.5 展示了对 P-Naph 和 P-NBD 的质子化过程 pK_a 的测量。P-Naph 和 P-NBD 的 pK_a 分别为 7.77 和 6.70，两种染料在质子化后均展现出良好的荧光增强。

所有的哌嗪取代染料都可以在 $\text{pH}=4.0$ 的水溶液中几乎完全质子化，转换为对应的质子季铵哌嗪染料（Lyso-RH、4-HPR-COOH、HP-Naph 和 HP-NBD）。

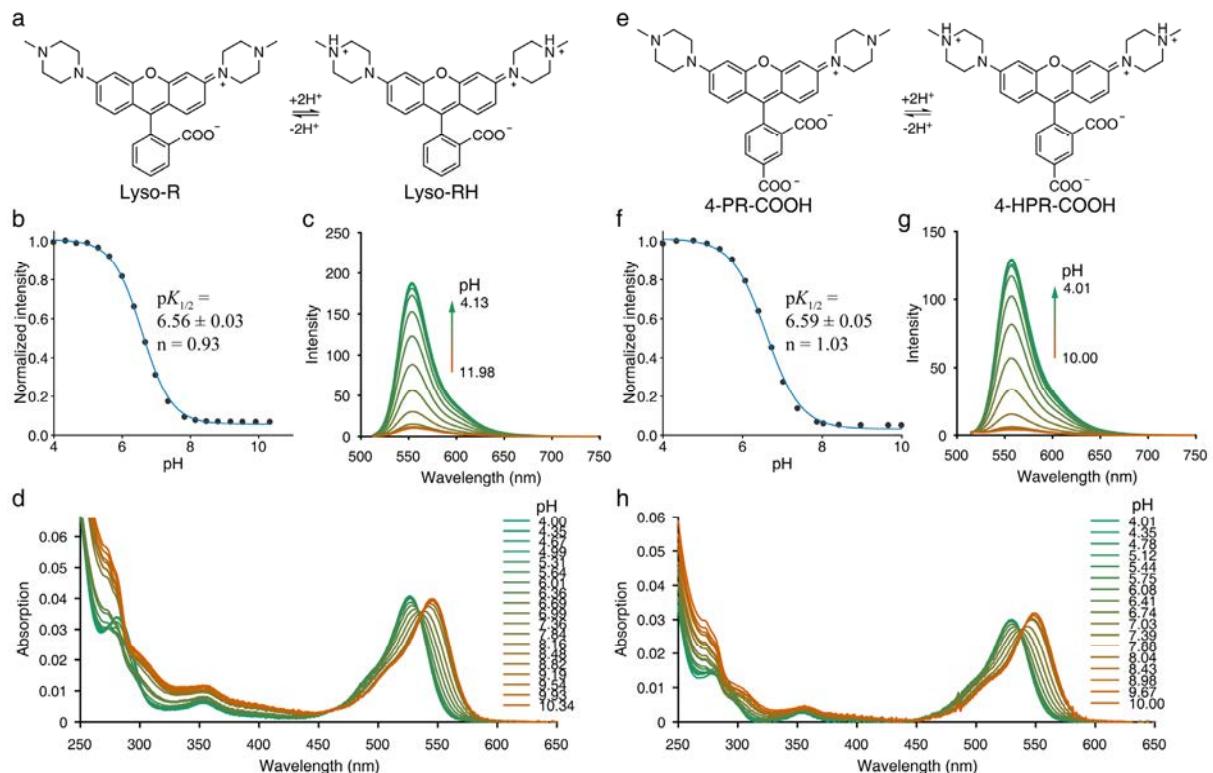


图 4.4 味嗪罗丹明 (Lyso-RH, 左侧, a-d; 4-PR-COOH, 右侧, e-h) 在 PBS 中的质子化过程的 $pK_{1/2}$ 测量。光谱测定样品浓度为 $0.5 \mu\text{M}$ 。 (a 和 e) 展示了质子化过程的结构变化示意图。随 pH 变化的荧光强度及荧光光谱分别展示在 (b 和 f) 以及 (c 和 g)。蓝色线标示了 Hill 方程对荧光强度信号的拟合结果。 (d 和 h) 展示了随 pH 变化的吸收光谱。

Figure 4.4 Protonation $pK_{1/2}$ measurements for piperazine rhodamines, Lyso-RH (left panel, a-d) and 4-PR-COOH (right panel, e-h) in PBS. Spectra were recorded at a concentration of $0.5 \mu\text{M}$. Schematic illustrations of protonation processes are presented in (a) and (e). The normalized fluorescence (b and f) and the corresponding fluorescent spectra (c and g) as a function of pH. The blue line shows the fit acquired from the Hill equation^{[198],[199]}. The absorption spectra (d and h) as a function of pH.

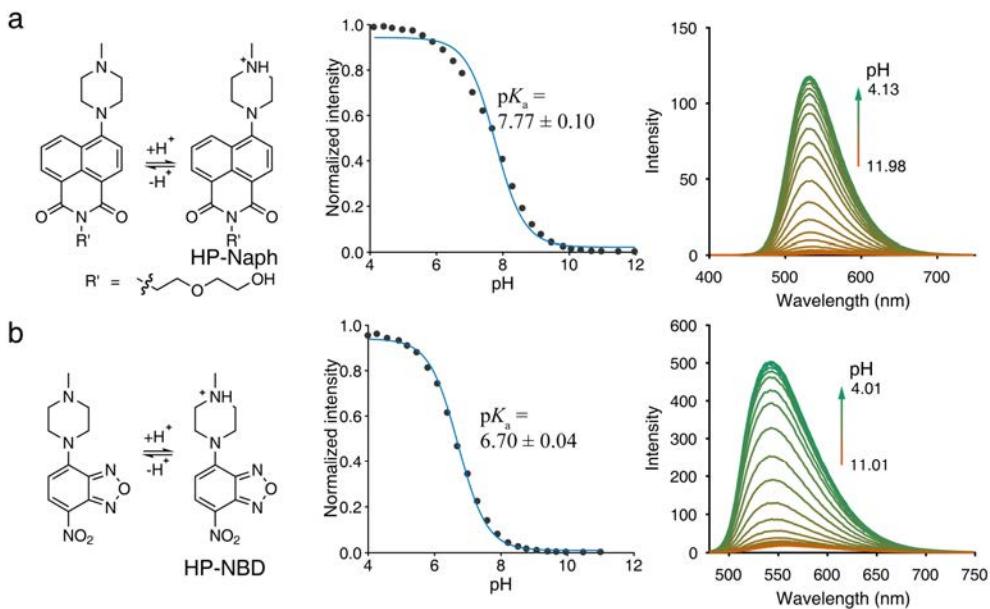


图 4.5 HP-Naph (a) 和 HP-NBD (b) 在 PBS 中的质子化 pK_a 测量。每组图的左侧展示了质子化过程的结构变化示意图。中间列图展示了随溶剂 pH 变化的归一化荧光强度。蓝色线展示了对相关强度使用 Henderson-Hasselbalch 方程拟合的结果。右侧图展示了随 pH 变化的荧光光谱。

Figure 4.5 Protonation pK_a measurements for (a) HP-Naph and (b) HP-NBD in PBS. Left column shows the schematic illustration of the protonation process of HP-Naph and HP-NBD. Middle column plots the normalized fluorescence as a function of the pH of the solvent. The blue line shows the fit acquired from Henderson-Hasselbalch equation. Right column shows the corresponding fluorescent spectra upon a series of pH.

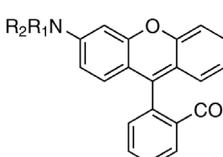
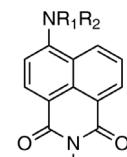
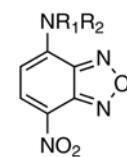
4.5.2 季铵化哌嗪取代染料与二甲氨基类似物的光谱测量及亮度比较

新加坡科技大学刘晓刚教授课题组对季铵化哌嗪取代的罗丹明及二甲氨基罗丹明进行了理论计算。根据计算结果，季铵化哌嗪取代基显示出较高离子化能 (vertical ionization energy)，因此其供电子能力较通常的氨基取代基更弱；并且季铵化哌嗪取代染料比传统二甲氨基取代染料更难以进入 TICT 状态。理论计算结果显示季铵化哌嗪取代染料可能具有更高的亮度。

与理论计算结果预期一致，光谱研究结果显示采用季铵化哌嗪策略的染料在水中的亮度比其二甲氨基取代对比物的亮度更高。表 4.1 列出了在本章中研究的季铵化哌嗪策略母体染料及其对比化合物二甲氨基取代染料在水中光谱性质。

表 4.1 季铵化哌嗪取代染料在水中的光谱性质

Table 4.1 Spectroscopic properties of quaternary piperazine substituted fluorophores in aqueous solution.

荧光团	NR ₂	染料	λ _{Ab} (nm)	λ _{Em} (nm)	Φ	ε (× 10 ⁴ M ⁻¹ cm ⁻¹)
		TMR	548	571	0.47	7.8 ^a
		MPR	524	552	0.93	8.7
		Lyso-RH ^b	526	557	0.92	8.7
		DM-Naph	441	554	0.009	0.98
		MP-Naph	388	528	0.71	0.96
		HP-Naph ^b	387	531	0.65	1.0
		DM-NBD	499	558	0.010 (0.017) ^c	3.6
		MP-NBD	469	539	0.087 (0.35) ^c	2.1
		HP-NDBd	472	543	0.086	2.1

a 引用自文献[41]; b 在 pH = 4 的水中测量; c 在 DMSO 中测量。

表 4.2 其它季铵化哌嗪罗丹明和 Mem-TMR 的光物理性质。

Table 4.2 Photophysical properties of other quaternary piperazine rhodamines and Mem-TMR in water

Dye	λ _{Ab} (nm)	λ _{Em} (nm)	Φ	ε (× 10 ⁴ M ⁻¹ cm ⁻¹)
Lyso-R ^a	546	571	0.032	7.5
4-MPR-COOH ^b	526	555	0.96	7.8
4-HPR-COOH ^c	529	556	~1	8.0
4-PR-COOH ^a	548	574	0.028	7.2
Mem-R ^b	527 (524) ^d	552 (545) ^d	0.64 (0.90) ^d	1.9 (8.6) ^d
Mem-TMR ^b	560	585	0.21	2.0

a 在 pH = 12.0 水溶液中测量;

b 在超纯水 (MilliQ water, pH ≈ 7) 溶液中测量;

c 在 pH = 4.0 水溶液中测量;

d 在括号内的数据是染料的二氯甲烷溶液 (含有 10% 三氟乙酸) 的测量结果。

在以罗丹明为荧光团的染料中，相比于传统的四甲基罗丹明 TMR ($\Phi = 0.47$; $\epsilon = 7.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)，MPR 展现了显著提升的荧光量子产率 ($\Phi = 0.93$) 和提高的摩尔消光系数 ($\epsilon = 8.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)；质子化季铵化的 Lyso-RH 也展现了相似的亮度提升 ($\Phi = 0.92$, $\epsilon = 8.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。另一方面，与理论计算预期的季铵化哌嗪取代基削弱的供电子能力相符，相比于 TMR, MPR 和 Lyso-RH 展现出吸收和发射光谱的蓝移。

季铵化哌嗪取代的萘酰亚胺具有比二甲氨取代对比物更好的亮度。如表 4.1 所列，二甲氨取代萘酰亚胺 DM-Naph 在水中的荧光很弱 ($\Phi = 0.009$; $\epsilon = 0.98 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。与此相反，季铵化哌嗪取代的萘酰亚胺展示了 >70 的荧光亮度提升 (MP-Naph, $\Phi = 0.71$; $\epsilon = 0.96 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; HP-Naph, $\Phi = 0.65$, $\epsilon = 1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。MP-Naph 和 HP-Naph 的斯托克斯位移也比二甲氨取代类似物延长 $\sim 30 \text{ nm}$ 。延长的斯托克斯位移可能来源于激发态季铵化哌嗪取代基的轻微旋转。

季铵化哌嗪策略设计的 NBD 染料也呈现出相似的亮度增加。例如，甲基季铵化哌嗪取代 NBD (MP-NBD, $\Phi = 0.087$; $\epsilon = 2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 和质子季铵化哌嗪取代 NBD (HP-NBD, $\Phi = 0.086$; $\epsilon = 2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 也展现出相对于二甲氨 NBD (DM-NBD, $\Phi = 0.010$, $\epsilon = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) >8 倍的荧光增强。尽管如此，这些染料在水中的荧光量子产率仍然很小，可能由于在 NBD 荧光团周围强烈的氢键作用^[46]。而在非质子溶剂中，氢键的影响将减少，MP-NBD 在 DMSO 溶剂中的量子产率提升至 0.35。

图 4.6 展示了这些染料的吸收和荧光光谱，以及在相同条件下，季铵化哌嗪策略母体染料的与其二甲氨类似物的荧光光谱的比较图。季铵化哌嗪取代策略显著提升了这些荧光团的荧光亮度。P-NBD 在 DMSO 中由于没有质子季铵化的过程，它几乎没有荧光信号。

表 4.2 列出了其它在本章中出现染料在水中的光物理性质。4-MPR-COOH 和 4-HPR-COOH 在水中也具有极高的荧光量子产率 (0.96 和 ~ 1)，这些结果与前面报道的季铵化哌嗪策略罗丹明测量结果一致。4-PR-COOH 和 Lyso-R 在水中的荧光量子产率极低，可能是由于它们在激发后能够进入非辐射跃迁的 TICT 态。由于季铵化哌嗪基团供电子能力的削弱，4-MPR-COOH 和 4-HPR-COOH 相比于 TMR 显示出相似的光谱蓝移。另外一方面，基于季铵化哌嗪策略开发的膜探针，Mem-R，在水溶液中的荧光量子产率 ($\Phi = 0.64$) 适中，而且在水中的摩尔消光系数较小 ($\epsilon = 1.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。这可能是由于 Mem-R 在水溶液中的聚集。将 Mem-R 置于抑制其聚集的二氯甲烷 (含有 10% 三氟乙酸) 体系中，Mem-R 展现出高荧光量子产率 ($\Phi = 0.90$) 与摩尔消光系数 ($\epsilon = 8.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。

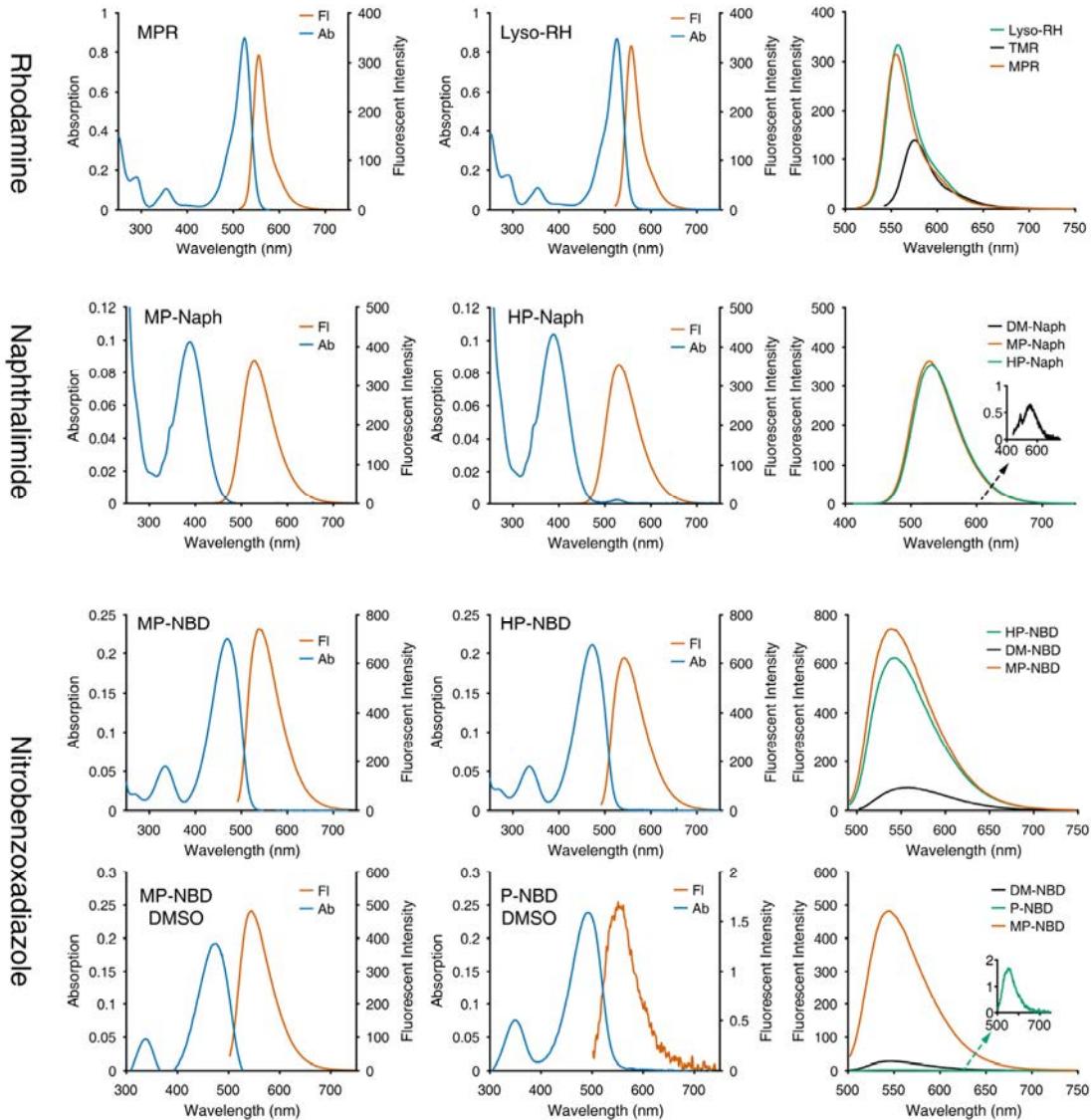


图 4.6 基于季铵化哌嗪策略的荧光团的紫外可见吸收及荧光光谱。光谱测定样品溶解于水中 ($\text{pH} \approx 7$)，浓度为 $10 \mu\text{M}$ 。右侧的图比较了季铵化哌嗪荧光团和其二甲氨基对比类似物的荧光光谱。Lyso-RH, HP-Naph 和 HP-NBD 的光谱数据在 $\text{pH} = 4.0$ 的水中测量。

Figure 4.6 UV-vis absorption and fluorescence spectra of fluorophores implemented with the quaternary piperazine strategy. Spectra were measured in water ($\text{pH} \approx 7$) at a concentration of $10 \mu\text{M}$. Blue curves depict the absorption spectra, red solid curves depict the fluorescent spectra. The last plots on each row show the fluorescent comparison between quaternary piperazine fluorophores and its dimethylamino analog. The spectra of Lyso-RH, HP-Naph and HP-NBD were measured in $\text{pH} = 4.0$ water.

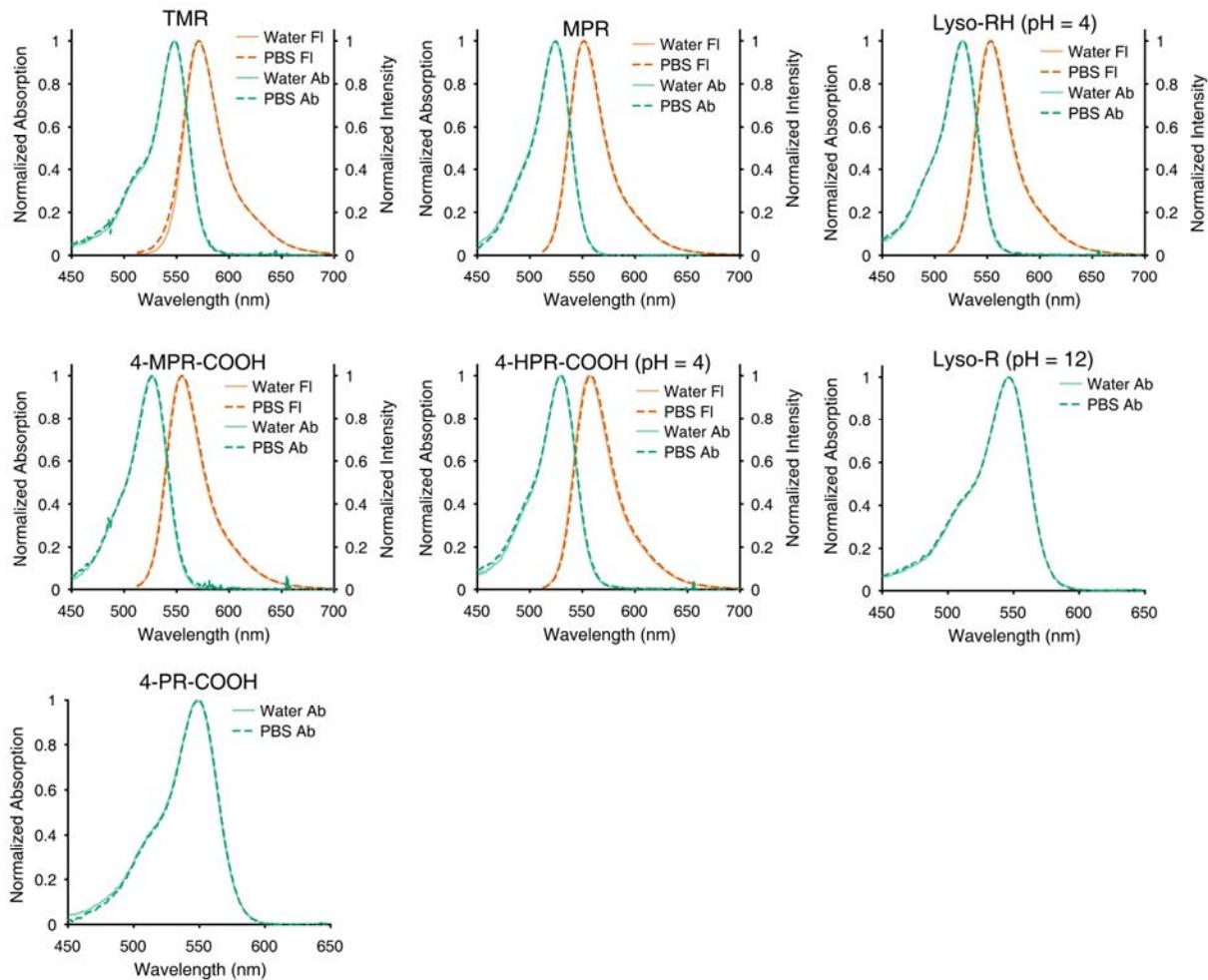


图 4.7 罗丹明染料在水中和缓冲液 (PBS) 中的吸收和荧光光谱。上图中, 虚线展示了在 PBS 中测量的光谱数据, 而实线展示了在水中测量的光谱数据; 绿色线对应于吸收光谱, 红色线对应于荧光光谱。由于 Lyso-R 和 4-PR-COOH 的荧光太弱, 本分析排除它们的荧光光谱。

Figure 4.7 Absorption and fluorescent spectra of studied rhodamines in water and buffer (PBS). For all plots, the dashed lines show spectra measured in PBS and the solid lines show those spectra measured in water; the green curves plot absorption spectra and the red curves plot fluorescence spectra. Since the fluorescence of Lyso-R and 4-PR-COOH were too weak, their fluorescent spectra were not included in this study.

图 4.7 展示了季铵化哌嗪罗丹明 (MPR, Lyso-RH, 4-MPR-COOH, 4-HPR-COOH) 和类似物 (TMR, Lyso-R, 4-PR-COOH) 在水中和在缓冲液条件 (PBS) 下测量光谱的

比较。这些染料在两种条件下的光谱重叠良好（几乎完全一致），该结果表明这些荧光团在水中和在缓冲液中的光物理性质相似。

4.5.3 季铵化哌嗪策略提升亮度的机制探究

为了探究季铵化哌嗪策略提升亮度的机制，测量了季铵化哌嗪罗丹明 Lyso-RH 以及 TMR 在一系列质子化溶剂以及乙腈中的光谱性质。表 4.3 列出了在这些溶剂中染料的光谱性质以及这些溶剂的性质（极性、氢键给体/受体能力和粘度）。非质子溶剂（乙腈除外）不包含在这部分研究中，因为罗丹明染料在这些溶剂中不处于的两性离子/酸性形式，并没有可见吸收发射^[200]。

表 4.3 Lyso-RH 和 TMR 在不同溶剂中的光谱性质

Table 4.3 Spectroscopic properties of Lyso-RH, TMR in different solvents.

染料	溶剂	λ_{Ab} (nm)	λ_{Em} (nm)	Φ	τ (ns)	k_{nr} ($\times 10^{-2}$ ns^{-1})	Δf^a	α^b	β^b	π^b	η^c (cP)	Z^d
Lyso-RH	Water	529	556	~1	3.48	~0	0.64	1.17	0.14	1.09	0.80	94.6
	MeOH ^e	530	556	0.92	3.52	2.3	0.62	0.93	0.66	0.58	0.54	83.6
	EtOH ^e	533	558	0.76	3.33	7.2	0.58	0.83	0.75	0.51	1.07	79.6
	n-PrOH ^e	536	560	0.67	3.37	9.8	0.55	0.78	0.90	0.52	1.95	78.3
	n-BuOH ^e	538	561	0.64	3.37	11	0.53	0.79	0.84	0.47	2.54	77.7
	Glycerol ^e	541	565	0.61	3.28	12	0.53	0.93	0.67	1.04	934	82.7
	Acetonitrile ^e	534	559	0.97	3.44	0.9	0.61	0.19	0.40	0.75	0.37	71.3
TMR	Water	548	571	0.47	2.25	25	0.64	1.17	0.14	1.09	0.80	94.6
	MeOH	540	565	0.57	2.65	16	0.62	0.93	0.66	0.58	0.54	83.6
	EtOH	537	563	0.63	3.04	12	0.58	0.83	0.75	0.51	1.07	79.6
	n-PrOH	537	563	0.66	3.25	10	0.55	0.78	0.90	0.52	1.95	78.3
	n-BuOH	537	563	0.65	3.30	11	0.53	0.79	0.84	0.47	2.54	77.7
	Glycerol	554	577	0.64	3.24	11	0.53	0.93	0.67	1.04	934	82.7
	Acetonitrile ^f	551	573	0.52	2.56	19	0.61	0.19	0.40	0.75	0.37	71.3

^a Onsager 极性^[201]: $\Delta f = 2(\epsilon-1)/(2\epsilon+1) - 2(n^2-1)/(2n^2+1)$;

^b 从参考文献^[202]获得的溶剂 Kamlet-Taft 参数^{[203]–[205]};

^c 从 CRC 手册获得数据^[206];

^d 从文献获得数据^[207];

^e 质子化形式的 Lyso-RH 是通过对 Lyso-R 在这些溶剂中加入 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 质子化获得;

^f 在乙腈中加入 0.1% TFA，确保罗丹明处于具有可见吸收的两性离子/酸性形式。

到目前为止，许多实验研究证实了对于不同荧光团均存在 TICT 态形成的可能，这些有机荧光团包括萘酰亚胺^{[46],[208],[209]}、罗丹明^{[182]–[185],[210]}和香豆素^{[211]–[213]}。TICT 态的形成与溶剂的粘度与极性相关，前者抑制了向分子扭转态的旋转，而后者控制了整个过

程的转动势垒和驱动能量。与上述 TICT 的机制预期一致, TMR 在中等极性以及粘性溶剂中展现出显著降低的非辐射跃迁速率、增强的荧光量子产率和延长的荧光寿命。例如, TMR 在水中的非辐射跃迁速率高达 0.25 ns^{-1} , 而在极性减弱的正丁醇和粘性甘油溶液中, 它的非辐射跃迁速率降低到 0.11 ns^{-1} 。在极性降低 (或者粘度增加) 溶剂中降低的非辐射跃迁速率可归咎于增强的旋转能垒。与此一致的是, 过去文献也详细研究了分子扭转和平面状态对罗丹明 B 及其它罗丹明类似物在不同溶剂中的影响^{[182]–[185],[210]}。

值得注意的是, TMR 在粘性甘油中的量子产率仅为 0.64。在如此高的粘度下, TICT 态的形成应当被阻碍了, 因此氢键作用可能在猝灭荧光过程中扮演了重要的角色。

另一方面, Lyso-RH 在水中和在乙腈中具有接近完美的量子产率, 这说明质子化季铵化哌嗪策略避免了分子内扭转态形成、氢键作用及绝大多数其它的非辐射跃迁过程。

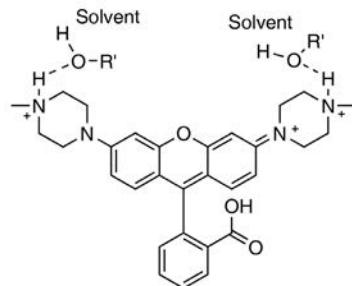


图 4.8 溶剂分子和质子化氨基的氢键作用

Figure 4.8 Hydrogen-bonding interactions between the protonated amine and solvent molecules.

Lyso-RH 在不同溶剂中展现出不同的量子产率。Lyso-RH 的非辐射跃迁速率随着溶剂极性减弱和溶剂粘度增加逐渐增强。这种强化的非辐射跃迁过程可能与在这些溶剂中溶剂强化的氢键供体能力 (β) 及其削弱的季铵盐基团吸电子诱导效应有关。如图 4.8 所示, 季铵化哌嗪的质子可能与溶剂的供体原子形成氢键。如表 4.3 所列, 极性稍弱的溶剂具有增强的氢键供体能力, 同时由于溶剂与哌嗪基团的氢键作用, 造成哌嗪季铵化程度的下降。这样导致罗丹明上芳香氨的供电能力恢复, 稳定了激发态的分子扭转状态, 最后表现为 Lyso-RH 从水 ($k_{nr} \sim 0 \text{ ns}^{-1}$ 和 $\Phi \sim 1$) 到正丁醇 ($k_{nr} = 0.11 \text{ ns}^{-1}$ 和 $\Phi = 0.64$) 的增强非辐射跃迁速率及降低的荧光量子产率。在此处测量的 Lyso-RH 在水中的荧光量子产率要略高于表 4.1 中给出的值 (0.92), 因为前者的 0.1% 三氟乙酸提供的质子浓度要高于后者 (即 $\text{pH} = 4.0$ 的水) 的质子浓度。基于同样的氢键作用, 由于甘油的较高氢键供体能力 ($\beta = 0.67$), Lyso-RH 在该溶剂中也展现出削弱的荧光量子产率 (0.64) 和较高的非辐射跃迁速率 (0.12 ns^{-1})。

表 4.4 Lyso-RH 和 TMR 在水和甘油混合溶剂中的光谱性质

Table 4.4 Spectroscopic properties of Lyso-RH, TMR in water glycerol mixture.

染料	Glycerol, % ^a	λ_{Ab} (nm)	λ_{Em} (nm)	Φ	η (cP)
Lyso-RH	0	529	556	~1	0.80 ^b
	50	534	560	0.86	5.0 ^c
	80	538	563	0.77	45.0 ^c
	92	539	564	0.67	211 ^c
	96	540	564	0.64	413 ^c
	98	540	564	0.63	602 ^c
	100	541	565	0.61	934 ^b
TMR	0	548	571	0.47	0.80 ^b
	50	550	573	0.51	5.0 ^c
	80	552	576	0.54	45.0 ^c
	92	552	576	0.53	211 ^c
	96	552	575	0.56	413 ^c
	98	552	575	0.57	602 ^c
	100	552	575	0.64	934 ^b

a 质量分数;

b 来源于 CRC 手册^[206];

c 按照文献提供的方法计算获得^[214]。

粘度实验也证明了上述分子内扭曲过程和季铵化哌嗪的氢键作用是影响罗丹明染料荧光发射的重要因素。表 4.4 列出 Lyso-RH 和 TMR 在不同粘度的水和甘油混合溶剂中光谱性质的测量结果。随着甘油比例的提升，溶剂的粘度逐渐增加，Lyso-RH 的荧光量子产率呈现出单调减少，而 TMR 的荧光量子产率呈现出单调增加。

溶剂变色效应的研究也支持上述的分析结果。在低粘度质子溶剂中，随着溶剂极性的增加，TMR 展现出持续的吸收和发射光谱的红移，与典型的电子转移染料特点相匹配（图 4.9，灰色）。Lyso-RH 在高极性溶剂中展现出吸收和发射光谱的蓝移（图 4.9，红色），这种变化可以被上述的诱导效应与氢键作用的竞争机制解释。高极性溶剂增强的氢键供体能力恢复了 Lyso-RH 的芳香氨供电子能力，使得染料在这些溶剂中的吸收和发射光谱红移。在高粘度的甘油溶液中，两种染料均展现出吸收和发射光谱的蓝移。这种现象的可能原因是甘油的高极性（ π ）和 Kosower's 性质（Z），同样的结果在之前罗丹明 B 的研究中也见报道^{[215],[216]}。

基于上述的光物理性质的测量结果，TICT 态的形成是传统二甲氨基罗丹明（TMR）的关键猝灭机制；季铵化哌嗪取代策略抑制了 TICT 态的形成以及其它可能的非辐射跃迁过程（例如，氢键作用）。

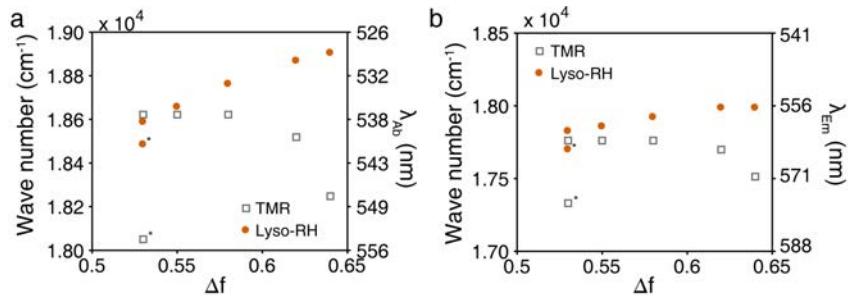


图 4.9 Lyso-RH 和 TMR 的溶剂变色效应。图展示了吸收最大值和发射最大值所处的波数随溶剂极性 (Δf) 变化的规律。星号标记了在甘油中的测量结果。

Figure 4.9 Solvatochromic effect for Lyso-RH and TMR. The wave numbers of (a) absorption maximums and (b) emission maximums as a function of solvent polarity (Δf). The asterisk labeled the values measured in glycerol.

4.5.4 MPR 和 TMR 的单分子测量

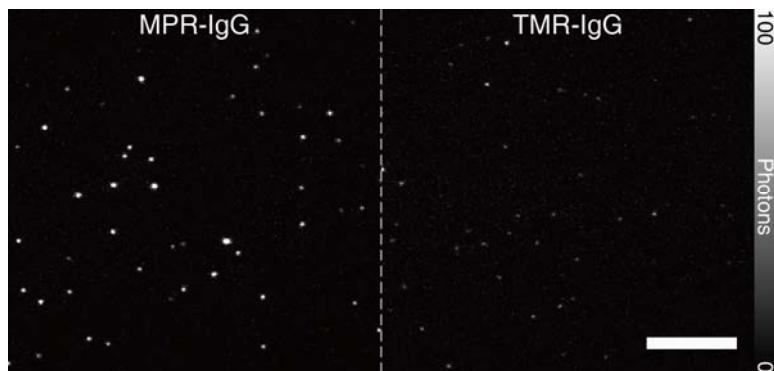


图 4.10 MPR-IgG 和 TMR-IgG 的单分子荧光信号

Figure 4.10 Single-molecule fluorescent signals of MPR-IgG and TMR-IgG. Scale bar: 10 μm .

光谱测量结果 (4.5.2 节) 显示了季铵化哌嗪罗丹明在水中具有显著提升的亮度, 下文在单分子水平上进一步对季铵化哌嗪罗丹明的亮度进行测量。通过相同位置的羧基将 MPR 和 TMR 分别衍生到单分子抗体蛋白上 (MPR-IgG 和 TMR-IgG), 然后再将它们稀疏的吸附在盖玻片的表面, 这样就可以在水溶液环境中研究两种荧光团的单分子光物理性质。如图 4.10 所示, MPR-IgG 和 TMR-IgG 的单分子信号稀疏分布, 避免了不同分子信号之间的重叠。

表 4.5 列出了在不同强度激光照射条件下测量的 MPR-IgG 和 TMR-IgG 的单分子性质, 研究中考察了两种缓冲液体系: (A) PBS; (B) 成像增强缓冲液 (含有 200 mM 疏基乙胺的 TN 缓冲液)。因为大部分数据在不同光强下的对比结果相同, 下面的讨论默认给出在 1000 W/cm² 测量的数据 (除非另外声明)。

(1) MPR 和 TMR 的单分子光子统计数据

季胺化哌嗪取代的罗丹明 MPR 展现了比 TMR 更好的单分子光子统计结果。在所有测试的条件下, MPR 一致展现出比 TMR 更优的单分子亮度、漂白前收集总光子数、信噪比和定位精度 (图 4.11 和图 4.12)。这些结果与光谱测量的结果以及量子化学计算预期一致。

例如, MPR 的单分子亮度 (单分子每帧光子数: 518, PBS; 1087, 成像液) 是 TMR 的单分子亮度 (227, PBS; 470, 成像液) 的两倍。单分子亮度的增强来源于 MPR 在水中接近于 1 的荧光量子产率 (表 4.1)。与其单分子亮度的增强结果一致, MPR 相比于 TMR 在单分子信号信噪比 (正比于单分子亮度平方根) 和单分子定位精度 (正比于单分子亮度平方根倒数) 也获得提升。

总收集光子数可以反应染料的光稳定性, 因为前者正比于在漂白前被激发的总次数与荧光量子产率的乘积。因此, 在绝大多数条件下, MPR 相对于 TMR 两倍以上提升的总光子数说明了 MPR 相比于 TMR 具有更好的光稳定性。

另外一方面, 在 PBS 条件下, MPR 相比于 TMR 展现出 1.7-4.6 的单次亮态光子数的提升, 与季胺化哌嗪罗丹明在水中的量子产率提升的结果保持一致。在成像液中, 在绝大多数照明条件下 (从 100 到 1500 W/cm²), 两种染料的单次亮态光子数统计结果接近 (2.24×10^4 -MPR- vs 2.34×10^4 -TMR-)。仅在 2000W/cm² 照明及成像液条件下, MPR 的单次亮态光子数出现了衰退, 其机制的探讨将在下面与两种染料的闪烁特征结合讨论。

综上所述, 不管是在 PBS 或者成像液中, MPR 总体展现了比 TMR 更好的单分子光子统计数据结果。

表 4.5 MPR-IgG 和 TMR-IgG 的单分子性质
Table 4.5 Single-molecule characteristics of MPR-IgG and TMR-IgG

染料 (W/cm ²)	激光强度 (W/cm ²)	亮度(单分子每帧光子数)		信噪比	定位精度(nm)	占空比	光子数(× 10 ⁴)	单次亮态的闪烁次数	亮态持续时间(s)	N _m ¹	条件
		总收集光子数 (× 10 ⁴)	单分子每帧光子数								
MPR -IgG	100 ²	39±3	1.33±0.46	2.58±0.12	17.36±0.31	0.144±0.038	0.51±0.20	7.69±0.31	1.40±0.50	29	PBS
	200	74±3	1.95±0.64	3.45±0.10	15.74±0.18	0.109±0.020	0.75±0.23	6.91±1.54	1.03±0.17	44	
	500	231±22	2.90±0.46	5.83±0.29	12.11±0.67	0.055±0.010	1.29±0.12	3.84±0.41	0.69±0.23	59	
	1000	518±63	4.06±0.26	8.51±0.32	10.08±0.19	0.034±0.012	2.04±0.62	2.90±0.44	0.42±0.02	56	
	1500	689±108	4.31±0.75	9.85±0.95	8.94±1.22	0.029±0.007	2.02±0.30	3.30±0.36	0.32±0.05	62	
	2000	963±111	3.47±1.33	11.11±0.83	9.08±0.63	0.020±0.002	2.23±0.84	1.96±0.28	0.32±0.04	63	
	100 ²	105±12	6.24±0.40	3.81±0.21	14.41±0.25	0.201±0.017	0.85±0.22	21.23±1.40	0.51±0.03	167	
	200	213±10	10.24±1.70	5.52±0.13	12.06±0.24	0.167±0.021	1.00±0.16	18.52±1.71	0.43±0.06	182	
	500	498±20	17.94±1.68	8.29±0.26	10.29±0.31	0.116±0.009	2.14±0.49	19.01±0.98	0.33±0.04	190	mM MEA
	1000	1087±104	18.86±0.71	12.17±0.83	8.60±0.53	0.061±0.002	2.24±0.46	14.57±1.29	0.21±0.04	191	
TMR -IgG	1500	1407±161	16.05±1.43	13.81±0.87	8.34±0.28	0.044±0.004	2.80±0.68	12.48±2.58	0.18±0.03	171	
	2000	1194±45	17.85±1.70	12.71±0.08	8.64±0.39	0.059±0.008	1.55±0.08	20.84±4.27	0.14±0.01	165	
TMR -IgG	100 ²	31±8	No. Det. ³	2.34±0.18	18.45±0.31	No. Det.	0.24±0.04	8.54±3.48	0.78±0.35	5	PBS
	200 ²	54±10	0.45±0.17	3.01±0.25	16.70±0.65	0.058±0.025	0.16±0.07	7.01±1.38	0.54±0.26	16	
	500	147±14	1.26±0.40	4.49±0.18	14.45±0.53	0.059±0.002	0.73±0.48	2.59±0.84	0.86±0.21	35	
	1000	227±19	1.18±0.20	5.72±0.14	12.75±0.20	0.033±0.009	0.60±0.18	2.91±0.27	0.42±0.11	55	
	1500	402±32	2.42±0.93	7.48±0.22	10.96±0.35	0.031±0.009	0.98±0.25	2.40±0.18	0.44±0.14	59	
	2000	449±19	2.19±1.08	7.76±0.18	11.05±0.25	0.023±0.007	0.92±0.10	2.32±0.60	0.34±0.03	63	
	100 ²	63±15	1.23±0.26	3.00±0.41	15.99±0.63	0.111±0.028	0.26±0.06	14.10±3.32	0.46±0.12	65	
	200 ²	123±11	3.01±0.52	3.89±0.27	14.49±0.22	0.142±0.010	0.80±0.12	12.46±1.29	0.91±0.09	94	
	500	307±14	6.98±2.73	6.19±0.24	12.31±0.38	0.133±0.015	2.16±0.52	6.49±0.76	1.33±0.62	135	mM MEA
	1000	470±46	6.67±0.95	7.59±0.40	11.43±0.25	0.091±0.009	2.34±0.38	5.51±0.44	0.85±0.07	139	
TMR -IgG	1500	526±188	7.33±1.57	7.99±1.60	10.94±0.89	0.079±0.030	2.38±0.29	5.84±1.61	0.66±0.25	191	
	2000	829±135	7.08±0.98	9.89±0.90	9.92±0.63	0.049±0.005	2.88±0.28	4.18±0.08	0.54±0.06	129	

¹平均每组成像结果分析的单分子荧光轨迹数量; ²由于在这些弱光条件下的单分子信号较弱, 统计的单分子数据的波动增强; ³未给出。

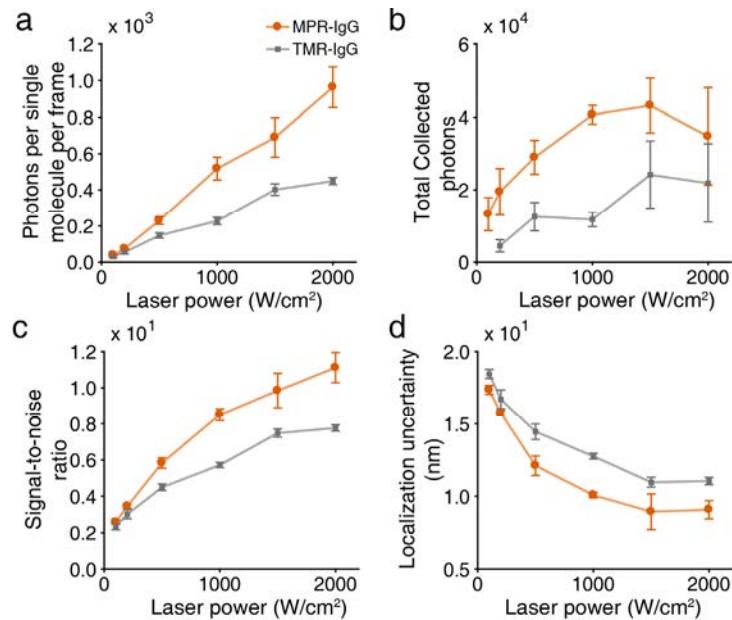


图 4.11 MPR-IgG 和 TMR-IgG 在 PBS 缓冲体系下不同激光照明强度的单分子特征。图中展示了随激光强度变化的 (a) 单分子亮度; (b) 在光漂白前收集的总光子数; (c) 信噪比和 (d) 定位精度。由于在 100 W/cm^2 照明强度下 TMR 的信号较弱, 其统计结果的波动过大, 因而 TMR-IgG 在该条件下统计总光子数并未列出。

Figure 4.11 Single-molecule characteristics of MPR-IgG and TMR-IgG in PBS under a set of irradiation powers. (a) The single-molecule brightness, (b) the total collected photons before photobleached, (c) the signal-to-noise ratio and (d) the localization uncertainty as a function of laser power. The total collected photons of TMR-IgG at 100 W/cm^2 was omitted because of the variance resulted from weak signals of TMR under that condition.

(2) MPR 和 TMR 的单分子闪烁统计数据测量及超分辨成像能力评估

MPR 展现出比 TMR 更适用于单分子定位超分辨成像的闪烁统计特征。

在成像液中, MPR 具有比 TMR 更多的闪烁次数 (14.57 -MPR- vs 5.51 -TMR-) , 并且这种闪烁次数的提升没有增加 MPR 的占空比 (0.061 -MPR- vs 0.091 -TMR-) , 这很可能是由于 MPR 比 TMR 更短的亮态持续时间。提升的闪烁次数将在定位型超分辨成像中为每个染料分子提供更多的定位信息, 提升最后的定位密度。因此, 在成像液中, MPR 具有比 TMR 更优秀的定位型超分辨成像潜力。

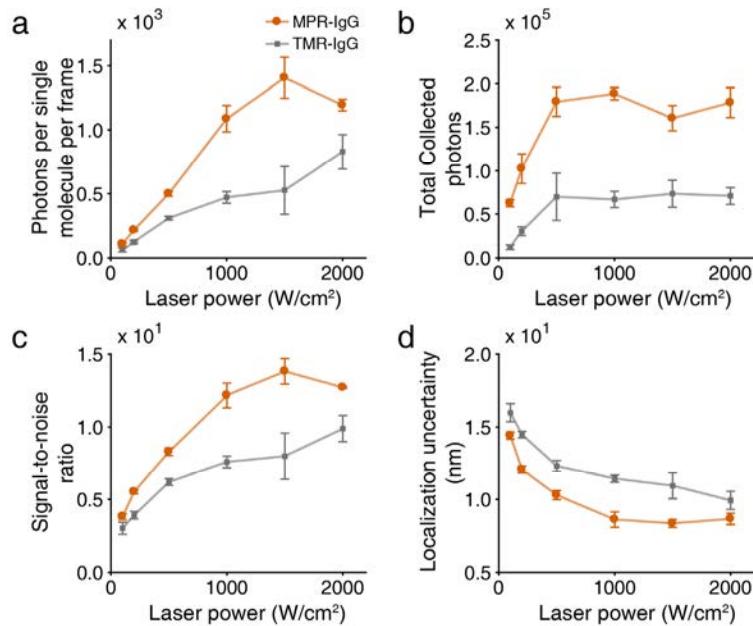


图 4.12 MPR-IgG 和 TMR-IgG 在成像增强液 (200 mM 瓶基乙胺) 体系下不同激光照明强度的单分子特征。图中展示了随激光强度变化的 (a) 单分子亮度; (b) 在光漂白前收集的总光子数; (c) 信噪比和 (d) 定位精度。

Figure 4.12 Single-molecule characteristics of MPR-IgG and TMR-IgG in PBS under a set of irradiation powers. (a) The single-molecule brightness, (b) the total collected photons before photobleached, (c) the signal-to-noise ratio and (d) the localization uncertainty as a function of laser power.

在 PBS 中, 两种染料展现出相似的闪烁特征(闪烁次数、占空比和亮态持续时间)。没有成像增强剂条件下, 两种染料的闪烁次数均十分有限 (2.90 -MPR- vs 2.91 -TMR-) , 这说明这两种标记在生物大分子上的染料并没有自闪烁的趋势。这些结果进一步说明通过这些染料标记抗体免疫标记实现的超分辨成像需要使用成像液, 来提升成像结果的质量和可靠性。

TMR 和 MPR 的单次亮态光子数与其它单分子光子统计数据的差异可以用它们的闪烁统计数据来解释。TMR 在成像液中的单次亮态光子数比其在 PBS 中的数据有显著的提升, 其可能原因是 TMR 的亮态持续时间在成像液中的提升 (0.85 s -成像液- vs 0.42 s -PBS-)。虽然在该条件下 (除 2000W/cm² 成像液条件), 两种染料展现出的单次亮态光子数十分相似, TMR 的亮态时间延长同时导致了占空比的提升 (0.091 -TMR- vs 0.061 -MPR-) , 降低了超分辨成像单位时间内能够定位的荧光团分子数^[35]。另外一方面, 在成像液中, MPR 的亮态光子数在 2000W/cm² 照明条件下出现了衰减 (2.80, 1500 W/cm²

vs 1.55, 2000 W/cm²）。该结果可能是单分子发光速率的饱和和亮态到暗态速率提升共同作用的结果，前者可以被衰减的单分子亮度数据证实（单分子每帧光子数：1407, 1500 W/cm²; 1194, 2 000 W/cm²），后者可以被显著增加的亮暗态次数揭示（12.48, 1500 W/cm²; 20.84, 2000 W/cm²）。虽然 TMR 在该条件下单次亮态光子数较高，但是考虑到 MPR 在同样条件下更优秀的单分子亮度和闪烁次数，MPR 仍然具有比 TMR 更好的定位型超分辨成像潜力。

综上所述，基于闪烁统计结果，两种染料在 PBS 中展示了相似的闪烁特征，而在成像液中，MPR 展现了相比于 TMR 显著提升的闪烁统计数据。这些结果表明 MPR 具有比 TMR 更好的定位型超分辨成像能力。

（3）对于 2 kW/cm² 成像液条件单分子统计数据的探讨及 TMR 和 MPR 的超分辨成像能力评估

值得注意的是，如前所述，MPR 在 2 kW/cm² 成像液条件下展现出比 TMR 更少的单次亮态光子数。虽然单次亮态光子数是荧光团十分重要的单分子性质，MPR 在此项参数的降低并没有减弱其定位型超分辨成像的能力，因为其它单分子性质，如光子发出速率、总收集光子数、闪烁次数，也影响了染料的成像能力。在该成像条件（2 kW/cm²，成像液）下，MPR 展现了增强的单分子亮度（单分子单帧光子数：1194 -MPR- vs 829 -TMR-）、总收集光子数（17.85 -MPR- vs 7.08 -TMR- × 10⁴）和闪烁次数（20.84 -MPR- vs 4.18 -TMR-）。由于 MPR 这些优秀单分子性质，在同样条件下，相比于 TMR 的超分辨重构结果，MPR 的结果展现了显著提升的结构连续性特征（图 4.15 和 4.17）。因此，综合所有的单分子统计特征而言，MPR 在 2 kW/cm² 成像液条件下展现出比 TMR 更好的定位型超分辨成像能力。

为了理解 MPR 成像能力的增强效应，基于在 2 kW/cm² 成像液条件下测量的单分子闪烁统计数据，模拟分析了两种染料的超分辨重构结果。假定亮暗态转换和光漂白过程满足泊松分布^{[159],[192]}，以闪烁统计数据为其期望（通过方程 B.1, B.2, B.3 和 B.14，假定亮态和暗态转换过程均满足单自然指数分布），基于蒙特卡罗方法模拟染料的单分子闪烁过程。对该模拟计算获得的单分子信号应用超分辨定位分析软件（如 ThunderStorm, 4.4.10 节）完成定位分析，其重构结果见图 4.13。由于两种染料的闪烁符合压制型（即 dSTORM 型）染料特征，在模拟中假定这些染料在初始阶段均处于亮态，并随着激光的压制逐渐转换进入稀疏发光过程，因此模拟的成像原始数据中单分子信号重叠的数据排除在后续定位分析之外。在所有模拟的标记密度下，MPR 的重构结果可以完整的揭示连续的“DUT”字符，然而 TMR 仅仅能够给出大致的形态。MPR 重构的较高连续性可以

归咎于它更短的亮态持续时间（0.14 -MPR- vs 0.54 -TMR-， 2 kW/cm^2 成像液）、更多的闪烁次数和更大的总收集光子数。对于 TMR，由于有限的闪烁次数，大部分它的信号都在初始阶段的压制信号密度的过程中丢失了。这种重构质量的差异性与两种染料微管标记超分辨实验中展现出的差异性一致。

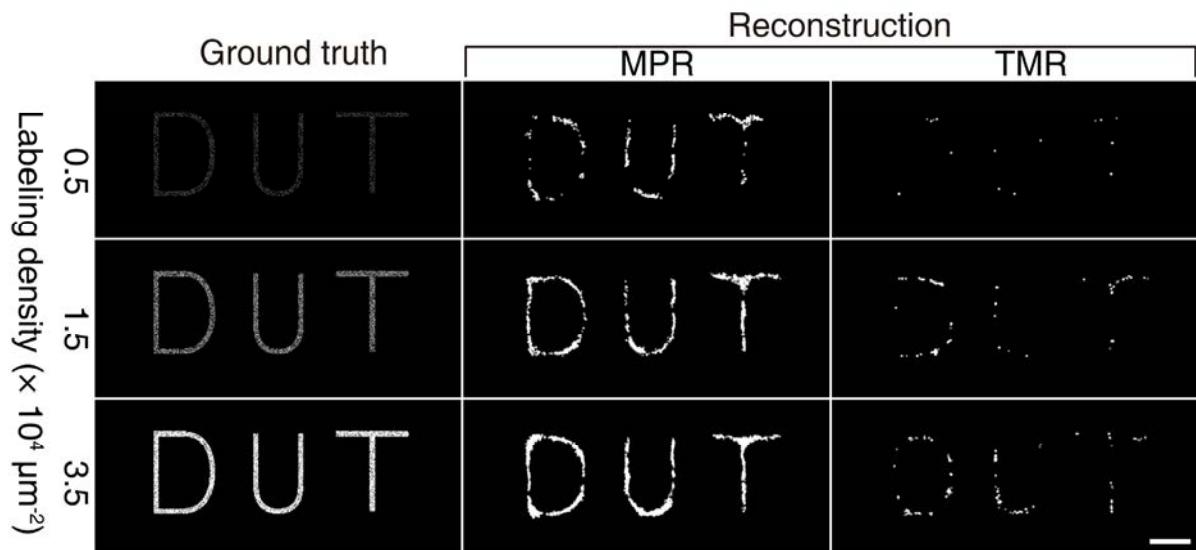


图 4.13 在不同标记密度下对 MPR 和 TMR 能够获得的重构成像图的模拟。在模拟中，假定亮暗态转换和光漂白过程满足泊松分布^{[159],[192]}。利用在 2 kW/cm^2 成像液条件下获得的单分子统计数据来模拟两个荧光团的闪烁。模拟的单分子信号在每帧发出~1000 个光子。对于每个单分子信号，其收集到的光子数据以实验中显微镜的设定按照模拟的单分子扩散函数（PSF，Gibson 和 Lanni 模型， $z = 0$ ）^[217]随机分布。

Figure 4.13 Simulation on the reconstruction from MPR and TMR at various labeling density. Poisson process is assumed for the on-off transfers and bleaching events^{[159],[192]}. The obtained single-molecule statistics at 2 kW/cm^2 in imaging enhancing buffer (Table S4) were utilized for generating the blinking behaviours for both fluorophores. The simulated single-molecule signals were assumed to emit ~1000 photons on each frame. The collected photons of a single-molecule signal were randomly distributed according to a simulated point spread function (Gibson and Lanni model, $z = 0$)^[217] under experimental microscopy configuration.

Scale bar: 500 nm.

另一方面，模拟分析并没有包括两种染料在光子发射速率上的差异。因为 MPR 展现出更高的光子发射速率（单分子单帧光子数），在相同收集时间内，MPR 可以获得比 TMR 更优的定位精度（8.64 -MPR- vs 9.92 -TMR-， 2 kW/cm^2 in buffer）。此外，TMR 需

要延长单帧收集时间来提高其单分子信号的亮度，这也可能会提升临近单分子信号重叠的可能性。

(4) MPR 和 TMR 的单分子分析小结

单分子光物理性质的研究显示 MPR 相比于 TMR 展现出显著提升的光子统计特征，并且在成像液中，MPR 也表现出更为优秀的闪烁统计特征。在单分子水平，MPR 表现出与光谱研究一致的亮度提升，并且其统计值显示出该染料在定位型超分辨成像的优势。

4.5.5 MPR 标记抗体的微管超分辨成像及其与 TMR 的成像结果对比

为了验证季铵化哌嗪策略在超分辨成像的实用性，对 HeLa 细胞的微管进行了标记和成像。图 4.14c 展示了标记有 MPR 的抗体的合成方法（详细细节见 4.4.3 节）。通过免疫标记抗 α -tubulin 一抗及标记有 MPR 的二抗，成功对固定细胞的微管进行了成像（图 4.14a）。由于光学衍射极限限制，传统荧光成像的分辨率较低，只能给出模糊的微管结构特征。与此形成强烈对比，图 4.14 所示的重构图揭示了微管的扭转和交叉的结构特征，显示出可观的清晰度提升。对重构成像中的定位数据统计分析给出平均单分子亮度为 1360（单分子每帧光子数，图 4.14d）、平均定位精度为 14.9 nm（图 4.14e）和从傅立叶环分析获得的整体分辨率为 96.3 nm^{[165],[172]}（图 4.14f）。图 4.14h 和 k 展示的放大后的重构图揭示了在传统荧光成像（4.14g 和 j）中隐藏的交错的微管丝状结构。如图 4.14i 所示，对放大图蓝线标记区域的强度剖线分析数据进行高斯函数拟合分析，超分辨成像成功区分了两条相距仅 88.7 nm 的微管丝状结构；按照同样方法对另一区域的微管结构尺寸进行分析，如图 4.14l 所示，分析结果显示抗体标记的微管丝状结构的宽度为 52.7 nm，与过去报道的结果匹配^[1]。

通过免疫标记微管方法比较了 MPR 和 TMR 实现定位型超分辨成像的能力。由于超分辨成像重构结果与实验条件相关（例如，标记密度），在实验中两种染料使用完全一致的标记方法（包括标记材料），以避免两种染料标记差异对最终结果的影响。为了减少未标记染料的抗体在二抗中的比例以及增强结构重构的完整性，在本研究中使用了具有相似标记密度的多标记二抗^[90]。对于每种染料，比较成像在相同条件下重复在 $n \geq 5$ 细胞完成。因为两种染料在 PBS 中仅有有限的闪烁次数（表 4.5），所有的成像在含有 200 mM 疏基乙胺的成像增强液^[218]中完成。

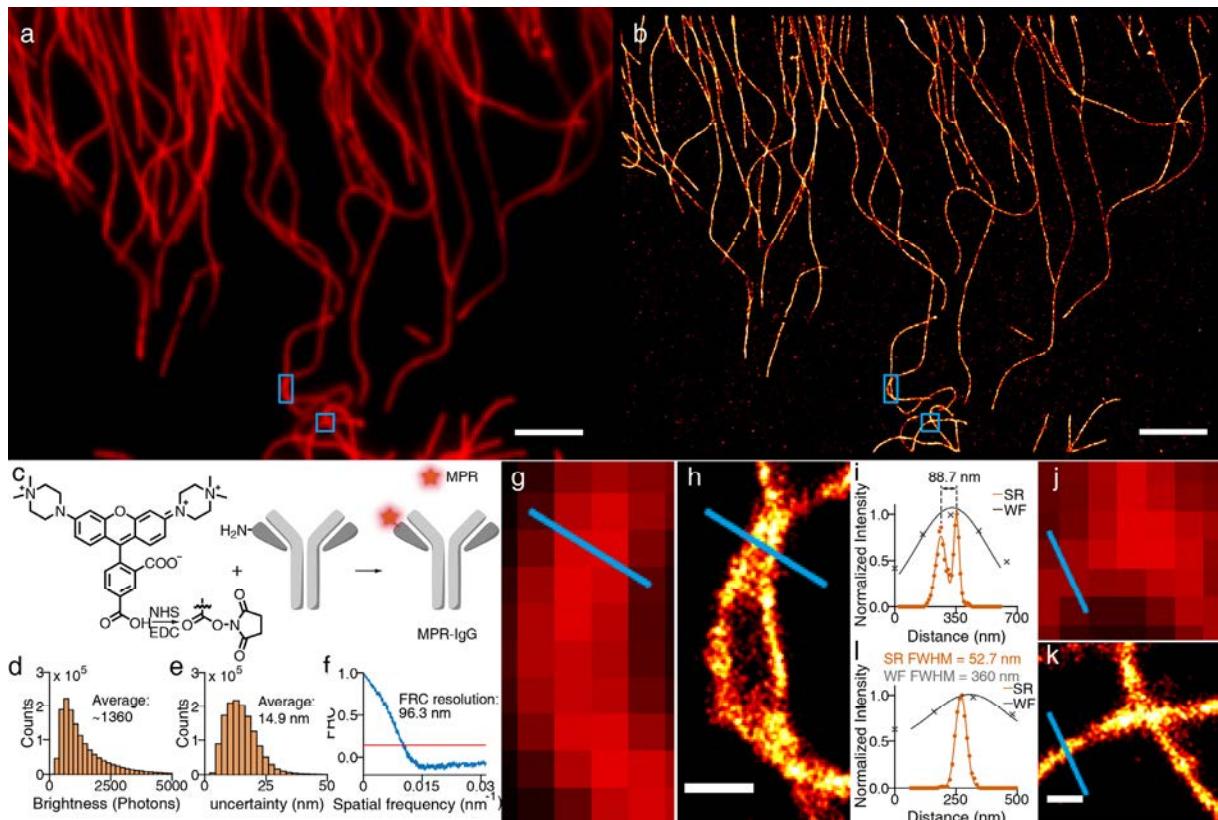


图 4.14 固定 HeLa 细胞中微管的超分辨成像。微管免疫标记抗 α -tubulin 蛋白一抗及连接有 MPR 的二抗，其传统和重构成像图分别显示在 (a) 和 (b) 中。 (c) MPR-IgG 准备方法的示意图。重构图 (b) 的单分子亮度 (d) 和定位精度 (e) 的直方图。 (f) 图 (b) 中定位数据的傅立叶环分析。图 (a) 或 (b) 中的蓝色框标记区域的放大图 (g 和 j) 或 (h 和 k)。在放大图 (g, h 或 j, k) 中蓝色线区域的强度剖线分析 (i 或 l)。标尺: 4 μ m (a 和 b); 300 nm (h); 200 nm (k)。

Figure 4.14 Super-resolution imaging of microtubules in a fixed HeLa cell. Conventional (a) and reconstruction image (b) of microtubules immunostained with primary antibody against α -tubulin and secondary antibody conjugated to MPR. (c) Schematic illustration of preparative method of MPR-IgG. Histogram of single-molecule brightness (d) and localization uncertainties (e) in (b). (f) Fourier ring correlation analysis of localizations in (b). Magnified views (g and j) or (h and k) of regions indicated by blue boxes in image (a) or (b). Intensity distributions (i and l) across the blue lines in magnified views (g, h and j, k). Scale bars: 4 μ m (a and b); 300 nm (h); 200 nm (k).

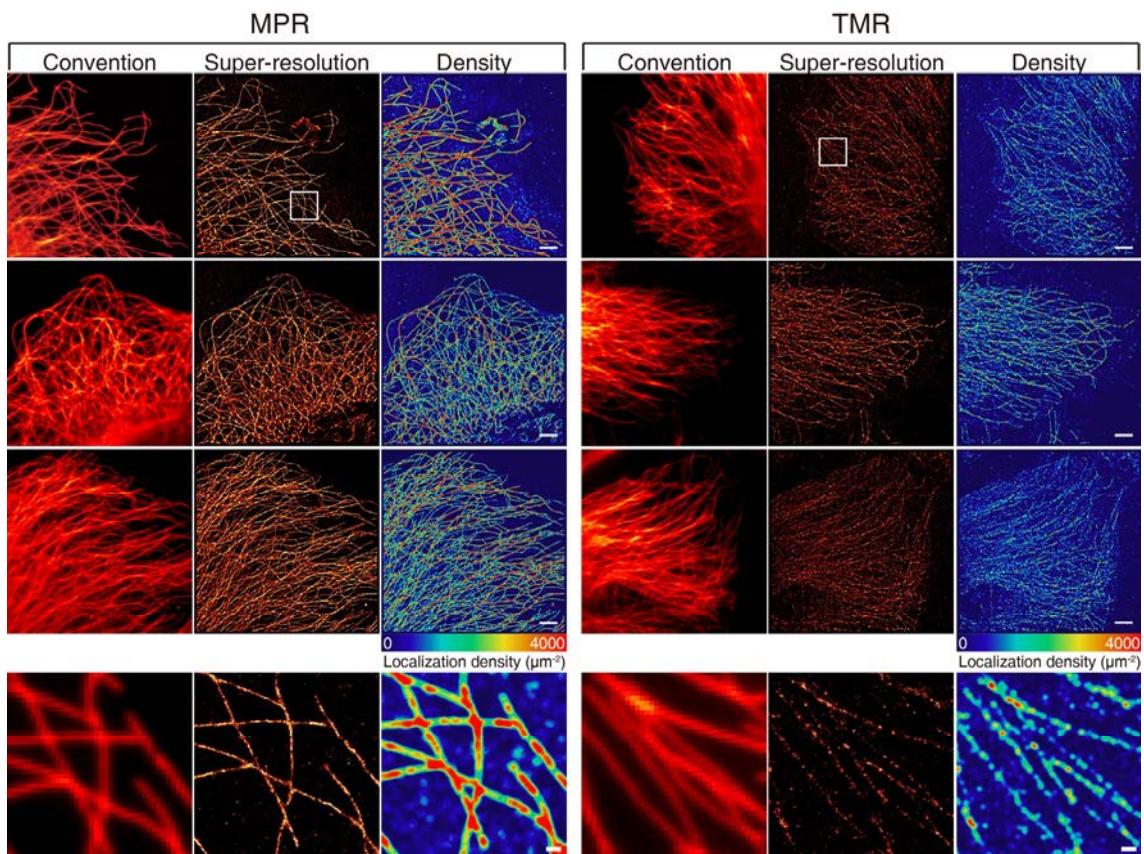


图 4.15 MPR 和 TMR 的超分辨成像结果比较。成像的对象为免疫标记有抗 α -tubulin 的一抗和荧光团标记的二抗 (MPR-IgG 或者 TMR-IgG)。左侧展示了来源于 MPR-IgG 的典型成像结果；右侧展示了 TMR-IgG 的典型成像结果。在每侧数据中，第一列图展示了在超分辨成像拍摄前相同区域获得的传统荧光成像结果；第二列图展示了对应的超分辨成像结果；第三列展示了从重构像图分析获得的定位密度地图。底行图展示了白色框指示的区域所有成像结果的放大图。标尺：4 μm (前三行图)；500 nm (最后一行)。

Figure 4.15 Comparison on the super-resolution imaging results between MPR and TMR. The imaging was performed on immunostained microtubules with primary antibodies against α -tubulin and secondary antibodies labeled with fluorophores (MPR-IgG or TMR-IgG). The left panel presents typical results from MPR-IgG and the right panel shows typical results from TMR-IgG. For each panel: the first column shows the conventional images on the same region acquired before super-resolution imaging; the second column shows the corresponding super-resolution imaging results; the third column shows the corresponding localization density maps analyzed from the reconstructed images. Bottom row shows regions highlighted by white boxes. Scale bars: 4 μm (first three rows); 500 nm (bottom row).

图 4.15 展示了三组典型的成像结果。所有的传统成像结果（图 4.15 两组数据第一列图）展示了连续的微管丝状结构，说明两种染料均实现对微管成功的标记。MPR 的超分辨成像结果（图 4.15 左侧第二列）也展现出微管连续的丝状结构，不同的是，TMR 的超分辨成像结果（图 4.15 右侧第二列）仅仅显示了间断的几乎不可分辨的微管丝状结构。在图 4.15 最后一行，放大的成像结果进一步揭示了两种染料超分辨成像结果的巨大差异。MPR 相对增强的成像质量与其相对于 TMR 更优秀的单分子光物理性质的测量结果一致（表 4.5）。

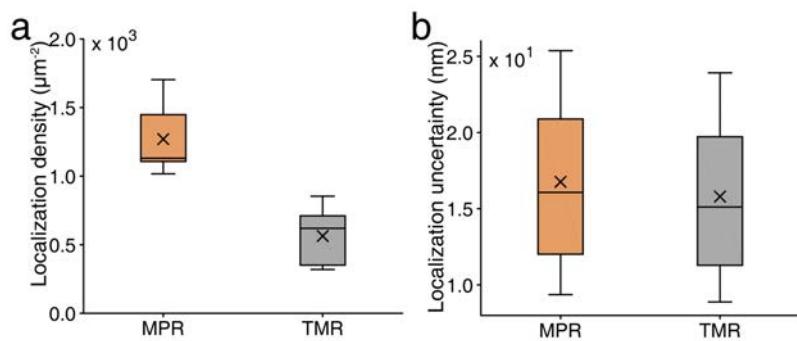


图 4.16 定量化以固定 HeLa 细胞免疫标记微管方法比较 MPR 和 TMR 的超分辨成像能力。MPR 和 TMR 在重构成像图中微管的定位密度（a）和定位精度（b）的统计箱图。（对于每个荧光团，统计数据来源于 $n \geq 5$ 成像结果）。

Figure 4.16 Quantitative comparison on the super-resolution imaging capability between MPR and TMR through immunostained microtubules in fixed HeLa cells. The box plots of (a) localization densities and (b) localization uncertainties for MPR and TMR on reconstructed microtubules. (Statistical data analysed from $n \geq 5$ imaging results for each fluorophore).

超分辨成像的定位密度地图更进一步揭示了从 MPR 到 TMR 的定位密度的下降（图 4.15 每组第三列）。这个结果与前面的模拟分析结果一致（图 4.13）。如图 4.16a 所示，MPR-IgG 染色微管超分辨成像结果在微管的平均定位密度为 1.3×10^3 定位/ μm^2 ，两倍于 TMR-IgG 的密度 (0.6×10^3 定位/ μm^2)。研究中采用了一致的标记方法和标记材料，两种染料的标记密度应当相似，因此超分辨重构结果定位密度的差异应当主要来源于 MPR 和 TMR 不同的闪烁特征。MPR 标记获得的更高的定位密度应当与其胜过 TMR 的闪烁次数有关（表 4.5）。

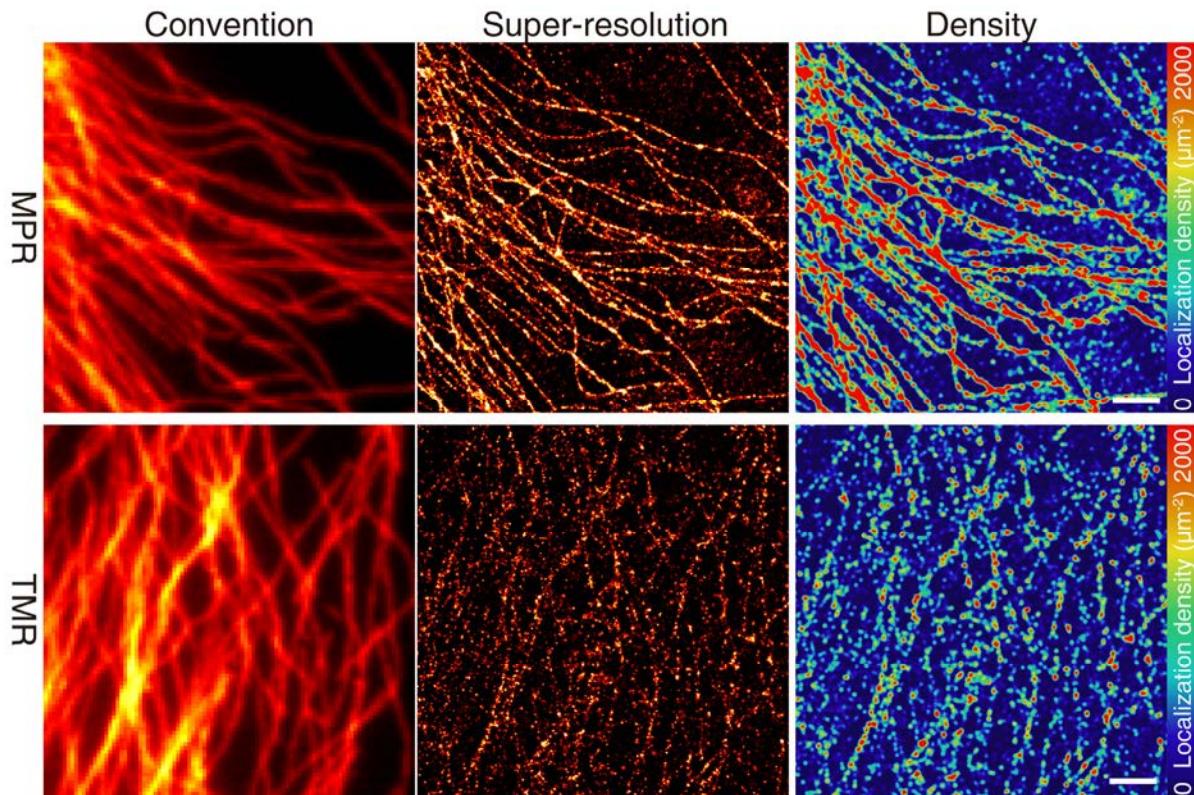


图 4.17 对比通过 MPR 和 TMR 单标记二抗完成的微管超分辨成像。微管的免疫标记的抗体为抗 α -tubulin 一抗和单标记二抗（染料蛋白标标记：0.33 -MPR- 和 0.31 -TMR-）。第一列图展示了在超分辨成像相同区域的传统成像图；第二列图展示了对应的超分辨成像结果；第三列图展示了从超分辨重构成像结果分析的定位密度地图。标尺：2 μm 。

Figure 4.17 Comparison on the super-resolution imaging of microtubules with single-labeled secondary antibodies of MPR and TMR. Microtubules were immunostained with primary antibody against α -tubulin and single-labeled secondary antibodies (dye-to-protein ratio: 0.33 -MPR- and 0.31 -TMR-). The first column shows the conventional images on the same region acquired before super-resolution imaging; the second column shows the corresponding super-resolution imaging results; the third column shows the corresponding localization density maps analyzed from the reconstructed images. Scale bars: 2 μm .

另一方面，从每个染料五组成像结果比较分析显示，MPR 在成像条件下的单分子亮度 (980) 仅仅略高于 TMR (920)，虽然在单分子分析中，TMR 展现出显著的弱于 MPR 的单分子亮度 (表 4.5)。TMR 的相对增强的单分子亮度可能与固定细胞微管的微环境具有比水溶液环境更高的粘度有关，这样的微环境可能抑制 TMR 的非辐射跃迁从而提

升其单分子亮度。因为两种染料表现出的相似的亮度，两者的平均定位精度也接近（图 4.16b）。MPR 相比于 TMR 略微变差的定位精度（MPR: 16.8 nm; TMR: 15.8 nm）可能来源于其略微提升的背景噪音，因为 MPR 在超分辨成像每帧图中能够给出更多数量的单分子信号。

尽管如此，因为 MPR 的超分辨成像展现出显著提升的定位密度和成像质量，MPR 具有比 TMR 更好的定位型超分辨成像能力。

MPR 和 TMR 的超分辨成像能力也在其它标记密度的微管上进行了比较分析，这些微管的染料标记密度要低于图 4.15 的密度。这部分的对比成像通过使用接近单标记的一抗（这些一抗同时也应用于前述的单分子分析，见 4.5.4 节）降低染料在微管的标记密度。如图 4.17 所示，两种荧光团的传统荧光成像展示了相似的连续的丝状结构，这与他们在相同标记条件下获得相似标记密度的预期一致。然而，它们的超分辨重构成像结果在连续性方面展现了巨大差异。MPR 的重构结果保持了连续性的微管丝状结构而 TMR 几乎无法分辨这些结构。这些结果与更高标记密度的结果（图 4.15）以及模拟分析结果（图 4.13）一致。定量的数据分析显示，MPR 在微管结构上的平均定位密度为 659 定位/ μm^2 ，两倍于 TMR 的数据（368 定位/ μm^2 ）。因为在相同实验条件下应当获得相似的标记密度，这种定位密度的差异主要来源于 MPR 和 TMR 在成像液中闪烁统计特征的差异（表 4.5），正如前文所述。

另外，在过去的报道中，TMR 在包括除氧系统的成像液体系中完成超分辨成像时会出现“幽灵”的标记结构背景（见文献^[35]补充材料页码 S30，倒数第三和第四行）。这些“幽灵”噪音会给定位带来偏差同时模糊标记结构的内在特征。因此，为了避免这些噪音，本章节单分子和超分辨成像研究采用了优化后的不包含除氧系统的成像液体系。

总之，MPR 在不同标记密度下获得的高质量成像结果说明 MPR 具有比 TMR 更强的定位型超分辨成像能力。

4.5.6 Mem-R 的活细胞细胞膜超分辨成像及其与 Mem-TMR 的成像结果对比

为了进一步研究季铵化哌嗪罗丹明在活细胞标记成像上的能力，开发了一种双极性的探针，Mem-R ($\Phi=0.64$ ，图 4.19a)，来选择性标记细胞膜结构。同时为了确定季铵化哌嗪罗丹明的超分辨成像能力，设计了一种基于四甲基罗丹明的细胞膜探针，Mem-TMR，与 Mem-R 进行超分辨成像结果进行对比。

磷脂为细胞膜主要组成成分，其分子具有两亲性特点，一端为水溶性的磷脂结构，另一端为脂溶性的长烷烃链。而设计的探针 Mem-R 与 Mem-TMR 也具备有与磷脂相似的两亲性特点，季铵化的哌嗪基团提供水溶性，而正十六烷取代基提供脂溶性。在细胞染色时，长烷烃链驱动探针分子分布于细胞膜，而水溶性季铵化基团促使这些染料停留

在膜外，避免透膜内化，实现对细胞膜的选择性标记。如图 4.18 所示，共聚焦成像证实了两种探针的细胞膜选择性标记能力。

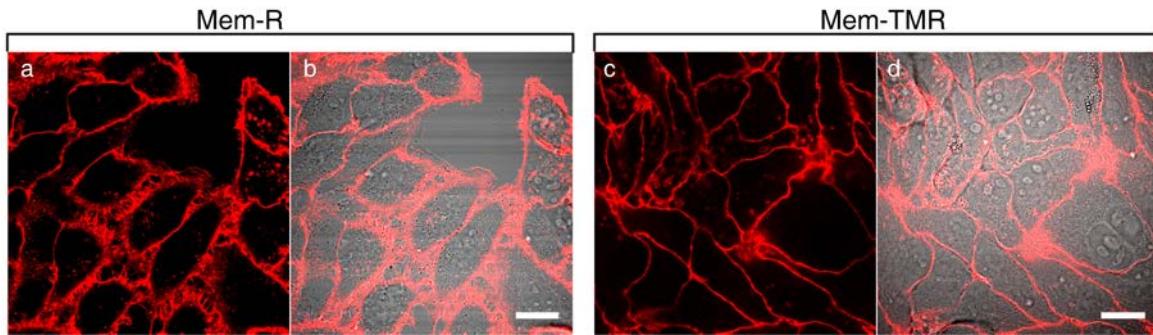


图 4.18 在活 HeLa 细胞中 Mem-R 与 Mem-TMR 的共聚焦荧光成像。（a 和 c）Mem-R 和 Mem-TMR 的荧光信号。（b 和 d）相同细胞的白场与荧光信号叠加图。Mem-R 和 Mem-TMR 的荧光信号准确定位于白场显示的细胞边缘，与环绕细胞的细胞膜结构形态匹配。

Figure 4.18 Confocal fluorescent imaging of Mem-R and Mem-TMR in live HeLa cells. (a and c) Fluorescent signals from Mem-R and Mem-TMR. (b and d) Merged image from fluorescent and bright-field image of the same cells. The fluorescent signals of Mem-R and Mem-TMR precisely locate the edge of the cell on the bright field, matching the morphology of plasma membrane which surrounds the cell. Scale bars: 20 μ m.

通过 Mem-R 染色实现了活细胞细胞膜的超分辨成像。超分辨成像过程中在细胞膜上可以持续收集到稀疏的单分子信号，这可能与 Mem-R 对细胞膜的可交换标记过程有关（参见 4.5.8 节）。超分辨重构结果（图 4.19b）揭示了细胞膜的细节结构特征，包括细胞膜粗糙的边缘形态、细胞膜的微绒毛结构及绒毛的交错与扭曲等，而宽场成像结果（图 4.19c）只能给出模糊的结果。超分辨重构的定量分析结果显示，成像的单分子亮度为 984（图 4.19d）、定位精度为 20.9 nm（图 4.19e）。不仅如此，如图 4.19f 所示，Mem-R 的良好光物理性质使得高密度单分子追踪实验成为可能，成像结果同时展示了 Mem-R 在细胞膜上不均匀的扩散过程。这些结果显示，Mem-R 具备完成高质量的细胞膜超分辨成像的能力。

在相同条件下通过 Mem-TMR 和 Mem-R 染色活细胞比较了两种染料的细胞膜超分辨成像能力。图 4.20 展示了两种染料的三例典型成像结果。Mem-TMR 的重构结果质量

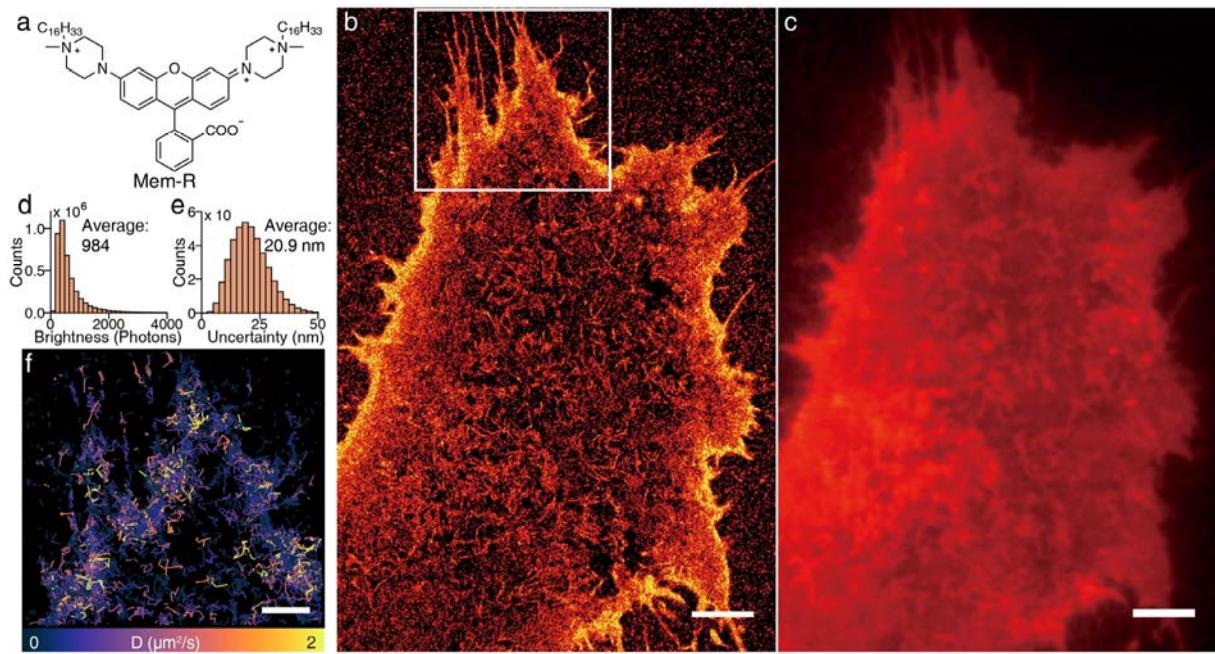


图 4.19 Mem-R 的细胞膜超分辨成像。 (a) Mem-R 的分子结构。使用 Mem-R 染色活 HeLa 细胞细胞膜的 (b) 传统和 (c) 超分辨成像。图 (c) 的单分子亮度 (d) 和定位精度 (e) 直方图。 (f) 图 (c) 标记区域的 Mem-R 高密度单分子追踪分析。单分子轨迹按照它们的扩散系数标记颜色。标尺: 4 μm (b 和 c) ; 2 μm (f) 。

Figure 4.19 Super-resolution imaging of plasma membrane with Mem-R. (a) Molecular structure of Mem-R. (b) Super-resolution and (c) conventional image of the plasma membrane of a live HeLa cell stained with Mem-R. Histogram of single-molecule brightness (d) and localization uncertainties (e) in (b). (f) High-density molecular tracking of Mem-R in the marked region in (b). Trajectories were colored according to their diffusion coefficients. Scale bars: 4 μm (b and c); 2 μm (f).

较低, 可能与染料在膜上的聚集有关系。相反, Mem-R 的重构结果清晰的描绘了细胞膜的边缘形态, 包括底面细胞膜的微绒毛扭曲结构。图 4.21 比较了两种染料重构图像的定位密度的定量化分析结果。Mem-R 展现了 4 倍于 Mem-TMR 的定位密度 (450 定位/ μm^2 -Mem-R- vs 119 定位/ μm^2 -Mem-TMR-)。Mem-R 成像结果从定位密度估算的 Nyquist 分辨率 ($R_{\text{Nyquist}} = 2/\sqrt{\rho}$) ^{[21],[164],[171]} 为 94 nm, 相比于 TMR 的结果 ($R_{\text{Nyquist}} = 183$ nm) 有两倍增强。综上所述, 相比于其类似物 Mem-TMR, Mem-R 展现了显著提升的细胞膜定位型超分辨成像能力。

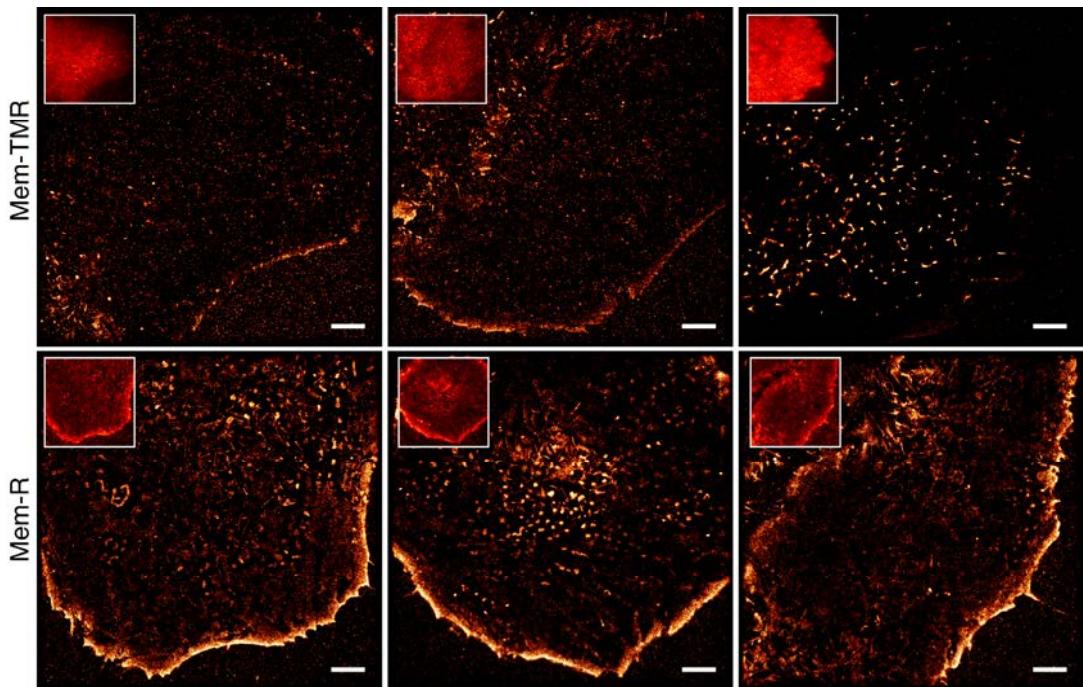


图 4.20 通过 Mem-TMR 和 Mem-R 染色活细胞的细胞膜超分辨成像比较。上图和下图分别显示了从 Mem-TMR 和 Mem-R 的定位数据获得的重构结果。白色框高亮的插图显示了在超分辨成像前收集的相同区域的传统成像图。标尺: 4 μm 。

Figure 4.20 Comparison on the super-resolution imaging of membrane in living cells stained with Mem-TMR and Mem-R. Upper panel shows the reconstructions from localizations of Mem-TMR. The bottom pannal shows the reconstructions from localizations of Mem-R. The white box highlighted insets present the conventional images of the same region, attained before super-resolution imaging. Scale bars: 4 μm .

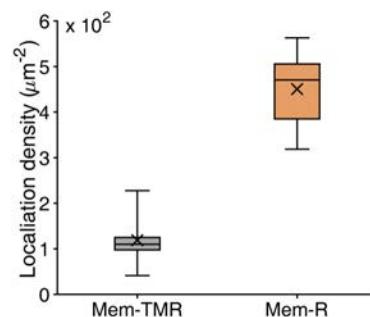


图 4.21 Mem-TMR 和 Mem-R 重构成像结果的定位密度比较。每种染料的数据包含 $n > 10$ 的成像结果。

Figure 4.21 Comparison on the localization densities of the reconstruced images from Mem-TMR and Mem-R. $n > 10$ imaging results were included for each fluorophores.

4.5.7 Lyso-RH 的活细胞溶酶体超分辨成像

季铵化哌嗪罗丹明前体化合物 Lyso-R 在中性环境中就有酸性亚细胞器的聚集倾向。如图 4.22 所示, Lyso-R 在中性环境中处于闭环结构, 并且几乎没有荧光发射; 然而当它透过细胞膜到达酸性亚细胞器后, 质子化的季铵化哌嗪罗丹明 Lyso-RH 具有强烈的荧光发射, 同时季铵化提升了分子的水溶性, 减缓了染料从酸性亚细胞器向外的扩散。这样 Lyso-R 可能具有选择性酸性亚细胞器的标记能力。另一方面, 在中性细胞基质和酸性亚细胞器之间的扩散平衡以及 Lyso-RH 的质子季铵化平衡过程可以为定位型超分辨成像提供理想的亮暗态转换过程, 有利于实现酸性亚细胞器的超分辨成像。

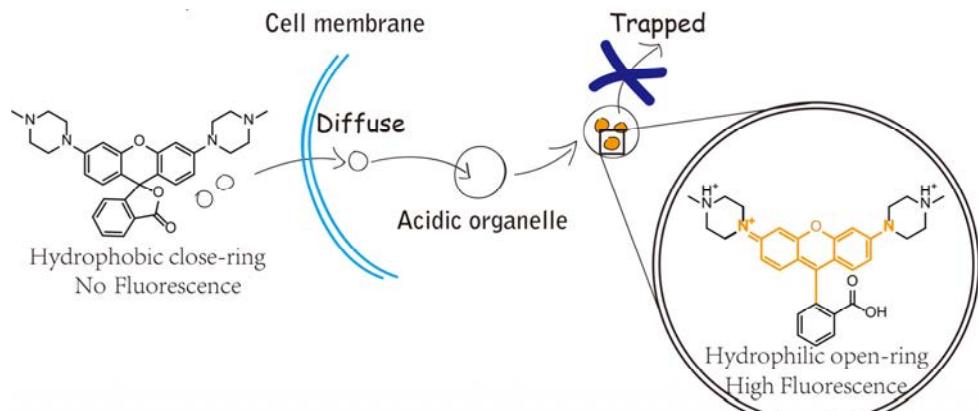


图 4.22 Lyso-R 酸性亚细胞器选择性标记的机理示意图

Figure 4.22 Schematic illustration of the mechanism of the acidic organelle selectivity of Lyso-R.

为了确证 Lyso-RH 在细胞内的真实分布, 在活 HeLa 细胞中对 Lyso-RH 与溶酶体相关膜蛋白 (Lamp-1) 进行了共定位分析。其结果如图 4.23 所示, Lyso-RH 的荧光信号显示了细胞内点状溶酶体分布。对于体积较大的溶酶体, Lamp-1 的融合荧光蛋白给出的荧光信号正好包裹了 Lyso-RH 荧光点信号, 与 Lyso-RH 位于溶酶体基质而 Lamp-1 位于溶酶体膜的结果预期一致; 对于体积较小的溶酶体, Lamp-1 的荧光信号与 Lyso-RH 的信号几乎完全重叠, 说明 Lyso-RH 具有良好的溶酶体标记能力。定量分析结果显示, Lamp-1 与 Lyso-RH 的成像结果具有较高的 Pearson's 相关系数为 0.84 ($n = 21$)。这些结果证明 Lyso-RH 可以选择性标记活细胞的溶酶体。

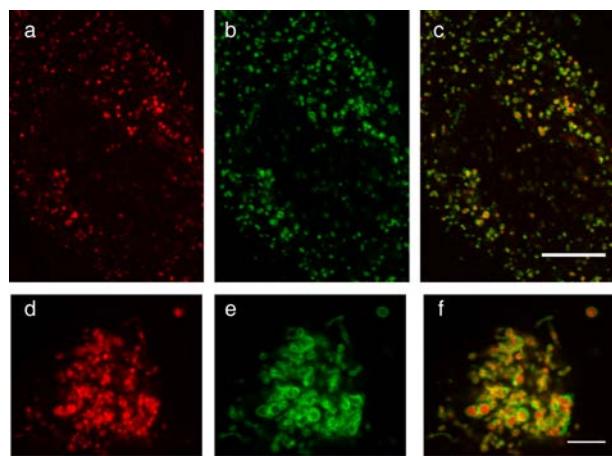


图 4.23 Lyso-R 与溶酶体相关膜蛋白 (Lamp-1) 的共定位分析。Lyso-R 的荧光线号显示在图 (a) 和图 (d) 中。融合在 Lamp-1 蛋白的 mGFP 荧光蛋白的荧光信号显示在图 (b) 和 (e) 中。荧光信号的叠加图显示在图 (c) 和 (f) 中。标尺: 10 μm (a, b 和 c) ; 5 μm (d, e 和 f) 。

Figure 4.23 Colocalization analysis of lysosomal associated-membrane protein 1 (Lamp-1) with Lyso-R. The fluorescence from Lyso-R is showed in images (a) and (d). The fluorescence from mGFP fused with Lamp-1 was showed in images (b) and (e). The merged images were shown in images (c) and (f), respectively. Scale bar: 10 μm (a, b and c); 5 μm (d, e and f).

通过 Lyso-RH 对溶酶体的标记实现了活细胞溶酶体的超分辨成像。由于 Lyso-RH 的质子化平衡过程 (图 4.22, 图 4.24a) 以及细胞内的氧化还原体系^[219], 在普通培养基中活细胞溶酶体上出现了时间分隔重复出现的单分子信号。图 4.25 的统计分析显示 Lyso-RH 具有比商品化 Lysotracker Red 更好的单分子亮度。重构的图像 (图 4.24b 和 e) 显示了球状溶酶体在二维平面投影的真实尺寸和形态, 具有相比衍射极限限制的传统成像结果 (图 4.24c 和 f) 显著提升的清晰度。从超分辨成像图测量的溶酶体大小为 70.3 nm, 与电镜中测量结果接近^{[220],[221]}, 而从传统成像图测量同一溶酶体的大小为 421 nm (图 4.24g)。重构的定量分析显示了超分辨成像结果具有极高的分辨率, 其定位精度为 13.9 nm (图 4.24i), 整体分辨率为 37.6 nm (图 4.24j)。不仅如此, 由于 Lyso-RH 在溶酶体中展现出不依赖于成像液的持续性闪烁特征 (图 4.24k), 实现了对溶酶体长时间的超分辨成像 (图 4.24d), 并且在高的空间分辨率下展示了不同溶酶体的移动特征 (图 4.24d 1-5)。

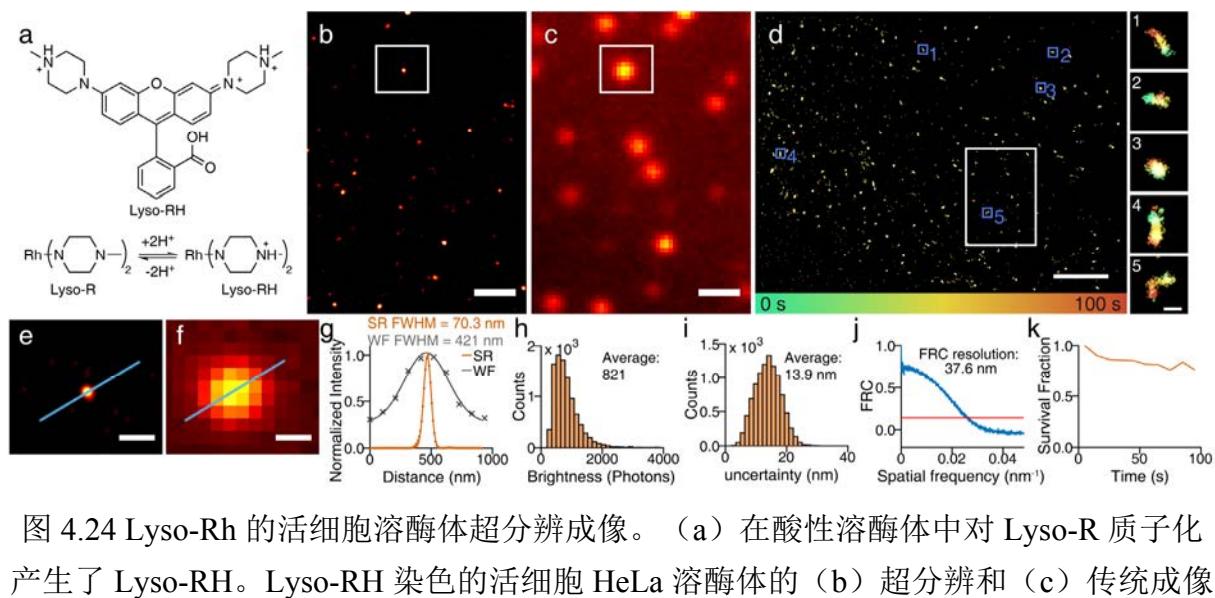


图 4.24 Lyso-RH 的活细胞溶酶体超分辨成像。 (a) 在酸性溶酶体中对 Lyso-R 质子化产生了 Lyso-RH。 Lyso-RH 染色的活细胞 HeLa 溶酶体的 (b) 超分辨和 (c) 传统成像图。 (d) 按时间信息上色的溶酶体超分辨成像图。白色框高亮了图 (b) 的成像区域。右侧展示了典型的溶酶体的放大图像。图 (e) 和 (f) 是图像 (b) 和 (c) 的高亮区域的放大图。 (g) 图 (e) 和 (f) 中蓝线的强度刨线分析。图 (b) 的单分子亮度 (h) 和定位精度 (i) 直方图。 (j) 图 (b) 的傅立叶环相关分析^[165]。 (k) 图 (d) 的成像过程中分子存活率的变化。标尺: 1 μm (b, c) ; 4 μm (d) ; 200 nm (d 1-5) ; 300 nm (e,f) 。

Figure 4.24 Super-resolution imaging of lysosomes in a live cell with Lyso-RH. (a) Protonation of Lyso-R generates Lyso-RH *in situ* in acidic lysosomes. (b) Super-resolution and (c) conventional images of lysosomes in a live HeLa cell stained with Lyso-RH. (d) Time colored super-resolution images of lysosomes. The white box highlights the imaging region of (b). Magnified views of typical lysosomes are presented on the right. Images (e) and (f) were magnified views of the highlighted regions in (b) and (c). (g) Intensity distributions across the blue lines in (e) and (f). Histogram of single-molecule brightness (h) and localization uncertainties (i) in (b). (j) FRC analysis^[165] of (b). (k) The survival fraction of molecules during imaging of (d). Scale bars: 1 μm (b, c); 4 μm (d); 200 nm (d 1-5); 300 nm (e,f).

表 4.6 总结了目前报道的活细胞溶酶体定位型超分辨成像结果。本论文的结果可以与之前报道的结果相比较, 因为其它的结果需要可能具有毒性的成像液 (结果 4) 或者高浓度的染料 (结果 3)。结果 2 报道了一种新型具有溶酶体靶向能力的一氧化氮笼化的罗丹明。然而, 这种染料在光激活后释放的一氧化氮具有生物活性, 可能会干扰活细胞的代谢过程。另一方面, 结果 3 使用了高密度的单分子信号数据, 而非通常的稀疏单

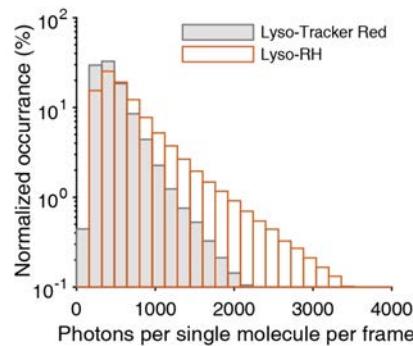


图 4.25 Lyso-RH 和 Lyso-Tracker Red (商品化溶酶体探针) 在活 HeLa 细胞中超分辨成像溶酶体的单分子亮度对比。对于每种荧光团收集并统计了 $n = 10$ 次的成像结果。

Figure 4.25 The comparison of single-molecule brightness between Lyso-RH and Lyso-Tracker Red (commercial lysosomal tracker) during super-resolution imaging of lysosomes in live HeLa cells. Statistic data were collected from $n = 10$ imaging results for each fluorophore.

表 4.6 活细胞溶酶体的定位型超分辨成像比较

Table 4.6 Comparison of localization-based super-resolution imaging of lysosomes in live cells.

序号	研究	荧光团	染色浓度 (μM)	空间分辨率 (nm)	时间分辨率 (s)	单帧收集时间 (ms)	激光强度 ¹	是否加入成像液
1	本论文 (He et al. Chem. Commun. 2018) ^[64]	Lyso-RH	0.5	37.9 ²	10	0.01	532: 2 kW/cm ²	-
2	(Pan et al. Nat. Commun. 2014) ^[138]	NOR535	0.5	未报道	30	0.01	532: 2 kW/cm ²	-
3	(Shim et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2012) ^[3]	Caged-Rh110-labeled probe 5	6	未报道	2	~0.004	473: 0.38 kW/cm ² ; 405: 5.5–23 W/cm ²	-
4		Lyso-Tracker Red	1	30-40 ³	1	~0.002	561: 10 kW/cm ² ; 405: 0-3 W/cm ²	+

¹ 405, 473, 532 是成像中使用激光器的发射波长;

² 从傅立叶环分析估算的分辨率;

³ 按照 Nyquist-Shannon 标准估算的分辨率。

分子信号，为了对高密度的单分子数据进行计算，他们使用了基于 Bayesian 信息准则的高密度的定位算法^{[222],[223]}。结果 4 需要同时利用高强度激光以及成像液，不利于活细胞成像。

4.5.8 Mem-R 和 Lyso-RH 在活细胞内的闪烁行为探究

如前所述，标记有 Mem-R 的活细胞细胞膜和标记有 Lyso-RH 的活细胞溶酶体在超分辨成像过程中均展现出稀疏持续的单分子信号，并且这些闪烁不依赖于成像液，在普通的培养基中即可完成。这些结果不符合单分子分析结果显示的季铵化哌嗪策略染料在 PBS 中有限的闪烁次数预期，活细胞中的闪烁很可能来源于探针对靶标结构的可逆标记过程。对于 Mem-R，该探针持续地标记到靶标细胞膜结构上，这个过程在超分辨成像过程中持续性的产生单分子信号，上述机制与其他可交换的染料探针一致（例如，尼罗红）^{[85],[88],[89],[224]}。对于 Lyso-RH，该探针在培养基以及细胞基质内主要处于非质子化形式（ $pK_{1/2} = 6.56$ ），因而荧光发射较弱（图 4.4）。在酸性溶酶体中，Lyso-RH 质子化为具有强烈荧光发射的 Lyso-RH，这一过程构成了理想的暗态到亮态的转换过程。该过程与该荧光团在细胞基质和溶酶体的扩散平衡过程结合，将为溶酶体超分辨成像过程持续性提供闪烁单分子信号。除了扩散平衡和酸性环境诱导的闪烁机制，Lyso-RH 的闪烁单分子信号也受益于细胞内的氧化还原体系^{[219],[225]}（如，谷胱甘肽）。罗丹明染料已知在这种体系中会出现光致转换的现象（虽然在报道中应用的还原性物质的浓度很高）^{[12],[31]}。因此，得益于这些探针对结构的可逆性标记以及细胞内的氧化还原体系，即使标记在抗体大分子上的 MPR 在没有成像液的条件下并没有多次循环闪烁的过程，按照季铵化哌嗪策略发展的两种细胞器探针仍然可以在活细胞目标结构上展现出有利于有利于成像的闪烁信号。

4.6 本章小结

本章建立了一种新的提升罗丹明染料亮度的策略。该策略通过季铵化哌嗪取代基作为供体，降低了供体的推拉电子效应并且抑制了分子内扭曲电荷转移态的形成。新设计的 MPR 染料相比于传统的 TMR 染料展现了>1 倍的亮度提升，并且通过微管标记成像展现了其定位型超分辨成像能力。基于 MPR，本章开发了一种细胞膜探针 Mem-R、一种溶酶体探针 Lyso-R，这两种染料的高性能荧光特性使得单分子追踪和定位型超分辨成像实验成为可能。

本章开发的季铵化哌嗪策略将启迪未来高性能荧光团的发展，并为荧光成像技术的发展提供帮助。

5 结论与展望

5.1 结论

为了解决超分辨荧光成像及荧光染料领域内染料单分子性质评价分析缺乏准确性和系统性的问题,本论文在第2章建立了完整的单分子分析算法。该算法由三部分构成:首先,通过高斯滤波及小波变换实现单分子信号识别,基于超分辨定位及分子归属分析的方法,排除空间邻近的单分子信号;其次,确定每个单分子信号的采样像素并提取其荧光轨迹,基于隐匿马尔可夫模型,拟合获得单分子的亮暗态轨迹;最后,通过荧光和状态轨迹实现单分子光物理性质的测量。本论文将该算法在 Matlab 平台上转换为单分子分析软件,实现高效规范对单分子信号的分析。

为了提升罗丹明螺内酰亚胺的超分辨成像能力,在本论文第3章设计了一种新的延长激发态持续时长的分子设计策略。通过将羧基引入邻近罗丹明螺环位置,合成了甘氨酸罗丹明 Rh-Gly,实现了分子内酸性环境的构建,延长了罗丹明螺内酰亚胺的两性离子亮态。单分子研究证实了邻接羧基罗丹明螺内酰亚胺显著延长的亮态,其亮态时长通过酸性策略可由~30 ms 延长至~60 ms,同时该研究预测这类罗丹明具备更优秀的定位型超分辨成像能力。通过 Rh-Gly,实现了对活细胞的线粒体超分辨成像,成像达到了 10 s 的时间分辨率和~25 nm 的定位精度;通过 Rh-Gly 的标记衍生物,实现了活细胞细胞核组蛋白和固定细胞微管的超分辨成像。

为了改善传统罗丹明的亮度,在本论文的第4章提出季铵化哌嗪取代的分子设计策略。利用季铵化哌嗪取代基的吸电子诱导效应,削弱氨基给电子能力,抑制分子内扭曲态等非辐射跃迁过程,提升罗丹明染料的亮度。基于该策略合成的季铵化哌嗪罗丹明 MPR 和 Lyso-RH 在水中显示了接近两倍于传统四甲基罗丹明 TMR 的荧光量子产率。光物理性质研究及基于该策略萘酰亚胺和 NBD 染料光谱研究证明了季铵化哌嗪策略对改善推拉体系荧光团的亮度的有效性。在单分子水平上,MPR 展现出比 TMR 更好的单分子光子统计数据以及更有潜力的定位型超分辨成像能力,且在固定细胞微管超分辨成像证实了 MPR 具备更强的超分辨成像能力。通过基于该策略开发的细胞膜探针 Mem-R 与溶酶体探针 Lyso-RH,实现了对活细胞细胞膜和溶酶体的超分辨成像及细胞膜表面单分子追踪分析。

5.2 创新点

- (1) 以超分辨成像定位分析算法以及单分子能量转移分析方法为基础, 建立了完整的单分子数据处理分析方法并开发了单分子处理分析软件。
- (2) 受罗丹明螺内酰亚胺相关探针响应机制启发, 开发了一种延长罗丹明螺内酰亚胺激发态亮态持续时长的分子设计策略。基于该策略染料实现了时间(10 s)和空间(~ 50 nm)分辨率平衡的活细胞线粒体定位型超分辨成像。
- (3) 为抑制分子内扭曲电荷转移态的形成, 设计一种季铵化哌嗪取代的分子设计策略提升罗丹明染料的亮度。通过该策略开发的探针, 实现了对活细胞细胞膜和溶酶体的超分辨成像。

5.3 展望

本论文建立的单分子分析算法和开发的分析软件将为荧光染料领域的科学的研究者提供标准化的分析工具, 为领域内逐步完善染料的单分子评价体系提供有价值的基础平台, 促进超分辨成像染料的开发。

本论文提出的两种罗丹明染料的开发设计策略, 将启发多样化的超分辨染料分子的开发; 基于这两种策略开发的模型染料, 将成为未来的超分辨染料开发的平台分子, 推动超分辨探针的开发, 并进一步促进超分辨成像技术的发展和进化。

目前研究者对染料分子结构与其单分子光物理性质乃至与其定位型超分辨成像性质的关联仍不明确。在荧光染料领域内, 超分辨染料的开发仍然处于积累和试错的阶段。未来应提升分子结构与超分辨相关性质关联性研究, 推动适用于超分辨染料成像的染料分子设计策略的发展。

参 考 文 献

- [1] Bates M., Huang B., Dempsey G. T., et al. Multicolor Super-Resolution Imaging with Photo-Switchable Fluorescent Probes[J].*Science*, 2007,317(5845):1749–1753.
- [2] Xu K., Zhong G., Zhuang X. Actin, Spectrin, and Associated Proteins Form a Periodic Cytoskeletal Structure in Axons[J].*Science*, 2013,339(6118):452–456.
- [3] Shim S.-H., Xia C., Zhong G., et al. Super-Resolution Fluorescence Imaging of Organelles in Live Cells with Photoswitchable Membrane Probes[J].*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012,109(35):13978–13983.
- [4] Klar T. A., Jakobs S., Dyba M., et al. Fluorescence Microscopy with Diffraction Resolution Barrier Broken by Stimulated Emission[J].*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000,97(15):8206–8210.
- [5] Betzig E., Patterson G. H., Sougrat R., et al. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution[J].*Science*, 2006,313(5793):1642–1645.
- [6] Rust M. J., Bates M., Zhuang X. Sub-Diffraction-Limit Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM)[J].*Nature Methods*, 2006,3:793–796.
- [7] Gustafsson M. G. L. Surpassing the Lateral Resolution Limit by a Factor of Two Using Structured Illumination Microscopy[J].*Journal of Microscopy*, 2000,198(2):82–87.
- [8] van de Linde S., Sauer M. How to Switch a Fluorophore: From Undesired Blinking to Controlled Photoswitching[J].*Chemical Society reviews*, 2014,43(4):1076–1087.
- [9] Vogelsang J., Steinhauer C., Forthmann C., et al. Make Them Blink: Probes for Super-Resolution Microscopy[J].*Chemphyschem*, 2010,11(12):2475–2490.
- [10] Hess S. T., Girirajan T. P. K., Mason M. D. Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy[J].*Biophysical Journal*, 2006,91(11):4258–4272.
- [11] Fölling J., Bossi M., Bock H., et al. Fluorescence Nanoscopy by Ground-State Depletion and Single-Molecule Return[J].*Nature Methods*, 2008,5(11):943–945.
- [12] Heilemann M., van de Linde S., Schüttelpehl M., et al. Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes[J].*Angewandte Chemie International Edition*, 2008,47(33):6172–6176.
- [13] Harms G. S., Cognet L., Lommerse P. H. M., et al. Autofluorescent Proteins in Single-Molecule Research: Applications to Live Cell Imaging Microscopy[J].*Biophysical Journal*, 2001,80(5):2396–2408.
- [14] Deschout H., Zanacchi F. C., Mlodzianoski M., et al. Precisely and Accurately Localizing Single Emitters in Fluorescence Microscopy[J].*Nature Methods*, 2014,11:253–266.
- [15] Thompson R. E., Larson D. R., Webb W. W. Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes[J].*Biophysical Journal*, 2002,82(5):2775–2783.
- [16] Zhu L., Zhang W., Elnatan D., et al. Faster STORM Using Compressed Sensing[J].*Nature Methods*, 2012,9:721–723.
- [17] Nehme E., Weiss L. E., Michaeli T., et al. Deep-STORM: Super-Resolution Single-Molecule Microscopy by Deep Learning[J].*Optica*, 2018,5:458–464.

- [18] Cox S., Rosten E., Monypenny J., et al. Bayesian Localization Microscopy Reveals Nanoscale Podosome Dynamics[J].*Nature Methods*, 2012,9(2):195–200.
- [19] Hofmann M., Eggeling C., Jakobs S., et al. Breaking the Diffraction Barrier in Fluorescence Microscopy at Low Light Intensities by Using Reversibly Photoswitchable Proteins[J].*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005,102(49):17565–17569.
- [20] Dertinger T., Colyer R., Iyer G., et al. Fast, Background-Free, 3D Super-Resolution Optical Fluctuation Imaging (SOFI)[J].*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009,106(52):22287–22292.
- [21] Shroff H., Galbraith C. G., Galbraith J. A., et al. Live-Cell Photoactivated Localization Microscopy of Nanoscale Adhesion Dynamics[J].*Nature methods*, 2008,5:417–423.
- [22] Bernard J., Fleury L., Talon H., et al. Photon Bunching in the Fluorescence from Single Molecules: A Probe for Intersystem Crossing[J].*The Journal of Chemical Physics*, 1993,98(2):850–859.
- [23] Zumbusch A., Fleury L., Brown R., et al. Probing Individual Two-Level Systems in a Polymer by Correlation of Single Molecule Fluorescence[J].*Physical Review Letters*, 1993,70(23):3584–3587.
- [24] Trautman J. K., Macklin J. J. Time-Resolved Spectroscopy of Single Molecules Using near-Field and Far-Field Optics[J].*Chemical Physics*, 1996,205(1):221–229.
- [25] Lu H. P., Xie X. S. Single-Molecule Spectral Fluctuations at Room Temperature[J].*Nature*, 1997,385(6612):143–146.
- [26] Dickson R. M., Cubitt A. B., Tsien R. Y., et al. On/off Blinking and Switching Behaviour of Single Molecules of Green Fluorescent Protein.[J].*Nature*, 1997,388(6640):355–358.
- [27] Patterson G. H., Lippincott-Schwartz J. A Photoactivatable GFP for Selective Photolabeling of Proteins and Cells[J].*Science*, 2002,297(5588):1873–1877.
- [28] Bates M., Blosser T. R., Zhuang X. Short-Range Spectroscopic Ruler Based on a Single-Molecule Optical Switch[J].*Physical Review Letters*, 2005,94(10):1–4.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] Steinhauer C., Forthmann C., Vogelsang J., et al. Superresolution Microscopy on the Basis of Engineered Dark States[J].*Journal of the American Chemical Society*, 2008,130(50):16840–16841.
- [32] Heilemann M., van de Linde S., Mukherjee A., et al. Super-Resolution Imaging with Small Organic Fluorophores[J].*Angewandte Chemie International Edition*, 2009,48(37):6903–6908.
- [33] Dempsey G. T., Bates M., Kowtoniuk W. E., et al. Photoswitching Mechanism of Cyanine Dyes.[J].*Journal of the American Chemical Society*, 2009,131(51):18192–18193.
- [34] Wombacher R., Heidbreder M., van de Linde S., et al. Live-Cell Super-Resolution Imaging with Trimethoprim Conjugates[J].*Nature Methods*, 2010,7:717–719.
- [35] Dempsey G. T., Vaughan J. C., Chen K. H., et al. Evaluation of Fluorophores for Optimal Performance in Localization-Based Super-Resolution Imaging[J].*Nature Methods*, 2011,8:1027–1036.
- [36] Belov V. N., Wurm C. A., Boyarskiy V. P., et al. Rhodamines NN: A Novel Class of Caged Fluorescent Dyes[J].*Angewandte Chemie International Edition*, 2010,49(20):3520–3523.
- [37] Vaughan J. C., Jia S., Zhuang X. Ultrabright Photoactivatable Fluorophores Created by Reductive Caging[J].*Nature Methods*, 2012,9(12):1181–1184.

- [38] 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: 132–139.
- [39] 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.
- [40] Uno S., 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: 681–689.
- [41] 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: 244–250.
- [42] Roubinet B., Weber M., Shoaiei 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.
- [43] Wijesooriya C. S., Peterson J. A., Shrestha P., et al. A Photoactivatable BODIPY Probe for Localization-Based Super-Resolution Cellular Imaging[J].*Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(39): 12685–12689.
- [44] Grimm J. B., English B. P., Choi H., et al. Bright Photoactivatable Fluorophores for Single-Molecule Imaging[J].*Nature Methods*, 2016, 13: 985–988.
- [45] Grimm J. B., Muthusamy A. K., Liang Y., et al. A General Method to Fine-Tune Fluorophores for Live-Cell and in Vivo Imaging[J].*Nature methods*, 2017, 14(10): 987–994.
- [46] Liu X., Qiao Q., Tian W., et al. Aziridinyl Fluorophores Demonstrate Bright Fluorescence and Superior Photostability by Effectively Inhibiting Twisted Intramolecular Charge Transfer[J].*Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(22): 6960–6963.
- [47] Song X., Johnson A., Foley J. 7-Azabicyclo[2.2.1]Heptane as a Unique and Effective Dialkylamino Auxochrome Moiety: Demonstration in a Fluorescent Rhodamine Dye[J].*Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(52): 17652–17653.
- [48] Mitronova G. Y., Belov V. N., Bossi M. L., et al. New Fluorinated Rhodamines for Optical Microscopy and Nanoscopy[J].*Chemistry - A European Journal*, 2010, 16(15): 4477–4488.
- [49] Belov V. N., Mitronova G. Y., Bossi M. L., et al. Masked Rhodamine Dyes of Five Principal Colors Revealed by Photolysis of a 2-Diazo-1-Indanone Caging Group: Synthesis, Photophysics, and Light Microscopy Applications[J].*Chemistry – A European Journal*, 2014, 20(41): 13162–13173.
- [50] Singha S., Kim D., Roy B., et al. A Structural Remedy toward Bright Dipolar Fluorophores in Aqueous Media[J].*Chemical Science*, 2015, 6(7): 4335–4342.
- [51] Sanborn M. E., Connolly B. K., Gurunathan K., et al. Fluorescence Properties and Photophysics of the Sulfoindocyanine Cy3 Linked Covalently to DNA[J].*The Journal of Physical Chemistry B*, 2007, 111(37): 11064–11074.
- [52] Waggoner A. S., Mujumdar R. B. Rigidized Trimethine Cyanine Dyes: US, 6133445 A[P]. 2000, 10, 17.
- [53] Cooper M., Ebner A., Briggs M., et al. Cy3BTM: Improving the Performance of Cyanine Dyes[J].*Journal of Fluorescence*, 2004, 14(2): 145–150.
- [54] Michie M. S., Götz R., Franke C., et al. Cyanine Conformational Restraint in the Far-Red Range[J].*Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(36): 12406–12409.

- [55] Lord S. J., Conley N. R., Lee H. 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.
- [56] Lord S. J., Lee H. D., Samuel R., et al. Azido Push–Pull Fluorogens Photoactivate to Produce Bright Fluorescent Labels[J].The Journal of Physical Chemistry B, 2010,114(45):14157–14167.
- [57] Pelliccioli A. P., Wirz J. Photoremovable Protecting Groups: Reaction Mechanisms and Applications[J].Photochemical & Photobiological Sciences, 2002,1(7):441–458.
- [58] Mitchison T. J., Sawin K. E., Theriot J. A., et al. Caged Fluorescent Probes[J].Methods in Enzymology, 1998,291(2):63–78.
- [59] Wysocki L. M., Grimm J. B., Tkachuk A. N., et al. Facile and General Synthesis of Photoactivatable Xanthene Dyes[J].Angewandte Chemie International Edition, 2011,50(47):11206–11209.
- [60] Banala S., Maurel D., Manley S., et al. A Caged, Localizable Rhodamine Derivative for Superresolution Microscopy[J].ACS Chemical Biology, 2012,7(2):289–293.
- [61] Kobayashi T., Urano Y., Kamiya M., et al. Highly Activatable and Rapidly Releasable Caged Fluorescein Derivatives[J].Journal of the American Chemical Society, 2007,129(21):6696–6697.
- [62] Grimm J. B., Klein T., Kopek B. G., et al. Synthesis of a Far-Red Photoactivatable Silicon-Containing Rhodamine for Super-Resolution Microscopy[J].Angewandte Chemie International Edition, 2016,128(5):1755–1759.
- [63] He H., Ye Z., Xiao Y., et al. Super-Resolution Monitoring of Mitochondrial Dynamics upon Time-Gated Photo-Triggered Release of Nitric Oxide[J].Analytical Chemistry, 2018,90(3):2164–2169.
- [64] He H., Ye Z., Zheng Y., et al. Super-Resolution Imaging of Lysosomes with a Nitroso-Caged Rhodamine[J].Chemical Communications, 2018,54(23):2842–2845.
- [65] Tang J., Robichaux M. A., Wu K.-L., et al. Single-Atom Fluorescence Switch: A General Approach toward Visible-Light-Activated Dyes for Biological Imaging[J].Journal of the American Chemical Society, 2019,141(37):14699–14706.
- [66] Montenegro H., Di Paolo M., Capdevila D., et al. The Mechanism of the Photochromic Transformation of Spirorhodamines[J].Photochemical & Photobiological Sciences, 2012,11(6):1081–1086.
- [67] Fukaminato T., Tateyama E., Tamaoki N. Fluorescence Photoswitching Based on a Photochromic PKA Change in an Aqueous Solution[J].Chemical Communications, 2012,48(88):10874–10876.
- [68] 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.
- [69] Roubinet B., Bischoff M., Nizamov S., et al. Photoactivatable Rhodamine Spiroamides and Diazoketones Decorated with “Universal Hydrophilizer” or Hydroxyl Groups[J].The Journal of Organic Chemistry, 2018,83(12):6466–6476.
- [70] Macdonald P. J., Gayda S., Haack R. A., et al. Rhodamine-Derived Fluorescent Dye with Inherent Blinking Behavior for Super-Resolution Imaging[J].Analytical Chemistry, 2018,90(15):9165–9173.
- [71] Irie M., Fukaminato T., Sasaki T., et al. A Digital Fluorescent Molecular Photoswitch[J].Nature, 2002,420(6917):759–760.
- [72] Fukaminato T., Umemoto T., Iwata Y., et al. Photochromism of Diarylethene Single Molecules in Polymer Matrices[J].Journal of the American Chemical Society, 2007,129(18):5932–5938.

- [73] Saita S., Yamaguchi T., Kawai T., et al. Two-Photon Photochromism of Diarylethene Dimer Derivatives[J].*ChemPhysChem*, 2005,6(11):2300–2306.
- [74] Uno K., Niikura H., Morimoto M., et al. In Situ Preparation of Highly Fluorescent Dyes upon Photoirradiation[J].*Journal of the American Chemical Society*, 2011,133(34):13558–13564.
- [75] Nevskyi O., Sysioev D., Oppermann A., et al. Nanoscopic Visualization of Soft Matter Using Fluorescent Diarylethene Photoswitches[J].*Angewandte Chemie International Edition*, 2016,55(41):12698–12702.
- [76] Li C., Gong W.-L., Hu Z., et al. Photoswitchable Aggregation-Induced Emission of a Dithienylethene-Tetraphenylethene Conjugate for Optical Memory and Super-Resolution Imaging[J].*RSC Advances*, 2013,3(23):8967–8972.
- [77] Li C., Yan H., Zhao L.-X., et al. A Trident Dithienylethene-Perylenemonoimide Dyad with Super Fluorescence Switching Speed and Ratio[J].*Nature Communications*, 2014,5(1):5709.
- [78] Li C., Hu Z., Aldred M. P., et al. Water-Soluble Polymeric Photoswitching Dyads Impart Super-Resolution Lysosome Highlighters[J].*Macromolecules*, 2014,47(24):8594–8601.
- [79] Liu J.-X., Xin B., Li C., et al. PEGylated Perylenemonoimide-Dithienylethene for Super-Resolution Imaging of Liposomes[J].*ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017,9(12):10338–10343.
- [80] Seefeldt B., Kasper R., Beining M., et al. Spiropyrans as Molecular Optical Switches[J].*Photochemical & Photobiological Sciences*, 2010,9(2):213–220.
- [81] Deniz E., Tomasulo M., Cusido J., et al. Photoactivatable Fluorophores for Super-Resolution Imaging Based on Oxazine Auxochromes[J].*The Journal of Physical Chemistry C*, 2012,116(10):6058–6068.
- [82] Cusido J., Ragab S. S., Thapaliya E. R., et al. A Photochromic Bioconjugate with Photoactivatable Fluorescence for Superresolution Imaging[J].*The Journal of Physical Chemistry C*, 2016,120(23):12860–12870.
- [83] Gu X., Zhao E., Zhao T., et al. A Mitochondrion-Specific Photoactivatable Fluorescence Turn-On AIE-Based Bioprobe for Localization Super-Resolution Microscope[J].*Advanced Materials*, 2016,28(25):5064–5071.
- [84] Uno S., Kamiya M., Morozumi A., et al. A Green-Light-Emitting, Spontaneously Blinking Fluorophore Based on Intramolecular Spirocyclization for Dual-Colour Super-Resolution Imaging[J].*Chemical Communications*, 2018,54(1):102–105.
- [85] Sharonov A., Hochstrasser R. M. Wide-Field Subdiffraction Imaging by Accumulated Binding of Diffusing Probes[J].*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006,103(50):18911–18916.
- [86] Jungmann R., Steinhauer C., Scheible M., et al. Single-Molecule Kinetics and Super-Resolution Microscopy by Fluorescence Imaging of Transient Binding on DNA Origami[J].*Nano Letters*, 2010,10(11):4756–4761.
- [87] Jungmann R., Avendaño M. S., Woehrstein J. B., et al. Multiplexed 3D Cellular Super-Resolution Imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT[J].*Nature methods*, 2014,11(3):313–318.
- [88] Kiuchi T., Higuchi M., Takamura A., et al. Multitarget Super-Resolution Microscopy with High-Density Labeling by Exchangeable Probes[J].*Nature Methods*, 2015,12(8):743–746.
- [89] Legant W. R., Shao L., Grimm J. B., et al. High-Density Three-Dimensional Localization Microscopy across Large Volumes[J].*Nature Methods*, 2016,13(4):359–365.

- [90] Takakura H., Zhang Y., Erdmann R. S., et al. Long Time-Lapse Nanoscopy with Spontaneously Blinking Membrane Probes[J].*Nature Biotechnology*, 2017,35:773–780.
- [91] Danylchuk D. I., Moon S., Xu K., et al. Switchable Solvatochromic Probes for Live-Cell Super-Resolution Imaging of Plasma Membrane Organization[J].*Angewandte Chemie International Edition*, 2019,58(42):14920–14924.
- [92] Sun W.-C., Gee K. R., Klaubert D. H., et al. Synthesis of Fluorinated Fluoresceins[J].*The Journal of Organic Chemistry*, 1997,62(19):6469–6475.
- [93] 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.
- [94] Liphardt B., Liphardt B., Lüttke W. Laser Dyes III: Concepts to Increase the Photostability of Laser Dyes[J].*Optics Communications*, 1983,48(2):129–133.
- [95] Liphardt B., Liphardt B., Lüttke W. Laser Dyes with Intramolecular Triplet Quenching[J].*Optics Communications*, 1981,38(3):207–210.
- [96] 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.
- [97] Holzmeister P., Gietl A., Tinnefeld P. Geminate Recombination as a Photoprotection Mechanism for Fluorescent Dyes[J].*Angewandte Chemie International Edition*, 2014,53(22):5685–5688.
- [98] Altman R. B., Terry D. S., Zhou Z., et al. Cyanine Fluorophore Derivatives with Enhanced Photostability[J].*Nature Methods*, 2012,9(1):68–71.
- [99] Zheng Q., Jockusch S., Zhou Z., et al. On the Mechanisms of Cyanine Fluorophore Photostabilization[J].*The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2012,3(16):2200–2203.
- [100] van der Velde J. H. M., Ploetz E., Hiermaier M., et al. Mechanism of Intramolecular Photostabilization in Self-Healing Cyanine Fluorophores[J].*ChemPhysChem*, 2013,14(18):4084–4093.
- [101] van der Velde J. H. M., Oelerich J., Huang J., et al. A Simple and Versatile Design Concept for Fluorophore Derivatives with Intramolecular Photostabilization[J].*Nature Communications*, 2016,7:10144.
- [102] Zheng Q., Jockusch S., Zhou Z., et al. Electronic Tuning of Self-Healing Fluorophores for Live-Cell and Single-Molecule Imaging[J].*Chemical Science*, 2017,8(1):755–762.
- [103] Smit J. H., van der Velde J. H. M., Huang J., et al. On the Impact of Competing Intra- and Intermolecular Triplet-State Quenching on Photobleaching and Photoswitching Kinetics of Organic Fluorophores[J].*Physical Chemistry Chemical Physics*, 2019,21(7):3721–3733.
- [104] Glebockyte V., Lincoln R., Cosa G. Cy3 Photoprotection Mediated by Ni²⁺ for Extended Single-Molecule Imaging: Old Tricks for New Techniques[J].*Journal of the American Chemical Society*, 2015,137(3):1116–1122.
- [105] Glebockyte V., Wieneke R., Gatterdam K., et al. Tris-N-Nitritolriacetic Acid Fluorophore as a Self-Healing Dye for Single-Molecule Fluorescence Imaging[J].*Journal of the American Chemical Society*, 2018,140(35):11006–11012.
- [106] Ormö M., Cubitt A. B., Kallio K., et al. Crystal Structure of the Aequorea Victoria Green Fluorescent Protein[J].*Science*, 1996,273(5280):1392–1395.
- [107] Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., et al. UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis[J].*Journal of Computational Chemistry*, 2004,25(13):1605–1612.

- [108] Subach F. V., Patterson G. H., Manley S., et al. Photoactivatable MCherry for High-Resolution Two-Color Fluorescence Microscopy[J].*Nature methods*, 2009,6(2):153–159.
- [109] Subach O. M., Patterson G. H., Ting L. M., et al. A Photoswitchable Orange-to-Far-Red Fluorescent Protein, PSmOrange[J].*Nature Methods*, 2011,8(9):771–780.
- [110] McKinney S. A., Murphy C. S., Hazelwood K. L., et al. A Bright and Photostable Photoconvertible Fluorescent Protein.[J].*Nature methods*, 2009,6(2):131–133.
- [111] Zhang M., Chang H., Zhang Y., et al. Rational Design of True Monomeric and Bright Photoactivatable Fluorescent Proteins[J].*Nature methods*, 2012,9(7):727–729.
- [112] Brakemann T., Stiel A. C., Weber G., et al. A Reversibly Photoswitchable GFP-like Protein with Fluorescence Excitation Decoupled from Switching[J].*Nature Biotechnology*, 2011,29(10):942–950.
- [113] Wang S., Moffitt J. R., Dempsey G. T., et al. Characterization and Development of Photoactivatable Fluorescent Proteins for Single-Molecule-Based Superresolution Imaging[J].*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014,111(23):8452–8457.
- [114] Miller L. W., Cai Y., Sheetz M. P., et al. In Vivo Protein Labeling with Trimethoprim Conjugates: A Flexible Chemical Tag[J].*Nature Methods*, 2005,2(4):255–257.
- [115] Calloway N. T., Choob M., Sanz A., et al. Optimized Fluorescent Trimethoprim Derivatives for in Vivo Protein Labeling[J].*ChemBioChem*, 2007,8(7):767–774.
- [116] Jing C., Cornish V. W. Chemical Tags for Labeling Proteins Inside Living Cells[J].*Accounts of Chemical Research*, 2011,44(9):784–792.
- [117] Keppler A., Gendreizig S., Gronemeyer T., et al. A General Method for the Covalent Labeling of Fusion Proteins with Small Molecules in Vivo[J].*Nature Biotechnology*, 2003,21(1):86–89.
- [118] Los G. V., Encell L. P., McDougall M. G., et al. HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis[J].*ACS Chemical Biology*, 2008,3(6):373–382.
- [119] Wang L., Schultz P. G. Expanding the Genetic Code[J].*Angewandte Chemie International Edition*, 2005,44(1):34–66.
- [120] Xue L., Karpenko I. A., Hiblot J., et al. Imaging and Manipulating Proteins in Live Cells through Covalent Labeling[J].*Nature Chemical Biology*, 2015,11(November):1–7.
- [121] Lee H. D. 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.
- [122] Klein T., Löscherger A., Proppert S., et al. Live-Cell DSTORM with SNAP-Tag Fusion Proteins[J].*Nature Methods*, 2011,8:7–9.
- [123] Agard N. J., Prescher J. A., Bertozzi C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems[J].*Journal of the American Chemical Society*, 2004,126(46):15046–15047.
- [124] Blackman M. L., Royzen M., Fox J. M. Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Reactivity[J].*Journal Of The American Chemical Society*, 2008,130(41):13518–13519.
- [125] Becer C. R., Hoogenboom R., Schubert U. S. Click Chemistry beyond Metal-Catalyzed Cycloaddition[J].*Angewandte Chemie International Edition*, 2009,48(27):4900–4908.

- [126] Nikić I., Plass T., Schraadt O., et al. Minimal Tags for Rapid Dual-Color Live-Cell Labeling and Super-Resolution Microscopy[J].*Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53:2245–2249.
- [127] Uttamapinant C., Howe J. D., Lang K., et al. Genetic Code Expansion Enables Live-Cell and Super-Resolution Imaging of Site-Specifically Labeled Cellular Proteins[J].*Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(14):4602–4605.
- [128] Kozma E., Estrada Girona G., Paci G., et al. Bioorthogonal Double-Fluorogenic Siliconrhodamine Probes for Intracellular Super-Resolution Microscopy[J].*Chemical Communications*, 2017, 53(50):6696–6699.
- [129] Neubert F., Beliu G., Terpitz U., et al. Bioorthogonal Click Chemistry Enables Site-Specific Fluorescence Labeling of Functional NMDA Receptors for Super-Resolution Imaging[J].*Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(50):16364–16369.
- [130] Beliu G., Kurz A. J., Kuhlemann A. C., et al. Bioorthogonal Labeling with Tetrazine-Dyes for Super-Resolution Microscopy[J].*Communications Biology*, 2019, 2(1):261.
- [131] Chin J. W. Expanding and Reprogramming the Genetic Code[J].*Nature*, 2017, 550:53.
- [132] Oliveira B. L., Guo Z., Bernardes G. J. L. Inverse Electron Demand Diels–Alder Reactions in Chemical Biology[J].*Chemical Society Reviews*, 2017, 46(16):4895–4950.
- [133] Carlini L., Manley S. Live Intracellular Super-Resolution Imaging Using Site-Specific Stains[J].*ACS Chemical Biology*, 2013, 8(12):2643–2648.
- [134] 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.
- [135] Lukinavičius G., Reymond L., Umezawa K., et al. Fluorogenic Probes for Multicolor Imaging in Living Cells[J].*Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(30):9365–9368.
- [136] Lukinavičius G., Mitronova G. Y., Schnorrenberg S., et al. Fluorescent Dyes and Probes for Super-Resolution Microscopy of Microtubules and Tracheoles in Living Cells and Tissues[J].*Chemical Science*, 2018, 9(13):3324–3334.
- [137] Knorr G., Kozma E., Schaart J. M., et al. Bioorthogonally Applicable Fluorogenic Cyanine-Tetrazines for No-Wash Super-Resolution Imaging[J].*Bioconjugate Chemistry*, 2018, 29(4):1312–1318.
- [138] Pan D., Hu Z., Qiu F., et al. A General Strategy for Developing Cell-Permeable Photo-Modulatable Organic Fluorescent Probes for Live-Cell Super-Resolution Imaging[J].*Nature Communications*, 2014, 5:5573.
- [139] Starck J.-L., Murtagh F. *Astronomical Image and Data Analysis*[M]. Berlin: Springer, 2006: 291–296.
- [140] Ovesný M., Křížek P., Borkovec J., et al. ThunderSTORM: A Comprehensive ImageJ Plug-in for PALM and STORM Data Analysis and Super-Resolution Imaging[J].*Bioinformatics*, 2014, 30(16):2389–2390.
- [141] McKinney S. A., Joo C., Ha T. Analysis of Single-Molecule FRET Trajectories Using Hidden Markov Modeling[J].*Biophysical Journal*, 2006, 91(5):1941–1951.
- [142] Liu Y., Park J., Dahmen K. A., et al. A Comparative Study of Multivariate and Univariate Hidden Markov Modelings in Time-Binned Single-Molecule FRET Data Analysis[J].*The Journal of Physical Chemistry B*, 2010, 114(16):5386–5403.
- [143] Smith C. S., Joseph N., Rieger B., et al. Fast, Single-Molecule Localization That Achieves Theoretically Minimum Uncertainty[J].*Nature Methods*, 2010, 7:373–375.

- [144] Cheezum M. K., Walker W. F., Guilford W. H. Quantitative Comparison of Algorithms for Tracking Single Fluorescent Particles[J].*Biophysical Journal*, 2001,81(4):2378–2388.
- [145] Yildiz A., Forkey J. N., McKinney S. A., et al. Myosin V Walks Hand-Over-Hand: Single Fluorophore Imaging with 1.5-Nm Localization[J].*Science*, 2003,300(5628):2061–2065.
- [146] Belov V. N., Bossi M. L., Fölling J., et al. Rhodamine Spiroamides for Multicolor Single-Molecule Switching Fluorescent Nanoscopy[J].*Chemistry – A European Journal*, 2009,15(41):10762–10776.
- [147] Huang F., Hartwich T. M. P., Rivera-Molina F. E., et al. Video-Rate Nanoscopy Using SCMOS Camera-Specific Single-Molecule Localization Algorithms[J].*Nature Methods*, 2013,10:653–658.
- [148] Nolan E. M., Lippard S. J. Tools and Tactics for the Optical Detection of Mercuric Ion[J].*Chemical Reviews*, 2008,108(9):3443–3480.
- [149] Chen X., Pradhan T., Wang F., et al. Fluorescent Chemosensors Based on Spiroring-Opening of Xanthenes and Related Derivatives[J].*Chemical Reviews*, 2012,112(3):1910–1956.
- [150] Kim H. N., Lee M. H., Kim H. J., et al. A New Trend in Rhodamine-Based Chemosensors: Application of Spirolactam Ring-Opening to Sensing Ions[J].*Chemical Society Reviews*, 2008,37(8):1465–1472.
- [151] Zhu H., Fan J., Xu Q., et al. Imaging of Lysosomal PH Changes with a Fluorescent Sensor Containing a Novel Lysosome-Locating Group[J].*Chemical Communications*, 2012,48(96):11766–11768.
- [152] Zhang X., Xiao Y., Qian X. A Ratiometric Fluorescent Probe Based on FRET for Imaging Hg²⁺ Ions in Living Cells[J].*Angewandte Chemie International Edition*, 2008,47(42):8025–8029.
- [153] Chen X., Nam S., Jou M. J., et al. Hg 2 + Selective Fluorescent and Colorimetric Sensor : Its Crystal Structure and Application to Bioimaging[J].*Organic Letters*, 2008,10:5235–5238.
- [154] Li K., Xiang Y., Wang X., et al. Reversible Photochromic System Based on Rhodamine B Salicylaldehyde Hydrazone Metal Complex[J].*Journal of the American Chemical Society*, 2014,136(4):1643–1649.
- [155] Kim H., Rao B. A., Jeong J., et al. A Rhodamine Scaffold Immobilized onto Mesoporous Silica as a Fluorescent Probe for the Detection of Fe (III) and Applications in Bio-Imaging and Microfluidic Chips[J].*Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016,224:404–412.
- [156] Yu H., Zhang X., Xiao Y., et al. Targetable Fluorescent Probe for Monitoring Exogenous and Endogenous NO in Mitochondria of Living Cells[J].*Analytical chemistry*, 2013,85(15):7076–7084.
- [157] 肖义, 于海波. 5(6)取代的罗丹明异构体的拆分合成方法:中国,201210080853.1[P].2012,8,15.
- [158] Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis[J].*Nature Methods*, 2012,9(7):671–675.
- [159] Lee S.-H., Shin J. Y., Lee A., et al. Counting Single Photoactivatable Fluorescent Molecules by Photoactivated Localization Microscopy (PALM)[J].*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012,109(43):17436–17441.
- [160] Ouyang W., Aristov A., Lelek M., et al. Deep Learning Massively Accelerates Super-Resolution Localization Microscopy[J].*Nature Biotechnology*, 2018,36:460.
- [161] Konopka C. A., Bednarek S. Y. Variable-Angle Epifluorescence Microscopy: A New Way to Look at Protein Dynamics in the Plant Cell Cortex[J].*Plant Journal*, 2008,53(1):186–196.
- [162] Tokunaga M., Imamoto N., Sakata-Sogawa K. Highly Inclined Thin Illumination Enables Clear Single-Molecule Imaging in Cells[J].*Nature Methods*, 2008,5(2):159–161.

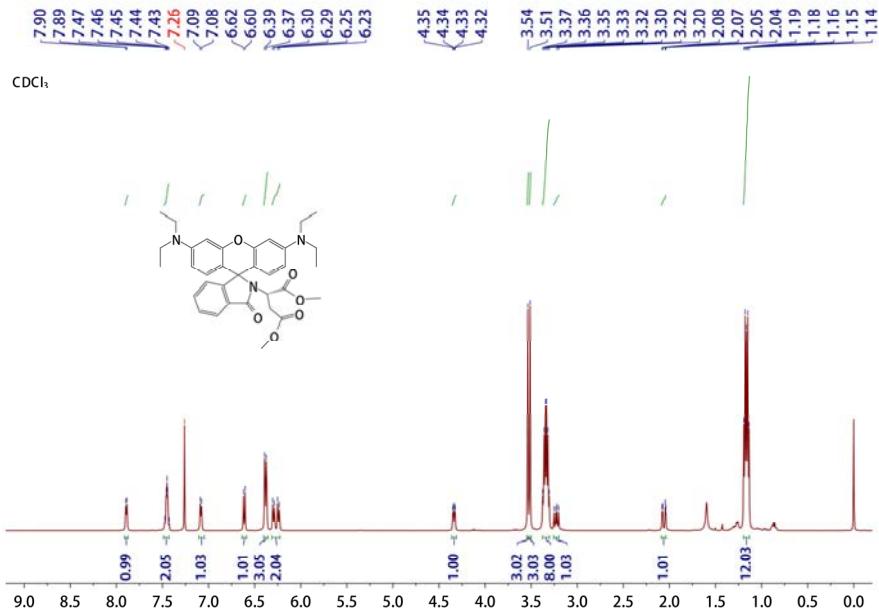
- [163] Mortensen K. I., Churchman L. S., Spudich J. A., et al. Optimized Localization Analysis for Single-Molecule Tracking and Super-Resolution Microscopy[J].*Nature Methods*, 2010, 7:377–381.
- [164] Jones S. A., Shim S.-H., He J., et al. Fast, Three-Dimensional Super-Resolution Imaging of Live Cells[J].*Nature Methods*, 2011, 8:499–508.
- [165] Nieuwenhuizen R. P. J., Lidke K. A., Bates M., et al. Measuring Image Resolution in Optical Nanoscopy[J].*Nature Methods*, 2013, 10:557–562.
- [166] Takakura H., Zhang Y., Erdmann R. S., et al. Long Time-Lapse Nanoscopy with Spontaneously Blinking Membrane Probes[J].*Nature Biotechnology*, 2017, 35:773–780.
- [167] Bittel A. M., Nickerson A., Saldivar I. S., et al. Methodology for Quantitative Characterization of Fluorophore Photoswitching to Predict Superresolution Microscopy Image Quality[J].*Scientific Reports*, 2016, 6:29687.
- [168] Casey J. R., Grinstein S., Orlowski J. Sensors and Regulators of Intracellular PH[J].*Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, 11:50–61.
- [169] Johnson L. V., Walsh M. L., Chen L. B. Localization of Mitochondria in Living Cells with Rhodamine 123[J].*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1980, 77(2):990–994.
- [170] Brunelle J. K., Chandel N. S. Oxygen Deprivation Induced Cell Death: An Update[J].*Apoptosis*, 2002, 7(6):475–482.
- [171] Shannon C. E. Communication in the Presence of Noise[J].*Proceedings of the IRE*, 1949, 37(1):10–21.
- [172] Banterle N., Bui K. H., Lemke E. A., et al. Fourier Ring Correlation as a Resolution Criterion for Super-Resolution Microscopy[J].*Journal of Structural Biology*, 2013, 183(3):363–367.
- [173] Deschout H., Lukes T., Sharipov A., et al. Complementarity of PALM and SOFI for Super-Resolution Live-Cell Imaging of Focal Adhesions[J].*Nature Communications*, 2016, 7:13693.
- [174] Appelhans T., Richter C. P., Wilkens V., et al. Nanoscale Organization of Mitochondrial Microcompartments Revealed by Combining Tracking and Localization Microscopy[J].*Nano Letters*, 2012, 12(2):610–616.
- [175] Newman J., Peat T. S., Richard R., et al. Haloalkane Dehalogenases: Structure of a Rhodococcus Enzyme[J].*Biochemistry*, 1999, 38(49):16105–16114.
- [176] Liu Z., Lavis L. D., Betzig E. Imaging Live-Cell Dynamics and Structure at the Single-Molecule Level[J].*Molecular Cell*, 2015, 58(4):644–659.
- [177] van de Linde S., Heilemann M., Sauer M. Live-Cell Super-Resolution Imaging with Synthetic Fluorophores[J].*Annual Review of Physical Chemistry*, 2012, 63(1):519–540.
- [178] Lavis L. D. Chemistry Is Dead. Long Live Chemistry![J].*Biochemistry*, 2017, 56:5165–5170.
- [179] 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.
- [180] 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.
- [181] Mitronova G. Y., Belov V. N., Bossi M. L., et al. New Fluorinated Rhodamines for Optical Microscopy and Nanoscopy[J].*Chemistry – A European Journal*, 2010, 16(15):4477–4488.

- [182] Vogel M., Rettig W., Sens R., et al. Structural Relaxation of Rhodamine Dyes with Different N-Substitution Patterns: A Study of Fluorescence Decay Times and Quantum Yields[J].Chemical Physics Letters, 1988,147(5):452–460.
- [183] Chang T.-L., Cheung H. C. A Model for Molecules with Twisted Intramolecular Charge Transfer Characteristics: Solvent Polarity Effect on the Nonradiative Rates of Dyes in a Series of Water—Ethanol Mixed Solvents[J].Chemical Physics Letters, 1990,173(4):343–348.
- [184] Chang T., Borst W. L. Effect of Solvent Polarity on a Rotational Isomerization Mechanism of Rhodamine - B in Normal Alcohols[J].The Journal of Chemical Physics, 1990,93(7):4724–4729.
- [185] Casey K. G., Quitevis E. L. Effect of Solvent Polarity on Nonradiative Processes in Xanthene Dyes: Rhodamine B in Normal Alcohols[J].Journal of Physical Chemistry, 1988,92(23):6590–6594.
- [186] Grabowski Z. R., Rotkiewicz K., Rettig W. Structural Changes Accompanying Intramolecular Electron Transfer: Focus on Twisted Intramolecular Charge-Transfer States and Structures[J].Chemical Reviews, 2003,103(10):3899–4032.
- [187] Woodroffe C. C., Lim M. H., Bu W., et al. Synthesis of Isomerically Pure Carboxylate- and Sulfonate-Substituted Xanthene Fluorophores[J].Tetrahedron, 2005,61(12):3097–3105.
- [188] Yu H., Fu M., Xiao Y. Switching off FRET by Analyte-Induced Decomposition of Squaraine Energy Acceptor: A Concept to Transform ‘Turn off’ Chemodosimeter into Ratiometric Sensors[J].Physical Chemistry Chemical Physics, 2010,12(27):7386–7391.
- [189] Sadkowski P. J., Fleming G. R. Photophysics of the Acid and Base Forms of Rhodamine B[J].Chemical Physics Letters, 1978,57(4):526–529.
- [190] Williams A. T. R., Winfield S. A., Miller J. N. Relative Fluorescence Quantum Yields Using a Computer-Controlled Luminescence Spectrometer[J].The Analyst, 1983,108(1290):1067–1071.
- [191] Falcón-pérez J. M., Nazarian R., Sabatti C., et al. Distribution and Dynamics of Lamp1-Containing Endocytic Organelles in Fibroblasts Deficient in BLOC-3[J].Journal of Cell Science, 2005,118(22):5243–5255.
- [192] Ye Z., Yu H., Yang W., et al. 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.
- [193] Jaqaman K., Loerke D., Mettlen M., et al. Robust Single-Particle Tracking in Live-Cell Time-Lapse Sequences[J].Nature Methods, 2008,5(8):695–702.
- [194] Douglass A. D., Vale R. D. Single-Molecule Microscopy Reveals Plasma Membrane Microdomains Created by Protein-Protein Networks That Exclude or Trap Signaling Molecules in T Cells[J].Cell, 2005,121(6):937–950.
- [195] Manley S., Gillette J. M., Patterson G. H., et al. High-Density Mapping of Single-Molecule Trajectories with Photoactivated Localization Microscopy[J].Nature methods, 2008,5(2):155–157.
- [196] Asanuma D., Takaoka Y., Namiki S., et al. Acidic-PH-Activatable Fluorescence Probes for Visualizing Exocytosis Dynamics[J].Angewandte Chemie International Edition, 2014,53(24):6085–6089.
- [197] Aigner D., Borisov S. M., Orriach Fernández F. J., et al. New Fluorescent PH Sensors Based on Covalently Linkable PET Rhodamines[J].Talanta, 2012,99:194–201.

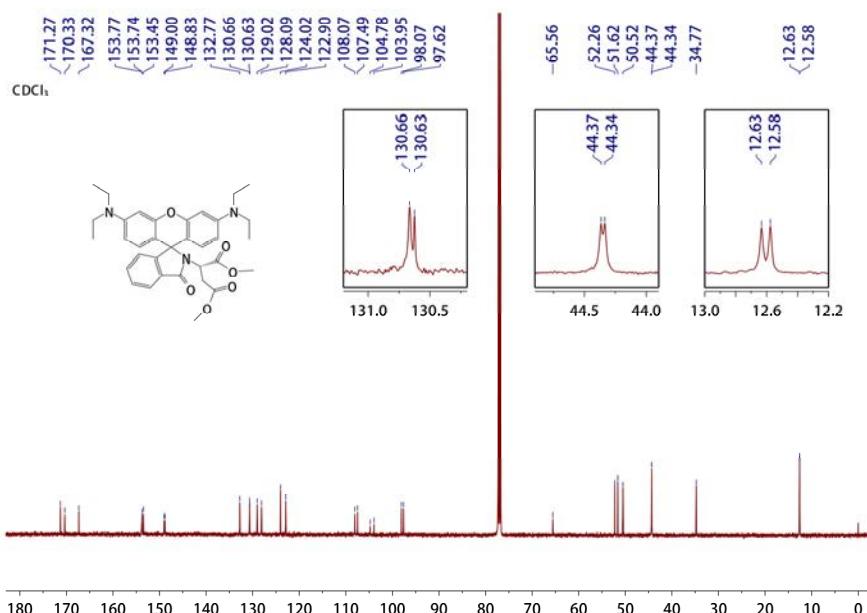
- [198] Onufriev A., Case D. A., Ullmann G. M. A Novel View of PH Titration in Biomolecules[J].*Biochemistry*, 2001,40(12):3413–3419.
- [199] Cantor C. R., Schimmel P. R. *Biophysical Chemistry: Part III: The Behavior of Biological Macromolecules*[M].London:Macmillan,1980.
- [200] Klein U. K. A., Hafner F. W. A New Dual Fluorescence with Rhodamine B Lactone[J].*Chemical Physics Letters*, 1976,43(1):141–145.
- [201] Suppan P. Invited Review Solvatochromic Shifts: The Influence of the Medium on the Energy of Electronic States[J].*Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 1990,50(3):293–330.
- [202] Jessop P. G., Jessop D. A., Fu D., et al. Solvatochromic Parameters for Solvents of Interest in Green Chemistry[J].*Green Chemistry*, 2012,14(5):1245–1259.
- [203] Kamlet M. J., Taft R. W. The Solvatochromic Comparison Method. I. The β -Scale Of Solvent Hydrogen-Bond Acceptor (HBA) Basicities[J].*Journal of the American Chemical Society*, 1976,98(2):377–383.
- [204] Kamlet M. J., Abboud J. L., Taft R. W. The Solvatochromic Comparison Method. 6. The Π^* Scale of Solvent Polarities[J].*Journal of the American Chemical Society*, 1977,99(18):6027–6038.
- [205] Taft R. W., Kamlet M. J. The Solvatochromic Comparison Method. 2. The α -Scale of Solvent Hydrogen-Bond Donor (HBD) Acidities[J].*Journal of the American Chemical Society*, 1976,98(10):2886–2894.
- [206] Lide D. R., Ed. *CRC Handbook of Chemistry and Physics Internet Version*[M].Boca Raton:CRC Press,2005: 6–3–6–190.
- [207] Marcus Y. The Properties of Organic Liquids That Are Relevant to Their Use as Solvating Solvents[J].*Chemical Society Reviews*, 1993,22(6):409–416.
- [208] Chi W., Chen J., Qiao Q., et al. Revealing the Switching Mechanisms of an off-on-off Fluorescent Logic Gate System[J].*Physical Chemistry Chemical Physics*, 2019,21(30):16798–16803.
- [209] Szakács Z., Rousseva S., Bojtár M., et al. Experimental Evidence of TICT State in 4-Piperidinyl-1,8-Naphthalimide – a Kinetic and Mechanistic Study[J].*Physical Chemistry Chemical Physics*, 2018,20(15):10155–10164.
- [210] Vogel M., Rettig W., Sens R., et al. Evidence for the Formation of Biradicaloid Charge-Transfer (BCT) States in Xanthene and Related Dyes[J].*Chemical Physics Letters*, 1988,147(5):461–465.
- [211] Barik A., Kumbhakar M., Nath S., et al. Evidence for the TICT Mediated Nonradiative Deexcitation Process for the Excited Coumarin-1 Dye in High Polarity Protic Solvents[J].*Chemical Physics*, 2005,315(3):277–285.
- [212] Rechthaler K., Köhler G. Excited State Properties and Deactivation Pathways of 7-Aminocoumarins[J].*Chemical Physics*, 1994,189(1):99–116.
- [213] Jones G., Jackson W. R., Choi C. Y., et al. Solvent Effects on Emission Yield and Lifetime for Coumarin Laser Dyes. Requirements for a Rotatory Decay Mechanism[J].*The Journal of Physical Chemistry*, 1985,89(2):294–300.
- [214] Cheng N. S. Formula for the Viscosity of a Glycerol-Water Mixture[J].*Industrial and Engineering Chemistry Research*, 2008,47(9):3285–3288.

- [215] Ainsworth S., Flanagan M. T. The Effects That the Environment Exerts on the Spectroscopic Properties of Certain Dyes That Are Bound by Bovine Serum Albumin[J].*Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 1969,194(1):213–221.
- [216] Snare M. J., Treloar F. E., Ghiggino K. P., et al. The Photophysics of Rhodamine B[J].*Journal of Photochemistry*, 1982,18(4):335–346.
- [217] Kirshner H., Aguet F., Sage D., et al. 3-D PSF Fitting for Fluorescence Microscopy: Implementation and Localization Application[J].*Journal of Microscopy*, 2013,249(1):13–25.
- [218] van de Linde S., Löschberger A., Klein T., et al. Direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy with Standard Fluorescent Probes[J].*Nature protocols*, 2011,6(7):991–1009.
- [219] Schafer F. Q., Buettner G. R. Redox Environment of the Cell as Viewed through the Redox State of the Glutathione Disulfide/Glutathione Couple[J].*Free Radical Biology and Medicine*, 2001,30(11):1191–1212.
- [220] Bright N. A., Gratian M. J., Luzio J. P. Endocytic Delivery to Lysosomes Mediated by Concurrent Fusion and Kissing Events in Living Cells[J].*Current Biology*, 2005,15(4):360–365.
- [221] Nishida T., Yoshimura R., Endo Y. Three-Dimensional Distribution of TrkA Neurotrophin Receptors in Neurite Varicosities of Differentiated PC12 Cells Treated with NGF Determined by Immunoelectron Tomography[J].*Cell And Tissue Research*, 2013,351(1):1–13.
- [222] Wang Y., Quan T., Zeng S., et al. PALMER: A Method Capable of Parallel Localization of Multiple Emitters for High-Density Localization Microscopy[J].*Optics Express*, 2012,20(14):16039–16049.
- [223] Quan T., Zhu H., Liu X., et al. High-Density Localization of Active Molecules Using Structured Sparse Model and Bayesian Information Criterion[J].*Optics Express*, 2011,19(18):16963–16974.
- [224] Spahn C. K., Glaesmann M., Grimm J. B., et al. A Toolbox for Multiplexed Super-Resolution Imaging of the E. Coli Nucleoid and Membrane Using Novel PAINT Labels[J].*Scientific Reports*, 2018,8(1):1–12.
- [225] Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo M. R. Cell Signalling and the Glutathione Redox System[J].*Biochemical Pharmacology*, 2002,64(5):1057–1064.

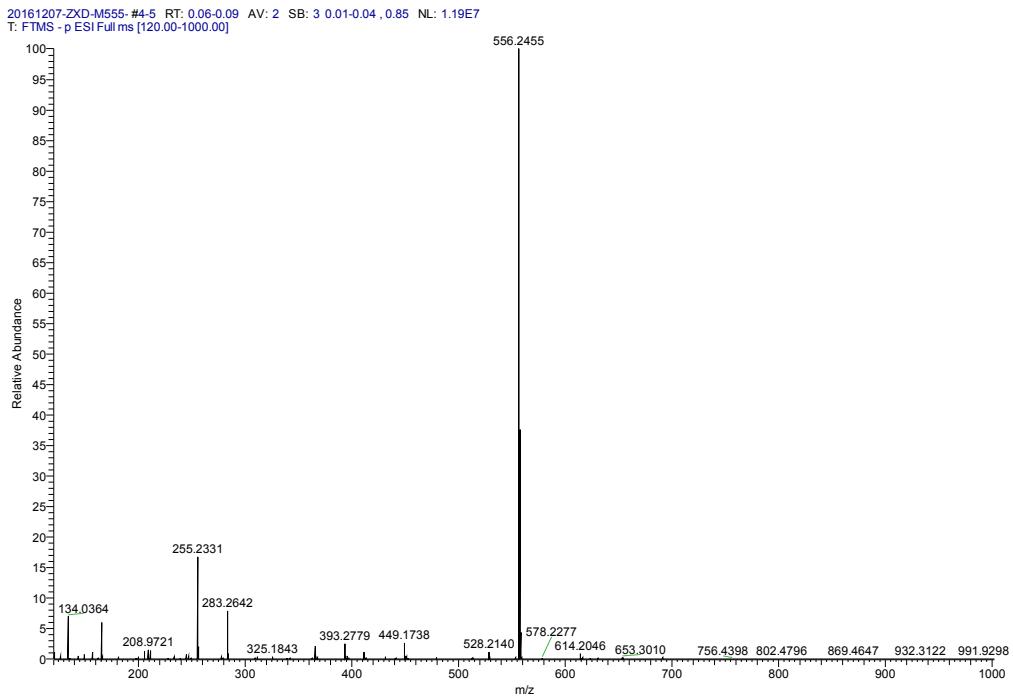
附录 A 化合物表征数据



附图 1 Rh-dMAsp(3-4)的 ^1H NMR 谱图
Appendix Figure 1 ^1H NMR spectrum of Rh-dMAsp(3-4).

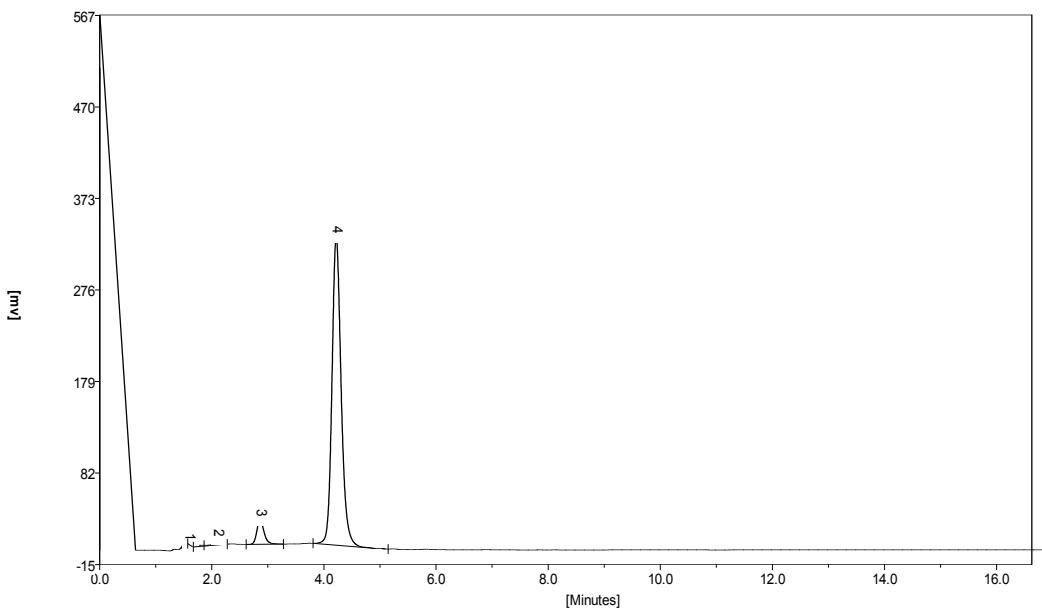


附图 2 Rh-dMAsp(3-4)的 ^{13}C NMR 谱图
 Appendix Figure 2 ^{13}C NMR spectrum of Rh-dMAsp(3-4).



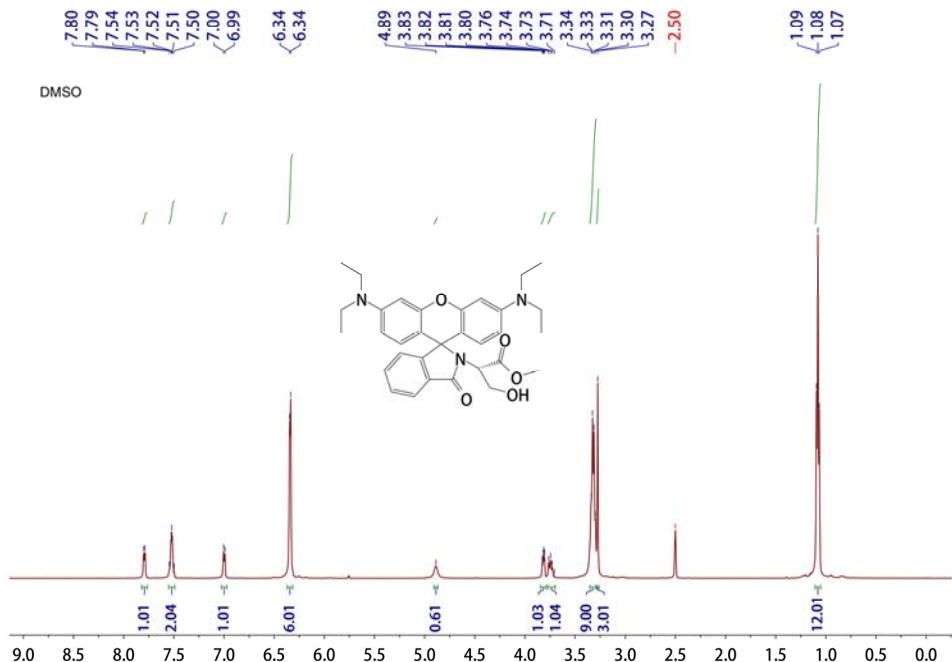
附图 3 Rh-Asp((3-5)的 HRMS 谱图

Appendix Figure 3 HRMS of Rh-Asp((3-5).

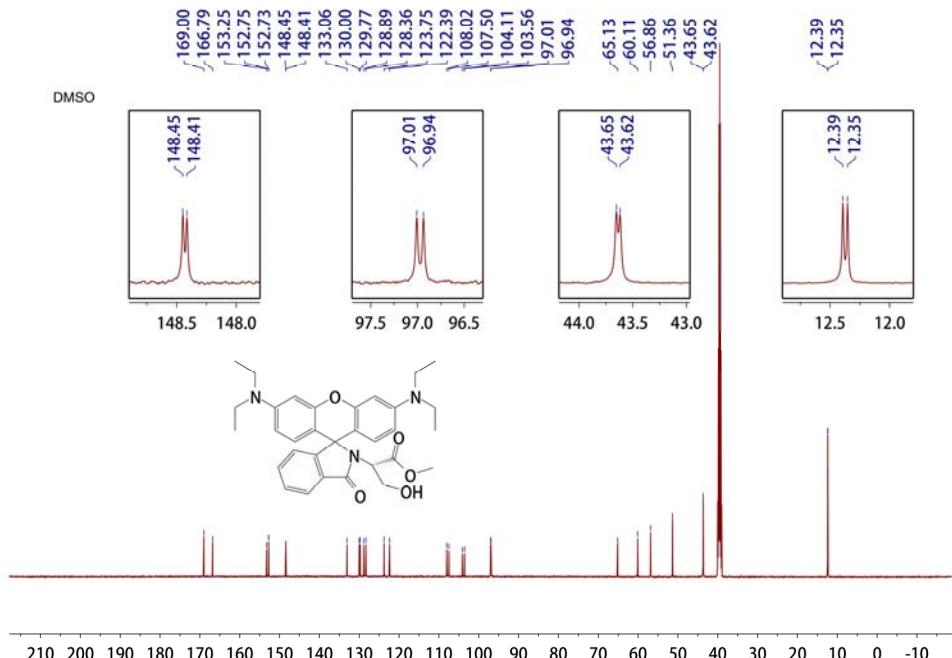


附图 4 Rh-Asp((3-5)的高效液相色谱图

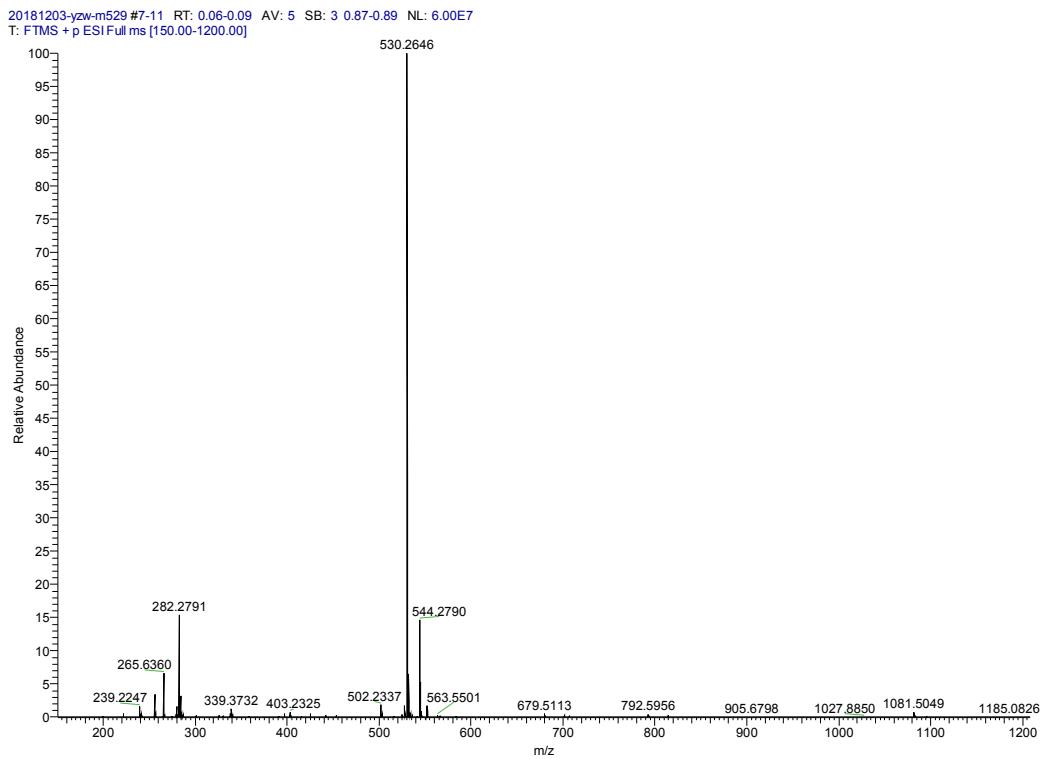
Appendix Figure 4 HPLC spectrum of Rh-Asp((3-5).



附图 5 Rh-MSer(3-6)的 ^1H NMR 图
Appendix Figure 5 ^1H NMR spectrum of Rh-MSer(3-6).

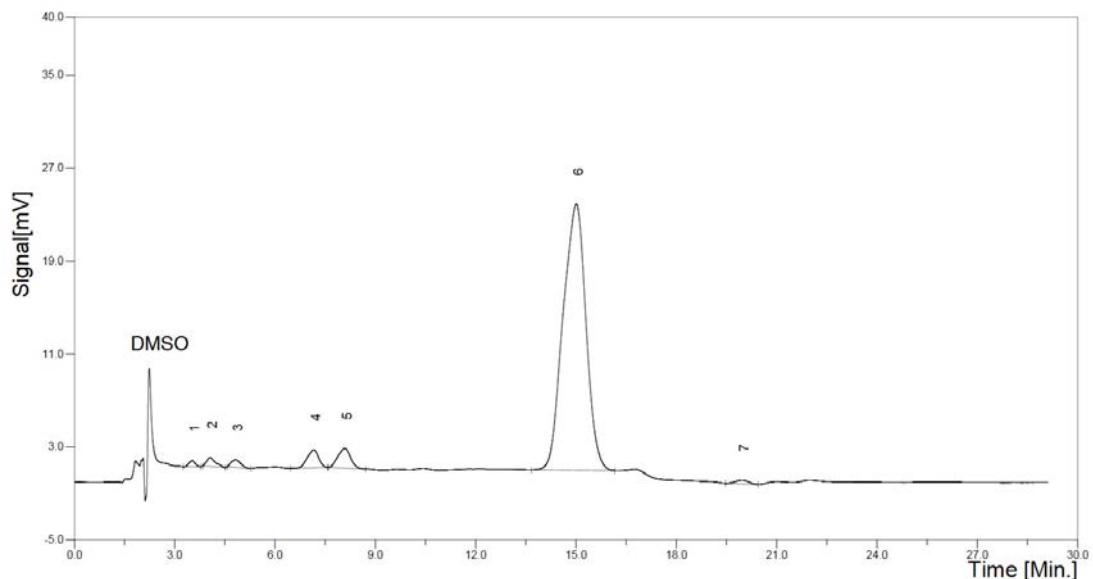


附图 6 Rh-MSer(3-6)的 ^{13}C NMR 图
Appendix Figure 6 ^{13}C NMR spectrum of Rh-MSer(3-6).



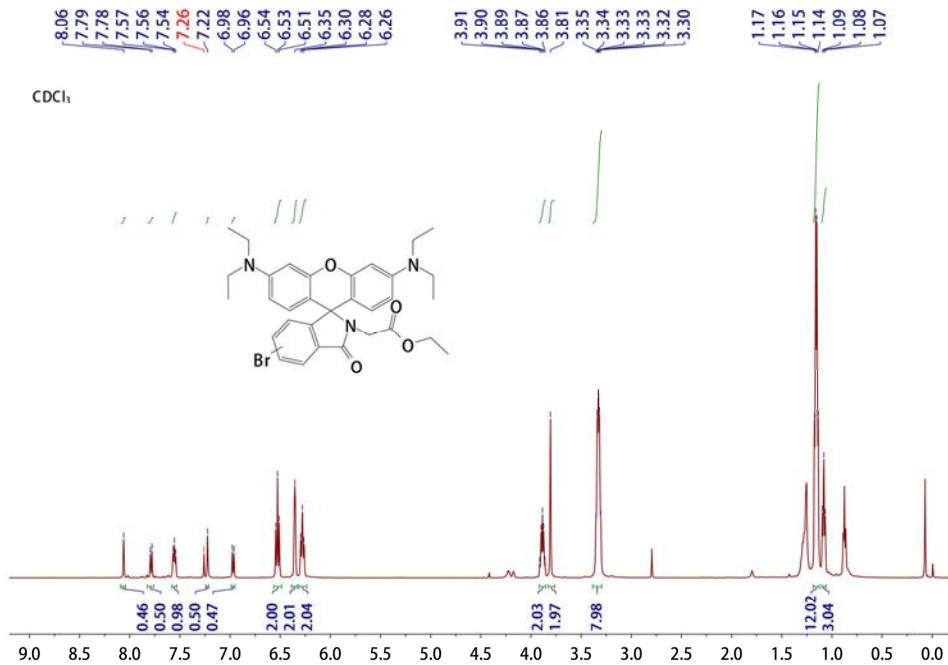
附图 7 Rh-Ser((3-7)的 HRMS 图

Appendix Figure 7 HRMS of Rh-Ser((3-7).



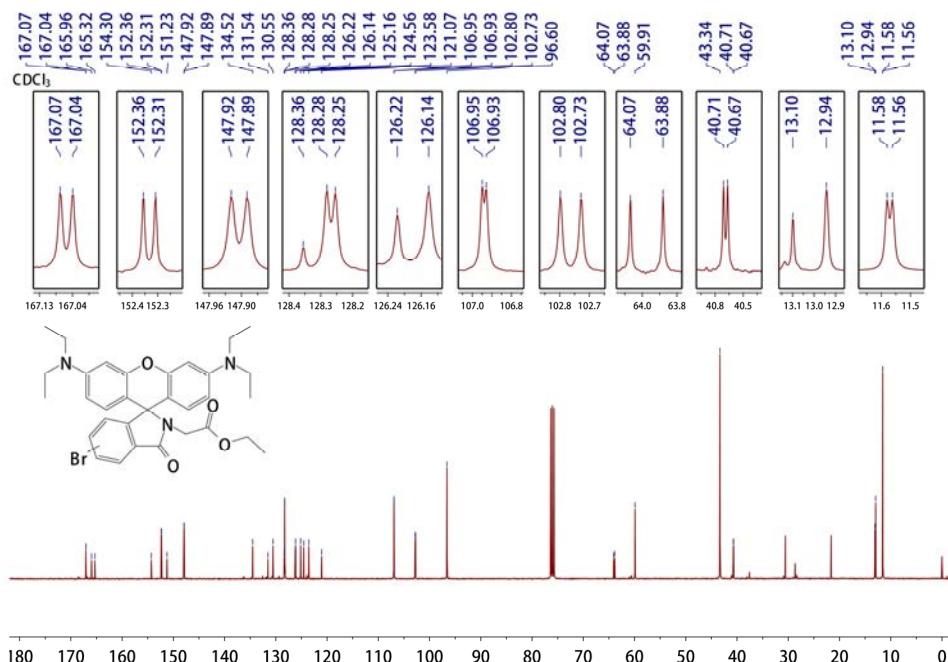
附图 8 Rh-Ser((3-7)的高效液相色谱图

Appendix Figure 8 HPLC spectrum of Rh-Ser((3-7).



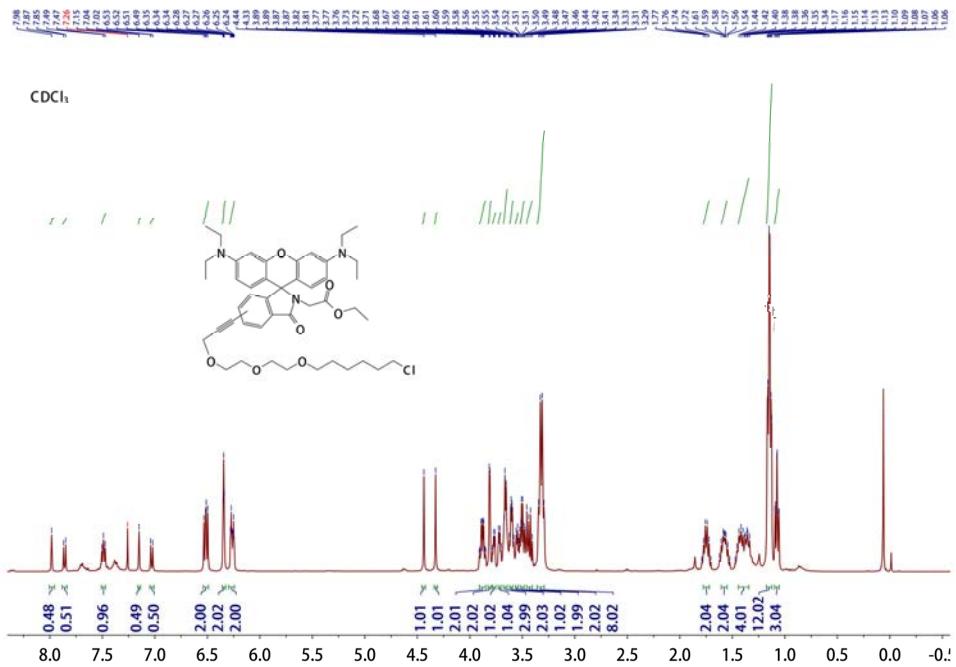
附图 9.3-9 的 ^1H NMR 图

Appendix Figure 9 ^1H NMR spectrum of **3-9**.



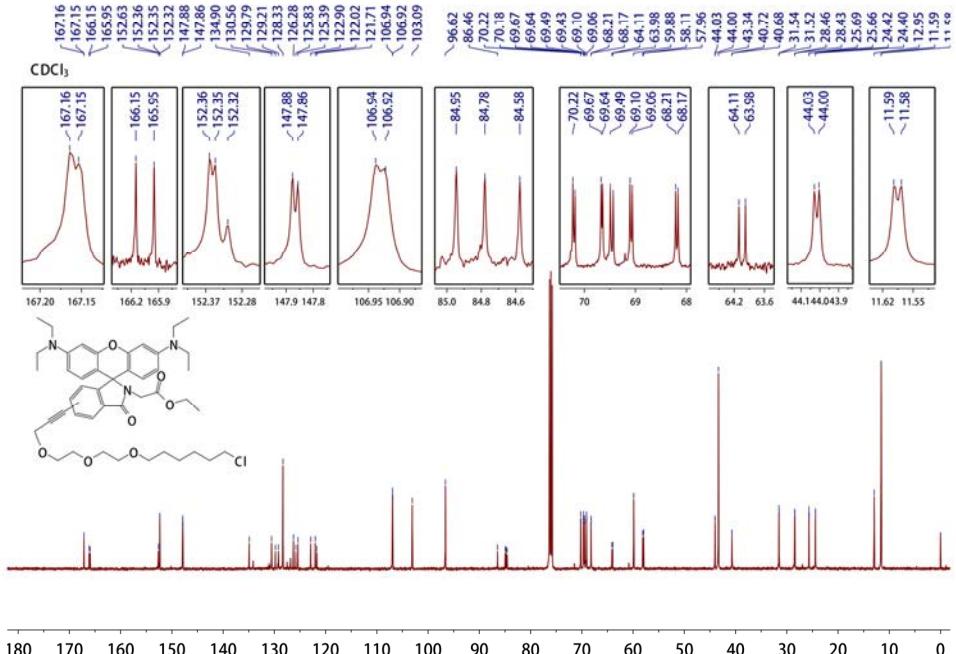
附图 10 3-9 的 ^{13}C NMR 图

Appendix Figure 10 ^{13}C NMR spectrum of **3-9**.



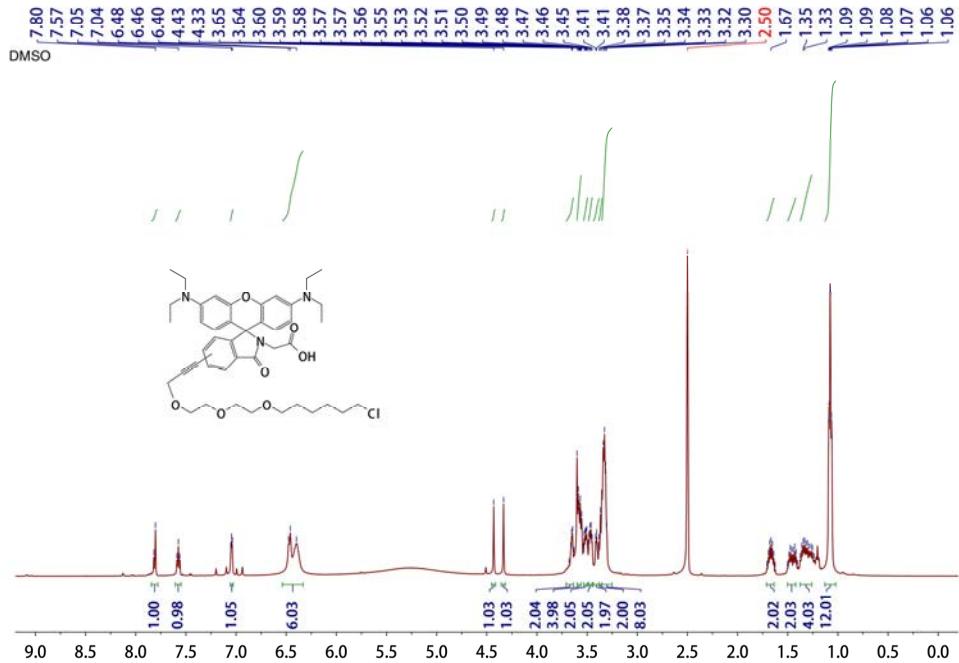
附图 11 3-10 的 ^1H NMR 图

Appendix Figure 11 ^1H NMR spectrum of 3-10.



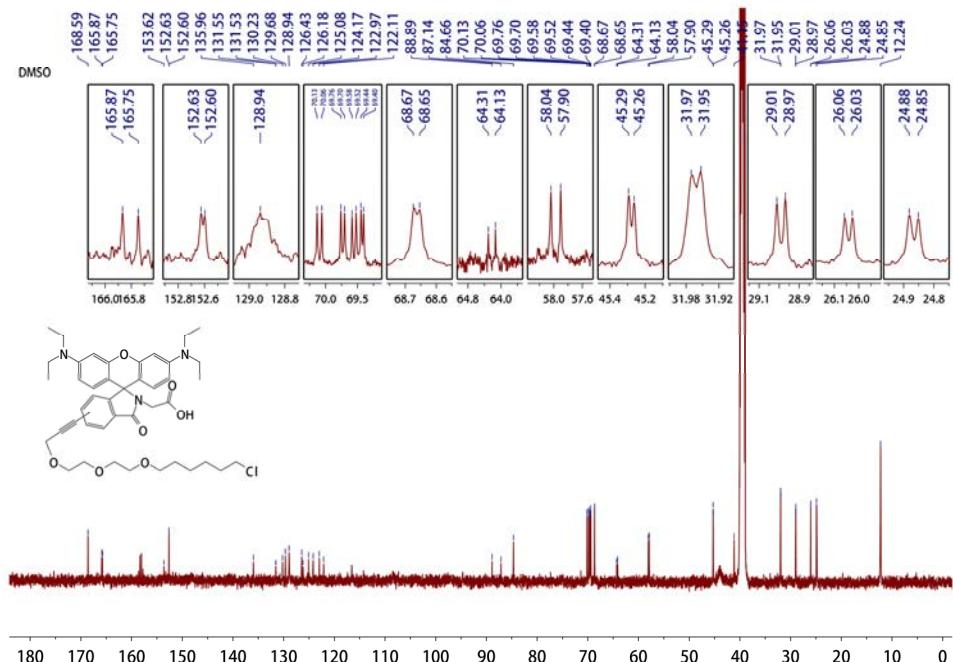
附图 12 3-10 的 ^{13}C NMR 图

Appendix Figure 12 ^{13}C NMR spectrum of **3-10**.



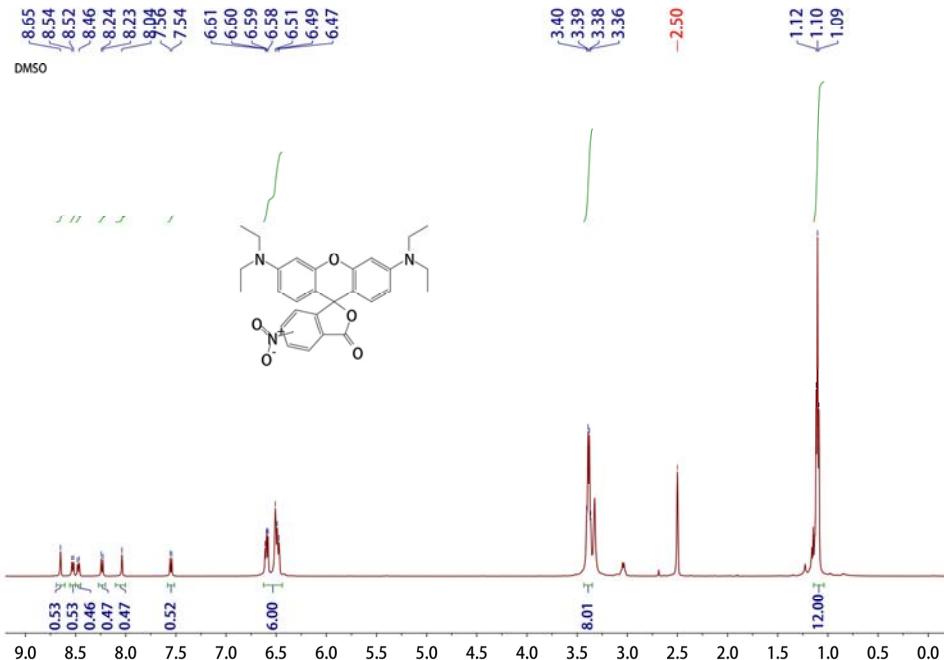
附图 13 Rh-Gly-Halo(3-11)的 ^1H NMR 图

Appendix Figure 13 ^1H NMR spectrum of Rh-Gly-Halo(3-11).



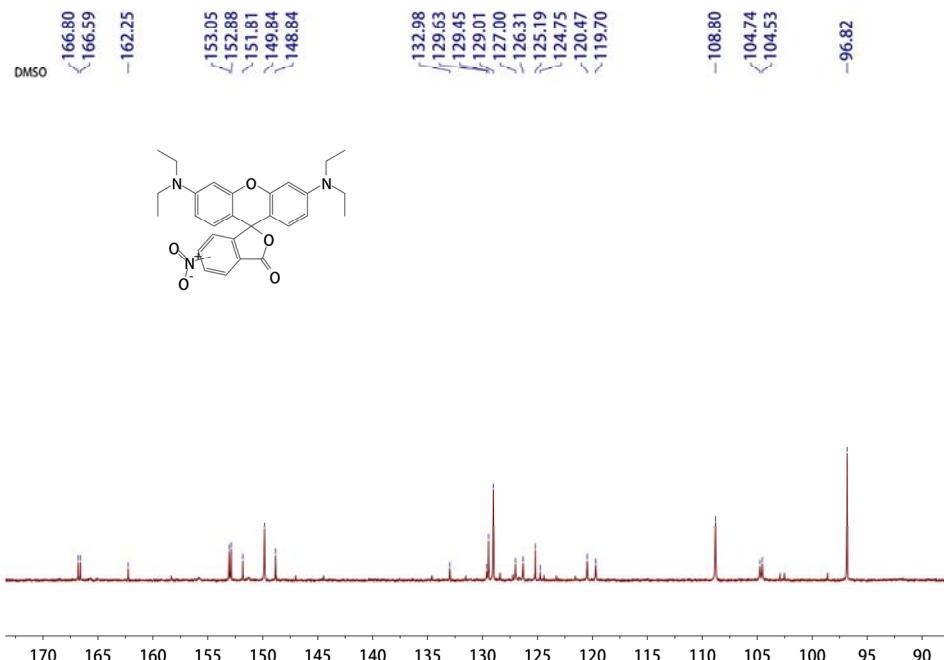
附图 14 Rh-Gly-Halo(3-11)的 ^{13}C NMR 图

Appendix Figure 14 ^{13}C NMR spectrum of Rh-Gly-Halo(3-11).



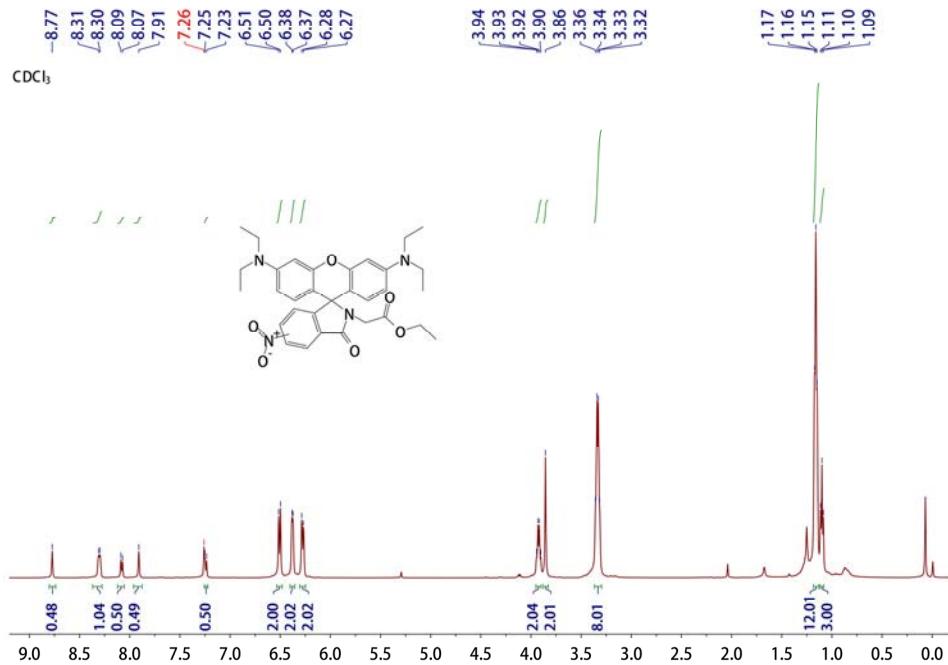
附图 15 3-12 的 ^1H NMR 图

Appendix Figure 15 ^1H NMR spectrum of 3-12.



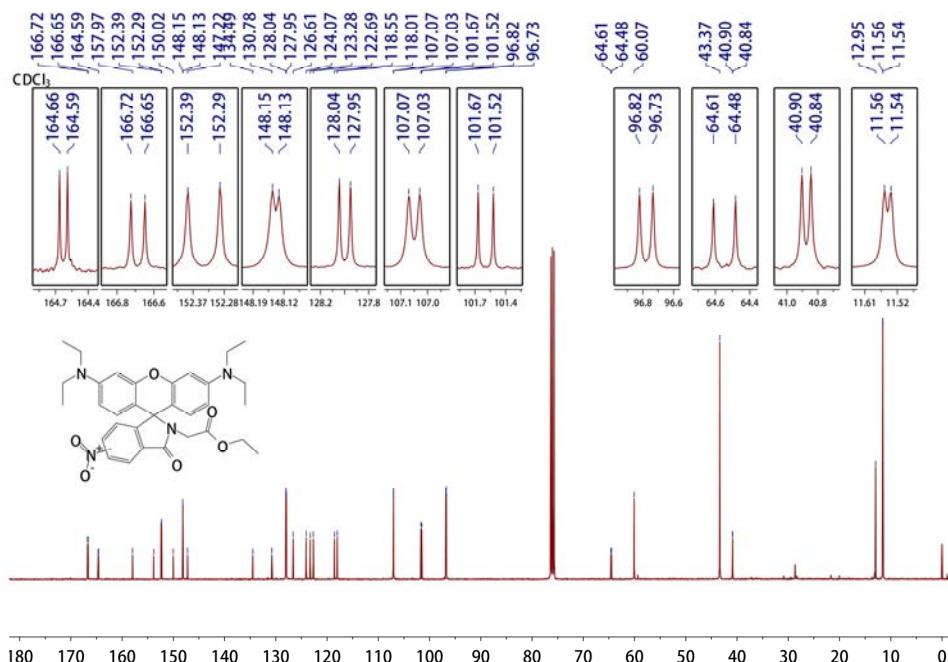
附图 16 3-12 的 ^{13}C NMR 图

Appendix Figure 16 ^{13}C NMR spectrum of 3-12.



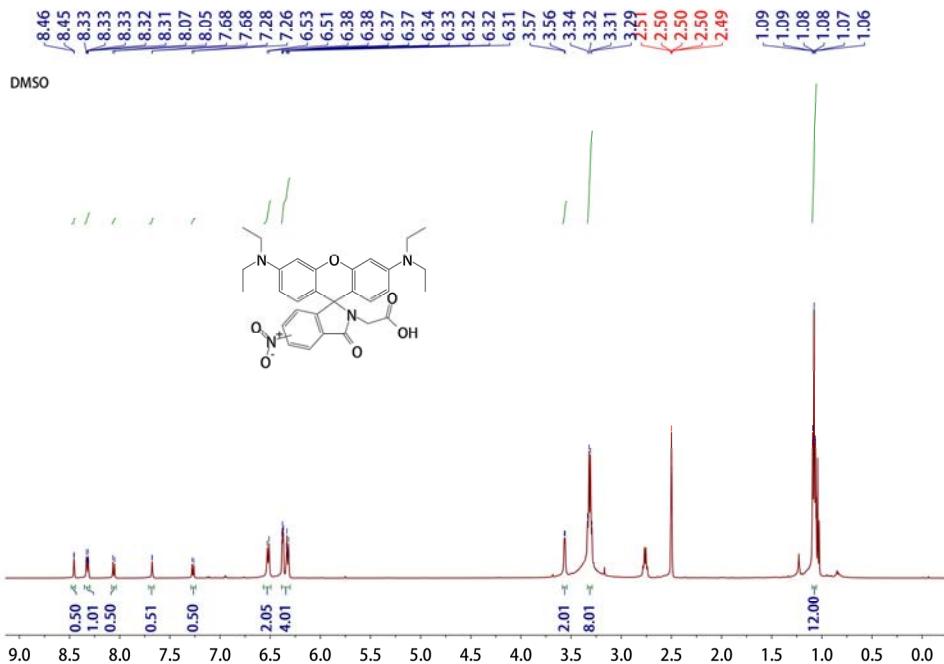
附图 17 3-13 的 ^1H NMR 图

Appendix Figure 17 ^1H NMR spectrum of 3-13.



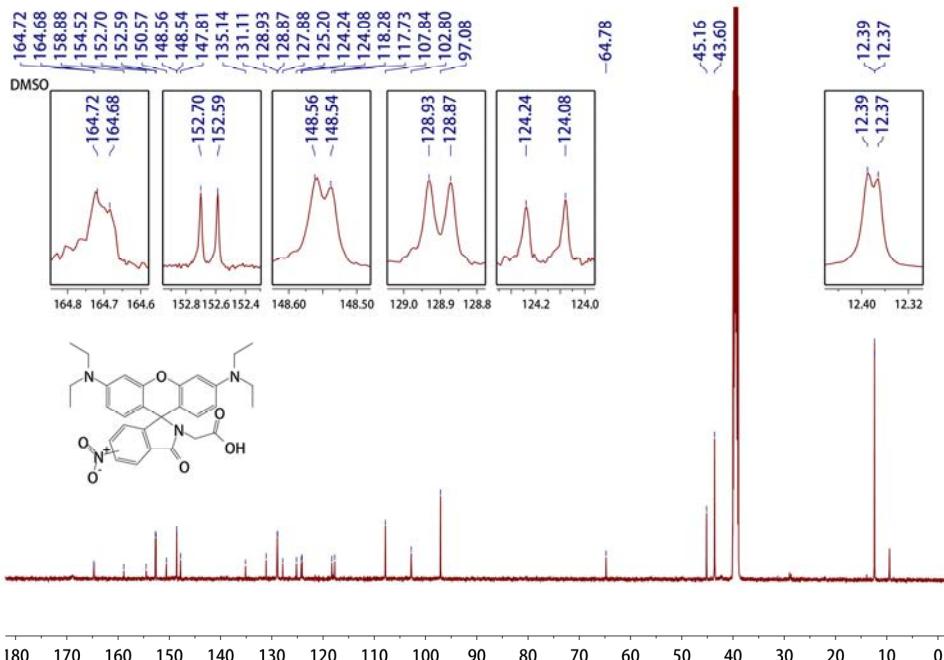
附图 18 3-13 的 ^{13}C NMR 图

Appendix Figure 18 ^{13}C NMR spectrum of 3-13.



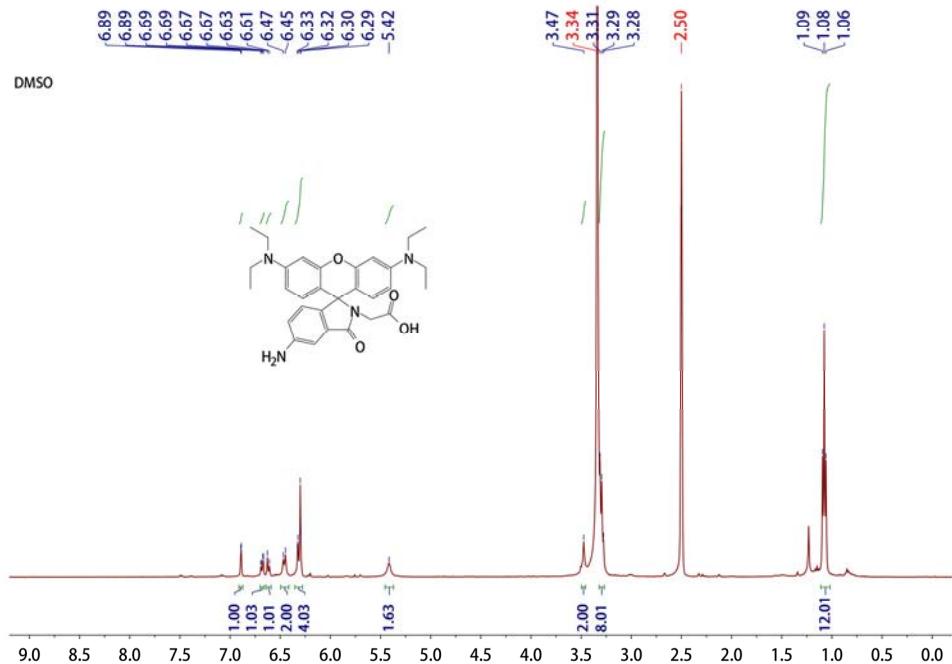
附图 19 3-14 的 ^1H NMR 图

Appendix Figure 19 ^1H NMR spectrum of 3-14.



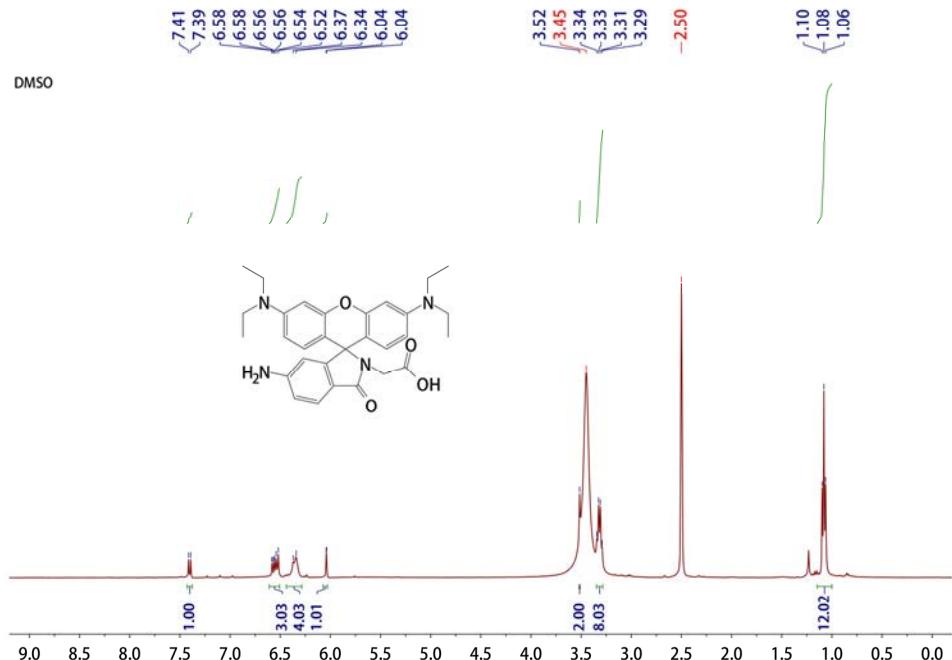
附图 20 3-14 的 ^{13}C NMR 图

Appendix Figure 20 ^{13}C NMR spectrum of 3-14.



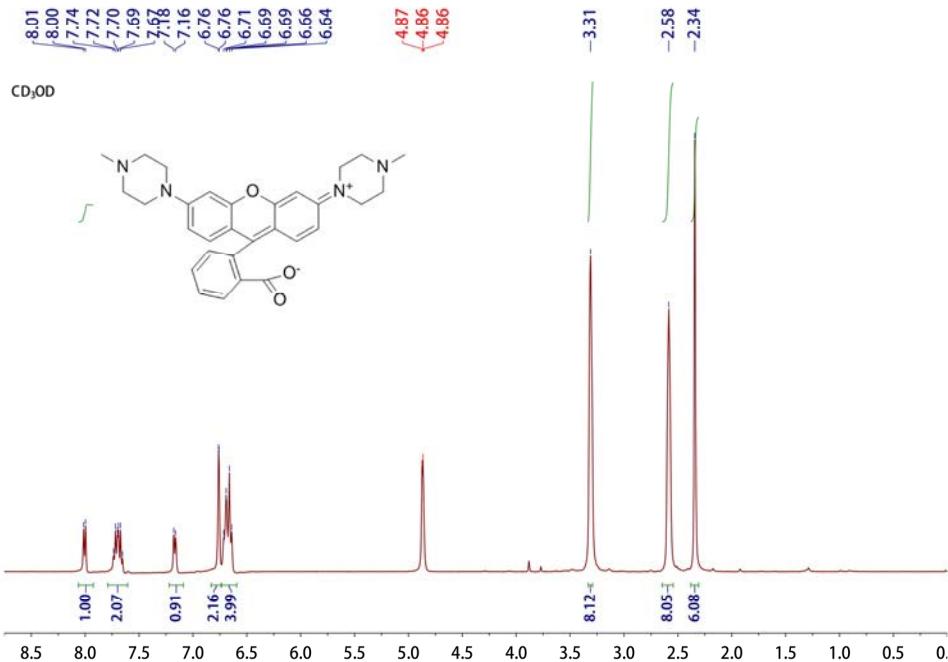
附图 21 4'-3-15 的 ^1H NMR 图

Appendix Figure 21 ^1H NMR spectrum of 4'-3-15.

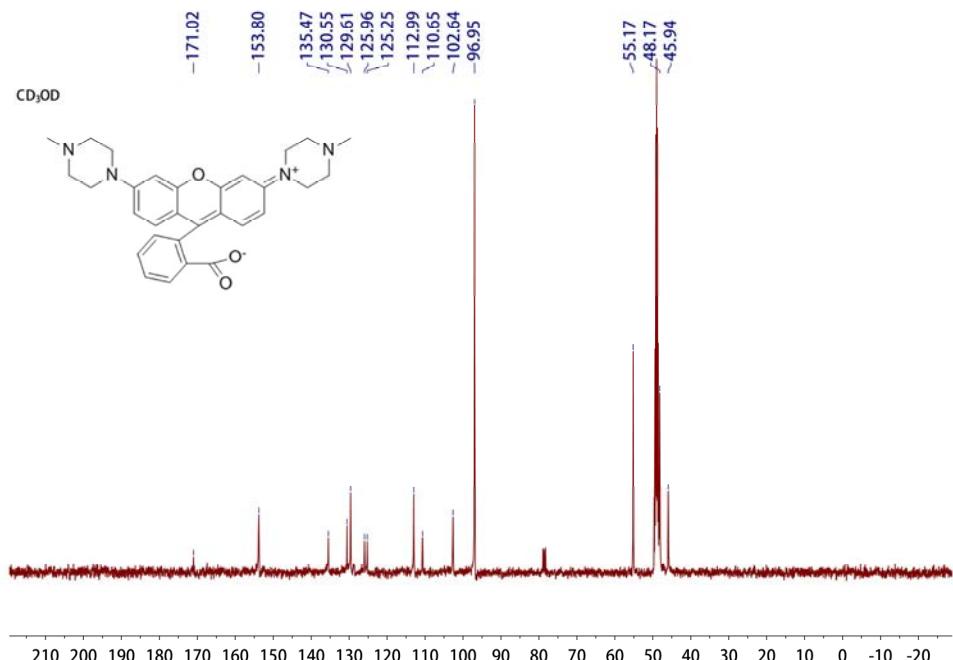


附图 22 5'-3-15 的 ^1H NMR 图

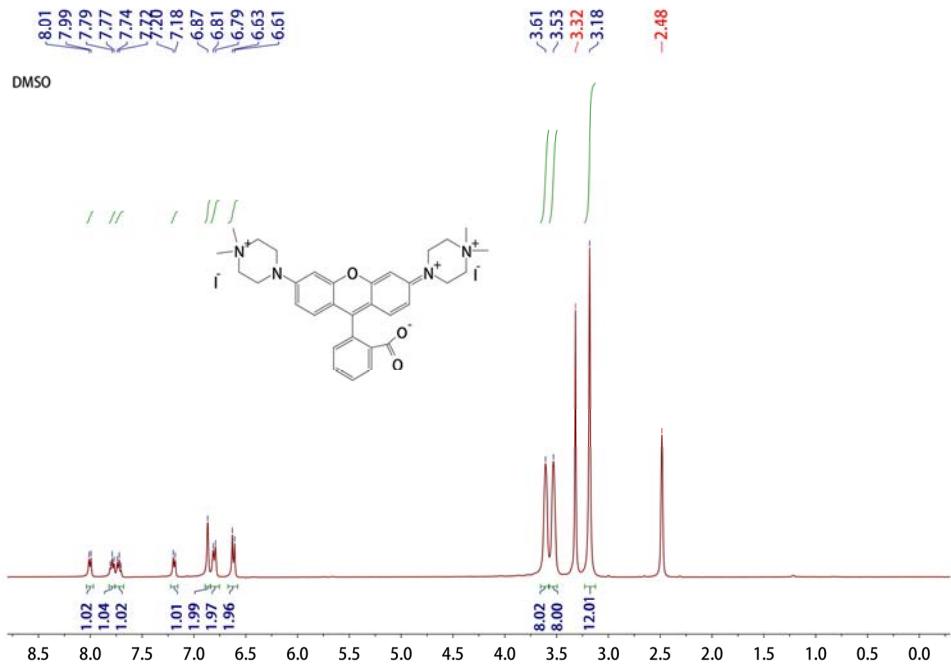
Appendix Figure 22 ^1H NMR spectrum of 5'-3-15.



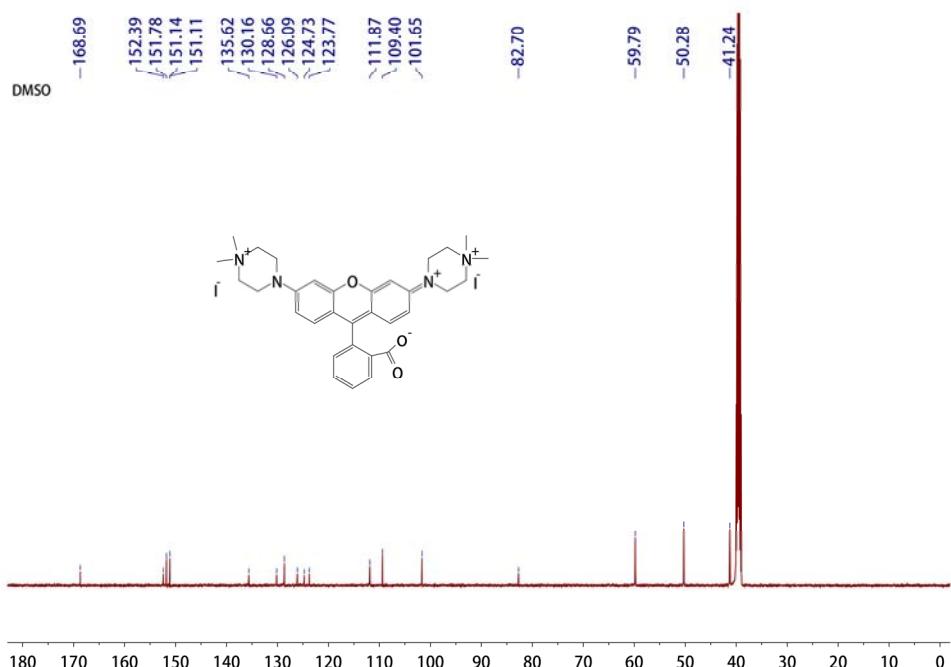
附图 23 Lyso-R(4-2)的¹H NMR 图
Appendix Figure 23 ¹H NMR spectrum of Lyso-R(4-2).



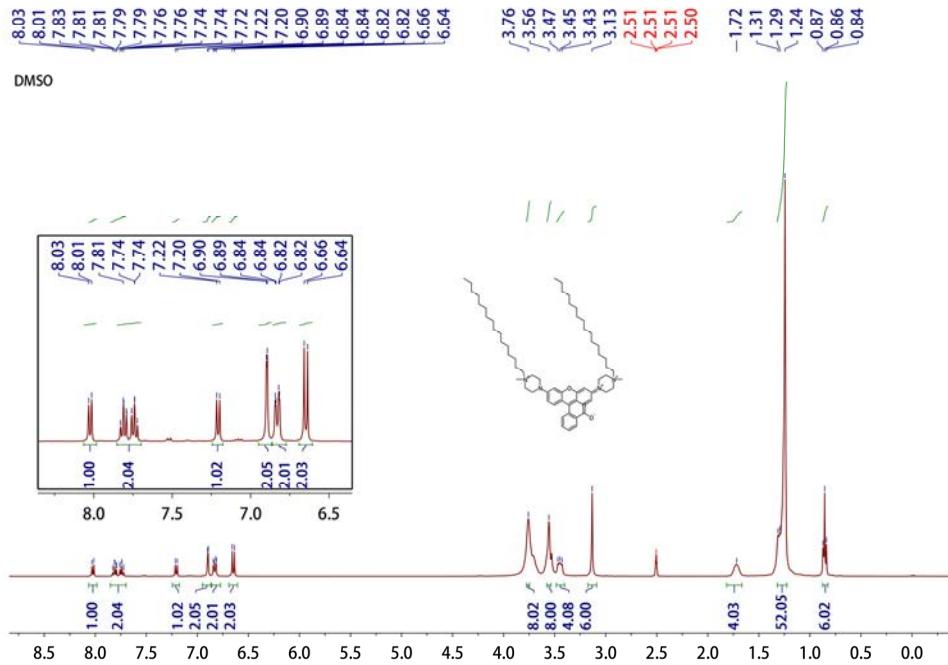
附图 24 Lyso-R(4-2)的¹³C NMR 图
Appendix Figure 24 ¹³C NMR spectrum of Lyso-R(4-2).



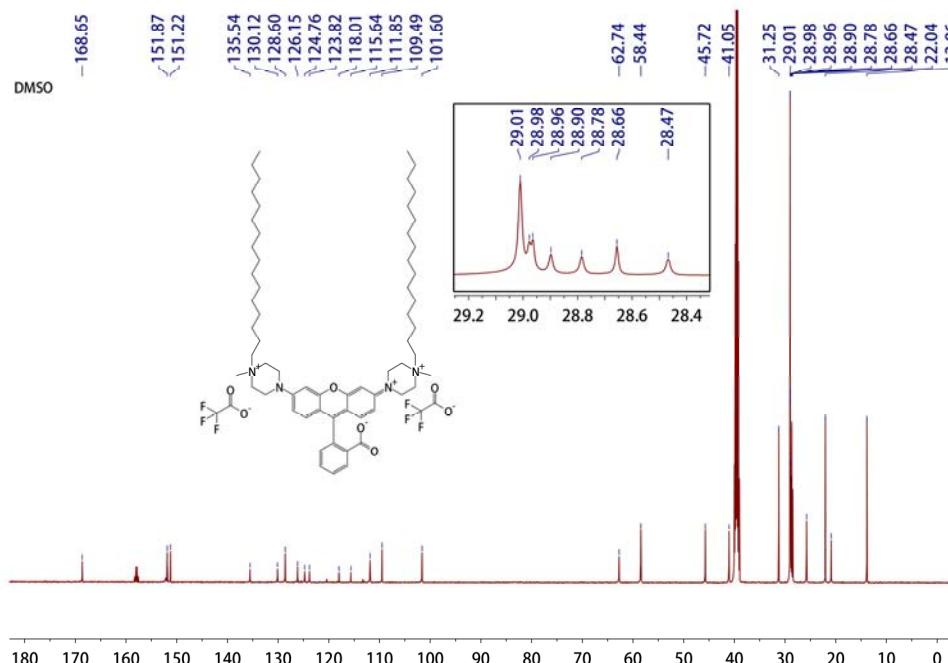
附图 25 MPR(4-3)的 ¹H NMR 图
Appendix Figure 25 ¹H NMR spectrum of MPR(4-3).



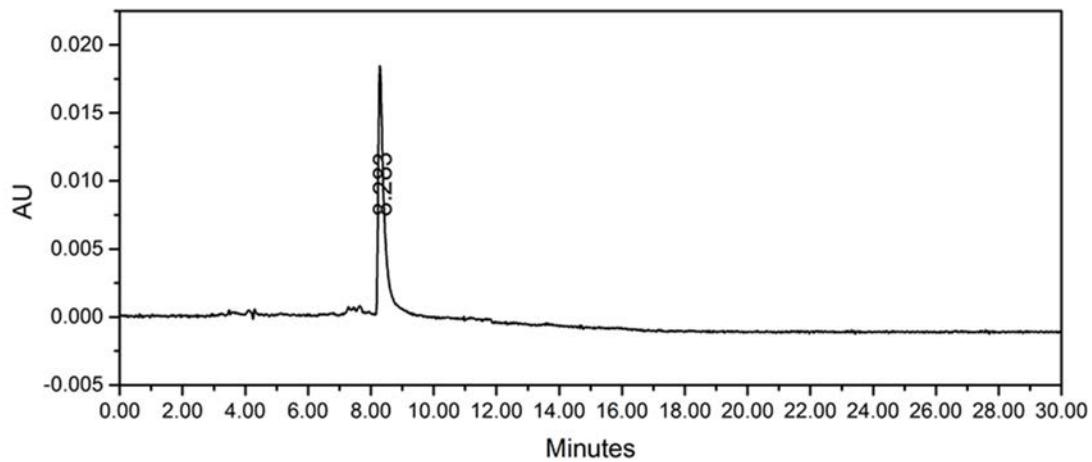
附图 26 MPR(4-3)的 ¹³C NMR 图
Appendix Figure 26 ¹³C NMR spectrum of MPR(4-3).



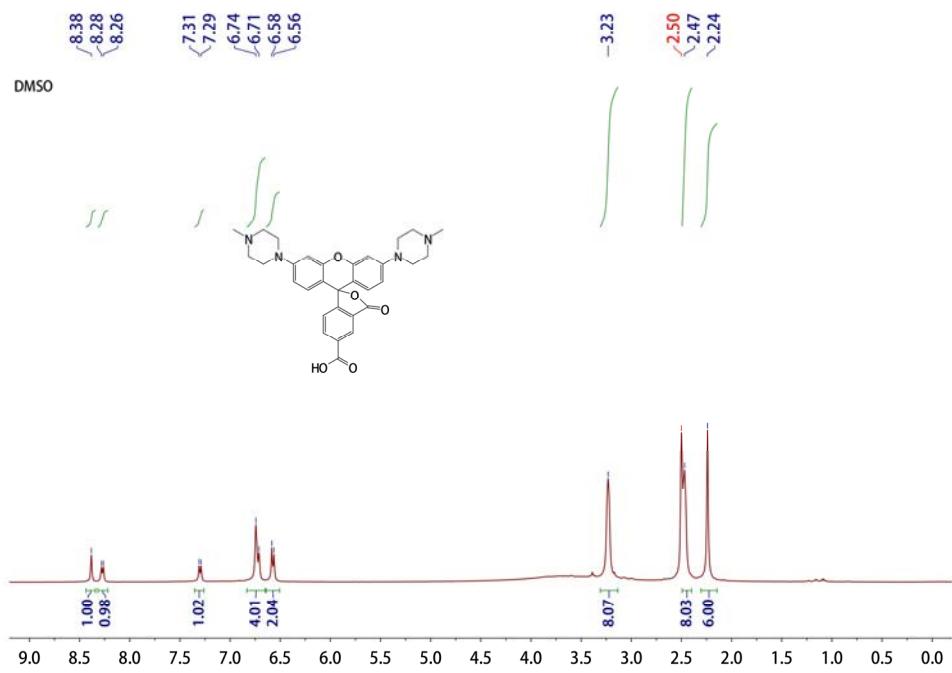
附图 27 Mem-R(4-4)的 ^1H NMR 图



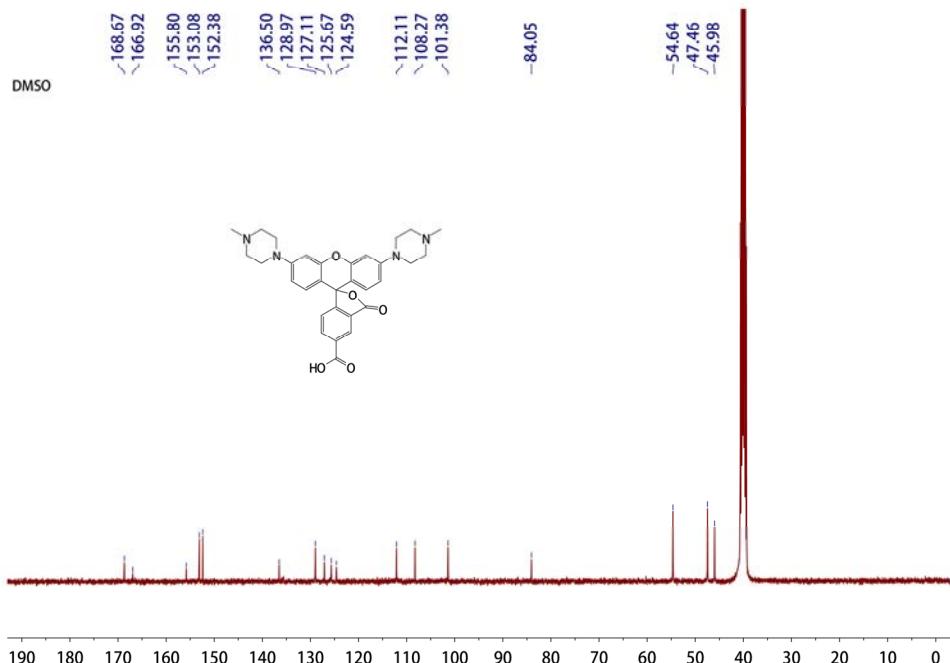
附图 28 Mem-R(4-4)的 ^{13}C NMR 图



附图 29 Mem-R(4-4)的高效液相色谱图
Appendix Figure 29 HPLC spectrum of Mem-R(4-4).

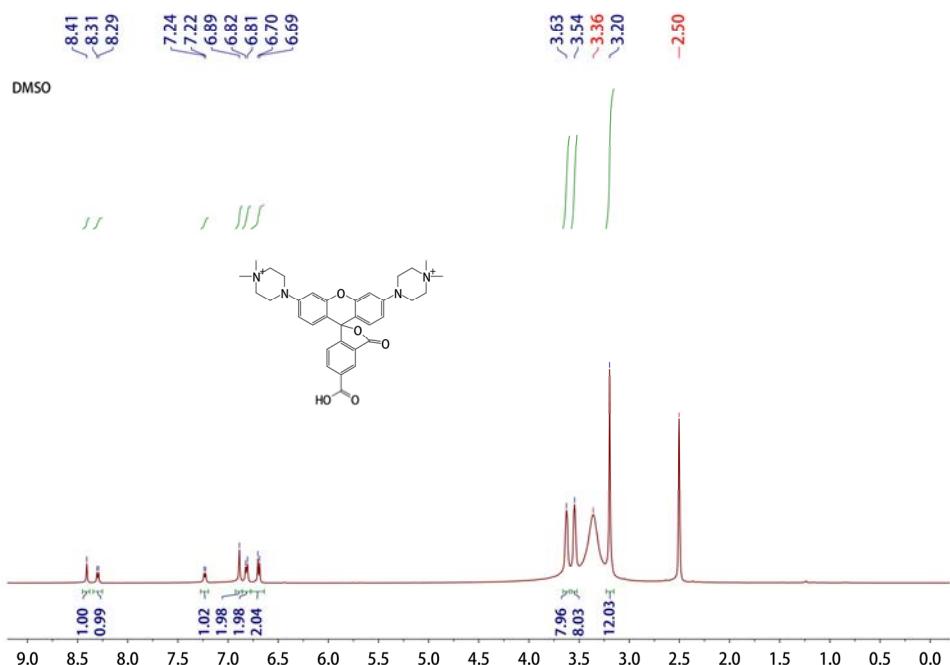


附图 30 4-PR-COOH(4-5)的¹H NMR 图
Appendix Figure 30 ¹H NMR spectrum of 4-PR-COOH(4-5).



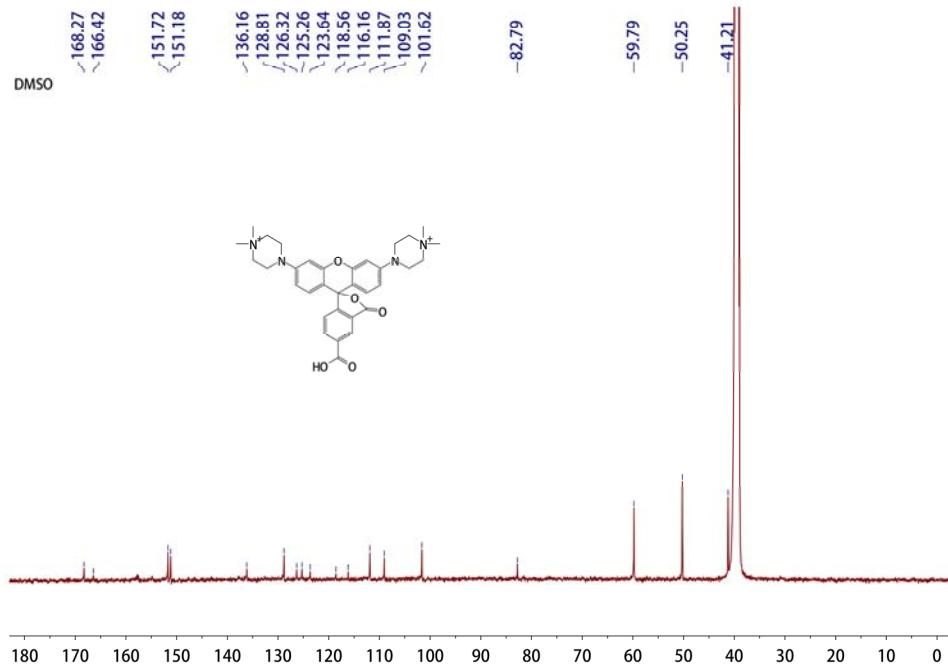
附图 31 4-PR-COOH(4-5)的 ^{13}C NMR 图

Appendix Figure 31 ^{13}C NMR spectrum of 4-PR-COOH(4-5).



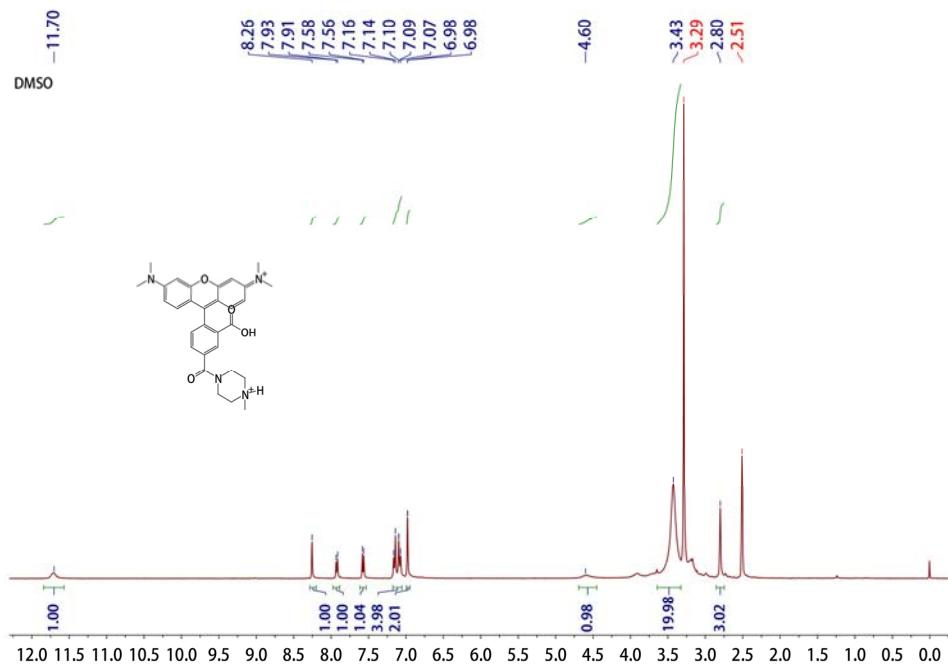
附图 32 4-MPR-COOH(4-7)的 ^1H NMR 图

Appendix Figure 32 ^1H NMR spectrum of 4-MPR-COOH(4-7).



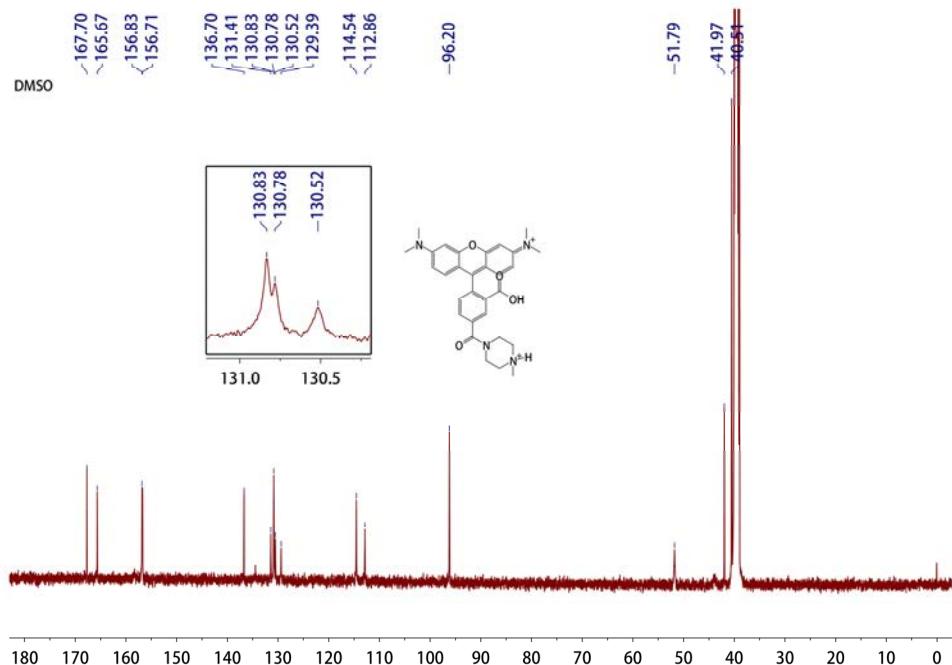
附图 33 4-MPR-COOH(4-7)的 ^{13}C NMR 图

Appendix Figure 33 ^{13}C NMR spectrum of 4-MPR-COOH(4-7).



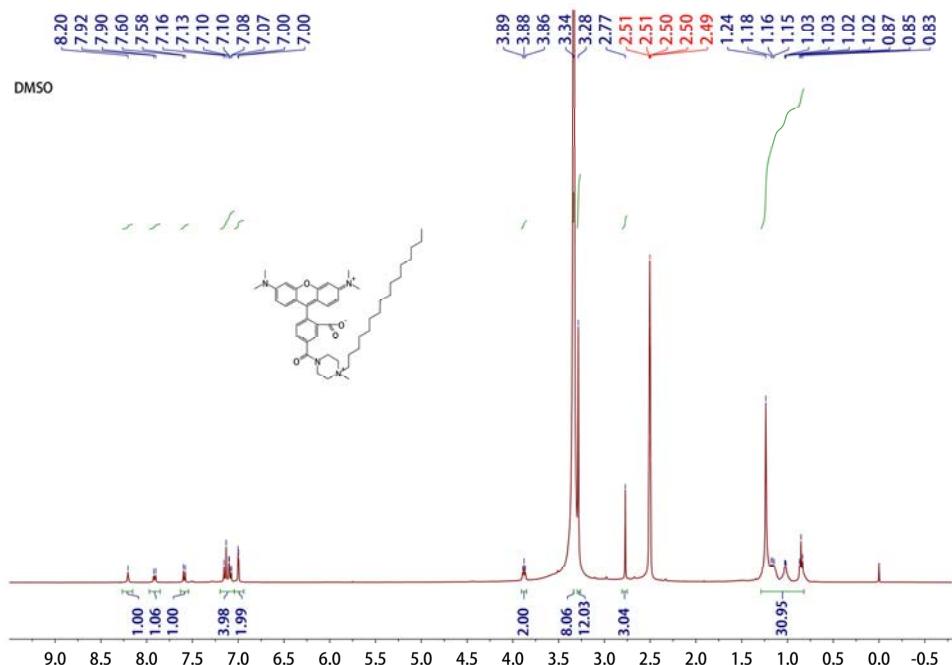
附图 34 4-P-TMR(4-10)的 ^1H NMR 图

Appendix Figure 34 ^1H NMR spectrum of 4-P-TMR(4-10).



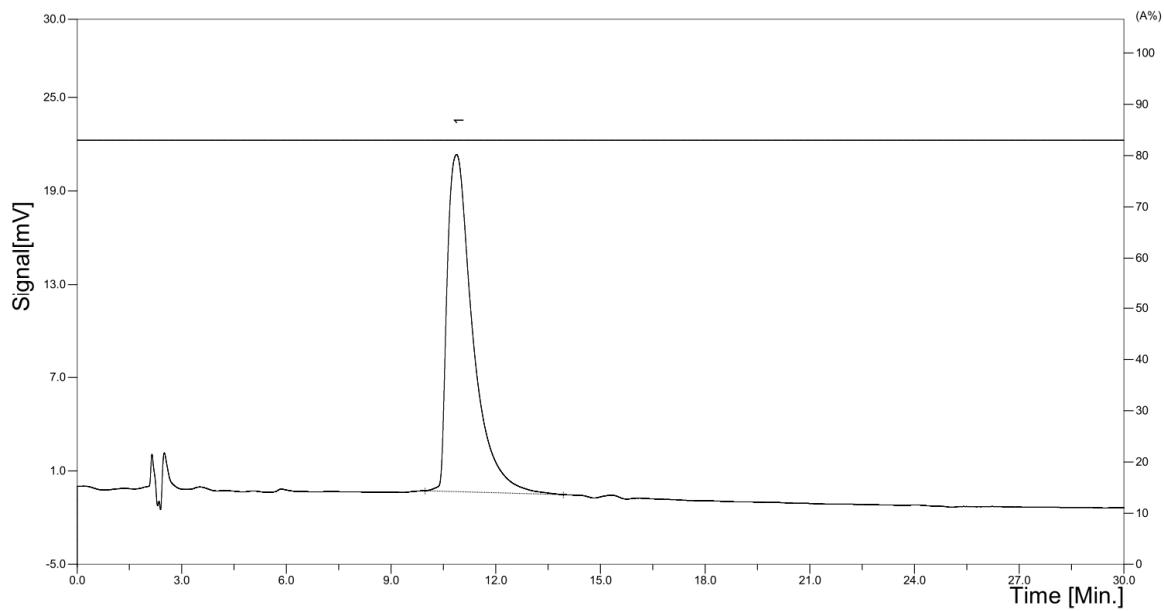
附图 35 4-P-TMR(4-10)的¹³C NMR 图

Appendix Figure 35 ¹³C NMR spectrum of 4-P-TMR(4-10).



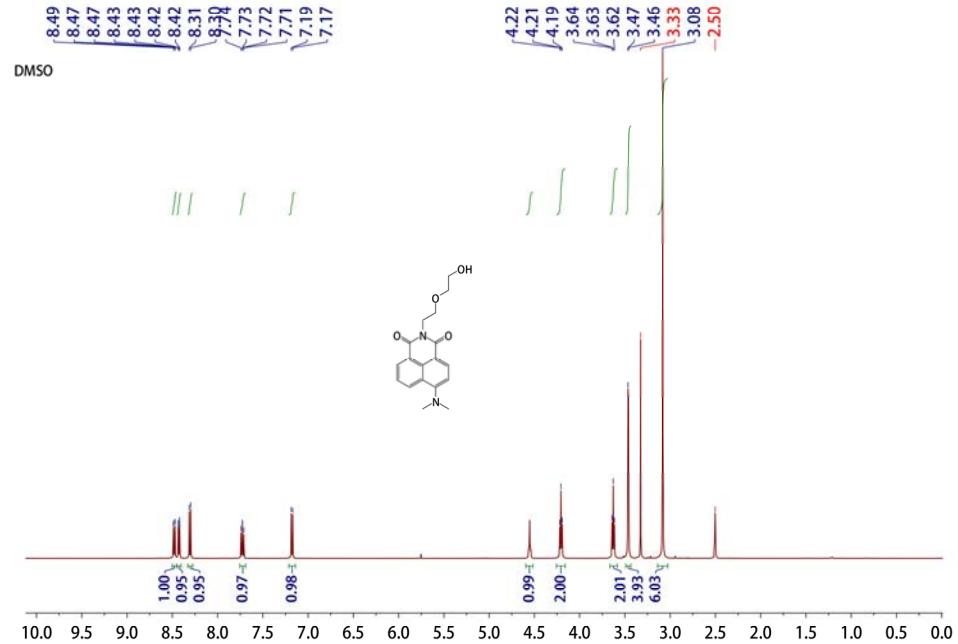
附图 36 Mem-TMR(4-11)的¹H NMR 图

Appendix Figure 36 ¹H NMR spectrum of Mem-TMR (4-11).



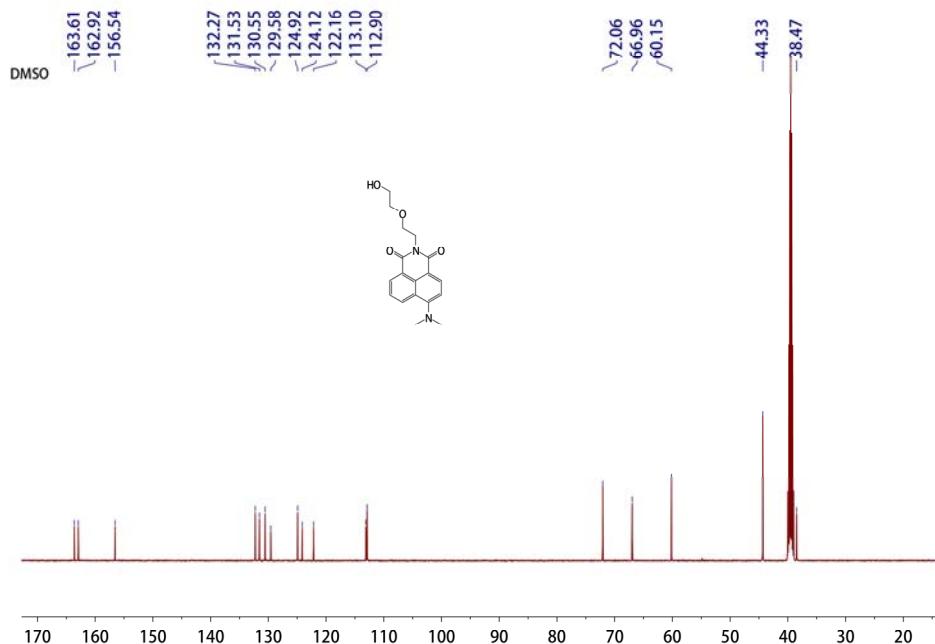
附图 37 Mem-TMR(4-11)的高效液相色谱图

Appendix Figure 37 HPLC spectrum of Mem-TMR(4-11).

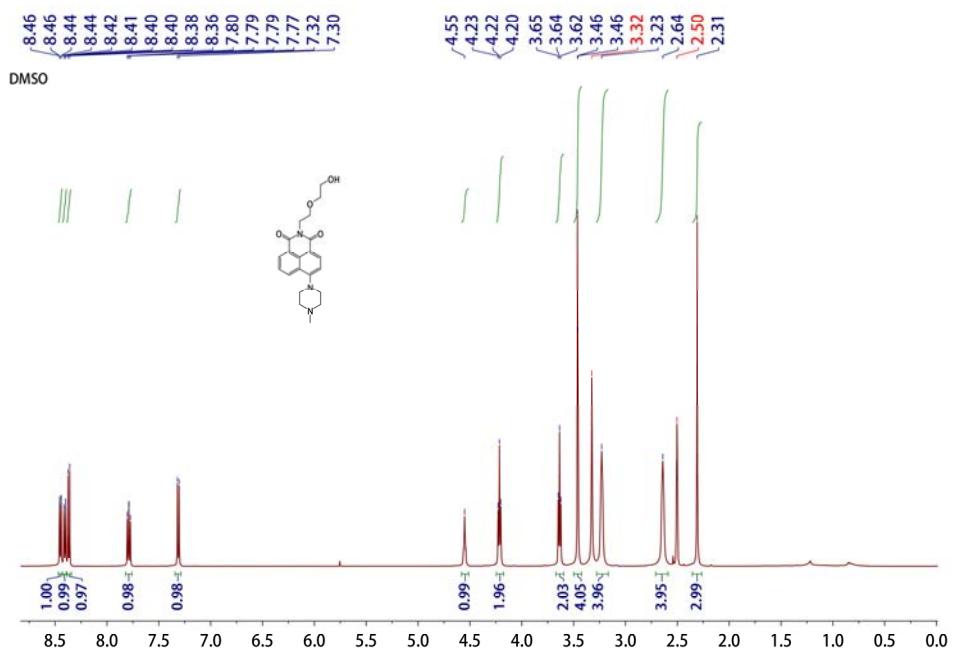


附图 38 DM-Naph(4-13)的 ¹H NMR 图

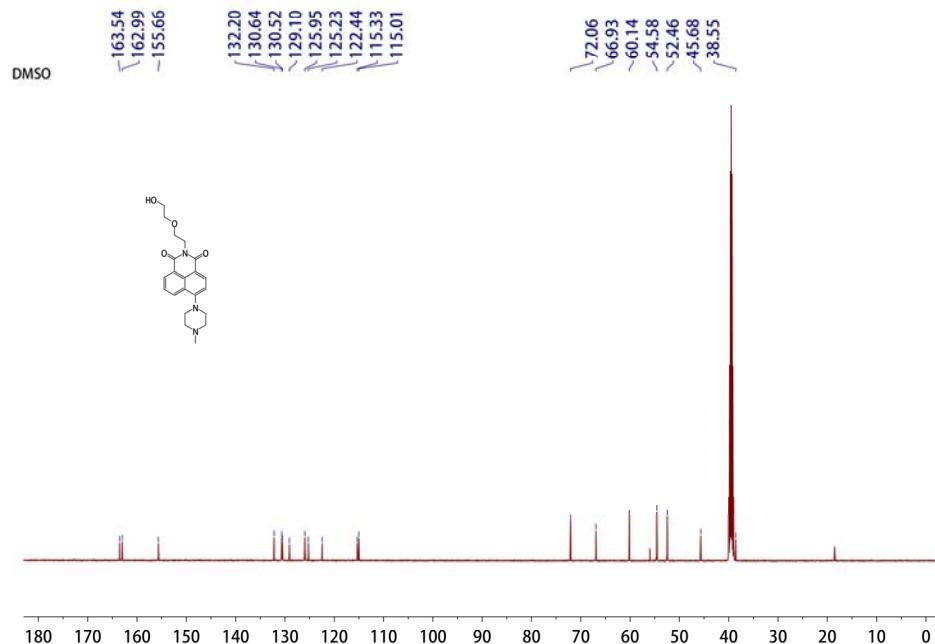
Appendix Figure 38 ¹H NMR spectrum of DM-Naph(4-13).



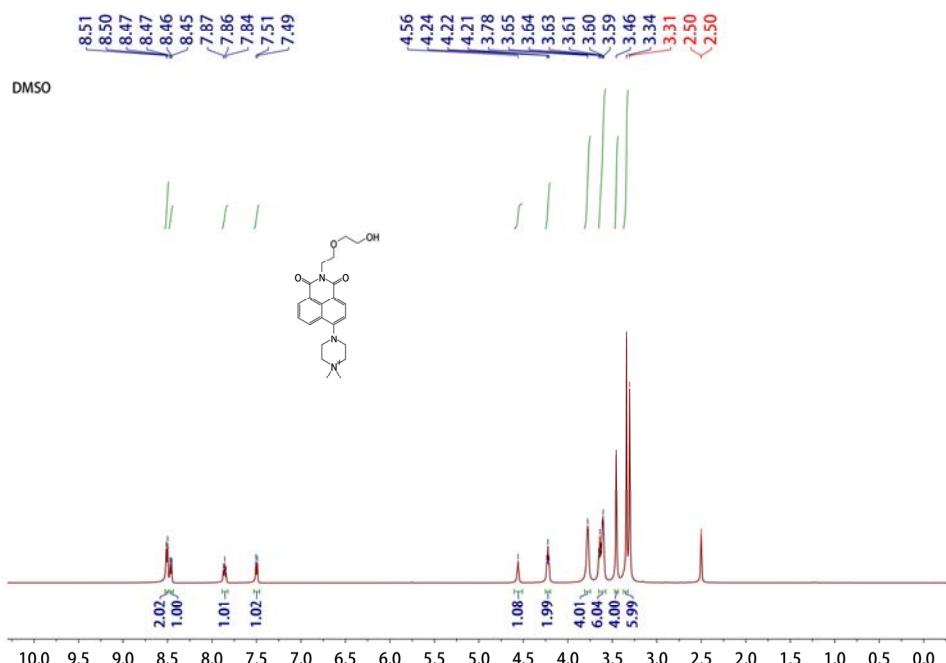
附图 39 DM-Naph(**4-13**)的 ^{13}C NMR 图
Appendix Figure 39 ^{13}C NMR spectrum of DM-Naph(**4-13**).



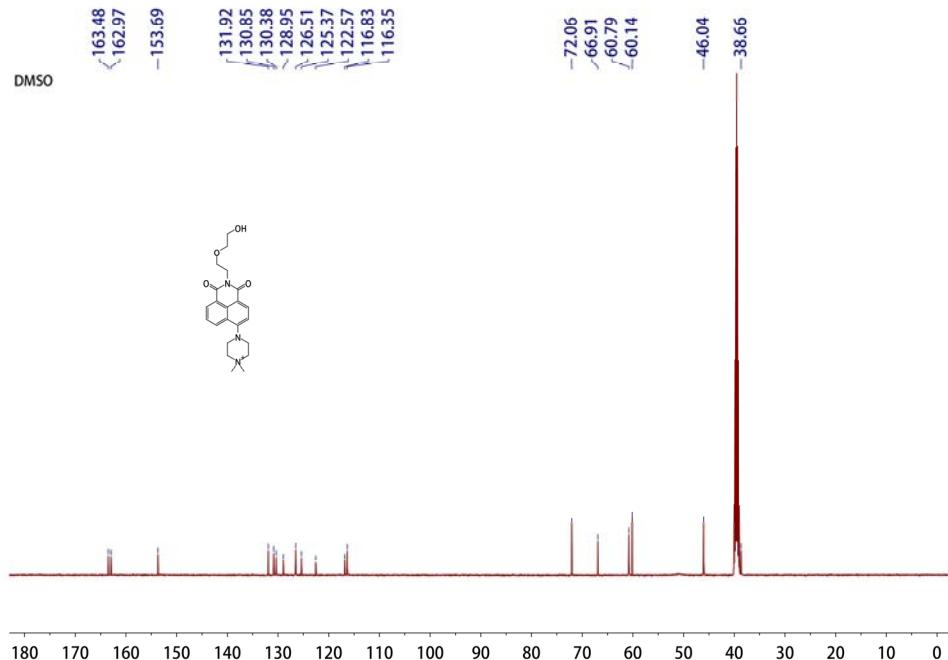
附图 40 P-Naph(4-14)的 ^1H NMR 图
Appendix Figure 40 ^1H NMR spectrum of P-Naph(4-14).



附图 41 P-Naph(4-14)的 ^{13}C NMR 图
Appendix Figure 41 ^{13}C NMR spectrum of P-Naph(4-14).

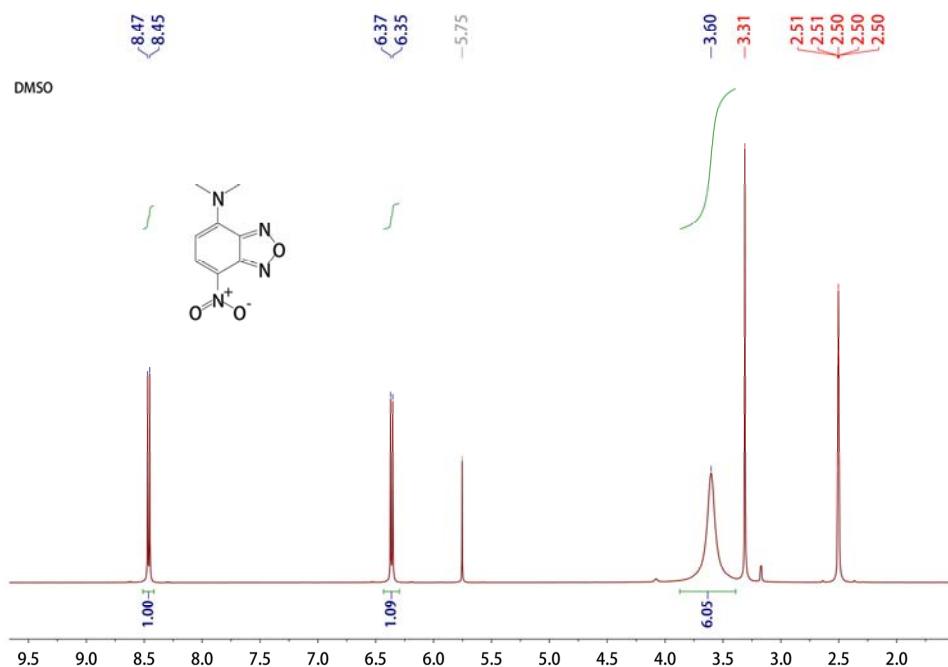


附图 42 MP-Naph(4-15)的 ^1H NMR 图
Appendix Figure 42 ^1H NMR spectrum of MP-Naph(4-15).



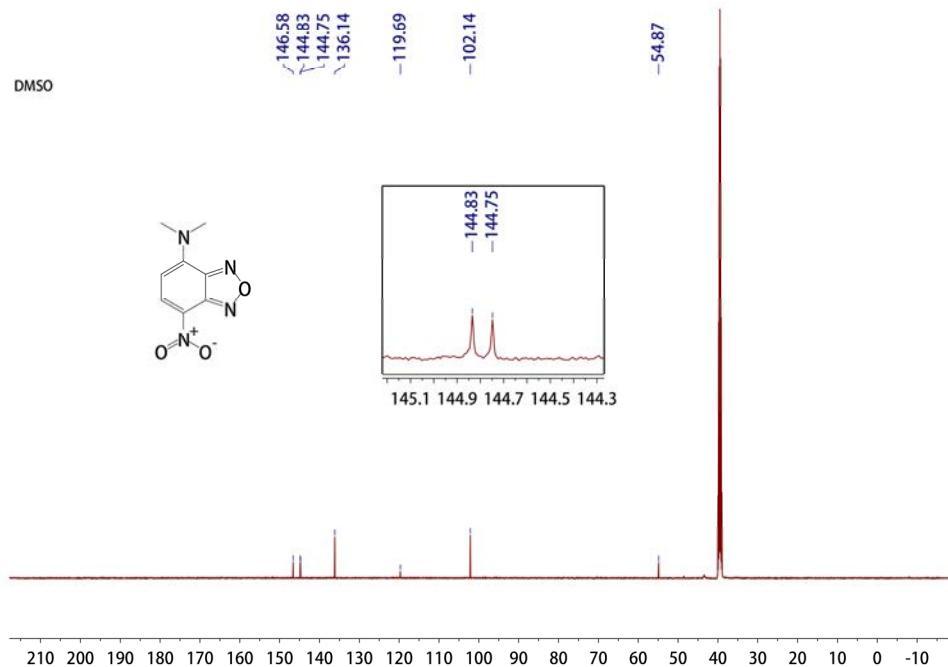
附图 43 MP-Naph(4-15)的¹³C NMR 图

Appendix Figure 43 ¹³C NMR spectrum of MP-Naph(4-15).



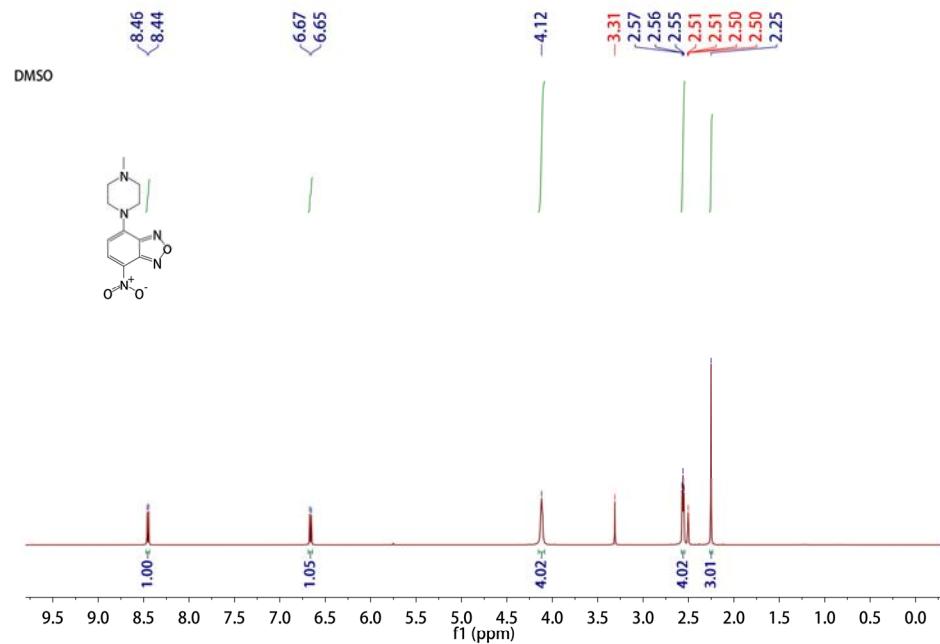
附图 44 DM-NBD(4-17)的¹H NMR 图

Appendix Figure 44 ¹H NMR spectrum of DM-NBD(4-17).



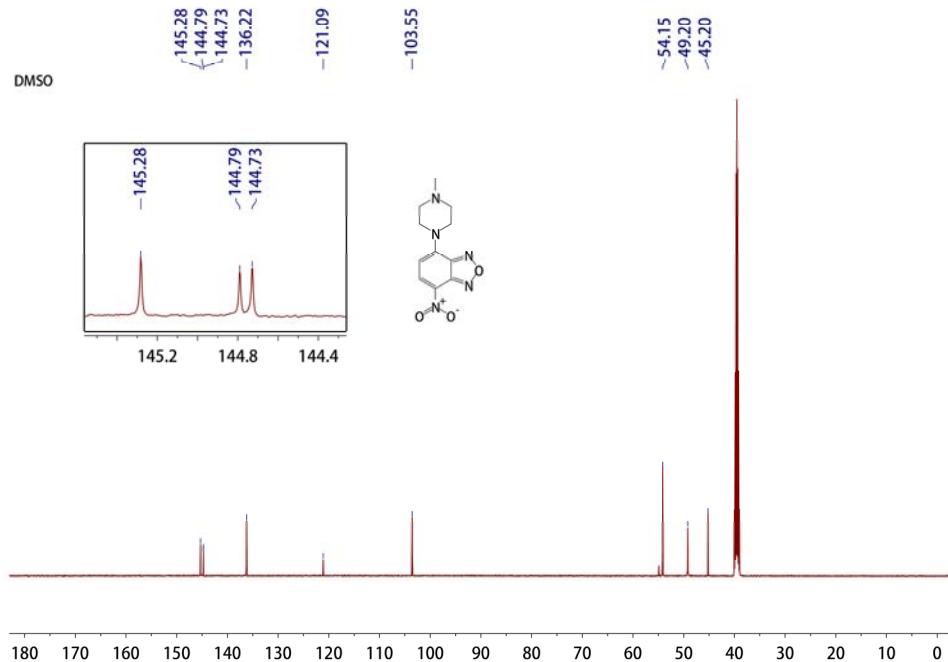
附图 45 DM-NBD(4-17)的 ^{13}C NMR 图

Appendix Figure 45 ^{13}C NMR spectrum of DM-NBD(4-17).

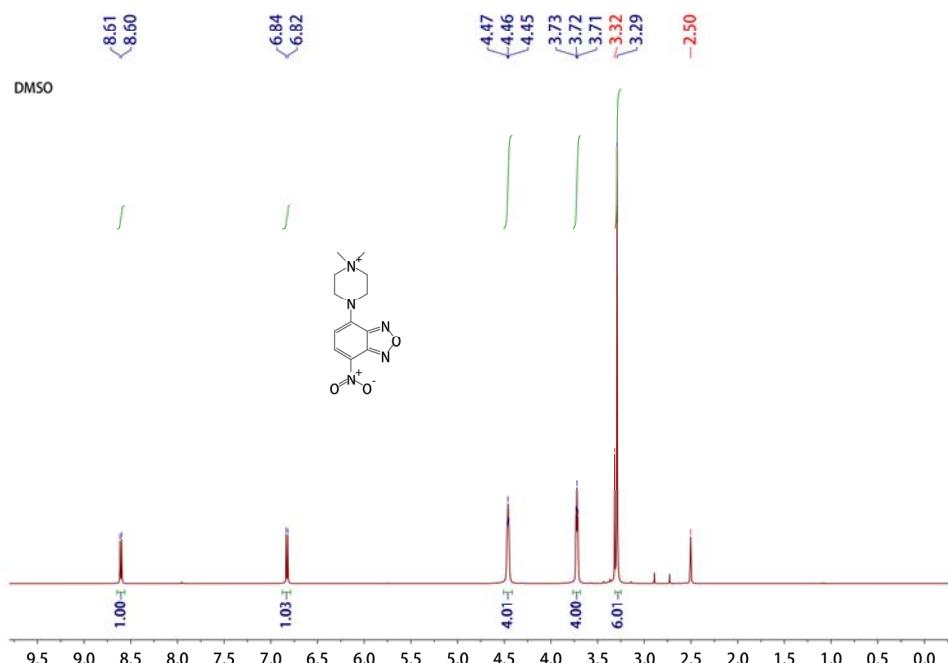


附图 46 P-NBD(4-18)的 ^1H NMR 图

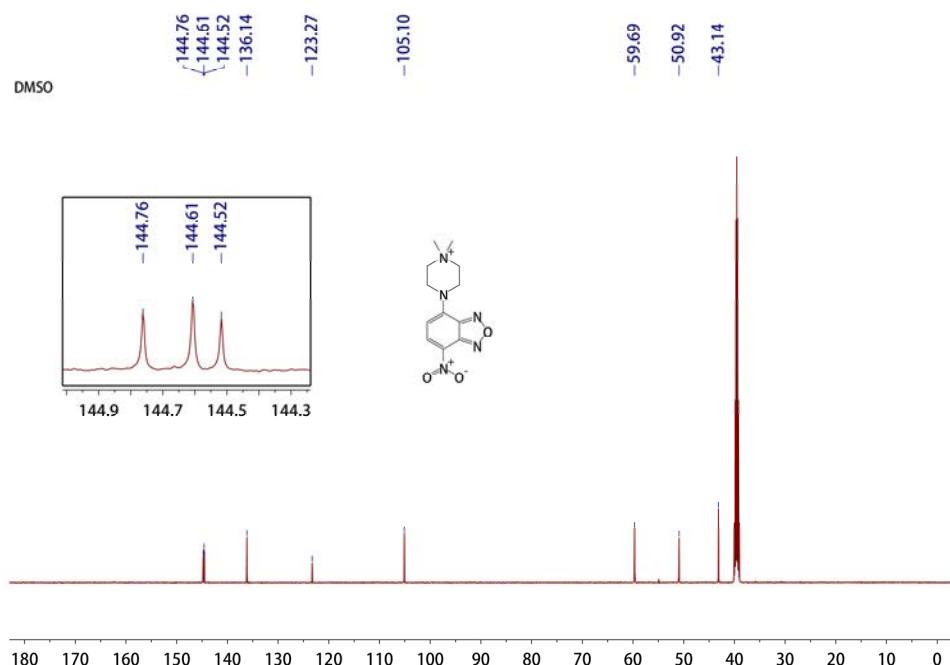
Appendix Figure 46 ^1H NMR spectrum of P-NBD(4-18)



附图 47 P-NBD(4-18)的 ^{13}C NMR 图
Appendix Figure 47 ^{13}C NMR spectrum of P-NBD(4-18)



附图 48 MP-NBD(4-19)的 ^1H NMR 图
Appendix Figure 48 ^1H NMR spectrum of MP-NBD(4-19)

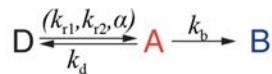


附图 49 MP-NBD(4-19)的 ^{13}C NMR 图
Appendix Figure 49 ^{13}C NMR spectrum of MP-NBD(4-19)

附录 B 激活荧光染料闪烁模型

根据 Bustamante 等提出的单分子闪烁动力学模型^[159]，在暗态的染料分子可以转换到亮态，而分子在亮态驻留一段时间后，将可能转换到暗态或者发生漂白。这些转换的发生可用泊松(Poisson)过程描述，其相关的数学推导过程可参见相应文献的支持信息，在此给出该模型的重要数学方程。

激活型荧光染料在激活后，处于可以被激发出荧光信号的亮态(A)，而在被激发的过程中，染料分子可以转换(k_d)进入到暗态(D)，也可以通过光漂白过程(k_b)不可逆的转换到漂白状态(B)。在暗态(D)的分子也随机转换(转换速率 k_{r1} 、 k_{r2} ，转换系数 α)到亮态(A)，下图展示了上述的物理模型：



需要注意的是，在模型中，计数的闪烁次数并不包括第一次的亮态(单分子荧光轨迹如果只有一个亮态过程，则该分子闪烁次数统计为0)：

$$\bar{n}_{\text{blinks}} = n_{\text{blinks}} - 1 \quad (\text{B.1})$$

假定对于所有观测的事件满足泊松(Poisson)过程，在驻留时间 t 发生事件的可能性为：

$$P_k(t) = k e^{-kt} \quad (\text{B.2})$$

因此，在 t 时间发生从亮态到暗态的转换过程满足：

$$P_{\text{on}}(t) = (k_d + k_b) e^{-(k_d + k_b)t} \quad (\text{B.3})$$

在 t 时间发生从暗态转换到亮态的转换也满足双指数分布：

$$P_{\text{dark}}(t) = \alpha k_{r1} e^{-k_{r1}t} + (1 - \alpha) k_{r2} e^{-k_{r2}t} \quad (\text{B.4})$$

根据上面的假设，可推出发生多少次闪烁的可能性为：

$$P_{\text{blinks}}(n_{\text{blinks}}) = \eta^n (1 - \eta) \quad (\text{B.5})$$

$$\eta \stackrel{\text{def}}{=} \frac{k_d}{k_d + k_b} \quad (\text{B.6})$$

也可推出在 t 时刻发生光漂白的概率为：

$$P_{\text{bleach}}(t) = k_b (r_1 e^{-k_1 t} + r_2 e^{-k_2 t} + r_3 e^{-k_3 t}) \quad (\text{B.7})$$

$$r_1 \stackrel{\text{def}}{=} \frac{(k_{r1}-k_1)(k_{r2}-k_1)}{(k_2-k_1)(k_3-k_1)} \quad (B.8)$$

$$r_2 \stackrel{\text{def}}{=} \frac{(k_{r1}-k_2)(k_{r2}-k_2)}{(k_1-k_2)(k_3-k_2)} \quad (B.9)$$

$$r_3 \stackrel{\text{def}}{=} \frac{(k_{r1}-k_3)(k_{r2}-k_3)}{(k_1-k_3)(k_2-k_3)} \quad (B.10)$$

其中 k_1, k_2, k_3 为下面的三元方程组的负数解:

$$s^3 + as^2 + bs + c = 0 \quad (B.11)$$

$$a = k_d + k_b + k_{r1} + k_{r2} \quad (B.12)$$

$$b = (k_{r1} + k_{r2} - \bar{k}_r)k_d + (k_{r1} + k_{r2})k_b + k_{r1}k_{r2} \quad (B.13)$$

$$c = k_b k_{r1} k_{r2} \quad (B.14)$$

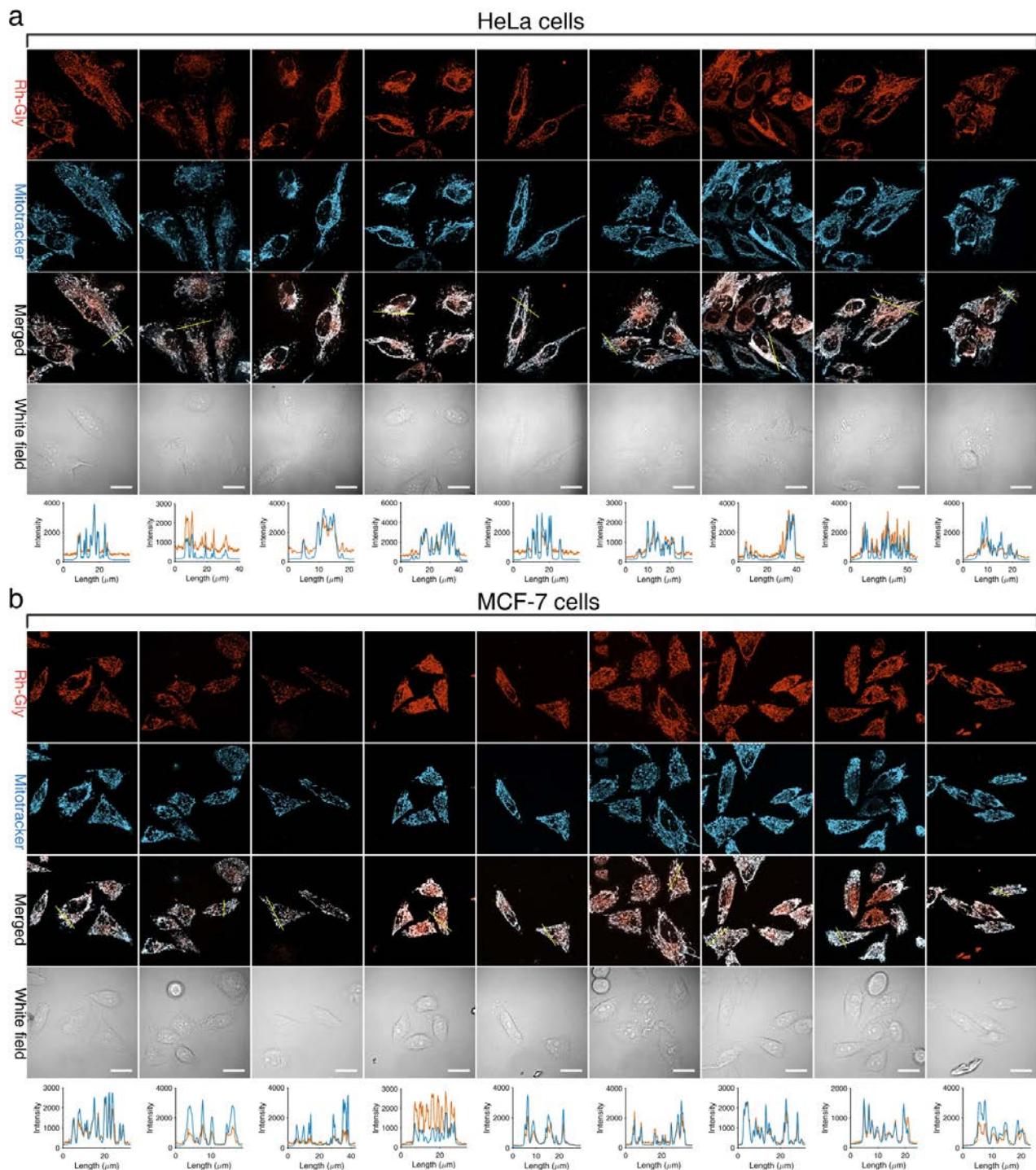
根据上述的模型的方程 B.3-B.6, 可以从单分子统计数据中拟合出 k_d, k_b, k_{r1}, k_{r2} and α 。然后用拟合的结果, 以及方程 B.7-B.14, 可以获得拟合的光漂白概率分布曲线, 并与实际测量获得的统计结果进行对比, 验证上述模型的可行性。同时更具拟合获得的速率, 可以通过方程转换为预期的平均闪烁次数:

$$\bar{n}_{\text{blinks}} = \frac{k_d}{k_b} \quad (B.15)$$

该模型下的暗态平均持续时长, 可用如下方程计算:

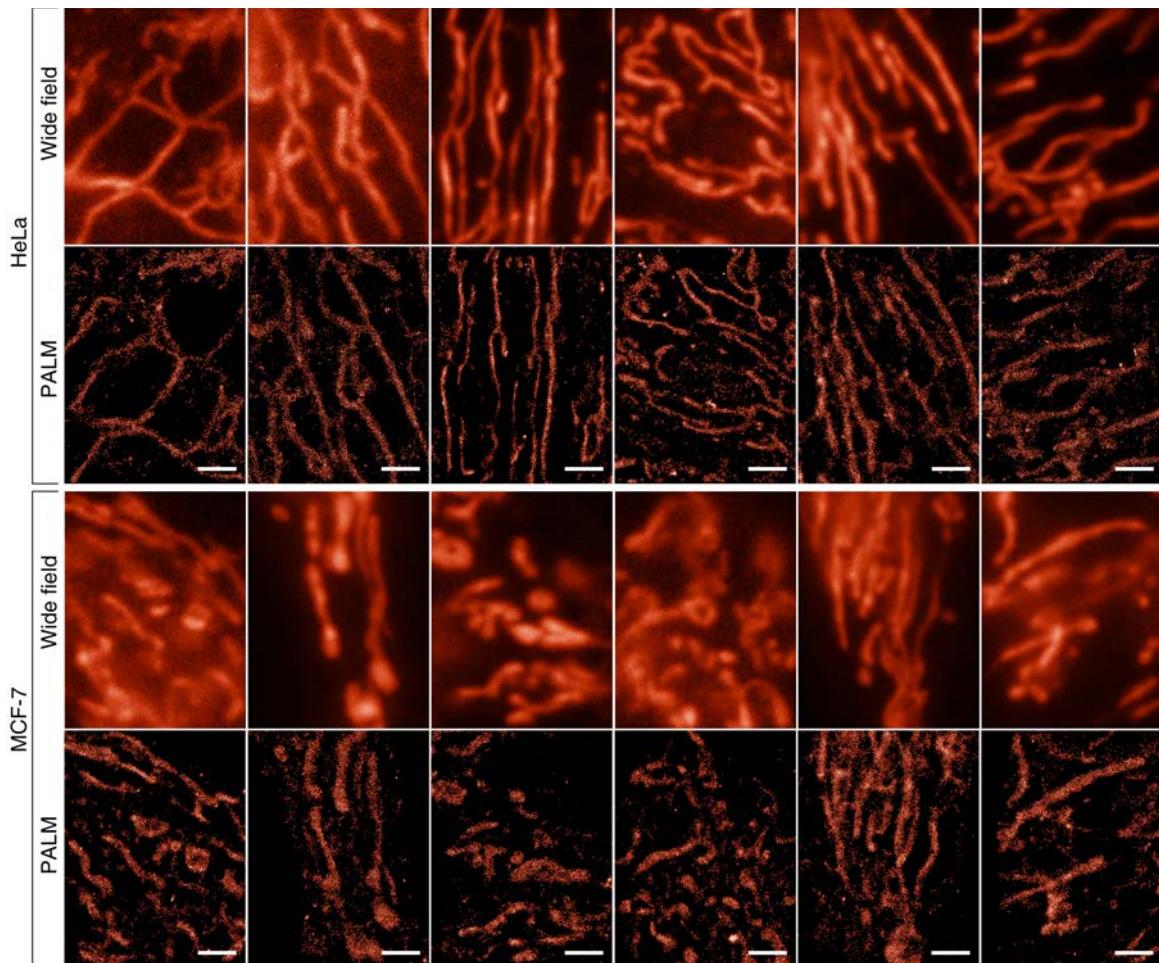
$$\bar{t}_{\text{dark}} = \alpha \times \frac{1}{k_{r1}} + (1 - \alpha) \times \frac{1}{k_{r2}} \quad (B.16)$$

附录 C 补充甘氨酸罗丹明成像结果



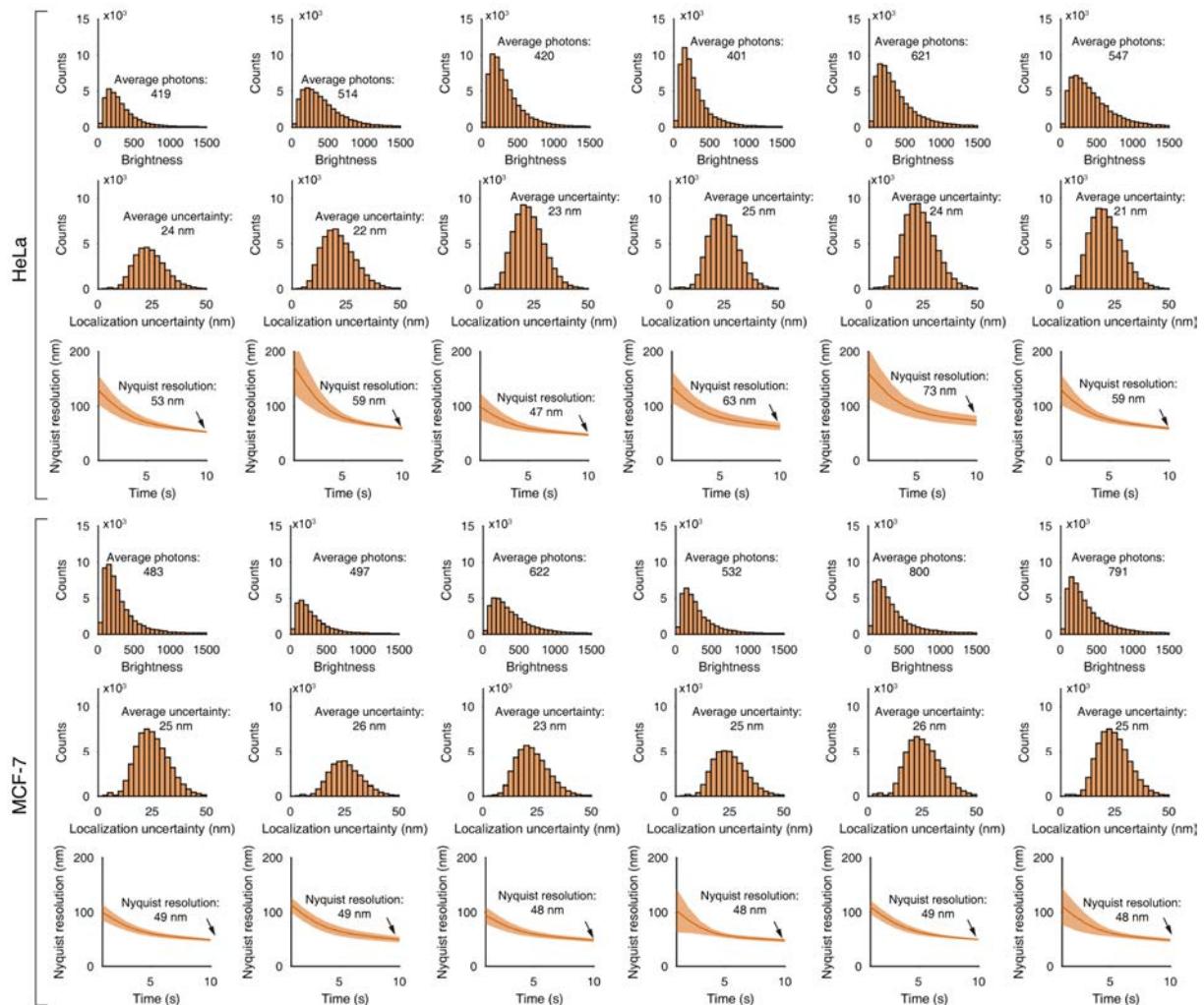
附图 50 Rh-Gly 与 Mitotracker Deep Red 在 HeLa (a) 和 MCF-7 (b) 细胞系的共定位分析。每组分析展示了在共定位成像分析中的 9 个不同区域。在每组分析中，从上往下：紫外光激活后 Rh-Gly 的共聚焦荧光成像图，着色为红色；Mitotracker Deep Red 的共聚焦荧光成像图，着色为蓝色；两张荧光成像图的叠加图；沿着叠加图中黄色线标注区域的两个荧光图的荧光强度剖线。标尺：25 μm 。

Appendix Figure 50 Colocalization studies between Rh-Gly and Mitotracker Deep Red in HeLa (panel a) and MCF-7 cells (panel b). Each panel presents nine different regions of the colocalization experiment. In each panel, from top row to bottom row: confocal fluorescence images of Rh-Gly, colored in red; confocal fluorescence images of Mitotracker Deep red, colored in blue; merged images of two dyes; corresponding bright field images; line intensity distributions along yellow lines in the merged images. Scale bar: 25 μm .



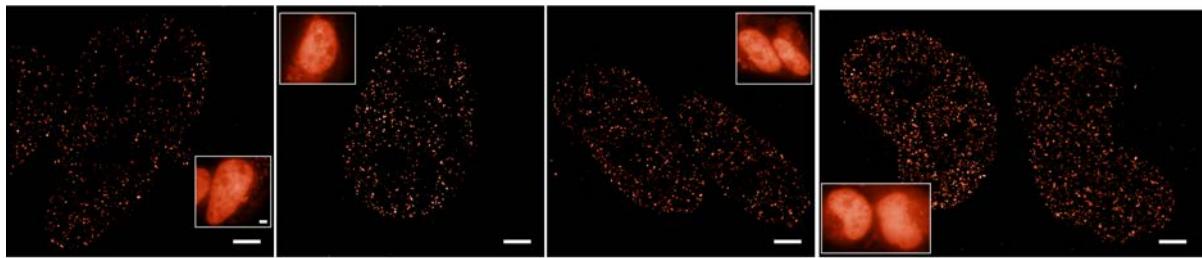
附图 51 HeLa (上) 和 MCF-7 (下) 细胞系的活细胞线粒体超分辨成像。在每组数据中，顶端行显示了对线粒体区域的宽场荧光成像图而底端行显示了在倾斜照明模式下对应的 10 s 内超分辨重构图。标尺：2 μm 。

Appendix Figure 51 Super-resolution imaging of live cell mitochondria in HeLa (top panel) and MCF-7 (bottom panel) cell lines. In each panel, the top row exhibits the wide-field images of regions rich of mitochondria and the bottom row shows the corresponding reconstructed images in 10 s under inclined illumination. Scale bars: 2 μm .



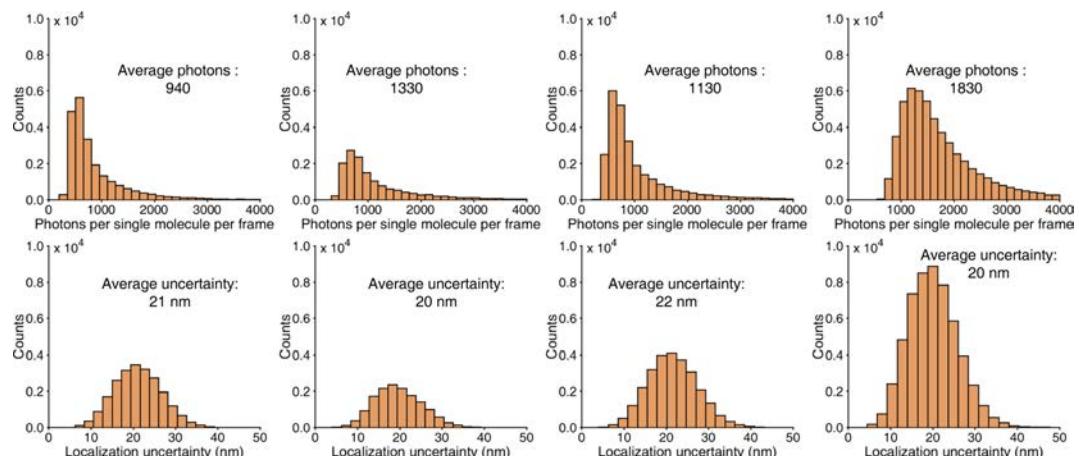
附图 52 对附图 51 中 HeLa (上) 和 MCF-7 (下) 细胞系超分辨成像结果的定量分析。在每组数据中, 从顶端行往底端行: 单分子亮度的直方图; 定位精度的直方图; 从附图 51 的光激活定位成像图分析的 Nyquist 分辨率。

Appendix Figure 52 Quantitative analysis of super-resolution imagings in HeLa (top panel) and MCF-7 (bottom panel) cell lines in Appendix Figure 51. In each panel, from top row to bottom row: histogram of photon numbers per single molecule per frame; histogram of localization uncertainties; Nyquist resolution estimations for the corresponding PALM imaging in Appendix Figure 51.



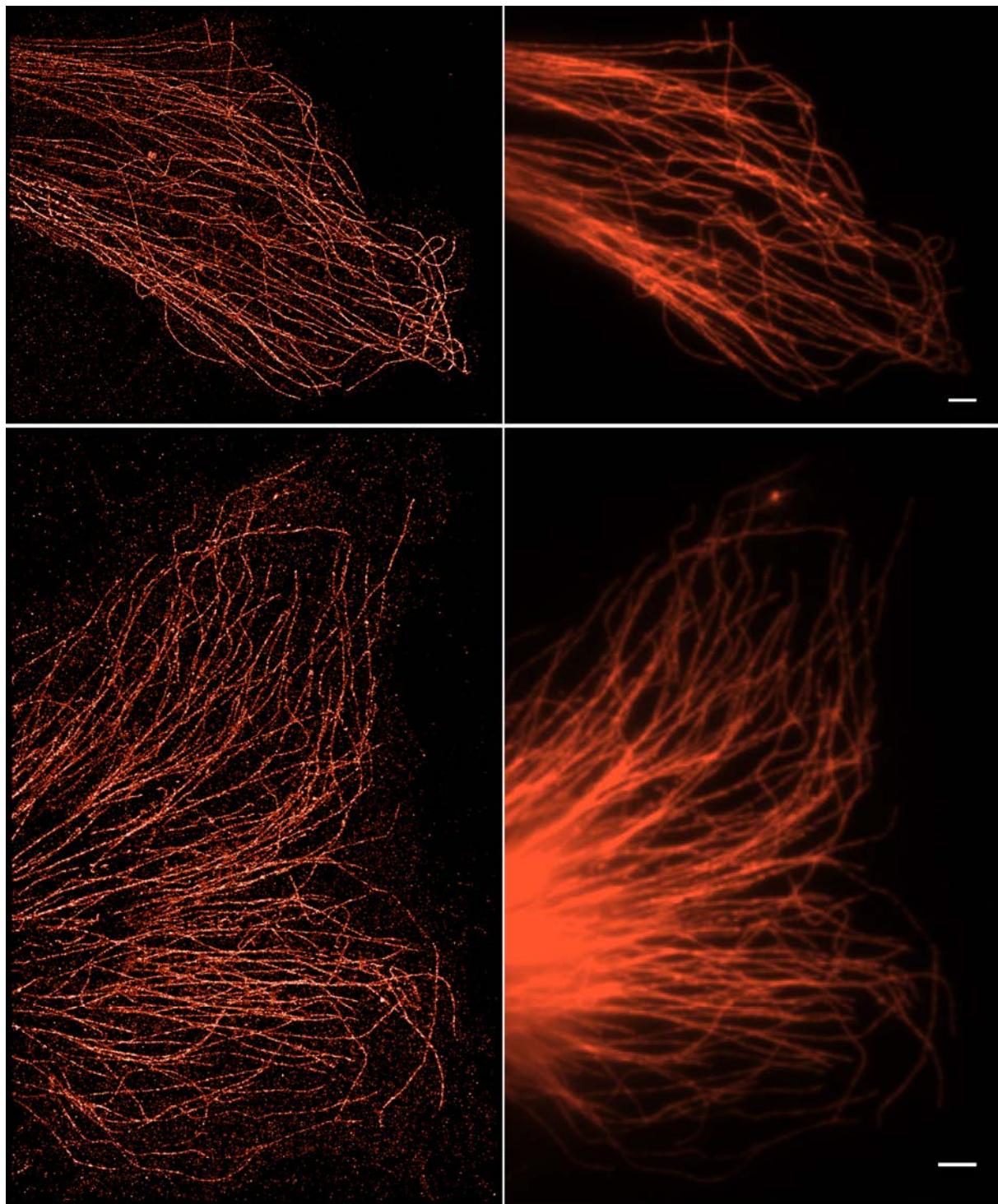
附图 53 在倾斜照明模式下对活 HeLa 细胞细胞核的组蛋白超分辨成像。HaloTag 融合蛋白在活细胞中共价连接 Rh-Gly-Halo。由于瞬时转染，细胞内的融合蛋白过表达水平不完全一致。超分辨成像图从 5000 帧原始数据重构获得。插图显示了从同样标记的蛋白拍摄的宽场荧光成像图。标尺：3 μ m。

Appendix Figure 53 Super-resolution imaging of H2B-Halo fusion proteins in nucleus of live HeLa cells under inclined illumination. The H2B-Halo fusion proteins are covalently coupled to Rh-Gly-Halo in live cells, with different levels of overexpression due to transient transfection. The super-resolution images are reconstructed from 5000 frames. Inset presents the wide-field image from the same labeled proteins. Scale bar: 3 μ m.



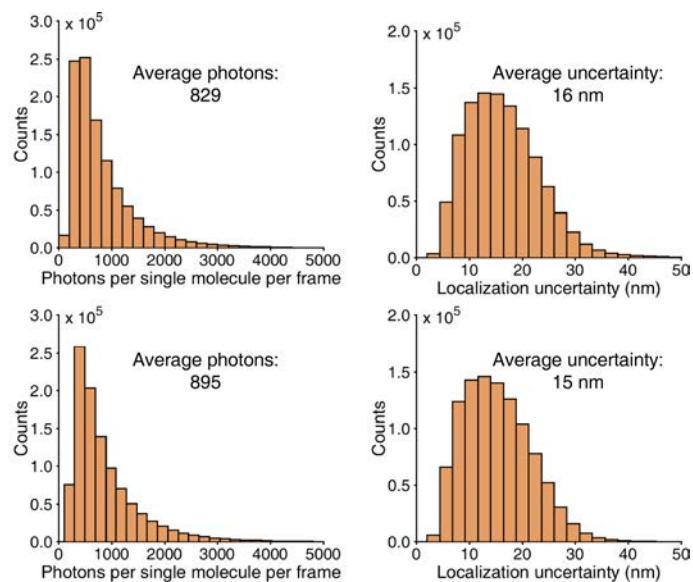
附图 54 附图 53 的超分辨重构定量分析。顶端行：单分子亮度直方图；底端行：定位精度直方图。从左往右对应附图 53 的定量分析结果。

Appendix Figure 54 Quantitative analysis of the reconstructions of super-resolution images in Appendix Figure 53. Top panel, histogram of single-molecule brightness; bottom panel, histogram of localization uncertainties. From left to right, corresponding quantitative plots for Appendix Figure 53.



附图 55 通过一抗抗 α -tubulin 和标记有 Rh-Gly-NCS 的二抗免疫染色的 HeLa 细胞微管的超分辨成像。左列图：在倾斜照明模式下固定 HeLa 细胞的微管的光激活定位成像，通过 11000 或者 17000 帧原始数据重构。成像也为 PBS 缓冲液。右列图：对应微管的宽场成像图。标尺：3 μm 。

Appendix Figure 55 Super-resolution imaging of microtubules in HeLa cells immunostained with primary antibody against α -tubulin and secondary antibodies conjugated with Rh-Gly-NCS. Left column: PALM imaging of microtubules in fixed HeLa cells under inclined illumination, reconstructed from 11000 or 17000 frames. The imaging was performed in PBS solution. Right column: corresponding wide-field images of microtubules. Scale bars: 3 μ m.



附图 56 附图 55 重构图的定量分析。左列图：单分子亮度直方图；右列图：定位精度直方图。顶端行对应于附图 55 的顶端行重构结果；底端行对应于附图 55 的底端行重构结果。

Appendix Figure 56 Quantitative analysis of reconstructions in Appendix Figure 55. Left column: histogram of single-molecule brightness. Right column: histogram of localization uncertainties. Top row correlates to the reconstructed image on top row in Appendix Figure 55. Bottom row correlates to the reconstructed image on bottom row in Appendix Figure 55.

攻读博士学位期间科研项目及科研成果

发表论文

- [1] 叶智伟, 杨薇, 肖义. 光激活定位超分辨荧光成像的罗丹明分子设计[J]. 中国科学: 化学, 2017, 47(8):926-932. 中文核心期刊 (本学位论文第 1 章部分内容)
- [2] Ye Zhiwei, Yu Haibo, Yang Wei, et al. 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. (**SCI** 检索号: 000466053400017) (本学位论文第 3 章内容)
- [3] Ye Zhiwei, Yang Wei, Wang Chao, 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. (**SCI** 检索号: 000487180200004) (本学位论文第 4 章内容)
- [4] Ye Zhiwei, Xiao Yi, Guo Haiying, et al. Specific and Photostable Rhodamine-Based Tracker for 3D Video Imaging of Single Acidic Organelles[J]. RSC Advances, 2014, 4(71):37547–37555. (**SCI** 检索号: 000341454600013) (本学位论文第 4 章部分内容)
- [5] He Haihong, Ye Zhiwei(共同一作), Zheng Ying, et al. Super-Resolution Imaging of Lysosomes with a Nitroso-Caged Rhodamine[J]. Chemical Communications, 2018, 54(23):2842–2845. (**SCI** 检索号: 000428844500003)
- [6] He Haihong, Ye Zhiwei(共同一作), Xiao Yi, et al. Super-Resolution Monitoring of Mitochondrial Dynamics upon Time-Gated Photo-Triggered Release of Nitric Oxide[J]. Analytical Chemistry, 2018, 90(3):2164–2169. (**SCI** 检索号: 000424730600095)
- [7] Zhang Xiaodong, Ye Zhiwei(共同一作), Zhang Xinfu, et al. A Targetable Fluorescent Probe for dSTORM Super-Resolution Imaging of Live Cell Nucleus DNA[J]. Chem. Commun., 2019, 55(13):1951–1954. (**SCI** 检索号: 000458390000016)

参与科研项目

- [1] 国家自然科学基金项目 (21376038), 靶向亚细胞器的荧光分子探针, 2014.1 – 2017.12, 负责人: 肖义
- [2] 国家自然科学基金项目 (21576040), 近红外染料衍生的可溶性星形共轭大分子类电子受体材料, 2016.1 – 2019.12, 负责人: 肖义
- [3] 国家自然科学基金项目 (21776037), 酶标签融合蛋白的多色标记染料探针, 2018.1 – 2021.12, 负责人: 肖义

[4] 国家自然科学基金项目（21804016），超分辨成像荧光染料分子的高通量筛选及发光机制定量研究，2019.1 – 2021.12，负责人：杨薇

致 谢

在本论文行文完成之际，我由衷的感谢我的导师，肖义教授。肖老师的智慧与坚持，一直是照亮我前行的灯塔，肖老师对我的工作的支持与信心，是支撑我研究前进的力量，肖老师的宽容与理解，让我得以自由的成长。没有肖老师的教导，本论文的工作将无法完成。

本论文研究的完成特别感谢合作者，精细化工国家重点实验室工程师杨薇老师。本论文的超分辨成像及单分子研究工作的完成离不开杨老师的帮助，许多结果是与杨老师共同探讨研究完善的，感谢杨老师对我的鼓励与支持。

本论文的完成同时还要感谢课题组的陈令成老师，感谢陈老师在日常生活及科研上对我的帮助。感谢课题组的张新富老师，在研究起始阶段指导我合成的方法，并在生活上给予我很多帮助。

本论文的研究工作完成也要感谢合作者，辽宁大学于海波教授、科技设计大学刘晓刚教授和华东理工大学杨有军教授。

本论文的完成也离不开课题组师兄师姐师妹师弟在实验和生活上的无私帮助。

最后，我想把本论文献给我的挚爱郑莹和我的父母，是他们一直理解并且不断给予我工作支持，是他们成就了本论文的工作。

作者简介

姓名：叶智伟

性别：男

出生年月：1990 年 10 月

民族：汉

籍贯：江西省贵溪市

研究方向：荧光染料及超分辨成像

简历：

2007 年 9 月-2011 年 6 月 大连理工大学 精细化工专业，学士

2011 年 9 月-2019 年 12 月 大连理工大学 应用化学专业，博士

